



วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเหนี่ยวนำเอนไซม์ไซลันเนสจากเชื้อ *Bacillus pumilus* DMKUB39 และ *Microbispora siamensis* DMKUA 245<sup>T</sup> และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซลันจากเชื้อผสมระหว่าง *Bacillus pumilus* DMKUB39 และ *Bacillus amyloliquefaciens* DMKUB24 โดยใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบ

Induction of Xylanase in *Bacillus pumilus* DMKUB39 and *Microbispora siamensis* DMKUA 245<sup>T</sup> and Production of Xylan-Degrading Enzymes by *Bacillus pumilus* DMKUB39 and *Bacillus amyloliquefaciens* DMKUB24 using Rice Straw as Raw Material

โดย

นางสาวชนาพร ตระกูลแจ๊ะ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2557

ชนาพร ตระกูลแจะ 2557: การเหนี่ยวนำเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Bacillus pumilus* DMKUB39 และ *Microbispora siamensis* DMKUA 245<sup>T</sup> และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจากเชื้อผสมระหว่าง *Bacillus pumilus* DMKUB39 และ *Bacillus amyloliquefaciens* DMKUB24 โดยใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วีเชษฐ์ กิจปรีชาวนิช, D.Eng. 132 หน้า

จากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสร้างสปอร์จำนวน 180 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไซแลน พบว่า *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสได้สูงสุด 10.7 และ 7.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวซึ่งมีฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่าเป็นองค์ประกอบ ตามลำดับ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ที่แยกได้และเชื้อ *M.siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีการรายงานการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสมาก่อนหน้านี้ พบว่า ไซแลนสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้สูงสุด 17.7 และ 9.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเติมกลูโคสลงในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 เป็นเวลา 3 วัน พบว่าการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสเพิ่มขึ้น 1.1 เท่า ส่วนการเติมแมนนิทอลในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ *M.siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> เป็นเวลา 3 วัน พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสเพิ่มขึ้นถึง 1.8 เท่า ในขณะที่การเติมไซโลสิมีผลให้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 และ *M.siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> ลดลง 1.3 และ 1.1 เท่า ตามลำดับ เมื่อศึกษาปัจจัยและค่าที่เหมาะสมต่อผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 โดยใช้การออกแบบการทดลอง Plackett-Burman central composite design และ response surface methodology (RSM) พบว่าค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสคือ ฟางข้าว 18.7 กรัมต่อลิตร, peptone 2.0 กรัมต่อลิตร, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.3 โดยผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 21.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสคือ ฟางข้าว 20.1 กรัมต่อลิตร, peptone 2.0 กรัมต่อลิตร, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.28 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.03 โดยผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสสูงสุดเท่ากับ 31.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อขยายการผลิตเอนไซม์ในถังหมักแบบกวนขนาด 1 ลิตรโดยใช้สูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิด พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 49.3 และ 46.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสคือ 50 และ 55 องศาเซลเซียส และพีเอชเท่ากับ 5.5 และ 5.0 ตามลำดับ เอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสมีความคงทนพีเอชระหว่าง 5.0-11.0 และ 4.5-11.0 ตามลำดับ และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซลานสยังคงเหลือเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

---

ลายมือชื่อนิสิต

---

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Chanaporn Trakunjae 2014: Induction of Xylanase in *Bacillus pumilus* DMKUB39 and *Microbispora siamensis* DMKUA 245<sup>T</sup> and Production of Xylan-Degrading Enzymes by *Bacillus pumilus* DMKUB39 and *Bacillus amyloliquefaciens* DMKUB24 using Rice Straw as Raw Material. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Associate Professor Vichien Kitpreechavanich, Dr.Eng. 132 pages.

From 180 Gram's positive spore forming bacteria, *B. pumilus* DMKUB39 and *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 were selected as its highest producers of  $\beta$ -xylanase (10.7 U/ml) and  $\beta$ -xylosidase (7.9 U/ml), respectively in the liquid medium containing alkaline treated rice straw. The effect of different carbon source on the  $\beta$ -xylanase induction was investigated by the selected isolate of *B. pumilus* DMKUB39 and *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> which a novel specie of produced  $\beta$ -xylanase. Xylan was found to be the best inducer on the  $\beta$ -xylanase production yielded 17.7 and 9.4 U/ml, respectively. The addition of glucose to the xylan medium affected the increase of  $\beta$ -xylanase production with 1.1 fold increased by *B. pumilus* DMKUB39. While the addition of manitol to the xylan medium affected an increase of  $\beta$ -xylanase production with 1.8 fold increased by *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup>. In contrast, the addition of xylose to the xylan medium resulted in a decrease of  $\beta$ -xylanase production with 1.3 and 1.1 fold by *B. pumilus* DMKUB39 and *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup>, respectively. To optimize the production of  $\beta$ -xylosidase and  $\beta$ -xylanase, the mixed culture strains of *B. pumilus* DMKUB39 and *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 were investigated using Plackett–Burman (PB) experimental design, central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM). The optimized medium for  $\beta$ -xylanase production consisted of (g/l): NaOH-pretreated rice straw, 18.7; peptone, 2.0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.3 and initial pH 8.3 could enhance  $\beta$ -xylanase production to 21.1 U/ml. The optimized medium for  $\beta$ -xylosidase production consisted of (g/l): NaOH-pretreated rice straw, 20.1; peptone, 2.0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.28 and initial pH 8.03 could enhance  $\beta$ -xylosidase production to 31.2 U/ml. The maximal  $\beta$ -xylanase and  $\beta$ -xylosidase production of 49.3 and 46.1 U/ml in a 1L stirrer fermentor were obtained from the optimized medium of each enzyme production. The optimum temperature of  $\beta$ -xylanase and  $\beta$ -xylosidase were 50 and 55°C, respectively. The optimum pH of  $\beta$ -xylanase and  $\beta$ -xylosidase were 5.0 and 5.5, respectively. The  $\beta$ -xylanase and  $\beta$ -xylosidase were stable at temperature of 65 and 60°C and pH of 5.0-11.0 and 4.5-11.0, respectively. However, the  $\beta$ -xylanase and  $\beta$ -xylosidase activity remained when kept at 75 °C and 70 °C for 1 h.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช อาจารย์ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก และดร. สุขุมารณ์ สุขขุม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษา  
ชี้แนะแนวทางทั้งทางด้านวิชาการและปฏิบัติการ ตลอดจนช่วยเหลือสนับสนุนทางด้านต่างๆ ทำให้  
วิทยานิพนธ์เรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สาทิตรี ลิ่มทอง  
ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ  
ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกที่กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ Associate Professor Shinji Tokuyama ที่ให้คำปรึกษาในระหว่างทำการศึกษา  
วิจัยภายใต้โครงการ Japan-East Asia Network of Exchange or students and Youth (JENESYS)  
Programme ณ มหาวิทยาลัย Shizuoka ประเทศญี่ปุ่น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนวิจัยเพื่อการตีพิมพ์  
ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่  
ให้ความช่วยเหลือและแนะนำในการศึกษา รวมทั้งให้การช่วยเหลือมาโดยตลอดการทำวิจัยรวมทั้ง  
เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้ออุปกรณ์  
ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณครอบครัว ที่ให้โอกาสพร้อมทั้งกำลังใจในการศึกษาของข้าพเจ้ามาโดยตลอด  
ขอบคุณรุ่นพี่ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำวิจัย และให้การสนับสนุน  
ข้าพเจ้าเสมอมา ดังนั้นคุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จึงขอมอบแด่ บิดา มารดา ครู  
อาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ชนาพร ตระกูลแจะ

