

การศึกษาการผลิต การทำให้บริสุทธิ์ และคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลันเนส โดย
เชื้อ *Aspergillus niger* ที่เหนียวน้ำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย
รังสีอัลตราไวโอเล็ต

STUDIES ON PRODUCTION AND CHARACTERISTICS OF XYLANASE
PRODUCED BY AN ULTRAVIOLET INDUCING MUTANT OF
Aspergillus niger

สุนันทา มีชนะ
SUNANTA MEECHANA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

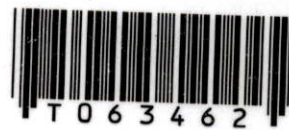
พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2553-2

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการผลิต การทำให้บริสุทธิ์ และคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนส โดย
เชื้อ *Aspergillus niger* ที่เหนียวนำไปเกิดการกลายพันธุ์ด้วย
รังสีอัลตราไวโอเล็ต

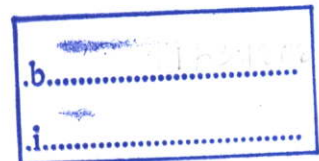
STUDIES ON PRODUCTION AND CHARACTERISTICS OF XYLANASE
PRODUCED BY AN ULTRAVIOLET INDUCING MUTANT OF
Aspergillus niger



สุนันทา มีชนะ

SUNANTA MEECHANA

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 63462
วัน,เดือน,ปี 29 ส.ค. 2549



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2553-2

**STUDIES ON PRODUCTION AND CHARACTERISTICS OF XYLANASE
PRODUCED BY AN ULTRAVIOLET INDUCING MUTANT OF
*Aspergillus niger***

SUNANTA MEECHANA

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LANKRABANG**

2006

ISBN 974-15-2553-2

COPYRIGHT 2006

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LANKHABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการผลิต การทำให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของ เอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อ <i>Aspergillus niger</i> ที่เหนียวนำไปเกิด การกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต
นักศึกษา	สุนันทา มีชนะ
รหัสประจำตัว	45064567
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2549
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ.อารี ฤทธิบุรณ์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเหนียวนำไปเกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อ *Aspergillus niger* โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าหลังจากการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตให้กับสปอร์ของเชื้อ *A. niger* ที่เวลา 3.5 นาที เพื่อให้มีความอยู่รอดของเชื้อ *A. niger* เหลือประมาณร้อยละ 10 สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายบนอาหาร minimal medium โดยพบว่าได้สายพันธุ์กลายของเชื้อ *A. niger* จำนวน 18 สายพันธุ์ ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารแข็งที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 6 เชื้อสายพันธุ์กลาย *A. niger* ML 1 มีค่าอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีที่สูงที่สุด (เท่ากับ 3.16) สำหรับที่พีเอชเท่ากับ 7 พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย *A. niger* ML 13 มีค่าอัตราส่วนดังกล่าวสูงสุดเท่ากับ (3.39) และที่พีเอชเท่ากับ 8 ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย *A. niger* ML 249 ที่มีค่าอัตราส่วนดังกล่าวส่วนสูงสุดเท่ากับ 3.61 นอกจากนี้เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 3 ชนิด มาเลี้ยงในสภาวะการเลี้ยงเชื้ออาหารเหลวที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้อาหารสูตรตัดแปลง พบว่าเชื้อ *A. niger* ML 3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสมากที่สุด (18.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสที่สูงกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ของสายพันธุ์ดั้งเดิม (13.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว พบว่าเมื่อใช้ซังข้าวโพดร้อยละ 2 ของน้ำหนักโดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและทริปโติน 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 สามารถส่งเสริมให้มีการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* ML3 ได้ดีที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 118.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย (0.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เชื้อ *A. niger* ML 3 ที่เลี้ยงในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวที่สภาวะเหมาะสมดังกล่าวนี้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (41.90 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ถึง 2.82 เท่า

จากการศึกษาการแยกและการทำเอนไซม์ไซลาลเนสทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนโดยการนำเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้นร้อยละ 70 ของความอิ่มตัว ตามด้วยการทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีการอัลตราฟิวเตรชัน (ultrafiltration) และแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้เจลฟิวเตรชันชนิดเซฟลาคริลเอส -100 (gel filtration Sephacryl S-100) และโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิดดีอีเออี-ไฮแทรป เซฟลาโรส (DEAE-Hitrapp Sepharose) ได้เอนไซม์ไซลาลเนสที่มีความบริสุทธิ์ 4.97 เท่า เมื่อศึกษาถึงปัจจัยที่มีต่อคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลาลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน พบว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 4.5 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความคงตัวดีที่สุดที่ พีเอช 4.5 (ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (เป็นเวลา 30 นาที) นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิดโซเดียมโดดีซิล-ซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจล (SDS-PAGE) พบว่าเอนไซม์ไซลาลเนสที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนนี้มีแถบโปรตีนเกิดขึ้น 4 แถบ คือมีน้ำหนักโมเลกุล 16, 15.7, 15.4 และ 15.2 คาลตัน สำหรับการศึกษาคูณลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ไซลาลเนสมีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 3.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 250 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ เมื่อใช้ไซแลนเป็นสับสเตรต

Thesis Title	Studies on production and characteristics of xylanase produced by an ultraviolet inducing mutant of <i>Aspergillus niger</i> .
Student	Miss Sunanta Meechana
Student ID.	45064567
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2006
Thesis Advisor	Asst. Prof. Aree Rittiboom

ABSTRACT

From the studies on inducing mutation of *Aspergillus niger* using ultraviolet irradiation found that after exposing the fungal spores under UV for 3.5 minutes the percentage of survival of the spores was reduced to 10 %. The irradiated fungal spores were plated on a minimal medium containing xylan as the only carbon source and a total of eighteen mutants of *A. niger* were screened for xylanase activity by measuring the ratio between the size of the diameter of the clear zone formed around the colony and the diameter of colony. The result demonstrated that the mutant strains ML1, ML13 and ML 249 had the maximum ratios of 3.16, 3.39 and 3.61, respectively. Moreover, when the *A. niger* mutant strains were grown in a modified liquid medium, it was found that *A. niger* ML 3 produced the highest amount of xylanase when xylan was used as the carbon source (18.56 U/ml). This value was higher than that from the wild type (13.11 U/ml).

The optimal liquid culture conditions for xylanase production by the mutant strain ML 3 were as follows: 2 % (w/v) corncobs (as carbon source), 3 % tryptone nitrogen/litter (as nitrogen source) and the initial pH 6.0. Under these conditions, the highest xylanase activity was 118.21 U/ml whereas small amount of cellulase activity (0.10 U/ml) was found. The xylanase produced by *A. niger* ML 3 under these conditions was found higher than that of the wild type for 2.82 fold.

The culture broth of partially from *A. niger* ML3 was purified by 70 % saturated ammonium sulfate precipitation, followed by ultrafiltration and separated by gel filtration with Sephacryl S-100 and DEAE-Hitrap Sepharose column chromatography. The specific activities of the purified xylanase were increased approximately 4.97 fold. The optimal pH and temperature partially of the purified xylanase were 4.5 and 50 °C, respectively. It was stable at pH and

temperature of 4.5 (at 4 °C for 24 hours) and 40 °C (for 30 min), respectively. By SDS-PAGE, the partially purified xylanase contained four protein bands with the molecular weights of 16, 15.6, 15.4 and 15.2 kilodaltons. When xylan was used as a substrate, the values of apparent K_m and V_{max} were 3.60 mg/ml and 250 μ mol/ml/min, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้เนื่องจากความช่วยเหลือและความเมตตาจากคณาจารย์ คุณพ่อคุณแม่ พี่น้อง เจ้าหน้าที่ในฝ่ายต่างๆ พี่และน้องปริญญาโททุกท่าน ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาและผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ที่คอยให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำงานวิจัยวิทยานิพนธ์ อีกทั้งยังช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ประธานคณะกรรมการสอบ รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี จิตาภิชิต ผู้ทรงคุณวุฒิภายในภาควิชา และ ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง ผู้ทรงคุณวุฒิก่อนนอกภาควิชาที่ให้คำแนะนำและช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ สั่งสอนให้ความรู้และเป็นທີ່ปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด

กราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกแก่ข้าพเจ้าในการดำเนินงานวิจัย

กราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษาศาสตร์ เจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยอำนวยความสะดวกด้านการเรียนและดำเนินการสอบ

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้อง ที่เข้าใจ ให้กำลังใจและกำลังทรัพย์ในการศึกษาเล่าเรียนและทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และ น้องๆ นักศึกษาปริญญาโททุกท่านที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุนันทา มีชนะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	XI
สารบัญรูป.....	XII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ไชเลน.....	4
2.2 ไชลานโกลติกเอนไซม์.....	6
2.3 เอนไซม์เซลลูเลส.....	8
2.4 การทำการกลายพันธุ์.....	9
2.5 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์.....	16
2.6 ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไชลานเนส.....	19
2.7 คุณสมบัติของเอนไซม์ไชลานเนส.....	21
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	27
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย.....	29
3.1 วัสดุ.....	29
3.1.1 วัตถุดิบ.....	29
3.1.2 จุลินทรีย์.....	29
3.3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	29
3.1.4 สารเคมี.....	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 อุปกรณ์.....	31
3.3 วิธีการ.....	32
3.3.1 การหาร้อยละของการอยู่รอดสปอร์เชื้อ <i>A. niger</i> หลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ระยะเวลาต่างกัน.....	32
3.3.2 การคัดแยกเชื้อ <i>A. niger</i> สายพันธุ์กลาย.....	33
3.3.3 การคัดเลือกเชื้อ <i>A. niger</i> สายพันธุ์กลาย ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส จากขนาดวงใสรอบโคโลนีในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง.....	34
3.3.4 การคัดเลือกเชื้อ <i>A. niger</i> สายพันธุ์กลาย ที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว.....	34
3.3.5 การศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ <i>A. niger</i> ที่คัดเลือกได้.....	35
3.3.6 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ของเชื้อสายพันธุ์ <i>A. niger</i> ดั้งเดิมและเชื้อสายพันธุ์กลาย.....	36
3.3.7 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	36
3.3.8 การศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และ การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนส.....	36
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	41
4.1 ศึกษาอัตราการอยู่รอดของสปอร์เชื้อ <i>A. niger</i> หลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน.....	41
4.2 คัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อ <i>A. niger</i> หลังจากผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาที่ทำให้มี การอยู่รอดเท่ากับร้อยละ 10.....	42

สารบัญ (ต่อ)

4.3 ผลการศึกษาการคัดเลือกเชื้อ <i>A. niger</i> สายพันธุ์กลาย ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจาก ขนาดวงใสรอบโคโลนีในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง.....	42
4.4 ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ของเชื้อ <i>A. niger</i> สายพันธุ์กลายในสภาวะ การเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวสูตรคัดแปลง.....	46
4.5 การศึกษาหาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ของเชื้อ <i>A. niger</i> ML 3 ที่คัดเลือกได้.....	47
4.6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ของเชื้อ <i>A. niger</i> สายพันธุ์ดั้งเดิมและ เชื้อ <i>A. niger</i> ML 3.....	53
4.7 ผลการศึกษาการทำเอนไซม์ไซลานเนส และการศึกษาคูณลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนส.....	54
บทที่ 5 สรุปผลงานวิจัย.....	70
บรรณานุกรม.....	72
ภาคผนวก ก.....	84
ภาคผนวก ข.....	88
ภาคผนวก ค.....	96
ภาคผนวก ง.....	103
ภาคผนวก จ.....	112

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงอัตราการเกิดมิวเตชันของยีนตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ.....	11
2.2 แสดงค่าแสงและรังสีตามช่วงความยาวคลื่นแสง.....	14
2.3 การทดลองการตกตะกอน โปรตีนและสารละลายเอนไซม์ ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต.....	17
2.4 แสดงช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ ในการตกตะกอนเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์.....	18
2.5 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	22
2.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส จากจุลินทรีย์ต่างๆ.....	24
2.7 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซลานเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ.....	25
4.1 แสดงประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส บนอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ของสายพันธุ์กลายเชื้อ <i>A. niger</i> กับสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่พีเอชเท่ากับ 6.0	43
4.2 แสดงประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส บนอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ของสายพันธุ์กลายเชื้อ <i>A. niger</i> กับสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่พีเอชเท่ากับ 7.0	44
4.3 แสดงประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส บนอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ของสายพันธุ์กลายเชื้อ <i>A. niger</i> กับสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่พีเอชเท่ากับ 8.0	45
4.4 แสดงประสิทธิภาพในการผลิตไซลานเนส โดยเชื้อ <i>A. niger</i> สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม ในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน.....	46
4.5 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตจากเชื้อ <i>A. niger</i> สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในการเลี้ยงเชื้อ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน.....	51

สารบัญตาราง (ต่อ)

4.6 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ร้อยละความอิ่มตัวในช่วงต่างๆของเอนไซม์ไซลาเนส ที่ผลิตจากเชื้อ <i>A. niger</i> ML3.....	55
4.7 ผลการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไซลาเนส จากเชื้อ <i>A. niger</i> ML3.....	60

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ส่วนประกอบของอะราบิโน-4-โอ-เมธิลกลูโคโนไซแลน (ไซแลนในไม้เนื้ออ่อน).....	4
2.2 ส่วนประกอบของโอ-อะซิติล-4-โอ-เมธิล-กลูโคโรโนไซแลน (ไซแลนในไม้เนื้อแข็ง).....	5
2.3 โครงสร้างของโอ-อะซิติล-อะราบิโน-4-โอ-เมธิลกลูโคโลโนไซแลน (ในไม้พืชร่มลูก ตระกูลหญ้า)	6
2.4 แสดงโครงสร้างของไซแลนที่ได้จากพืชและ แสดงบริเวณพันธะที่ย่อยสลายด้วยไซลาโนไลติกเอนไซม์	8
2.5 การทำงานที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซแลน.....	10
2.6 มิวเตชันเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่ความแปรผัน ทางพันธุกรรมและความหลากหลายของสปีชีส์ในกระบวนการวิวัฒนาการ.....	14
2.7 การเกิดไทมินไคเมอร์เนื่องจากผลของแสงอัลตราไวโอเลต	14
2.8 การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยวิธีโฟโตรีแอคทีเวชัน (photoreactivation).....	16
2.9 การซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ถูกทำลายโดยแสงอัลตราไวโอเลต.....	16
4.1 กราฟแสดงอัตราการย่อยสลายของการอยู่รอดของเชื้อ <i>A. niger</i> ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4}	41
4.2 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตไซแลนส โดย <i>A. niger</i> ML 3 ในอาหารเหลว โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน.....	48
4.3 ผลของปริมาณซังข้าวโพดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตไซแลนส โดย <i>A. niger</i> ML 3 ในอาหารเหลว โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน.....	50
4.4 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตไซแลนส โดย <i>A. niger</i> ML 3 ในอาหารเหลว โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน.....	53

สารบัญรูป (ต่อ)

4.5 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อ <i>A. niger</i> และ <i>A. niger</i> ML3.....	54
4.6 โครมาโทแกรมการแยกเอนไซม์ไซลาเนส จากเชื้อ <i>A. niger</i> ML 3 ด้วยคอลัมน์ เซฟลาคริลเอส-100.....	57
4.7 โครมาโทแกรมการแยกเอนไซม์ไซลาเนส จากเชื้อ <i>A. niger</i> ML 3 ด้วยคอลัมน์ คีอีเออี-ไฮเทรป เซฟฟลาโรส.....	59
4.8 ผลของค่าพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ <i>A. niger</i> ML 3 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	61
4.9 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ <i>A. niger</i> ML 3 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	63
4.10 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสจาก เชื้อ <i>A. niger</i> ML 3 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	64
4.11 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส จากเชื้อ <i>A. niger</i> ML3 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	65
4.12 การหาหน้าหนักโมเลกุลเอนไซม์ไซลาเนสที่ผ่านขั้นตอน ในการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนบน SDS-PAGE.....	66
4.13 Lineweaver-Burk plot ของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับร้อยละ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5.....	69

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

การผลิตเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์นั้นเป็นการศึกษาที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถผลิตได้เป็นจำนวนมากและเอนไซม์บางชนิดสามารถใช้ทำงานแทนสารเคมีในการเกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษที่เกิดขึ้นจากสารตกค้างของการเกิดปฏิกิริยาเคมี เอนไซม์ไซลาลเนสผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ และแอคติโนมัยสิค เป็นต้น เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้นั้นได้รับความสนใจในการพัฒนาเพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก เนื่องจากการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสแบบปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular) ซึ่งง่ายต่อการนำมาใช้งาน (Dietmar *et al.*, 1996) กระบวนการผลิตกระดาษจำเป็นต้องฟอกสีเยื่อกระดาษเพื่อกำจัดลิกนินที่เป็นตัวกำหนดคุณภาพของเยื่อกระดาษออก การฟอกสีเยื่อกระดาษนิยมใช้สาร oxidizing agent เช่น คลอรีนและคลอรีนไดออกไซด์ ร่วมกับด่าง ซึ่งสารเหล่านี้เมื่อทำปฏิกิริยากับลิกนินจะก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อมีการใช้เอนไซม์ไซลาลเนสในกระบวนการนั้น เอนไซม์จะเข้าไปย่อยสลายไซลาลินที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสในเยื่อกระดาษ ทำให้เกิดเป็นรูพรุน oxidizing agent ที่ใช้ในการฟอกสีจึงเข้าไปสกัดเอาลิกนินออกได้ง่ายขึ้นทำให้เยื่อกระดาษมีความสว่างมากขึ้น และลดการใช้สารเคมีได้ (Dietmar *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังมีการใช้ไซลาลเนสในอุตสาหกรรมอาหาร การสกัดกาแฟ น้ำมันพืช (Wong and Saddler, 1992) เพิ่มคุณค่าอาหารสัตว์ (Kuhad and Singh, 1993) และการทำน้ำผลไม้ให้ใส (Biely, 1985)

การกลายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลผลิตเป็นวิธีหนึ่งเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ที่ได้รับความสนใจเพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการผลิตที่ดีขึ้น ซึ่งวิธีการทำการกลายพันธุ์มีทั้งที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (Gargham *et al.*, 1993) และเกิดจากการกระตุ้นโดยรังสี แสงที่มีความยาวคลื่นต่ำ เช่น แสงอัลตราไวโอเลต หรือการใช้สารเคมี (Toyama and Toyama, 1990a, b) และได้มีการทดลองการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี (Anwar *et al.*, 1996; Mikhailova *et al.*, 1998; Steiner *et al.*, 1998) และพบว่าการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้กับเชื้อรา (ชวนพิศ ดีเอกนามกุล, 2536) เช่น เชื้อ *Fusarium oxysporum* NTG-19 เป็นเชื้อสายพันธุ์กลายโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตและ N-methyl-N'-nitrosoguanidine (NTG) ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้สูงขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิม (Kuhad *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีการให้ความสนใจในการศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่างๆ เช่น การตกตะกอนโปรตีน อัลตราฟิวเตรชัน เจลฟิวเตรชัน และการ

ใช้คอลัมน์ชนิดแลกเปลี่ยนไอออน เพื่อให้ได้เอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ที่สูงในการย่อยสลายไซเลน Bakir *et al.*, (2001) ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุพบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 53.6 เท่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) และมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงถึง 49.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

งานวิจัยนี้จึงมีการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตแก่เชื้อ *Aspergillus niger* และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนส และมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่สูงขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิมและศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพื่อการใช้เอนไซม์ไซลานเนสที่มีประสิทธิภาพเพื่อประยุกต์ในการใช้งานที่ดีขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ทำการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เชื้อ *A. niger* เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต แยกและคัดเลือก *A. niger* สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

1.2.2 ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลาย ซึ่งได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและพีเอชเริ่มต้น

1.2.3 ทำการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพื่อให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพการทำงานที่ดียิ่งขึ้น ในสภาวะการทำงานที่เหมาะสม

1.3 ขอบข่ายของโครงการวิจัย

1.3.1 ทำการศึกษาการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ด้วยวิธีฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตแก่สปอร์ของเชื้อ *A. niger* ที่ระยะเวลาต่างกัน

1.3.2 ทำการคัดเลือกเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3.3 ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายโดยทำการแปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน และค่าพีเอชเริ่มต้น

1.3.4 ทำการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นเหมาะสม การอัตราพีวเตรชัน เจลพีวเตรชันและการแยกให้บริสุทธิ์โดยการแลกเปลี่ยนประจุ

1.3.5 ศึกษาสถานะการคงตัว สถานะที่เหมาะสมต่อการทำงาน น้ำหนักโมเลกุลและค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไซลานเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อให้ได้สายพันธุ์เชื้อ *A. niger* ที่ผ่านการเหนี่ยวนำกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสสูง

1.4.2 เพื่อศึกษาแนวทางการใช้เป็นแนวทางในการวิจัยขั้นสูงในการขยายขนาดการผลิต (large scale)

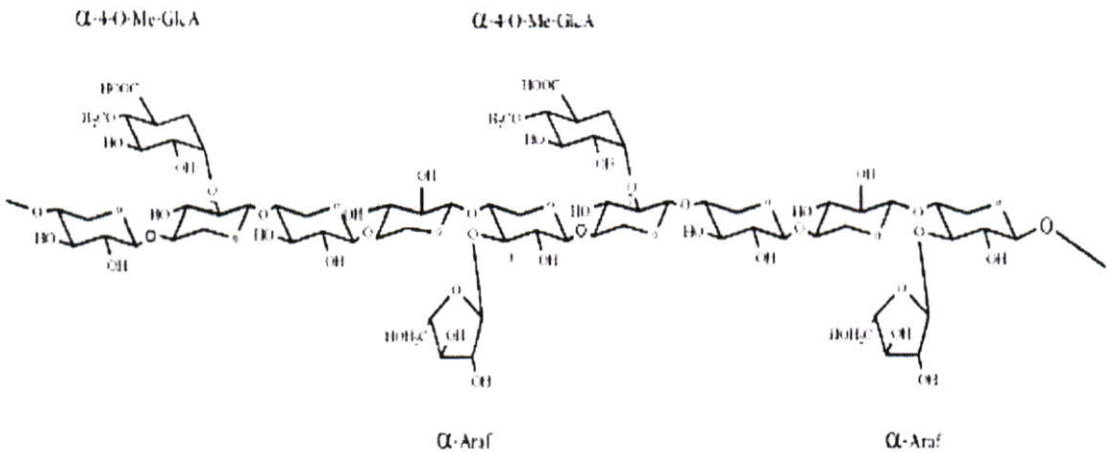
1.4.3 ใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายและราคาถูก

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไซแลน (xylan)

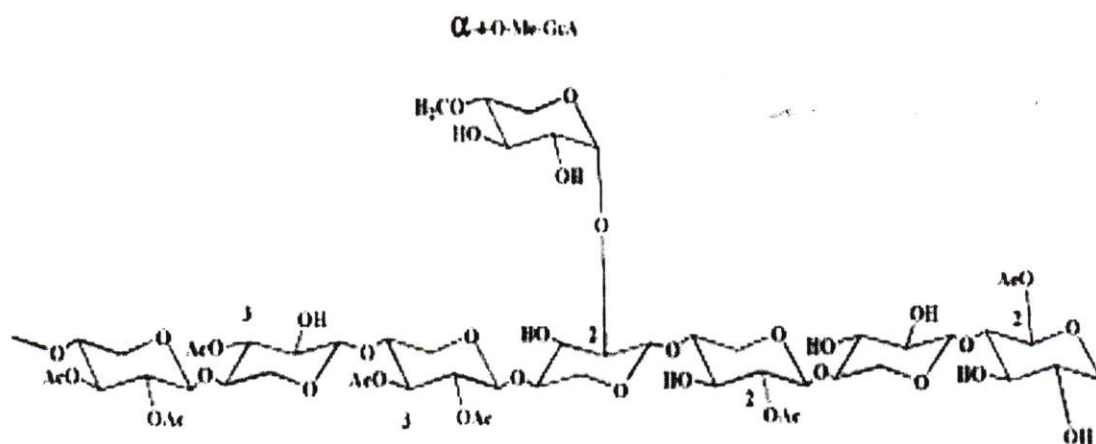
โครงสร้างของไซแลนเป็นคาร์โบไฮเดรตหลักที่พบในผนังเซลล์พืชพบได้ทั้งในไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งพบร้อยละ 7 ถึง 10 และร้อยละ 15 ถึง 30 ตามลำดับสัดส่วน และในไม้ล้มลุกพบมากกว่าร้อยละ 30 ไซแลนมีโครงสร้างหลักที่ประกอบด้วยบีต้าดีไซโลส (β -D-xylose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic linkage) และมีโซ่กิ่งเป็นพวอะซิติก 1,4-โอเมทิล-ดี-กลูโคโรซิด (acetyl-1, 4-O-methyl-D-glucurosyl) และกลุ่มของแอล-อะราบินโนฟูราโนซิล (L-arabinofuranosyl group) ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนมีองค์ประกอบของอะราบินโน-4-โอเมทิล-กลูโคโรโนไซแลน (arabino-4-O-methyl-glucuronoxylan) (รูปที่ 2.1) กรด 4-โอเมทิลกลูคูโรนิก (4-O-methylglucuronic acid) สร้างพันธะอัลฟา-1,2-ไกลโคซิดิก (α -1,2 glycosidic bond) ที่ตำแหน่ง C2 ของไซโลสในโครงสร้างหลักและมีแอล-อะราบินโนฟูราโน (L-arabinofuranoside) เชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักที่คาร์บอนตำแหน่งที่สามของน้ำตาลไซโลส ด้วยพันธะอัลฟา-1,3 ไกลโคซิดิก (α -1,3 glycosidic bond) ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนไม่พบอะซิติก และไซแลนในไม้เนื้ออ่อนมีอัตราส่วนของไซโลสต่อกับกรด 4-โอเมทิลกลูคูโรนิก (4-O-methylglucuronic acid) และเชื่อมต่อกับอะราบินโนส (arabinose) เท่ากับ 8 ต่อ 1.6 ต่อ 1



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบของอะราบินโน-4-โอเมทิลกลูคูโนไซแลน (arabino-4-O-methylglucuronoxylan) (ไซแลนในไม้เนื้ออ่อน)

ที่มา : Viikari et al., (1993)

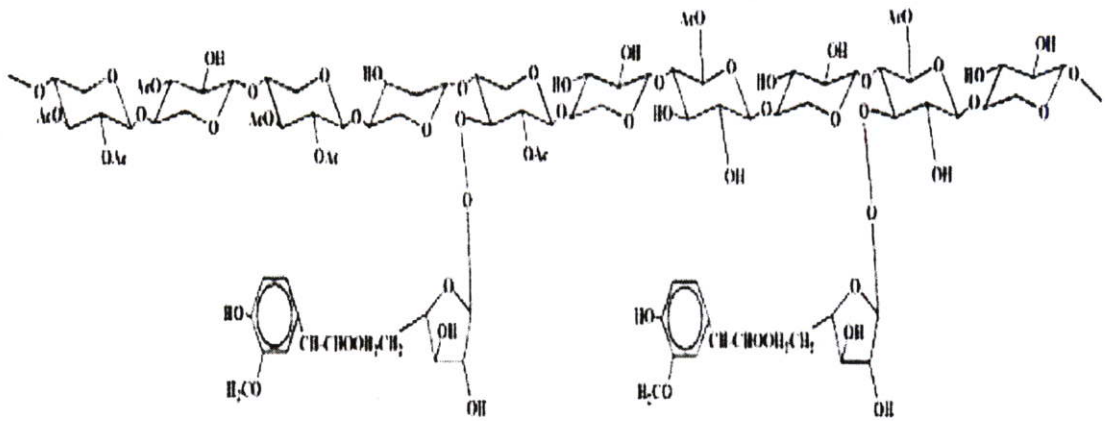
ไซแลนในไม้เนื้อแข็งมีองค์ประกอบของโอ-อะซิติล-เมธิล-4-โอ-กลูโคโรโนไซแลน (O-acetyl-4-O-methyl-glucuronoxylan) (รูปที่ 2.2) ไซแลนในไม้เนื้อแข็งจะมีอัตราส่วนของไซโลส (xylose) ต่อกับกรด 4-โอ-เมธิลกลูโคโรนิกแอซิก (4-O-methylglucuronic acid) ต่อกับกรดอะซิติล (acetic acid) เท่ากับ 10 ต่อ 1 ต่อ 7 โดยที่ไซแลนในไม้เนื้อแข็งมีอะซิติลเชื่อมต่อกับไซโลสในสายโครงสร้างหลักที่ตำแหน่งคาร์บอนตำแหน่งสองหรือสามอยู่เป็นจำนวนมาก และทุกๆ 10 โมเลกุลของไซโลสพบกรด 4-โอ-เมธิลกลูโคโรนิก เชื่อมต่อกับไซโลสที่ตำแหน่งคาร์บอนตำแหน่งที่สองของไซโลส



รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบของโอ-อะซิติล-4-โอ-เมธิล-กลูโคโรโนไซแลน (ไซแลนในไม้เนื้อแข็ง)

ที่มา: Viikari *et al.*, (1993)

ไซแลนในไม้ล้มลุกและพืชตระกูลหญ้ามีองค์ประกอบของโอ-อะซิติล-อะราบิโน-4-โอ-เมธิลกลูโคโรโนไซแลน (O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan) (รูปที่ 2.3) ไซแลนในไม้ล้มลุกมีไซกิ่งมีส่วนของกรด 4-โอ-เมธิลกลูโคโรนิกแอซิกน้อยกว่าในไม้เนื้อแข็ง โดยส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแอล-อะราบิโนฟูรานอซิล (L-arabinofuranosyl) ซึ่งเชื่อมต่อกับไซโลสในโครงสร้างหลักที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองหรือสาม หรือทั้งสองตำแหน่ง นอกจากนั้นพบกลุ่มอะซิติลร้อยละ 2 ถึง 5 เชื่อมที่ตำแหน่งสองและสามในน้ำตาลไซโลสของโครงสร้างหลัก และมีไซกิ่งของอะราบิโนซิล (arabinosyl) ประมาณร้อยละ 6 และมีไซกิ่งของพิกูมาโรซิล (*p*-coumarosyl) ประมาณร้อยละ 3 (Viikari *et al.*, 1993)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของโอ-อะซิติล-อะราบินโน-4-โอ-เมธิลกลูคูโลโนไซแลน ในไม้พืชม้วน
ตระกูลหญ้า

ที่มา : Viikari *et al.*, (1993)

2.2 ไซลาโนไลติกเอนไซม์ (xylanolytic enzymes)

