การคัดเลือกแบคทีเรียชอบด่างที่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

SCREENING OF ALKALOPHILIC BACTERIA FOR XYLANASE PRODUCTION

จุฑามาศ มณีวงศ์
CHUTAMAS MANEEWONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-800-5

การคัดเลือกแบคทีเรียชอบด่างที่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

SCREENING OF ALKALOPHILIC BACTERIA FOR XYLANASE PRODUCTION

T049303

จุฑามาศ มณีวงศ์

CHUTAMAS MANEEWONG

เลขหมู่..............................
เลขทะเบียน 49303
วัน, เดือน, ปี 19 ก.พ. 2547

b..............................
i..............................

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-800-5

SCREENING OF ALKALOPHILIC BACTERIA FOR XYLANASE PRODUCTION

CHUTAMAS MANEEWONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2003

ISBN 974-324-800-5

COPYRIGHT 2003

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบคทีเรียชอบด่างที่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

SCREENING OF ALKALOPHILIC BACTERIA FOR XYLANASE PRODUCTION

ชื่อนักศึกษา นางสาวจุฑามาศ มณีวงศ์

รหัสประจำตัว 43065214

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.สุริยา สาสนรักกิจ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.ดุษณี	ธนะบริพัฒน์	
รศ.ดร.นวลพรรณ	ณ ระนอง	
ดร.สุริยา	สาสนรักกิจ	
ผศ.ดวงใจ	โอชัยกุล	
รศ.อรไท	สุขเจริญ	

วัน/เดือนปี ที่สอบ 29 สิงหาคม 2546 เวลา 10.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4 ห้อง 424

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.บุญวัฒน์ อัตชู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่......10.......**เดือน**.....ตุลาคม.........**พ.ศ.**...2546...

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียชอบด่างที่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส
นักศึกษา	นางสาวจุฑามาศ มณีวงศ์
รหัสประจำตัว	43065214
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2546
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. สุริยา สาสนรักกิจ

บทคัดย่อ

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงที่เป็นด่างโดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน จากการคัดแยกได้แบคทีเรียสายพันธุ์ UM-122 ซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุด จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาพบว่าแบคทีเรียอยู่ในจีนัส *Cellulomonas* จากการเปรียบเทียบลำดับเบสบนดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ UM-122 และ *Cellulomonas variformis* พบว่ามีความคล้ายคลึงกันถึงร้อยละ 95 จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสายพันธุ์เป็น *Cellulomonas variformis*

สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยแบคทีเรีย *C. variformis* UM-122 ประกอบด้วย ฟางข้าว 10 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงให้เท่ากับ 10 โดยการเติมโซเดียมคาร์บอนเนต 10 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตเอนไซม์ในฟลาสก์แบบเขย่าให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดเท่ากับ 1.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.63 เท่า ภายหลังการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิ่มตัวเท่ากับ 60 และผ่านการไดอะไลซีส โดยมีกิจกรรมจำเพาะ 5.15 หน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีน สำหรับพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ กิจกรรมของเอนไซม์คือ 7.0 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวที่ช่วงพีเอช 7.0-11.0 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 55 องศาเซลเซียส ผลผลิตสุดท้ายจากการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสพบว่าส่วนใหญ่จะเป็นไซโลไบโอสซึ่ง ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไซแลนเนสจากการใช้ฟางข้าวเป็นสับสเตรต คือ 164.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 591.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

Thesis Title	Screening of Alkalophilic Bacteria for Xylanase Production **Student**
	Miss Chutamas Maneewong
Student ID.	43065214
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2003
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Nuanphan Naranong
Thesis Co-advisor	Dr. Suriya Sassanarakkit

ABSTRACT

Screening of xylanase-producing bacteria was carried out using rice straw as a sole carbon source on an alkaline medium. Among the isolated bacteria the strain UM122 from soil at Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) showed the highest xylanase production. The bacterium is belonged to genus *Cellulomonas,* based on morphological and physiological characteristics,. According to the comparative analysis of DNA sequences, the DNA-DNA similarity between the strain UM-122 and *Cellulomonas variformis* was 95%, so it was identified as *Cellulomonas variformis.*

An optimized medium for xylanase production of *C. variformis* UM122 was 10 g/l rice straws, 1 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/l yeast extract, 1 g/l K_2HPO_4, and 0.2 g/l $MgSO_4 \bullet 7H_2O$. An initial pH of the medium was adjusted to 10.0 by 10 g/l Na_2CO_3. In shake flask culture, the maximum activity of 1.4 U/ml was obtained on day 7 with the shaking speed of 200 rpm at 30°C. Some properties of the crude enzyme were studied. The xylanase was purified 1.63 times after precipitation with ammonium sulfate at saturation of 60% and dialysed with a specific activity of 5.15 U/mg protein. The optimal pH and temperature for xylanase activity were 7.0 and 60 °C, respectively. The enzyme was stable at pH range between 7.0 and 11.0 and at temperature belowed 55°C. The end products from rice straw hydrolysis by xylanase were mainly xylobiose. The K_m and V_{max} values of xylanase with rice straw as substrate were 164.47 mg/ml and 591.26 μg/ml/min, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. สุริยา ศาสนรักกิจ จาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และ Professor Dr. Makio Kitada จาก Japan Society for The Promotion of Science (JSPS) ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นในการทำวิจัย และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในภาควิชา และ รองศาสตราจารย์ อรไท สุขเจริญ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกภาควิชา ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ภูษิตา วรรณิสสร ที่ให้ความรู้ คำแนะนำและให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์ทางดีเอ็นเอ

ขอกราบของพระคุณ ดร.สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์ ผู้อำนวยการฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่กรุณาให้ใช้เครื่องมือและสถานที่ในการทำการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และเพื่อนๆ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ เพื่อนๆ และพี่ๆ ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ของกราบของพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาว ที่ช่วยเหลือ สนับสนุน และเป็นกำลังใจที่ดี ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์

จุฑามาศ มณีวงศ์

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		II
กิตติกรรมประกาศ		III
สารบัญ		IV
สารบัญตาราง		VI
สารบัญรูป		VII
บทที่ 1 บทนำ		**1**
1.1	ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2	วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3	ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง		**3**
2.1	ไซแลน	3
2.2	เอนไซม์ไซแลนเนส	6
2.3	จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส	9
2.4	จุลินทรีย์ชอบด่าง	11
2.5	ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากจุลินทรีย์	15
2.6	ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส	18
2.7	ประโยชน์ของเอนไซม์ไซแลนเนส	21
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง		**23**
3.1	สารเคมี	23
3.2	เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	24
3.3	การเตรียมฟางข้าวและอาหารเลี้ยงเชื้อ	25
3.4	การคัดแยกแบคทีเรียย่อยฟางข้าวจากดิน	25
3.5	การคัดแยกแบคทีเรียย่อยฟางข้าวในอาหารเหลว	25

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.6 การจำแนกลักษณะและศึกษาสมบัติบางประการของแบคทีเรีย.....................26

3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสในระดับฟลาสก์....28

3.8 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซแลนเนส...............................30

3.9 การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์.......................31

3.10 การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์........................32

3.11 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซแลนเนส....................................32

3.12 วิธีวิเคราะห์..32

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์...33

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยไซแลนจากฟางข้าว..................33

4.2 การจำแนกลักษณะและศึกษาสมบัติบางประการของแบคทีเรีย.....................33

4.3 การศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ในระดับฟลาสก์..38

4.4 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์...49

4.5 การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสับสเทรตด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส.........56

4.6 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซแลนเนส....................................58

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย...60

บรรณานุกรม...61

ภาคผนวก ก...68

ภาคผนวก ข...70

ภาคผนวก ค...81

ประวัติผู้เขียน...86

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส......9
2.2 จุลินทรีย์ชอบด่างที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส......10
2.3 แสดงความแตกต่างของพีเอชภายในและภายนอกเซลล์ในแบคทีเรียชนิดต่างๆ......14
4.1 ชนิดของตัวอย่าง แหล่งที่มา และกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส......34
4.2 ชนิดของไอโซเลตและกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส......34
4.3 ลักษณะและสมบัติบางประการของแบคทีเรียสายพันธุ์ UM-122......36
4.4 แสดงการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส......39
4.5 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณฟางข้าวที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส......41
4.6 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส......43
4.7 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส......45
4.8 แสดงการเปรียบเทียบผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส......47
4.9 แสดงผลการตกตะกอนเอนไซม์ไซแลนเนสด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในแต่ละขั้นตอน......50
ตารางภาคผนวก......79

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของไซแลนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 และพันธะ β-1,3 4
2.2 แสดงองค์ประกอบของไซแลนในพืชตระกูลหญ้าหรือฟางข้าวที่มีลักษณะเป็นอนุพันธ์ของ arabino-4-*O*- methylglucuronoxylan..4
2.3 แสดงองค์ประกอบของไซแลนในไม้เนื้อแข็งที่มีลักษณะเป็น *O*-acethyl-4-*O*- methylglucuronoxylan 5
2.4 แสดงองค์ประกอบของไซแลนในไม้เนื้ออ่อนที่มีลักษณะเป็น arabino-4-*O*- methylglucuronoxylan 5
2.5 แสดงการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส..7
2.6 แสดงการเจริญของจุลินทรีย์ที่พีเอชต่างๆ...11
2.7 แสดงกลไกการนำ Na^+/H^+ เข้า-ออกจากเซลล์..13
4.1 แสดงรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ UM-122 เมื่อทำการเลี้ยงบนอาหาร alkaline medium...35
4.2 ลำดับเบสบนดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ UM-122...37
4.3 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส......................................39
4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสเมื่อใช้ปริมาณฟางข้าวต่างๆกัน...............................41
4.5 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส...................................44
4.6 การใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส 45
4.7 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส.......................................48
4.8 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยง...48
4.9 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสที่พีเอชต่างๆ...52
4.10 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสที่อุณหภูมิต่างๆ...52
4.11 ความคงตัวของเอนไซม์ไซแลนเนสที่พีเอชต่างๆ...55
4.12 ความคงตัวของเอนไซม์ไซแลนเนสที่อุณหภูมิต่างๆ..55
4.13 ผลผลิตที่ได้จากการย่อยไซแลนจากโอ๊ตด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส...............................57
4.14 ผลผลิตที่ได้จากการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส......................................57
4.15 แสดงกราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/[V] และ 1/[S]..59
รูปภาคผนวก 72

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

องค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์พืชจะประกอบด้วย เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนิน โดยเฮมิเซลลูโลสจะประกอบด้วยไซแลน (xylan) เป็นส่วนใหญ่ ไซแลนมักพบเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช (Georis และคณะ, 2000) ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยในไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งจะพบไซแลนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 25 และร้อยละ 10 ตามลำดับ (Wong และคณะ, 1988) ไซแลนเป็นสารประกอบพวกเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharides) ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไซโลไพราโนซิล (β-1,4-xylopyranosyl) เป็นโครงสร้างหลัก (backbone) และมีแขนง (branch chain) เป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดอื่นมาเชื่อมต่อกับโครงสร้างหลัก เช่น อะซิทิล (acetyl) อะราบิโนซิล (arabinosyl) และกรดเมทิลกลูคูโรนิก (methylglucuronic acid) (Whistler และ Richards, 1970) เอนไซม์ไซแลนเนสที่สามารถย่อยโครงสร้างหลักของไซแลนประกอบด้วย เอนไซม์เอนโดเบต้า-1,4-ไซแลนเนส (endo-β-1,4- xylanase, EC. 3.2.1.8) และเอนไซม์ β-ไซโลซิเดส (β-xylosidase, EC. 3.2.1.37) (Soha, 2000) เอนไซม์ไซแลนเนสมีประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มโดยเอนไซม์ไซแลนเนสจะช่วยในการทำลายพันธะในพอลิแซ็กคาไรด์ช่วยให้การทำขนมและอาหารรวดเร็วขึ้นและทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้นด้วย (Godfrey และ West, 1996) นอกจากนี้ยังใช้เอนไซม์ไซแลนเนสย่อยเศษวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรก่อนที่จะนำไปเป็นอาหารสัตว์ หรือเติมเอนไซม์ไซแลนเนสลงไปในอาหารธัญพืชที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารของสัตว์ (Gilbert และ Hazlewood, 1993) และใช้ในการฟอกขาวทางชีวภาพ (biobleaching) ในอุตสาหกรรมทำกระดาษ ซึ่งอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษในขั้นตอนการฟอกขาวจะใช้คลอไรด์ที่มีความเป็นด่างสูงในการฟอก ภายหลังการผลิตก็จะเกิดสารประกอบของคลอไรด์ซึ่งเป็นสารพิษเกิดขึ้น เพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้คลอไรด์ในขั้นตอนการฟอกขาวจึงมีการนำเอาเอนไซม์ไซแลนเนสซึ่งสามารถเกิดกิจกรรมได้ในสภาวะที่เป็นด่างมาใช้ร่วมกับสารเคมีในกระบวนการนี้ (Viikari และคณะ, 1986) แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่สามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้แก่ *Bacillus* sp. (Rius และ Loren, 1998) และ *Streptomyces* sp. (Beg และคณะ, 2000) ในงานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียชอบด่างจากดินตามธรรมชาติในประเทศไทย โดยใช้ฟางข้าวซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรซึ่งมีไซแลนเป็นองค์ประกอบจึงเหมาะแก่การใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสที่สามารถคงตัวในสภาวะพีเอชสูงๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ดังที่กล่าวมาข้างต้นต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดแยกแบคทีเรียชอบด่างที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

1.2.3 เพื่อศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซแลนเนส

1.2.4 เพื่อศึกษาผลผลิตที่ได้จากการย่อยสับสเทรตด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.1.1 คัดแยกแบคทีเรียชอบด่างจากดินที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสโดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

1.1.2 จำแนกลักษณะของแบคทีเรียโดยศึกษาทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และวิเคราะห์ทางดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

1.1.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

1.1.4 ศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซแลนเนส

1.1.5 ศึกษาผลผลิตที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ไซแลนเนสกับสับเทรต

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

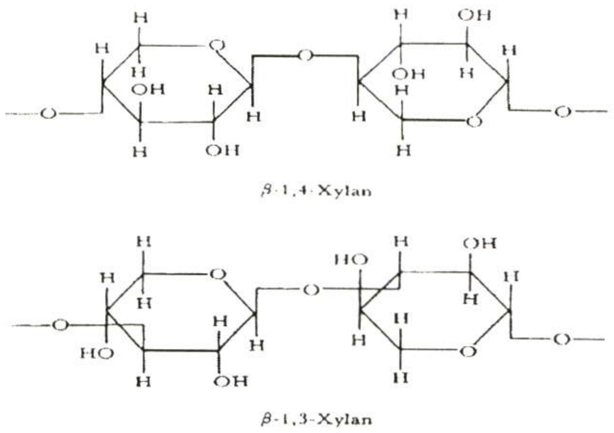
สามารถคัดเลือกแบคทีเรียชอบด่างที่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากดิน และสามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส คุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซแลนเนส และผลผลิตที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ไซแลนเนส เพื่อเป็นแนวทางในการนำแบคทีเรียหรือเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ และเป็นแนวทางในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ต่อไป

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไซแลน (xylan)

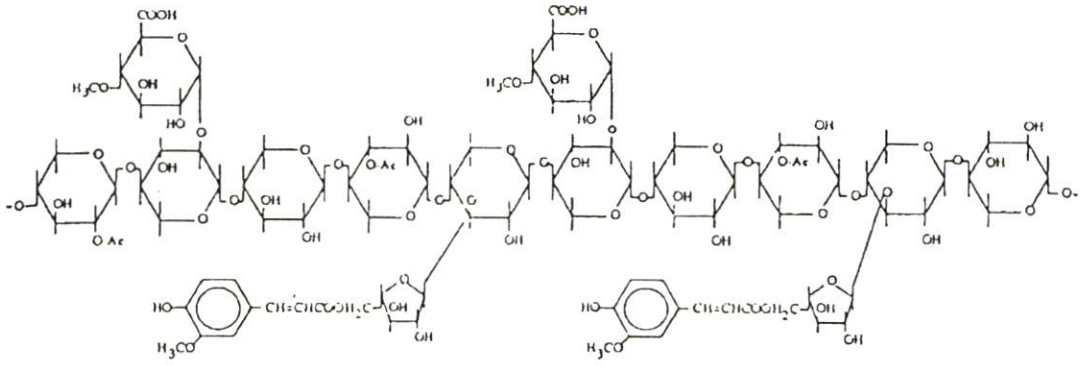
องค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์พืชตามธรรมชาติประกอบด้วยไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส โครงสร้างหลักของไซแลนประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลดีไซโลส (D-xylose) มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-D-ไซโลไพราโนซิล (β-1,4–D-xylopyranosyl) การเชื่อมต่อกันนี้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งที่มาของไซแลน (Filho, 1998) นอกจากนี้ยังมีไซแลนอีกชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลดีไซโลสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,3-D-ไซโลไพราโนซิล (β-1,3–D-xylopyranosyl) ซึ่งมักพบเป็นองค์ประกอบของสาหร่ายน้ำจืดและสาหร่ายทะเล (Horikoshi, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

พืชแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบบริเวณแขนงที่แตกต่างกันมายึดจับกับโครงสร้างหลักเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดอื่น ในโครงสร้างหลักของเฮมิเซลลูโลสในพืชตระกูลหญ้าจะมี L-arabinose β-coumaroyl และ ferruloyl มายึดจับกับโครงสร้างหลักของไซแลน ส่วนไม้เนื้อแข็งจะมี 4-*O*-methylglucuronopyranosyl มายึดจับกับโครงสร้างหลักของไซแลนที่ตำแหน่ง α-1,2 และไม้เนื้ออ่อนจะมี α -arabinofuranose และ α-4-*O*-methylglucuronic มายึดจับกับโครงสร้างหลักของไซแลน (Hurlbert และ Preston, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ถึง 2.4 ระดับการเกิดพอลิเมอไรซ์ (degree of polymerization) ในไม้เนื้ออ่อนอยู่ในช่วง 70-130 และในไม้เนื้อแข็งอยู่ในช่วง 150-200 (Filho, 1994)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไซแลนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 และพันธะ β-1,3

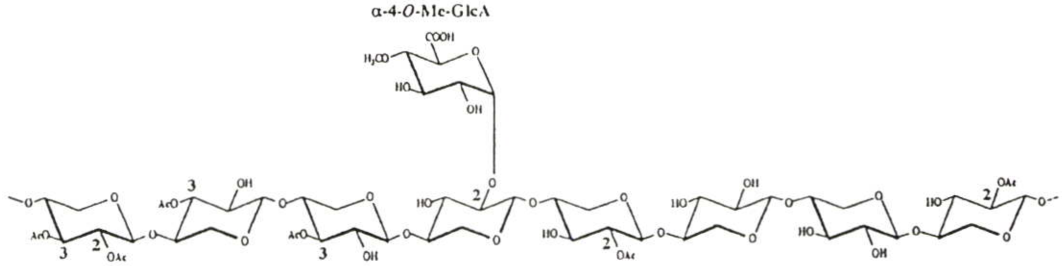
ที่มา: Horikoshi และAkiba (1982)



รูปที่ 2.2 แสดงองค์ประกอบของไซแลนในพืชตระกูลหญ้าหรือฟางข้าว ที่มีลักษณะเป็นอนุพันธุ์ของ arabino-4-*O*-methylglucuronoxylan

Ac = acetyl group

ที่มา: Coughlan และ Hazlewood (1993)

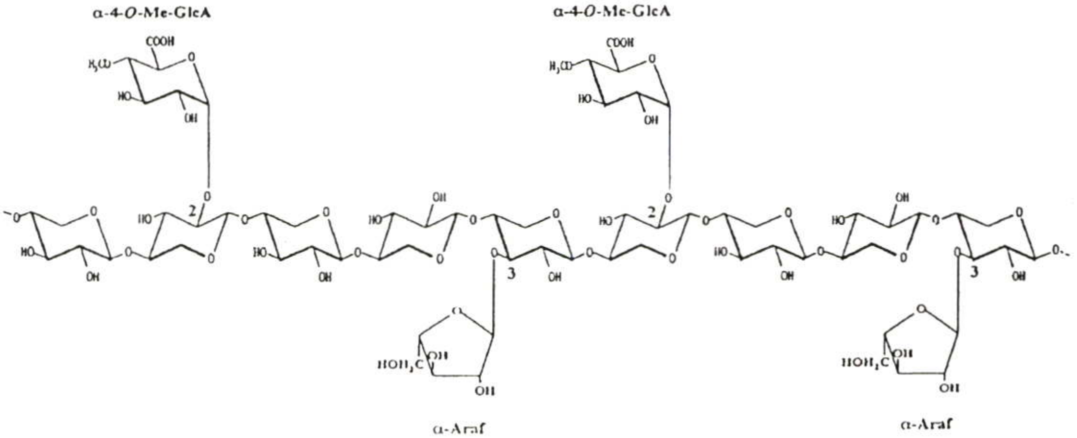


รูปที่ 2.3 แสดงองค์ประกอบของไซแลนในไม้เนื้อแข็งที่มีลักษณะเป็น

O-acetyl-4-*O*-methylglucuronoxylan

Ac = acetyl group, α-4-*O*-Me-GlcA = α-4-*O*-methylglucuronic acid

ที่มา: Sunna และ Antranikian (1997)



รูปที่ 2.4 แสดงองค์ประกอบของไซแลนในไม้เนื้ออ่อนที่มีลักษณะเป็น arabino-4-*O*-methylglucuronoxylan

α-Araf = α -arabinofuranose, α-4-*O*-Me-GlcA = α-4-*O*-methylglucuronic acid

ที่มา: Sunna และ Antranikian (1997)

2.2 เอนไซม์ไซแลนเนส (xylanase)

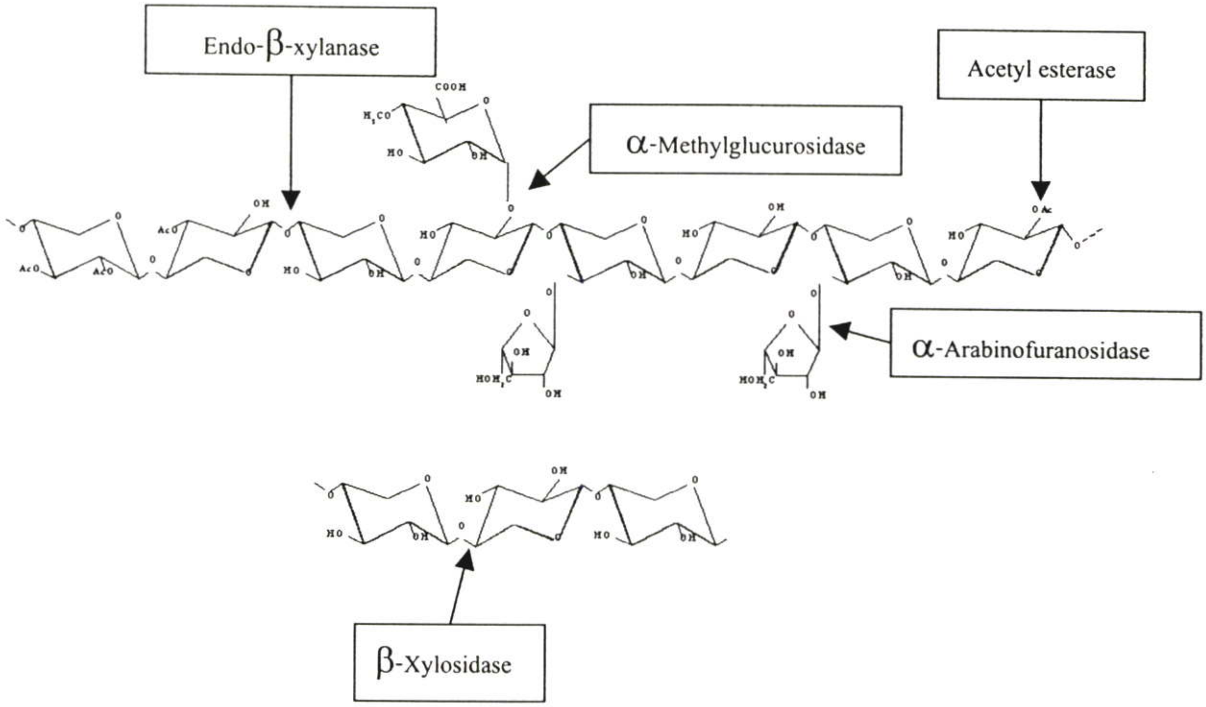
2.2.1 ชนิดของเอนไซม์ไซแลนเนส

เอนไซม์ที่สามารถย่อยโครงสร้างหลักของไซแลนประกอบด้วย เอนไซม์เอนโด-β-1,4-ไซแลนเนส (endo-β-1,4- xylanase, EC. 3.2.1.8) และเอนไซม์ β-ไซโลซิเดส (β-xylosidase, EC. 3.2.1.37) (Soha, 2000) เอนไซม์เอนโด-β-1,4-ไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยตรงตำแหน่ง β-1,4 ภายในโครงสร้างหลักของไซแลน สามารถจำแนกเอนไซม์ชนิดนี้ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ family 10 และ family 11 โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน (Henrissat และ Bairoch, 1993) เอนไซม์เอนโด-β-1,4-ไซแลนเนสทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันทั้ง มวลโมเลกุล ชนิดของสับสเทรตที่ย่อย และผลผลิตที่ได้จากการย่อย (Biely และคณะ, 1997) เอนไซม์ทั้งสองกลุ่มมีโครงสร้างแบบขดทบเป็นก้อน (tertiary structure) โดย family 10 มีมวลโมเลกุลประมาณ 48 กิโล-ดาลตัล การขดทบเกิดที่ตำแหน่ง α กับ β (Derewenda และคณะ, 1994) ส่วน family 11 จะมีขนาดเล็กกว่า โดยมีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 19-31 กิโลดาลตัล การขดทบเกิดที่ตำแหน่ง β (Vroenmen และคณะ, 1995)

เอนไซม์ที่สามารถย่อยส่วนที่เป็นแขนงออกจากโครงสร้างหลักของไซแลนได้แก่ เอนไซม์ α- อะราบิโนฟูแรนโนซิเดส (α-arabinofuranosidases, EC. 3.2.1.55) เอนไซม์อะซิทิลเอสเทอเรส (acetylesterases, EC. 3.1.1.6) เอนไซม์ α-เมทิลกลูคูโรโนซิเดส (α-methylglucuronosidases) และเอนไซม์เฟอรูลอยล์เอสเทอเรส (feruloyl esterase) เอนไซม์ดังกล่าวจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับแขนงเพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นแขนงออกจากโครงสร้างหลัก (Jeffries, 1990) จากนั้นเอนไซม์เอนโด-β-1,4-ไซแลนเนสก็จะย่อยภายในโครงสร้างหลักของไซแลนที่เป็นพอลิเมอร์ไปเป็นสารประกอบพวกไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharides) ที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับระดับของการเกิดพอลิเมอร์ของไซแลนแต่ละชนิดและเอนไซม์ β-ไซโลซิเดสก็จะย่อยส่วนที่เป็น nonreducing ออกจาก D-xylose ดังแสดงในรูปที่ 2.5 (Bachmann และ McCarthy, 1989) (Poutanen และ Puls, 1988)

ก.