เมษายน 2557

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	28
อุปกรณ์	28
วิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	42
สรุปและข้อเสนอแนะ	87
สรุป	87
ข้อเสนอแนะ	89
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	90
ภาคผนวก	102
ภาคผนวก ก ข้อมูลการทดลอง	103
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อ	122
ภาคผนวก ค สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี	125
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	132

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง) ของฟางข้าว	7
2	แผนมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือก N-1 ปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง	20
3	ค่าของ code level ใน central composite design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย	22
4	องค์ประกอบของฟางข้าวที่ไม่ปรับสภาพและฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง	29
5	การกำหนดระดับต่ำ (-) และระดับสูง (+) ของชนิดสารอาหารและปัจจัยที่ศึกษาเพื่อใช้กำหนดแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman	36
6	แบบการทดลองในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลาลเนสโดยใช้แผนการทดลอง Plackett-Burman	37
7	ความสามารถในการย่อยสลายไซแลนบนอาหารแข็งของแบคทีเรีย 20 สายพันธุ์	42
8	ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ DMKUB24 และ DMKUB39	47
9	กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลาลเนสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย <i>B. pumilus</i> DMKUB39 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในสภาพเขย่า	49
10	กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลาลเนสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย <i>M. siamensis</i> DMKUA245 <sup>T</sup> เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในสภาพเขย่า	50
11	กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลาลเนสและเบต้าไซลาลเนสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24 และปริมาณเซลล์ในแต่ละการทดลองที่ออกแบบโดยวิธี Plackett-Burman	58

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	ผลวิเคราะห์ทางสถิติจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman โดยการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ 9 ปัจจัย ต่อผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อผสมระหว่าง <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	59
13	ผลวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี Plackett-Burman ออกแบบการทดลองต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสมของ <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	60
14	ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสมระหว่าง <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	61
15	การกำหนดระดับของแต่ละปัจจัยที่ศึกษาโดยวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD)	62
16	ผลของการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24 ในแต่ละการทดลอง โดยใช้การออกแบบการทดลอง central composite design	63
17	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ	65
18	ค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส	66
19	ค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส	68
20	ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กับค่าทำนายกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสในแต่ละการทดลอง	72

## สารบัญตาราง (ต่อ)

### ตารางที่

21	การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสมระหว่าง <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	82
----	--	----

### ตารางผนวกที่

ก1	กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ <i>B. pumilus</i> DMKUB39 ในแต่ละการทดลองที่ออกแบบโดยวิธี Plackett-Burman	106
ก2	ผลวิเคราะห์ทางสถิติจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman โดยการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ 9 ปัจจัยต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ <i>B. pumilus</i> DMKUB39	107
ก3	ผลของการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลานเนส ของเชื้อ <i>B. pumilus</i> DMKUB39 ในแต่ละการทดลอง โดยใช้วิธี Central composite design ออกแบบการทดลอง	109
ก4	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ	110
ก5	ค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส	111
ก6	ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กับค่าทำนายกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสในแต่ละการทดลอง	114
ก7	รหัสของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกสร้างสปอร์ จำนวน 180 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง	120