กระบวนการย่อยสลายไซแลนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จะเกิดขึ้นในกระบวนการหมัก โดยสลายแขนงของหมู่อะซิติลในโครงสร้างของไซแลนเป็นผลมาจากเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ เอนโด-1,4-บีต้า-ไซแลเนส (endo-1,4- β -xylanase) หรือไซแลเนสที่เข้าจับที่พอลิแซคคาไรด์และบีต้า-ไซโลซิเดส (β -xylosidase) หรือไซแลเนสที่ย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ไปเป็นดี-ไซโลส (D-xylose) ซึ่งการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะกว่าการใช้สารเคมีในการย่อยสลายเนื่องจากใช้สภาวะการทำงานที่ไม่รุนแรงไม่เกิดสารประกอบที่เป็นพิษและสารเคมีตกค้าง ทำให้สามารถนำน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปใช้ผลิตสารอื่นๆ ต่อไป เอนไซม์ไซแลเนสสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประการ คือการฟอกสีเยื่อกระดาษ การลดความหนืดของอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมอาหาร (Wong and Saddler, 1988) แผนภาพในรูปที่ 2.4 แสดงการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ต่างๆ และบริเวณพันธะที่มีเอนไซม์ย่อยสลาย

ไซแลนมีโครงสร้างที่ซับซ้อน การย่อยสลายไซแลน (ที่มีโครงสร้างซับซ้อน) ได้อย่างสมบูรณ์จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของไซลาโนไลติกเอนไซม์หลายชนิด (ดังรูปที่ 2.5) ซึ่งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลักได้แก่ เอนโดไซแลเนส และบีต้า-ไซโลซิเดส ส่วนเอนไซม์ที่ย่อยสลายส่วนที่เป็นกิ่งก้านได้แก่ อัลฟา-แอล-อะราบินโนฟูรานอซิเดส (α -arabinofuranosidase) อัลฟา-กลูคูโรนิเดส (α -glucuronidase) และอะซิติลไซแลนเอสเตอเรส (acetyl xylanesterase) Haltrich *et al.*, (1994) รายงานว่า *Sclerotium rolfsii* ผลิตเอนไซม์ไซแลเนสและเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส รวมทั้งมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในการย่อยสลาย

ไซแลนไปเป็นไซโลส ไซลานโนไลติกเอนไซม์เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเฮมิเซลลูโลส ไซลานโนไลติกเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.2.1 กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสายสร้างหลัก

2.2.1.1 บีต้า-1,4-เอนโคไซลานเนส (1,4- β -xylan xylohydrolase ; E.C. 3.2.1.8)

ย่อยสลายพันธะบีต้า-1-4 ไกลโคซิดิก (β -1,4 glycosidic) จากด้านในสายของไซแลนแบบสุ่ม การย่อยสลายขึ้นกับชนิดของสารตั้งต้น เช่น ความยาวของสายไซแลนและจำนวนแขนง ช่วงแรกของการย่อยสลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ จากนั้นเกิดการย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ต่อไปจนได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลไตรออส ไซโลไบออสและไซโลสตามลำดับ (Sunna and Antranikian, 1997)

2.2.1.2 บีต้า-ไซโลซิเดส (β -D-Xyloside Xylohydrolase ; E.C. 3.2.1.37)

เป็น exoglycosidase ที่ย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ และไซโลไบออสจากปลายด้าน non-reducing และสามารถย่อยสลายอาดิพีเซิลสับสเตรต (artificial substrate) เช่น พี-ไนโตรฟีนิล-บีต้า-ดี-ไซโรไซด์ (*p*-nitrophenyl- β -D-xyloside) การทำงานของเอนไซม์บีต้าไซโลซิเดสต่อการย่อยสลาย ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ลดลงเมื่อสายของไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายไซแลนได้ในอัตราที่ช้ามาก โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส (Kormelink *et al.*, 1993)

2.2.2 กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายสายกิ่ง

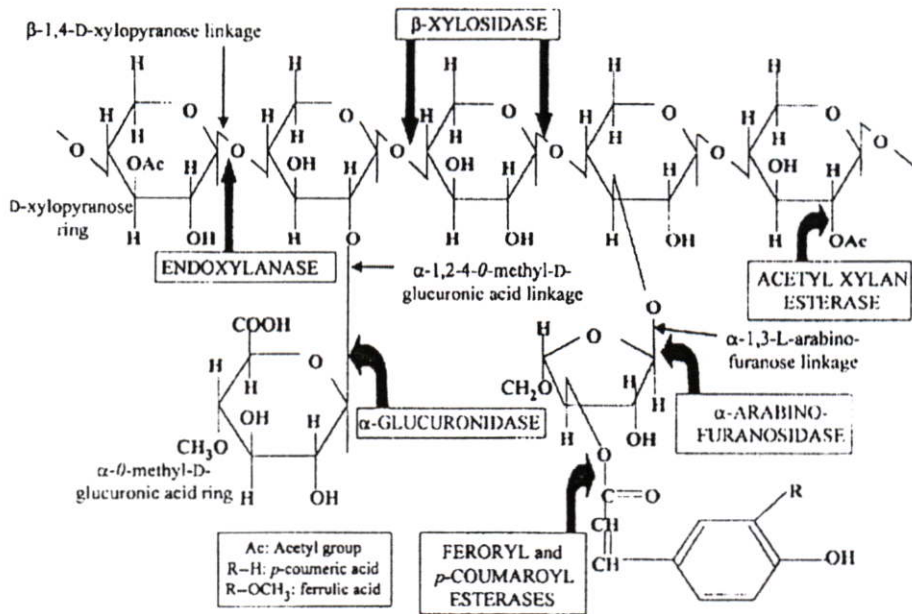
2.2.2.1 อัลฟา-แอล-อะราบินโนฟูรานซิเดส (α -L-arabinofuranosidase ; E.C. 3.2.1.55)

เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายไซแลน โดยเฉพาะไซแลนในไม้เนื้ออ่อน อะราบินโนฟูรานซิเดสแบ่งออกเป็น 2 ชนิดได้แก่ 1) *exo-acting* α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) ซึ่งสามารถย่อยสลาย *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside และส่วนที่เป็นอะราบินแนน 2) *endo-1,5-* α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.99) ย่อยเฉพาะอะราบินแนนที่เป็นเส้นตรงเท่านั้น และพบว่าการทำงานร่วมกันของอัลฟา-แอล-อะราบินโนฟูรานซิเดสกับไซลานเนสทำให้ได้ไซโลส ไซโลไบออสและอะราบินโนส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนเพิ่มขึ้น (Kormelink *et al.*, 1993)

2.2.2.2 อัลฟา-กลูคูโรนิเดส (α -glucuronidase ; EC 3.2.1.139) ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ระหว่างไซโลสและกรดดี-กลูคูโรนิก (D-glucuronic acid) หรือ 4-โอ-เมทิลอีเทอร์ (4-O-methyl

ether) พบในกลูคูโรโนไซแลน ซึ่งความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์อัลฟา-กลูคูโรนิเดสขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา (Kormelink *et al.*, 1993)

2.2.2.3 อะซิทิลไซแลนเอสเตอเรส (acetyl xylan esterase ; E.C. 3.1.1.6) ย่อยสลายพันธะระหว่างอนุพันธ์ของโอ-อะซิทิล (O-acetyl residue) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ในสายของอะซิทิลไซแลน (Kormelink *et al.*, 1993)



รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของไซแลนที่ได้จากพืชและแสดงบริเวณพันธะที่ย่อยสลายด้วยไซลาโนไลติกเอนไซม์

ที่มา : Beg *et al.*, (2001)

2.3 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

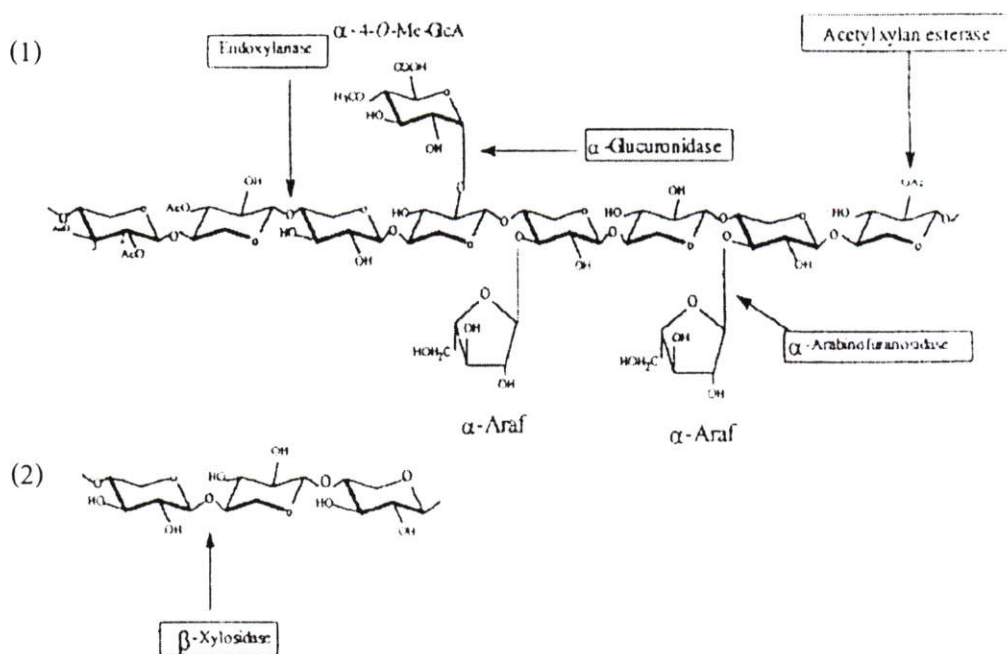
เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีน (glycoprotein) มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตต่อโปรตีนเท่ากับ 1:1 ละลายน้ำได้ ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ หรือโลหะอื่นในการเข้าทำปฏิกิริยา เป็นเอนไซม์เชิงซ้อนประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ส่วนได้แก่ (Enari, 1983)

2.3.1 เอนโดกลูโคเนส (1,4-beta-D-glucanohydrolase ; E.C. 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส เซลโลไบโอส เซลโลไตรโอส ย่อยเซลโลเดรกซ์ตริน (cellodextrin) และไฮโดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (HEC) และสามารถย่อยเซลลูโลสรูปผลึก

(crystalline cellulose) ได้ด้วย ความจำเพาะของเอนไซม์ไม่สูงมากนัก วิเคราะห์เอนไซม์โดยใช้ CMC และ HEC เป็นสับสเตรต

2.3.2 1,4-บีต้า-ดี-กลูแคนเซลโลไบโอไฮโดรเลส (1,4-beta-D-glucan cellulobiohydrolase ; E.C. 3.2.1.9) ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสค้ำ non-reducing ของเส้นสายได้เซลโลไบโอส การศึกษาเอนไซม์นี้ใช้อวิเซล (avicel) และอะมอร์ฟอสเซลลูโลส (amorphous cellulose) เป็นสับสเตรต

2.3.3 บีต้า-กาแลคโตซิเดส (beta-D-glucohydrolase ; E.C. 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอส และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cello-oligosaccharide) ได้กลูโคสแต่ไม่ย่อยเซลลูโลสหรือเซลโลเดรกซ์ทริน การศึกษาเอนไซม์นี้ด้วยการย่อยสลายสับสเตรตในกลุ่มเซลโลไบโอส-พีนโตรฟีนิล-บีต้า-ดี-กลูโคไซด์ (cellobiose-p-nitrophenyl-beta-D-glucoside) หรือซาลิซิน (salicin)



รูปที่ 2.5 (1) การทำงานที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซเลน Ac: Acetyl group; α -Araf:

α -4-O-Me-GlcA: α -4-O-methylglucuronic acid

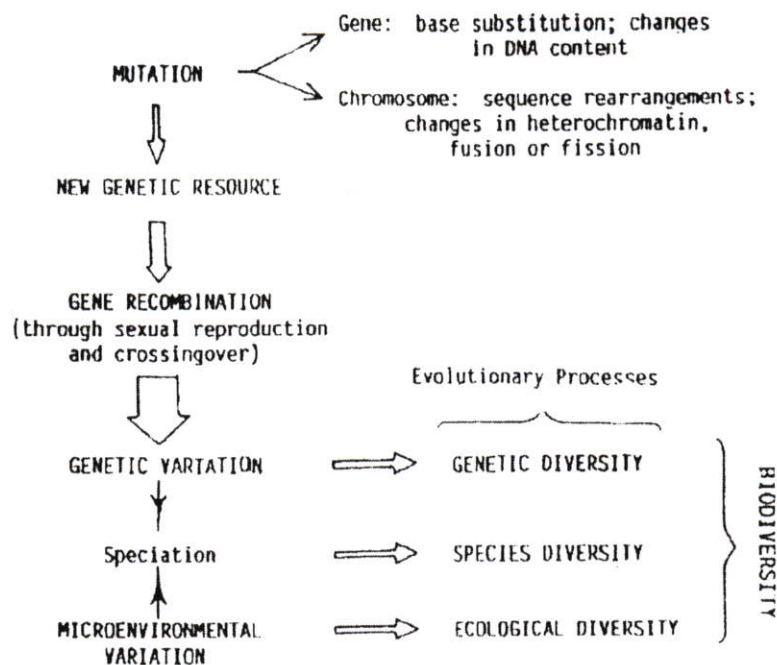
(2) การย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยบีต้าไซโลซิเดส

ที่มา : Sunna and Antranikian (1997)

2.4 การกลายพันธุ์ (mutation)

2.4.1 ความหมายของการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์หมายถึง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับหน่วยควบคุมลักษณะ เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ฉับพลัน และสามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงนี้จะรวมถึงการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม แต่การกลายพันธุ์ในปัจจุบันจะหมายความถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนจากสภาพหนึ่งไปยังอีกสภาพหนึ่ง ดังนั้นอาจเรียกการเปลี่ยนแปลงอันนั้นว่าการกลายพันธุ์ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของดีเอ็นเอ คือ นิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งเข้าไปแทนที่นิวคลีโอไทด์อีกชนิดหนึ่ง (วิสุทธิ ไบไม้, 2533) การกลายพันธุ์เป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิตและเป็นกลไกสำคัญอันดับแรกที่ทำให้เกิดความแปรผันในองค์ประกอบทางพันธุกรรม (genetic variation) ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญสำหรับกระบวนการวิวัฒนาการ แสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 การกลายพันธุ์เป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่ความแปรผันทางพันธุกรรม และความหลากหลายของสปีชีส์ในกระบวนการวิวัฒนาการ
ที่มา: วิสุทธิ ไบไม้ (2533)

2.4.2 การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation)

การกลายพันธุ์ชนิดนี้เป็นผลมาจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติกระตุ้นให้เกิดแปรผันการเกิดทอโทเมอร์ริคชิฟท์ (tautomeric shift) หรือก่อให้เกิดแตกตัวเป็นประจุ (ionization) ในโมเลกุลของเบสดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอ การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีอัตราต่ำมาก อัตราโดยเฉลี่ยประมาณ 10^{-5} - 10^{-10} ต่อเซลล์ต่อรุ่น ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมแตกต่างกันออกไปตามแต่ละตำแหน่ง ชนิดของยีนและชนิดของสิ่งมีชีวิต (ประเสริฐ สันตินานาเลิศ, 2536) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ยีนการกลายพันธุ์อาจเกิดในทางไปข้างหน้า (forward mutation : A \rightarrow a) คือลักษณะปกติเปลี่ยนไปเป็นลักษณะกลาย หรือเกิดขึ้นย้อนกลับ (back mutation : a \rightarrow A) คือจากลักษณะกลายเปลี่ยนกลับไปเป็นยีนปกติตามดั้งเดิม

ตารางที่ 2.1 แสดงอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

สิ่งมีชีวิต	อัตราการเกิดการกลายพันธุ์
ฟาจก์ (T4)	
SM23	1×10^{-4}
SM37	3×10^{-5}
UV102	1×10^{-6}
SM32	2×10^{-7}
UV248	1×10^{-8}
UV237	1×10^{-9}
แบคทีเรีย (<i>Escherichia coli</i>)	
ยีนที่ต่อยาสเตรปโตมัยซิน	4×10^{-4}
ยีนที่ต้องการฮิสทีดิน	2×10^{-6}
ราขนมปัง (<i>Neurospora crassa</i>)	
ยีนที่ไม่ต้องการสารอินซิดอล	1.5×10^{-5}
ยีนที่ไม่ต้องการสารอะดีนีน	4.3×10^{-5}
ยีสต์ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	
ยีนที่ไม่ต้องการอาร์จินีน	9.3×10^{-7}
ยีนที่ไม่ต้องการฮิสทีดิน	3×10^{-9}

ที่มา: วิสุทธิ์ ไบไม้ (2533)

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สิ่งมีชีวิต	อัตราการเกิดการกลายพันธุ์
ข้าวโพด (<i>Zea mays</i>)	
เมล็ดสีแดง	4.9×10^{-4}
เมล็ดสีม่วง	1.1×10^{-5}
เมล็ดมีน้ำตาลสูง	2.4×10^{-4}
แมลงหวี่ (<i>Drosophila melanogaster</i>)	
ตัวสีเหลือง	1.2×10^{-5}
ตาสีขาว	2.9×10^{-5}
มนุษย์ (<i>Homo sapiens</i>)	
กระดูกเล็ก(เตี้ย-แคระ)	3×10^{-5}
เป็นใบ้	1.1×10^{-5}
ตาบอดสี	2.8×10^{-5}
ผิวเผือก	3.7×10^{-6}
กล้ามเนื้อแขนขาลีบ	5×10^{-6}

ที่มา: วิสุทธ์ ไบไม้ (2533)

2.4.3 การกลายพันธุ์แบบเหนี่ยวนำ (induced mutation)

นอกจากจะการกลายพันธุ์จะสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแล้ว การกลายพันธุ์ถูกทำให้เกิดขึ้นได้โดยใช้วิธีการกระตุ้น เช่น จากการใช้รังสีเอกซ์ (X-rays) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ พบว่าอัตราของการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจะสูงกว่าพวกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติประมาณ 150 เท่า

2.4.4 สิ่งที่ทำให้เกิดการการกลายพันธุ์ (mutagens)

สิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่ อุณหภูมิ รังสีต่างๆ ซึ่งรังสีเป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่สำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถแบ่งแสงและรังสีตามช่วงความยาวคลื่นดังตารางที่ 2.2 คลื่นวิทยุ แสงและรังสีคือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีช่วงคลื่นขนาดต่างๆกัน ซึ่งคลื่นวิทยุที่มีช่วงคลื่นยาวมีความยาวระหว่าง 10^4 - 10^{10} ซม. ส่วนแสงที่สามารถมองเห็นได้มีช่วงคลื่น 10^{-4} ซม. (1 ไมครอน) คลื่นที่มีช่วงสั้นกว่า เช่น แสงอัลตราไวโอเล็ต รังสีเอกซ์ จัดเป็นคลื่นที่มีพลังงานสูงเมื่อช่วงคลื่นยังสั้นลงพลังงานยิ่งสูงขึ้นรังสีบางชนิดที่มีพลังงานสูง

จึงสามารถแทรกซึมวัตถุและก่อผลให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจแยกคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

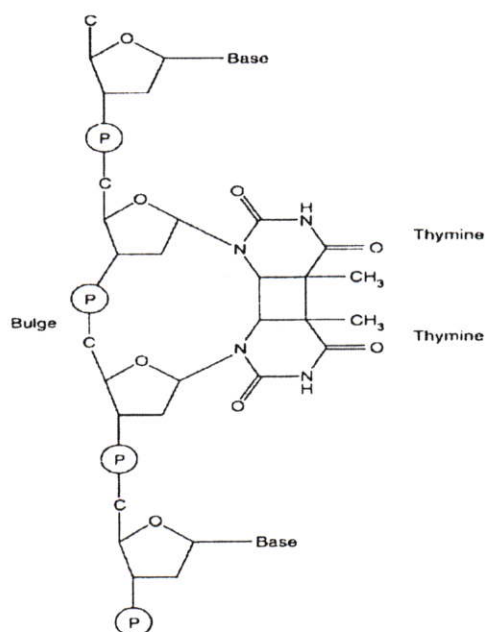
1 รังสี (ionizing radiation) คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหรือพลังงานในรูปมวลที่มีพลังงานสูง เมื่อกระทบกับวัตถุแล้วจะทำให้มีการผลิตไอออน (ions) และรังสีนี้จัดเป็นพวกที่มีพลังงานสูง รังสีมีอยู่หลายชนิดโดยมีแหล่งกำเนิดและพลังงานแตกต่างกัน ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีคอสมิก รังสีอัลฟา และรังสีบีต้า โดยรังสีทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการที่ทำให้เกิดไอออน เมื่อรังสีไปกระทบกับอะตอมของวัตถุก็จะทำให้อะตอมสูญเสียอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่สูญเสียออกไปจะถูกจับไว้โดยอะตอมข้างเคียงจึงทำให้อะตอมนั้นกลายเป็นไอออนที่มีประจุลบ ด้วยเหตุนี้เองไอออนจึงเกิดเป็นคู่ๆ เสมอ รังสีอาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้หลายวิธี เช่น เมื่อไอออนนั้นอยู่ในส่วนของยีน การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดกับไอออนนั้นก็ทำให้ยีนเปลี่ยนแปลงสภาพไป ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือรังสีอาจทำให้น้ำที่อยู่ภายในเซลล์ผลิตไอออนของไฮโดรเจน (H^+) และกลุ่มไฮดรอกซิล (OH^-) และ H^+ จะรวมตัวกับออกซิเจนได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา คืออาจทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โปรตีนหรือโครโมโซมก็ได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับโครโมโซมก็จะทำให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซมหรือเกิดการกลายพันธุ์ของยีนได้

2 แสง (nonionizing radiation) คือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีพลังงานไม่สูงพอที่จะทำให้มีการผลิตไอออนและมีพลังงานต่ำ แสงที่อาจเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ได้แก่ แสงอัลตราไวโอเลต(UV) แสงชนิดนี้มีช่วงคลื่นยาวกว่ารังสีเอกซ์และมีพลังงานต่ำ แสงอัลตราไวโอเลตจึงมีพลังงานต่ำ มักใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับพืช เช่น ใช้กับอัลละอองเกสร เป็นต้น หรือใช้กับไข่แมลงหวี่และใช้ได้ผลดีกับเชื้อแบคทีเรียและไวรัส (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2543) เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตไม่ทำให้มีการผลิตไอออน ดังนั้นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นก็เนื่องมาจากการที่เซลล์รับแสงเข้าไปโดยตรง ส่วนของเซลล์ที่รับแสงได้ดี คือกรดนิวคลีอิกซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเบส โดยเฉพาะที่ไพริมิดีนซึ่งเมื่อเบสกระทบกับแสงอัลตราไวโอเลตก็จะทำให้คุณสมบัติในการจับเกาะของพันธะ (bond) เปลี่ยนไปทำให้มีการจับเกาะระหว่างเบสชนิดเดียวกัน เบสที่จับเกาะกันนี้เรียกว่าเป็นไดเมอร์ (dimer) การจับเกาะที่เกิดขึ้นง่ายที่สุดคือการจับเกาะระหว่างไทมีน (thymine) ซึ่งทำให้เกิดไทมีน ไดเมอร์ (thymine dimer) ดังรูปที่ 2.7 ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนในเส้นนิวคลีโอไทด์เส้นเดียวกันก็จะมีการจัดขวางไม่ให้ดีเอ็นเอแบ่งตัว ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนของเส้นตรงกันข้ามก็ทำให้คุณสมบัติในการจับคู่ของไทมีนกับอะดีนีน(thymine กับ adenine: T-A) เปลี่ยนไป จึงทำให้ไทมีน ไปจับกับกวานีนซึ่งจะยังผลให้ T-A เปลี่ยนไปเป็น C-G ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบทรานซิชัน (transition)

ตารางที่ 2.2 แสดงค่าแสงและรังสีตามช่วงความยาวคลื่นแสง

แสงและรังสี	ช่วงความยาวคลื่น
คลื่นวิทยุ	$10^4 - 10^1$ ซม.
แสงอินฟราเรด (infrared)	$10^2 - 10^3$ ซม.
แสงที่มองเห็น	10^4 ซม.
รังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet)	$10^5 - 10^6$ ซม.
รังสีเอกซ์ (X-rays)	$10^7 - 10^8$ ซม.
รังสีแกมมา (gamma rays)	$10^9 - 10^{10}$ ซม.
รังสีคอสมิก (cosmic rays)	10^{11} ซม.

Kohil *et al.*, (2001) ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Actinomyces thalophilus* ที่เหนียวน้ำ ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต เป็นเวลา 15 นาที นอกจากนั้น Anwar *et al.*, (1996) เหนียวน้ำเชื้อ *Penicillium purpurogenum* P - 26 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตร้อยละ 2-3 เพื่อคัดเลือกลายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ต้านทาน catabolite repression



รูปที่ 2.7 การเกิดไทมินไดเมอร์เนื่องจากผลของแสงอัลตราไวโอเล็ต

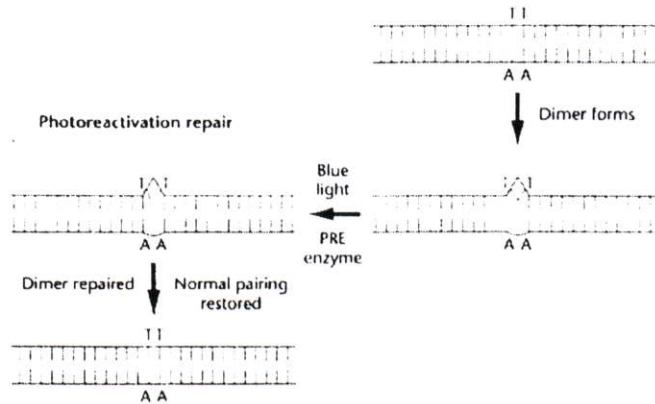
ที่มา: Robert (1993)

2.4.5 การซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair)

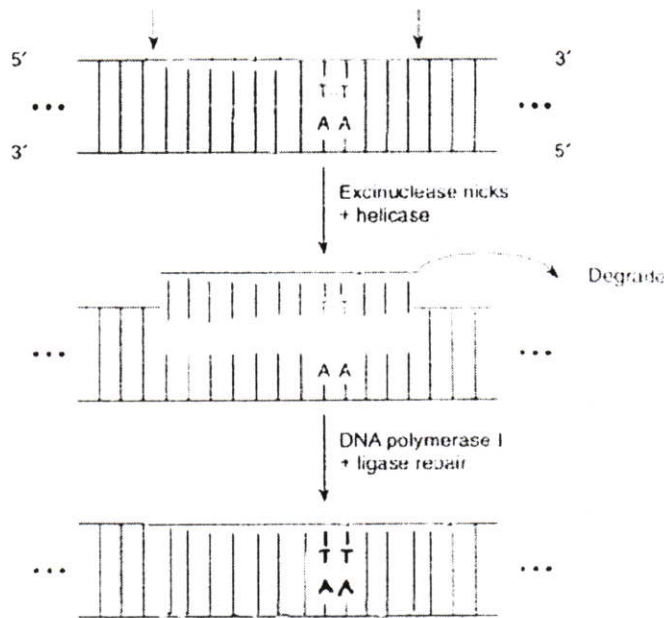
โมเลกุลของดีเอ็นเอถ้าเกิดการเสียหายมากจะมีผลต่อการดำรงชีวิต ดังนั้นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจึงมีกลไกในการซ่อมแซมโมเลกุลดีเอ็นเอที่จะเสียหายให้กลับคืนสู่สภาพปกติให้มากที่สุด ซึ่งกลไกการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอ มีหลายวิธีดังนี้

2.4.5.1 โฟโตรีแอกติเวชัน (photoreactivation) เป็นการซ่อมแซมความผิดปกติของโมเลกุลของดีเอ็นเอ เช่น กรณีที่เกิดไทมีนไคเมอร์เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งเกิดจากการเกาะกันของเบส T ในสายเดียวกันเป็นไซโคลบิวเทนริง (cyclobutane ring) โดยใช้เอนไซม์โฟโตรีแอกติเวติง (photoreactivating enzyme) หรือเอนไซม์ดีเอ็นเอโฟโตไลเอส (DNA photolyase) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้เริ่มต้นด้วย เอนไซม์ดีเอ็นเอโฟโตไลเอสจะเข้าไปเกาะที่ตำแหน่งที่เกิดไทมีนไคเมอร์และเอนไซม์นี้จะดูดซับแสงสว่าง (visible light) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เอนไซม์นี้เข้าทำลายไซโคลบิวเทนริงที่ขี้นระหว่างเบสไทมีนด้วยกัน ทำให้เบสไทมีนสามารถไปเข้ากับเบสอะดีนีนของสายตรงกันข้ามได้เหมือนดั้งเดิม หลังจากนั้นเอนไซม์ชนิดนี้ก็จะหลุดจากตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ผิดปกติ ก็จะได้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปกติเหมือนดั้งเดิม ดังรูปที่ 2.8 (William, 1997) ในกรณีที่เกิดความผิดปกติของโมเลกุลของดีเอ็นเอเนื่องจากมีหมู่เมธิล (methyl group) เกินมาจากปกติที่ตำแหน่ง O⁶ ของเบสกวานีน (O⁶methylguanine) ก็จะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอเอซิลทรานสเฟอเรส (O⁶-mGua DNA methyltransferase : O⁶-mGua) ทำหน้าที่กำจัดหมู่เมธิลที่เกินมาออกจากโมเลกุลของเบสกวานีน ก็จะทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปกติเหมือนดั้งเดิม

2.4.5.2 เอกซ์ซิชั่นรีแพร์ (excision repair) เป็นกระบวนการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ผิดปกติทั่วไป โดยจะมีการตัดส่วนของดีเอ็นเอที่เสียหายหรือผิดปกติออกไปโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และจะมีการเติมส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกต้องแทนส่วนที่ถูกตัดออกไป การซ่อมแซมดีเอ็นเอดังกล่าวนี้มีหลายแบบ เช่น การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เสียหายจากแสงอัลตราไวโอเล็ต เป็นต้น (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2543) โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ตจะเกิดไทมีนไคเมอร์ขึ้นภายในเวลา 1-2 ชั่วโมง ในกรณีที่ไม่มีกระบวนการซ่อมแซมโดยวิธีโฟโตรีแอกติเวชันแล้ว การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดไทมีนไคเมอร์จะเกิดขึ้นโดยมีเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส (endonuclease) ทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 8 นับจากปลาย 5' ของบริเวณที่เกิดไทมีนไคเมอร์และตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 4 นับจากปลาย 3' ของบริเวณที่เกิดไทมีนไคเมอร์ จากนั้นจะมีเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส I (DNA polymerase I) และไลเกส (ligase) ทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องตรงบริเวณช่องว่างที่ถูกตัดออกไปให้สมบูรณ์ (Robert, 1993) ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.8 การซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยวิธีโฟโตรีแอคทีเวชัน (photoreactivation)
ที่มา: William (1997)



รูปที่ 2.9 การซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ถูกทำลายโดยแสงอัลตราไวโอเล็ต
ที่มา: Robert (1993)

2.5 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (enzyme purification)

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยวิธีการหลายกระบวนการ เพื่อแยกส่วนที่ต้องการและสามารถนำมาใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งมีวิธีการที่ใช้ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ดังต่อไปนี้

2.5.1 การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation)