ข.



Ac คือ Acetyl group

รูปที่ 2.5 แสดงการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส

ก. เอนไซม์ α-arabinofuranosidases, acetylesterases และ α-methylglucuronosidases จะย่อยส่วนที่เป็นแขนงออกจากโครงสร้างหลัก แล้วเอนไซม์ endo- β-xylanase จะย่อยโครงสร้างหลักของไซแลนให้เป็น xylooligosaccharide

ข. การย่อยสลาย xylooligosaccharide ด้วยเอนไซม์ β-xylosidase

ที่มา: Sunna และ Antranikian (1997)

2.2.2 ความจำเพาะเจาะจงกับสับสเทรต (substrate specific) และผลผลิตที่ได้จากการย่อยสับสเทรตด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส

เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเทรตแล้วได้ผลผลิต โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับสับสเทรต และให้ผลผลิตที่แตกต่างกันไป

Kubata และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลผลิตที่ได้จากการย่อยสับสเทรตด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส IV (xylanase IV) ซึ่งได้จากการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จาก *Aeromonas caviae* สายพันธุ์ ME-1 สามารถย่อยไซแลนจากโอ๊ต (oat spelt) ได้ผลผลิตเพียงอย่างเดียวคือ ไซโลเตตระโอส (xylotetraose)

Shoa และคณะ (1995) ได้ศึกษาความจำเพาะเจาะจงกับสับสเทรตของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ได้จากการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ JW/SL-YS485 พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสที่มีกิจกรรมจำเพาะ 3 48 57 70 และ 91 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัม เมื่อใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ไซแลนจากต้นบีช (beech wood) ไซแลนจากต้นเบิร์ช(birch wood) ไซแลนจากต้นลาร์ช (larch wood) และไซแลนจากโอ๊ต ตามลำดับ สำหรับผลผลิตที่ได้จากการย่อยไซแลนจากโอ๊ตคือ ไซโลไตรโอส (xylotriose)

Kang และคณะ (1996) ได้ศึกษาผลผลิตที่ได้จากการย่อยสับสเทรตด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสซึ่งทำให้บริสุทธิ์แล้วจากเชื้อรา *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 สามารถย่อยไซแลนจากต้นเบิร์ชให้ผลผลิตหลักคือ ไซโลไบโอส (xylobiose) และผลผลิตรองลงมาคือ ไซโลไตรโอส และไซโลเฮกโซส (xylohexose)

Lin และคณะ (1999) ได้ศึกษากลไกการย่อยไซแลนและน้ำตาล xylooligosaccharide ด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสซึ่งทำให้บริสุทธิ์แล้วจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus*. สายพันธุ์ SSBP โดยใช้ไซแลนจากต้นเบิร์ช ไซโลไตรโอส และ ไซโลเตตราโอส เป็นสับสเทรต ได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นไซโลไบโอส กลไกการย่อยเกิดขึ้นดังนี้ เมื่อเอนไซม์ย่อยไซแลนได้ผลผลิตเป็นไซโลไตรโอส จากนั้นไซโลไตรโอส 2 โมเลกุลจะมาเชื่อมต่อกันเกิดเป็นไซโลเฮกโซสด้วยเอนไซม์ทรานไกลโคซิเดส (transglycosidase) จากนั้นไซโลเฮกโซสจะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วด้วยเอนไซม์เอนโดไซแลนเนส (endo-xylanase) เกิดเป็นไซโลไบโอส 3 โมเลกุล หรือเกิดเป็นไซโลเตตระโอส และไซโลส จากนั้นไซโลเตตราโอสจะถูกย่อยสลายไปเป็นไซโลสในที่สุด

Bataillon และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลผลิตที่ได้จากการย่อยสับสเทรตด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SPS-0 พบว่าเมื่อใช้ไซแลนจากต้นเบิร์ชเป็นสับสเทรตจะได้ผลผลิตคือ ไซโลส ไซโลไบโอส ไซโลไตรโอส และไซโลเตตราโอส

Gioris และคณะ (2000) ได้ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของสับสเทรตของเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ S38 สามารถแยกเอนไซม์ไซแลนเนสให้บริสุทธิ์ได้ 3 ชนิดคือ Xyl1 Xyl2 และ Xyl3 ศึกษาเปรียบเทียบการย่อยสับสเทรต 2 ชนิด ได้แก่ ไซแลนจากโอ๊ต และ

ไซแลนจากต้นเบิร์ช พบว่า Xyl1 ย่อยไซแลนจากต้นเบิร์ชได้ดีกว่า Xyl2 และ Xyl3 ในขณะที่ Xyl2 และ Xyl3 ย่อยไซแลนจากโอ๊ตได้ดีกว่า Xyl1

Tseng และคณะ (2002) ได้ศึกษาผลผลิตที่ได้จากการย่อยสับสเทรตด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสซึ่งทำให้บริสุทธิ์แล้วจากเชื้อ *Bacillus firmus* สามารถย่อยไซแลนจากต้นเบิร์ชได้ผลผลิตคือ ไซโลส ไซโลไตรโอส และไซโลเฮกโซส

2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

2.3.1 จุลินทรีย์โดยทั่วไปที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้แก่ แบคทีเรีย และรา ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

ชนิดของจุลินทรีย์	อ้างอิง
แบคทีเรีย	
Bacillus polymyxa	Morales และคณะ, 1993
Aeromonas caviae	Kubata และคณะ, 1995
Thermoanaerobacterium sp.	Shao และคณะ, 1995
Thermotoga maritima	Winterhalter และ Liebl, 1995
Cellulomonas fimi	Stalbrand และคณะ, 1998
Cellulomonos pachnodae	Cazemier และคณะ, 1999
Bacillus circulans	Qureshy และคณะ, 2000
Streptomyces lividans	Ducros และคณะ, 2000
Streptomyces sp.	Beg และคณะ, 2000
Clostridium cellulovorans	Kosugi และคณะ, 2001
Erwinia chrysanthemi	Hurlbert และ Preston, 2001
Bacillus fermus	Tseng และคณะ, 2002
Bacillus subtilis	Sa-Pereira และคณะ, 2002

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	อ้างอิง
รา	
Chaetomium thermophile	Ganji และคณะ, 1989
Cephalosporium sp.	Kang และคณะ,1996
Acrophialophora nainiana	Salles และคณะ, 2000
Thermomyces lanuginosus	Singh และคณะ, 2000
Penicillium sp.	Godfrey และคณะ, 1996
Aureobasidium pullulans	Li และคณะ, 2000
Talaromyces sp.	Godfrey และคณะ, 1996
Aspergillus niger	Zhao และคณะ, 2002

2.3.2 จุลินทรีย์ชอบด่างที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

จุลินทรีย์ชอบด่างที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้แก่ แบคทีเรีย และรา ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ชอบด่างที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

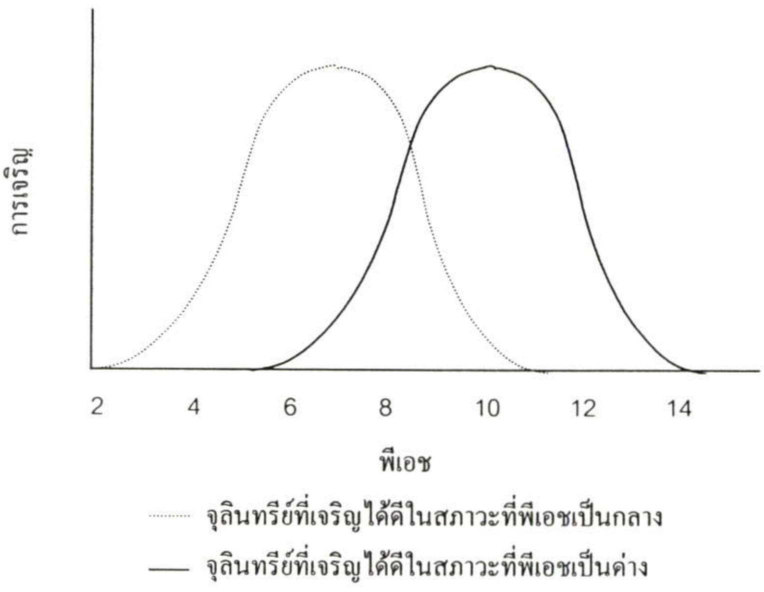
ชนิดของจุลินทรีย์	อ้างอิง
แบคทีเรีย	
Bacillus polymyxa	Morales และคณะ, 1993
Bacillus alcalophilus	Rius และ Loren, 1998
Bacillus circulan	Dhillon and Khanna, 2000
Streptomyces sp.	Beg และคณะ, 2000
Bacillus firmus	Tseng และคณะ, 2002
รา	
Aspergillus fischeri	Chandra และ Chandra, 1995
Cephalosporium sp.	Chandra และ Chandra, 1995
Fusarium oxysporum	Kang และคณะ, 1996

2.4 จุลินทรีย์ชอบด่าง (alkalophilic microorganism)

2.4.1 จุลินทรีย์ชอบด่าง

จุลินทรีย์ที่ชอบด่าง (alkalophilic microorganism) หมายถึง จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่เป็นด่างหรือมีค่าพีเอชมากกว่า 9.0 แต่ไม่สามารถเจริญหรือเจริญได้ช้าในสภาวะแวดล้อมที่มีค่าพีเอชเป็นกลาง ดังแสดงในรูปที่ 2.6 (Krall, 1990)

จุลินทรีย์ที่ชอบด่างมักพบกระจายอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ ซึ่งเราสามารถพบได้จากดินซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีทั้ง แบคทีเรีย รา ยีสต์ และฟาจ (phages) แบคทีเรียชอบด่างพบในดินตามธรรมชาติมีจำนวนร้อยละ 1 ถึงร้อยละ10 ของจำนวนแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีค่าพีเอชเป็นกลาง (neutrophilic bacteria) (Horikoshi, 1999)



รูปที่ 2.6 แสดงการเจริญของจุลินทรีย์ที่พีเอชต่างๆ
ที่มา : Horikoshi (1999)

2.4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (physiology) ของแบคทีเรียที่ชอบด่าง

แบคทีเรียที่ชอบด่างสามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีค่าพีเอชประมาณ 10 ซึ่งต่างจากพวกแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกลาง ซึ่งภายในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียที่ชอบด่างจะมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 8.0-8.5 ในขณะที่แบคทีเรียที่เจริญในสภาวะแวดล้อมที่มีค่าพีเอชเป็นกลางมีค่า พีเอชภายในเซลล์ประมาณ 7.5 (Horikoshi และ Akiba ,1982) ขึ้นอยู่กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ได้แก่

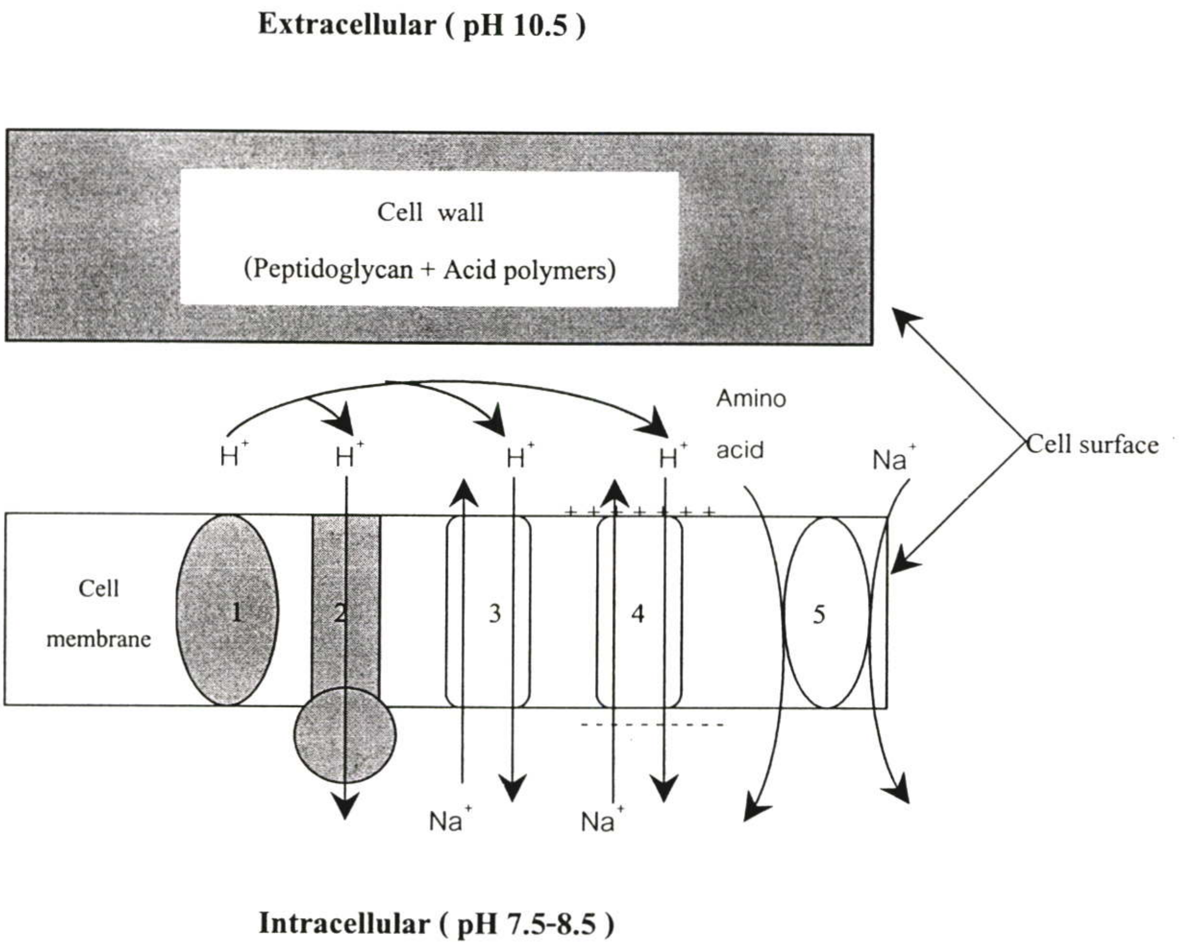
2.4.2.1 ผนังเซลล์ (cell wall)

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป็นส่วนที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง แบคทีเรียทั่วไปเช่น *Bacillus subtilis* ผนังเซลล์จะประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ส่วนผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ชอบด่าง เช่น *Bacillus alcalophilus* จะประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกรดอะมิโน เช่น กรดกาแลคทูโรนิก (galacturonic acid) กรดกลูโคนิก (gluconic acid) กรดกลูตามิก (glutamic acid) กรดแอสพาร์ติก (aspartic acid) และกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) ซึ่งประจุลบในกรดอะมิโนดังกล่าวช่วยให้ Na^+ และ H^+ ถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ และขณะเดียวกันก็จะผลัก OH^- ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่เป็นด่าง (Aono และ Horikoshi, 1983)

2.4.2.2 ระบบการนำ Na^+/H^+ เข้า-ออกจากเซลล์ (Na^+/H^+ antiport system)

แบคทีเรียชอบด่างสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มี Na^+ แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารที่เป็นด่างที่ปราศจาก Na^+ โดยบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเหล่านี้จะมีการนำโปรตอนเข้าสู่เซลล์ (proton motive force) เมื่อมี Na^+ (Mandel และคณะ, 1980) รายงานการวิจัยของ Kitada และคณะ (1982) พบว่าเมื่อทำการเลี้ยง *Bacillus firmus* RAB ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบด่างในอาหารเลี้ยงที่ปราศจาก Na^+ ที่พีเอชเท่ากับ 10.5 พบว่าพีเอชภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 9.5-10.5 จากนั้นเซลล์ก็จะตายในสุด

Kitada และ Horikoshi (1992) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของความต่างศักย์ ($\Delta\psi$) ต่อการเกิดการนำ Na^+/H^+ เข้า-ออกจากเซลล์ ใน *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N-6 พบว่าระบบดังกล่าวเกิดขึ้นจากความต่างศักย์ที่บริเวณภายในและภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเยื่อหุ้มเซลล์ด้านในมีค่าประจุเป็นลบทำให้ Na^+ ที่อยู่ภายนอกเซลล์เข้าสู่เซลล์ โดยอัตราการเข้าสู่เซลล์ของ Na^+ (V) จะเพิ่มขึ้นแบบเชิงเส้น ค่าความชันของอัตราการเข้าสู่เซลล์ของ Na^+ ต่อค่าความต่างศักย์ ($V/\Delta\psi$) ที่พีเอช 9 มีค่ามากกว่าที่พีเอช 8 แสดงให้เห็นว่าค่าความต่างศักย์มีผลต่ออัตราการเข้าสู่เซลล์สูงสุดของ Na^+ (V_{max}) ขณะเดียวกัน H^+ จากกระบวนการหายใจก็จะเข้าสู่เซลล์ด้วย โดยอาศัยความต่างศักย์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เช่นกัน การเพิ่มขึ้นของ H^+ ภายในเซลล์นี้จะไปยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของ Na^+ จะได้ค่า K_m ของอัตราการนำ Na^+ เข้าสู่เซลล์ จากนั้น Na^+ ก็จะถูกนำออกจากเซลล์โดยอาศัยความต่างศักย์ เรียกกลไกการแลกเปลี่ยน Na^+ ออกจากเซลล์และการนำ H^+ เข้าสู่เซลล์ว่า Na^+/H^+ antiporter ซึ่งทำให้ค่าพีเอชภายในเซลล์มีค่าเป็นกลางและทำให้เซลล์อยู่รอดในสิ่งแวดล้อมที่มีค่าพีเอชสูงๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ในขณะที่ Na^+ เข้าสู่เซลล์ก็จะนำกรดอะมิโนเข้ามาภายในเซลล์ทำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ และผลิตสารออกนอกเซลล์ขณะเจริญซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นพวกกรดอะมิโน ทำให้ค่าพีเอชของสิ่งแวดล้อมมีค่าลดลง



1: Respiratory chain

2: FoF1-ATPase

3: Δ pH dependent Na^+/H^+ antiporter

4: $\Delta\psi$ dependent Na^+/H^+ antiporter

5: Amino acids/ Na^+ symporter

รูปที่ 2.7 แสดงกลไกการนำ Na^+/H^+ เข้า-ออกจากเซลล์

ที่มา: Horikoshi (1999)

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียชอบด่างดังที่กล่าวมาข้างต้น ได้แก่ ผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน และกลไกการนำ Na^+/H^+ เข้า-ออกจากเซลล์ ทำให้ค่าพีเอชภายในเซลล์มีค่าอยู่ระหว่าง 7.0-8.5 ดังแสดงในตารางที่ 2.3 และเอนไซม์ที่ผลิตภายในเซลล์แบคทีเรียชอบด่าง (intracellular enzyme) จะมีรูปแบบในการเกิดกิจกรรมคล้ายกับเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่สามารถเจริญในสภาวะพีเอชเป็นกลาง (Horikoshi, 1999)

ตารางที่ 2.3 แสดงความแตกต่างของพีเอชภายในและภายนอกเซลล์ในแบคทีเรียชนิดต่างๆ

ชนิดของแบคทีเรีย	พีเอชภายในเซลล์ (internal pH)	พีเอชภายนอกเซลล์ (external pH)
แบคทีเรียชอบด่าง		
Bacillus alcalophilus	9.0	9.0
	9.3	10.0
	9.1	11.0
Bacillus firmus RAB	7.7	7.0
	8.0	9.0
	9.4	10.5
Bacillus sp. YN-2000	8.2	7.5
	7.9	8.5
	8.1	9.5
	8.4	10.2
แบคทีเรียที่เจริญในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกลาง		
Staphtococcus faecalis	7.2	6.0
	7.7	7.0
	8.0-8.2	7.5
Escherichia coli MRE 600	7.55	6.0-8.0
Bacillus megaterium	8.03	7.4
Escherichia coli ML 308-225	7.8	6.3
	7.9	6.8
	8.4	7.8
	8.8	8.7
Escherichia coli K12	8.0	6.0
	7.7	7.0
	7.7	8.0
	8.5	9.0

ที่มา : Horikoshi (1999)

2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากจุลินทรีย์

2.5.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการเจริญ การสังเคราะห์เซลล์ และเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ แหล่งคาร์บอนมีความจำเป็นในการชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ในจุลินทรีย์ นอกจากแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการชักนำแล้วปริมาณของแหล่งคาร์บอนก็เป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์