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างไซเลนในไม้เนื้ออ่อน (A) ไม้เนื้อแข็ง (B) พืชตระกูลหญ้า (C)	8
2	ตำแหน่งที่เอนไซม์เข้าย่อยพันธะในโครงสร้างไซเลนเอนไซม์ที่ย่อยโครงสร้างหลักของไซเลนแบบสุ่มและเอนไซม์ที่ย่อยโซ่ด้านข้างของไซเลน (A) เอนไซม์ที่ย่อยที่ตำแหน่งปลายโมเลกุลของโครงสร้างหลักไซเลน (B)	10
3	แสดงสิ่งทดลอง (design points) สำหรับสมการกำลังสอง	21
4	ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อแบคทีเรีย 20 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวที่มีฟางข้าวเป็นองค์ประกอบ	44
5	ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อเดี่ยวสายพันธุ์ DMKUB24 สายพันธุ์ DMKUB39 และเชื้อผสมระหว่างสองสายพันธุ์ ในอาหารเหลวซึ่งมีฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่าเป็นองค์ประกอบ	44
6	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ DMKUB24 และ DMKUB39 ที่เลี้ยงบนอาหาร NA medium	45
7	ความสัมพัทธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ DMKUB24 และ DMKUB39	46
8	SDS-PAGE และ active-PAGE ของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ <i>B. pumilus</i> DMKUB39 (A) และ <i>M. siamensis</i> DMKUA245 <sup>T</sup> (B) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ	53
9	ผลการเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ลงในอาหารไซเลนต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อ <i>B. pumilus</i> DMKUB39 (A) และ <i>M. siamensis</i> DMKUA245 <sup>T</sup> (B) ภายหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารไซเลนเป็นเวลา 3 วัน	55
10	แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส (A) และเบต้าไซโลซิเดส (B) ระหว่างเชื้อผสม <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	57

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	Normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อนต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อผสม <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	69
12	Normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อนต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสม <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	70
13	Scatter plot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนายต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อผสม <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	71
14	Scatter plot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนายต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	71
15	ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสที่ได้จากการทดลองและค่าทำนายของเชื้อผสม <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	74
16	ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสที่ได้จากการทดลองและค่าทำนายของเชื้อผสม <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	74
17	กราฟพื้นผิวคอบสองและคอนทัวร์แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและ peptone (A) ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (B) ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและพีเอชเริ่มต้น (C) peptone และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (D) peptone และพีเอชเริ่มต้น (E) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และพีเอชเริ่มต้น (F) ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อผสมระหว่าง <i>B. pumilus</i> DMKUB3 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	76

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	กราฟพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่างและ peptone (A) ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่างและ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (B) ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่างและฟิเอชเริ่มต้น(C) peptone และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (D) peptone และฟิเอชเริ่มต้น (E) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และฟิเอชเริ่มต้น (F) ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสมระหว่าง <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	78
19	เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสม ในถังหมักแบบกวนโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส (A) และ สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส (B) ที่มีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที	81
20	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสที่ผลิตจากเชื้อผสมของ <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	83
21	ผลของฟิเอชต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสที่ผลิตจากเชื้อผสมของ <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	84
22	ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสที่ผลิตจากเชื้อผสมของ <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	85
23	ผลของฟิเอชต่อความคงทนของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสที่ผลิตจากเชื้อผสมของ <i>B. pumilus</i> DMKUB39 และ <i>B. amyloliquefaciens</i> DMKUB24	86

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
ก1	ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อ <i>B. pumilus</i> DMKUB39	106
ก2	Normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อน	113
ก3	Scatter plot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนาย	114
ก4	ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสที่ได้จากการทดลองและค่าทำนาย	116
ก5	กราฟพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ <i>B. pumilus</i> DMKUB39	117
ก6	กราฟพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ <i>B. pumilus</i> DMKUB39	118
ก7	กราฟพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ และพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ <i>B. pumilus</i> DMKUB39	119
ก8	การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ <i>B. pumilus</i> DMKUB39 ก่อน (■) และ หลัง (▲) การศึกษาหาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส	120

การเหนี่ยวนำเอนไซม์ไซลันเนสจากเชื้อ *Bacillus pumilus* DMKUB39 และ  
*Microbispora siamensis* DMKUA 245<sup>T</sup> และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซลันจาก  
เชื้อผสมระหว่าง *Bacillus pumilus* DMKUB39 และ *Bacillus amyloliquefaciens*  
DMKUB24 โดยใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบ

Induction of Xylanase in *Bacillus pumilus* DMKUB39 and *Microbispora siamensis*  
DMKUA 245<sup>T</sup> and Production of Xylan-Degrading Enzymes by *Bacillus pumilus*  
DMKUB39 and *Bacillus amyloliquefaciens* DMKUB24 using  
Rice Straw as Raw Material

คำนำ

เนื่องมาจากประชากรส่วนใหญ่ในประเทศไทยประกอบอาชีพทางเกษตรกรรม ดังนั้นในแต่ละปีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจึงมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะวัสดุเหลือทิ้งจากการปลูกข้าว ซึ่งเป็นพืชหลักของประเทศ จากสถิติการผลิตการเกษตรในกลุ่มข้าวปีเพาะปลูก 2555/57 ประเทศไทยมีเนื้อที่เพาะปลูกข้าว 64.66 ล้านไร่ (ศูนย์สถิติการเกษตร, 2557) ฟางข้าวจึงเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่มีอยู่มากมาย แต่ยังไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างมีประสิทธิภาพ เกษตรกรมักนำฟางข้าวไปเป็นแหล่งอาหารเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเห็ดทำปุ๋ยหมักและใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้แหล่งอาหารโปรตีนสำหรับเป็นอาหารสัตว์ (Han, 1978; George, 1983; Laukevics *et al.*, 1984; Lynch, 1988; Samklong *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามยังมีฟางข้าวจำนวนที่เหลือเกษตรกรมักกำจัดโดยการเผาทิ้ง (พิทยากร, 2531) รวมถึงในหลาย ๆ ประเทศหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตรแล้วก็จะเผาเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา (Givens, 1996; Samar *et al.*, 1999; Abdulla and El-Shatoury, 2007; Binod *et al.*, 2010)