เป็นการแยกโปรตีนออกมาโดยใช้คุณสมบัติการละลายของโปรตีน สารละลายที่ใช้ในการตกตะกอนอาจเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอกอฮอล์ อีเทอร์ อะซิโตน หรือสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นต้น ในการตกตะกอนโปรตีนนั้น นิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Scopes, 1978) เนื่องจาก

2.5.1.1 เป็นการเพิ่มปฏิกริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีน (protein - protein interaction)

2.5.1.2 มีความสามารถในการละลายสูง

2.5.1.3 ความร้อนมีผลต่อการละลายเพียงเล็กน้อยสารละลายอิมัตว์มีความหนืดต่ำ และมีความหนาแน่นต่ำ ทำให้แยกตะกอนโดยการหมุนเหวี่ยงออกได้ง่าย

การตกตะกอนเอนไซม์หรือโปรตีนใดๆ ที่ต้องการ โดยที่ยังไม่ทราบช่วงความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมในการตกตะกอน สามารถทำการทดลองขั้นพื้นฐาน (preliminary test) หรือทำการทดลองสุ่ม (trial fractionation) ในช่วงความเข้มข้นกว้าง ๆ ก่อน แล้วตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ตกตะกอนลงมา ช่วงความเข้มข้นของเกลือช่วงใดที่ให้ร้อยละของเอนไซม์ตกตะกอนลงมา มาก จะนำมาใช้เป็นการเข้มข้นมาตรฐานในการตกตะกอนจริง ตัวอย่างการทำการตกตะกอนแบบสุ่ม ดังตารางที่ 2.3 และตารางที่ 2.4 แสดงช่วงความอิมัตว์ของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ใช้ตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสที่มีรายงานไว้

ตารางที่ 2.3 การทดลองการตกตะกอนโปรตีนและสารละลายเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิมัตว์ในช่วงต่างๆ

การทดลองครั้งที่	ช่วงความอิมัตว์ของแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ)	ปริมาณเอนไซม์ที่ตกตะกอน (ร้อยละ)	โปรตีนที่ตกตะกอน (ร้อยละ)
1	0 – 40	4	25
	40 – 60	62	22
	60 – 80	32	32
	80	2*	21*

หมายเหตุ * เป็นปริมาณเอนไซม์หรือโปรตีนที่ละลายอยู่ในส่วนนั้นๆ

ที่มา : Scopes (1978)

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

การทดลองครั้งที่	ช่วงความอืดตัวของ แอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ)	ปริมาณเอนไซม์ ที่ตกตะกอน (ร้อยละ)	โปรตีนที่ตกตะกอน (ร้อยละ)
2	0 – 45	6	32
	45 – 70	90	38
	75	4*	30*
3	0 – 48	10	35
	48 – 65	75	25
	65	15*	40*

หมายเหตุ * เป็นปริมาณเอนไซม์หรือโปรตีนที่ละลายอยู่ในส่วนนั้นๆ

ที่มา : Scopes (1978)

ตารางที่ 2.4 แสดงช่วงความอืดตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนเอนไซม์ไซลาลเนส
ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	ความเข้มข้นของ แอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ)	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	60	Ito <i>et al.</i> , (1992)
<i>Aspergillus ochraceus</i> (mutant)	30-60	Biswas <i>et al.</i> , (1990)
<i>Aurebasidium pullulans</i> Y -311-1	30-50	Li <i>et al.</i> , (1993)
<i>Bacillus pumilus</i> IPO	20-60	Panbangred <i>et al.</i> , (1983)
<i>Streptomyces roseiscleroticus</i>	30-50	Grabski and Jeffries (1991)
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	80	Christakopoulos <i>et al.</i> , (1996)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> CS-185	30-50	Chen <i>et al.</i> , (1997)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	60-80	สมรภัทร์ พันธุ์ผล (2537)
<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 9363	40-75	Bakir <i>et al.</i> , (2001)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (mutant)	65	Bakalova <i>et al.</i> , (2002)

2.5.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography)

โครมาโทกราฟีเป็นกระบวนการที่นิยมในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โครมาโทกราฟีมีหลายแบบ เช่น โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography) โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography) และเจลฟิวเตรชันโครมาโทกราฟี (gel filtration chromatography) เป็นต้น ซึ่งในการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีจะเกี่ยวข้องกับ 2 ส่วนคือ ส่วนที่อยู่กับที่ (stationary phase) และส่วนที่เคลื่อนที่ (mobile phase) วิธีการแยกแบบโครมาโทกราฟีนี้จะอาศัยความแตกต่างของขนาด ลักษณะ ประจุ คุณสมบัติในการละลายและดูดซับ (Plummer, 1987) เจลฟิวเตรชันเป็นการแยกโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล แต่โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุเป็นการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของประจุของโมเลกุลสาร โดยสารจะจับอยู่กับตัวค้ำจุน (matrix) ที่มีรูพรุนและมีประจุ ซึ่งเรียกว่า ion exchange resin โดยเรซินที่มีประจุบวกก็จะมีประจุลบมาจับด้วยพันธะไอออนิก ประจุเหล่านี้เรียกว่า counter ions (anions) เรียกตัวแลกเปลี่ยนนี้ว่า anion exchangers และกรณีที่เรซินเป็นประจุลบ และมี counter ions เป็นประจุบวก (cations) ตัวแลกเปลี่ยนนี้เรียกว่า cation exchanger ดังนั้น anion exchangers จะทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนประจุลบและ cation exchanger จะทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนประจุบวกจากสารละลาย

2.6 ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลันเนส

2.6.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์ การเป็นแหล่งพลังงานและการสังเคราะห์เซลล์ ซึ่งในการผลิตเอนไซม์ไซลันเนสจากจุลินทรีย์นั้น จำเป็นต้องมีแหล่งคาร์บอนที่เป็นเฮมิเซลลูโลส เช่น ไซแลน เป็นต้น ซึ่งจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหนียวทำให้เกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลันเนส

Gasper *et al.*, (1997) ได้ศึกษาการผลิตไซลันโนไลติกเอนไซม์โดยเชื้อ *Penicillium caneseens* 10-10C พบว่าการผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ถั่วเหลืองป่นหรือฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อใช้กลูโคส ไซโลส และกาแลคโทสนั้นจะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ ซึ่ง Alam *et al.*, (1994) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลันเนส และศึกษาลักษณะของไซลันเนสที่ทนอุณหภูมิสูงจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* สายพันธุ์ RT 9 และ BJT9 และเปรียบเทียบกับเชื้อ *Thermoascus aurantiacus* โดยเลี้ยงบนอาหารที่มีลิกโนเซลลูโลสในสภาวะการหมักบนอาหารแข็ง พบว่าจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดสามารถผลิตไซลันเนสโดยใช้รำข้าวสาลี เป็นสับสเตรด ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเชื้อ *T. lanuginosus* นั้นสามารถผลิตไซลันเนสที่ปราศจากเซลลูเลสได้ ส่วนเชื้อ *T. aurantiacus* นั้นมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเล็กน้อยไซแลนร้อยละ 0.7 ที่เติมลงในอาหารที่ใช้

ในการบ่มนั้นเหนียวทำให้เกิดการผลิตไซลานเนสในเชื้อ *T. lanuginosus* เพิ่มขึ้นร้อยละ 28.0 และงานวิจัยของ Kuhad *et al.*, (1998) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยสายพันธุ์กลายเชื้อ *Fusarium oxysporum* NTG-19 พบว่าการใช้เศษวัสดุเหลือทางการเกษตร และไซแลน รำข้าวสาลีร้อยละ 4 น้ำหนักต่อปริมาตร จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด ซึ่ง Siedenberg *et al.*, (1998) พบว่าเชื้อ *Aspergillus awamari* CBS 11.5 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นสับสเตรตนั้น มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้ไซโลสเป็นสับสเตรต และงานวิจัยของ Hoq and Decker (1995) เปรียบเทียบการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* สายพันธุ์ RT9 และ MH4 ในอาหารเหลวโดยแปรผันแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้ขังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ทำให้เชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสโดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์บีต้าไซโลซิเดสเท่ากับ 2.6 และ 6.5 นาโนคิตาล/มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการใช้ไซแลน และรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และ Saha (2001) ใช้เชื้อ *Fusarium oxysporum* NRRL 26518 ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยใช้ขังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถใช้เส้นใยข้าวโพดได้ถึงร้อยละ 60 ในการผลิตไซลานเนสได้ 8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในการเลี้ยงเชื้อระดับฟลาสก์ที่มีอาหาร 50 มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *Fusarium verticillioides* ที่ใช้ birchwood xylan เป็นสับสเตรต นอกจากนี้ Ufuk *et al.*, (2001) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Rizopus oryzae* โดยการหมักในอาหารเหลวที่ใช้ขังข้าวโพดร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส สูงที่สุดเท่ากับ 2.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการหมัก ซึ่งสูงกว่าการใช้รำข้าวสาลี เปลือกข้าวสาลี ถั่วเหลืองบดและไซแลนในสภาวะทดลองเดียวกัน

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการนำไปใช้แตกต่างกัน เพื่อให้เซลล์มีการเจริญเติบโตและสามารถมีผลผลิตเอนไซม์ที่สูง ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจึงขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์

Rotto *et al.*, (1992) รายงานว่า *Bacillus circulans* VTT-E-87-305 สามารถใช้ ไซแลนจากบิชเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้น้ำขังข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุดในการผลิตไซลานโนไลติกเอนไซม์ Hoq *et al.*, (1994) ใช้เชื้อ *Thermomyces lanuginosus* RT 9 ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยใช้เปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าการใช้แอมโมเนียมฟอสเฟต และ Ufuk *et al.*, (2001) พบว่าเชื้อ *Rizopus oryzae* โดยการเจริญในอาหารเหลวที่ใช้ขังข้าวโพดร้อยละ 3 ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนจากถั่วเหลืองบดร้อยละ 1 และแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 ของน้ำหนักโดยปริมาตรนั้นส่งเสริมการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงสุดเท่ากับ 23.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ามากกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนจากอื่นๆ เช่น ยีสต์สกัดร้อยละ 1 ร่วมกับทริปโตเนร้อยละ 1 เป็นต้น

ส่วน Kohil *et al.*, (2001) มีรายงานว่าเชื้อ *Thermoactinomyces thalophilus* มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 23.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการใช้ ทริปโตเนร้อยละ 0.1 น้ำหนักโดยปริมาตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในเวลา 96 ชั่วโมง นอกจากนั้น Smith and Wood (1991) ศึกษาผลของการแปรผันแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ยีสต์สกัด เปปโตเน ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรด คาซิโตน (casitone) และน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) เป็นแหล่งไนโตรเจนกับเชื้อ *Aspergillus awamori* CMI 142717 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในระดัปลาสก์ พบว่าคาซิโตน (casitone) นั้นส่งเสริมการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีที่สุด ซึ่งให้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 15.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.6.3 ค่าพีเอชเริ่มต้น

พีเอชที่เหมาะสมต่อสภาพการเจริญของจุลินทรีย์นั้นเป็นสิ่งสำคัญอีกปัจจัยหนึ่ง โดยที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความชอบต่างกัน เช่น จุลินทรีย์บางชนิดชอบสภาพที่เป็นกรด บางชนิดชอบสภาพที่เป็นด่าง ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมพีเอชให้เหมาะสมเพื่อให้เกิดผลผลิตสูงสุด

Kang *et al.*, (1996) พบว่าเชื้อ *Cephalosporium sp.* RYM-202 เป็นเชื้อที่สามารถเจริญในสภาพที่เป็นด่างได้ดี โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสระหว่าง 9.5 ถึง 10.0 เมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 7.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน Hoq *et al.*, (1994) พบว่าเชื้อ *T. lanuginosus* RT9 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยปราศจากเอนไซม์เซลลูเลส ในอาหารเหลวที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นในช่วง 5.0 ถึง 8.0 พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 6.6

2.7 คุณลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนส

2.7.1 ค่าพีเอชที่เหมาะสมและค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลานเนส

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชหรือความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน ทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงหรือเพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากพีเอชมีผลต่อการแตกตัวของสับสเตรตซึ่งมีผลต่อการจัดรูปร่างและสถานะของไอออนของเอนไซม์และสับสเตรต (มุกดา จิตะสุด, 2527) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชมากๆอาจทำให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพ ซึ่งมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ ดังนั้นเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดในช่วงพีเอชที่เหมาะสมหนึ่งเรียกว่า พีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการเกิดกิจกรรมเอนไซม์นั้นๆ ซึ่งเอนไซม์ไซลานเนสที่มีความคงตัวที่ค่าพีเอชในช่วงกว้างขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และลักษณะเฉพาะในการทนกรดทนด่างของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสของจุลินทรีย์ต่างๆ แสดงได้ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	พีเอชที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus awamori</i> CMI 142717	5.5-6.0 (endo I) 5.0 (endo II) 4.0 (endo III)	Kormelink <i>et al.</i> , (1993)
<i>Aspergillus niger</i>	6.0 (Xylanase I) 5.5 (Xylanase II)	Fredrick <i>et al.</i> , (1985)
<i>Aspergillus niger</i>	5.0	Ricardo <i>et al.</i> , (1985)
<i>Aspergillus niger</i>	4.9	Shei <i>et al.</i> , (1985)
<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 1308	5.5 (Xyla) 4.5 (XylB) 2.0 (XylC)	Ito <i>et al.</i> , (1992)
<i>Aspergillus ochraceus</i> (mutant)	6.0	Biawas <i>et al.</i> , (1990)
<i>Aspergillus sp.</i>	4.5	Kinoshita and Svarachorm (1983)
<i>Aureobasidium pullulans</i> Y-2311-1	4.8	Li <i>et al.</i> , (1993)
<i>Bacillus pumilus</i> IPO	6.5	Panbangred <i>et al.</i> , (1983)
<i>Cryptococcus flavus</i> IFO 0407	4.5	Nakannish <i>et al.</i> , (1984)
<i>Streptomyces roseiscleroticus</i>	6.5-7.0	Grabski and Jeffries (1991)
<i>Trichoderma koningii</i> G-39	5.5	Huang <i>et al.</i> , (1991)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> CS-185	5.0-6.0	Chen <i>et al.</i> , (1997)
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	6.0	Christakopoulos <i>et al.</i> , (1996)
<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 9363	4.5	Bakir <i>et al.</i> , (2001)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (mutant)	6.7	Bakalova <i>et al.</i> , (2002)

Nakanish *et al.*, (1984) ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไซลานเนสจาก *Cryptococcus flavus* IFO 0407 ในช่วงพีเอช 2.0 – 10.0 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอช 3.0 – 8.0 Frederick *et al.*, (1985) พบว่าเอนไซม์ไซลานเนส I จากเชื้อ *Aspergillus niger* มีความคงตัวสูงที่ พีเอชเท่ากับ 5.0 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่งในเวลา 20 นาที ในขณะที่เอนไซม์ไซลานเนส II มีค่าความคงตัวที่พีเอชเท่ากับ 6.0 โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่งในเวลา 75 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส Kormelink *et al.*, (1993) ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Aspergillus awamari* CMI 142717 ที่สามารถมีกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส I ได้ดีในช่วงพีเอชเท่ากับ 5.5 – 6.0 ซึ่งมีค่าความคงตัวในช่วงพีเอชเท่ากับ 3.0 -10.0 เอนไซม์ไซลานเนส II ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 5.0 และเอนไซม์ไซลานเนส III เท่ากับ 4.0 โดยเอนไซม์มีความคงตัวได้ในช่วงพีเอชเดียวกันกับไซลานเนส I ส่วน Alam *et al.*, (1994) พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* มีค่าความคงตัวในช่วงพีเอชเท่ากับ 5.0 – 11.0 โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 6.0 นอกจากนี้ Christakopoulos *et al.*, (1996) พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* F3 เท่ากับ 6.0 โดยมีค่าความคงตัวในช่วงพีเอช 4.0 – 10.0 เมื่อบ่มเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.7.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมและค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลานเนส

การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อุณหภูมิที่สูงมากๆทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลงเนื่องจากเอนไซม์เสียสภาพ จึงมีอุณหภูมิหนึ่งเท่านั้นที่ทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเรียกว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละจุลินทรีย์ แสดงได้ดังตารางที่ 2.6

Fredrick *et al.*, (1985) พบว่า *Aspergillus niger* ที่ผลิตไซลานเนส I และไซลานเนส II นั้นมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 45 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียส โดยสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากการศึกษาของ Kinoshita and Svarachom (1983) โดยบ่มเอนไซม์ไซลานเนสของ *Aspergillus*. sp. ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังมีความคงตัวดีและที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่ง และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ที่ 60 องศาเซลเซียส และ Bakir *et al.*, (2001) ไซลานเนสจากเชื้อ *Rizopus oryzae* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส โดยสามารถเกิดกิจกรรมเอนไซม์ได้ในช่วงอุณหภูมิ 30 – 60 องศาเซลเซียส โดยกิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์คงเหลือร้อยละ 40

ตารางที่ 2.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus awamori</i> CMI 142717	55 (endo I) 50 (endo II) 45-50 (endo III)	Kormelink <i>et al.</i> , (1993)
<i>Aspergillus niger</i>	45 (Xylanase I) 50 (Xylanase II)	Fredrick <i>et al.</i> , (1985)
<i>Aspergillus niger</i>	40-45	Ricardo <i>et al.</i> , (1985)
<i>Aspergillus niger</i>	45	Shei <i>et al.</i> , (1985)
<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 1308	60 (Xyla) 55 (XylB) 50 (XylC)	Ito <i>et al.</i> , (1992)
<i>Aspergillus ochraceus</i> (mutant)	50	Biawas <i>et al.</i> , (1990)
<i>Aspergillus sp.</i>	60	Kinoshita and Svarachorm (1983)
<i>Aureobasidium pullulans</i> Y-2311-1	54	Li <i>et al.</i> , (1993)
<i>Streptomyces roseiscleroticus</i>	60	Grabski and Jeffries (1991)
<i>Trichoderma koningii</i> G-39	60	Huang <i>et al.</i> , (1991)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> CS-185	45	Chen <i>et al.</i> , (1997)
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	60	Chritstakopoulos <i>et al.</i> , (1996)

2.7.3 น้ำหนักโมเลกุล

เอนไซม์ไซลานเนสมีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างต่ำ ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซลานเนสจะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ แสดงได้ดังตารางที่ 2.7

Kormelink *et al.*, (1993) เอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Aspergillus awamari* CMI 142717 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ววิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ไซลานเนส I มีน้ำหนัก

โมเลกุล เท่ากับ 39 กิโลดาลตัน ไชลานเนส II มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 23 กิโลดาลตัน และเอนไซม์ ไชลานเนส III มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 26 กิโลดาลตัน ซึ่ง Shei *et al.*, (1985) พบว่าไชลานเนสจาก เชื้อ *Aspergillus niger* มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมากคือเท่ากับ 14 กิโลดาลตัน นอกจากนั้น Christakopoulos *et al.*, (1996) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไชลานเนสจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* F3 ได้เท่ากับ 23.5 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับไชลานเนสจากเชื้อ *Themomyces lanuginosus* (mutant) คือเท่ากับ 24 กิโลดาลตัน

ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลส นั้น Hurst *et al.*, (1977) พบว่าเชื้อ *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 26 กิโลดาลตัน ในขณะที่ Okada (1985) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger* มีน้ำหนักโมเลกุล 31 กิโลดาลตัน นอกจากนั้น Araujo and Souza (1986) รายงานว่าเชื้อ *Aspergillus terreus* ATCC 52430 ผลิตเอนโคกลูคาเนส I และ II ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 78 กิโลดาลตัน และ 16 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

ตารางที่ 2.7 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไชลานเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus awamori</i> CMI 142717	39 (endo I) 23 (endo II) 26 (endo III)	Kormelink <i>et al.</i> , (1993)
<i>Aspergillus niger</i>	13 (Xylanase I) 18	Fredrick <i>et al.</i> , (1985)
<i>Aspergillus niger</i>	28	Ricardo <i>et al.</i> , (1985)
<i>Aspergillus niger</i>	14	Shei <i>et al.</i> , (1985)
<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 1308	35 (Xyla) 26 (XylB) 29 (XylC)	Ito <i>et al.</i> , (1992)
<i>Aspergillus ochraceus</i> (mutant)	48	Biawas <i>et al.</i> , (1990)
<i>Cryptococcus flavus</i> IFO 0407	25	Nakannish <i>et al.</i> , (1984)
<i>Streptomyces roseiscleroticus</i>	22.6	Grabski and Jeffries (1991)
<i>Trichoderma koningii</i> G-39	21.5	Huang <i>et al.</i> , (1991)

ตารางที่ 2.7 (ต่อ)

จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	เอกสารอ้างอิง
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> CS-185	37.7	Chen <i>et al.</i> , (1997)
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	23.5	Christakopoulos <i>et al.</i> , (1996)
<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 9363	22	Bakir <i>et al.</i> , (2001)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (mutant)	24	Bakalova <i>et al.</i> , (2002)

2.7.4 ค่าทางจลศาสตร์ของเอนไซม์ (enzyme kinetic)

ค่าทางจลศาสตร์ของเอนไซม์ แสดงถึงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะนั้นๆ ซึ่งค่าคงที่ของไมเคิลิส (Michaelis constant, K_m) เป็นค่าที่แสดงความเข้มข้นของซับสเตรต ณ อัตราเร็วครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุด (V_{max}) ที่เอนไซม์สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ Biswas *et al.*, (1990) รายงานว่าค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Aspergillus ochraceus* (mutant) มีค่าเท่ากับ 1×10^{-3} โมลต่อมิลลิลิตร และ 19.6 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมต่อนาที ตามลำดับ ซึ่งค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Streptomyces rseiscleroticus* มีค่าเท่ากับ 7.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 305 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมต่อนาที ตามลำดับ (Grabski and Jeffries, 1991) ซึ่งเชื้อ *Trichoderma koningii* G-39 มีค่า K_m เท่ากับ 0.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า V_{max} เท่ากับ 1.8×10^6 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมต่อนาที (Huang *et al.*, 1991) และจากการศึกษาของ Chen *et al.*, (1997) รายงานว่าเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Trichoderma longibrachiatum* CS-185 มีค่า K_m เท่ากับ 10.1 มิลลิกรัมไซแลนต่อมิลลิลิตร และมีค่า V_{max} เท่ากับ 4,025 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนเชื้อ *Rizopus oryzae* ATCC 9363 ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่มีค่า K_m เท่ากับ 18.5 มิลลิกรัม ไซแลนต่อมิลลิลิตร และมีค่า V_{max} เท่ากับ 90 ใอยูต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Bakir *et al.*, 2001)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Steiner *et al.*, (1998) ได้แยกสายพันธุ์กลายของเชื้อ *Penicillium purpurogenum* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและบีต้า-ไซลาโลซิเดส โดยการเหนี่ยวนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต และนำสายพันธุ์กลายที่ดีที่สุดไปทรัดด้วย N- methyl - N' - nitro - N-nitrosoquandine โดยการใส่สปอร์ที่มีอายุ 7 วัน นำสปอร์ 2×10^7 สปอร์/มิลลิลิตร มาละลายใน

อะซิเตรคบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จากนั้นฉายแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้ระยะห่างจากแหล่งกำเนิดแสง 18 เซนติเมตร ให้มีอัตราการอยู่รอดประมาณร้อยละ 0.1 และนำไปเลี้ยงในอาหาร PDA ที่ไตรอนเอกซ์-100 (trion X - 100) ร้อยละ 0.1 ที่ 28 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่ม 4 วัน จากนั้นนำไปทรีตด้วย N- methyl - N' - nitro - N- nitrosoquanidine ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 0.5 จากนั้นนำโคโลนีกลายพันธุ์ไปเลี้ยงในอาหาร Mandels (1975) เพื่อคัดเลือกรายของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี และคัดเลือกลายพันธุ์ที่ให้อัตราการอยู่รอดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุด พบว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนร้อยละ 0.75 ร่วมกับรำข้าวสาลีร้อยละ 0.25 สายพันธุ์กลายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 124.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สายพันธุ์เดิมผลิตได้ 67 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และจากงานวิจัยของ Fiedurek and Gromada (1997) ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์เชื้อ *Aspergillus niger* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์อะซิเตรคบัฟเฟอร์โดยใช้สารละลายสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตและสารไนโตรควินิดีน (nitroquanidine) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 พบว่าสามารถเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์อะซิเตรคบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม ซึ่ง Kuhad *et al.*, (1998) เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์เชื้อ *Fusarium oxysporum* NTG-19 จากเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ *Fusarium oxysporum* DSM 841 โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตและทรีตด้วย N- methyl - N' - nitro - N- nitrosoquanidine เพื่อผลิตเอนไซม์ไซแลเนสที่มีประสิทธิภาพมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม Wong *et al.*, (1998) ได้แบ่งเอนไซม์ไซแลเนส ออกเป็น 2 ลักษณะ คือ กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ชอบด่าง (alkali xylanase) และกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงคือ เอนไซม์ไซแลเนสที่ชอบกรด (acid xylanase) และเอนไซม์ไซแลเนสจากเชื้อทนด่าง (alkali-tolerant) จากเชื้อ *Fusarium oxysporum* (chistakopoulos *et al.*, 1996) และเชื้อ *Chepalosporium* sp. (Bansod *et al.*, 1993) อาจเป็นข้อดีของการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะการทรีตเยื่อกระดาษในสภาวะเป็นด่าง ซึ่ง Kitrechanich (1984) ได้ศึกษาการทำเอนไซม์ไซแลเนส ให้บริสุทธิ์ 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นเกลืออิ่มตัวร้อยละ 60 และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 27,000 g นาน 20 นาที และละลายด้วยอะซิเตรคบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5 จากนั้นทำไดอะไลซิสด้วยบัฟเฟอร์หลายๆครั้งเพื่อกำจัดเกลือและทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้น ขั้นตอนที่ 2 แยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้เจลฟิวเคชันโครมาโทกราฟี ขั้นตอนที่ 3 แยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography) โดยใช้คอลัมน์ดีอีเอ-เซฟลาโรส ซีแอล-6บี (DEAE-sepharose CL-6B) โดยใช้บัฟเฟอร์ชนิดเดิมที่มีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-0.35 โมลาร์ เป็นตัวชะและทดสอบการย่อยสลายสับสเตรตด้วยเอนไซม์ไซแลเนสที่ได้ และทำการวัดผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการย่อยโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography) บนซิลิกาเจล (silica gel) พบว่าเมื่อเริ่มต้นปฏิกิริยาจะมีไซโล-

โอลิโกแซคคาไรด์ปริมาณเล็กน้อยเกิดขึ้นและเมื่อทิ้งไว้นานขึ้น จะมีการสะสมของไซโลไตรโอส และไซโลไบโอส และเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์มากขึ้นจะมีไซโลสปริมาณเล็กน้อยเกิดขึ้นด้วย Bakir *et al.*, (2001) ได้ศึกษาการผลิตและทำเอนไซม์ไซลานเนสให้กับบริสุทธิ์จากเชื้อ *Rizopus oryzae* ATCC 9363 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงสุดเมื่อในสภาวะที่ใช้ขังข้าวโพด ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 ร่วมกับกากถั่วเหลืองบคร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 260 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุแล้ว พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 55 เท่า มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22 กิโลดาลตัน เอนไซม์ไซลานเนสที่ได้นั้นมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมเท่ากับ 4.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 18.5 มิลลิกรัมไซแลนต่อมิลลิลิตร และ 90 ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัมไซแลน ตามลำดับ ซึ่ง Bakalova *et al.*, (2002) ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* ATCC 44008 จากสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ เจลฟิวเรชัน โครมาโทกราฟี และการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 22 กิโลดาลตัน และจากสายพันธุ์กลายมีน้ำหนักโมเลกุล 24 กิโลดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 5.8 และ 6 ตามลำดับ โดยมีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์จากสายพันธุ์ดั้งเดิม เท่ากับ 7 และ 60 องศาเซลเซียส มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 5.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 385 ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัมไซโลส ตามลำดับ สายพันธุ์กลายที่ค่าพีเอชที่เหมาะสม เท่ากับ 6.7 และอุณหภูมิที่เหมาะสม 70 องศาเซลเซียส มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 3.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 670 ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัมไซโลส ตามลำดับ

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัสดุดิบ

ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อยขนาด 0.75 มิลลิเมตร (เตรียมโดยใช้เครื่องบดอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) และไซแลน (oat spelt xylan) จากบริษัท Sigma, USA

3.1.2 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัยเป็นเชื้อจากดินในธรรมชาติ ซึ่งผ่านการแยกเชื้อจนบริสุทธิ์และผ่านการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วว่าเป็นเชื้อ *Aspergillus niger* (เรวดี ปรีบัว, 2547)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.3.1 อาหาร potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก)

3.1.3.2 อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์ (xylan medium) ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก)

3.1.3.3 อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์สูตรดัดแปลง (เรวดี ปรีบัว, 2547) ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว (ภาคผนวก ก)

3.1.3.4 อาหารสูตร minimal medium (ภาคผนวก ก)

3.1.3.5 อาหารสูตร complete medium (ภาคผนวก ก)

3.1.4 สารเคมี

กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCL)

J.T.Baker

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

Merck

คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC)	Sigma
ไซเลน	Sigma
โซเดียมไนเตรต (NaNO_3)	Sigma
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	Sigma
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	CarloErba Reagenti
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Carlo Erba Reagenti
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Calo Erba Reagenti
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)	Calo Erba Reagenti
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Scharlau
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Calo Erba Reagenti
แมงกานีสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Calo Erba Reagenti
ฟีนอล ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Sigma
แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium persulphate)	Phamacia Biotech
สารละลายผสมอะคริลาไมด์และบิสอะคริลาไมด์ (acrylamide and bis-acrylamide solutions)	Bio-Rad
เทตระเมทิลีนไดเอมีน (TEMED)	Sigma
กรดบอริก (boric acid)	Merck
โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue)	Fluka
เอทานอล (ethanol)	Merck
เมทานอล (methanol)	Scarlau
ทริสเบส (tris base)	Sigma
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Carlo Erba Reagenti
คองโกเรด (congo red)	Fluka
ทวิน 80 (tween 80)	Merck
ยูเรีย (NH_4CONH_2)	Merk

น้ำแช่ข้าวโพด (consteep liquor)	Sigma
กลูโคส (glucose)	Fluka
มอลโตส (maltose)	Carlo Erba Reagenti
เปปโตน (peptone)	Scharlau
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	Scharlau
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	Scharlau
ทริปโตน (tryptone)	Scharlau
ผงวุ้น (agar)	Scharlau

3.2 อุปกรณ์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน (autoclave) บริษัท Tommy Kogyo; SS 325
- ตู้อบเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) SL(Shellab) บริษัท Memert
- เครื่องบ่มเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) บริษัท GALLENKAMP
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow) ISSCO lamina flow บริษัท ISSCO; HS 123
- เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) บริษัท Hermle; Z383K
- กล้องจุลทรรศน์ (light Microscope) บริษัท Olympus; UFX-DX
- เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) บริษัท Barnstad/Thermolyne; SP46920-26
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท Dever Instrument; Model 215
- เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร)
- ตู้อบแห้ง (hot air oven) บริษัท WTB binder; ED53
- เครื่องผสมสาร (vortex) บริษัท IKA; MS 1 Misnishaker
- ไมโครปิเปตต์ (micropipet) บริษัท Pyrex
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Metter; AG240
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) บริษัท Shimadu; UV 1201 V
- เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง Mettler Toledo; PG 803 และ AG 204 ตามลำดับ