Yang และ คณะ (1995) ได้ทำการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ V1-4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบด่าง โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนต่างๆ พบว่าอาหารที่มีไซแลนจากต้นเบิร์ชร้อยละ 1 สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้กิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 24.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือรำข้าวร้อยละ 3 ของอาหารสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้กิจกรรมเท่ากับ 22.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเลี้ยง เมื่อทำการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสในน้ำตาลทั้งสามชนิดได้แก่ กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส (arabinose) พบว่าน้ำตาลไซโลสเพียงอย่างเดียวเท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสโดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 8.9 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันที่ 2 ของการเลี้ยงได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Gessesse และ Mamo (1999) ได้ทำการศึกษาอัตราส่วนของรำข้าวต่อปริมาณอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AR-009 ที่ชอบด่าง พบว่าสัดส่วนรำข้าวต่อปริมาณอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสคือ 1 ต่อ 1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสเท่ากับ 720 หน่วยต่อน้ำหนักแห้งของแบคทีเรีย(กรัม) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเติมไซโลสร้อยละ 10 ในอาหารรำข้าวมีผลต่อการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส เมื่อเติมกลูโคสร้อยละ 5 ของอาหารเลี้ยงมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 80 ของกิจกรรมในอาหารเลี้ยงที่ไม่มีการเติมกลูโคส และเมื่อเติมกลูโคสมากกว่าร้อยละ 15 ของอาหารเลี้ยงจะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

Beg และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนของที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ QG-11-3 พบว่าเมื่อใช้รำข้าวและเยื่อยูคาลิปตัส ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 และ 1 ต่อ 2.5 (แหล่งคาร์บอนต่ออาหารเหลว) มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 2,360 และ 1,200 หน่วยต่อน้ำหนักสับสเทรต (กรัม) ตามลำดับ

Georis และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ S38 เมื่อเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน (ร้อยละ 1) ได้แก่ ไซแลนจากโอ๊ต ไซโลส และเยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ฟอก มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส 31 12 และ 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าไม่มีการ

ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเมื่อใช้ แป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส กลูโคส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงที่ใช้ไซแลนจากโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีผลไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส ไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเลี้ยงที่ใช้ไซแลนหรือคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

Kosugi และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Clostridium cellulovorans* โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนต่างๆ ดังนี้ กลูโคส เซลโลบิโอส เซลลูโลส อะไวเซล (avicel) ไซแลนจากโอ๊ต และไซแลนจากต้นเบิร์ช พบว่าไซแลนจากต้นเบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสโดยให้กิจกรรมจำเพาะ (specific activity) สูงสุดเท่ากับ 0.81 หน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ในวันที่ 4 ของการเลี้ยง

Sa-Pereira และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus subtilis* พบว่าอาหารเลี้ยงที่เติมไซแลนจากโอ๊ตร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 12 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่ากลูโคส ไซโลส และ เมลิบิโอส (melibiose) จะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

2.5.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญ และการสร้างองค์ประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์สามารถเจริญและให้ผลผลิตสูงในอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์แตกต่างกันไป ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์

Yang และ คณะ (1995) ได้ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ V1-4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบด่าง โดยเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยไซแลนจากต้นเบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอน 20 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.2 กรัมต่อลิตร และทำการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน เคซีน กากถั่วเหลือง และน้ำแช่ข้าวโพด พบว่าเมื่อใช้น้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 1 ในอาหารเหลวจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 49 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Gessesse และ Mamo (1999) ได้ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AR-009 ที่ชอบด่าง โดยเลี้ยงในอาหารที่ใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและทำการเปรียบเทียบการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ (ร้อยละ 5) ได้แก่ เปปโตน

สารสกัดจากยีสต์ และทริปโตน พบว่าสารสกัดจากยีสต์มีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ร้อยละ 20 เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

Pereira และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus subtilis* โดยเลี้ยงในอาหารที่ใช้ไซแลนจากโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน และทำการเปรียบเทียบการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ (ร้อยละ 0.2) ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย สารสกัดจากยีสต์ และอาหารเลี้ยงที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนพบว่า อาหารเลี้ยงที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด และมีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณต่ำเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตหรือสารสกัดจากยีสต์ ในขณะที่ยูเรียจะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

2.5.3 พีเอชเริ่มต้น

พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของสิ่งแวดล้อมมีความสำคัญต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ชอบด่างสามารถเจริญได้ดีในสภาวะพีเอชสูงๆ ดังนั้นพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเจริญจึงขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันไป

Yang และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ V1-4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบด่าง ทำการเลี้ยงโดยใช้เยื่อไม้เนื้อแข็งเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เซลล์สามารถเจริญได้ดีที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 11.5 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 49 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ประกอบด้วยไซแลนจากต้นเบิร์ชร้อยละ 2 พบว่าที่เอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 และ 10 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 30 และ 25 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

Kang และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาเชื้อรา *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 ซึ่งเป็นเชื้อราที่ชอบด่าง พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสคือ 9.5 ถึง 10.0 เมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 7.8 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Rius และ Loren (1998) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการนำโปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะพีเอชที่เป็นกลาง (neutrophile) ส่วน *Bacillus alcalophilus* เป็นแบคทีเรียที่ชอบด่าง (alkalophile) พบว่า *Bacillus alcalophilus* สามารถเจริญและสามารถนำโปรตอนเข้าสู่เซลล์ได้ดีในอาหารเลี้ยงที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 10.5 ส่วนในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 8.5 ความสามารถในการนำโปรตอนเข้าสู่เซลล์ต่ำกว่า *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis*

Gessesse และ Momo (1999) ได้ทำการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยศึกษาความเข้มข้นของ Na_2CO_3 ที่ใช้เป็นบัฟเฟอร์ในการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยง

49303

พบว่า Na_2CO_3 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 5.0 และ 10.0 พบว่า Na_2CO_3 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุด

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

2.6.1 พีเอช

เอนไซม์แต่ละชนิดจะทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชที่เหมาะสม ซึ่งจะแตกต่างไปตามสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ถ้าพีเอชเปลี่ยนแปลงไปจากค่าที่เหมาะสมจะทำให้กิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์ลดลง

Nakamura และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซแลนเนสซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp.สายพันธุ์ 41M-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบด่าง พบว่าเอนไซม์ Xylanase I ซึ่งได้จากการแยกบริสุทธิ์ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 9.0 ที่ 50 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวที่พีเอชเท่ากับ 9.0 ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

Yang และคณะ (1995) ได้ศึกษาการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ V1-4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบด่างพบว่าเมื่อใช้ไกลซีน (glycine) เป็นบัฟเฟอร์ เอนไซม์ไซ-แลนเนสมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 8.5 และเมื่อใช้ฟอสเฟตเป็นบัฟเฟอร์พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสมีกิจกรรมสูงสุดในช่วงพีเอช 6.0 ถึง 7.0

Blanco และคณะ (1995)ได้ศึกษาผลของพีเอชต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลน-เนส จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BP-23 ซึ่งเป็นแบคทีเรียทนด่าง (alkali-tolerant) พบว่าที่พีเอช 9.5 และ 10.0 เอนไซม์มีกิจกรรมร้อยละ 72 และ 35 ตามลำดับ และเอนไซม์มีความคงตัวที่พีเอช 11.0 เมื่อทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 11 วัน

Kang และคณะ (1996) ได้ศึกษาผลของพีเอชต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อรา *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 ซึ่งเชื้อราที่ชอบด่าง พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 7.5-8.0 และมีความคงตัวที่พีเอชในช่วง 5.5-12.0

Gessesse (1998) ได้ทำการแยกเอนไซม์ไซแลนเนสให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AR-009 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบด่างได้เอนไซม์ไซแลนเนส 2 ชนิดคือ XylA (23 kDa) และ XylB (48 kDa) โดย XylA มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดที่พีเอช 9.0 และ XylB มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดที่พีเอช 9.0-10.0 และเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีกิจกรรมอยู่ในช่วงพีเอช 5.0-11.0

Tseng และคณะ (2002) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซแลนเนส จาก *Bacillus firmus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบด่าง โดยการแยกเอนไซม์ไซแลนเนสให้บริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ที่มีขนาด 45 kDa และ 23 kDa เมื่อทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ไซแลนจากต้นเบิร์ชเป็น

สับสเทรต พบว่าพีเอช 6.0-8.0 เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมสำหรับเอนไซม์ขนาด 45 kDa และพีเอช 6.0-7.0 เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมสำหรับเอนไซม์ขนาด 23 kDa โดยที่เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีกิจกรรมอยู่ในช่วง 5.0-11.0

2.6.2 อุณหภูมิ

เอนไซม์แต่ละชนิดเกิดปฏิกิริยาสูงสุดที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปการทำงานของเอนไซม์จะช้าหรือหยุดชะงัก ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปเอนไซม์จะถูกทำลาย

Blanco และคณะ (1995) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp.สายพันธุ์ BP-23 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มที่พีเอช 7.0 นาน 40 นาที

Kang และคณะ (1996) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อรา *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มที่พีเอช 8.0 นาน 2 ชั่วโมง

Gessesse (1998) ศึกษาการแยกเอนไซม์ไซแลนเนสให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. พบเอนไซม์ไซแลนเนส 2 ชนิด คือ Xyl A และ Xyl B โดย Xyl A มีกิจกรรมสูงสุดที่ 70 องศาเซลเซียส ส่วน Xyl B มีกิจกรรมสูงสุดที่ 70 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิพบว่า Xyl A มีความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อทำการบ่มนาน 3 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 95 ของกิจกรรมเริ่มต้น และเมื่อทำการบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 78 ของกิจกรรมเริ่มต้น ส่วน Xyl B มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 3 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 51 ของกิจกรรมเริ่มต้นตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 1 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 54 ของกิจกรรมที่เหลือ

Ratanakhanokchai และคณะ (1999) ศึกษาเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-1 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 7.0 มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มที่พีเอช 7.0 นาน 30 นาที และเมื่อทำการบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 90 ของกิจกรรมเริ่มต้น

2.6.3 ไอออนของโลหะและสารประกอบบางชนิด

ไอออนของโลหะและสารประกอบบางชนิดมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์บางชนิดอาจไปส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปของโคแฟคเตอร์(cofactor) ซึ่งช่วยให้เอนไซม์สามารถจับกับสับสเทรตได้ดีขึ้น หรือช่วยให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่เหมาะสมแก่การเร่งปฏิกิริยา แต่ไอออนของโลหะบางชนิดจะมีผลไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ โดยทำให้เอนไซม์จับกับสับสเทรตได้น้อยลงหรือ

ได้ช้าลง หรืออาจไปมีผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-สับสเทรต (enzyme-substrate complex)ไปเป็นผลผลิต ซึ่งความสามารถในการส่งเสริมหรือยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ด้วย (Chaplin and Bucke, 1992)

Blanco และคณะ (1995) ศึกษาผลของไอออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BP-23 พบว่า Fe^{3+} Ag^{+} Zn^{2+} และ Hg^{2+} ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์จะไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ในขณะที่ Mg^{2+} มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ ส่วนสารประกอบ *N*- bromosuccinimide ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ในขณะที่ *N*- Acetylimidazole ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์

Gessesse (1998) ศึกษาผลของไอออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AR-009 พบว่า Hg^{2+} Fe^{2+} Fe^{3+} และ Pb^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์จะไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์

Lin และคณะ (1999) ศึกษาผลของไอออนและสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Thermomyces lanuginosus* สายพันธุ์ SSBP พบว่า Pb^{2+} และ Hg^{2+} มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ และสารประกอบ *N*- bromosuccinimide มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์

Ratanakhanokchai และคณะ (1999) ศึกษาผลของไอออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซ-แลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-1 พบว่า $FeCl_2$ $CaCl_2$ และ $MgCl_2$ เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส แต่ $MnSO_4$ เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์จะไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์

Bataillon และคณะ (2000) ศึกษาผลของไอออนและสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SPS-0 พบว่า Ca^{2+} Fe^{2+} Mg^{2+} Na^{2+} และ Zn^{2+} เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ในขณะที่ Hg^{2+} เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ร้อยละ 99 ส่วนสารประกอบ β-mercaptoethanol และ dithiothreitol เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ร้อยละ 41 และ 93 ตามลำดับ ในขณะที่ *N*- bromosuccinimide เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ร้อยละ 99

2.7 ประโยชน์ของเอนไซม์ไซแลนเนส

2.7.1 การฟอกขาวทางชีวภาพ (biobleaching) ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ

ในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ เยื่อที่จะมาทำกระดาษจะมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาล เอนไซม์ไซแลนเนสจะไปขจัดเอาไซแลนซึ่งเป็นส่วนประกอบของเฮมิเซลลูโลสออกจากเยื่อกระดาษทำให้กระดาษขาวขึ้น เพื่อเป็นการลดการใช้คลอไรด์ในกระบวนการผลิตกระดาษ โดยสารเคมีที่นิยมใช้ในการฟอกได้แก่ คลอไรด์ (C) คลอไรด์ไดออกไซด์ (D) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (E) วิธีการที่นิยมใช้กันมากที่สุดมี 5 ขั้นตอนคือ CEDED หรือ DEDED จากกระบวนการผลิตดังกล่าวจะเกิดสารประกอบอินทรีย์คลอไรด์ (organic chloride) ซึ่งเป็นสารพิษปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม (Viikari และคณะ, 1986) เมื่อใช้เอนไซม์ไซแลนเนสร่วมกับกระบวนการทางเคมีดังกล่าวสามารถลดปริมาณการใช้คลอไรด์ได้ร้อยละ 20-25 นอกจากนี้ยังเป็นการลดการสูญเสียสับสเทรตในกระบวนการผลิต เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงกับสับสเทรตมากกว่าสารเคมี และสารเคมีที่ใช้ในการฟอกจะเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงอีกทั้งยังทำให้สูญเสียสับสเทรตด้วย (Ander, 1994)

2.7.2 การผลิตเอทานอล

ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นไซแลนและเซลลูโลส ภายหลังจากการย่อยจะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลกลูโคส ตามลำดับ จากนั้นจึงใช้ยีสต์หมักน้ำตาลที่ได้เปลี่ยนเป็นเอทานอล (Puls, 1993) กระบวนการผลิตโดยส่วนใหญ่ใช้กรดในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ หรือใช้ความร้อนสูงร่วมด้วยในการย่อยสลายเพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (Morjanoff และ Gray, 1987) กระบวนการผลิตเหล่านี้จะมีสารประกอบพวกฟีนอล (phenolic compound) เกิดขึ้น ซึ่งฟีนอลนี้จะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์จึงต้องมีการกำจัดฟีนอลออกโดยวิธีต่างๆ เช่น การใช้เอนไซม์ฟีโนโลซิเดสแลค-เคส (phenoloxidase laccase) การใช้เรซิน และถ่านกัมมันต์ (active charcoal) จากนั้นจึงใช้ด่างในปรับพีเอชให้เป็นกลางเพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ (Watson และคณะ, 1984)

ส่วนกระบวนการผลิตอีกวิธีหนึ่งคือ การใช้เอนไซม์ย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เอนไซม์ไซแลนเนส และเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าให้น้ำตาลรีดิวซ์สูง อีกทั้งยังสามารถใส่ยีสต์ลงไปเพื่อหมักให้เกิดเป็นเอทานอลได้เลย เป็นการลดขั้นตอนการกำจัดฟีนอลและการปรับพีเอชให้เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ (Martin และคณะ, 2002)

2.7.3 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ในการทำขนม เช่น เค้ก คุกกี้ แครกเกอร์ และอาหารอื่นๆ เอนไซม์ไซแลนเนสจะช่วยในการทำลายพันธะในพอลิแซ็กคาไรด์ ช่วยให้การทำขนมและอาหารเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้นด้วย (Godfrey และWest, 1996)

2.7.4 อาหารสัตว์

เศษวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร ซึ่งส่วนใหญ่มักประกอบด้วยลิกนิน จึงทำการกำจัดเอาส่วนที่เป็นลิกนินออกโดยใช้เอนไซม์ย่อยก่อนที่จะนำไปเป็นอาหารสัตว์ หรือเติมเอนไซม์ลงไปในอาหารธัญพืชที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารของสัตว์และยังเพิ่มการดูดซึมเกลือแร่ (Gilbert และHazlewood, 1993)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
กรดซิตริก ($C_4H_8O_7 \cdot H_2O$)	BHD
กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)	Sigma
กรดแอซิติก (CH_3COOH)	Merck
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	Merck
กลีเซอรอล	Merck
ไกลซีน (NH_2CH_2COOH)	BDH
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC)	Fluka
คอปเปอร์ซัลเฟตเพตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	Merck
โซเดียมคาร์บอเนตแอนไฮดรัส (Na_2CO_3)	Fluka
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	Merck
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$)	Merck
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	BDH
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	Fluka
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส (NaH_2PO_4)	Fluka
ไซแลนจากโอ๊ต (oat spelt xylan)	Fluka
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดดีคาไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	Fluka
ไดโซเดียมไฮโดรเจนอาร์เซเนตเฮปตะไฮเดรต ($AsHNa_2O_4 \cdot 7H_2O$)	Fluka
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส (K_2HPO_4)	Fluka
ทรีส ($C_4H_{11}NO_3$)	Merck
แนพทารีโซซินอล (naphtharesolcinol)	Fluka
บิวทานอล (C_4H_9OH)	Merck
เปปโตน	Difco
ผงวุ้น	Himedia
โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)	Merck
โพแทสเซียมไฮโดรเจนคาร์บอนเนต ($KHCO_3$)	Fluka

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Fluka
โฟลิน (folin-ciocaiteu' s phenol reagent)	Fluka
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเครต ($MgSO_4$•$7H_2O$)	Merck
สารสกัดจากยีสต์	Difco
เอทานอล (C_2H_5OH)	Merck
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	Fluka
แอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ •4 H_2O)]	Univar
อัลบูมิน(bovine serum from albumin)	Merck

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ	**บริษัทผู้ผลิต**
เครื่องกวนระบบแม่เหล็ก(magnetic stirrer) รุ่น PU-01	Yamoto
เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น pH -205	Digicon
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น 3000 array	Milton spectronic
เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น BR 4	Jouan
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator sheaker) รุ่น BR-13FP	Yamoto
เครื่องแก้วต่างๆ	Pyrex
เครื่อง electrophoresis รุ่น gelmate 2000	TOYOBO
เครื่องเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ รุ่น PCR System 9700	GeneAmp
เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม (automate sequencer) รุ่น genetic Analyze 310	ABI PRISM
ตู้บ่มเชื้อ (incubator)	Memmert
หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)	Yamoto
ไมโครปิเปตต์ (micropipet)	Gilson
แผ่นซิลิกาเจล (silica gel 60 50 TLC plate 10x20 เซนติเมตร)	Merck
ถุงไดอะไลซีส (cellulose tube 12000-14000 molecular cut off)	VISKASE
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น BT 100	Yamoto

3.3 การเตรียมฟางข้าวและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 การเตรียมฟางข้าว

นำฟางข้าวมาตัดยาวประมาณ 2 นิ้วล้างด้วยน้ำให้สะอาด จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทำการย่อยฟางข้าวเพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นลิกนินออกโดยนำฟางข้าวมาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล ทิ้งไว้ข้ามคืน นำฟางข้าวมาล้างด้วยน้ำประปาประมาณ 5-6 ครั้ง หรือจนน้ำที่ล้างใสหรือมีค่าพีเอชของน้ำล้างได้เท่ากับ 7 นำฟางข้าวไปอบให้แห้งที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Rao, 1983)

3.3.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเหลว alkaline medium (ภาคผนวก ก1) ปริมาณ 30 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้ฟางข้าวที่ได้จากข้อ 3.3.1 เป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 1

3.4 การคัดแยกแบคทีเรียย่อยฟางข้าวจากดิน

นำตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในอาหาร alkaline medium 30 มิลลิลิตรที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน คัดเลือกฟลาสก์ที่ฟางข้าวถูกย่อยได้ดีที่สุด (สังเกตจากฟางข้าวจะมีขนาดลดลงและอาหารเลี้ยงจะขุ่นข้นขึ้น) มาเพาะเลี้ยงต่อไปในอาหารใหม่ โดยถ่ายเชื้อจากอาหารเก่าใส่ในอาหารใหม่ปริมาตรร้อยละ 1 จากนั้นนำไปบ่มที่สภาวะเดิม ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนี้จนแน่ใจว่าได้แบคทีเรียที่สามารถย่อยฟางข้าวได้ จากนั้นนำเชื้อจากอาหารมาแยกโดยนำมาลาก (streak) บนอาหารแข็ง alkaline agar (ภาคผนวก ก2) นำโคโลนีเดี่ยวๆที่ได้มาแยกโดยเลือกเก็บเฉพาะโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน มาทำการย้อมสีแกรม และตรวจดูลักษณะการติดสีการเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำโคโลนีที่บริสุทธิ์ไปศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยฟางข้าวในอาหารเหลว

3.5 การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยฟางข้าวในอาหารเหลว

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 มาเลี้ยงในอาหารเหลว alkaline medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมงใส่ลงในอาหารเลี้ยงให้มีปริมาณของเชื้อเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเท่ากับ $2x10^8$ CFU/มิลลิลิตร นำไปทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำน้ำส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส คัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์สูงสุดไปศึกษาต่อไป

3.6 การจำแนกลักษณะและศึกษาสมบัติบางประการของแบคทีเรีย

3.6.1 ศึกษาการจำแนกลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiology) และสัณฐานวิทยา (Morphology) ของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 3.5 มาเลี้ยงในอาหารแข็ง alkaline agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทำการย้อมสีแบบแกรมและดูลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยศึกษาการติดสี รูปร่างของเซลล์ ขนาดของเซลล์ การเคลื่อนที่ และการสร้างสปอร์ เพื่อศึกษาการจำแนกลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโดยวิธีของเบอร์กีย์ (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (Butler, 1986)

3.6.1.1 การผลิตเอนไซม์แคตาเลส (catalase)

นำแบคทีเรียมาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารแข็ง alkaline agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ10 ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที แสดงว่าแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์แคตาเลส

3.6.1.2 การเกิดปฏิกิริยา Voges-Proskauer

ศึกษาการผลิต acetyl methyl carbinol โดยทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Voges-Proskauer broth (ภาคผนวก ก4) ทำการตรวจสอบการผลิต acetyl methyl carbinol ในวันที่ 3 5 และ 7 ของการเลี้ยงโดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนัก/ปริมาตร) 3 มิลลิลิตร และ creatine 0.5-1 มิลลิกรัมลงไปในอาหารเลี้ยง สังเกตการผลิต acetyl methyl carbinol โดยอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีแดงภายใน 30-60 นาที แสดงว่ามีการเกิดปฏิกิริยา Voges-Proskauer

3.6.1.3 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดส (oxidase)

เป็นการทดสอบการถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปยังออกซิเจนซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในไซโตโครม (cytochrome) โดยการใช้แผ่นทดสอบ (oxidase disk) นำแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว alkaline medium บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน นำเชื้อมาขีดลงบนแผ่นทดสอบ หากแผ่นทดสอบเปลี่ยนเป็นสีม่วงภายในเวลา 10 นาทีแสดงว่าเกิดปฏิกิริยาออกซิเดส แต่ถ้าสีไม่เปลี่ยนแสดงว่าไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดส

3.6.1.4 การเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ (nitrate to nitrite)

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร nitrate broth (ภาคผนวก ก5) นำอาหารมาวิเคราะห์ไนไตรต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 7 ของการเลี้ยง โดยหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไป 2-3 หยด บนแผ่น starch paper ที่มี KI แล้วขีดเชื้อลงบนแผ่นทดสอบ หากแผ่นทดสอบเปลี่ยนเป็นสีม่วงภายในเวลา 10 นาทีแสดงว่ามีไนไตรต์เกิดขึ้น