ฟางข้าวมีสารประกอบประเภทลิกโนเซลลูโลสซึ่งมีองค์ประกอบสำคัญ ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน และสารอินทรีย์ ในฟางข้าวองค์ประกอบส่วนใหญ่จะมีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละประเทศ ขึ้นอยู่กับอายุ สภาพแวดล้อมในการเจริญ สภาพทางสรีรวิทยา รวมทั้งวิธีการที่ใช้วิเคราะห์ แต่องค์ประกอบของผนังเซลล์ค่อนข้างคงที่ คือ เซลลูโลส 30-51 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 6-28 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 4-10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง (Doyle, 1986) โดยส่วนที่

เป็นเฮมิเซลลูโลสที่มียีนประกอบที่สำคัญคือน้ำตาลไซโลสซึ่งมีประมาณ 13.9 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักแห้ง) ของน้ำหนักทั้งหมดซึ่งอยู่ในรูปของไซแลน (ศุภกิจและคณะ, 2538) จากองค์ประกอบดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าฟางข้าวเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญ เช่น กลูโคสไอโซเมอเรส (Chen and Anderson, 1980) และเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนเช่น เอนไซม์ไซแลเนส เป็นต้น (Kapoor *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2008) มีการนำเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น การฟอกขาวในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษ การลดความหนืดของอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมอาหาร รวมถึงการย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลไซโลส และไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมหลายชนิด

การพัฒนากระบวนการผลิตและศึกษาสมบัติของเอนไซม์นั้นมีความจำเป็นสำหรับการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ในระดับอุตสาหกรรม สำหรับวิธีดั้งเดิมที่นำมาใช้ในการศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตนั้นทำโดยการศึกษาทีละปัจจัย (one factor at a time) ในขณะที่กำหนดให้ปัจจัยอื่นคงที่ วิธีนี้ไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้ในกรณีที่มีหลายปัจจัย การศึกษาด้วยวิธีนี้ไม่เพียงแต่ใช้เวลาในการศึกษานาน แต่ยังไม่สามารถหาจุดที่เหมาะสม รวมทั้งไม่สามารถอธิบายปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยได้ (Liu and Tzeng, 1998; Weuster-Botz, 2000) สำหรับข้อจำกัดของวิธีดังกล่าวสามารถหลีกเลี่ยงได้โดยใช้วิธีทางสถิติ โดยการออกแบบการทดลองทางสถิตินั้นสามารถใช้อธิบายปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ต่างกันได้ (Liu และ Tzeng, 1998) และวิธีดังกล่าวได้มีการนำมาประยุกต์ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการหมักในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (Weuster-Botz, 2001) และเชื้อรา (Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006; Francis *et al.*, 2003) สำหรับวิธีการออกแบบการทดลองที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ Plackett-Burman (Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006; Viswanathan และ Surlikar, 2001) central composite design (Vohra และ Satyanarayana, 2002; Tanyildizi *et al.*, 2004) และ Box-Behnken design (Francis *et al.*, 2002; Anisha *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2008)

มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนที่มีความสำคัญได้ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ แอคติโนมัยซีท และรา (Badhan *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 1992; Knob *et al.*, 2010; Boondaeng *et al.*, 2009; Poorma *et al.*, 2007) มีรายงานว่าแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกสร้างสปอร์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนได้ดี เช่น *Bacillus* (Ashita *et al.*, 2000; Gowdhaman *et al.*, 2013), *Paenibacillus* (Chun-Han Ko *et al.*, 2009; Khianggam *et al.*, 2009) เป็นต้น แต่เนื่องจากการย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์นั้นต้องใช้เอนไซม์ย่อยสลายไซแลนหลายชนิด ได้แก่ ได้แก่ เอนโดเบต้าไซแลเนส (endo- $\beta$ -xyylanase) และเบต้าไซโลซิเดส ( $\beta$ -xylosidase) และ

เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโซ่ด้านข้าง ได้แก่ แอลฟากลูคูโรนิเดส ( $\alpha$ -glucuronidase) อะซิetyl ไซแลนเอสเทอเรส (acetyl xylan esterase) แอลฟาอะราบินโนฟูราโนซิเดส ( $\alpha$ -arabinofuranosidase) และฟีนอลิกแอซิดเอสเทอเรส (phenolic acid esterase) ดังนั้นในปัจจุบันจึงนำวิธีการดัดแปลงพันธุกรรมของจุลินทรีย์มาใช้เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนดังกล่าวได้มากกว่า 1 ชนิดในเวลาเดียวกัน (La Grange *et al.*, 2001; Shakila *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002) ถึงแม้ว่าวิธีการดัดแปลงพันธุกรรมของจุลินทรีย์จะประสบความสำเร็จและมีการนำมาใช้ในบางประเทศ แต่เนื่องจากในประเทศไทยมีข้อจำกัดทางชีวภาพเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ที่ดัดแปลงพันธุกรรม ดังนั้นวิธีการดังกล่าวจึงยังไม่เป็นที่ยอมรับในประเทศไทย

ในการศึกษานี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียดีคีสแกรมบวกและสร้างสปอร์ที่เก็บรักษาในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่มเบต้าไซแลนเนสและเบต้าไซโลซิเดส โดยใช้ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่า pH เป็นวัตถุดิบ และศึกษาการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับเชื้อ *Microbispora siamensis* DMKUA 245<sup>T</sup> ซึ่งเป็นเชื้อแอคติโนมัยสิททอนร้อนสปิซิสส์ใหม่ที่มีการรายงานการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสมาก่อนหน้านี้ (Boondaeng *et al.*, 2009) นอกจากนี้เพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการผลิตเอนไซม์ รวมทั้งหลีกเลี่ยงการใช้เชื้อจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม จึงได้ศึกษากระบวนการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสและเบต้าไซโลซิเดสได้พร้อมกันโดยใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิด และทำการศึกษาค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในระดับ ฟลasks โดยใช้แผนการทดลองแบบ Central composite design และวิธีพื้นผิวตอบสนอง รวมถึงทำ การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสและเบต้าไซโลซิเดสที่ผลิตได้ เพื่อนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ได้อย่างเหมาะสม