คอลัมน์เจลฟิวเตรชัน (gelfiltration column) ขนาด 1.6×100 เซนติเมตร บริษัท Amersham Bioscience

เครื่องอัลตราฟิวเตรชัน (ultrafiltration stirred) บริษัท Amicon ขนาด 47 มิลลิเมตร ใช้เมมเบรนของ millipore ที่ให้สารที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 กิโลดาลตัน ผ่านได้

คอลัมน์ดีไอเออีโครมาโทกราฟี (DEAEcolumn chromatography) ชนิดดีไอเออี - ไฮแทรปเซฟฟลาโรส (DEAE - Hitrap Sepharose) ขนาด 1×5 เซนติเมตร บริษัท Amersham Bioscience

คอลัมน์ขจัดเกลือ (desalting column) บริษัท Amersham Bioscience ขนาด 0.5×5 เซนติเมตร

แฟลคชันคอลเลกเตอร์ (fraction collector) บริษัท Phamacia Biotech; รุ่น Frac- 100

ปั๊ม (Peristaltic Pump) บริษัท Phamacia Biotech; P- 1

อิเล็กโทรโฟริซิส (electrophoresis) บริษัท Amersham Bioscience; รุ่น Hoefer SE 250

เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง (power supply) Apparatus corporation; รุ่น EC570-90

เดซิเคเตอร์ (dessicator)

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer)

เครื่องแก้วต่างๆ

3.3 วิธีการ

3.3.1 อัตราการอยู่รอดของสปอร์ของเชื้อ *A. niger* หลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ระยะเวลาต่างๆ กัน

3.3.1.1 เลี้ยงเชื้อ *A. niger* ที่แยกบริสุทธิ์แล้วจากดินในธรรมชาติ (เรวดี ปรีบัว, 2547) ในอาหารวุ้นแป้ง (PDA) เป็นเวลา 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.3.1.2 เดิมสารละลายทวีน 80 เข้มข้นร้อยละ 0.02 ลงในอาหารวุ้นแป้งที่มีเชื้อ *A. niger* เจริญอยู่เพื่อเตรียมเป็นสารละลายสปอร์

3.3.1.3 นับจำนวนและเตรียมสารละลายสปอร์ให้มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer)

3.3.1.4 นำสารละลายสปอร์เข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่จานเลี้ยงปลอกเชื้อเพื่อนำมาฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต และไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (ชุดควบคุม) อย่างละหนึ่งชุด

3.3.1.5 เตรียมอุปกรณ์ฉายแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยกำหนดให้ งานเพาะเลี้ยงบรรจุสารละลายสปอร์ห่างจากหลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต 15 เซนติเมตร

3.3.1.6 วางงานเลี้ยงเชื้อที่มีสปอร์ของเชื้อที่ต้องการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์บน เครื่องกวนสาร ใส่แท่งกวนสารแม่เหล็กที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในงานเลี้ยงเชื้อ ปรับความเร็วการหมุนแท่ง แม่เหล็กอย่างช้าๆ

3.3.1.7 ฉายแสงอัลตราไวโอเลตให้กับสารละลายสปอร์ในงานเลี้ยงเชื้อ โดยจับเวลาและ เก็บสารละลายสปอร์ในแต่ละช่วงเวลาดังแต่ 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ตามลำดับที่เวลาต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับชุดไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต นำสารละลายสปอร์ 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองหุ้มฟอยด์ และเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.3.1.8 นำมาทำการเจือจางสารละลายสปอร์ที่ความเข้มข้นเหมาะสมเท่ากับ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} จากนั้นนำสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร มานับจำนวนด้วยวิธี pour pate โดยใช้ อาหาร complete medium (Demzin, 1986) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นับจำนวน โคโลนีและคำนวณหาร้อยละของการอยู่รอด (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.3.1.9 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและร้อยละการอยู่รอด เพื่อใช้ในการ คัดเลือกสายพันธุ์กลายต่อไปโดยเลือกระยะเวลาที่เหมาะสม สำหรับการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะใช้เวลาที่ทำให้เซลล์เริ่มต้นตายร้อยละ 90 หรือมีการอยู่รอดร้อยละ 10 (ชวนพิศ ตีเอกนามกุล. 2536)

3.3.2 การคัดแยกเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลาย

3.3.2.1 นำสารละลายสปอร์ของเชื้อ *A. niger* มาผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 3.5 นาที ที่ทำให้เซลล์มีการอยู่รอดร้อยละ 10 (จากข้อ 3.3.1.9) เก็บในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ pour plate ด้วย complete medium บ่มเป็นเวลา 2-3 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ไม้จิ้มฟันฆ่า เชื้อแล้วเขี่ยเชื้อลงบน minimal medium บ่มเป็นเวลา 2 วัน โดยโคโลนีที่ไม่สามารถเจริญใน minimal medium แสดงว่าเป็นสายพันธุ์กลาย

3.3.2.2 นำสารละลายสปอร์ของเชื้อ *A. niger* มาผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตตาม เวลาที่ทำให้เซลล์มีการอยู่รอดร้อยละ 10 (จากข้อ 3.3.1.10) เติมน้ำในอาหาร minimal medium ใน

สภาวะการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และกรองเส้นใยออก จากนั้นเลี้ยงเชื้อต่ออีก 12 ชั่วโมง จากนั้นกรองเส้นใยออกและนำมา spread plate บนอาหาร complete medium เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน และทดสอบสายพันธุ์กลับตามวิธีในข้อ 3.3.2.1

3.3.3 การคัดเลือกเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากขนาดวงโคโลนีในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง

3.3.3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก) ที่มีไซเลนเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและปรับพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ กันคือ 6.0, 7.0 และ 8.0

3.3.3.2 เลี้ยงเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลาย (จากข้อ 3.3.2.2) พบบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนำคอร์กบอยเลอร์ (cork borer) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะโคโลนีเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร PDA นำไปวางตรงจุดกึ่งกลางอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นจึงการวัดขนาดโคโลนี

3.3.3.3 นำมาข้อมสีด้วยคองโกเรด (congo red) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 นาน 15 นาที และล้างออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที ทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงโคโลนีของเชื้อและเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี

3.3.3.4 คำนวณค่าอัตราส่วนของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงโคโลนี กับขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี และเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ดั้งเดิมโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติวางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan' New Multiple-Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากการทดลอง 3 ซ้ำ และคัดเลือกเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายที่มีค่าอัตราส่วนของขนาดวงโคโลนีกับขนาดโคโลนีที่มากกว่าหรือเท่ากับสายพันธุ์ดั้งเดิมมาทำการทดลองต่อไป

3.3.4 การคัดเลือกเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว

3.3.4.1 ใ้สารละลายสปอร์ของเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลาย ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารเหลว (ภาคผนวก ก) ที่มีไซเลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนโดยบรรจุอาหารปริมาณ 70 มิลลิลิตร ใน ฟลasks ขนาด

250 มิลลิลิตร และปรับพีเอชเริ่มต้นให้เท่ากับ 6.0 (Montenecourt and Eveligh, 1977) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

3.3.4.2 เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากฟลาस्कที่เลี้ยงเชื้อในวันที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 ของการเลี้ยงเชื้อมาแยกเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และนำมาวัดค่าพีเอช วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสตามวิธีการของ Tang *et al.*, 1987 และเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีการของ Mandels and Weber (1969) (ภาคผนวก ข)

3.3.4.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อสายพันธุ์กลายจากค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสในวันที่สูงที่สุด โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan' New Multiple-Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากการทดลอง 3 ซ้ำ จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสที่สูงที่สุด โดย 1 ยูนิท หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที

3.3.5 การศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ *A. niger* ที่คัดเลือกได้

3.3.5.1 การศึกษาชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.4.3 ในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารปริมาตร 70 มิลลิลิตร โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน ที่ทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ซึ่งได้แก่ ไชเลน ชั่งข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และชานอ้อย ที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ให้มีขนาด 0.75 มิลลิเมตร โดยให้ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ กับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงและวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

3.3.5.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

จากชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในข้อ 3.3.5.1 นำมาแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็นร้อยละ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ 3.3.5.3 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน

1 แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับไคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

เมื่อได้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากข้อ 3.3.5.1 และข้อ 3.3.5.2 จากนั้นแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อ

การผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสโดยใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต[(NH₄)₂HPO₄] 1.4 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ คือ เปปโตน โมลต์สกัด บีสต์สกัดและน้ำแช่ข้าวโพดที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร และอาหารที่เติมเฉพาะแอมโมเนียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

2 แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์

เมื่อได้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสจากข้อ 3.3.5.1 และข้อ 3.3.5.2 จากนั้นแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสโดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ คือ เปปโตน โมลต์สกัด บีสต์สกัด และน้ำแช่ข้าวโพด โดยกำหนดความเข้มข้นให้เท่ากันคือ 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

3.3.5.3 การศึกษาหาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

ศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้น โดยการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.1, 3.3.5.2 และ 3.3.5.3 ตามลำดับ นำมาแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกันคือ 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ทำการวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

3.3.6 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสของเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์ดั้งเดิมและเชื้อสายพันธุ์กลาย

จากการศึกษาหาชนิดของแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์กลาย และนำมาเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสจากสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ใช้อาหารเหลวสูตรดัดแปลง (จากข้อ 3.1.3.3) ในการเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

3.3.7 วางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสในแต่ละขั้นตอนการศึกษา สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan' New Multiple-Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.8 ศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลาลเนส

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไซลาลเนสจากเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายที่คัดแยกได้ (จากข้อ 3.3.4) นำมาเลี้ยงเชื้อในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวในสภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 5 วัน

โดยใช้ความเข้มข้นสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (จากข้อ 3.3.6) จากนั้นนำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เซลลูเลส ปริมาณโปรตีนละลาย (soluble protein) และนำมาทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

3.3.8.1 การแยกและทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์

1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำน้ำหมักที่ได้มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแบบลำดับส่วน (salt fractionation) เอนไซม์ไซลาเนส โดยแปรผันความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 0-30, 30-50, 50-70, และ 70-90 ตามลำดับ (ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนแสดงดังตารางในภาคผนวก ก) โดยระหว่างการเติมไคแอมโมเนียมซัลเฟตให้เติมสารอย่างช้าๆ และกวนเบาๆ อย่างสม่ำเสมอ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสออกและนำส่วนตะกอนมาละลายด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 โดยใช้ปริมาณบัฟเฟอร์เล็กน้อยจนตะกอนละลายหมด จากนั้นวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เซลลูเลส และโปรตีนละลาย

2 การกำจัดเกลือโดยผ่านคอลัมน์

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1 มากำจัดเกลือโดยด้วยคอลัมน์กำจัดเกลือ (desalting column) โดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 4.8 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เป็นตัวชะที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วจึงทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการอัลตราฟิวเตรชันโดยใช้เมมเบรนที่ให้น้ำหนักต่ำกว่า 10,000 ดาลตัน ผ่านได้ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เซลลูเลส และโปรตีน

3 การแยกเอนไซม์ด้วยเจลฟิวเตรชันโครมาโทกราฟี (gel filtration chromatography)

บรรจุเจลชนิดเซฟลาคริล เอส-100 ลงในคอลัมน์ขนาด 1.6×100 เซนติเมตร แล้วใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 2 เท่าของคอลัมน์ไหลผ่านคอลัมน์เพื่อให้เจลอยู่ในสภาวะสมดุล (equilibrium) จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2 ใส่ในคอลัมน์ และชะด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ โดยให้มีอัตราการไหลของตัวชะเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อหลอด ด้วยแฟลคชันคอลเลกเตอร์ จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้แต่ละ

หลอดมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วจึงนำหลอดช่วงที่มีโปรตีน มาวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เซลลูเลส และ โปรตีน จากนั้นทำตามวิธีข้อ 2

4 การแยกเอนไซม์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography)

นำคอลัมน์ชนิดดีอีเออี-ไฮเทรป เซฟลาโรส (DEAE - Hitrap Sepharose) ขนาด 1 × 5 เซนติเมตร มาปรับสมดุลของคอลัมน์ด้วยซีเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ที่อัตราการไหลของตัวชะเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3 ใส่ในคอลัมน์ชะด้วยซีเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 โดยการชะแบบเพิ่มความแรงประจุแบบลำดับขั้น (stepwise gradient) ของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 1 โมลาร์ โดยมีอัตราการไหลของตัวชะเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องแฟลคชันคอลเลกเตอร์ จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้แต่ละหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วจึงนำหลอดช่วงที่มีโปรตีนมาวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เซลลูเลสและ โปรตีน จากนั้นทำตามวิธีข้อ 2 และนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลาเนสต่อไป

5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซลาเนส

โดยการทำให้เจลอิเล็กโตรโพลีซิสชนิดโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์ เจล (SDS-PAGE) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (SDS-PAGE Low Molecular Weight Calibration Kit) ของบริษัท Amersham Biosciences ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนช่วง 14.4 ถึง 97 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีน 6 ชนิด คือ แอลฟา-แลคตอลบูมิน (α -lactalbumin), ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (trypsin inhibitor), คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase), โอวอลบูมิน (ovalbumin), โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) และฟอสโฟไรเลส บี (phosphorylase b) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14.4, 20.1, 30, 45, 66 และ 97 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาคผนวก ข)

3.3.8.2 การศึกษาคุณลักษณะบางประการของเอนไซม์ไซลาเนส

1 ศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมไซลาเนส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ (3.3.8.1 (4)) ที่มีความเข้มข้นเหมาะสม มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยแปรผันค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งใช้ซีเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 กับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0, 7.5 และ 8.0 บ่มเป็นเวลา 10 นาที โดยมีสารละลายไซแลนความเข้มข้น ร้อยละ 1.0 เป็นสับสเตรต

2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไซลานเนส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ (3.3.8.1 (4)) ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยแปรผันค่าอุณหภูมิของการบ่มเอนไซม์ที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.8.1 ที่อุณหภูมิต่างๆคือ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยมีสารละลายไซแลนความเข้มข้น ร้อยละ 1.0 เป็นสับสเตรต

3 ศึกษาผลของค่าพีเอชต่อความคงตัวของไซลานเนส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ (3.3.8.1 (4)) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับซิงเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ที่พีเอชต่างๆ กันได้แก่ 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0, 7.5 และ 8.0 เขย่าให้เข้ากัน โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์จากข้อ 3.3.8.2 (1) วิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในรูปร้อยละกิจกรรมที่เหลือ (residual activity)

4 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลานเนส

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ (3.3.8.1 (4)) มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส โดยบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิต่างๆคือ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลายบ่มเป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในรูปร้อยละกิจกรรมที่เหลือ (residual activity)

5 การศึกษาค่าทางจลศาสตร์ของเอนไซม์ไซลานเนส

ศึกษาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่เร่งโดยสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นอย่างเหมาะสม ที่ความเข้มข้นของสับสเตรตต่างๆ คือ ความเข้มข้นของสารละลายไซแลนร้อยละ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ละลายในบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส (3.3.8.2) โดยบ่มเอนไซม์ไซลานเนสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายไซแลน 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (3.3.8.2 (3)) โดยวิเคราะห์น้ำตาลรีดิคซ์ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆกันคือ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที จากนั้นเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์ที่เกิดขึ้นต่อเวลายบ่ม โดยความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาหาได้จากการอ่านค่าปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาหนึ่งที่ระยะเริ่มต้นที่ให้กราฟเป็นเส้นตรงหรือจากค่าความชันของกราฟ นำค่าความเร็วเริ่มต้นที่ได้กับความเข้มข้นต่างๆของสับสเตรตมาเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk plots แสดงความสัมพันธ์ของค่า $1/V$ และ $1/[S]$ บนแกน X และ Y

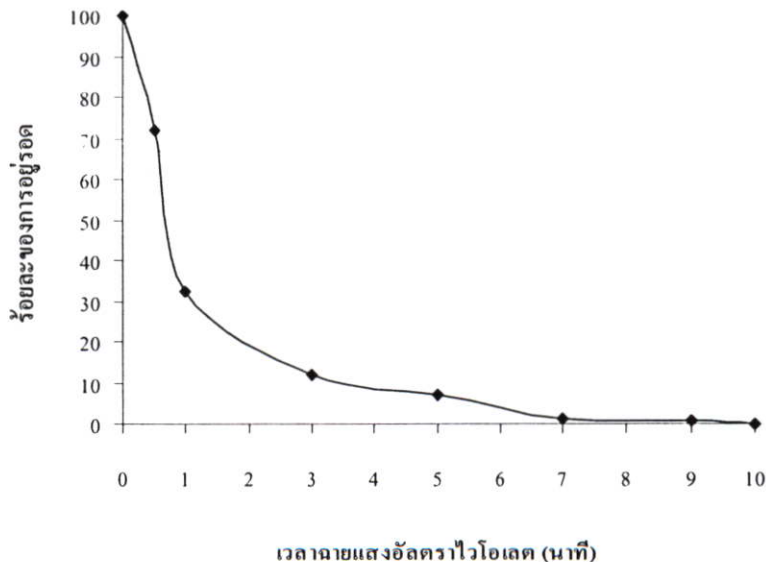
ตามลำดับ จากนั้นคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} ซึ่งจุดตัดบนแกน X คือค่า $-1/K_m$ และจุดตัดบนแกน Y คือค่า $1/V_{max}$ (Robyt and White, 1987)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาอัตราการย่อยและการอยู่รอดของสปอร์เชื้อ *A. niger* หลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

จากการทดลองฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ให้กับสปอร์ของเชื้อ *A. niger* ที่ระยะเวลาต่าง ๆ และนำมาตรวจนับโคโลนีที่เจริญบน complete medium (ชุดทดลอง) เทียบกับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ไม่ผ่านการฉายแสง (ชุดควบคุม) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} โดยนำมาคำนวณหาร้อยละของการอยู่รอด พบว่าที่เวลา 3 นาที หลังจากได้รับแสงอัลตราไวโอเลต จะมีการอยู่รอดของเชื้อ *A. niger* ประมาณร้อยละ 12.2 และที่เวลา 5 นาที จะมีการอยู่รอดประมาณร้อยละ 7 เมื่อพลอตกราฟระหว่างร้อยละของความอยู่รอดกับระยะเวลาที่ได้รับแสงอัลตราไวโอเลต ดังรูปที่ 4.1 จะมีร้อยละของการอยู่รอดของสปอร์เชื้อ *A. niger* หลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเลตเท่ากับร้อยละ 10 ที่เวลาประมาณ 3.5 นาที ซึ่งใช้เวลาแตกต่างกับการฉายแสงอัลตราไวโอเลตในการเหนี่ยวนำเชื้อ *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C ซึ่งใช้เวลานาน 15 นาที ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ได้ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งสูตร xylan medium (Kohil et al., 2001)



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงอัตราการย่อยและการอยู่รอดของสปอร์เชื้อ *A. niger* ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่เวลาต่าง ๆ ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4}

4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อ *A. niger* หลังจากผ่านการฉายแสงอัลตรา-ไวโอเล็ตที่เวลาที่ทำให้มีการอยู่รอดเท่ากับร้อยละ 10

หลังจากการทดลองฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตแก่สปอร์เชื้อ *A. niger* เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีการอยู่รอดร้อยละ 10 นำมาทดสอบการกลายพันธุ์โดยเลี้ยงเชื้อใน complete medium บ่มเป็นเวลา 2-3 วัน และย้ายโคโลนีเชื้อ *A. niger* ต่อโคโลนี ลงใน minimal medium พบว่ามีสายพันธุ์กลายของเชื้อ *A. niger* ที่ไม่สามารถเจริญบน minimal medium ได้จำนวน 18 สายพันธุ์ จากนั้นจึงนำสายพันธุ์กลายของเชื้อ *A. niger* มาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในสภาวะแบบอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อสายพันธุ์กลายในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง

เมื่อนำสายพันธุ์กลายของเชื้อ *A. niger* 18 สายพันธุ์ มาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสกับเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์ดั้งเดิมบนอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้บนอาหารแข็งและสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ทุกสายพันธุ์ แสดงได้ดังตารางที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนที่พีเอชเท่ากับ 6 เชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายหมายเลข ML 1, ML 2, ML 3, ML 5, ML 13, ML 115, ML 201, ML 209, ML 217, ML 241, ML 249 และ ML 405 มีค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีมากกว่าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายหมายเลข ML 1 ให้ค่าอัตราส่วนสูงสุดเท่ากับ 3.17 (ตารางที่ 4.1) และในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งที่พีเอชเท่ากับ 7 เชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลาย ML 1, 2, 3, 13, 115, 201, 217, 249, 254 และ 405 มีค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีมากกว่าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลาย ML 13 ให้ค่าอัตราส่วนสูงสุดเท่ากับ 3.38 (ตารางที่ 4.2) และในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งที่พีเอชเท่ากับ 8 (ตารางที่ 4.3) เชื้อสายพันธุ์กลาย ML 1, 3, 5, 13, 115, 209, 217, 239, 249 และ 405 มีค่าของอัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีมากกว่าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะเชื้อสายพันธุ์กลาย ML 249 ให้ค่าอัตราส่วนสูงสุดเท่ากับ 3.61

ตารางที่ 4.1 แสดงประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสบนอาหารแข็งที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอนของสายพันธุ์กลายเชื้อ *A. niger* กับสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่พีเอชเท่ากับ 6.0

สายพันธุ์กลาย ของเชื้อ <i>A. niger</i>	ขนาดของ เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.)	ขนาดของ เส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่าง เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด วงใสต่อขนาดโคโลนี (ซม.)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	2.58	4.55	1.76 ^{defg}
ML 1	1.44	4.57	3.17 ^a
ML 2	2.64	4.75	1.79 ^{defg}
ML 3	2.67	4.72	2.65 ^b
ML 5	2.28	4.54	1.99 ^d
ML 13	1.46	4.56	3.12 ^a
ML 115	2.30	4.39	1.90 ^{def}
ML 168	2.92	4.92	2.23 ^{fgh}
ML 201	2.07	4.81	2.32 ^c
ML 209	2.26	4.13	1.82 ^{defg}
ML 217	2.24	4.41	1.96 ^{dc}
ML 223	2.87	5.02	1.74 ^{efg}
ML 239	2.83	4.72	1.66 ^{fgh}
ML 241	2.76	5.00	1.81 ^h
ML 247	2.86	4.81	1.71 ^{gh}
ML 249	1.67	4.32	2.58 ^b
ML 254	2.71	4.55	1.67 ^{fgh}
ML 412	2.41	3.53	1.46 ^{defg}
ML 405	2.40	4.69	1.95 ^{dc}

หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความน่าเชื่อถือร้อยละ 95 (จากการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 4.2 แสดงประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซแลนสบนอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนของสายพันธุ์กลายเชื้อ *A. niger* กับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่พีเอชเท่ากับ 7.0

สายพันธุ์กลาย ของเชื้อ <i>A. niger</i>	ขนาดของ เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.)	ขนาดของ เส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่าง เส้นผ่าศูนย์กลางวงใส รอบโคโลนีต่อขนาด โคโลนี (ซม.)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	2.36	4.64	1.96 ^{fg}
ML 1	1.66	4.72	2.84 ^c
ML 2	2.40	4.86	2.02 ^{def}
ML 3	1.82	4.47	2.65 ^{cd}
ML 5	1.51	2.11	1.39 ^h
ML 13	1.41	4.77	3.38 ^a
ML 115	2.13	4.71	2.21 ^{cdef}
ML 168	2.28	4.41	1.93 ^{fg}
ML 201	1.58	4.59	2.90 ^b
ML 209	2.23	4.14	1.85 ^{fg}
ML 217	2.14	4.81	2.24 ^{cd}
ML 223	2.47	4.62	1.86 ^{fg}
ML 239	2.22	3.75	1.68 ^e
ML 241	2.34	4.53	1.93 ^{fg}
ML 247	2.38	4.54	1.90 ^{fg}
ML 249	1.38	3.64	2.60 ^{cd}
ML 254	2.16	4.41	2.04 ^{efg}
ML 412	2.10	2.67	1.27 ^h
ML 405	2.04	4.84	2.37 ^{cd}

หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขถ้าต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความน่าเชื่อถือร้อยละ 95 (การทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 4.3 แสดงประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซแลนสบนอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนของสายพันธุ์กลายเชื้อ *A. niger* กับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่พีเอชเท่ากับ 8.0

สายพันธุ์กลาย ของเชื้อ <i>A. niger</i>	ขนาดของ เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.)	ขนาดของ เส้นผ่าศูนย์กลางใส (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่าง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใส รอบโคโลนีต่อขนาด โคโลนี (ซม.)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	2.14	4.62	2.15 ^{gh}
ML 1	1.76	4.63	2.63 ^d
ML 2	2.16	4.12	1.90 ^j
ML 3	2.06	4.37	2.30 ^{fg}
ML 5	1.91	4.20	2.19 ^{gh}
ML 13	1.60	4.69	2.93 ^c
ML 115	1.65	3.92	2.37 ^{cf}
ML 168	2.10	4.07	1.93 ^{ig}
ML 201	1.36	2.60	1.91 ^j
ML 209	1.82	3.97	2.18 ^{defg}
ML 217	1.69	4.15	2.45 ^c
ML 223	1.95	4.01	2.05 ^{fg}
ML 239	1.11	3.39	3.05 ^b
ML 241	2.15	4.53	2.10 ^{hi}
ML 247	2.06	4.08	1.98 ^{ig}
ML 249	1.15	3.61	3.61 ^a
ML 254	2.13	4.53	2.12 ^{gh}
ML 412	1.35	1.82	1.34 ^k
ML 405	1.71	4.11	2.40 ^{cf}

หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขถ้าต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความน่าเชื่อถือร้อยละ 95 (การทดลอง 3 ซ้ำ)

4.4 ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบสูตรดัดแปลง

เมื่อคัดเลือกเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสสูง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมจากสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งได้สายพันธุ์กลายจำนวน 12 สายพันธุ์ ได้แก่ ML 1, 2, 3, 5, 13, 115, 201, 209, 217, 241, 249 และ 405 มาเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวสูตรดัดแปลงที่บรรจุอาหาร 70 มิลลิลิตรในฟลักซ์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ไซเลนร้อยละ 1 ซึ่งบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน พบว่าสายพันธุ์กลาย ML 3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 18.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ไซเลนเป็นสับสเตรต และผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพียงเท่ากับ 0.30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสจากสายพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งเท่ากับ 13.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย ML 3 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอยู่ 1.41 เท่า โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ใกล้เคียงกัน และสายพันธุ์กลาย ML 3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสมากกว่าสายพันธุ์กลายตัวอื่นของการทดลองซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงได้ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงประสิทธิภาพในการผลิตไซลานเนสโดยเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ <i>Aspergillus niger</i>	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	13.11 ^{cd}
ML 1	16.15 ^b
ML 2	16.03 ^b
ML 3	18.56 ^a
ML 5	14.33 ^{bcd}
ML 13	16.18 ^b
ML 115	13.50 ^{cd}
ML 201	14.55 ^{bc}

หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (การทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

เชื้อ <i>Aspergillus niger</i>	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
ML 209	13.34 ^{bc}
ML 217	13.94 ^{bc}
ML 241	14.34 ^{bcd}
ML 249	12.48 ^d
ML 405	12.83 ^{cd}

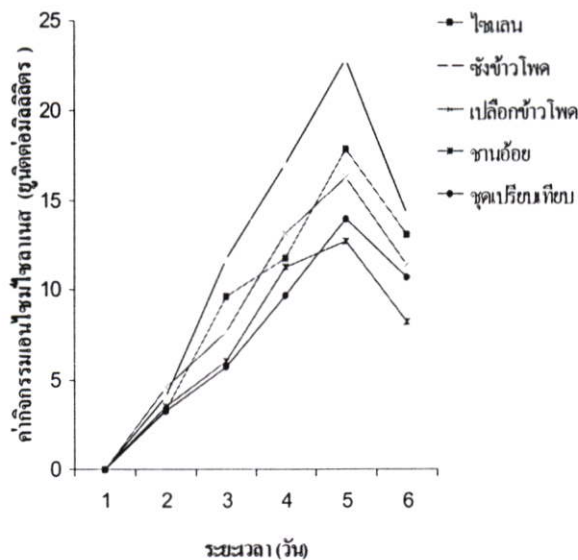
หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (การทดลอง 3 ซ้ำ)

4.5 การศึกษาหาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ *A. niger* ML 3 ที่คัดเลือกได้

4.5.1 ผลของการแปรผันชนิดแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อ *A. niger* ML 3 และเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารเลี้ยงสูตรดัดแปลง ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่มีการแปรผันชนิดแหล่งคาร์บอนโดยใช้ไซเลน ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และชานอ้อยเป็นสับสเตรด โดยกำหนดความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 1 พบว่าเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลาย ML 3 สามารถเจริญและเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสได้ในทุกสับสเตรด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารที่ใช้ชังข้าวโพดเป็นสับสเตรดจะทำให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 22.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสได้ต่ำที่สุดเมื่อใช้ชานอ้อยเป็นสับสเตรดซึ่งเท่ากับ 12.72 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 14.30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ไซเลนเป็นสับสเตรด ส่วนเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารที่มีชังข้าวโพดเป็นสับสเตรดมีค่ากิจกรรมไซลานเนสเท่ากับ 17.73 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลาย ML 3 ในอาหารเหลวที่มีชังข้าวโพดเป็นสับสเตรดนั้นมีค่ามากกว่า และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังรูปที่ 4.2 ซึ่งในชังข้าวโพดประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลสที่ย่อยสลายได้ง่ายกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น (Barber and Benedito, 1974) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hoq and Deckwer (1995) ที่มีการใช้เชื้อ *T. lanuginosus* สายพันธุ์ RT9 และ MH4 ผลิตเอนไซม์บีต้าไซโลซิเดส (β -xylosidase) ได้สูงสุดเท่ากับ 2.6 และ 6.5 นาโนคะตาลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยใช้ชังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไซเลน และ

รำข้าวสาทิ Puchart *et al.*, (1999) คัดเลือกเชื้อ *T. lanuginosus* ได้ 17 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากการใช้ขังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนได้มากกว่าไซลานเนสที่ได้จากการใช้ไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ Christakopoulos *et al.*, (1996) เลี้ยงเชื้อ *F. oxysporum* F3 มีกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงถึง 29,431 ยูนิต เมื่อใช้ขังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวที่มีปริมาตรอาหาร 500 มิลลิลิตร พีเอชเท่ากับ 8.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ส่วน Kohil *et al.*, (2001) เลี้ยงเชื้อ *F. verticilliodes* ใช้ขังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนมีกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ Christov *et al.*, (1999) ใช้เชื้อ *Aspergillus foetidus* ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยการใช้ขังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 547.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 6.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการทดลองจึงเห็นได้ว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. niger* ML 3 โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ในปริมาณมากและเชื้อมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณเพียงเล็กน้อย