3.6.1.5 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ต่อการเจริญ

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร alkaline medium 30 มิลลิลิตรในในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ แป้ง (soluble strach) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) และไซแลน โดยทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันนาน 3 วัน ตรวจสอบผลการเจริญจากความขุ่นของเชื้อ ที่ค่าการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร

3.6.1.6 การทดสอบการเจริญที่พีเอชต่างๆ

ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลว nutrient broth (ภาคผนวก ก3) ปรับค่าพีเอชเป็น 7.0 8.0 9.0 10.0 11.0 และ 12.0 โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบผลการเจริญจากความขุ่นของเชื้อ ที่ค่าการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร

3.6.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการจะวิเคราะห์ในอาหาร alkaline agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน จากนั้นนำไปทำการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) (ภาคผนวก ข4) นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาเจือจาง 10 เท่า 100 เท่า และ1000 เท่า นำดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปทำ electrophoresis (ภาคผนวก ข5) เพื่อทดสอบผลการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำดีเอ็นเอความเข้มข้นที่เหมาะสมไปทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (polymerase chain reaction, PCR) (ภาคผนวก ข6) นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนในหลอดทดลองมาทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing) โดยใช้ชุดทดลอง ABI Prism® Big Dye™ Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit สำหรับเครื่อง automate sequencer เพื่อหาลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้ไปจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้โปรแกรม BLASTP 2.0

3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสในระดับฟลาสก์

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสในระดับฟลาสก์โดยเตรียมอาหาร alkaline medium นำอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นำอาหารทั้งหมดไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นทำการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงให้เท่ากับ 10.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอนเนต (Na_2CO_3) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่กล้าเชื้อลงในอาหารเลี้ยง โดยให้มีปริมาณของเชื้อเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเท่ากับ $2x10^8$ CFU/มิลลิลิตร ลงไปในอาหารแต่ละฟลาสก์ โดยแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

3.7.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมอาหารเหลว alkaline medium ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที นำเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกมา 1 ลูปถ่ายลงไปในอาหาร แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.7.2 แหล่งคาร์บอน

3.7.2.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ alkaline medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนดังนี้คือ ฟางข้าว ไซแลน และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เข้มข้นร้อยละ 1 หลังจากเติมกล้าเชื้อ นำฟลาสก์ทั้งหมดไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 7 วัน วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส (ภาคผนวก ข2)

3.7.2.2 การศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ alkaline medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.2.1 โดยแปรผันความเข้มข้นต่างๆกันดังนี้ คือร้อยละ 0.25 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 หลังจากเติมกล้าเชื้อนำฟลาสก์ทั้งหมดไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 7 วัน วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

3.7.3 แหล่งไนโตรเจน

3.7.3.1 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

เมื่อทราบปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากข้อ 3.7.2 แล้วจึงทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ โดยทำการเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ได้แก่ สกัดจากยีสต์และเปปโตน โดยใช้ความเข้มข้นที่เท่ากันคือร้อยละ 0.1 หลังจากเติมกล้าเชื้อ นำฟลาสก์ทั้งหมดไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 7 วัน วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

3.7.3.2 การศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

ทำการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์โดยใช้ แอมโมเนียมซัลเฟตกับสารสกัดจากยีสต์ โพแทสเซียมไนเตรตกับสารสกัดจากยีสต์ โซเดียมไนเตรตกับสารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมซัลเฟตกับเปปโตน โพแทสเซียมไนเตรตกับเปปโตน และโซเดียมไนเตรตกับเปปโตน โดยใช้ความเข้มข้นที่เท่ากันคือ แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ร้อยละ 0.1 กับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ร้อยละ 0.1 หลังจากเติมกล้าเชื้อนำฟลาสก์ทั้งหมดไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 7 วัน วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

3.7.4 การศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

เมื่อทราบปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากข้อ 3.7.1 และ 3.7.2 แล้วทำการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นต่างๆ ดังนี้ 7.0 8.0 9.0 10.0 11.0 และ 12.0 เตรียมอาหารเลี้ยงโดยใช้สูตรเดียวกับอาหาร alkaline medium เติมกล้าเชื้อแล้วนำ ฟลาสก์ทั้งหมดไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 7 วัน วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

3.8 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซแลนเนส

3.8.1 การเตรียมตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ไซแลนเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเท่ีเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากข้อ 3.7 นำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงในระดับฟลาสก์เขย่า ซึ่งเก็บในวันที่ให้กิจกรรมสูงสุดมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก จากนั้นนำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ค่าร้อยละการอิ่มตัวต่างๆ ดังนี้ 0-40 40-60 และ 60-80 ตามลำดับ (ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอน แสดงในตารางภาคผนวก ข8) โดยทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำตะกอนที่ได้ในแต่ละช่วงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 นำมาแยกเกลือออกโดยการไดอะไลซีสในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยที่ 4 ชั่วโมงแรกของการทำไดอะไลซีสต้องเปลี่ยนบัฟเฟอร์ครั้งหนึ่งหลังจากนั้นก็ทำไดอะไลซิสจนครบ 18 ชั่วโมง เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสก่อนไดอะไลซีสและหลังไดอะไลซิส

3.8.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

นำสารละลายเอนไซม์ไซแลนเนสที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.8.1 ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส ที่พีเอชต่างๆ ดังนี้ พีเอช 4.0 และ 5.0 ใช้อะซีเตตบัฟเฟอร์ (acetic-NaOH) 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 6.0 7.0 และ 8.0 ใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Na_2HPO_4-NaH_2PO_4) 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 9.0 และ 10.0 ใช้ โซเดียมคาร์บอนเนตบัฟเฟอร์ (Na_2CO_3-$NaHCO_3$) 0.05 โมลาร์ และที่พีเอช 11.0 12.0 และ 13.0 ใช้ ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (Glycine-NaOH) 0.05 โมลาร์ (ภาคผนวก ข9) เตรียมสารละลายไซแลนเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆเป็นสับสเทรต แล้วจึงนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสที่วิเคราะห์ได้ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)

3.8.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

นำสารละลายเอนไซม์ไซแลนเนสที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.8.1 ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส เตรียมสารละลายไซแลนเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสจากข้อ 3.8.2 เป็นสับสเทรต แล้วจึงนำมาวิเคราะห์

กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสที่วิเคราะห์ได้ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์

3.8.4 การศึกษาผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซแลนเนส

นำสารละลายเอนไซม์ไซแลนเนสที่ได้จากข้อ 3.8.1 มาบ่มในบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 10.0 11.0 12.0 และ 13.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาปรับพีเอชให้เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส (ตามข้อ 3.8.2) แล้วจึงนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส ในสภาวะที่เหมาะสมซึ่งเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด (ตามข้อ 3.8.2 และ 3.8.3) เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสในรูปร้อยละกิจกรรมที่เหลือ (residual activity)

3.8.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.8.1 มาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วจึงนำมาเจือจางให้เหมาะสมก่อนนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส ในสภาวะที่เหมาะสมซึ่งเอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุด (ตามข้อ 3.8.2 และ 3.8.3) เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสในรูปร้อยละกิจกรรมที่เหลือ

3.9 การวิเคราะห์ผลิตผลที่ได้จากการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ (crude enzyme)

การวิเคราะห์ผลิตผลที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์โดยวิธี Thin layer chromatography ดัดแปลงมาจาก Harborne (1960) (ภาคผนวก ข7) โดยการบ่มเอนไซม์ไซแลนเนส (มีกิจกรรม 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร) 1 มิลลิลิตร กับสารละลายไซแลนเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในสภาวะที่เหมาะสม (ตามข้อ 3.8.2 และ 3.8.3) ทำการวิเคราะห์หาสารที่เกิดจากการย่อยหลังจากบ่ม 10 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบสารตัวอย่างที่ได้กับสารละลายมาตรฐาน ได้แก่ ไซโลส ไซโลไบโอส ไซโลไตรโอส ไซโลเตตราโอส ไซโลเพนโตส และไซโลเฮกโซส ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน

3.10 การวิเคราะห์ผลิตผลที่ได้จากการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส

การวิเคราะห์ผลิตผลที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์โดยวิธี Thin layer chromatography โดยการบ่มเอนไซม์ไซแลนเนส (มีกิจกรรม 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร) 1 มิลลิลิตร กับฟางข้าว 100 มิลลิกรัม ในสภาวะที่เหมาะสม (ตามข้อ 3.8.2 และ 3.8.3) ทำการวิเคราะห์หาสารที่เกิดจากการย่อยหลังจากบ่ม 10 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง และ18 ชั่วโมง เปรียบเทียบสารตัวอย่างที่ได้กับสารละลายมาตรฐาน ได้แก่ ไซโลส ไซโลไบโอส ไซโลไตรโอส ไซโลเตตราโอส ไซโลเพนโตส และไซโลเฮกโซส ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน

3.11 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซแลนเนส

นำเอนไซม์ที่มีกิจกรรม 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร มา 1 หน่วย (Activity = 1U) และสารละลายฟางข้าว (ละลายในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม) ที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 25 50 100 150 และ 200 มิลลิกรัม โดยทำการบ่มที่พีเอชเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างสารละลายมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในช่วงเวลาต่างๆ กัน คือ 10 นาที 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ180 นาที โดยวิธี Somogyi 's Nelson (ภาคผนวก ข1) นำค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลามาเขียนกราฟ เพื่อคำนวณหาอัตราเร็วเริ่มต้น (V) ของปฏิกิริยา จากนั้นเขียนกราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/[S] กับ 1/[V] เพื่อคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} จากกราฟ

3.12 วิธีวิเคราะห์

3.12.1 วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi 's Nelson (ภาคผนวก ข1)

3.12.2 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส (ภาคผนวก ข2)

3.12.3 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry (ภาคผนวก ข3)

3.12.4 วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี CRD และเปรียบเทียบผลการทดลองโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 (ทรงเกียรติ, 2545)

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยไซแลนจากฟางข้าว

นำตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในอาหาร alkaline medium 30 มิลลิลิตรที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน คัดเลือกฟลาสก์ที่ฟางข้าวถูกย่อยได้ดีที่สุดมาเพาะเลี้ยงต่อไปในอาหารใหม่ โดยถ่ายเชื้อจากอาหารเก่าใส่ในอาหารใหม่ปริมาตรร้อยละ 1 จากนั้นนำไปบ่มที่สภาวะเดิม ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนี้จนแน่ใจว่าได้แบคทีเรียที่สามารถย่อยฟางข้าวได้ จากนั้นนำเชื้อจากอาหารมาแยกให้บริสุทธิ์ โดยนำมาลาก (streak) บนอาหารแข็ง alkaline agar เลือกเก็บเฉพาะโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันและอยู่เดี่ยวๆ ดูการเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเก็บเฉพาะโคโลนีที่บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์เอนไซม์ไซแลนเนส

ผลการแยกแบคทีเรียจากดินตัวอย่างในประเทศไทย 1,200 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างดินจำนวน 10 ตัวอย่างที่มีแบคทีเรียชอบด่างที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส ซึ่งดินตัวอย่างรหัส UM-12 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดเท่ากับ 0.67 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากนั้นนำแบคทีเรียจากตัวอย่างรหัส UM-12 ไปทำการแยกให้บริสุทธิ์ พบว่ามี 12 ไอโซเลต เมื่อนำแต่ละไอโซเลตมาทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน และหากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ UM-122 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดเท่ากับ 0.70 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.2

4.2 การจำแนกลักษณะและศึกษาสมบัติบางประการของแบคทีเรีย

4.2.1 การจำแนกลักษณะทางทางสรีรวิทยา และสัณฐานวิทยา

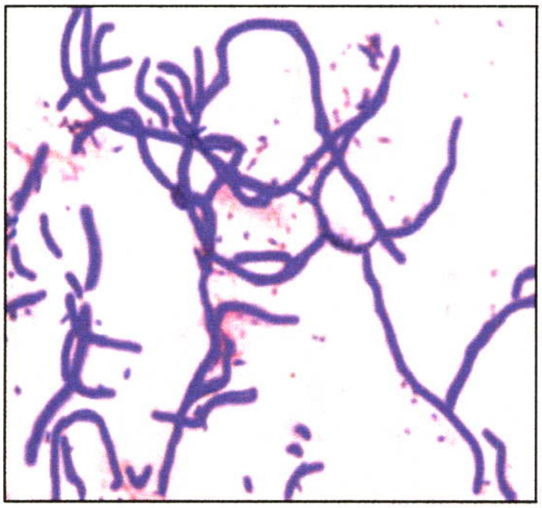
เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ UM-122 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงสุดมาทำการจำแนกลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาบางประการของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ UM-122 รูปร่างเป็นแบบแท่งยาวและมีกิ่งก้าน (branch) ในระยะแรกของการเจริญ เมื่อเซลล์แก่จะมีขนาดสั้นลง และเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์นานเกินกว่า 1 สัปดาห์ขนาดของเซลล์จะหดสั้นลงไปอีก ดังแสดงในรูปที่ 4.1 เมื่อทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีของเบอร์กีย์ (Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ UM-122 จัดอยู่ในจีนัส *Cellulomonas*

ตารางที่ 4.1 ชนิดของตัวอย่าง แหล่งที่มา และกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

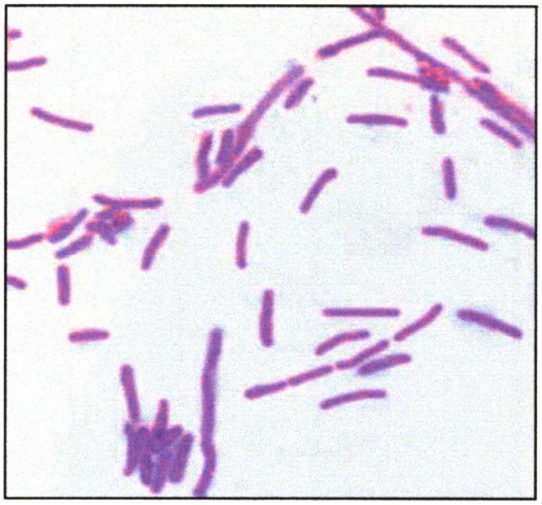
ชนิดของตัวอย่าง	กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แหล่งที่มา
F-7	0.25	โรงงานกระดาษร้าง
F-17	0.21	อ. บางประอิน จ.อยุธยา
KU-10	0.15	คณะสัตวแพทยศาสตร์
KU-35	0.30	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
LD-37	0.24	สวนลาดกระบัง กรุงเทพฯ
R-21	0.32	ป่าเชิงเขา
R-80	0.15	อ.โพธาราม จ. ราชบุรี
S-12	0.18	เขาใหญ่ จ. นครราชสีมา
T-25	0.33	**สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และ**
UM-12	**0.67**	**เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว)**

ตารางที่ 4.2 ชนิดของไอโซเลต และกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

ชนิดของไอโซเลตที่แยกได้จาก UM12	กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
UM-121	0.44
UM-122	**0.70**
UM-123	0.34
UM-124	0.45
UM-125	0.36
UM-126	0.34
UM-127	0.56
UM-128	0.62
UM-129	0.60
UM-130	0.55
UM-131	0.45
UM 132	0.60



ก.



ข.

ค.

ง.

รูปที่ 4.1 แสดงรูปร่างของแบคทีเรียสายพันธุ์ UM-122 เมื่อทำการเลี้ยงบนอาหาร alkaline medium (ภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า)

ก. แบคทีเรียอายุ 1 วัน ข. แบคทีเรียอายุ 2 วัน

ค. แบคทีเรียอายุ 4 วัน ง. แบคทีเรียอายุ 7 วัน

ตารางที่ 4.3 ลักษณะและสมบัติบางประการของแบคทีเรียสายพันธุ์ UM-122

ลักษณะ	ผลการทดสอบ
โคโลนี	สีเหลือง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 ไมโครเมตร
รูปร่าง	แท่ง
ขนาด	0.5 - 0.6 ไมโครเมตร x 2.0 - 4.0 ไมโครเมตร
แกรม	บวก
การเคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่
การสร้างสปอร์	ไม่มีสปอร์
ปฏิกิริยา Voges-Proskauer (VP reaction)	ไม่เกิด
แคตาเลส (catalase)	เกิด
ออกซิเดส (oxidase)	ไม่เกิด
การเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์	เกิด
การเจริญในแหล่งคาร์บอน	
ไซแลน	เจริญ
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส	เจริญ
แป้ง	ไม่เจริญ
พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญ	
7.0	ไม่เจริญ
8.0	ไม่เจริญ
9.0	เจริญ
10.0	เจริญ
11.0	เจริญ
12.0	ไม่เจริญ
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ	30 องศาเซลเซียส

4.2.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง และหาลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ แล้วนำลำดับเบสดังแสดงรูปที่ 4.2 มาทำการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม BLASTP 2.0 (www. ncbi. nlh. gov) พบว่าลำดับเบสตรงกับแบคทีเรีย *Cellulomonas variformis* ร้อยละ 95

GGCTNCATGG TACGGCAATA GANGCGTAGG GNACTGANTC CTGGGTAGCG
GGGATGGCAG TATCNGAGGA CCCCGATGCG AAGCAGTCTC TGGCCGCACT
GACGTGAGGA GCGAAAGCAT GGGGAGCGAA CAGGATTAGA TACCCTGTAG
TCCATGCCGT AAACGTTGGG CACTAGGTGT GGGGCTCATT CCACGAGTTC
CGCGCCGCAG CTAACGCATT AAGTGCCCCG CCTGGGGAGT ACGGCCGCAA
GGCTAAAACT CAAAGGAATT GACGGGGGCC CGCACAAGCG GCGGAGCATG
CGGATTAATT CGATGCAACG CGAAGAACCT TACCAAGGCT TGACATGCAC
CGGACGCTTC CAGAGATGGT TGTTCCGCAA GGTCGGTGCA CAGGTGGTGC
ATGGTTGTCG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG TTGGGTTAAG TCCCGCAACG
AGCGCAACCC TCGTCCCATG TTGCCAGCGG GTTATGCCGG GGACTCATGG
GAGACTGCCG GGGTCAACTC GGAGGAAGGC GGGGATGACG TCAAATCATC
ATGCCCCTTA TGTCTTGGGC TTCACGCATG CTACAATGGC CGGTACAGAG
GGCTGCGATA CCGTAAGGTG GAGCGAATCC CAAAAAGCCG GTCTCAGTTC
GGATTGGGGT CTGCAACTCG ACCCCATGAA GTCGGAGTCG CTAGTAATCG
CAGATCAGCA ACGCTGCGGT GAATACGTTC CCGGGCCTTG TACACACCGC
CCGTCAAGTC ACGAAAGTTG GTAACACCCG AAGCCCATGG CTCAACCGGT
TTCCGGGGGG AGGNCGAAGG GGACTGCGAT G

รูปที่ 4.2 ลำดับเบสบนดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ UM-122

4.3 การศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในระดับฟลาสก์

4.3.1 แหล่งคาร์บอน

4.3.1.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

นำเชื้อ *Cellulomonas variformis* UM-122 มาทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตามสูตรในภาคผนวก ก2 โดยทำการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ ฟางข้าว ไซแลนและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส โดยใช้ร้อยละ 1.0 ของอาหารเลี้ยง 30 มิลลิลิตร

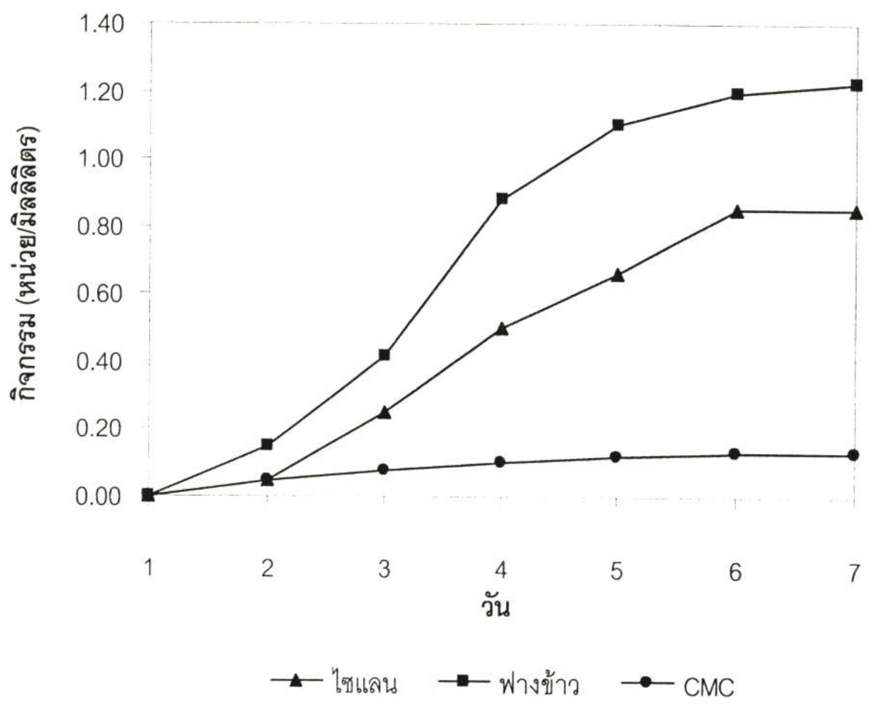
ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส พบว่าฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสโดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 1.23 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง รองลงมาคือไซแลนและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสเท่ากับ 0.85 และ 0.13 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 จากการเปรียบเทียบผลของฟางข้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 พบว่าฟางข้าวให้ผลในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสแตกต่างจากแหล่งอื่น ดังแสดงในตารางที่ 4.4

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเหนี่ยวนำในการผลิตเอนไซม์ เมื่อทำการเลี้ยง *C. variformis* UM-122 ในอาหารเลี้ยงที่ใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสมากกว่าเลี้ยงในไซแลนและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เนื่องจากฟางข้าวมีองค์ประกอบที่เป็นไซแลนมากกว่าแหล่งอื่น จากงานวิจัยของ Kosugi และคณะ (2001) รายงานว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนจะมีผลต่อการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) จากการศึกษาใน *Clostridium cellulovorans* ซึ่งทำการเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ กลูโคส เซลโลไบโอส เซลลูโลส อะไวเซล (avicel) ไซแลนจากโอ๊ต และไซแลนจากต้นเบิร์ช (xylan birchwood) พบว่าในอาหารที่ใช้ไซแลนจากต้นเบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซแลนเนส และเซลลูเลส 0.81 และ 0.25 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ส่วนในอาหารที่ใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส และไซแลนเนสเท่ากับ 0.36 และ 0.06 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ Qureshy และคณะ (2000) พบว่าผลผลิตสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสโดยศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus subtilis* โดยใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ผลผลิตที่ได้คือไซโลสและอะราบิโนสซึ่งเป็นพวกน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอมสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

ตารางที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

แหล่งคาร์บอน	กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
ฟางข้าว	1.23 [a]
ไซแลน	0.85 [b]
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส	0.13 [c]

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกัน



รูปที่ 4.3 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

4.3.1.2 การศึกษาปริมาณฟางข้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

จากผลการทดลองในข้อ 4.3.1.1 พบว่าฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส จึงได้มีการศึกษาปริมาณฟางข้าวที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยศึกษาปริมาณฟางข้าวร้อยละ 0.1 0.25 0.50 1.0 1.5 และ 2.0 น้ำหนักต่อปริมาตร