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกสร้างสปอร์ ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเนสโดยใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบ
2. เพื่อศึกษาการเหนี่ยวนำเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับเชื้อแอสคิโนมัยซีท *Microbispora siamensis* DMKUA 245<sup>T</sup> ซึ่งเป็นเชื้อชนิดใหม่ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้
3. ศึกษาปัจจัยและค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเนสจากเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบด้วยวิธีพื้นผิวดอก
4. เพื่อศึกษาสมบัติบางประการของการทำงานของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเนสที่ผลิตได้จากเชื้อผสมของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

## การตรวจเอกสาร

### 1. ฟางข้าว

ได้มีการประมาณว่าในแต่ละปีมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั่วโลกปีละประมาณ 150 พันล้านตันหรือประมาณ 2-9 ตันต่อ Hectare (Abdulla and El-Shatoury, 2007) ในประเทศจีนในแต่ละปีมีวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ประมาณ 939 ล้านตัน สามารถใช้ประโยชน์เพื่อเป็นแหล่งพลังงานใหม่ทดแทนพลังงานจากแก๊สธรรมชาติได้ 550 ล้านตัน (Cuiping et al., 2004; Jin and Chen, 2006) นอกจากนี้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรยังสามารถนำมาผลิตโปรตีน เอนไซม์ หรือผลิตภัณฑ์ที่สำคัญทางอุตสาหกรรม (Vadiveloo, 2000; Shen et al., 2003) สำหรับประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพทางการเกษตรคิดเป็นร้อยละ 53 ของพื้นที่ประเทศ โดยเฉพาะการปลูกข้าวซึ่งเป็นพืชหลักของประเทศ จึงทำให้ในแต่ละปีมีปริมาณฟางข้าวเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก

#### 1.1 องค์ประกอบผนังเซลล์ของฟางข้าว

องค์ประกอบที่พบในผนังเซลล์ส่วนใหญ่ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นองค์ประกอบหลัก (major component) และองค์ประกอบรอง (minor component) โดยส่วนที่เป็นองค์ประกอบหลักประกอบด้วยส่วนที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ และสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compounds) ส่วนองค์ประกอบรองประกอบด้วย สารละลายธรรมชาติ (neutral solvents) ปริมาณสารประกอบแต่ละกลุ่มมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และส่วนประกอบต่าง ๆ ส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช มีปริมาณของสารประกอบต่างๆ ที่ไม่เท่ากัน

พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) เป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีมวลโมเลกุลสูงที่พบมากในผนังเซลล์พืชได้แก่ เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส สารทั้งสองมีความสัมพันธ์กันและมักอยู่รวมกันเรียกว่า โฮโลเซลลูโลส (holocellulose) โดยมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 60-80 ของสารประกอบทั้งหมด

1.1.1 เซลลูโลส (Cellulose) เป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ ที่มีประมาณร้อยละ 40-50 ในผนังเซลล์พืช ลักษณะเป็นพอลิเมอร์สายตรง ไม่มีกิ่งก้านสาขา และเป็นโฮโมพอลิเมอร์

(homopolymer) ของ  $\beta$ -D-glucose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4-glycosidic linkage โดยมีค่า degree of polymerization อยู่ในช่วงประมาณ 100 ถึงมากกว่า 10,000 ซึ่งเกาะรวมกันภายใน crystalline microfibrils เซลลูโลสมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20,000 ถึง 750,000 ดาลตันซึ่งเท่ากับ 100-4,000 หน่วยกลูโคส โมเลกุลของเซลลูโลสเรียงตัวเป็นมัดเรียกว่า fibril โดยมีพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลกลูโคสที่อยู่ใกล้กันของเซลลูโลสสายหนึ่งกับเซลลูโลสอีกสายหนึ่ง เชื่อมต่อกันเป็น fibril นอกจากนั้นเซลลูโลสที่พบในทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งมีความทนต่อกรดได้มากกว่าเฮมิเซลลูโลส

1.1.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) เป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงพบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส โดยพบประมาณร้อยละ 20-30 ในผนังเซลล์พืช สามารถสกัดได้ด้วยสารละลายที่เป็นด่าง เฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ประกอบด้วยไซแลน (xylan) กลูโคแมนแนน (glucomannans) กาแลคแตน (galactans) และกลูแคน (glucan) ไซแลนเป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุดในการเฮมิเซลลูโลส โดยมีโครงสร้างหลักที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4-glycosidic linkage ของน้ำตาลไซโลส และมีกิ่งก้านเป็นน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลต่าง ๆ

เฮมิเซลลูโลส เป็นสารประกอบพอลิเมอร์จะถูกย่อยด้วยกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส และยังสามารถถูกย่อยได้ด้วยด่าง เฮมิเซลลูโลสมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ น้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบได้แก่ D-xylose D-mannose D-galactose D-glucose L-arabinose 4-O-methyl-D-glucuronic acid D-galacturonic acid และ D-glucuronic acid น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในเฮมิเซลลูโลสที่พบไม่บ่อยนัก เช่น L-rhamnose L-fucose และ methylated neutral sugars พอลิแซ็กคาไรด์ที่สำคัญที่จัดเป็นเฮมิเซลลูโลส คือไซแลน (xylan) และ แมนแนน (mannan) (Goodwin and Mercer, 1972; Wong *et al*, 1988)