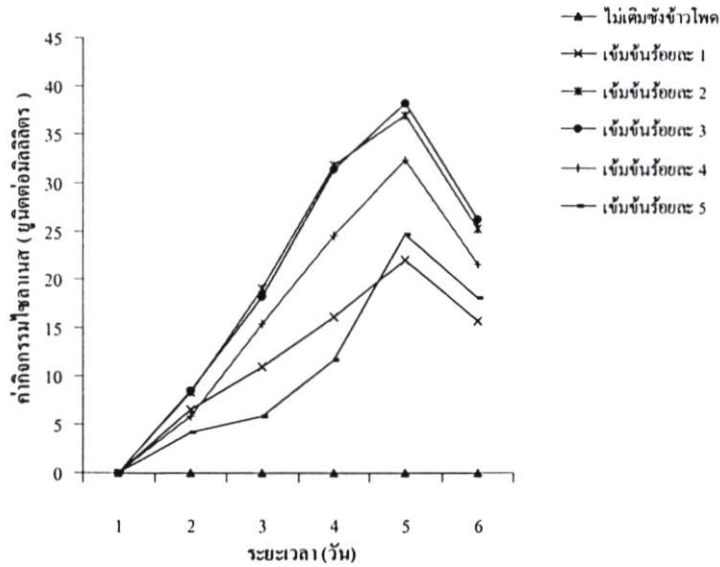


รูปที่ 4.2 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซลานเนสโดย *A. niger* ML 3 ในอาหารเหลว โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 เซลเซียสเป็นเวลา 6 วัน (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

4.5.2 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลาย ML 3 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นสับสเตรด โดยแปรผันความเข้มข้นของซังข้าวโพดเป็นร้อยละ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 พบว่าที่ความเข้มข้นของซังข้าวโพดเป็นร้อยละ 3 นั้นวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุดเท่ากับ 38.21 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.16 หน่วยต่อมิลลิลิตร และรองลงมาคืออาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเข้มข้นร้อยละ 2 วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 36.98 หน่วยต่อมิลลิลิตร และวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.16 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากสายพันธุ์กลาย ML3 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่ซังข้าวโพดเข้มข้นร้อยละ 2 และ 3 นี้ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสมากกว่าชุดเปรียบเทียบที่ใช้สายพันธุ์กลาย ML 3 ในอาหารสูตรคัดแปลง (มีค่ากิจกรรมไซลานเนสเท่ากับ 20.44 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเซลลูเลสเท่ากับ 0.14 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ส่วนในอาหารเหลวที่ไม่เติมซังข้าวโพดเป็นสับสเตรดนั้น เชื้อสายพันธุ์กลาย ML 3 สามารถเจริญได้เล็กน้อยและไม่มีการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ดังรูปที่ 4.3 เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่ากิจกรรมที่เกิดขึ้นในทางสถิติแล้วนั้น ที่ความเข้มข้นของซังข้าวโพดร้อยละ 2 และ ร้อยละ 3 นั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะเห็นได้ว่าถึงแม้ใส่สับสเตรดในปริมาณมาก เช่นการใช้ซังข้าวโพดร้อยละ 5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ก็เกือบไม่สูงขึ้นเลย อาจเป็นไปได้ว่าการที่มีสับสเตรดมากเกินไปนั้นส่งเสริมให้เกิดกระบวนการ catabolic repression ที่มีผลกระทบต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส (Kohil *et al.*, 2001) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bakir *et al.*, (2001) ใช้ซังข้าวโพดร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *R. oryzae* มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 23.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่ง Kuhad *et al.*, (1998) ที่ใช้ *Fusarium oxysporum* ในการผลิตไซลานเนส ซึ่งสามารถผลิตไซลานเนสได้ดีเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นรำข้าวสาลีร้อยละ 4 ของน้ำหนักโดยปริมาตร และมีกิจกรรมไซลานเนสน้อยสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นเป็นร้อยละ 5 ต่อน้ำหนักโดยปริมาตร และงานวิจัยของ Yang *et al.*, (1995) พบว่าเชื้อ *Bacillus sp.* สายพันธุ์ VI-4 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้มากที่สุดเมื่อใช้ไซเลนจากต้นบรีชร้อยละ 2 ของน้ำหนักต่อปริมาตร รองลงมาคือร้อยละ 3 ของ น้ำหนักต่อปริมาตร งานวิจัยของ Christov *et al.*, (1999) ได้เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. foetidus* ATCC 14916 จากการใช้ซังข้าวโพดและรำข้าวสาลีร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน (547.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร) มีค่ามากกว่าที่ใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน (159.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร) และ Christakopoulos *et al.*, (1996) เชื้อ *F. oxysporum* F3 ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงสุดเมื่อใช้ซังข้าวโพดร้อยละ 2 เมื่อเลี้ยงในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเท่ากับ 8.0 จากการศึกษานี้ได้ผลว่าซังข้าวโพดความเข้มข้นร้อยละ 2 และร้อยละ 3 ส่งเสริมประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* ML3 ได้อย่างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงได้ใช้ซังข้าวโพด

ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อทำการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสต่อไป



รูปที่ 4.3 ผลของปริมาณซังข้าวโพดในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซลานเนสโดย *A. niger* ML 3 ในอาหารเหลว โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 เซลเซียสเป็นเวลา 6 วัน (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

4.5.3 ผลของการแปรผันชนิดแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองที่มีการแปรผันแหล่งไนโตรเจนโดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์คือ ยีสต์ สกัก เปปโตน ทริปโตน น้ำแช่ข้าวโพด ที่ความเข้มข้น 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง และการใช้แหล่งไนโตรเจนจากไคแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่ความเข้มข้น 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยใช้ซังข้าวโพดร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอาหารที่เติมเฉพาะทริปโตนนั้นช่วยส่งเสริมให้เชื้อสายพันธุ์กลาย ML 3 นั้นมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 93.60 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.5 และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.12 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองมาคืออาหารที่เติมเฉพาะเปปโตนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 90 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.12 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เติมไคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร่วมกับไนโตรเจนจากอินทรีย์สาร จะเห็นได้ว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ในอาหารที่เติมเฉพาะทริปโตน หรือ เปปโตนเพียงอย่างเดียวหนึ่งนั้นส่งเสริมให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีกว่า อาจเนื่องมาจากการให้แหล่งไนโตรเจนที่มากเกินไปของไคแอมโมเนียมไฮโดรเจน

ฟอสเฟตร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์สาร นั้นส่งเสริมให้เกิดกระบวนการ catabolic repression ที่มีผลกระทบต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส (Kohil *et al.*, 2001)

ตารางที่ 4.5 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพด ร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
อาหารซุดเปรียบเทียบ	38.89 ^h
โคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร	41.36 ^h
โคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	78.63 ^{cd}
โคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร+ ยูเรีย 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	71.41 ^f
โคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร+ ยีสต์สกัด 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	75.59 ^{cf}
โคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร+ เปปโตน 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	74.68 ^{dc}
โคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร+ น้ำแช่ข้าวโพด 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	34.78 ^l
โคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร+ ทรีปโตน 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	80.71 ^c
ยูเรีย 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	74.79 ^{cf}
ยีสต์สกัด 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	79.75 ^c
เปปโตน 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	90.01 ^b
น้ำแช่ข้าวโพด 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	80.07 ^c
ทรีปโตน 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	93.60 ^a

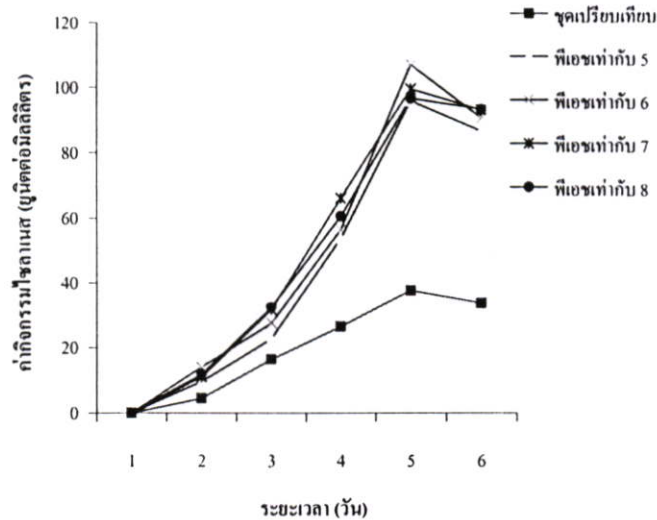
หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความน่าเชื่อถือร้อยละ 95 (การทดลอง 3 ซ้ำ)
: ชุดอาหารเปรียบเทียบคืออาหารสูตรดัดแปลง

Kohil *et al.*, (2001) ใช้ทริปโตเนร้อยละ 0.1 ของน้ำหนักโดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ บีสต์สก็ด ถั่วเหลืองบด หรือเปปโตนเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Thermoactinomyces thalophilus* ซึ่งงานวิจัยของ Kuhad *et al.*, (1998) พบว่าเชื้อ *F. oxysporum* NTG-19 นั้นผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีที่สุดเมื่อใช้เปปโตเนร้อยละ 1 ของน้ำหนักโดยปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจนเมื่อเทียบกับบีสต์สก็ด แอมโนเนียมไนเตรด แอสพาราจีน (asparagine) เคซีน และโพแทสเซียมไนเตรด ซึ่งจะเห็นได้ว่าแหล่งไนโตรเจนนั้นมีผลกระทบต่ออย่างมากต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส โดยที่แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จะส่งเสริมให้เชื้อนั้นสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจน อนินทรีย์ เช่น การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. awamori* (Smith and Wood, 1991)

4.6.4 ค่าพีเอชเริ่มต้น

เมื่อทำการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลาย ML 3 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน และมีทริปโตเน 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนแล้ว จากนั้นจึงวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสที่แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อ *A. niger* ML3 สามารถเจริญได้ในพีเอช 5, 6, 7 และ 8 และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6, 7, 8 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 106.75, 99.37, 96.44, และ 95.65 ounitต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเกิดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเพียงเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.6 โดยที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 มีค่าพีเอชเปลี่ยนไปเป็น 4.31 ในวันที่มีการผลิตเอนไซม์สูงสุด (วันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ) ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 มีค่าพีเอชที่เปลี่ยนไปเป็น 4.69 ในวันที่มีการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 มีค่าพีเอชที่เปลี่ยนไปเป็น 4.79 ในวันที่มีการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด และที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 มีค่าพีเอชที่เปลี่ยนไปเป็น 4.17 ในวันที่มีการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด ซึ่งเห็นได้ว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย ML 3 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีในช่วงค่าพีเอชค่อนข้างเป็นกรดอ่อน ซึ่งคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Singh *et al.*, (2001) ที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *T. lanuginosus* SSBPP พบว่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 6000 นาโนคะตาลต่อมิลลิลิตร Saha (2001) ใช้เชื้อ *F. verticillioides* ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 Kuhad *et al.*, (1998) พบว่าพีเอช 5.0 เป็นพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *F. oxysporum* และเชื้อ *Streptomyces* sp. Ab 106 มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 6.0 (Techapun *et al.*, 2002) Christov *et al.*, (1999) ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อคัดเลือกเชื้อ 7 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสมาเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลา-

เนส คือมีซังข้าวโพดร้อยละ 3 และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เป็นสับสเตรต แสดงให้เห็นว่าเชื้อส่วนใหญ่ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสมีประสิทธิภาพการผลิตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชระหว่างค่าพีเอชเท่ากับ 4.0-6.0 (Bajpai *et al.*, 1997)

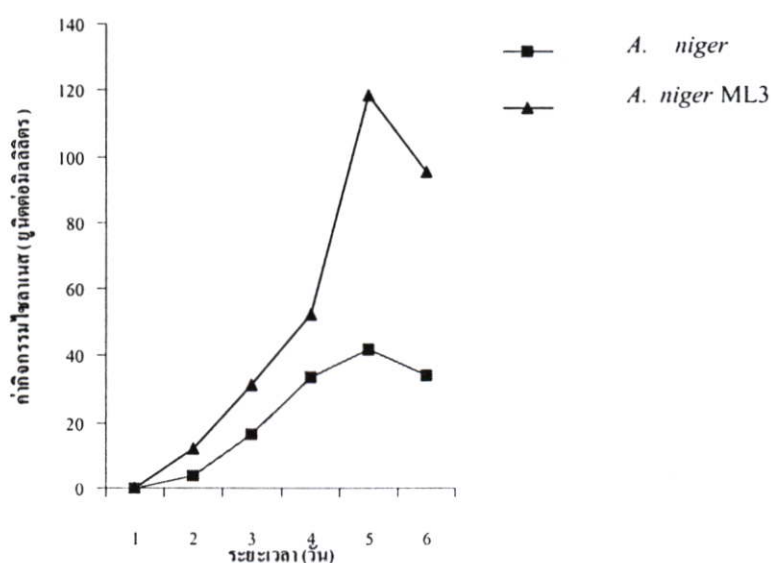


รูปที่ 4.4 ผลของพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซลานเนสโดย *A. niger* ML 3 ในอาหารเหลว โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 เซลเซียสเป็นเวลา 6 วัน (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

4.7 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์ดั้งเดิม และเชื้อ *A. niger* ML 3

จากการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสระหว่างเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงกับเชื้อ *A. niger* ML3 ที่เลี้ยงในอาหารที่ซังข้าวโพดร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน และทริปโตเนน 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 และเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน พบว่า *A. niger* ML3 นั้นมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสเกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อซังข้าวโพดสูงสุดที่วันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 118.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสมากกว่าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 41.90 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ดังรูปที่ 4.5 อาจแสดงได้ว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย ML 3 ในอาหารสูตรนี้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารสูตรดัดแปลงเท่ากับ 2.82 เท่า ซึ่ง Kuhad *et al.*, (1998) นำเชื้อ *F. oxysporum* NTG-19 สายพันธุ์กลายที่ถูก

เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการแสงอัลตราไวโอเลต และทรีตด้วยสารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) มาผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว ที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนใช้เปปโตนร้อยละ 0.3 ร่วมกับยีสต์สกัดร้อยละ 0.3 เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พี่เอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เซ่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน มีกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 15.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้ในสภาวะที่เหมาะสมโดยการใช้อำนาจสารร้อยละ 4 เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงขึ้นไปถึง 65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.5 การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อ *A. niger* และ *A. niger* ML3 ในอาหารที่มีสภาวะเหมาะสม ทำการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเซ่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน (จากการทดลอง 3 ซ้ำ)

4.8 ผลการศึกษาการทำเอนไซม์ไซลานเนสและการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนส

4.8.1 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

4.8.1.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* ML 3 แล้ว จึงมาทำการศึกษาการทำเอนไซม์ไซลานเนสให้บริสุทธิ์โดยขั้นแรกนำเอนไซม์สกัดหยาบ

(crude enzyme) ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส 110 หน่วย/มิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส 0.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวต่างๆกันคือร้อยละ 0-30, 30-50, 50-70 และ 70-90 แยกตะกอนโปรตีนออกด้วยการหมุนเหวี่ยงและละลายตะกอนโปรตีนด้วยซีเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 และนำมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสได้ดังตารางที่ 4.6 จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ไซลานเนสจะตกตะกอนได้ดีที่สุดในช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 50-70 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 129.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเล็กน้อยเท่ากับ 0.036 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.6 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิ่มตัวในช่วงต่างๆของเอนไซม์ไซลานเนสที่ผลิตจากเชื้อ *A. niger* ML3

แฟลคชัน (Fraction)	ปริมาณ (มิลลิ ลิตร)	โปรตีน (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน รวม (มิลลิ กรัม)	ค่ากิจกรรม เอนไซม์ ไซลานเนส (หน่วยต่อ มิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรม เอนไซม์ ไซลานเนส รวม (หน่วย)	ค่ากิจกรรม จำเพาะ (หน่วยต่อ มิลลิกรัม โปรตีน)
เอนไซม์สกัดหยาบ 100	100	23.55	2355	110	11000	4.67
แอมโมเนียม ซัลเฟต อิ่มตัวร้อยละ 0-30	2	11.41	22.82	10.42	20.84	0.91
แอมโมเนียม ซัลเฟต อิ่มตัวร้อยละ 30-50	10	16.17	16.17	67.81	678.10	4.19
แอมโมเนียม ซัลเฟต อิ่มตัวร้อยละ 50-70	12	26.48	317.76	129.17	1550	4.88
แอมโมเนียม ซัลเฟต อิ่มตัวร้อยละ 70-90	5	24.5	122.75	2.70	135	0.11

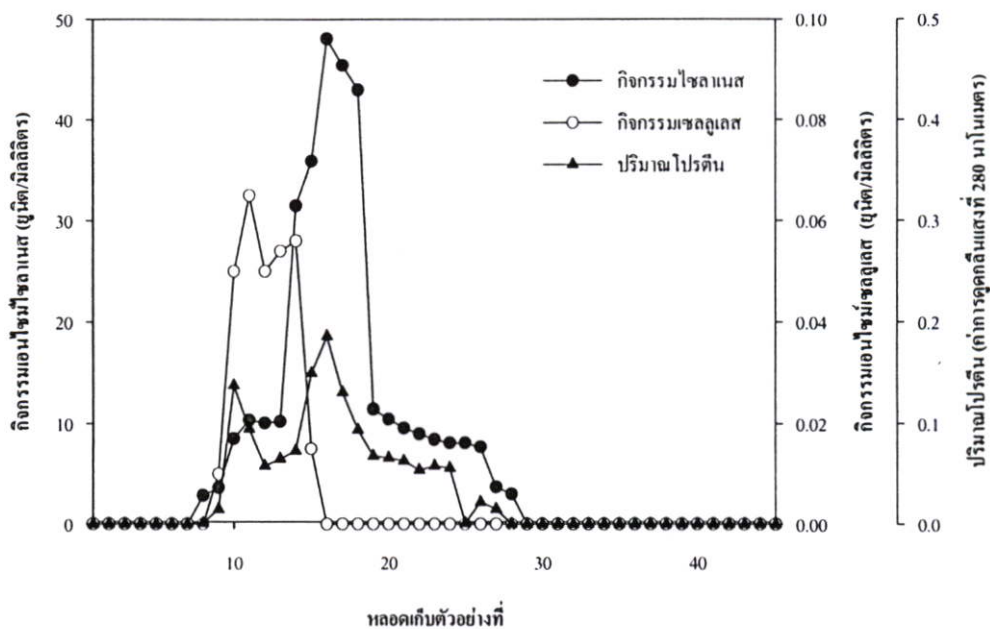
ดังนั้นจึงนำเอนไซม์สกัดหยาบที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจนถึงความเข้มข้นอิ่มตัวที่ร้อยละ 70 แล้วจึงนำมาแยกตะกอนด้วยการหมุนเหวี่ยง และละลายตะกอนโปรตีนด้วยซีเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 จากนั้นจึงกำจัดเกลือออกโดยผ่านคอลัมน์กำจัดเกลือ และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการอัลตราฟิวเตรชันได้ปริมาณสายละลายเอนไซม์ 70 มิลลิลิตร แล้วจึงวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสได้เท่ากับ 115 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งในงานวิจัยที่คล้ายคลึงกันนั้น Bakir *et al.*, (2001) ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *R. oryzae* และทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 80 ในขั้นตอนแรกของการทดลอง Lama *et al.*, (2004) ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตตกตะกอนเอนไซม์ไซลานเนสของน้ำหมักจากเชื้อ *B. thermantarcticus* ที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 ส่วน Tseng *et al.*, (2002) ตกตะกอนเอนไซม์ไซลานเนสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 65 ของน้ำหมักเชื้อ *B. firmus* ซึ่งต่างจากการทดลองนี้เพียงเล็กน้อย

4.8.1.2 การแยกด้วยเจลฟิวเตรชันโครมาโทกราฟี (gel filtration chromatography)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนเกลือและกำจัดเกลือออกแล้วมาผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-100 แล้วชะเอนไซม์ออกด้วยซีเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 เนื่องจากคอลัมน์ชนิดนี้เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล ดังนั้นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า จากรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าพีก (peak) ของโปรตีนมี 2 พีก เมื่อเก็บตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์แล้ว พบว่าพีกโปรตีนพีกแรกมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสโดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.19 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสจะอยู่ในช่วงของพีกโปรตีนที่สองจากกราฟโดยมีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสปะปนอยู่ 0.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจะพบว่าในขั้นตอนนี้สามารถที่จะแยกโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสจากโปรตีนอื่นออกไปได้ค่อนข้างมาก ซึ่งโปรตีนอื่นที่แยกออกมานั้นจะถูกชะออกมาหลังจากเอนไซม์ถูกชะออกมา แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่แยกออกไปได้นี้มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าโมเลกุลของเอนไซม์ไซลานเนส และเซลลูเลส

จากการทดลองพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจะถูกชะออกมาก่อนเอนไซม์ไซลานเนส โดยมีบางส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสที่ถูกชะออกมาในแฟลคชัน (fraction) ของเอนไซม์ไซลานเนส และจากกราฟจะเห็นได้ว่าพีกของเอนไซม์ไซลานเนสนั้นมียอดเพียงพีกเดียว จึงอาจเป็นไปได้ว่ามีเอนไซม์ไซลานเนสเพียง 1 ชนิด ที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. niger* ML 3 จึงได้นำแฟลคชันจากหลอดเก็บตัวอย่างที่ 12-30 มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีการอัลตราฟิวเตรชันได้สารละลายเอนไซม์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร วิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสได้ทั้งหมดเท่ากับ 1531.84 ยูนิต และมีค่ากิจกรรมจำเพาะ

ของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 19.83 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสได้เท่ากับ 0.26 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเอนไซม์ส่วนนี้ไปทำการทดลองต่อไป



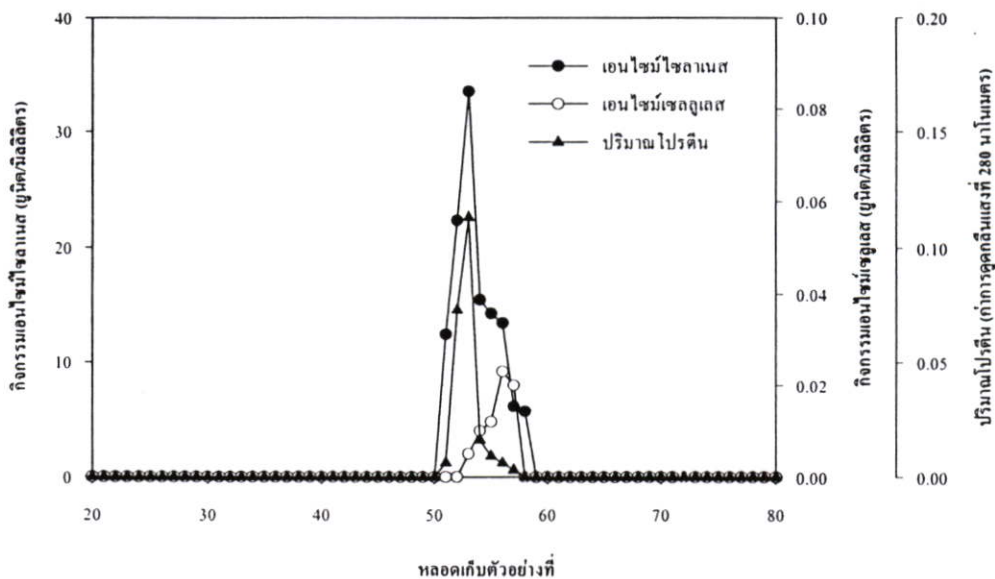
รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมการแยกเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *A. niger* ML 3 ด้วยคอลัมน์ เซฟลาคริล เอส-100 ที่ทำการชะโปรตีนด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรต่อหลอด

4.8.1.3 การแยกด้วยโครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชันมาแยกต่อด้วยการผ่านคอลัมน์ดีไอเออี-ไฮเทรป เซฟลาโรส ซึ่งกลุ่มประจุของตัวแลกเปลี่ยนประจุเป็นประจุบวก เรียกตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchanger) โดยชะสารละลายเอนไซม์ด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ที่มีการแปรผันค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.7 พิกของเอนไซม์ไซลาเนส และพิกของเอนไซม์เซลลูเลสนั้นไม่ได้แยกออกจากกัน จากกราฟแสดงให้เห็นว่าการแยกเอนไซม์ไซลาเนสด้วยวิธีผ่านคอลัมน์ดีไอเออี - ไฮเทรป เซฟลาโรสนั้น ไม่สามารถแยกเอนไซม์ไซลาเนสจากเอนไซม์เซลลูเลสได้ อาจเพราะมีคุณสมบัติของประจุของเอนไซม์ใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลาเนส เนื่องจากการแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุนั้น อัตราเร็วในการที่สาร

ตัวอย่างจะถูกชะออกนั้นจะขึ้นอยู่กับความแรงของการขีดเหนี่ยวกับประจุของสารแต่ละชนิดกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ หรือความจำเพาะทางไฟฟ้าเนื่องจากการมีประจุสุทธิบน โมเลกุลของโปรตีน (Pharmacia, 1991a) ดังนั้นจากการใช้คอลัมน์ดีไอเออี - ไฮเทรป เซฟลาโรส ในการทดลองนี้ได้เอนไซม์ไซลานเนสที่มีความบริสุทธิ์เพียงบางส่วนเท่านั้น และเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ไซลานเนสที่ผ่านคอลัมน์คอลัมน์ดีไอเออี - ไฮเทรป เซฟลาโรส มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีการอัลตราฟิวเตรชัน ได้ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ซึ่งวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสได้เท่ากับ 48.13 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์รวมเท่ากับ 721.95 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 26.60 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.19 หน่วยต่อมิลลิลิตร ได้เอนไซม์ไซลานเนสมีความบริสุทธิ์ (Purification fold) 4.97 มีผลได้ (Yield) ร้อยละ 3.13 ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Kimura *et al.*, (1995) ได้แยกเอนไซม์ไซลานเนสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 80 และผ่านคอลัมน์ต่างๆคือมาโคร-พรีฟ-ไฮคิว เซฟลาคริล เอส-200 อาร์ ไบโอ-เจล เฮสพีที (Macro-Prep-High Q Sephacryl S-200R Bio-gel HPT) และ มาโคร-พรีฟ-ไฮคิว (Macro-Prep-High Q) ได้เอนไซม์ไซลานเนส I มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 69.5 หน่วยต่อมิลลิกรัม และเอนไซม์ไซลานเนส II ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 37.1 หน่วยต่อมิลลิกรัม มีผลได้ เท่ากับร้อยละ 4 และ 5 ตามลำดับ และจากการทดลองนี้สามารถทำเอนไซม์ไซลานเนสให้บริสุทธิ์ได้มากกว่า Christakopoulos *et al.*, (1996) ที่ทำเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *F. oxysporum* มีความบริสุทธิ์ (Purification fold) เท่ากับ 1.30 เมื่อแยกเอนไซม์ด้วยการผ่านคอลัมน์เซฟลาเดกซ์ จี-25 อัลโตเจล แอเคเอ 54 (Sephadex G-25 Ultogel AcA 54) และการแยกด้วยคอลัมน์ดีไอเออีเซฟลาโรส ส่วน Silva *et al.*, (1999) แยกเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. fumigatus* ด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชันผ่านคอลัมน์เซฟลาเดกซ์ จี-50 (Sephadex G-50), อีโคโน-แพค ซีเอสที-ทู (Econo-Pac CHT-II), อีโคโน-แพค ไฮคิว (Econo-Pac High Q) พีเอช 7.0 และอีโคโน-แพค ไฮคิวพีเอช 6.5 มีผลได้ของเอนไซม์ไซลานเนสร้อยละ 0.26 มีความบริสุทธิ์ 1.32 เท่า แต่มีผลได้และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลานเนสซึ่งได้น้อยกว่างานวิจัยของ Carmona *et al.*, (1998) ที่แยกเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. versicolor* ด้วยวิธีไดอะไลซิส (Dialysis) คอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิดดีไอเออี-เซฟลาเดกซ์ (DEAE-Sephadex) และเซฟลาเดกซ์ จี-75 (Sephadex G-75) มีผลได้เอนไซม์ร้อยละ 19 ซึ่งมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 635 หน่วยต่อมิลลิกรัม นอกจากนี้ Tseng *et al.*, 2002 แยกเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *B. firmus* ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านคอลัมน์ดีไอเออี-โตโยเพริล 650เอฟ (DEAE-Toyoperl 650F) กับคอลัมน์ทีเอสเค-แฟลคโตเจล 55เอฟ (TSK-Fractogel 55F) ได้เอนไซม์ไซลานเนส I มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 34.08 หน่วยต่อมิลลิกรัม มีผลได้ร้อยละ 19.5 และเอนไซม์ไซลานเนส II มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 3.67 หน่วยต่อมิลลิกรัม มีผลได้ร้อยละ 2.1 ในขณะที่ Ryan *et al.*, (2003) ได้แยกเอนไซม์ไซลานเนสให้บริสุทธิ์ได้น้อยกว่าการแยกเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Penicillium casulatum* มีความบริสุทธิ์ 17.96 เท่า มีผลได้ร้อยละ 3.03

และ Sandrim *et al.*, (2005) ทำเอนไซม์ไฮลาเนสจากเชื้อ *A. caespitopus* ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการผ่านคอลัมน์เซฟลาเดกซ์ จี-100 (Sephadex G-100) ได้เอนไซม์ไฮลาเนส I มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 1314 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ผลได้ร้อยละ 23.8 และมีค่าความบริสุทธิ์ 23.8 เท่า ส่วนเอนไซม์ไฮลาเนส II นั้นมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 133.4 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และมีค่าความบริสุทธิ์ 2.4 เท่า ส่วน Kitreechavanich *et al.*, (1984) สามารถทำเอนไซม์ไฮลาเนสจากเชื้อ *Humicola lanuginosa* ให้มีค่าความบริสุทธิ์เท่ากับ 54 โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 60 จากนั้นนำเอนไซม์ไปผ่านคอลัมน์เซฟลาเดกซ์ จี-100 และดีอีเออี-เซฟลา-โรส ซีแอล-6บี (DEAE-Sepharose CL-6B) ตามลำดับ และมีผลได้ถึงร้อยละ 68 นอกจากนั้น Cardoso *et al.*, (2003) ทำเอนไซม์ไฮลาเนสจากเชื้อ *Acrophialophora nainiana* ได้เอนไซม์ไฮลาเนสมีค่าความบริสุทธิ์ 22.12 เท่า มีผลได้ร้อยละ 19.78 ด้วยการใช้วิธีอัลตราฟิวเรชัน ผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟลาโรส, คิว-เซฟลาโรส (Q-Sepharose), เซฟลาคริต เอส-100 และคิว-เซฟลาโรส จากการทดลองนี้เมื่อได้แยกเอนไซม์ไฮลาเนสด้วยการผ่านคอลัมน์เซฟลาคริต เอส-100 และดีอีเออี-เซฟลาโรสแล้ว เอนไซม์ที่ได้ในขั้นตอนนี้จะใช้ในการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไฮลาเนสในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมการแยกเอนไซม์ไฮลาเนสจากเชื้อ *A. niger* ML 3 ด้วยคอลัมน์ดีอีเออี-ไฮเทรป เซฟโรส ที่ทำการชะโปรตีนด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรต่อหลอด