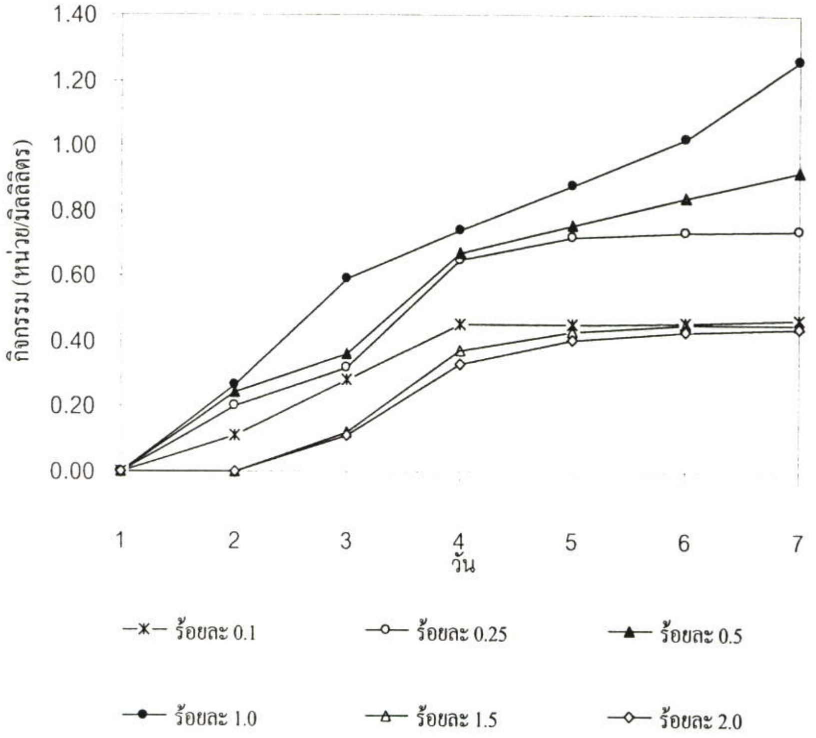
ผลการศึกษาปริมาณฟางข้าวต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส พบว่าปริมาณฟางข้าวร้อยละ 1.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดเท่ากับ 1.26 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง รองลงมาคือปริมาณฟางข้าวร้อยละ 0.5 และ 0.25 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสเท่ากับ 0.92 และ 0.74 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง เมื่อใช้ปริมาณฟางข้าวร้อยละ 0.1 1.5 และ 2.0 จะผลิตเอนไซม์ได้ในระดับใกล้เคียงกัน คือ 0.47 0.45 และ 0.44 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.4 จากการเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 พบว่าฟางข้าวร้อยละ 1.0 น้ำหนักต่อปริมาตร ให้ผลการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสแตกต่างจากความเข้มข้นอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.5

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสคือ ร้อยละ1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ถ้าแหล่งคาร์บอนมีน้อยหรือมากเกินไปก็จะมีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณน้อย เนื่องจากแบคทีเรียต้องการความชื้นสูงในการเจริญและการส่งผ่านออกซิเจน จากงานวิจัยของ Yang และคณะ (1995) พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสที่ชอบด่าง (alkaline xylanase) จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ V1-4 พบว่าเมื่อใช้ไซแลนจากต้นเบิร์ชร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงสุดรองลงมาคือรำข้าวร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร Beg และคณะ (2000) รายงานการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสของแบคทีเรียที่ชอบเจริญในที่อุณหภูมิสูง (thermophile) จากเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ QG-11-3 โดยการเลี้ยงในอาหารแข็ง (solid state fermentation) ใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในสัดส่วน 1:1 ถึง 1:4 (รำข้าว:ความชื้น) พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 1:2.5 ถึง 1:3 สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูง ในขณะที่ Gessesse และ Mamo (1999) รายงานการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ A-009 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบด่าง สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงสุดเมื่อใช้รำข้าวในปริมาณต่ำและความชื้นสูงโดยการเลี้ยงในอาหารแข็ง ใช้สัดส่วน 1:0.5 ถึง 1:1.5 (รำข้าว:ความชื้น) ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และออกซิเจนที่มีจำกัดต่อการส่งผ่านสู่เซลล์ แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความชื้นต่ำในขณะที่เชื้อราสามารถเจริญได้ดีในสภาวะดังกล่าว

ตารางที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณฟางข้าวที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

ร้อยละของปริมาณฟางข้าว (น้ำหนักต่อปริมาตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
1.0	1.26 [a]
0.5	0.92[b]
0.25	0.74[c]
0.1	0.47[d]
1.5	0.45[d]
2.0	0.44[d]

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกัน



รูปที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสเมื่อใช้ปริมาณฟางข้าวต่างๆกัน

4.3.2 แหล่งไนโตรเจน

4.3.2.1 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

นำสูตรอาหารที่ทราบปริมาณฟางข้าวที่เหมาะสมจากข้อ 4.3.1 (ร้อยละ 1 ของอาหาร) มาศึกษาแหล่งไนโตรเจน โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ประกอบด้วยแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรต และโพแทสเซียมไนเตรต ส่วนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์และเปปโตน โดยใช้ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือร้อยละ 0.1 ทำการเลี้ยงโดยเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน

ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส แสดงในรูปที่ 4.5 พบว่าสารสกัดจากยีสต์ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดเท่ากับ 1.13 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง รองลงมาคือ แอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสเท่ากับ 0.97 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง ส่วนโพแทสเซียมไนเตรต เปปโตน และโซเดียมไนเตรต มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสเท่ากับ 0.91 0.90 และ 0.88 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง ตามลำดับ เมื่อไม่มีแหล่งไนโตรเจนก็แทบจะไม่มีการผลิตเอนไซม์ จากการเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากยีสต์ทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 พบว่าสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสแตกต่างจากแหล่งไนโตรเจนอื่น ดังแสดงในตารางที่ 4.6

4.3.2.3 การศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์

ทำการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์โดยใช้ แอมโมเนียมซัลเฟตกับสารสกัดจากยีสต์ โพแทสเซียมไนเตรตกับสารสกัดจากยีสต์ โซเดียมไนเตรตกับสารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมซัลเฟตกับเปปโตน โพแทสเซียมไนเตรตกับเปปโตน และโซเดียมไนเตรตกับเปปโตน โดยใช้ความเข้มข้นแต่ละชนิดเท่ากับร้อยละ 0.1 ของปริมาตรอาหาร

ผลการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ร่วมกับสารอินทรีย์ พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดเท่ากับ 1.15 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง รองลงมาคือการใช้โซเดียมไนเตรตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ และโพแทสเซียมไนเตรตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ซึ่งให้ค่ากิจกรรมที่ไม่แตกต่างคือ 1.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง สำหรับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับเปปโตน โซเดียมไนเตรตร่วมกับเปปโตน และโพแทสเซียมไนเตรตร่วมกับเปปโตน มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสใกล้เคียงกันเท่ากับ 0.95 0.95 และ 0.94 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของ

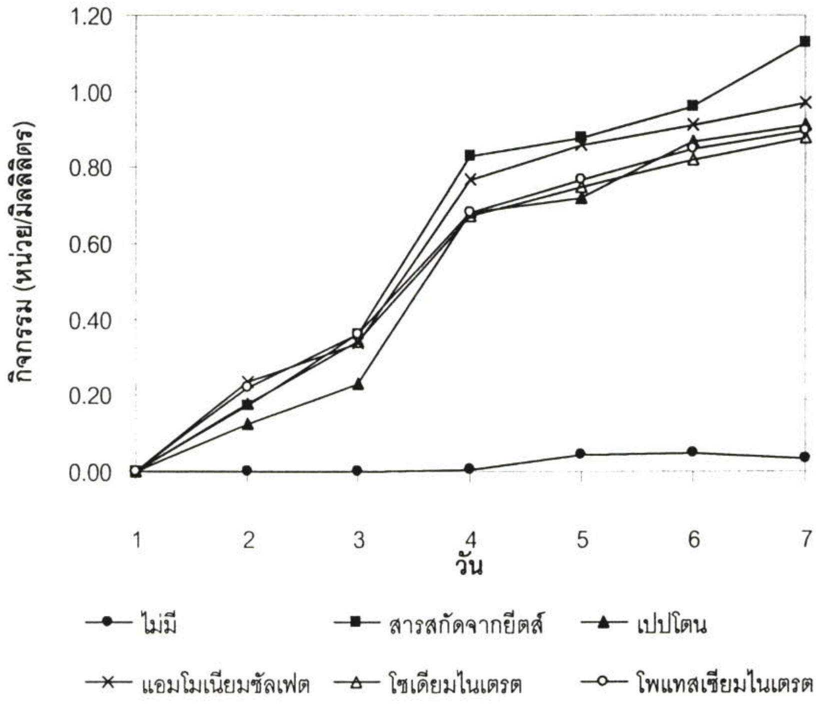
การเลี้ยง ตามลำดับ ดังแสดงในรูป 4.6 จากการเปรียบเทียบการใช้สารสกัดจากยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 พบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต ให้ผลในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสแตกต่างจากแหล่งอื่น ดังแสดงในตารางที่ 4.7

จากผลการทดลองพบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเมื่อเทียบกับแหล่งอื่น ในขณะที่แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรตและโพแทสเซียมไนเตรตก็สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดี เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจึงสามารถใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนแทนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนได้ จากงานวิจัยของ Beg และคณะ (2000) การผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Streptomyces* สายพันธุ์ QG-11-3 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบด่างในอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียวคือ แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 ของอาหาร สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงสุด เนื่องจากรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งประกอบด้วยสารอาหารและแหล่งไนโตรเจนจากธรรมชาติ นอกจากนี้ยังมีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เป็นแหล่งโซเดียมร้อยละ 0.25 ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ชอบด่าง จากการทดลองพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์คือ สารสกัดจากยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงกว่าเปปโตนถึงร้อยละ 20 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gessese และ Mamo (1999) รายงานว่าการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AR-009 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบด่างเมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ไซแลนเนสถึงร้อยละ 20 ส่วนเปปโตนและทริปโตนไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ไซแลนเนสเมื่อเปรียบเทียบการทดลองที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากในรำข้าวมีแร่ธาตุและวิตามินที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ Qureshy และ คณะ (2000) พบว่า *Bacillus subtilis* สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ในอาหารที่ประกอบด้วยสกัดจากยีสต์สูงกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต Sa-Pereira และคณะ (2002) พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus subtilis* ซึ่งชอบเจริญในที่อุณหภูมิสูง ในอาหารที่ประกอบด้วยแอมโมเนียซัลเฟตซึ่งเป็น แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนร้อยละ 0.2 และในอาหารที่ประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจนร้อยละ 0.2 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส 4.0 และ 4.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
สารสกัดจากยีสต์	1.13[a]
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.97[b]
โพแทสเซียมไนเตรต	0.91[b]
เปปโตน	0.90[b]
โซเดียมไนเตรต	0.88[b]
ไม่เติม	0.03[c]

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกัน

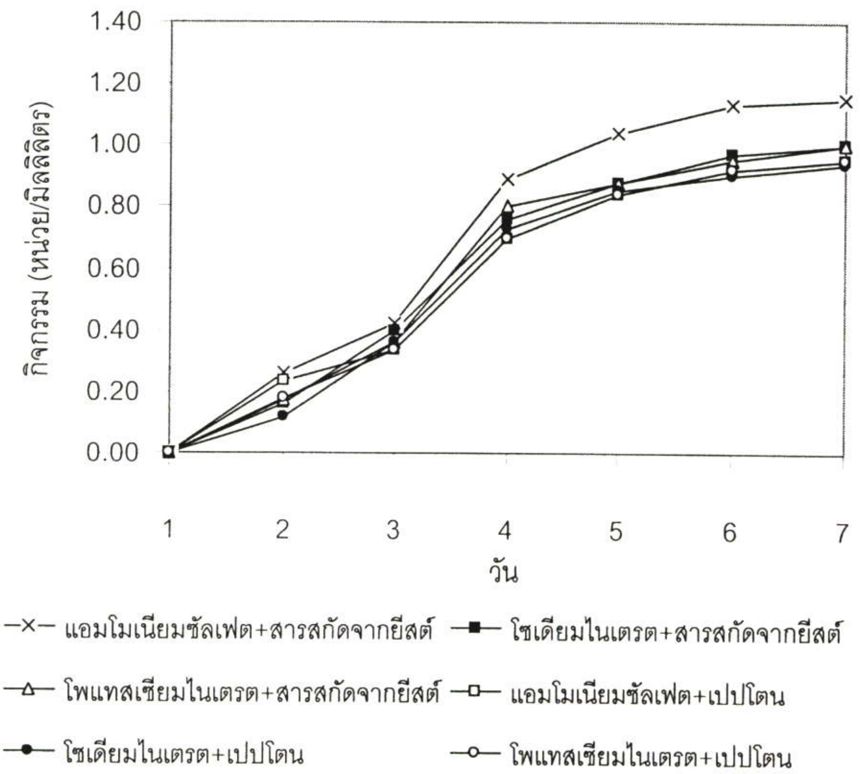


รูปที่ 4.5 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

ตารางที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ ต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
แอมโมเนียมซัลเฟต+สารสกัดจากยีสต์	1.15[a]
โซเดียมไนเตรต+ สารสกัดจากยีสต์	1.00[b]
โพแทสเซียมไนเตรต + สารสกัดจากยีสต์	1.00[b]
แอมโมเนียมซัลเฟต + เปปโตน	0.95[c]
โซเดียมไนเตรต+ เปปโตน	0.95[c]
โพแทสเซียมไนเตรต +เปปโตน	0.94[c]

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกัน



รูปที่ 4.6 การใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

4.3.3 การศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

เมื่อทราบปริมาณฟางข้าวและปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหาร (จากข้อ 4.3.1 และ 4.3.2) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสแล้ว นำอาหารดังกล่าวมาศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยนำอาหารมาปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 8.0 9.0 10.0 11.0 และ12.0 ตามลำดับ

ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส พบว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงที่มีพีเอชเริ่มต้น 10.0 ให้กิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดเท่ากับ 1.39 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างการเลี้ยงพบว่าใน 24 ชั่วโมงแรกพีเอชลดลงเหลือ 9.15 และหลังจากนั้นค่าพีเอชเริ่มคงที่ตลอดในระหว่างการเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 4.8 สำหรับอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 11.0 ให้กิจกรรมของเอนไซม์รองลงมาคือ 1.34 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง การเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างการเลี้ยงพบว่าใน 24 ชั่วโมงแรกพีเอชลดลงเหลือ 9.55 และจากนั้นค่าพีเอชจะคงที่ (พีเอช 9)ไปตลอดระหว่างการเลี้ยง อาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 9.0 และ 8.0 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสใกล้เคียงกันคือ 0.52 และ 0.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง ตามลำดับ ในขณะที่อาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 12.0 และ 7.0 ให้กิจกรรมของเอนไซม์เพียง 0.20 และ 0.08 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันที่ 7 ของการเลี้ยง ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบผลของพีเอชเริ่มต้น 10.0 และ 11.0 ต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส ทางสถิติวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 และ 11.0 ให้ผลในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.8

จากผลการทดลองพบว่าอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 10 และ 11 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 8 และ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลน-เนสจะลดลงร้อยละ 60 เนื่องจากเซลล์ต้องการโซเดียมไอออน (Na^+) ในการนำสารเข้าภายในเซลล์ ดังนั้นในอาหารที่มีพีเอชมากกว่าจึงมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงกว่าอาหารที่พีเอชต่ำกว่า และในระหว่างการเลี้ยงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงลดลงเนื่องจากเซลล์มีการผลิตสารพวกกรดอะมิโนออกมาภายนอกเซลล์ (Kitada และ Horikoshi, 1992) ขณะเดียวกันในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 12 ไม่มีการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเนื่องจากเซลล์มีการนำเอาโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์มากขึ้นๆ ประกอบกับเซลล์ไม่สามารถควบคุมการนำโซเดียมไอออนออกจากเซลล์ได้ทัน ทำให้พีเอชภายในเซลล์เพิ่มขึ้น เซลล์ก็จะเสียสภาพและตายในที่สุด และในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ไม่มีการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเนื่องจากมีโซเดียมไอออนในปริมาณต่ำทำให้การนำสารเข้าไปในเซลล์มีน้อย เซลล์จึงขาดสารอาหารและตายในที่สุด (Kitada และคณะ, 1982) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Horikoshi และ Atsukawa (1973) พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C-59-2 สามารถเจริญได้ในในอาหารเลี้ยงที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 10.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงพบว่าค่าพีเอชลดลงเหลือ 8.0 Kang และคณะ (1996)

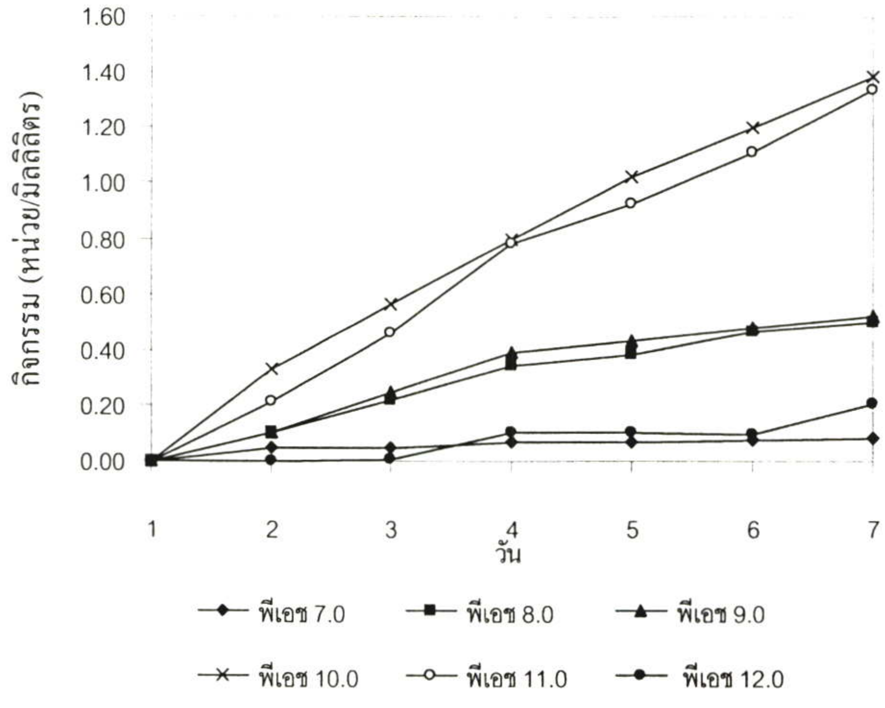
พบว่า *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 ซึ่งเป็นเชื้อราที่ชอบด่างสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดีในช่วงพีเอช 9.5-10.0 Gessesse (1998) พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AR-009 ที่ชอบด่างสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสและเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 10.5 Ratanakhanokchai และคณะ (1998) พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-1 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสและเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 10.5 Rius และ Loren (1998) พบว่า *Bacillus alcalophilus* สามารถเจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่เป็นด่าง โดยสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชเท่ากับ 8.5-11.5 และเจริญได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 10.6 ในขณะที่อาหารมีค่าพีเอชเป็นกลางเชื้อจะไม่เจริญ Tseng และคณะ (2002) พบว่า *Bacillus firmus* ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสสามารถเจริญได้ดีในช่วง พีเอช 10-12

ตารางที่ 4.8 แสดงการเปรียบเทียบผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

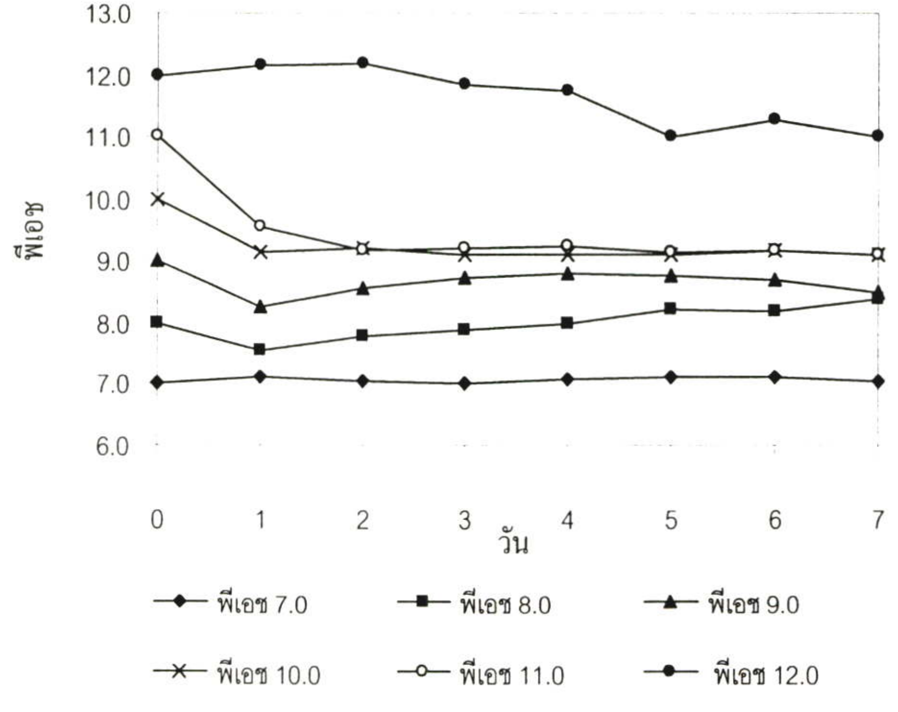
พีเอชเริ่มต้น	กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
10.0	1.39^{a}
11.0	1.34^{a}
9.0	0.52^{b}
8.0	0.50^{b}
12.0	0.20^{c}
7.0	0.08^{c}

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกัน

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกัน



รูปที่ 4.7 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส



รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยง

4.4 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์

4.4.1 ผลของการเตรียมตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ไซแลนเนส

นำอาหารที่ได้จากการเลี้ยง *C. variformis* UM-122 เป็นเวลา 7 วัน มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เพื่อแยกเอาส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 3.17 หน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีน จากนั้นนำส่วนใสที่แยกได้จากอาหารมาทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ค่าร้อยละของความอิ่มตัวที่ 0-40 40-60 และ 60-80 จากนั้นทำการไดอะไลซีสเพื่อเอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออก พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 4.28 5.50 และ 6.53 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ผลผลิตที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าที่ร้อยละของความอิ่มตัวที่ 40-60 มีผลผลิตของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดคือร้อยละ 36.03 มีความบริสุทธิ์ (fold purification) 1.63 เท่า รองลงมาคือร้อยละของความอิ่มตัวที่ 0-40 มีผลผลิตของเอนไซม์ไซแลนเนส ร้อยละ 28.41 มีความบริสุทธิ์ 1.14 เท่า และร้อยละของความอิ่มตัวที่ 60-80 มีผลผลิตของเอนไซม์ไซแลนเนสร้อยละ 12.73 มีความบริสุทธิ์ 1.19 เท่า ในการตกตะกอนเอนไซม์ที่ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงร้อยละ 0-40 และ 40-60 ผลผลิตของเอนไซม์มีค่าใกล้เคียงกัน ในการทดลองจึงทำการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 0-60 จากงานการวิจัยของ Kubata และคณะ (1995) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Aeromonas caviae* สายพันธุ์ ME-1 สามารถตกตะกอนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 0-95 มีค่าร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 80 Kang และคณะ (1996) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อรา *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 สามารถตกตะกอนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 30-80 มีค่าร้อยละผลผลิตเท่ากับ 72.2 Gessesse และคณะ (1998) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สามารถตกตะกอนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 70 มีค่าร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 76.4 Lin และคณะ (1999) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* สายพันธุ์ SSBP สามารถตกตะกอนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 มีค่าร้อยละผลผลิตเท่ากับ 86.4 Sa-Pereira และคณะ (2000) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ CCMI 966 สามารถตกตะกอนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 65 มีค่าร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 32.4 Bataillon และคณะ (2000) พบว่าเอนไซม์ไซแลน-เนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SPS-0 สามารถตกตะกอนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 มีค่าร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 48.6 Georis และคณะ(2000) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ S38 สามารถตกตะกอนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 75 มีค่าร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 73