1.1.3 ลิกนิน (Lignin) เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่มีอยู่ในพืชซึ่งจัดเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย phenylpropane เกิดจาก phenylpropane แต่ละหน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ และคาร์บอน-คาร์บอน ลิกนินในโครงสร้างไม้มีอยู่ประมาณร้อยละ 20-35 และเป็นสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลสูงและไม่มีโครงสร้างที่แน่นอนในธรรมชาติ สามารถสร้างพันธะโควาเลนต์กับหมู่ L-arabinosyl และ glucuronosyl residue ของไซแลน จึงเป็นไปได้ว่ามีการสร้าง cross-link ระหว่างลิกนินกับไซแลน หรือไซแลนกับพอลิแซ็กคาไรด์อื่น ๆ ลิกนินในเนื้อไม้มีหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างเยื่อชั้นนอก (outer layer) ของเส้นใย (fiber) และเป็นสิ่งที่เพิ่มความแข็งแรงให้แก่เส้นใย

องค์ประกอบทางเคมีของฟางข้าวส่วนใหญ่จะมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อายุ สภาพทางสรีรวิทยา สภาพแวดล้อมในการเติบโต รวมทั้งวิธีการที่ใช้วิเคราะห์ แต่องค์ประกอบของผนังเซลล์ค่อนข้างคงที่คือ เซลลูโลส 32-47 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 19-27 เปอร์เซ็นต์ ลิกนิน 5-24 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น 4.2-9.8 เปอร์เซ็นต์ (Doyle, *et al.*, 1986; Garrote *et al.*, 2002; Saha, 2003) โดยมีกลูแคนและไซแลน เท่ากับ 26.0-37.5 และ 13.0-20.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สัดส่วนของปริมาณคาร์โบไฮเดรตในฟางข้าวประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 41-43.4 เปอร์เซ็นต์ ไซโลส 14.8-20.2 เปอร์เซ็นต์ อะราบิโนส 2.7-4.5 เปอร์เซ็นต์ แมนโนส 1.8 เปอร์เซ็นต์ และกาแลคโตส 0.4 เปอร์เซ็นต์ (Karimi *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2006)

**ตารางที่ 1** องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง) ของฟางข้าว

Crude Protein	Crude fibre	Total ash	Hemi-cellulose	Cellulose	Lignin	Country/Region	Reference
2.4	-	-	28	-	7	Thailand	Tinnimit <i>et al.</i> (1985)
2.6	-	15	24	-	5	Thailand	Wanapat <i>et al.</i> (1985)
3.5	-	15	-	-	4	Thailand	Wanapat <i>et al.</i> (1984)
3.8	-	21	22	-	7	Sri Lanka	Sannasgala <i>et al.</i> (1985)
3.8	-	17	-	-	-	Thailand	Wongsrikeao <i>et al.</i> (1985)
4.6	31	18	25	36	10	Japan	Toyokawa <i>et al.</i> (1982)
-	-	-	24.01	38.97	7.96	Thailand	วิเชียร และคณะ (2531)

ที่มา: คัดแปลงจาก Doyle (1986)



### 3. เอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลน

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการการย่อยโครงสร้างหลักของไซแลน ได้แก่ เอนโดเบต้าไซแลนาส (endo- $\beta$ -xylanase) และเบต้าไซโลซิเดส ( $\beta$ -xylosidase) และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยไซแลนข้าง ได้แก่ แอลฟาไกลูคูโรนิเดส ( $\alpha$ -glucuronidase) อะซิetylไซแลนเอสเทอเรส (acetyl xylan esterase) แอลฟาอะราบิโนฟูราโนซิเดส ( $\alpha$ -arabinofuranosidase) และฟีโนลิกแอซิดเอสเทอเรส (phenolic acid esterase) โดยเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มทำงานร่วมกันในการเปลี่ยนไซแลนให้เป็นน้ำตาลไซโลส (Sunna and Antranikian, 1997)

เอนไซม์ที่ย่อยโครงสร้างหลักไซแลนจัดอยู่ในกลุ่ม Glycosyl hydrolase ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยพันธะเบต้า 1, 4-ไซโลไพราโนซิล ของอะราบิโนไซแลน อะราบิโน 4-O เมทิล-ดี-กลูคูโรโนไซแลน และ กลูคูโรโนไซแลน เอนไซม์ดังกล่าวแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

3.1 Endo  $\beta$ -1, 4-xylan xylohydrolase (EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ย่อยพันธะเบต้า 1, 4-ไซโลซิดิกของโมเลกุลไซแลนแบบสุ่ม (ภาพที่ 2) โดยจะย่อยโมเลกุลของไซแลนซึ่งจะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก เช่น ไซโลไบโอส ไซโลไตรโอส และไซโลเตตราโอสซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์และสายพันธุ์จุลินทรีย์ เอนไซม์ไซแลนาสยังแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามความสามารถในการย่อย 1, 3 -แอล ของอะราบิโนไซแลน และอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน คือ

3.1.1 Arabinose-liberating endoxylanase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยอะราบิโนไซแลนและอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลนตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของ ไซโลส และอะราบิโนส

3.1.2 Non arabinose-liberating endoxylanase เป็นเอนไซม์ที่ไม่สามารถย่อยอะราบิโนไซแลนและอะราบิโนกลูคูโรไซแลนตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของไซโลสและอะราบิโนส

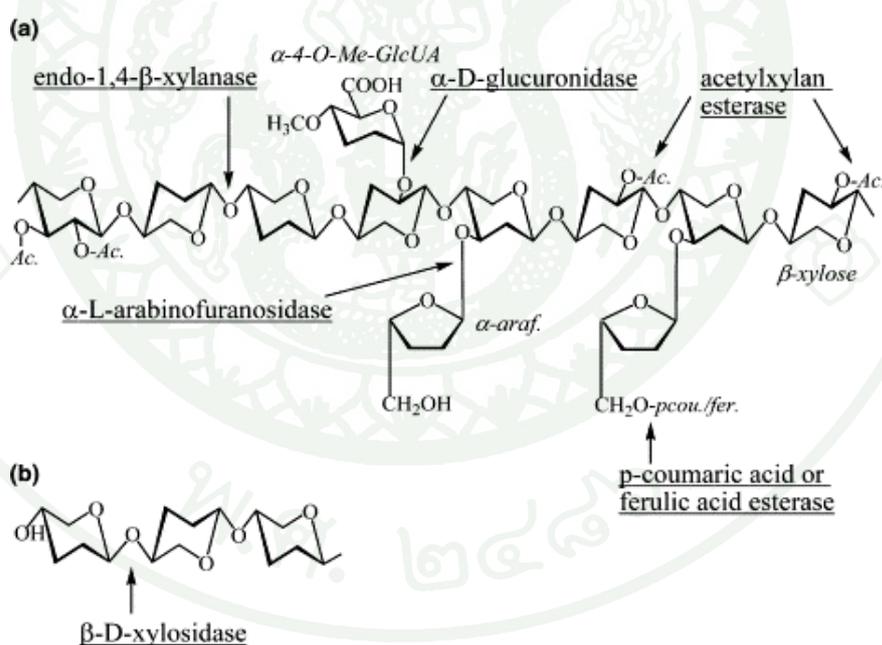
3. 2 Exo  $\beta$ -1, 4-xylan xylohydrolase หรือเรียกสั้น ๆ ว่า  $\beta$ -xylosidase (EC 3.2.1.37) โดยจะย่อยโมเลกุลของ xylooligosaccharides ซึ่งเกิดจากการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ไซแลนาสโดยเอนไซม์จะย่อยโมเลกุล xylooligosaccharides ของน้ำตาลไซโลสจากปลาย non-reducing ทีละโมเลกุลได้น้ำตาลไซโลส (ภาพที่ 2) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อีกกลุ่มหนึ่งซึ่งทำหน้าที่ย่อยไซ

ด้านข้างของโมเลกุลไซเลนที่แม้จะไม่ได้ย่อยโมเลกุลหลักของไซเลน แต่เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสำคัญ ทำให้การย่อยโมเลกุลของไซเลนสมบูรณ์ เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่

3.3  $\alpha$ -Glucuronidase (EC 3.2.1.99) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อย 1, 2- $\alpha$ -glucuronoxylan และ 4-O-methyl- D-glucuronic acid ตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของไซโลสและกรดกลูคูโรนิก โดยกิจกรรมของแอลฟา-กลูคูโรนิดเอสตรวจพบในเชื้อราและแบคทีเรีย

3.4  $\alpha$ -Arabinofuranosidase (EC3.2.1.55) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อย 1, 3- $\alpha$ -arabinofuranoxylan ตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของไซโลสและอะราบินโนส

3.5 Acetyl esterase หรือ acetyl xylan esterase (EC 3.2.1.72) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อย 1, 2-acetyl group ตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของไซโลส และหมู่อะซิetyl



ภาพที่ 2 ตำแหน่งที่เอนไซม์เข้าย่อยพันธะในโครงสร้างไซเลน

เอนไซม์ที่ย่อยโครงสร้างหลักของไซเลนแบบสุ่มและเอนไซม์ที่ย่อยโซ่ด้านข้างของ

ไซเลน (A) เอนไซม์ที่ย่อยที่ตำแหน่งปลายโมเลกุลของโครงสร้างหลักของไซเลน (B)

ที่มา : Collins *et al.* (2005)

#### 4. การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจากจุลินทรีย์

การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมเป็นแหล่งอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์เป็นแนวทางหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ การผลิตเอนไซม์โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมเป็นแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อ มีทั้งในสภาพการหมักแบบแห้ง และการหมักในสภาพของเหลว ในทางอุตสาหกรรมกระบวนการผลิตเอนไซม์นิยมผลิตในสภาพของเหลว (submerged fermentation) เนื่องจากสามารถจัดการได้ง่าย รวมถึงสามารถควบคุมปัจจัย ทางสภาพแวดล้อมได้ดี เช่น อุณหภูมิและกรด-ด่าง (pH)

จุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยสิท ผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสที่มีสมบัติแตกต่างกัน เช่น อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม อุณหภูมิและพีเอชที่คงตัว เอนไซม์ไซเนสจากจุลินทรีย์มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันตั้งแต่ 5,000 – 90,000 ดาลตัน และมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนในปริมาณที่แตกต่างกัน เอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น *Streptomyces sp.*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Schizophyllum commune*, *Cadida sp.*, และ *Cryptococcus abidus* มีองค์ประกอบของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน (Knob *et al.*, 2010; Sunna and Antranikian, 1997)

ในการย่อยสลายสารประกอบไซแลนให้สมบูรณ์นั้น จุลินทรีย์ต่างๆ มักผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสออกมามากกว่า 1 ชนิด เช่น *Pseudomonas fluorescens* ผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส A, B, C และ D (Tomme *et al.*, 1995) *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI ผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสอย่างน้อย 6 ชนิด (Lee *et al.*, 1993) เนื่องจากเบต้าไซลานเนสต่างๆ ที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดผลิตขึ้นสามารถย่อยสลายสารประกอบไซแลนในตำแหน่งที่แตกต่างกัน (Wong *et al.*, 1998)