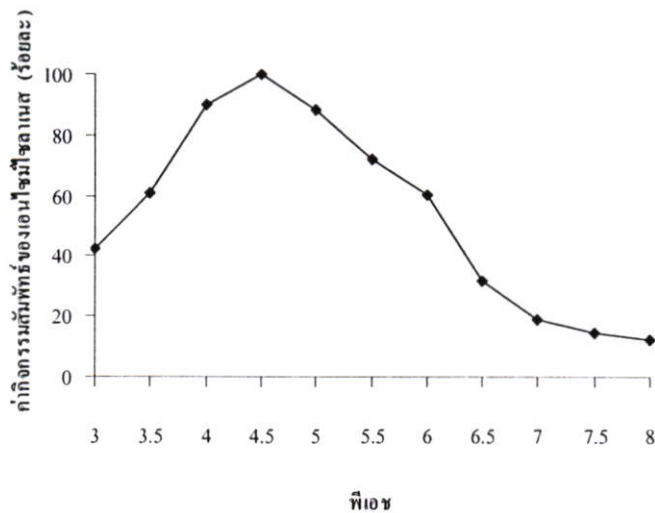
ตารางที่ 4.7 ผลการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* ML3

ขั้นตอนการทำ เอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน	ปริมาณ (มิลลิ ลิตร)	โปรตีน (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	โปรตีน รวม (มิลลิ กรัม)	กิจกรรม เอนไซม์ (ยูนิต/ มิลลิลิตร)	กิจกรรม เอนไซม์ จำเพาะ (ยูนิต/ มิลลิกรัม)	กิจกรรมเอนไซม์ รวม(ยูนิต)	Yield (ร้อยละ)	Purification factor
1. เอนไซม์สกัดหยาบ	200	21.59	4318	115.35	5.34	23070	100	1
2. ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟตร้อยละ 70 และผ่านอัลตรา ฟิวเตรชัน	70	32.79	2295.3	178.37	5.44	12484.5	54.18	1.01
3. เจลฟิวเตรชัน และผ่านอัลตราฟิวเตรชัน	20	3.86	77.2	76.59	19.83	1531.84	6.64	3.71
4. คอลัมน์โครมาโทกราฟี และผ่านอัลตราฟิวเตรชัน	15	1.810	27.15	48.13	26.60	721.95	3.13	4.49

4.8.2 คุณลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* ML 3 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน

4.8.2.1 ผลของค่าพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสเพื่อศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสในช่วงพีเอชต่างๆกัน คือ 3.0- 8.0 พบว่าพีเอชที่เหมาะสม (optimum pH) ต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสคือ 4.5 โดยที่พีเอช 4.0 เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็นร้อยละ 89.74 และที่พีเอช 5.0 เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 88.06 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไซลานเนสมีค่ากิจกรรมใกล้เคียงกันในช่วงพีเอช 4.0- 5.0 โดยที่พีเอช 3.0 นั้น เอนไซม์มีกิจกรรมเพียงสัมพัทธ์ร้อยละ 42.29 และเมื่อพีเอชมากกว่า 6.0 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสนั้นลดลงอย่างรวดเร็วโดยที่พีเอช 8.0 มีกิจกรรมสัมพัทธ์เพียงร้อยละ 12.46 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากเชื้อ *A. niger* ML 3 เกิดกิจกรรมเอนไซม์ได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกรดอ่อน ดังรูปที่ 4.8



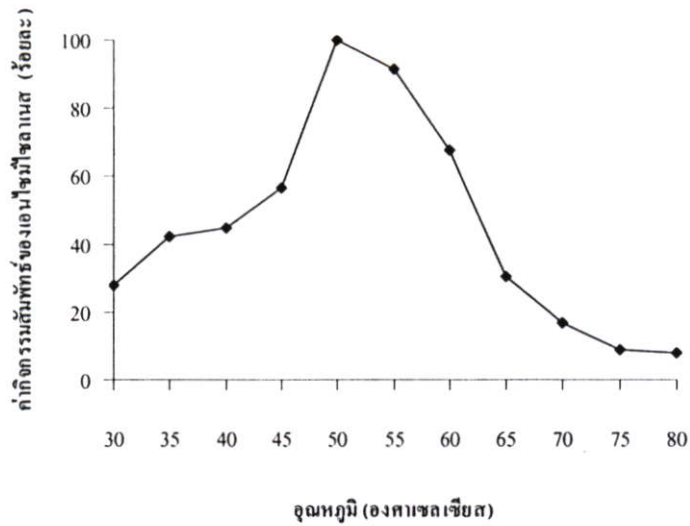
รูปที่ 4.8 ผลของค่าพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* ML 3 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ซึ่งค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมเอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* ML3 นั้นมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับค่าพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* (Bakir et al., 2001) ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Lama et al., (2004) เอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Bacillus therrnantaracticus* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 5.0 และ Silva et al., (1999) ที่พบว่าพีเอชเท่ากับ 5.5 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการ

เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *A. fumigatus* นอกจากนั้น Sandrim *et al.*, (2005) พบว่าเชื้อ *A. caespitosus* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในปริมาณสูง และมีกิจกรรมเอนไซม์ที่พีเอชเหมาะสมเท่ากับ 5.5 – 6.5 แต่บางวิจัยนั้นเอนไซม์ไซลาเนสสนั้นสามารถเกิดกิจกรรมได้ดีที่พีเอชสูง เช่น งานวิจัยของ Christakopoulos *et al.*, (1996) ทำเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* ให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์ไซลาเนสที่ได้นั้นมีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 7.4 เป็นต้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จาก *Aspergillus* นั้นมีกิจกรรมเอนไซม์ได้ดีที่สภาวะเป็นกรดเล็กน้อย

4.8.2.2 ผลของค่าอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเพื่อศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสม (Temperature optimum) ต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 และ 80 องศาเซลเซียส โดยบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเกิดขึ้นได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 91.77 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 56.82 โดยกิจกรรมของเอนไซม์นั้นลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อมีอุณหภูมิสูงตั้งแต่ 65 องศาเซลเซียส ขึ้นไปโดยที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นั้นกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไซลาเนสเหลือเพียงร้อยละ 8.11 ดังรูปที่ 4.9 ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *A. niger* ML3 ที่ได้นั้นมีค่าที่ใกล้เคียงกับรายงานของ Sandrim *et al.*, (2005) ที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *A. caespitosus* ได้เอนไซม์ไซลาเนส 2 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน โดยมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์เท่ากันคือระหว่าง 50 – 55 องศาเซลเซียส Silva *et al.*, (1999) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *A. Fumigatus* Cardoso *et al.*, (2003) เชื้อ *Acrophialophorav nainiana* มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ที่ 55 องศาเซลเซียส (Bakir *et al.*, 2001) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *R. oryzae* มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แต่เอนไซม์ไซลาเนสจากการทดลองนี้นั้นไม่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงได้เหมือนเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อทนอุณหภูมิสูงบางชนิด เช่น เชื้อ *T. lanuginosus* (Singh *et al.*, 2000) ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิเหมาะสมที่สุดเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส แต่เอนไซม์ที่ได้นี้สามารถที่จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิมากกว่า 80 องศาเซลเซียส ซึ่ง Ishihara *et al.*, (1997) พบว่าเชื้อทนอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ HG-1 ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 70 องศาเซลเซียส เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ไซลาเนสที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงนั้นจะสามารถนำไปใช้อุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษที่มีสภาวะอุณหภูมิสูงและมีความเป็นด่างสูง (Kohil *et al.*, 2001)

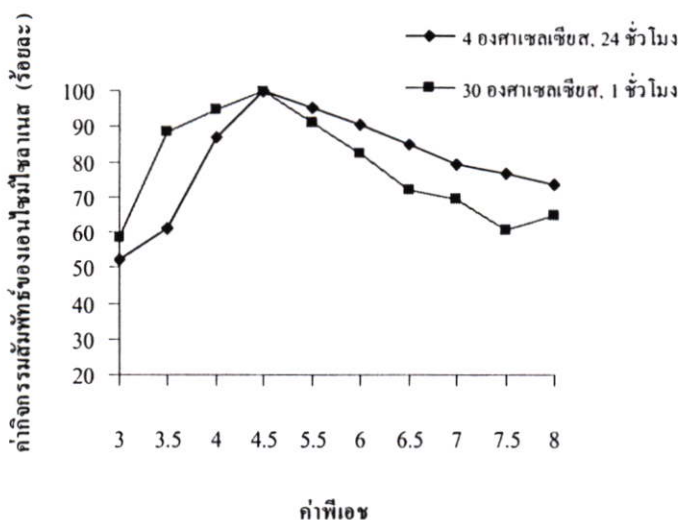


รูปที่ 4.9 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* ML 3 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

4.8.2.3 ผลของพีเอชต่อค่าความคงตัวของเอนไซม์ไซลานเนส

จากการทดลองเมื่อบ่มเอนไซม์ไซลานเนสในบัฟเฟอร์พีเอชต่างกันคือ 3.0-8.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส พบว่าการบ่มเอนไซม์ไซลานเนสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่พีเอช 4.5 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ร้อยละ 100 ที่พีเอชเท่ากับ 5.0 และ 5.5 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ร้อยละ 96.33 และ 90.60 ตามลำดับ ที่พีเอช 3.0 มีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ร้อยละ 52.12 ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์มีค่าลดลงเมื่อค่าพีเอชเพิ่มมากขึ้น และเมื่อบ่มเอนไซม์ไซลานเนสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอชต่างกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอช 4.0-5.5 โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 100 ที่พีเอช 4.5 ดังนั้นเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากเชื้อ *A. niger* ML 3 นั้นสามารถคงตัวได้ดีที่พีเอชช่วงแคบ ดังรูปที่ 4.10 ซึ่งเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าความคงตัวในช่วงพีเอชที่แคบกว่างานวิจัยของ Kimura *et al.*, (1995) พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. sojae* มีสองชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน (32,700 และ 35,000 กิโลดาลตัน) มีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 5.5 และ 5.0 ตามลำดับ โดยมีความคงตัวได้ที่พีเอชระหว่าง 5.0 ถึง 9.0 ทั้งสองชนิด ซึ่ง Carmona *et al.*, (1998) พบว่าเชื้อ *A. versicolor* ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่มีพีเอชเหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 6.0 และสามารถคงตัวได้ในพีเอชช่วง 4.0 – 8.0 และงานวิจัยของ Cesar and Mrsa (1996) พบมาเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *T. lanuginosus* มีค่าความคงตัวต่อพีเอชในระหว่าง 5.0. ถึง 7.0 Bakir *et al.*, (2001) และ Tseng *et al.*, (2002) พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *B. firmus* มีค่าความ

คงตัวในระหว่าง 5.0 – 11.0 แต่เอนไซม์ไซลาลเนสที่ได้จากการทดลองนี้ก็มีค่าความคงตัวใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลาลเนสจากเชื้อ *R. oryzae* ที่มีค่าความคงตัวต่อพีเอชในระหว่าง 3.5 – 5.5 (Bakir *et al.*, 2001))

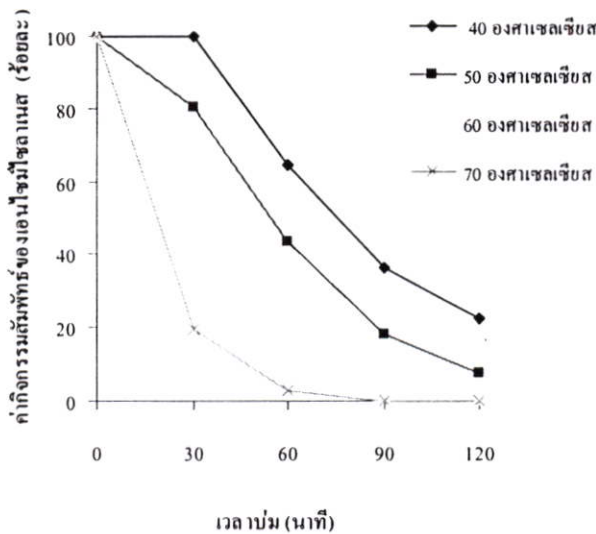


รูปที่ 4.10 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาลเนสจากเชื้อ *A. niger* ML3 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.8.2.4 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลาลเนส

จากการทดลองบ่มเอนไซม์ไซลาลเนสที่อุณหภูมิต่างๆกันคือ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที และทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวได้เวลาเป็นเวลา 30 นาที โดยเอนไซม์ยังมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เหลือร้อยละ 100 ซึ่งเอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 64.53 เมื่อบ่มเป็นเวลา 60 นาที มีกิจกรรมสัมพัทธ์เหลือร้อยละ 36.49 และ 22.61 เมื่อบ่มเป็นเวลา 90 นาที และ 120 นาที ตามลำดับ ซึ่งเมื่อบ่มเอนไซม์ไซลาลเนสที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว ที่เวลาบ่ม 30 นาที มีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เหลือร้อยละ 19.60 เมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีกิจกรรมสัมพัทธ์เหลือร้อยละ 2.90 และตรวจไม่พบกิจกรรมเอนไซม์เมื่อบ่มเป็นเวลา 90 นาที จากผลการทดลองแสดงว่า เอนไซม์ไซลาลเนสที่ได้จากเชื้อ *A. niger* ML3 นั้นคงตัวได้ดีที่สุดอุณหภูมิที่ไม่สูงมาก แสดงดังรูปที่ 4.11 เมื่อพิจารณาความคงตัวของเอนไซม์ไซลาลเนสจากเชื้อ *A. niger* ML3 ซึ่งพบว่าเอนไซม์มีความคงตัวได้ดีที่สุดที่ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที ซึ่งมีผลคล้ายคลึงกับเอนไซม์ไซลาลเนสที่ได้จาก *Cryptococcus*

flavus IFO 0407 ซึ่งเอนไซม์มีความคงตัวได้ดีในเวลา 30 นาที ที่ 45 เซลเซียส และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ (Nakanish *et al.*, 1984) Chistakopolos *et al.*, (1996) เอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *F. oxysorum* มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากการทดลองนั้นสามารถคงตัวได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า เอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. versicolor* ที่มีความคงตัวได้เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Carmona *et al.*, 1998) ซึ่งในเชื้อทนอุณหภูมิสูงบางชนิดเช่น *T. lanuginosus* นั้น เอนไซม์ไซลานเนสสามารถคงตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และกิจกรรมเอนไซม์ลดลงมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที (Cesar and Mrsa, 1996) การคงตัวของเอนไซม์ไซลานเนสที่สามารถคงตัวได้ในอุณหภูมิสูงนั้นเป็นข้อดีในการนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมฟอกเยื่อซึ่งมีสถานะในการทำงานที่มีอุณหภูมิสูง (Hoq and Deckwer, 1995)



รูปที่ 4.11 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* ML 3 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน เมื่อทำการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที

4.8.2.5 การหาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

การทดสอบความบริสุทธิ์และเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนบน SDS-PAGE แสดงดังรูปที่ 4.12 โดยใช้สารละลายเอนไซม์หลังจากผ่านคอลัมน์ดีอีเออี แล้วทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเรชัน จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ไซลานเนสให้แถบโปรตีนเข้ม 1 แถบ

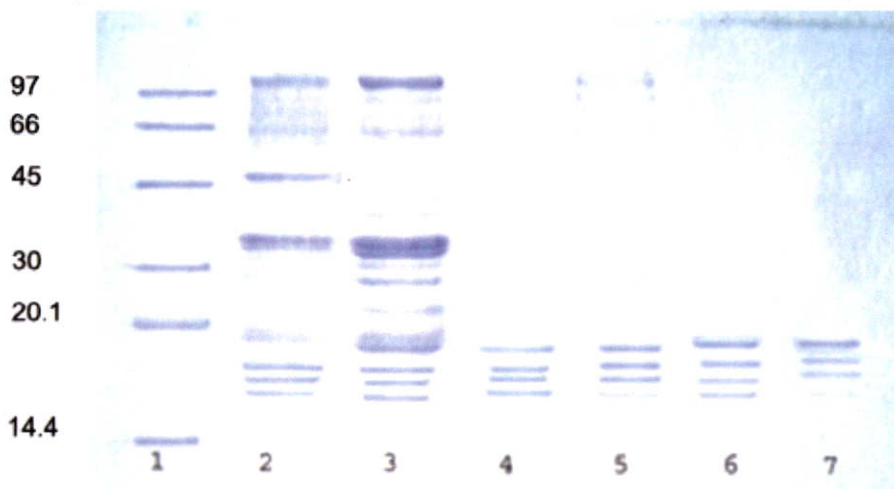
และแถบโปรตีนเจ็จางอีก 3 แถบ โดยโปรตีนแถบเข้มที่ 1 และแถบโปรตีนจางทั้ง 3 แถบ เมื่อคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าโปรตีนแถบเข้มที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 16 กิโลดาลตัน โปรตีนแถบที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 15.6 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนที่ 3 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 15.4 กิโลดาลตัน และแถบโปรตีนที่ 4 มีน้ำหนักโมเลกุล 15.2 กิโลดาลตัน ดังนั้นการแยกและทำให้บริสุทธิ์เพียง 2 คอลัมน์ จากการทดลองนี้จึงไม่สามารถแยกออกได้ หรืออาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ไซลานเนสประกอบไปด้วยหลายหน่วยย่อย (subunit) (Kormerlink *et al.*, 1993) เมื่อแยกด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่ง SDS นั้นมีคุณสมบัติทำให้โปรตีนเสียสภาพ จึงทำให้หน่วยย่อยของโปรตีนที่เกาะกันอยู่แยกออกจากกัน ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซลานเนสจึงไม่สามารถระบุได้อย่างแน่นอนว่าเป็นแถบโปรตีนแถบใด

แถบโปรตีนของเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆกันคือ 16, 15.7, 15.4 และ 15.2 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลแล้วมีความใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลานเนสของ *A. niger* จากการศึกษาของ Fredrick (1985) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13 กิโลดาลตัน หรือ 28 กิโลดาลตัน (Ricardo *et al.*, 1985) และจาก *A. sojae* ไซลานเนส I และ II มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32.7 และ 35.5 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Carmona *et al.*, 1998) พบว่าเอนไซม์จากเชื้อ *A. vericolor* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 19 กิโลดาลตัน Sandrim *et al.*, (2005) พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. caespitosus* มีน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไซลานเนส I เท่ากับ 7.7 กิโลดาลตัน และไซลานเนส II เท่ากับ 17.7 กิโลดาลตัน ไซลานเนสจากเชื้อ *A. fumigatus* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 19 กิโลดาลตัน และ 8.5 กิโลดาลตัน (Silva *et al.*, 1999) เชื้อ *F. oxysporum* F3 ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสสองชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 20 และ 23 กิโลดาลตัน นั้นแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไซลานเนสส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างต่ำ ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ได้จากการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดก็มีน้ำหนักโมเลกุลที่สูง ซึ่งมีรายงานว่าเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากเชื้อ *F. avenaceum* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 250 กิโลดาลตัน (Vssanska *et al.*, 1982 อ้างโดย Bastawde *et al.*, 1992) แต่อย่างไรก็ตามหลังจากที่แยกเอนไซม์ ไซลานเนสโดยผ่านคอลัมน์สองชนิดในการทดลองนี้แล้ว ยังตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสส่วนหนึ่งปนอยู่เล็กน้อย อาจเป็นไปได้ว่าเซลลูเลสในส่วนที่ปนมานั้นมีคุณสมบัติด้านประจุใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* ML 3 มากจึงไม่สามารถแยกออกได้เมื่อผ่านคอลัมน์เซฟลาคริล เอส-100 และดีอีเอซีเฟลาโรสในการทดลองนี้ Hurst *et al.*, (1977) พบว่าเชื้อ *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 26 กิโลดาลตัน ในขณะที่ Okada (1985) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger* มีน้ำหนักโมเลกุล 31 กิโลดาลตัน นอกจากนั้น Araujo and Souza (1986) รายงานว่าเชื้อ *Aspergillus terreus* ATCC 52430 ผลิตเอนโดกลูคาเนส I และ II ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 78 กิโลดาลตัน และ 16 กิโลดาลตัน ตามลำดับซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลานเนส แต่อย่างไรก็ตามน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสสามชนิดที่ได้มีการศึกษาที่ผ่านมา

คือ เอนโดกลูคาเนส, เซลโลไฮโดรเลส และ บีต้า-กลูโคซิเดส จากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ก็อาจมี น้ำหนักโมเลกุลที่สูงกว่าเอนไซม์ไซลาลเนสได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Wood (1971) พบว่าเอนไซม์ บีต้ากลูโคซิเดส จากเชื้อ *Fusarium solani* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 400 กิโลดาลตัน และบีต้า-กลูโคซิเดสจากเชื้อ *Aspergillus terreus* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 275 กิโลดาลตัน (Workman and Day, 1992) และ Hoh *et al.*, (1992) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของบีต้ากลูโคซิเดสจากเชื้อ *A. niger* USDB และ USDB มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 230 กิโลดาลตัน นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสจาก เชื้อ *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 ก็มีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูงคือประมาณ 76 กิโลดาลตัน (Romaniec *et al.*, 1992) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างจากน้ำหนักโมเลกุลที่ศึกษาได้ จากการทดลองนี้มาก

เอนไซม์ไซลาลเนสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนนี้ โปรตีนของเอนไซม์ยังไม่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneous) เพราะผ่านขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีเพียงครั้ง ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ก็น่าคล้ายคลึงกับงานของ Kinoshita and Svarachorn, 1983) ที่ศึกษาการทำเอนไซม์ไซลาลเนสจากเชื้อ *Aspergillus sp.* ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Sephadex-25 คอลัมน์ DEAE- Sephadex A-50 และ Sephadex G-200 เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้ SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ที่ได้ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน โดยปรากฏแถบโปรตีนขึ้นหลายแถบ

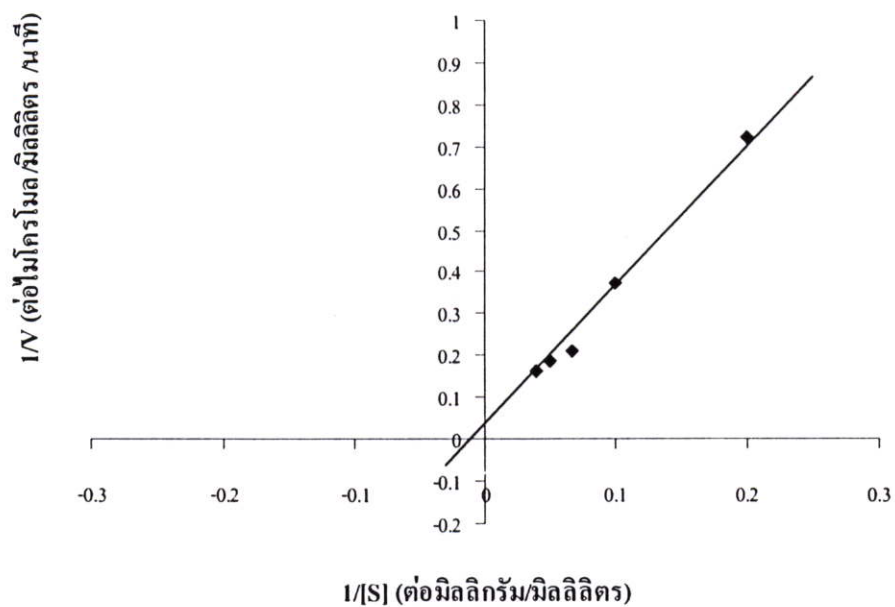
น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)



รูปที่ 4.12 การหาน้ำหนักโมเลกุลเอนไซม์ไซลาลเนสที่ผ่านขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนบน SDS-PAGE โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน ช่องที่ 2 ครูดเอนไซม์ ช่องที่ 3 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ช่องที่ 4 และ 5 ผ่านเจลคอลัมน์เซลาฟลาคริต เอส-100 ช่องที่ 6 และ 7 ผ่านคอลัมน์ดีอีเออี - ไฮแทรป เซฟลาโรส

4.7.2.6 ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไซลानเนส

นำสารละลายเอนไซม์ไซลानเนสมาหาค่า K_m และ V_{max} จากกราฟ Line weaver-Burk plot ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ $1/V$ กับ $1/[S]$ (รูปที่ 4.13) มีจุดตัดบนแกน X ได้ค่า $1/[S]$ เท่ากับ -0.28 ต่อมิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจุดนี้คือค่า $-1/K_m$ ดังนั้นค่า K_m มีค่าเท่ากับ 3.60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีจุดตัดบนแกน Y ได้ค่า $1/V$ เท่ากับ 0.004 ดังนั้นค่า V_{max} มีค่าเท่ากับ 250 ไมโครโมล/มิลลิลิตร/นาที เมื่อพิจารณาค่า K_m ของไซลानเนสที่ได้จากการทดลองพบว่า มีค่าน้อยกว่าเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *R. oryzae* (Bakir *et al.*, 2001) ซึ่งมีค่า K_m เท่ากับ 18.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่า V_{max} เท่ากับ 90 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และน้อยกว่าค่า K_m ของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Paecilomyces thermoplia* ที่มีค่า K_m เท่ากับ 11.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Tian *et al.*, 2005) เชื้อ *A. fumigatus* มีค่า K_m ของเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 5.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Silva *et al.*, 1999) แต่เอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากการทดลองนี้มีค่า K_m มากกว่าค่า K_m ของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *B. thermantacticus* ซึ่งมีค่า K_m เท่ากับ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Milagres *et al.*, (2005) พบว่าเชื้อ *Ceriporiopsis subvermisspora* สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่มีค่า K_m เท่ากับ 1.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการทดลองเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากเชื้อ *A. niger* ML 3 มีค่า K_m ใกล้เคียงกับเชื้อ *A. caesitosus* ที่มีค่า K_m ของไซลานเนส I เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ไซลานเนส II เท่ากับ 3.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า V_{max} เท่ากับ 1679 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 113 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ต่มน้ำดับ (Sandrim *et al.*, 2005) Carmona *et al.*, (2005) พบว่าไซลานเนสจากเชื้อ *A. versicolor* มีค่า K_m เท่ากับ 2.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า V_{max} เท่ากับ 233 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* ML 3 ของการทดลองนี้



รูปที่ 4.13 Lineweaver-Burk plot ของกิจกรรมเอนไซม์ไซตานเนสที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5

บทที่ 5

สรุปผลงานวิจัย

จากผลการศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อ *A. niger* ที่ได้แยกจากธรรมชาติ เพื่อนำมาผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต เพื่อให้สปอร์ที่เหลือร้อยละ 10 สปอร์ของเชื้อ *A. niger* ใช้เวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตนาน 3.5 นาที โดยจุดประสงค์ของการคัดเลือกเวลาที่ให้มีร้อยละของการอยู่รอดร้อยละ 10 นั้นเพื่อให้ง่ายต่อการคัดเลือกเชื้อต่อไป และจากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ *A. niger* ที่ได้จากธรรมชาติในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารแข็งที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอนที่พีเอช 6, 7, และ 8 พบว่าเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายที่ได้ นั้น สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ทุกตัว โดยสังเกตได้จากการเกิดวงใสรอบโคโลนี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดการใช้ไซเลนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารแข็ง โดยที่พีเอชเท่ากับ 6 เชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลาย ML1 และ ML 13 มีค่าอัตราส่วนของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุด ที่พีเอชเท่ากับ 7 เชื้อ *A. niger* ML 13 มีค่าอัตราส่วนสูงสุด และที่พีเอชเท่ากับ 8 เชื้อ *A. niger* ML 249 มีค่าอัตราส่วนสูงสุด ซึ่งเห็นได้ว่าเชื้อ *A. niger* หลังจากผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาที่ให้มีร้อยละของการอยู่รอดเพียงร้อยละ 10 แล้วนั้นได้สายพันธุ์กลายจำนวนน้อย อาจเนื่องมาจากในระหว่างการทดลองฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตนั้น เชื้อ *A. niger* ถูกแสงจึงทำให้จากเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลาย เกิดการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ถูกแสงอัลตราไวโอเล็ตทำลายเบสบางตัวไปแล้ว เกิดการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยวิธีโฟโตรีแอคทีเวชัน (photoreactivation) และจากการทดลองเพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น ดังนั้นเมื่อนำมาทดสอบในการเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวแล้วพบว่าเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายบางส่วนนั้นสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้น้อยกว่าเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์ดั้งเดิม จึงแสดงให้เห็นว่าการคัดเลือกโดยการเลี้ยงในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งนั้นไม่เพียงพอต่อการตัดสินใจเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด อาจได้เพียงแค่ศึกษาความสามารถที่จะมีการผลิตเอนไซม์ได้เท่านั้น เพราะเมื่อทำการคัดเลือกเชื้อ *A. niger* สายพันธุ์กลายในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวแล้วค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ที่ดีที่สุดคือพีเอชเท่ากับ 6 ส่วนในสภาวะการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 และ 8 นั้นเชื้อสามารถเจริญได้แต่มีการผลิตไซลานเนสได้น้อยมาก ซึ่งเชื้อ *A. niger* ML 3 นั้นสามารถที่จะผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีที่สุดในขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวในอาหารสูตรคัดแปลง

ผลการศึกษาน้ำหนักคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส เมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* ML 3 จะสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงกว่าการใช้ไซเลน เปลือกข้าวโพด และชานอ้อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้ซังข้าวโพดเข้มข้นร้อยละ 2 ของน้ำหนักโดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตของเอนไซม์ไซลานเนสสูงกว่าเมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 4 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเติมทริปโตเนนความเข้มข้น 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ลงในอาหารให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่สูงขึ้นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการอาหารที่มีการแปรผันแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และจากอาหารที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต และเมื่อปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0 7.0 และ 8.0 เมื่อศึกษาการแยกและการทำเอนไซม์ไซลานเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการนำสารละลายเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 70 จากนั้นกำจัดเกลือออกและทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการอัลตราฟิวเตรชัน และแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้เจลฟิวเตรชันชนิดเซฟลาคริส เอส-100 และ ดีอีเออี - ไฮแตรป เซฟลาโรส ได้เอนไซม์ไซลานเนสร้อยละ 3.12 มีความบริสุทธิ์ 4.97 เมื่อนำมาศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนสที่ผ่านทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์ดีอีเออี - ไฮแตรป เซฟลาโรส พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 4.5 โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไซลานเนสสามารถคงตัวได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 4.5 และมีกิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 96.33 และร้อยละ 90.60 ที่ พีเอชเท่ากับ 5.0 และ 5.5 ตามลำดับ และเอนไซม์สามารถคงตัวได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS - PAGE พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสที่แยกบริสุทธิ์เพียงบางส่วนนั้นแยกแถบโปรตีนออกเป็น 4 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16 กิโลดาลตัน 15.6 กิโลดาลตัน 15.4 กิโลดาลตัน และ 15.2 กิโลดาลตัน อาจเป็นไปได้ แถบโปรตีนที่เพิ่มขึ้นเป็นเพราะเอนไซม์มีหน่วยย่อยหลายหน่วยซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีเพียง 2 คอลัมน์นั้น ไม่สามารถแยกเอนไซม์ไซลานเนสให้บริสุทธิ์ได้ โดยมีเอนไซม์เซลลูเลสปนอยู่ในเอนไซม์ไซลานเนสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนอยู่ด้วย และเมื่อศึกษาคุณลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสมีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 3.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 250 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ฉะนั้นจากการศึกษานี้ได้ทำให้เป็นแนวทางในการประยุกต์และนำเอนไซม์ไซลานเนสไปศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น หรือใช้เป็นส่วนหนึ่งในการพิจารณาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและนำไปใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมต่อไป

บรรณานุกรม

- ชวนพิศ ดีเอกนามกุล. 2536. “การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อรา”. เล่มที่ 1. น.20-33. ในคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. วัฒนาวิทยาลัยปานบ้านเกร็ด และสรวงอุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ). สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. น.237-260.
- ประเสริฐ สันตินานาเลิศ. 2536. “การทำการเกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต”. เล่มที่ 1. น.5. ในคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. วัฒนาวิทยาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ). สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.
- พิณทิพย์ รื่นวงษา. 2536. “การแยกโปรตีนด้วยวิธีการทำเจลอิเล็กโตโฟรีซิส”. เล่มที่ 1. น.4.1-4.3. ในคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. วัฒนาวิทยาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ). สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2535. พันธุศาสตร์. ไทยวัฒนาพานิชย์, กรุงเทพฯ. น. 212-241.
- เรวดี ปรีบัว. 2546. “การแยกและคัดเลือกเชื้อจากดินในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 121 น.
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช. วิเชียร สีสุข. อัญชริดา สวารชร์ และนภา โล่ห์ทอง. 2535. “การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนจากวัสดูเห็ดที่งอกจากเกษตรโดยเชื้อ *A. fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F”. สาขาวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น. 196-305.
- วิสุทธิ ใบไม้. 2533. พันธุศาสตร์. เจ้าพระยาระบบการพิมพ์, กรุงเทพฯ. น.127-135.
- สมรภัษ พันธุ์ผล. 2537. “การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส และไซแลนสจาก *A. niger* ATCC 6275”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 107 น.