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการตกตะกอนเอนไซม์ไซแลนเนสด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในแต่ละขั้นตอน

ขั้นตอน	กิจกรรม (หน่วย)	โปรตีน (มิลลิกรัม)	กิจกรรมจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ร้อยละผลผลิต
เอนไซม์ก่อนตกตะกอน	160.00	50.60	3.16	-	100.00
ร้อยละความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต					
0-40	45.45	12.60	3.61	1.14	28.41
40-60	57.64	11.20	5.15	1.63	36.03
60-80	20.36	5.40	3.77	1.19	12.73

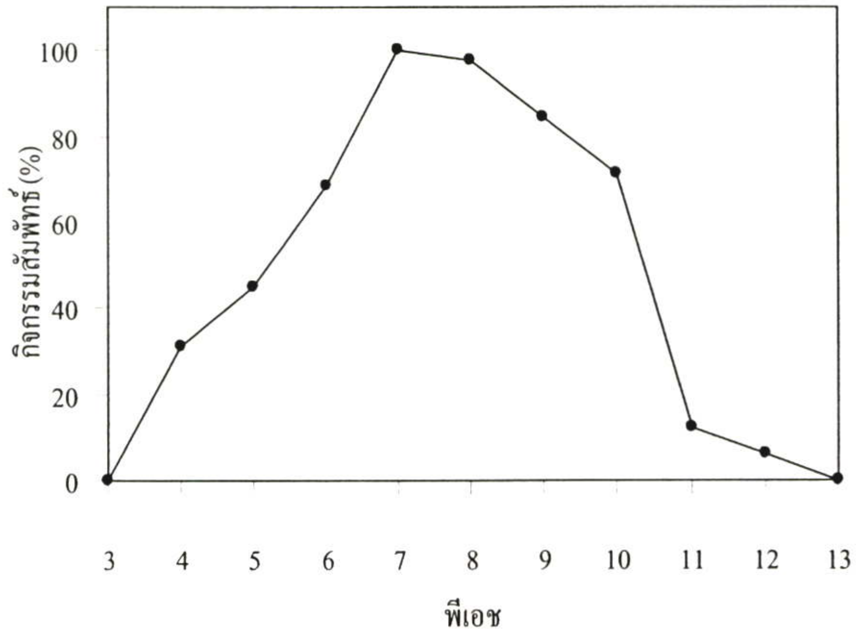
4.4.2 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

จากผลการทดลองพบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสคือ 7.0 ดังแสดงในรูป 4.9 ที่พีเอช 8.0 และ 9.0 เอนไซม์ไซแลนเนสมีกิจกรรมมากกว่าร้อยละ 80 ของกิจกรรมสูงสุด ส่วนที่พีเอช 10.0 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสลดลงเหลือร้อยละ 71 ของกิจกรรมสูงสุด ที่พีเอช 6.0 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสลดลงเหลือร้อยละ 68 ของกิจกรรมสูงสุด ที่พีเอช 5.0 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสลดลงเหลือร้อยละ 45 ของกิจกรรมสูงสุด ที่พีเอช 4.0 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสลดลงเหลือร้อยละ 31 ของกิจกรรมสูงสุด และที่พีเอช 11 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสลดลงเหลือร้อยละ 12 ของกิจกรรมสูงสุด เมื่อมีค่าพีเอชต่ำกว่า 4.0 และค่าพีเอชสูงกว่า 11.0 ไม่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับ Blanco และคณะ (1995) พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BP-23 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบด่างมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 นอกจากนี้ที่ พีเอช 9.5 และ 11.0 เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมร้อยละ 72 และ 35 ของกิจกรรมสูงสุดตามลำดับ Kang และคณะ (1996) ที่พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อรา *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 ซึ่งเป็นเชื้อราที่ชอบด่างมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.5-8.0 และในช่วงพีเอช 5.0-8.5 เอนไซม์มีกิจกรรมมากกว่าร้อยละ 80 ของกิจกรรมสูงสุด Gessesse (1998) พบว่าในการศึกษาการแยกเอนไซม์ไซแลนเนสให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp.สายพันธุ์ AR-009 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบด่างพบเอนไซม์ไซแลนเนส 2 ชนิด คือ Xyl A และ Xyl B โดย Xyl A

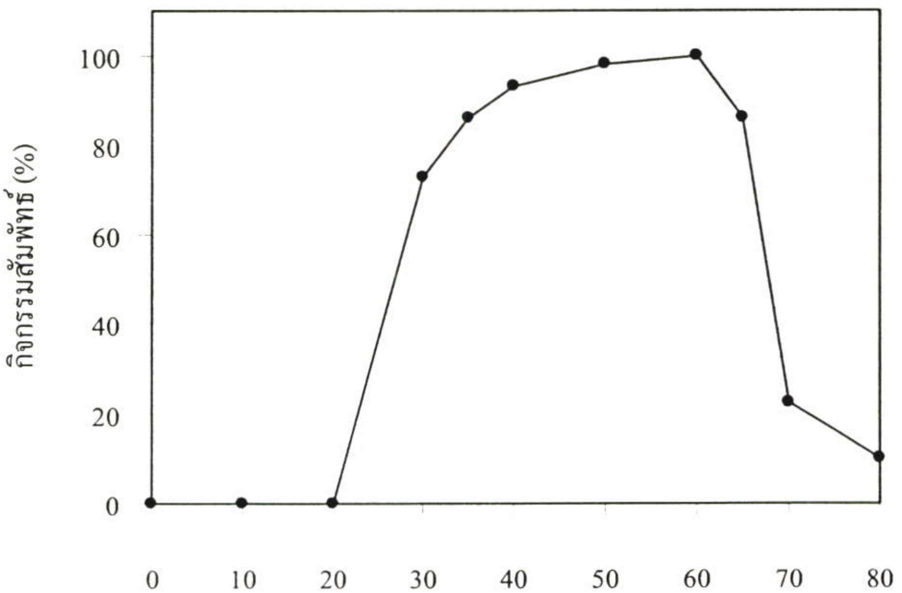
มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 9.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ Xyl B มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 9.0-10.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส Ratanakhanokchai และคณะ (1999) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp.สายพันธุ์ K-1 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 Tseng และคณะ (2002) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus firmus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบด่างมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0-7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมจนถึงพีเอช 11.0

4.4.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสคือ 60 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ซึ่งในช่วงอุณหภูมิ 35-65 องศาเซลเซียสมีกิจกรรมมากกว่าร้อยละ 80 ของกิจกรรมสูงสุด ส่วนที่อุณหภูมิ 70.0 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสลดลงเหลือร้อยละ 23 ของกิจกรรมสูงสุด ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสลดลงเหลือร้อยละ 10 ของกิจกรรมสูงสุด และที่อุณหภูมิ 30.0 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสลดลงเหลือร้อยละ 72 ของกิจกรรมสูงสุด เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส ไม่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับ Blanco และคณะ (1995) พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp.สายพันธุ์ BP-23 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบด่าง พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส Kang และคณะ (1996) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อรา *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 ซึ่งเป็นเชื้อราที่ชอบด่าง มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส Gessesse (1998) พบว่าในการศึกษาการแยกเอนไซม์ไซแลนเนสให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AR-009 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบด่าง พบเอนไซม์ไซแลนเนส 2 ชนิด คือ Xyl A และ Xyl B โดย Xyl A มีกิจกรรมสูงสุดที่ 70 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มที่พีเอช 8.0 และมีกิจกรรมสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มที่พีเอช 9.0 ส่วน Xyl B มีกิจกรรมสูงสุดที่ 70 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มที่พีเอช 8.0 และมีกิจกรรมสูงสุดที่ 75 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มที่พีเอช 9.0 Ratanakhanokchai และคณะ (1999) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp.สายพันธุ์ K-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบด่างมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและพีเอชเท่ากับ 7.0



รูปที่ 4.9 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสที่พีเอชต่างๆ



รูปที่ 4.10 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสที่อุณหภูมิต่างๆ

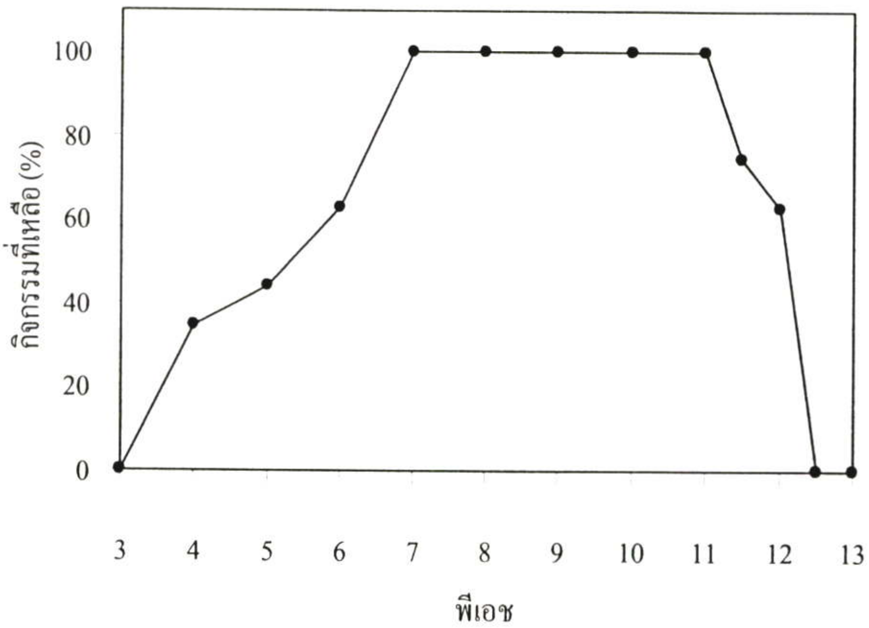
4.4.4 ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไซแลนเนสที่พีเอชต่างๆ

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสมีความคงตัวในช่วงพีเอช 7.0-11.0 ดังแสดงในรูปที่ 4.11 ที่พีเอช 6.0 และ 12.0 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 63 ของกิจกรรมเริ่มต้น ที่พีเอช 5.0 และ 4.0 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 44 และ 35 ของกิจกรรมเริ่มต้น ตามลำดับ ที่พีเอชต่ำกว่า 3.0 และพีเอชสูงกว่า 12.0 เอนไซม์จะเสียสภาพ ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Blanco และคณะ (1995) ที่พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp.สายพันธุ์ BP-23 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบด่างมีความคงตัวที่พีเอชเท่ากับ 11.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 11 วัน Kang และคณะ (1996) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อรา *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 ซึ่งเป็นเชื้อราที่ชอบด่างมีความคงตัวที่พีเอชเท่ากับ 5.5-12.0 ที่พีเอชเท่ากับ 12.0 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 95 ของกิจกรรมที่เหลือเมื่อบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง Gessesse (1998) พบว่าในการศึกษาการแยกเอนไซม์ไซแลนเนสให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AR-009 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบด่างพบเอนไซม์ไซแลนเนส 2 ชนิด คือ Xyl A และ Xyl B มีความคงตัวที่พีเอช เท่ากันคือ 5.0-11.0 เมื่อบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง Ratanakhanokchai และคณะ (1999) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp.สายพันธุ์ K-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบด่างมีความคงตัวที่พีเอชเท่ากับ 5.0-9.0 เมื่อบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และที่พีเอช 12.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 88 ของกิจกรรมเริ่มต้น

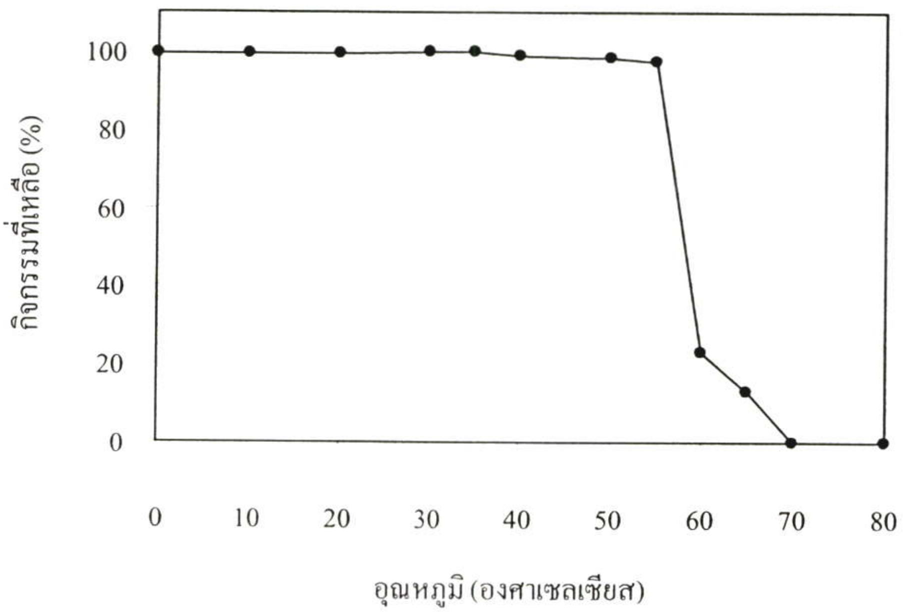
4.4.5 ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไซแลนเนสที่อุณหภูมิต่างๆ

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสมีความคงตัวต่ออุณหภูมิต่ำกว่า 55 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มที่พีเอช 7.0 นาน 30 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.12 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 98 ของกิจกรรมเริ่มต้น ที่อุณหภูมิ 60 และ 65 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 23 และ 13 ของกิจกรรมเริ่มต้น ตามลำดับ ที่อุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะเสียสภาพ ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Blanco และคณะ(1995) ที่พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp.สายพันธุ์ BP-23 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบด่าง พบว่ามีความคงตัวที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มที่พีเอช 7.0 นาน 40 นาที Kang และคณะ (1996) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อรา *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 ซึ่งเป็นเชื้อราที่ชอบด่าง มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มที่พีเอช 8.0 นาน 2 ชั่วโมง Gessesse (1998) พบว่าในการศึกษาการแยกเอนไซม์ไซแลนเนสให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AR-009 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบด่าง พบเอนไซม์ไซแลนเนส 2 ชนิดคือ Xyl A และ Xyl B โดย Xyl A มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อทำการบ่มที่พีเอช 8.0 และ 9.0 นาน 3 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 95 ของกิจกรรมเริ่มต้น และเมื่อทำการบ่มที่

65 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 8.0 และ 9.0 ลดลงเหลือร้อยละ 78 และ 55 ของกิจกรรมที่เหลือ ตามลำดับ ส่วน Xyl B มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 3 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 8.0 และ 9.0 ลดลงเหลือร้อยละ 51 และ 74 ของกิจกรรมเริ่มต้น ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 1 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 8.0 และ 9.0 ลดลงเหลือร้อยละ 54 และ 67 ของกิจกรรมเริ่มต้น ตามลำดับ Ratanakhanokchai และคณะ(1999) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp.สายพันธุ์ K-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบด่าง มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มที่พีเอช 7.0 นาน 30 นาที และเมื่อทำการบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 90 ของกิจกรรมเริ่มต้น



รูปที่ 4.11 ความคงตัวของเอนไซม์ไซแลนเนสที่พีเอชต่างๆ



รูปที่ 4.12 ความคงตัวของเอนไซม์ไซแลนเนสที่อุณหภูมิต่างๆ

4.5 การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสับสเตรตด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส

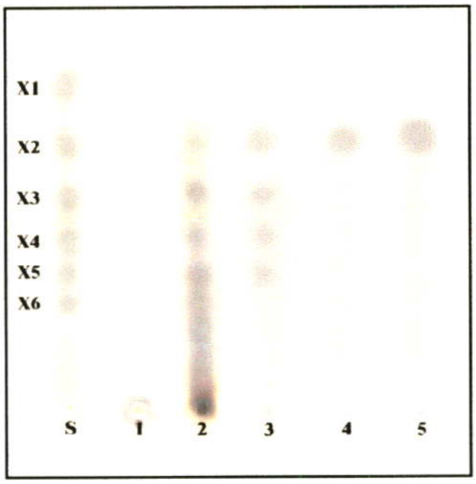
4.5.1 การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการย่อยไซแลนจากโอ๊ตด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส

การย่อยไซแลนจากโอ๊ตด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส โดยทำการบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี thin layer chromatography พบว่าผลผลิตที่ได้จากการย่อยส่วนใหญ่คือ ไซโลไบโอสและไซโลไตรโอส เมื่อบ่มนาน 3 ชั่วโมง ผลผลิตส่วนใหญ่จะเปลี่ยนเป็นไซโลไบโอสจนหมด ดังแสดงในรูปที่ 4.13

4.5.2 การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส

การย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส โดยทำการบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง และ 18 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี thin layer chromatography พบว่าผลผลิตที่ได้จากการย่อยส่วนใหญ่คือ ไซโลไบโอสและไซโลไตรโอส เมื่อบ่มนาน 18 ชั่วโมง ผลผลิตส่วนใหญ่จะเปลี่ยนเป็นไซโลไบโอสจนหมด ดังแสดงในรูปที่ 4.14

ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Kubata และคณะ (1995) ที่พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนส IV (xylanase IV) ซึ่งได้จากการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จาก *Aeromonas caviae* สายพันธุ์ ME-1 สามารถย่อยไซแลนจากโอ๊ตได้ผลผลิตเพียงอย่างเดียวคือ ไซโลเตตระโอส (xylotetraose) Kang และคณะ (1996) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสซึ่งทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อรา *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 สามารถย่อยไซแลนจากต้นเบิร์ชให้ผลผลิตหลักคือ ไซโลไบโอส และผลผลิต รองลงมาคือ ไซโลไตรโอสและไซโลเฮกโซส Lin และคณะ (1999) ได้ศึกษากลไกการย่อยไซแลนและน้ำตาล xylooligosacharide ด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสซึ่งทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* สายพันธุ์ SSBP โดยใช้ไซแลนจากต้นเบิร์ช ไซโลไตรโอส และไซโลเตตราโอส เป็นสับสเทรต ได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นไซโลไบโอส กลไกการย่อยเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ย่อยไซแลนได้ผลผลิตเป็นไซโลไตรโอส จากนั้นไซโลไตรโอส 2 โมเลกุลจะมาเชื่อมต่อกันเกิดเป็นไซโลเฮกโซส ด้วยเอนไซม์ transglycosidase และไซโลเฮกโซสจะเกิดการย่อยสลายอย่างรวดเร็วด้วยเอนไซม์ endo-xylanase เป็นไซโลไบโอส 3โมเลกุล หรือไซโลเตตระโอส และไซโลส จากนั้นไซโลเตตราโอสจะถูกย่อยสลายไปเป็นไซโลสในที่สุด Bataillon และคณะ (2000) พบว่าการย่อยไซแลนจากต้นเบิร์ชด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SPS-0 ได้ผลผลิตคือ ไซโลส และไซโลไบโอส Tseng และคณะ(2002) พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสซึ่งทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อ *Bacillus firmus* สามารถย่อยไซแลนจากต้นเบิร์ชได้ผลผลิตคือ ไซโลส ไซโลไตรโอส และไซโลเฮกโซส



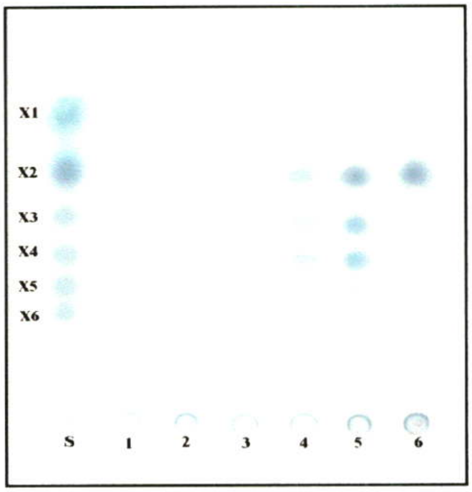
รูปที่ 4.13 ผลผลิตที่ได้จากการย่อยไซแลนจากโอ๊ตด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส

S สารมาตรฐาน (X1: xylose X2: xylobiose X3: xylotriose

X4: xylotretraose X5: xylopentose X6: xylohexose)

ช่องที่ 1 เวลาเริ่มต้น ช่องที่ 2 เวลา 30 นาที ช่องที่ 3 เวลา 1 ชั่วโมง

ช่องที่ 4 เวลา 2 ชั่วโมง ช่องที่ 5 เวลา 3 ชั่วโมง



รูปที่ 4.14 แสดงผลผลิตที่ได้จากการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส

S สารมาตรฐาน (X1: xylose X2: xylobiose X3: xylotriose

X4 : xylotretraose X5: xylopentose X6: xylohexose)

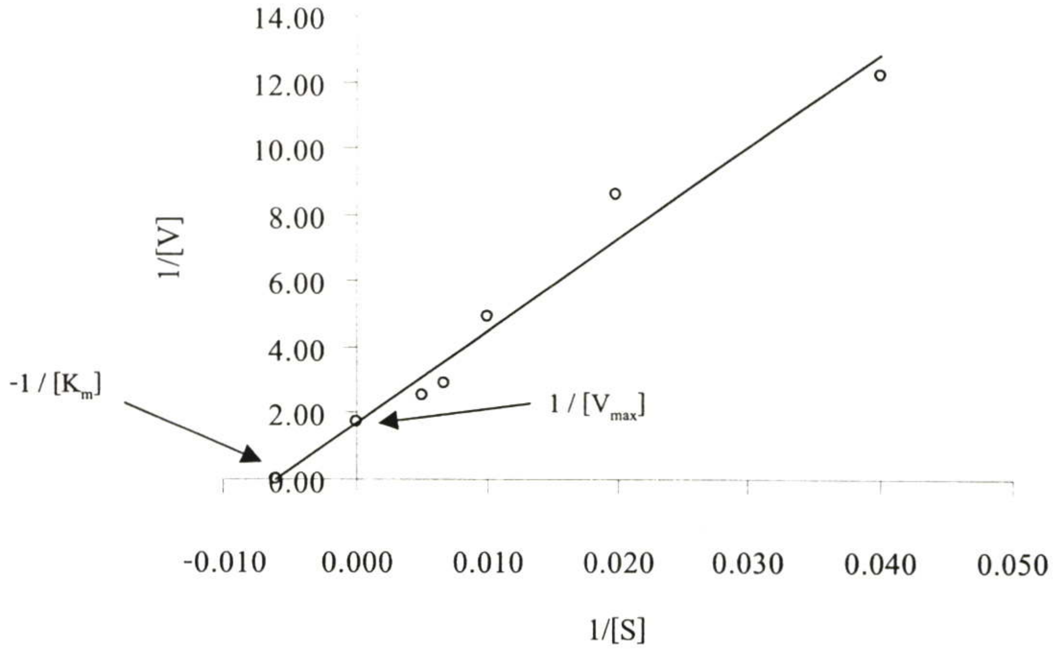
ช่องที่ 1 เวลาเริ่มต้น ช่องที่ 2 เวลา 30 นาที ช่องที่ 3 เวลา 1 ชั่วโมง

ช่องที่ 4 เวลา 2 ชั่วโมง ช่องที่ 5 เวลา 3 ชั่วโมง ช่องที่ 6 เวลา 18 ชั่วโมง

4.6 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซแลนเนส

หลังจากทำการบ่มสารละลายเอนไซม์ไซแลนเนสที่มีกิจกรรม 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรกับฟางข้าวที่ความเข้มข้นต่างๆ พีเอชเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่างๆ จากนั้นนำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่างๆ เพื่อหาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา นำความเร็วเริ่มต้นของกิริยาที่ได้มาเขียนกราฟ Lineweave-Burk ระหว่าง 1/[S] และ 1/[V] เพื่อคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} ดังแสดงในรูปที่ 4.15 พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสมีค่า K_m เท่ากับ 164.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า V_{max} เท่ากับ 591.26ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที

Lin และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Thermomyces lanuginosus* สายพันธุ์ SSBP โดยใช้ไซแลนจากต้นเบิร์ชเป็นสับสเทรต ทำการบ่มที่พีเอชเท่ากับ 6.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าค่า V_{max} เท่ากับ 6300 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัมของโปรตีนและ K_m เท่ากับ 3.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Bataillon และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SPS-0 โดยใช้ไซแลนจากต้นเบิร์ชเป็นสับสเทรต ทำการบ่มที่พีเอชเท่ากับ 6.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าค่า V_{max} เท่ากับ 2420 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที และ K_m เท่ากับ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Salles และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อรา *Acrophialophora nainiana* โดยใช้ไซแลนจากต้นเบิร์ชเป็นสับสเทรต ทำการบ่มที่พีเอชเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าค่า K_m เท่ากับ 16.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Georis และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ S38 โดยใช้ไซแลนจากต้นเบิร์ชเป็นสับสเทรต ทำการบ่มที่พีเอชเท่ากับ 6.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ ได้แก่ Xyl1 มีค่า K_m เท่ากับ 2.22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และV_{max} เท่ากับ 5700 หน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีน



รูปที่ 4.15 แสดงกราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/[V] และ 1/[S]

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

Cellulomonas variformis UM-122 เป็นแบคทีเรียซึ่งคัดแยกได้จากดินโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นด่างในการคัดเลือก และแบคทีเรียนี้สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ในอาหารที่มีความเป็นด่าง เมื่อทำการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสพบว่าฟางข้าวเป็นตัวเหนี่ยวนำในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสที่ดีที่สุด โดยปริมาณฟางข้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรอาหาร ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส คือการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.1ในขณะที่แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1โซเดียมไนเตรตร้อยละ 0.1 และโพแทสเซียมไนเตรตร้อยละ 0.1 ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ก็มีผลต่อการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเช่นกัน เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ทดแทนสารสกัดจากยีสต์ได้ และพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะแก่การผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสคือพีเอช 10 และ 11 อาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสให้กิจกรรมสูงสุดประกอบด้วย ฟางข้าวร้อยละ 1.0 สารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.1 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 ไดโพแทสเซียสไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.1 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตร้อยละ 0.02 และ โซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 1.0 เมื่อทำการเลี้ยงที่พีเอชเท่ากับ 10.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ในการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซแลนเนสพบว่า เอนไซม์ตกตะกอนได้สูงสุดที่ร้อยละความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 60 พีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดคือ พีเอช 7 เมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 10 กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสจะลดลงเหลือร้อยละ 50 ของกิจกรรมสูงสุด และเอนไซม์ไซแลนเนสยังคงมีกิจกรรมจนถึงพีเอช 11.5 ขณะเดียวกันเอนไซม์ไซแลนเนสมีความคงตัวในช่วงพีเอช 7-11 เมื่อบ่มนาน 30 นาที ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสคือ 60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ไซแลนเนสมีความคงตัวที่อุณหภูมิไม่เกิน 55 องศาเซลเซียส

ผลผลิตส่วนใหญ่ที่ได้จากการย่อยไซแลนและฟางข้าวด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสคือไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส เมื่อศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์โดยกราฟ Lineweave-Burk พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสมีค่า K_m เท่ากับ 164.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า V_{max} เท่ากับ 591.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที

บรรณานุกรม

ทรงเกียรติ วิสุทธิพิทักษ์กุล. **การใช้สถิติเพื่อการปรับปรุงกระบวนการ**. กรุงเทพมหานคร. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. 2545

Ander, P. 1994. Concluding remarks. **FEMS Microbiol.** Rev. 13: 387-390.

Aono, R., and Horikoshi, K., 1983. "Chemical Composition of Cell Walls of Alkaliphilic Strains of *Bacillus*." **J. Gen. Microbiol**. 129: 1083-1087.

Bachmann, S.L., and McCarthy, A.J. 1989. "Purification and Characterization of a Thermostable β-Xylosidase from *Thermonospora fusca*." **J. Gen. Microbial**. 135: 293-299.

Bataillon, M., Cardinali, N., Castillon, N., and Duchiron, F. 2000. "Purification and Characterization of a Moderately Thermostable Xylanase from *Bacillus* sp. Strain SPS-O." **Enzyme Microbiol. Technol**. 26: 187-192.

Beg, K.Q., Bhushan, B., Kapoor, M., and Hoondal, S. G. 2000. "Enhanced Production of a Thermostable Xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and Its Application in Biobleaching of Eucalytus Kraft Pulp." **Enzyme Microbiol. Technol**. 27: 459-466.

Baily, M.J., Baily, P., and Poutanen, K. 1992. "Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity." **J. Biotechnol**. 23: 257-270.

Biely, P., Vsanska, M., Tenkanen, M., and Kluepfel, D. 1997. "Endo-Beta-1,4-Xylanase Families: Difference in Catalytic Properties." **J. Biotechnol**. 57: 151-166.

Blanco, A., Vidal, T., Colom, F. J., and Pastor J. 1995. "Purification and Properties of Xylanase A from Alkali-Tolerant *Bacillus* sp. Strain BP-23." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 61: 4468-4470.

Butler, P. J. 1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2.** USA: William and Wilkins.

Cazemier, E.A., Verdoes, C. J., Ooyen, A., and Camp, H. 1999. "Molecular and Biochemical Characterization of Two Xylanase-Encoding Genes from *Cellulomonas pachnodae*." **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 4099-4107.

Chambers, J.A.A., and Rickwood D. 1993. **Buffer Chelating agents and denaturant in Biochemistry LABFAX**. Oxford : BIOS Scientific Publishers Limited .

Chandra, R.K., and Chandra, T.S. 1995. "A Cellulase-Free Xylanase from Alkali-Tolerant *Aspergillus fischeri* ." **Biotechnol. Lett.** 17: 309-314.

Chaplin, M.F., and Bucke, C.1992. **Enzyme Technology**. London :Cambridge University.

Coughlan, M. P., and Hazlewood, G.P. 1993. "β-1,4-D Xylan-Degrading Enzyme Systems: Biochemistry, Molecular Biology and Applications." **Biotech. Appl. Biochem**. 17: 259-289.

Christopoulos, P., Nerinckx, W., Kekos, D., Macris, B., and Chaeysens, M. 1996. "Purification of Two Low Molecular Mass-Alkaline Xylanase from *Fusarium oxysporum* F-3." **J. Biotechnol.** 51: 181-189.

Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D., and Derewenda S.Z. 1994. "Crystal Structure, at 2.6 Angstrom Resolution of the *Streptomyces lividans* Xylanase A, a Member of The F Family of Beta –1,4-D-Glucanase. " **J. Biol. Chem.** 269: 20811-20814.

Dhillon, A., and Khanna, S. 2000. " Production of a Termostable Alkali-Tolerant Xylanase from *Bacillus circulans* AB16 Grown on Wheat Straw. " **World J. Microbiol. Biotechnol.** 27: 235-327.

Ducros , V.,Charnock. J.S., Derewenda, U., Dauter, Z., Dupont, C., Shareck, F., Morosoli, R., Kluepfel, D., and Davies, J.D. 2000. "Substrate Specific in Glycoside Hydrolase Family 10." **J. Biol. Chem.** 275: 23020-23026.

Elegir, G., Szakacs, G., and Jeffries, T.W. 1994. "Purification, Characterization, and Substrate Specificities of Multiple Xylanases from *Streptomyces* sp. Strain B-12-2." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 60:2609-2615.

Filho, E.F.X. 1994. "The Xylan-Degrading Enzyme System." **Brazilian J. Med. Bio. Res.** 27:1093-1109.

Filho, E.F.X. 1998. **Hemicellulose and Biotechnology**. India : Pandalai.

Ganji, R.K., Vithayathil, P.J., and Murthy, S.K. 1989. "Purification and Characterization of Two Xylanases from *Chaetomium thermophile* var. *coprophile*." **Can. J. Microbiol**. 35: 836-842.

Gessesse, A. 1998. "Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases from an Alkaliphilic *Bacillus* sp. " **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 3533-3535.

Gessese, A., and Mamo, G. 1999. "High-Level Xylanase Production by an Alkaliphilic *Bacillus* sp. by Solid-State Fermentation." **Enzyme Microbiol. Technol.** 25: 68-72.

Georis, J., Gianotta, F., De Buyl, E., Granier, B., and Frere, J.M. 2000. "Purification and Properties of Three-β-1,4- Xylanase Produces by *Streptomyces* sp. Strain S38 which Differ in Their Ability to Enhance the Beaching of Kraft Pulps." **Enzyme Microbiol. Technol.**26: 178-186.

Gilbert, H.J., and Hazlewood, G.P. 1993. "Bacterial Cellulases and Xylanases." **J. Gen. Microbiol.** 139: 184-194.

Godfrey, T., and West, S. 1996. **Industrial Enzymology :The Application of Enzymes in Industry**. New York : MacMillan

Harborne, J. B. 1960. **Phytochemical Methods.** London. **Chapman and Hall.**

Henrissat, B., and Bairoch A. 1993. "New Families in The Classification of Glycosyl Hydrolase Based upon Amino Acid Sequence Similarities. " **Biochem. J.** 293: 781-788.

Horokoshi, K.1999. **Alkalophiles.** Tokyo: Kodansha Ltd.

Horokoshi, K., and Akiba, T. 1982. **Alkalophilic Microorganisms. A New Microbial World**. Germany: Springer-Verlag KG. Heidelberg.

Horikoshi, K., and Atsukawa, Y. 1973b. " Xylanase Produced by Alkalophilic *Bacillus* No. C-59-2." **Agric. Biol. Chem.** 37: 2097-2103.

Hurlbert, C.J., and Preston, F. J. 2001. " Functional Characterization of a Novel Xylanase from a Corn Strain of *Erwinia chrysanthemi*." **J. Bacteriol.** 183: 2093-2100.

Jeffries, T.W. 1990. "Biodegradation of Lignin-Carbohydrate Complex." **Biodegradation**. 1:163-176.

Kang , K.M., Maeng, J.P., and Rhee, H.Y. 1996. "Purification and Characterization of Two Xylanases from Alkalophilic *Cephalosporium* sp. Strain RYM-202." **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 3480-3482.

Kim, H.C. 1995. "Characterization and Substrate Specificity of an Endo-β-1,4-D- Glucanase I (Avicelase I) from an Extracellular Multienzyme Complex." **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 959-965.

Kitada, M., and Horikoshi, K. 1992. "Kinetic Properties of Electrogenic Na^+/H^+ Antiproter in Membrane Vesicles from *Bacillus* sp." **J. Bacteriol.** 169: 5761-5765.

Kitada, M., Guffanati, A.A., and Krulwich, T.A.1982. "Enzyme Properties of Purified D-xylose Isomerase from a Thermophilic Alkalophile, *Bacillus* TX-3." **Agric. Biol. Chem.** 53: 1461-1468.

Kosugi, A., Murashima, K., and Doi, R.H. 2001. "Characterization of Xylanolytic Enzymes in *Clostridium cellulovorans*: Expression of Xylanase Activity Dependent on Growth Substrates." **J. Bacteriol.** 183: 7037-7043.

Krall, R.G. 1990. **Alkalophiles.** New York: McGraw-Hill Publishing Co.

Kubata, K.B., Takamizawa, K., Kawai, K., Suzuki, T., and Horitsu, H. 1995. "Xylanase IV, an Exoxylanase of *Aeromonas caviae* ME-1 which Produces Xylotetraose as the Only Low-Molecular-Weight Oligosaccharide from Xylan." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 61: 1666-1668.

Li, K., Azadi, P., Collins, R., Tolan, J., Kim, S.J., and Eriksson, L. K. 2000. " Relationships between Activitie of Xylanases and Xylan Structures." **Enzyme Microbiol. Technol.** 27: 89-94.

Lin, J., Ndlovu, M.L., Singh, S., and Pillay, B. 1999. "Purification and Biochemical Characteristics of β-D-Xylanase from a Thermophilic Fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP." **Biotechnol. Appl. Biochem**.30: 73-79.

Lowry, O.H., Rosebrough, J.N., Farr, L.A., and Randall, J.R. 1951. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

Mandel, K.G., Guffanati, A.A. and Krulwich, T.A. 1980. "Monovalent Cation/Proton Antiporters in Membrane Vesicles from *Bacillus alcalophilus.* " **J. Biol. Chem.** 255: 7391-7396.

Martin, C., Galbe, M., Wahlbom, F.C., Hahn-Hagerdal, B., and Jonsson, J.L. 2002. "Ethanol Production from Enzymatic hydrolysates of Sugarcane Bagasse using Recombinant Xylose-Utilising *Saccharomyces cerevisiae*". **Enzyme Microbiol. Technol**. 31: 274-282.

McPhreson, J.M., Quirke, P., and Taylor, R.G. 1991. **PCR A Practical Approach.** New York: Oxford University Press.

Morales, P., Madarro, A., Perez-Gonzelez, J.A., Sendra J.M., Pinaga, F., and Flors, A. 1993. "Purification and Characterization of Alkaline Xylanases from *Bacillus polymyxa*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 1376-1382.

Morjanoff, P.J., and Gray, P.P., 1987. "Optimization of Steam Explosion as a Method for Increasing Susceptibility of Sugarcane Bagasse to Enzymatic Saccharification. " **Biotechnol. Bioeng.** 29: 733-741.

Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R., and Horikoshi, K. 1993. "Purification and Some Properties of an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M1." **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 2311-2316.

Poutanen, K., and Puls, J. 1988. "Characteristic of *Trichoderma reesei* β-Xylosidase and Its Use in the Hydrolysis of Solubilized Xylans." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 28: 425-432.

Puls, J. 1993. **Bioconversion of Forest and Argricutural Residues.** Willingford: CAP International.

Qureshy, A.F., Khan, L.A., and Khanna, S. 2000. "Expression of *Bacillus circulans* Teri-42 Xylanase Gene in *Bacillus subtilis*." **Enzyme Microbiol. Technol**. 27: 227-233.

Rao, M., Seeta R., and Vasanti, D. 1983. Effect of Pretreatment on the Hydrolysis of Cellulose by *Penicillium funiculosum* Cellulase and Recovery of Enzyme. **Biotechnol. Bioeng.** 25:1863-1871.

Ratanakhanokchai, K., Kyu, L.K., and Tanticharoen, M. 1999. "Purification and Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus sp.* Strain K-1." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 65: 694-697.

Rius, N., and Loren, G. J. 1998. "Buffering Capacity and Membrane H^+ Conductance of Neutrophilic and Alkaloplilic Gram-Positive Bacteria." **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 1344-1349.

Salles, B.C., Cunha, R.B., Fontes, W., Sousa, M.V., and Filho, E.X.F. 2000 "Purification and Characterization of a New Xylanase from *Acrophialophora nainiana*." J. Biotechnol. 81: 199-204. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 1344-1349.

Sa-Pereira, P., Duarte, J., and Ferreira, C. M. 2000. "Electroelution as a Simple and Fast Protein Purification Method: Isolation of an Extracellular Xylanase from *Bacillus* sp. CCMI 966." **Enzyme Microbiol. Technol**. 27: 95-99.

Sa-Pereira, P., Mesquita, A., Duarte, J., Barros, M., and Costa-Ferreira, M. 2002. "Rapid Production of Thermostable Cellulase-Free Xylanase by Strain of *Bacillus subtilis* and Its Properties." **Enzyme Microbiol. Technol.** 30: 924-933.

Shao, W., Deblois, S., and Wiegel, J. 1995. "A High-Molecular-Weight, Cell-Associated Xylanase Isolated from Exponential Growing *Thermoanaerobacterium* sp. Strain JW/SL-YS485." **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 937-940.

Singh, S., Pillay, B., and Prior, B. 2000. "Thermal Stability of β-Xylanases Produced by Different *Thermomyces lanuginosus* Strain ." **Enzyme Microbiol. Technol.** 26: 502-508.

Soha, B.C. 2000. " α-L Arbinofuranosidases Biochemistry, Molecular Biology and Application in Biotechnology. " **Biotechnol. Adv.** 18: 403-423.

Somogyi, M. 1952. "Notes on Sugar Determinations." **J. Biol. Chem.** 195: 19-23.

Stalbrand, H., Mansfield, D. S., Saddler, N. J., Kilburn ,G.D., Antony, R., Warren, J., and Gilkes, R. N. 1998. "Analysis of Molecular Size Distributions of Cellulose Molecules during Hydrolysis of Cellulose by Recombinant *Cellulomonas fimi* β-1,4-Glucanase." **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2374-2379.

Sunna, A., and Antranikian, G. 1997. " Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria." **Crit. Rev. Biotech.** 17: 39-47.

Tan, L.U.L.,Wong, K.K.Y., Yu, E.K.C., and Saddler, J.N. 1985. "Purification and Chracterization of Two D-Xylanases from *Trichoderma harzianum*." **Enzyme Microbiol. Technol**.7: 425-430.

Tenkanen, M., Puls, J., and Poutanen, K. 1992. "Two Major Xylanases of *Trichoderma reesei*." **Enzyme Microbiol. Technol.** 14: 566-574.

Tseng, J.M., Yap, N. M., Ratanakhanokchai, K., Kyu, L. K., and Chen, T. S. 2002. "Purification and Characterization of Two Cellulase Free Xylanases from an Alkaliphilic *Bacillus firmus*." **Enzyme Microbiol. Technol.** 30: 590-595.

Vroemen, S., Heldens, J., Boyd, C., Henrissat, B., and Keen, T. N. 1995. "Cloning and Characterization of the *bgx A* Gene from *Erwinia chrysanthemi* D1. which Encodes a β-Glucosidase/Xyloxidase Enzyme." **Mol.Gen.Genet.** :246: 465-477.

Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., and Linko, M. 1994. " Xylanase in Beaching from an Idea to the Industry." **FEMS Microbiol. Rev.** 13: 335-350.

Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., and Sundquist, L.M. 1986. **Biobleaching with Enzymes**. Stockholm.

Watson, N.E., Prior, B.A., and Lategan, P. 1984. "Factors in Acid Treated Bagasse Inhibiting Ethanol Production from D-Xylose by *Pichia tannophilus*." **Enzyme Microbiol. Technol**. 6: 451-455.

Whistler, R.L., and Richards, E.L. 1970. **The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry**. Vol.2. New York: Academic Press.

Winterhalter, C., and Liebl, W. 1995. "Two Extremely Thermostable Xylanase of the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima* MSB8." **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1810-1815.

Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., and Saddler, J.N.1988. "Multiplicity of β-1,4-Xylanase in Microorganism Functions and Applications." **Microbiol. Rev.** 52: 305-317.

Yang, V., Zhuang, Z., Elegir, G. and Jeffries, T.W. 1995. "Alkaline-Active Xylanse Produced by Alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolated from Kraft Pulp." **J. Ind. Microbiol.** 15: 434-441.

Ujiie, M., Roy, C., and Yaguchi, M. 1991. "Low-Molecular-Weight Xylanase from *Trichoderma viride.* " **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 371-375.

Zhao, J., Li, X., Qu, Y., and Gao, P. 2002. "Xylanase Pretreatment Leads to Enhanced Soda Pulping of Wheat Straw ." **Enzyme Microbiol. Technol.** 30: 734-740.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลว alkaline medium (ดัดแปลงจาก Horikoshi, 1999)

ฟางข้าว	1.0 %
$(NH_4)_2SO_4$	0.1 %
Yeast extract	0.1 %
K_2HPO_4	0.1 %
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02 %

ผสมอาหารในน้ำกลั่นตามสูตร และเตรียม Na_2CO_3 เข้มข้นร้อยละ 10 แยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วใส่ Na_2CO_3 ลงไปในอาหารเลี้ยงร้อยละ 1 ผสมให้เข้ากัน

2. อาหารแข็ง alkaline agar (ดัดแปลงจาก Horikoshi, 1999)

xylan	1.0 %
$(NH_4)_2SO_4$	0.1 %
Yeast extract	0.1 %
K_2HPO_4	0.1 %
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02 %
ผงวุ้น	1.5 %

ผสมอาหารในน้ำกลั่นตามสูตร และเตรียม Na_2CO_3 เข้มข้นร้อยละ 10 แยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วใส่ Na_2CO_3 ลงไปในอาหารเลี้ยงร้อยละ 1 ผสมให้เข้ากัน

3. อาหารเลี้ยง Nutrient broth (Difco)

เนื้อสกัด (beef extract)	0.3 %
เปปโตน	0.5 %

ผสมอาหารในน้ำกลั่นตามสูตร เตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยง Voges-Proskauer broth (Difco)

เปปโตน	0.7%
กลูโคส	0.5 %
NaCl	0.5 %

ผสมอาหารในน้ำกลั่นตามสูตร เตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5. อาหารเลี้ยง Nitrate broth (Difco)

เปปโตน	0.5 %
เนื้อสกัด	0.3 %
KNO_3	0.1 %

ผสมอาหารในน้ำกลั่นตามสูตร เตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi Nelson's (Somogyi, 1952)

1.1 การเตรียมสารละลาย Copper reagent ประกอบด้วย

1.1.1 สารละลาย $CuSO_4$ $5H_2O$ ร้อยละ 10 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

1.1.2 Phosphate-tartrate solution เตรียมโดยละลาย Na_2HPO_4 28 กรัม(หรือ Na_2HPO_4 $12H_2O$ 70.5495 กรัม) ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม sodium potassium tartrate (tetrahydrate) 40 กรัม ทำให้ละลายแล้วเติม 1N NaOH 100 มิลลิลิตร ตามด้วย Na_2SO_4 (Anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองตะกอนทิ้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

1.1.3 ผสมสารละลายในข้อ 1 (100 มิลลิลิตร) และข้อ 2 (900 มิลลิลิตร) เข้าด้วยกัน

1.2 การเตรียมสารละลาย Nelson's Arsenomolybdate color reagent ประกอบด้วย

1.2.1 ละลาย Ammoniummolybdate [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ $4H_2O$] 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.2.2 Disodium arsenate (Na_2HAsO_4 7 H_2O) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

1.2.3 ผสมสารละลายในข้อ 1 และข้อ 2 เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้อง และควรเก็บไว้ในขวดสีชา

วิธีการ

1. เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้ว เติม 1 มิลลิลิตร Copper reagent แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้ลูกแก้ววางบนปากหลอดแก้วเพื่อลดการระเหยของน้ำ
2. ทำให้เย็นลงทันที เติม Arsenomolybdate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จะเห็นเป็นสีเขียวหรือสีน้ำเงินขึ้นกับปริมาณน้ำตาล
3. เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส (ดัดแปลงจาก Baily และคณะ, 1992)

สารเคมี

1. สารละลายไซแลนจากโอ๊ต (oat spelt xylan) เข้มข้นร้อยละ 1.0 เตรียมโดยการละลายไซแลนจากโอ๊ต 1.0 กรัม ด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (sodium phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอชเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi Nelson's Method

วิธีการ

1. ใส่สารละลายเอนไซม์ไซแลนเนส (ที่เจือจางอย่างเหมาะสม) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง
2. นำสารละลายไซแลนจากโอ๊ตเข้มข้นร้อยละ 1.0 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาเติมในหลอดที่มีสารละลายดังกล่าว ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
3. หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที
4. หลอดควบคุม (control) ให้นำสารละลายเอนไซม์มาหยุดปฏิกิริยา โดยนำไปต้มในน้ำเดือดก่อนเติมสารละลายไซแลน
5. แบลงก์ (blank) ให้ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์
6. หลังจากหยุดปฏิกิริยาให้นำส่วนของน้ำใสไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi Nelson's Method
7. นำมาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ตามสูตร