- Anthony, T., Raj C. K., Rajendran, A. and Gunasckaran, P. 2003. "High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1". **Enzyme Microb. Biotechnol.** 32 :647-654.
- Anwar, H.N., Suto, M. and Tomita, F. 1996. "Isolation of mutant of *Penicillium purpurogenum* resistant to catabolite repression". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45 : 684-687.
- Alam, M., Gomes I., Mohiuddin, G., and Hoq, M.M. 1994. "Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses". **Enzyme Microb. Technol.** 16 :298-302.
- Araujo, A. and Souza, D. J. 1986. Characterization of cellulolytic enzyme component from *Aspergillus terreus* and its mutant. **J. Ferment. Technol.** 64 : 463-467.
- Bajpai, P. 1997. "Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications". **Adv. Appl. Microb.** 43 :141-194.
- Bakalova, E.M, Lissen V. A. Voragen A. G. and Beldman, G. 2002. "Purification, characterization and properties of two xylanase from *Thermomyces lanuginosus*". **Enzyme Microb. Tecchnol.** 32 : 437-445.
- Bakir, U., Yavascaoglu, S., Guvenc, F. and Ersayin, A. 2001. "An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partical purification and biochemical characterization". **Enzyme Microb. Technol.** 29 : 328-334.
- Barber, S and Benedito, B. C. 1974. Basic and applied research needs for optimizing utilization of rice as food as feed. Proceed of the rice by-product utilization international conference. **Institue osf Agrochemistry and Food Technology, Valencia.** 4 : 1-99.
- Bastawde, K. B. 1992. "Xylan structure, microbial xylanase and their mode of action". **World J. Microbiol. Biotechnol.** 8 : 359-368.
- Beg, O.K., Kapoor, M., Mahajan L. and Hoondal, G.S. 2001. "Microbial xylanases and their industrial applications: a review". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56 : 326-338 .
- Biely, B. 1985. "Microbiol xylanolytic system". **Trends. Biotechnol.** 3 : 286-290 .
- Biswas, S.R., Mishra A.K. and Nanda G. 1988. "Xylanase and β -xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses". **Biotechnol. Bioeng.** 31 : 613-616.

- Cardoso, V. A. O. and Filho, F. X. E. 2003. "Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophilophora nainina*". **FEMS Microbiol. Lett.** 233 : 309-314.
- Carmona, C. E., Braga, R. M., Kleiner, A. A. and Jorge, A. J. 1998. "Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*". **FEMS Microbiol. Lett.** 166:311-315.
- Carmona, C. E., Fialho, B. M. and Buchgnani, B. E. 2005. "Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*". **Process Biochem.** 40 : 359-364.
- Cesar, T. and Mrsa, V. "Purification and properties of the xylanase produced by *Thermomyces lanuginosus*". **Enzyme Microb. Technol.** 19 : 289-296.
- Chen, C., Chen, L. J. and Lin, Y.T. 1997. "Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production". **Enzyme Microb. Technol.** 21 : 91-96.
- Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B. J., Claeysens, M. and Bhat M. K. 1996. "Purification and characterization of a major xylanase with cellulase and transferase activities from *Fusarium oxysporum*". **Carbohydrate Res.** 289 : 91-104.
- Christakopoulos, P., Nerinckx, W, Kekos, D., Macris, B. and Claeysens, M. 1996. "Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanase from *Fusarium oxysporum* F3". **J. Biotechnol.** 51 : 181-189.
- Christov, L. P., Szakacs G. and Balakrishnan, H. 1999. "Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanase in pulp bleaching". **Process Biochem.** 34 : 511-517.
- Dekker, R.L. and Richards, G.N. 1976. "Hemicellulase : Their occurrence purification, properties and mode of the action". **Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.** 32 : 277-352.
- Demzin, A.L. and Solomon, N.A. 1986. Manual of Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology Washington, D.C. p.181.
- Dietmar, H., Bern, N., Klaus, D.K., Walter, S. and Silvia, Z. 1996. "Production of fungal xylanases". **Biores. Technol.** 58 : 137-161 .
- Dusterhorft, E. M., Linssen, V. A. J. M., Voragen, A. G. J. and Beldman, G. 1997. "Purification, characterization, and properties of two xylanase from *Humicola insolens*". **Enzyme Microbial. Technol.** 20 : 437-445.

- Enari, T.M. 1983. Microbial cellulases. Applied Science Publishers, London and New York. pp. 183-223.
- Fiedurek, J. and Gromada, A. 1997. "Selection of biochemical mutant of *Aspergillus niger* with enhanced catalase production". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45 : 684-687.
- Fredrick, U., Romanic, M.P.M., Kobayshi, T. and Demain, A. L. "Purification and characterization of endoxylanase Se from *Clostridium thermocellum*". **Biochem. J.** 279 : 67-73.
- Garg, A.P., Roberts, J.C., and McCarthy, A. 1998. "Bleach boosting effect of cellulase-free xylanase of *Streptomyces thermoviolaceus* and its comparison with two commercial enzyme preparations on birchwood kraft pulp". **Enzyme Microb. Biotechnol.** 22 : 594-598.
- Gargham, L.D., Haggett, K.D., Jennings, P.A., Le, Broque D.C., Whittaker, R.G. and Schober, P.A. 1993. Random mutagenesis of the substrate-binding site of a serine protease can generate enzymes with increased activity and altered primary specificities. **Biochem.** 32 : 6250-6258.
- Gasper, A., Cosson, T. and Thonart, P. 1997. "Study on the production of a xylanolytic complex from *Penicillium cannessens* 10-10C". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 67 : 45-58.
- Georis J., Giannotta F., Buyl D. E., Granier B. and Frere M. J. 2000. "Purification and properties of three endo- β -1,4-xylanase produced by *Streptomyces* sp. Strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. **Enzyme Microb. Technol.** 26 : 178-186.
- Gerald, J. S. 1973. Laboratory Exercise in Genetics. Macmillan Publishing Co.' Inc. New York. pp.183-198.
- Grbski, A., and Jeffries, T.W. 1991. "Production purification and characterization of beta-1,4-endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*". **Appl. Environ. Microbiol.** 57 : 987-992.
- Haltrich, D., Laussamayer, B. and Steiner, W. 1994. "Xylanase formation by *Sclerotium rolfsii*: Effect of growth substrates and development of a culture medium using statically designed experiments". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42 : 522-530.
- Hamzah, A., and Abdulrashid, M. 1999. "Characterization of xylanase produced by *Bacillus pumilis* strain PJ19". **World J. Microbiol. Biotechnol.** 9:157-162.
- Herbert, D, Phipps, P.J., and Strange, R.E. 1972. Chemical analysis of microbial cell. *In*: Norris JR, and Ribbon DW, editors. Methods in Microbiology. Academic Press, New York. pp. 275-279.

- Hoh, Y. K., Yeoh, H. H. and Tan, T. K. 1992. Properties of β -glucosidase purified from *Aspergillus niger* mutants USDB 0827 and USDB 0828. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 37 : 590-593.
- Hoq, M.M. and Deckwer, W.D. 1995. "Cellulase-free xylanase by thermophilic fungi: a comparison of xylanase production by two *Thermomyces lanuginosus* strains". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43 : 604-609.
- Hoq, M.M., Hempel, C. and Deckwer, W.D. 1994. "Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9: Effect of agitation and medium components on production". **J. Biotechnol.** 37 : 49-58.
- Huang, L. Hseu, T. H. Sullivan, P. A. and Shepherd, M. G. 1977. "Purification of an endoxylanase from *Trichoderma koningii* G-39.". **Biochem. J.** 278 : 329-333.
- Hurst, P. L., Nielsen, J., Sullivan, P. A. and Shepherd, M. G. 1977. Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. **Biochem. J.** 165 : 33-41.
- Ishihara, M., Tawata, S., and Toyama, S. 1997. "Purification and Some Properties of a Thermostable Xylanase from Thermophilic Fungus Strain HG-1". **J. Ferment. Bioeng.** 5 : 478-480.
- Ito, K., Ogasawara, H., and Ishikawa, T. 1992. "Purification and properties of acid stable xylanase from *Aspergillus kawachii*". **Biosci. Biotech. Biochem.** 56 : 547-550.
- Iwamoto, T., Sasaki, T. and Inaoka, M. 1973. "Hemicellulase : Their occurrence, purification, properties and mode of action". **Adv. Chem. Biochem.** 32 : 277-352.
- Jeffries, T.W. 1992. "Enzymatic treatment of pulps. Emerging Technologies for Material and Chemicals for Biomass". **ACS Symp. Ser.** 476 : 313-329.
- Jorgensen, H., Eriksson, T. and Borjesson, J. 2003. "Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888". **Enzyme Microb. Technol.** 32 : 851-861.
- Kang, K.M., Maeng, J.P. and Rhee, H.Y. 1996. "Purification and Characterization of Two Xylanase from Alkalophilic *Cephalosporium* sp. Strain RYM-202". **Appl. Environ. Microbiol.** 62 : 348-3482.

- Keskar, S.S. 1992. "High activity xylanase from thermotolerant *Streptomyces* T7 cultural condition and enzyme properties". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 14 : 481-486.
- Khanonguch, C., Asada, K., Tsuruga, H., Ooi, T., Kinoshita, S., and Lumyong S. 1998. "Beta-mannase and xylanase of *Bacillus subtilis* 5H active for biobleaching of curde pulp". **J. Ferment. Bioeng.** 86 : 461-466.
- Kimura, I., Sasahara, H. and Tajima, S. 1995. "Purification and Characterization of Two Xylanase and an Arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*". **J. Ferment. Bioeng.** 4 : 334-339.
- Kinoshita, S. and Svaracchorn, A., 1983. "Purification of xylanase from *Aspergillus* sp." **Annual Reprints of ICME.** 6 : 293-296.
- Kitreechavanich, V., Hayashi, M. and Nagai, S. 1984. "Purification and Properties of Endo-1,4- β -Xylanase from *Humicola lanuginosa*". **J. Ferment. Technol.** 5 : 415-420.
- Kohil, U., Nigam, P., Singh, D. and haudhary, K. 2001. "Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C". **Enzyme Microb. Biotechnol.** 28 : 606-610.
- Kormelink, F.J.M., Sarle, V. L. W. Wood, T.M. and Voragen, A.G.J. 1993. "Purification and characterization of three endo-(1,4)- β -xylanase and one β -xylosidase from *Aspergillus awamori*". **J. Biotechnol.** 27 : 1249-265.
- Kuhad, R.C. and Singh, A. 1993. "Lignocellulose biotechnology: current and future prospects". **Crit. Rev. Biotechnol.** 12 : 413-435.
- Kuhad, R.C., Manchanda, M. and Singh, A. 1998. "Optimization of xylanase peroduction by a hyperxylanolytic mutant strian of *Fusarium oxysporum*". **Process Biochem.** 6 : 641-647.
- Lama, L. Calandrelli, V. Gambacorta, A. and Nicolaus, B. 2004. "Purification and characterization of thermostable xylanase and β -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*". **Res. Microbiol.** 155 : 283-289.

- Lias, M. and Hoq, M.M. 1998. "Effect of agitation rate on the growth and production of xylanases free of cellulase by *Thermomyces lanuginosus* MH4 in bioreactor". **World J. Microbiol. Biotechnol.** 14 : 765-767.
- Li, L., Cheng Y., Jiang Z. and Yang, S. 2005. "Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila*". **Enzyme Microb. Technol.** 51: 451-461.
- Mandels, M. 1975. Microbial sources of cellulase. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 5 : 81-105.
- Mandels, M. and Weber, J. 1969. "The production of cellulose. In Advances in Chemistry Serology". Gould, R. E. ed. American Chemistry Society, Washington, D. C. pp. 391-398.
- Mikhailova, R.V., Lobanok, A.G., Sapunova, L.I., Shishko, Zh. F. and Zendovich, I.E. 1998. "Selection of a Mutant Strain of *Aspergillus alliaceus* Producing Pectin Hydrolases". **Appl. Biochem. Microbiol.** 34 : 77-80.
- Marques, S., Alves, L., Ribero, S. and Girio, F.M. 1998. "Characterization of a thermotolerant and alkalotolerant xylanase from a *Bacillus sp*". **Appl. Biochem. Biotechnol.** 73 : 159-172.
- Milagres, A. M. F., Magalhaes, P. O. and Ferraz, A. 2005. "Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispota* cultivated on *Pinus taeda*". **FEMS Microbiol. Lett.** 183 : 274- 281.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry.** 31 : 426 -428.
- Montenecourt, B. S. and Eveleigh, D. E. 1977. "Preparation of mutants of *Trichoderma reesei*" with enhanced cekkukase production. **Appl. Environ. Microbiol.** 134 : 777-782.
- Moreau, A., Sharock, F., Kluepfel, D., and Morosolf, R. 1994. "Increase in catalytic activity and thermostability of xylanase A of *S. lividans* 1326 by site specific mutagenesis". **Enzyme Microb. Technol.** 16 : 420-424.

- Nakanish, K., Arai, H., and Yasui, T. 1984. "Purification and some properties of xylanase from *Cryptococcus flavus*". **J. Ferment. Technol.** 62 : 361-369.
- Nascimento, R. P., Coelho, R.R.R., Marques, S. and Alves L. 2002. "Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. Strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil". **Enzyme Microb. Technol.** 31 : 549-555.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the smugly method for the determination of glucose. **J. Bio. Chem.** 153 : 375-380.
- Okada, G. 1985. Purification and properties of cellulose from *Aspergillus niger*. **Agric. Biol. Chem.** 49 : 1257-1265.
- Okeke, B.C. and Obi, S.K.C. 1993. "Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an *Arthrographis* sp". **World J. Microbiol. Biotechnol.** 9 : 345-359.
- Panbanged, W., Shinmyo, A. and Okada, H. 1993 "Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumilus*". **Annual Report of ICME.** 6 : 13-21.
- Pharmacia Fine Chemicals. 1991a. "Ion Exchange Chromatography ; Principles and methods". Pharmacia Fine Chemical AB, Sweden. p. 42.
- Plummer, D.T. 1987. "An Introduction to Pratical Bichemistry" London : MaGraw Hill Book Co., Ltd.
- Polsinelli, M. and Bertta, M. 1996. "Genetic recombination in crosses between *Streptomyces aureofaciens* and *S. rimosus*". **J. Bacteriol.** 91 : 63-68.
- Puchart, V., Katapodis, P. Biely, P. and Kremnický, L. 1999. "Production of xylanase, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lagnuginosus*". **Enzyme Microb. Technol.** 24 : 355-361.
- Raj, C. K. and Chanda, S.T. 1995. "A cellulase-free xylanase from alkali-tolerrant *Aspergillus fischeri* Fxn1". **Biotechnol. Lett.** 17 : 309-314.

- Rao, M., Khadikar, S. and Despande, V. 1995. "Chemical modification of xylanase from *Chainia sp.* (NCL 82.5.1)". **Biotechnol. Lett.** 17 : 589-592 .
- Ricardo, F.A. Fredirck, J. R. and Reilly, P.J. 1985. "Purification and characterization of endoxylanase from *Aspergillus niger*". **Bioehol. Bioeng.** 27 : 539-546.
- Robert, H. T. 1993. Molecular Genetics. Principle of Genetics, Boston University. pp. 441-480.
- Robert, J. B. 1999. Gene mutation and repair. Genetics: Analysis and principles, University of Minnesota. pp. 454-481.
- Roby, J.F. and White, B. J. 1987. "Biochemical Techniques Theory and Practice". California : Brooks/Cole Publishing Company.*
- Romaniec, M. P. M., Fauth, U., Kobayshi, T., Huskisson, N. S., Barker, P. J. and Demain, A. L. 1992. Purification and characterization of a new endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. **Biochem. J.** 283 : 69-73.
- Rotto, M., Poutanen D. and Viikari L. 1992. "Production of xylanolytic enzymes by an alkalitolelant *Bacillus circulans* strain". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 37 : 470-473.
- Ryan, E. S., Nolan, K., Thompson, R., Gubit, M. G., Savage, V. A. and Tuohy, G. M. 2003. "Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*". **Enzyme Microb. Technol.** 33 : 775-785.
- Saha, B.C. 2001. "Xylanase from a newly isolated *Fusarium verticillioides* capable of utilizing corn fiber xylan". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56 : 762-766.
- Sandrim, V. C., Rizzatti, A. C. S., Terenzi, H. F. and Jorge, J. A. 2005. "Purification and biochemical characterization of two xylanase produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching". **Process Biochem.** 40 : 1823-1828.
- Scopes, R.K. 1978. Techniques for protein purification. In Technique in the Life Science : Techniques and Enzymes. Biochemistry. (eds. Kornberg, H.L., Metcalf, J.C., Northcote, D.H., Pogson, C.I. and Tipton, K.F.) pp. 1-42, Amsterdam : Elsevier/ North-Holland Bichemical Press.

- Shei, J. C., Fratzke, A.R. and Reilly, P. J. 1985. "Purification and characterization of endoxylanase from *Aspergillus niger* III". **Biotechnol. Bioeng.** 27 : 533-538.
- Shoham, Y., Zosim, Z., and Rosenberg, E. 1993. "Practical decolourization of kraft pulp at high temperature and at high values with an extracellular xylanase from *Bacillus stearothermophilus*". **J. Biotechnol.** 30 : 123-131.
- Siedenberg, D., Gerlach, R. S. Schugeri, K. Giesppin, F. L. M. and Hunik, J. 1998. "Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures". **Process Biochem.** 4 : 429-433.
- Singh, S. Pillay B. and Prior, A. B. 2000. "Thermal stability of β -xylanase produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains". **Enzyme Microb. Technol.** 26 : 502-508.
- Silva, C. H. C., Puls, J. Sousa M. V. and Filho, F. X. 1999. "Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius". **Rev. Microbiol.** 30 : 1-10.
- Smith, C. D. and Wood, M. T. 1991. "Xylanase Production by *Aspergillus awamari*. Development of a Medium and Optimization of the Fermentation Parameters for the Production of Extracellular Xylanase and β -Xylosidase while Maintaining Low Protease Production". **Biotechnol. Bioeng.** 38 : 883-890.
- Srinivasan, M.C. and Rele, M.V. 1995. "Cellulase free xylanase from microorganisms and their applications to pulp and paper biotechnology: an overview". **Ind. J. Microbiol.** 35 : 93-101.
- Steiner, J., Carmona, P., Ponce, C., Berti, M. and Eyzaguirre, J. 1998. "Isolation of mutants of *Penicillium purpurogenum* with enhanced xylanase and β - xylosidase production". **World J. Microbiol. Biotechnol.** 14 : 589-590.
- Stroll, V. S. and Blanchard, J. S. 1990. "Buffer : principle and practice. In Method in Enzymology". Vol. 182, pp. 24-38, New York : Academic Press.
- Sunna, A. and Antranikian, G. 1997. "Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria". **Crit. Rev. Biotechnol.** 17 : 39-67.

- Tang, L.U.L., Yu E.K.C., Louis, S. G.W. and Saddler, J.W. 1987. "Inexpensive, rapid procedure for bulk purification of cellulase-free beta, 1-4, D-xylanase for high specific activity". **Biotechnol. Bioeng.** 30 : 96-106.
- Techapun, C., Charoenrat, T., Poosaran, N., Watanabe, M. and Sasaki. 2002. "Thermostable and Alkaline-Tolerant Cellulase-Free Xylanase Produced by Thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab 106". **J. Biosci. Bioeng.** 4 : 431-433.
- Tian, L., L., Cheng, Y., Jiang, Z. and Yang, S. 2005. "Purification and characterization of a cellulose-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila*". **Enzyme Microb. Technol.** 42: 412-418.
- Trujillo, M. A., Avalos, P. O. and Noyola, P. T. 2003. "Enzymatic properties of a purified xylanase from mutant PN-120 of *Cellulomonas flavigena*". **Enzyme Microb. Technol.** 32 : 401-406.
- Toyama, H. and Toyama, N. 1990a. "Genetic variants derived from auxotopolyploid strains of *Trichoderma reesei* QM 9414". **Agri. Biol. Chem.** 54(9) : 51-53.
- Toyama, H. and Toyama, N. 1990b. "Autopolyploid formation of *Trichoderma reesei* M 9414 by colchicine treatment". **J. Ferment. Bioeng.** 69(1) : 51-53.
- Tseng, J. M., Yap, N. M., Ratanakhanokchai, K., Kyu, L. K. and Chen, T. S. 2002. "Purification and characterization of two cellulase free xylanase from an alkaliphilic *Bacillus firmus*". **Enzyme Microb. Technol.** 30 : 590-595.
- Ufuk, B., Sebnem, Y., Ferda, G. and Aysegul, E. 2001. "An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization". **Enzyme Microb. Technol.** 7 : 328-334.
- Viikari, L., Temkanen, M., Buchert, J. Rotto, M., Bailey, M., Siika-aho, M. and Linko, M. 1993. Hemicellulose for industrial application, *In* J.N. Saddler and C.A.B. Wallingford. (eds.) Bioconversion of forest and agricultural plant residues. New York: International public. pp. 113-182.
- William, S.K. 1997. Gene mutation, DNA repair and transposable elements. Concepts of Genetic, The college of New Jersey. pp.389-428.

- Wong, K.K.Y. and Saddler, J.N. 1988. "Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and application". **Microbiol. Rev.** 52 : 305-317.
- Wong, K.K.Y. and Saddler, J.N. 1992. "*Trichoderma* xylanase, their properties and application". **Crit. Rev. Biotechnol.** 12 : 413-435.
- Wood, T. M. 1971. The cellulose of *Fusarium solani*. Purification and properties of the cellulose from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Biochem. J.** 191 : 83-94.
- Workman, W.E. and Day, D. F. 1982. Purification and properties of β -glucosidase from *Aspergillus terreus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 44 (6) : 1289-1295.
- Yang, V. Zhuang, Z. Elegir, G. and Jeffries, T.W. 1995. "Alkaline-Active Xylanase Produced by Alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolated from Kraft Pulp". **J. Ind. Microbiol.** 15 : 434-441.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารที่ใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์และการเลี้ยงเชื้อ

1. PDA medium

มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
เดซโทส (Dextose)	20	กรัมต่อลิตร
วุ้น	15	กรัมต่อลิตร

2. complete medium (Demzin, 1986)

มอลโตส (BHD)	40	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (Oxoid)	10	กรัมต่อลิตร
มอลลัสกัต (Oxoid)	24	กรัมต่อลิตร
วุ้น	20	กรัมต่อลิตร

3. minimal medium (Demzin, 1986)

โซเดียมไนเตรด (NaNO_3)	3	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5	กรัมต่อลิตร
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัมต่อลิตร
กลูโคส (glucose)	40	กรัมต่อลิตร

4. minimal medium agar

ใส่วุ้น 18 กรัมต่อลิตร ใน minimal medium เดิม โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์

5. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร xylan medium (Mendel, 1975)

ส่วนที่ 1

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2	กรัมต่อลิตร
---	---	-------------

ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ((NH ₄) ₂ HPO ₄)	1.4	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.3	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0.3	กรัมต่อลิตร
ยูเรีย	0.3	กรัมต่อลิตร
โปรติเอสเปปโตน	0.23	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	0.1	กรัมต่อลิตร
ส่วนที่ 2 แร่ธาตุผสม		
เฟอร์รัสซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (FeSO ₄ ·4H ₂ O)	5	กรัมต่อลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	1.40	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสเฮปตะไฮเดรต (MnSO ₄ ·7H ₂ O)	4.56	กรัมต่อลิตร
โคบอลต์ไดคลอไรด์ (CoCl ₂)	2.0	กรัมต่อลิตร

6. อาหารสูตรดัดแปลง (เรวดี ปรีบัว, 2547)

ยูเรีย	0.3	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	0.25	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	0.05	กรัมต่อลิตร
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ((NH ₄) ₂ HPO ₄)	1.4	กรัมต่อลิตร
ทวิน 80	0.2	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0.3	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MnSO ₄ ·7H ₂ O)	0.3	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	2	กรัมต่อลิตร
ไซเลน	1	ร้อยละ

7. วิธีการเตรียมอาหารสูตรต่างๆในการเก็บรักษาจุลินทรีย์และการเลี้ยงเชื้อ

7.1 วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์ (PDA medium)

7.1.1 ชั่งอาหาร PDA ในสัดส่วนให้ได้ปริมาตรตามต้องการ

7.1.2 ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

7.1.3 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.0

7.1.4 บรรจุลงในหลอดฝาเกลียว

7.1.5 นำอาหารที่เตรียมไว้หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7.1.6 เอียงหลอดอาหารจนกระทั่งวันแข็ง

7.2 วิธีการเตรียมอาหาร complete medium

7.2.1 ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

7.2.2 นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.0

7.2.3 เติมผงวุ้นลงและต้มจนวุ้นละลาย นำบรรจุลงในขวดอาหาร

7.2.4 นำอาหารที่เตรียมไว้หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7.2.5 เทลงในจานเพาะเชื้อโดยวิธีปลอดเชื้อ

7.3 วิธีการเตรียมอาหาร minimal medium

7.3.1 ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

7.3.2 นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.0

7.3.3 เติมผงวุ้นลงและต้มจนวุ้นละลาย นำบรรจุลงในขวดอาหาร

7.3.4 นำอาหารที่เตรียมไว้หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7.3.5 เทลงในจานเพาะเชื้อโดยวิธีปลอดเชื้อ

7.4 วิธีการเตรียมอาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์

7.4.1 แบ่งอาหารออกเป็นสองส่วน โดยละลายสารทั้งหมดของส่วนที่ 1 (ยกเว้น $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และส่วนที่ 2 (ยกเว้นไซแลน) เข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

7.4.2 นำส่วนที่ 2 ผสม 0.1 มิลลิลิตรต่อลิตร ในส่วนแรกตามสัดส่วนที่กำหนดไว้

7.4.3 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มอล จากนั้นเติมไซแลนร้อยละ 1 และเติมวุ้นลงไป

7.4.4 ต้มให้วุ้นละลาย แล้วเติม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (เพื่อป้องกันไม่ให้ Mg ไปจับทำให้เกิดตะกอน)

7.4.5 บรรจุลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

- 7.4.6 นำอาหารที่เตรียมไว้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- 7.4.7 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ที่แยกไว้นำไปกรองจุลินทรีย์ด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมครอน
- 7.4.8 นำสารจากข้อ 6 ที่ได้พออุ่นๆ ให้นำไปผสมกับ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ที่กรองจุลินทรีย์แล้ว
ตามสัดส่วนอาหาร

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์และการคำนวณ

1. การตรวจนับสปอร์ของเชื้อโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

1.1 เตรียมตัวอย่างที่จะตรวจนับถ้าเป็นของเหลวสามารถนำมาตรวจนับได้ทันที แต่ถ้าเป็นของแข็งให้ละลายในน้ำกลั่นในปริมาตรที่ต้องการก่อน เช่น ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร (จะได้ความเจือจางเป็น 1: 10) หรืออาจต้องทำการเจือจางมากขึ้นในกรณีที่มีสปอร์จำนวนมาก เช่น เจือจางเป็น 1 : 100 หรือ 1: 1000 เท่า เป็นต้น

1.2 ปิเปตต์ตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในฮีมาไซโตมิเตอร์ (ที่ปิดด้วยกระจกปิดสไลต์ (cover slip) แล้ว) โดยใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ คูดตัวอย่างมา 1-2 หยด และหยดลงด้านข้างของแผ่นกระจกปิดสไลต์

1.3 ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า (เลนส์ใกล้วัตถุ10X) นับจำนวนสปอร์ในแต่ละช่องเล็ก หรือนับช่องใหญ่แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับและนำไปคูณด้วย 4×10^6 จะได้เป็นปริมาณสปอร์ต่อกรัมหรือต่อมิลลิลิตร

2. วิธีการคำนวณหาปริมาณสปอร์

พื้นที่ 1 ช่องเล็กในตารางใหญ่มีค่าเท่ากับ $0.05 \times 0.05 = 0.0025$ ตร.มม.

ความลึกระหว่าง cover slip และตาราง (ผู้ผลิตจะกำหนดไว้) = 0.1 มม.

ดังนั้นปริมาตร 1 ช่องเล็ก จะมีค่า $0.0025 \times 0.1 = 0.00025$ ลบ.ซม.

ปริมาตร 0.00025 ลบ.ซม. มีจุลินทรีย์ Z เซลล์ (สปอร์)

ปริมาตร 1 ลบ.ซม. มีจุลินทรีย์ $= \frac{Z \times 1000}{0.00025}$

$= Z \times 4 \times 10^6$ เซลล์ต่อมล.

3. วิธีการคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ (จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร)

จำนวนจุลินทรีย์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) = จำนวนโคโลนีที่นับได้ \times ระดับความเจือจาง

4. การคำนวณหาร้อยละการอยู่รอดของจุลินทรีย์หลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต

$$\text{ร้อยละการอยู่รอด} = 100(S)/X$$

โดยกำหนดให้

X = จำนวนจุลินทรีย์สายพันธุ์แท้ที่ไม่ผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ต (ตัวควบคุม) ในแต่ละเวลาและความเจือจาง

S = จำนวนจุลินทรีย์ที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตในแต่ละเวลาและความเจือจาง

5. การเปรียบเทียบหาอัตราการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์

อัตราการใช้แหล่งคาร์บอน = $\frac{\text{ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสรอบโคโลนี/ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี}}$

6. การเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคสและไซโลส ในการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้สารละลาย DNS ตามวิธีการของ Miller (1959)

6.1 สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย (ร้อยละ) ในน้ำกลั่น

ไดโนโตรซาลิไซลิก แอสิด (DNS)	1
ฟีนอล	0.2
โซเดียมโพแทสเซียมทาทเรต (Rochelle salt)	20
โซเดียมซัลไฟด์ (Na_2SO_3)	0.05
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	1

6.2 วิธีการเตรียมสารละลาย DNS

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่นตามปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเติมสารละลายอื่นๆลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ บรรจุใส่ขวดสีชาและเก็บไว้ในที่มืด

6.3 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคสสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

6.3.1 เตรียม stock solution ของกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6.3.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 1 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร (ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เป็น blank)

6.3.3 เติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร

6.3.4 นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบทำให้เย็นโดยใช้น้ำธรรมดา

6.3.5 เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณกลูโคส ดังแสดงในรูปผนวกที่ ข.1

6.4 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลสสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐานของกลูโคส แต่ใช้สารละลายไซโลสแทนกลูโคส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณไซโลสดังแสดงในรูปผนวกที่ ข.2

7. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสตามวิธีของ Tang *et al.*, (1987)

7.1 วิธีวิเคราะห์

7.1.1 เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสมปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายไซแลนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในซิงโครตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

7.1.2 หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร และต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที

7.1.3 ทำให้เย็นด้วยน้ำธรรมดา

7.1.4 เติมน้ำกลั่นปริมาณ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

7.1.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไซโลส

7.1.6 ทำชุดควบคุม โดยการนำเอนไซม์ไปต้มเดือดนาน 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลายไซแลน และเติม DNS reagent ลงทันที นำไปต้มแล้วทำตามวิธีข้างต้น

7.2 การคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส

$$\text{ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์}}{\text{หน่วยต่อมิลลิลิตร} \times \text{น้ำหนักโมเลกุลไซโลส} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ (hydrolyse) สับสเตรตให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

8. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mandels and Weber (1969)

8.1 วิธีวิเคราะห์

เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสมปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายคาร์บอนกัมมะถืดเมทิลเซลลูโลส (CMC) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในซีเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส (ข้อ 7)

8.2 การคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

$$\text{ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักรวมของไซโลส} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ (hydrolyse) สับสเตรตให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

9. การหาปริมาณโปรตีน ตามวิธีการของ Lowry *et al.*, (1951)

9.1 สารเคมี

9.1.1 สารละลายไดโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

9.1.2 สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ร้อยละ 0.5 ในสารละลายโซเดียมตาเตรต ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

9.1.3 สารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (alkali copper) เตรียมโดยผสมสารละลายในข้อ 9.1.1 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ 9.1.2 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (ควรเตรียมในวันที่ใช้)

9.1.4 สารละลาย Folin-ciocateus phenol reagent นำมาเจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ก่อนใช้

9.2 วิธีการ

9.2.1 ใส่สารตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสมปริมาณ 0.5 มิลลิตรในหลอดทดลอง

9.2.2 เติมสารละลายอัลคาไลด์คอปเปอร์ปริมาณ 3.0 มิลลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

9.2.3 เติมสารละลาย Folin-ciocateus phenol reagent ปริมาณ 0.3 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

9.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

9.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

เตรียมโดยใช้ Bovin serum albumin ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

10. การคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆของเอนไซม์

10.1 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity)

$$\text{กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)} = \frac{\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)}}$$

10.2 ค่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ (total activity)

$$\text{ค่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ (ยูนิต)} = \text{ปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิตร)} \times \text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิตร)}$$

10.3 ผลได้ร้อยละ (% Yield)

$$\text{ผลได้ร้อยละ} = \frac{\text{กิจกรรมรวมของเอนไซม์} \times 100}{\text{กิจกรรมรวมของเอนไซม์เริ่มต้น}}$$

10.4 ค่าความบริสุทธิ์ (purification factor)

$$\text{ค่าความบริสุทธิ์} = \frac{\text{ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์}}{\text{ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เริ่มต้น}}$$

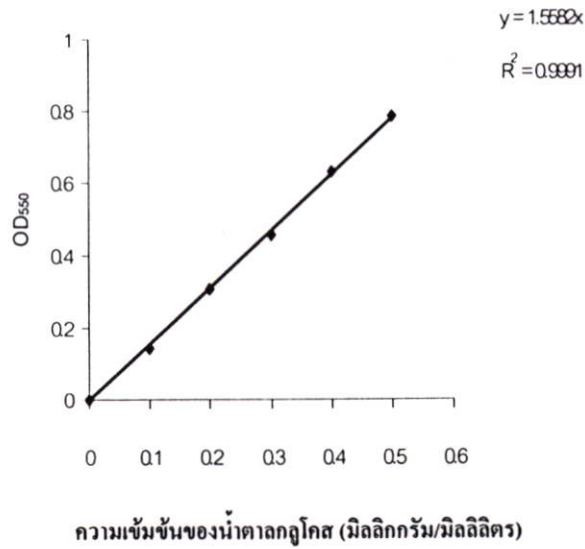
11. ตารางแสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน

ตารางที่ ข.1 แสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้ตกตะกอน โปรตีน

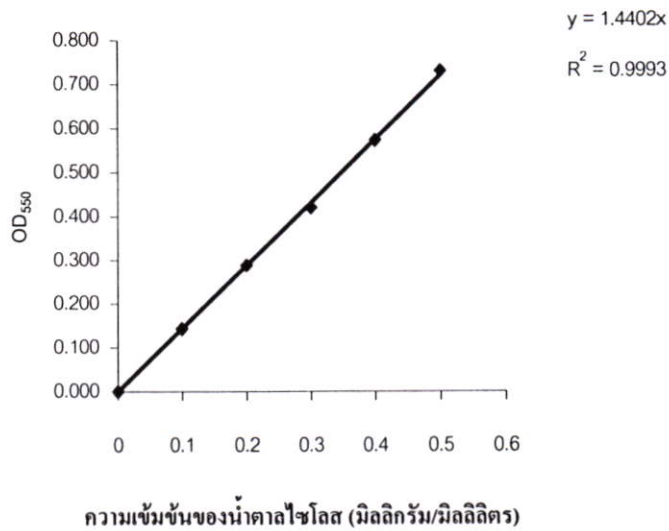
AMMONIUM SULPHATE, GRAMS TO BE ADDED TO 1 LITRE

From % \	To % →	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0		27	55	84	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
	5		27	56	85	115	146	179	212	246	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
	10			28	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	689
			15		28	58	88	119	151	185	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
				20		29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
					25		29	60	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
						30		30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
							35		30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
								40		31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
									45		31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
										50		32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
											55		33	66	101	138	175	215	256	298	343
												60		33	67	103	140	179	219	261	305
													65		34	69	105	143	183	224	266
														70		34	70	107	146	186	228
															75		35	72	110	149	190
																80		36	73	112	152
																	85		37	75	114
																		90		37	76
																			95		38

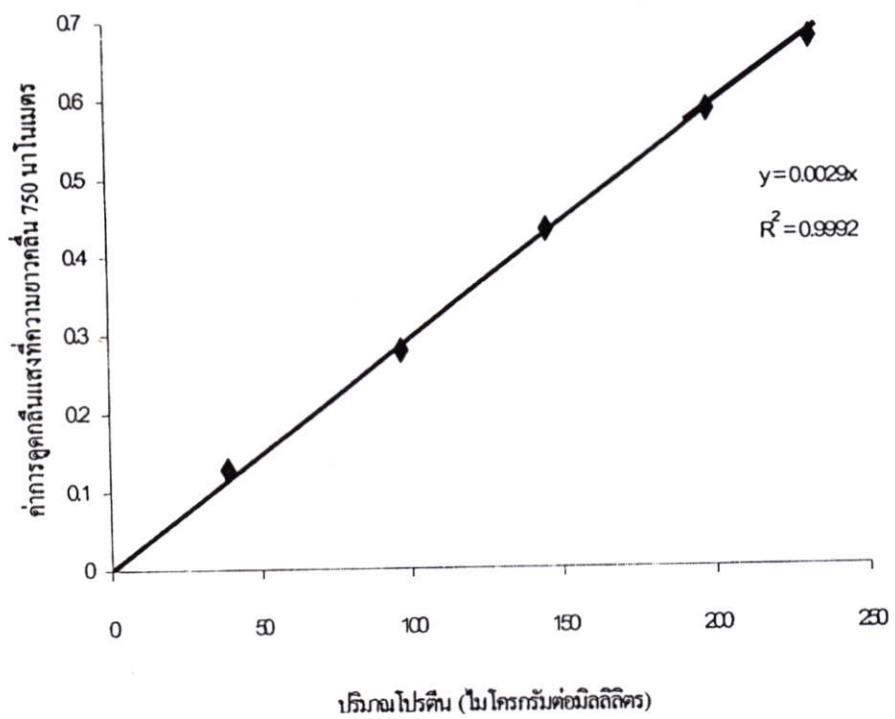
ที่มา: Scopes (1978)



รูปภาคผนวกที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส เป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร



รูปภาคผนวกที่ ข.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส เป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร



รูปผนวกที่ ข.3 กราฟมาตรฐาน โปรตีน โดยแปรผันความเข้มข้นของ Bovin serum albumin ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียมสารและทำแอนไซม์ให้บริสุทธิ์

1. การเตรียมบัฟเฟอร์ซิเตรต (citrate buffer) ตามวิธีการของ Lillie (1948 อ้างโดย Stroll and Blanchard, 1990)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้ค่าพีเอชตามที่ต้องการ

สารละลาย A คือ สารละลายกรดซิตริก (citric acid) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (21.01 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิตร)

สารละลาย B คือ สารละลายโซเดียมซิเตรต ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ ปริมาณ 29.41 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
46.5	3.5	3.0
43.7	6.3	3.2
40.0	10.0	3.4
37.0	13.0	3.6
35.0	15.0	3.8
33.0	17.0	4.0
31.5	18.5	4.2
28.0	22.0	4.4
25.5	24.5	4.6
23.0	27.0	4.8
20.5	29.5	5.0
18.0	32.0	5.2

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
16.0	34.0	5.4
13.7	36.3	5.6
11.8	38.2	5.8
9.5	41.5	6.0
7.2	42.8	6.2

2. การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ตามวิธีการของ Sorensen (1909 อ้างโดย Stoll and Blanchard, 1990)

เตรียมโดยผสมสายละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A คือ สารละลายโมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (monobasic sodium phosphate) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (KH_2PO_4 27.8 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B คือ สารละลายไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (dibasic sodium phosphate) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (Na_2HPO_4 53.65 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
93.5	6.5	5.7
92.0	8.0	5.8
90.0	10.0	5.9
87.7	12.3	6.0
85.0	15.0	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
62.5	37.5	6.6
56.5	46.5	6.7
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5
13.0	87.0	7.6
10.5	90.5	7.7
8.5	91.5	7.8
7.0	93.0	7.9
5.3	94.7	8.0

3. การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีของพินทิว รีนวงษา (2536)

เตรียมสารละลายเป็น stock solution ดังนี้

3.1 Acrylamide-bis (30 เปอร์เซ็นต์ T, 2.67 เปอร์เซ็นต์ C)

Acrylamide 29.2 กรัม และ N,N' - bis-methylene-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง (วอตแมนเบอร์ 1(Whaiman No. 1)) จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเก็บไว้ใช้ได้ภายใน 1 เดือนหลังจากเตรียมสาร

3.2 Tris- HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8

ละลาย Tris- HCl 18.17 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.8 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3 Tris- HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8

ละลาย Tris-base 6.06 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.8 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4 โซเดียมโคดีซิลซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 10

ละลายโซเดียมโคดีซิลซัลเฟต 10 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วกวนเบาๆปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.5 stock sample buffer

เตรียมโดยการผสมสารต่างๆในอัตราส่วนดังนี้

น้ำกลั่น	4.8	มิลลิลิตร
Tris- HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8	1.2	มิลลิลิตร
โซเดียมโคดีซิลซัลเฟต	2.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	1.0	มิลลิลิตร
โบร โมฟีนอลบูล เข้มข้นร้อยละ 0.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)	0.5	มิลลิลิตร

3.6 SDS reducing buffer

เตรียมโดยผสมสาร 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใน stock sample buffer ที่มีปริมาตร 0.95 มิลลิลิตร ก่อนที่จะใช้

3.7 5X-electrode (Runing) buffer พีเอช 8.3

ประกอบด้วย

Tris-base	9	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
โซเดียมโคดีซิลซัลเฟต	3	กรัม

เจือจางให้ได้ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นให้อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.8 ตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst)

เตรียมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) เข้มข้นร้อยละ 10 ก่อนที่จะนำมาใช้และ TEMED (N,N,N,N-tetramethyl ethylenediamine) ใช้ TEMED โดยตรงโดยไม่ต้องทำให้เจือจางก่อน

3.9 การย้อมสีโปรตีนในเจลโดยวิธี Coomassie Brilliant Blue R-250 เข้มข้นร้อยละ 0.1

(น้ำหนักต่อปริมาตร)

เตรียมสารละลายย้อมสี (staining solution) คือ Coomassie Blue R-250 เข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 40 และกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำสารละลายย้อมสีมากรองด้วยกระดาษกรอง สารละลายนี้สามารถนำกลับมาใช้อีกได้

เตรียมสารละลายล้างย้อม (destain) โดยประกอบด้วยเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 40 และกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

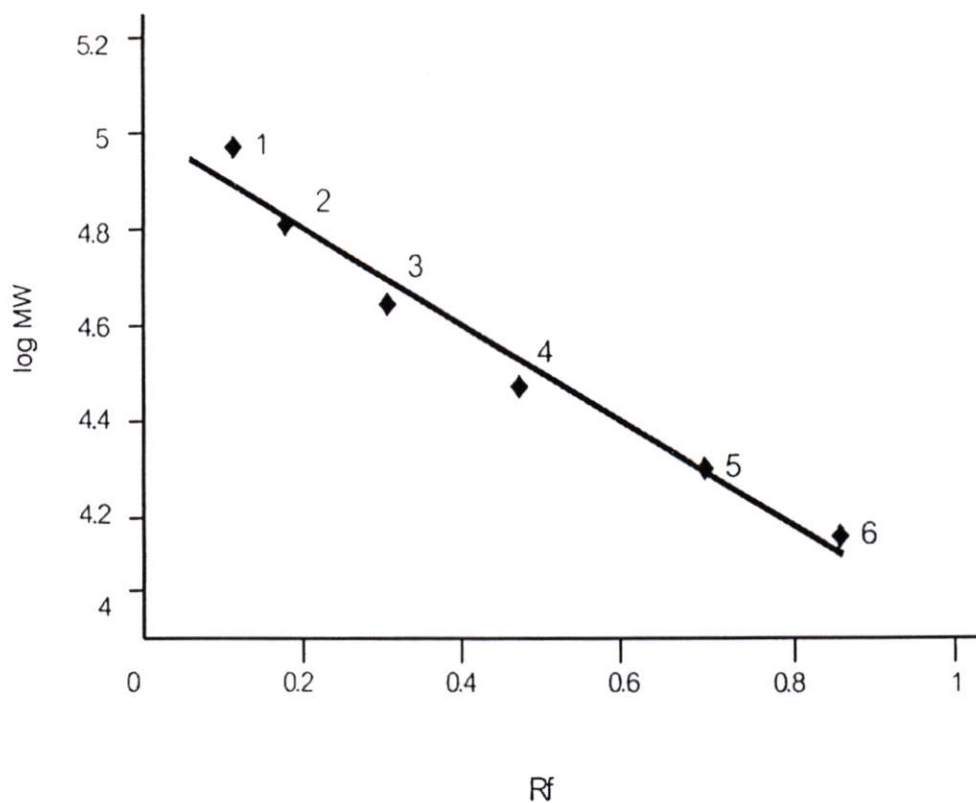
3.10 การเตรียมเจลเป็นชนิด Slab gel

ประกอบชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel เตรียมสารละลายของ separating gel ความเข้มข้นร้อยละ 12 ซึ่งประกอบด้วย น้ำกลั่น 3.35 มิลลิลิตร Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอชเท่ากับ 8.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร โซเดียมโคดีซิลซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ Acrylamide/bis ความเข้มข้นร้อยละ 30 นำไปดูดอากาศเพื่อกำจัดฟองอากาศนานประมาณ 20 นาที แล้วนำมาเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เทสารละลายเจลลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ แล้วค่อยๆ หยดน้ำให้คลุมผิวเจล ทิ้งเจลไว้ให้แข็งตัว และเตรียม stacking gel เข้มข้นร้อยละ 4 โดยประกอบด้วย น้ำกลั่น 6.1 มิลลิลิตร Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอชเท่ากับ 6.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร โซเดียมโคดีซิลซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ Acrylamide/bis ความเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร นำไปดูดอากาศออกจากสารละลาย และก่อนที่จะเติม APS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในส่วนของ separating gel เทน้ำกลั่นที่คลุมผิวเจลออกแล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง สอดหัวลงในแผ่นกระจกและเท stacking gel ที่เตรียมไว้ให้มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร เหนือ separating gel ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นในช่องหัวเอาออกโดยค่อยๆดึงอย่างระมัดระวัง

3.11 การเตรียมตัวอย่าง

เตรียม SDS-reducing buffer ตามปริมาณที่ต้องการใช้ โดยใช้ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อ stock sample buffer 0.95 มิลลิลิตร จากนั้นผสมตัวอย่างกับ SDS-reducing buffer ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต้มสารละลายที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ก่อนนำไปใส่ช่องบนเจล ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส เดิมบัฟเฟอร์โดยทำการเจือจาง 5X-electrode buffer ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 240 มิลลิลิตร เดิมบัฟเฟอร์ปริมาตร 150 มิลลิลิตรลงใน chamber บน ให้กลุ่มผิวเจล และเดิมบัฟเฟอร์ที่เหลือใน chamber ล่าง ใส่สารตัวอย่างหยอดในช่องเจลโดยค่อยๆหยอดผ่านบัฟเฟอร์ลงไป แล้วต่อกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์ เมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของ separating gel ปิดกระแสไฟฟ้า นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาใส่ในถาดที่มีสารละลายสีย้อม (staining solution) ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ส้ำสีย้อมด้วยสารละลายล้างสีย้อมหลายๆ ครั้งจนเห็นแถบน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน

ในกรณีของการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์สามารถทำได้โดยเปรียบเทียบ Mobilities ของโปรตีนนั้นๆกับ Mobilities ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสไปพร้อมกัน



รูปภาคผนวกที่ ค.4 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิด โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจล ซึ่งหมายเลขต่างๆแสดงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานดังนี้ หมายเลข 1 แทน Phosphorylase B, 2 แทน Bovine Serum Albumin, 3 แทน Ovalbumin, 4 แทน Carbonic anhydrase, 5 แทน Trysin inhibitor และ 6 แทน α -Lactalbumin

ภาคผนวก ง

ผลทางสถิติและค่าพีเอช

ตารางภาคผนวก ง. 1 ค่าทางสถิติของอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางวงไตต่อเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดโคโลนีเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายแต่ละสายพันธุ์ ในสถานะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	N	Subset							
สายพันธุ์		1	2	3	4	5	6	7	8
412.	3	1.4600							
247	3	1.6233	1.6233						
239	3	1.6633	1.6633	1.6633					
254	3	1.6767	1.6767	1.6767					
168	3	1.6833	1.6833	1.6833					
223	3		1.7400	1.7400	1.7400				
ดั้งเดิม	3		1.7600	1.7600	1.7600	1.7600			
2.00	3		1.7900	1.7900	1.7900	1.7900			
241	3		1.7967	1.7967	1.7967	1.7967			
209	3		1.8200	1.8200	1.8200	1.8200			
115	3			1.8900	1.8900	1.8900			
405	3				1.9533	1.9533			
217	3				1.9600	1.9600			
5	3					1.9833			
201	3						2.3467		
249	3							2.5800	
3	3							2.6533	
13	3								3.1167
1	3								3.1667
Sig.		.058	.111	.067	.073	.068	1.000	.480	.630

ตารางภาคผนวก ง. 2 ค่าทางสถิติของอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางวงไตต่อขนาด
เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนิเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายแต่ละสาย
พันธุ์ ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน มี
ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	N	Subset							
สายพันธุ์		1	2	3	4	5	6	7	8
412	3	1.2667							
5	3	1.3933							
239	3		1.6800						
209	3		1.8500	1.8500					
223	3		1.8667	1.8667					
247	3		1.9033	1.9033					
168	3		1.9267	1.9267					
241	3		1.9300	1.9300					
ดั้งเดิม	3		1.9500	1.9500	1.9500				
254	3			2.0333	2.0333	2.0333			
2	3			2.1300	2.1300	2.1300	2.1300		
115	3				2.2067	2.2067	2.2067		
3	3					2.2333	2.2333		
217	3					2.2410	2.2410		
249	3					2.2600	2.2600		
405	3						2.3767		
1	2							2.7300	
201	3							2.8967	
13	3								3.3967
Sig.		.306	.061	.054	.061	.111	.083	.180	1.000

ตารางภาคผนวก ง. 3 ค่าทางสถิติของอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสต่อขนาด
เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายแต่ละสาย
พันธุ์ ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งไซแลนที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 ที่
ค่าความชื้นร้อยละ 95

	N	Subset											
สายพันธุ์		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
412	3	1.3467											
201	3		1.8967										
2	3		1.9000										
168	3		1.9300	1.9300									
247	3		1.9733	1.9733									
223	3			2.0533	2.0533								
241	3				2.1200	2.1200							
254	3				2.1267	2.1267							
ดั้งเดิม	3				2.1500	2.1500							
209	3				2.1833	2.1833	2.1833						
5	3					2.1967	2.1967						
3	3						2.3033	2.3033					
115	3							2.3667	2.3667				
405	3							2.4000	2.4000				
217	3								2.4400				
1	3									2.6233			
13	3										2.9333		
239	3											3.0633	
249	3												3.6100
Sig.		1.000	.241	.052	.052	.252	.059	.126	.245	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางภาคผนวก ง. 4 ค่าทางสถิติของเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายแต่ละสายพันธุ์ ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พิเอชเท่ากับ 6.0 ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95

	N	Subset			
สายพันธุ์		1	2	3	4
ML 249	3	12.48467			
ML 405	3	12.83533	12.83533		
ดั้งเดิม	3	13.11000	13.11000		
ML 209	3	13.34500	13.34500		
ML 115	3	13.49367	13.49367		
ML 217	3	13.93667	13.93667		
ML 5	3	14.33033	14.33033	14.33033	
ML 241	3	14.34400	14.34400	14.34400	
ML 201	3		14.55133	14.55133	
ML 2	3			16.03167	
ML 1	3			16.14867	
ML 13	3			16.17767	
ML 3	3				18.56533
Sig.		.054	.075	.051	1.000

ตารางภาคผนวก ง. 5 ค่าความแตกต่างทางสถิติของค่ากิจกรรมไซแลนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML3 ในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารเหลวที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนโดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

ชนิดของแหล่งคาร์บอน (ร้อยละ 1)	ค่ากิจกรรมไซแลนส (ยูนิตต่อมล.)
ไซแลน	17.904 ^b
ซังข้าวโพด	22.864 ^a
เปลือกข้าวโพด	16.326 ^c
ชานอ้อย	12.717 ^d

ตารางภาคผนวก ง. 6 ค่าความแตกต่างทางสถิติของค่ากิจกรรมไซลานเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML3 ในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารเหลวที่มีการแปรผันความเข้มข้นของซังข้าวโพด โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

ความเข้มข้นของซังข้าวโพด (ร้อยละ)	ค่ากิจกรรมไซลานเนส (ยูนิตต่อมล.)
0	0.007 ^c
1	22.034 ^d
2	36.986 ^a
3	38.211 ^a
4	32.303 ^b
5	24.697 ^c

หมายเหตุ: อักษรหลังตัวเลขถ้าต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางภาคผนวก ง. 7 ค่าความแตกต่างทางสถิติของค่ากิจกรรมไซลานเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* สายพันธุ์กลาย ML3 ในสภาวะการเลี้ยงแบบอาหารเหลวที่มีการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้น โดยมีซังข้าวโพดร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนและ ทริปโตเนน 3 กรัมใน โตรเจนต่อลิตร ซึ่งเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

ค่าพีเอชเริ่มต้น	ค่ากิจกรรมไซลานเนส (ยูนิตต่อมล.)
ชุดเปรียบเทียบ	37.462 ^c
5	95.652 ^b
6	96.444 ^a
7	99.372 ^{ab}
8	106.754 ^b

: ชุดเปรียบเทียบคืออาหารสูตรดัดแปลง

ตารางภาคผนวก ง.8 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์
ไฮลาเนส *A. niger* สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมในสภาวะการเลี้ยงเชื้อ
สูตรคัดแปลง

สายพันธุ์	ค่าพีเอช				
	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (วัน)				
	2	3	4	5	6
<i>A. niger</i>	6.58	4.92	4.68	5.26	5.42
<i>A. niger</i> ML 1	6.47	3.80	3.83	4.90	5.10
<i>A. niger</i> ML 2	5.06	3.37	3.29	4.93	4.98
<i>A. niger</i> ML 3	5.59	3.59	3.86	4.95	5.03
<i>A. niger</i> ML 5	6.20	3.34	3.50	4.63	4.76
<i>A. niger</i> ML 13	5.57	3.53	4.10	4.47	4.70
<i>A. niger</i> ML 115	6.01	3.22	3.40	4.25	4.61
<i>A. niger</i> ML 201	6.99	3.46	3.22	3.44	4.00
<i>A. niger</i> ML 209	6.43	3.45	3.38	4.57	4.78
<i>A. niger</i> ML 217	7.00	5.12	3.13	4.00	4.62
<i>A. niger</i> ML 241	5.80	3.35	3.31	5.07	5.24
<i>A. niger</i> ML 249	6.67	4.20	2.73	3.06	3.67
<i>A. niger</i> ML 405	6.50	4.22	3.76	3.83	4.11

ตารางภาคผนวก ง.9 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสจากเชื้อ
A. niger ML3 ที่มีแปรผันชนิดแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ค่าพีเอช				
	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (วัน)				
	2	3	4	5	6
ชุดเปรียบเทียบ	4.73	2.83	3.65	4.65	4.78
ไซเลน	4.08	3.08	4.81	5.34	5.41
ซังข้าวโพด	4.26	6.13	5.34	5.08	5.51
เปลือกข้าวโพด	4.23	5.44	5.66	5.71	5.59
ชานอ้อย	4.94	5.53	5.70	5.77	5.62

ตารางภาคผนวก ง.10 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* ML3 ที่แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว

ความเข้มข้นของซังข้าวโพด (ร้อยละ)	ค่าพีเอช				
	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (วัน)				
	2	3	4	5	6
0	6.61	6.77	6.71	6.53	6.48
1	4.61	5.06	5.46	5.74	5.77
2	3.74	3.81	4.83	5.44	5.53
3	4.79	3.72	4.50	5.38	5.45
4	3.50	3.73	4.10	4.75	5.38
5	6.31	3.84	3.79	3.78	5.03

ตารางภาคผนวก ง.11 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *A. niger* ML3 ที่แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว

แหล่งไนโตรเจน	ค่าพีเอช				
	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (วัน)				
	2	3	4	5	6
ชุดเปรียบเทียบ	6.04	5.68	5.18	3.37	3.47
ไคแอมโมเนียไฮโดรเจน ฟอสเฟต 1.4 กรัม/ลิตร	4.03	3.19	3.42	3.94	4.06
ไคแอมโมเนียไฮโดรเจน ฟอสเฟต 3 กรัม/ลิตร	5.54	5.19	4.75	4.50	4.55
ไคแอมโมเนียไฮโดรเจน ฟอสเฟต 3 กรัมต่อลิตร + ยูเรีย 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	5.68	4.51	5.18	6.37	6.90
ไคแอมโมเนียไฮโดรเจน ฟอสเฟต 3 กรัมต่อลิตร + ซีสต์ สกัด 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	7.32	6.24	4.93	4.45	4.88

ตารางภาคผนวก ง.11 (ต่อ)

แหล่งไนโตรเจน	ค่าพีเอช				
	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (วัน)				
	2	3	4	5	6
โคแอมโมเนียไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมต่อลิตร + เปปโตน 3 กรัม ไนโตรเจน/ลิตร	6.08	4.72	4.28	4.52	4.79
โคแอมโมเนียไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมต่อลิตร + น้ำแซ่ข้าวโพด 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	5.31	4.90	4.42	4.70	4.96
โคแอมโมเนียไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมต่อลิตร + ทริปโตน 3 กรัม ไนโตรเจน/ลิตร	6.43	4.71	4.42	4.23	4.53
ยูเรีย 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	4.12	5.51	6.46	6.85	6.90
ยีสต์สกัด 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	6.97	5.02	4.73	4.50	4.47
เปปโตน 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	5.31	4.46	4.29	4.28	4.35
น้ำแซ่ข้าวโพด 3 กรัมไนโตรเจน/ ลิตร	4.66	4.79	4.52	4.57	5.01
ทริปโตน 3 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	5.31	4.82	4.40	4.33	4.60

ตารางภาคผนวก ง.12 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ

A. niger ML3 ที่แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหาร
เหลว

ค่าพีเอชเริ่มต้น	ค่าพีเอช				
	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (วัน)				
	2	3	4	5	6
พีเอช 5.0	5.18	4.75	4.38	4.17	4.26
พีเอช 6.0	4.92	4.78	4.69	4.31	4.33
พีเอช 7.0	4.67	5.10	4.83	4.69	4.99
พีเอช 8.0	4.73	4.88	4.82	4.79	5.04

ตารางภาคผนวก ง.13 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองผลิตเอนไซม์ไซลันเนสจากเชื้อ
A. niger ML3 ในอาหารเหลวสภาวะเหมาะสมและสายพันธุ์ดั้งเดิมใน
 อาหารสูตรคัดแปลง

สายพันธุ์	ค่าพีเอช				
	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (วัน)				
	2	3	4	5	6
<i>A. niger</i>	5.80	3.52	3.95	4.42	5.07
<i>A. niger</i> ML3	5.75	3.74	4.29	4.81	5.37

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุนันทา มีชนะ เกิดเมื่อวันที่ 17 พฤษภาคม 2522 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ปีการศึกษา 2548 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทั่วไป) จากมหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์