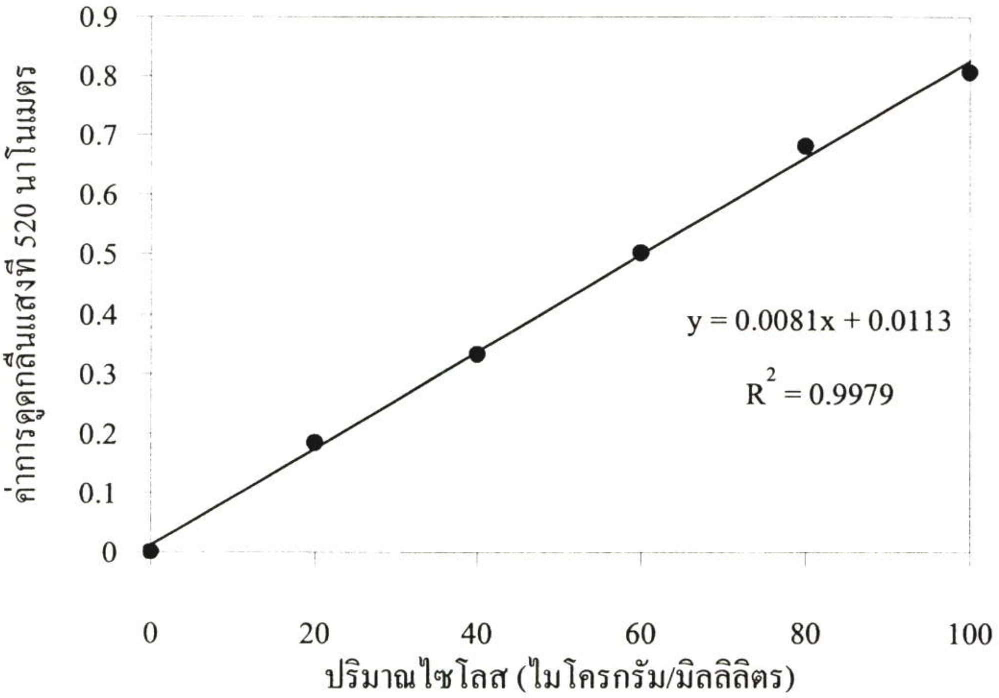
$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{ปริมาณเอนไซม์ในปฏิกิริยา} \times \text{เท่าของความเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลาในการเกิดปฏิกิริยา})}$$

$$= \text{หน่วยต่อมิลลิลิตร}$$

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเทรต และให้ไซโลส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายไซโลส

เตรียมสารละลายมาตรฐานสารละลายไซโลสที่ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Somogyi' s Nelson ข้างต้น นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และความเข้มข้นของสารละลายไซโลสมาสร้างกราฟมาตรฐานดังรูปภาคผนวก ข1



รูปภาคผนวก ข1 แสดงกราฟมาตรฐานของไซโลส

3. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของลาวรี่ (Lowry's method) (Lowry และคณะ 1951)

สารละลาย

สารละลาย ก : 1% (w/v) $CuSO_4 \bullet 5H_2O$

สารละลาย ข : 2% (w/v) Sodium potassium tartrate

สารละลาย ค : 0.2 M NaOH

สารละลาย ง : 4% (w/v) Na_2CO_3

เตรียมสารละลาย จ โดยผสมสารละลาย ค 49 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย ก 1 มิลลิลิตร จากนั้นใส่สารละลาย ข 1 มิลลิลิตร เรียกว่าสารละลาย จ ซึ่งต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง

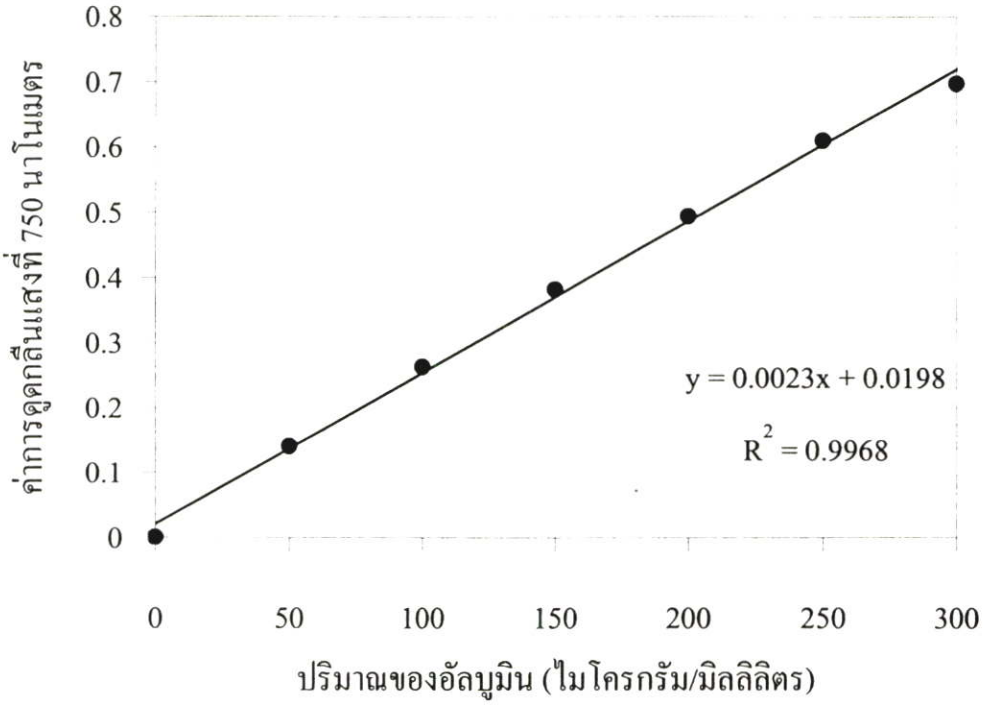
สารละลาย ฉ : Folin-Ciocalteau reagent 1 N เตรียมโดยเจือจาง Folin-Ciocalteau reagent ในอัตราส่วน 1 : 1 ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการ

1. ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน (โดยมีค่าโปรตีนไม่เกิน 0.5 มิลลิลิตร) 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย จ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 10นาที
2. ใส่สารละลาย ฉ 0.5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดในข้อ 1
3. เขย่าให้เท่ากันแล้วตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แบลงค์ทำตามขั้นตอนที่ 1-3 โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง
5. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้ bovine serum albumin ความเข้มข้นระหว่าง 50 – 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายอัลบูมิน

เตรียมสารละลายมาตรฐานอัลบูมินที่ความเข้มข้น 0 50 100 150 200 250 และ300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการวิเคราะห์ตามวิธีของลาวรี่ ข้างต้น นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ และความเข้มข้นของสารละลายอัลบูมิน มาสร้างกราฟมาตรฐานดังรูปภาคผนวก ข2



รูปภาคผนวก ข2 แสดงกราฟมาตรฐานของอัลบูมิน

4. การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (Genomic DNA)

(ดัดแปลงจาก McPherson และคณะ, 1991)

1. เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยง alkaline agar โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เตรียมสารละลายไลโซไซม์ (lysozyme) เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรใน TE บัฟเฟอร์ ใส่ไลโซไซม์หลอดละ 400 ไมโครลิตร
3. ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อเขี่ยโคโลนีที่ขึ้นเดี่ยวๆ ในอาหารแข็ง ใส่ลงไปในสารละลายไลโซไซม์
4. นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เขย่าเบาๆ เติมโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาณ 64.82 ไมโครลิตรเขย่าเบาๆ
5. เติมโปรตีเอส เค (protease K) 21.7 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง
6. ทำการสกัดด้วยฟีนอลโดยใส่สารละลายฟีนอล 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
7. ดูดเอาดีเอ็นเอ (ส่วนใสชั้นบน)ใส่หลอดใหม่ แล้วทำการสกัดด้วยฟีนอลอีกครั้งหนึ่ง
8. เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม (chlorofrom) : ไอโซเอมิล (isoamyl alcohol) เท่ากับ 24 : 1 ปริมาณ 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
9. ดูดเอาสารละลายใสออกมาใส่หลอดใหม่แล้ววัดปริมาตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาณ 5 ไมโครลิตร/ สารละลายใส 100 ไมโครลิตร
10. เติมสารละลาย absolutes ethanol (-20 องศาเซลเซียส) เขย่าเบาๆ จะสังเกตเห็นเส้นดีเอ็นเอ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน
11. หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที
12. เติมสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
13. เติมสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 90 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
14. ดูดเอาส่วนใสทิ้งนำไปทำแห้งใน heat block ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 10-15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

5. การทำ Electrophoresis (ดัดแปลงจาก McPherson และคณะ, 1991)

สารเคมี

1. ทรีสบัฟเฟอร์ (pH 8.0)
2. อากาโรส (agarose gel)
3. Gel star
4. Loading DNA
5. Standard marker: λ DNA ที่ตัดด้วย *Eco*RI และ *Hind*III

วิธีการทดลอง

1. เตรียม อากาโรสเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยชั่ง อากาโรส 0.8 กรัม ใส่ลงในทรีสบัฟเฟอร์ (tris-buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ นำไปหลอมจนกระทั่งอากาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50°C - 60°C
2. เทอากาโรสลงในถาด เมื่อเจลใกล้แข็งตัวใช้หวี (comb) สับให้เกิดช่อง (well) สำหรับใส่ตัวอย่าง เมื่อเจลแข็งจึงดึงหวีออก นำเจลไปใส่ในภาชนะทำหรับทำ electrophoresis เติมสารละลายของทรีส-บัฟเฟอร์ (tris-buffer) 50 มิลลิโมลาร์ ให้ท่วมเจล
3. นำดีเอ็นเอซึ่งเตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ มาอย่างละ 5 ไมโครลิตร ใส่สารละลาย gel star 5 ไมโครลิตรและใส่สารละลาย loading DNA 5 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันใส่ลงไปในแต่ละช่อง โดยช่องแรกจะทำการใส่ marker (Lambda DNA/ *Eco*RI + *Hind*III marker) 5 ไมโครลิตรและสารละลาย gel star 5 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน
4. ต่อวงจรไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง โดยให้ด้านที่มีช่องอยู่ทางด้านขั้วลบ ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ ทำในที่มืดจนกว่าแถบที่เคลื่อนที่ไปถึงปลายแผ่นเจล (ประมาณ 90 นาที)
5. แล้วเอาแผ่นเจลอากาโรสออกมาตรวจดูแถบดีเอ็นเอ โดยดูการเรืองแสงภายใต้รังสี UV บันทึกผลโดยการถ่ายรูป

6. การเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Polymerase chain reaction , PCR) (ดัดแปลงจาก McPherson และคณะ, 1991)

สารเคมี

1. น้ำปราศจากไอออน
2. 10 x Takara Ex Taq buffer
3. DNA template
4. dNTPs ที่ประกอบด้วย dATP, dGTP, dCTP, dTTP
5. Takara Ex *Taq* polymerase

ไพร์เมอร์ (Primer)

Primer BF_1 :	ลำดับเบส	5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3'
Primer BR_1 :	ลำดับเบส	5'-CGC TTA CCT TGT TAGC GAC TT-3'

วิธีการทดลอง

1. นำดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการสกัดมาทำปฏิกิริยาโดยเติมสารดังนี้

สารละลายเจือจาง 10 เท่าของ ExTakara buffer	5	ไมโครลิตร
dNTP เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์	4	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ BF_1 ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์	1	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ BR_1 ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์	1	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	28.75	ไมโครลิตร
เอนไซม์ Takara Ex *Taq* polymerase	0.25	ไมโครลิตร

2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที
3. นำไปใส่ในเครื่องสำหรับทำ PCR ตั้งค่าของเครื่องสำหรับจีโนมิคดีเอ็นเอที่ 2.1 KDp โดยตั้งโปรแกรมไว้ดังนี้ ตั้งไว้ 30 cycles

Denaturation step	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
Annealing step	55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
Elongation step	68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

4. เสร็จแล้วทำ final elongation ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
5. เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ นำดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่ง DNA ที่ได้ควรมีขนาดประมาณ 1500 bp.

7. การวิเคราะห์ผลิตผลสุดท้ายโดยวิธี Thin layer chromatography (ดัดแปลงจาก Harborne, 1960)

สารเคมี

1. สารละลายที่เป็นตัวพา

   บิวทานอล : กรดแอซิติกเข้มข้น : น้ำกลั่น = 3:3:2 โดยปริมาตร

2. สารละลายที่ทำให้เกิดสี

   2.1 สารละลาย 1,3 - ไดไฮดรอกซีแนฟทาลีน (1,3 – dihydroxynaphalene หรือ naphtharesolcinol) ร้อยละ 2 ในสารละลายเอทานอล

   2.2 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

นำสารละลายในข้อ 2.1 ผสมกับสารละลายในข้อ 2.2 ในอัตราส่วน 25 : 1 โดยปริมาตร สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายที่เป็นตัวพาใส่ในภาชนะที่จะทำโครมาโทกราฟี โดยให้สูงกว่าก้นภาชนะ 1 เซนติเมตร ปิดฝาภาชนะให้แน่น เพื่อให้สารละลายอิ่มตัวในภาชนะ 2 ชั่วโมง
2. นำแผ่นซิลิกาเจล (Glass sheet siliga gel) ขนาดกว้าง 10 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร ใช้ดินสอลากเส้นเบาๆให้ห่างจากขอบ 1.5 เซนติเมตร จุดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 3 ไมโครลิตรบนเส้นดินสอที่ลากไว้ ให้ระยะระหว่างสารแต่ละชนิดประมาณ 0.5 เซนติเมตร
3. นำแผ่นซิลิกาเจลที่จุดสารตัวอย่างแล้วมาใส่ในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยสารละลายที่เป็นตัวพา จนสารละลายเคลื่อนที่ไปถึงระยะทางที่ต้องการ
4. นำแผ่นซิลิกาเจลออกจากภาชนะ นำไปทำให้แห้งภายในตู้ควัน
5. พ่น สารละลายที่ทำให้เกิดสี ลงบนแผ่นซิลิการเจล
6. นำไปไว้ที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้สีชัดเจนขึ้น

8. ปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

ตารางภาคผนวก ค1 แสดงปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว)ที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน (ที่มา : Chambers, 1993)

ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์อิ่มตัวที่ 0 องศาเซลเซียส)	ความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในสารละลาย 100 มิลลิลิตร)																	
	10	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	5.6	11.4	14.4	17.6	20.9	24.3	27.7	31.3	35.1	39.0	43.0	47.2	51.6	54.1	56.7	61.1	65.9	70.7
10		5.7	8.6	11.8	15.0	18.3	21.6	25.1	28.8	32.6	36.5	40.6	44.9	45.4	50.3	54.4	58.9	63.6
20			2.9	5.9	9.1	12.3	15.5	18.9	22.5	26.2	30.0	34.0	38.2	42.4	43.3	47.3	51.9	56.5
25				3.0	6.1	9.3	12.5	15.8	.19.3	23.0	26.7	30.7	34.8	36.9	39.0	42.9	45.9	48.9
30					3.0	6.2	9.4	12.7	16.2	19.8	23.5	27.3	31.4	34.5	36.7	40.8	45.1	49.5
35						3.1	6.3	9.4	12.9	16.4	20.0	23.8	27.8	29.8	31.9	35.8	38.8	41.8
40							3.1	6.4	9.7	13.2	16.8	20.5	24.5	27.5	30.0	34.0	38.1	42.4
45								3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	21.0	23.1	25.0	29.2	32.3	35.2
50									3.3	6.6	10.1	13.7	17.6	20.4	23.3	27.2	31.2	35.3
55										3.3	6.7	10.3	13.7	17.1	20.5	23.9	27.3	30.7
60											3.4	6.9	10.5	13.5	16.6	20.4	24.2	28.3
65												3.2	6.6	10.3	13.7	17.1	20.5	23.9
70													3.2	6.6	10.0	13.6	17.3	21.2
75														3.2	6.7	10.2	13.9	17.6
80															3.3	6.8	10.4	14.1
85																3.4	6.9	10.6
90																	3.4	7.1
95																		3.5
100																		0

9. การเตรียมบัฟเฟอร์

9.1 การเตรียมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 4-5)

COONa ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Acitic acid ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เติมสารละลาย Acitic acid ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ลงไปในสารละลาย NaCOO ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จนได้พีเอชที่ต้องการ

9.2 การเตรียมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 6-8)

NaH_2PO_4 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

$NaHPO_4$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เติมสารละลาย NaH_2PO_4 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ลงไปในสารละลาย $NaHPO_4$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จนได้พีเอชที่ต้องการ

9.3 การเตรียมโซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 9-10)

$NaHCO_3$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Na_2CO_3 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เติมสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ลงไปในสารละลาย $NaHCO_3$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จนได้พีเอชที่ต้องการ

9.4 การเตรียมไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 11-13)

Glycine ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

NaOH ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ลงไปในสารละลาย Glycine ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จนได้พีเอชที่ต้องการ

ภาคผนวก ค

ข้อมูล

ตารางภาคผนวก ค1 แหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

แหล่งคาร์บอน	กิจกรรม (หน่วยต่อมิลลิลิตร)						
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน
ไซแลน	0	0.05	0.25	0.52	0.66	0.85	0.85
ฟางข้าว	0	0.15	0.42	0.88	1.14	1.22	1.20
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส	0	0.05	0.08	0.1	0.12	0.13	0.13

ตารางภาคผนวก ค2 ผลของปริมาณฟางข้าวต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

ปริมาณฟางข้าว (ร้อยละ)	กิจกรรม (หน่วยต่อมิลลิลิตร)						
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน
0.1	0.00	0.11	0.28	0.45	0.46	0.46	0.47
0.25	0.00	0.20	0.32	0.65	0.72	0.73	0.74
0.5	0.00	0.25	0.36	0.67	0.76	0.84	0.92
1.0	0.00	0.27	0.59	0.74	0.88	1.02	1.26
1.5	0.00	0.00	0.12	0.37	0.43	0.45	0.45
2.0	0.00	0.00	0.11	0.33	0.40	0.43	0.44

ตารางภาคผนวก ค3 **ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส**

แหล่งไนโตรเจน (ร้อยละ 0.1)	กิจกรรม (หน่วยต่อมิลลิลิตร)						
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน
ไม่มี	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.05	0.03
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.00	0.23	0.34	0.77	0.86	0.91	0.97
โซเดียมไนเตรต	0.00	0.18	0.34	0.67	0.75	0.82	0.88
โพแทสเซียมไนเตรต	0.00	0.22	0.36	0.68	0.77	0.85	0.90
สารสกัดจากยีตส์	0.00	0.17	0.36	0.83	0.88	0.96	1.13
เปปโตน	0.00	0.12	0.23	0.68	0.72	0.87	0.91

ตารางภาคผนวก ค4 ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

แหล่งไนโตรเจน (ร้อยละ 0.1+ ร้อยละ 0.1)	กิจกรรม (หน่วยต่อมิลลิลิตร)						
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน
แอมโมเนียมซัลเฟต+ สารสกัดจากยีสต์	0.00	0.26	0.43	0.89	1.04	1.13	1.15
โซเดียมไนเตรต+ สารสกัดจากยีสต์	0.00	0.16	0.40	0.76	0.88	0.97	1.00
โพแทสเซียมไนเตรต+ สารสกัดจากยีสต์	0.00	0.17	0.36	0.80	0.88	0.95	1.00
แอมโมเนียมซัลเฟต+ เปปโตน	0.00	0.23	0.34	0.70	0.84	0.92	0.95
โซเดียมไนเตรต+ เปปโตน	0.00	0.12	0.36	0.73	0.85	0.90	0.94
โพแทสเซียมไนเตรต+ เปปโตน	0.00	0.18	0.34	0.70	0.84	0.92	0.95

ตารางภาคผนวก ค5 ผลของพีเอชเริ่มต้นในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

พีเอชเริ่มต้น	กิจกรรม (หน่วยต่อมิลลิลิตร)						
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน
พีเอช 7.0	0.00	0.05	0.05	0.07	0.07	0.08	0.08
พีเอช 8.0	0.00	0.10	0.22	0.35	0.39	0.47	0.50
พีเอช 9.0	0.00	0.10	0.25	0.39	0.43	0.48	0.52
พีเอช 10.0	0.00	0.33	0.56	0.80	1.02	1.20	1.39
พีเอช 11.0	0.00	0.21	0.46	0.78	0.93	1.11	1.34
พีเอช 12.0	0.00	0.00	0.01	0.10	0.10	0.10	0.20

ตารางภาคผนวก ค6 แสดงค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปขณะทำการเลี้ยง

พีเอชเริ่มต้น	วัน							
	0	1	2	3	4	5	6	7
พีเอช 7.0	7.0	7.11	7.04	7.03	7.07	7.10	7.10	7.05
พีเอช 8.0	8.0	7.55	7.78	7.88	8.00	8.23	8.20	8.40
พีเอช 9.0	9.0	8.25	8.56	8.74	8.81	8.76	8.69	8.50
พีเอช 10.0	10.0	9.15	9.21	9.11	9.10	9.12	9.17	9.10
พีเอช 11.0	11.0	9.55	9.18	9.20	9.23	9.14	9.19	9.10
พีเอช 12.0	12.0	12.16	12.19	11.86	11.74	11.00	11.29	11.00

ตารางภาคผนวก ค7 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

พีเอช	กิจกรรม (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละกิจกรรมสัมพัทธ์
3.0	0	0
4.0	2.35	31.06
5.0	3.38	44.72
6.0	5.17	68.33
7.0	7.57	100.00
8.0	7.38	97.52
9.0	6.40	84.48
10.0	5.41	71.43
11.0	0.94	12.42
12.0	0.47	6.21
13.0	0	0

ตารางภาคผนวก ค8 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซแลนเนส

พีเอช	กิจกรรม (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละ กิจกรรมที่เหลือ
3.0	0	0
4.0	1.44	34.67
5.0	3.10	44.00
6.0	4.42	62.67
7.0	7.06	100.00
8.0	7.06	100.00
9.0	7.06	100.00
10.0	7.06	100.00
11.0	7.06	100.00
11.5	5.27	74.66
12.0	4.42	62.67
12.5	0	0
13.0	0	0

ตารางภาคผนวก ค9 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส

อุณหภูมิ	กิจกรรม (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละกิจกรรมสัมพัทธ์
0	0	0
10	0	0
20	0	0
30	7.53	72.73
35	8.94	86.36
40	9.65	93.18
50	10.16	98.18
60	10.35	100.00
65	8.94	86.36
70	2.35	22.73
80	1.04	10.00

ตารางภาคผนวก ค10 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ไซแลนเนส

อุณหภูมิ	กิจกรรม (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละกิจกรรมที่เหลือ
0	8.89	99.48
10	8.89	99.48
20	8.89	99.48
30	8.94	100.00
35	8.94	100.00
40	8.85	98.95
50	8.80	98.42
55	8.71	97.37
60	2.07	23.16
65	1.176	13.16
70	0	0
80	0	0

ตารางภาคผนวก ค11 ผลการย่อยฟางข้าวปริมาณต่างๆ ด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส

ฟางข้าว (มิลลิกรัม)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)				
	30 นาที	1 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง
25	0.07	0.14	0.21	0.32	0.34
50	0.09	0.22	0.33	0.44	0.47
100	0.17	0.42	0.63	0.78	1.30
150	0.14	0.54	0.92	1.16	2.18
200	0.24	0.62	1.11	1.39	2.38

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจุฑามาศ มณีวงศ์ เกิดเมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2518 ที่จังหวัดแพร่ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2542 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2543 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2546 ในระหว่างศึกษาอยู่ในระดับปริญญาโทมีผลงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่ดังนี้

ปี 2545 ได้รับคัดเลือกให้เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ เรื่อง " Production of xylanase by *Bacillus* sp. R-45. " ในงาน Biotechnology for Better Living in The New Economic เมื่อวันที่ 12-15 พฤศจิกายน 2545 ที่จังหวัดขอนแก่น

ปี 2546 ได้รับคัดเลือกให้เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์เรื่อง " Xylanase from Alkaliphilic *Cellulomonas variformis* UM-122 Grown on Rice Straw." ในงาน Enzymes in The Environment เมื่อวันที่ 14-17 กรกฎาคม 2546 ที่เมืองปาร์ก สาธารณรัฐเชค