ภัทราและคณะ (2544) ศึกษาการผลิตเบต้าไซลานเนสและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Bacillus circulans* B6 โดยใช้ xylan medium พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *B. circulans* B6 ในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์พบว่า specific activity ของเบต้าไซลานเนส และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 3.82 และ 0.09 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ เมื่อตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนด้วย SDS-PAGE และ active-PAGE พบว่า *B. circulans* B6 ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซลานโกลติก อย่างน้อย 16 ชนิด และกลุ่มเซลลูโลโกลติกอย่างน้อย 9 ชนิด จากการตรวจสอบความสามารถในการยึดเกาะระหว่าง crude enzyme กับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ พบว่ามีโปรตีน 3 ชนิดที่มีขนาดโมเลกุล 195, 44 และ 27 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ซึ่ง

สามารถยึดเกาะกับไซเลนที่ไม่ละลายน้ำ โดยโปรตีนที่มีขนาด 195 กิโลดาลตัน ตรวจพบ กิจกรรมของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ในขณะที่โปรตีนขนาด 44 และ 22 กิโลดาลตัน พบกิจกรรมของไซลานเนส

ธนวรรณ และคณะ (2551) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติก จากเชื้อ *Bacillus* sp. strain TW-1 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ต่างๆ ในกลุ่มไซลาโนไลติก ได้แก่ ไซลานเนส เบต้าไซโลซิเดส และอะราบีโนฟูราโนซิเดส กลุ่มเซลลูโลไลติกเอนไซม์ ได้แก่ อะไวซิเดส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และเบต้ากลูโคซิเดส และแมนนาเนสซึ่งในระหว่างการหมักแบบกะ เอนไซม์กลุ่มเหล่านี้ย่อยไซเลนและเซลลูโลสในเปลือกข้าวโพดได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส ไซโลไบโอส และโอลิโกแซ็กคาไรด์ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบเอทานอลและกรดแอซิติกในน้ำหมักด้วย เมื่อย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ด้วยไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. strain TW-1 พบว่าสามารถย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้ดี โดยเอนไซม์จากแบคทีเรียนี้สามารถย่อยเปลือกข้าวโพดได้ดีกว่าซังข้าวโพด รำข้าว ชานอ้อย และฟางข้าว

## 5. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของแบคทีเรีย

### 5.1 ปัจจัยทางกายภาพ

#### 5.1.1 อุณหภูมิ

เชื้อแบคทีเรียมีความต้องการอุณหภูมิในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน อุณหภูมิที่แบคทีเรียจะเจริญเติบโตได้อยู่ระหว่างอุณหภูมิสูงสุดและอุณหภูมิต่ำสุด ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้แบคทีเรียจะไม่เติบโต (นงลักษณ์ และปรีชา, 2552) ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันโดยในระหว่างการเจริญเติบโตแบคทีเรียจะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทความร้อนลงอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นระดับหนึ่งจนแบคทีเรียไม่สามารถดำเนินกิจกรรมได้ สำหรับการสร้างโปรตีนของเซลล์ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นเช่นกัน ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม

Kulkami and Rao (1996) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. NCIM59 เพื่อผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากกากชานอ้อย พบว่า ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตเอนไซม์

ไซลानเนสได้มากกว่าร้อยละ 50 ในขณะที่ Archana and Satyarayana (1997) รายงานการเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* A99 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 20, 37, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนส พบว่าที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตเอนไซม์ได้ไม่ต่างกัน

Pham *et al.* (1998) รายงานว่าเชื้อ *B. polymyxa* 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ CETC153 และ 6319T มีการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่อุณหภูมิแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ CETC153 ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนสายพันธุ์ 6319T ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

Heck *et al.* (2005) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. คืออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และถ้าเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจะลดลง

### 5.1.2 พีเอช

พีเอชมีผลต่อการทำงานของแบคทีเรียและการผลิตเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การเลี้ยงเชื้อในระยะแรกพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่ระหว่างการเลี้ยงค่าพีเอชจะมีการเปลี่ยนแปลงซึ่งอาจเกิดจากการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นค่าอื่น ๆ ออกมา หรือมีการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์เป็นผลให้พีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ดังนั้นการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียจึงต้องมีการเติมบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชอย่างช้า ๆ โดยบัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย  $H^+$  หรือ  $OH^-$  ออกมา (Kunghae, 1993)

Pham *et al.* (1998) ทำการหาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *B. polymyxa* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ CETC153 และ 6319T เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนส พบว่าพีเอชที่เหมาะสม เท่ากับ 7.0 และ 5.0 ตามลำดับ ในขณะที่ Mawadza *et al.* (2000) พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. PH43 และ *Bacillus* sp. HR68 จะมีการผลิตไซลานเนสได้ดีที่พีเอชช่วง 6.0-8.0

Nath and Rao (1998) ศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ *Bacillus* sp. NCIM59 โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีช่วงพีเอช 5.0-10.0 พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่พีเอช 6.0 เช่นเดียวกับ Sa-Pereira *et al.* (2002) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* มีการเจริญได้ดีที่พีเอช 5.0-8.0 แต่เชื้อมี

การผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้สูงสุดที่พีเอช 6 ซึ่งต่างจาก Shah *et al.* (1999) ที่รายงาน พีเอชที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus sp.*SAM-3 คือพีเอชเท่ากับ 8

## 5.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนมีผลต่อทั้งปริมาณและชนิดของเอนไซม์ที่ได้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ อาจไม่ใช่อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ออาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน ต้องประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์และสารที่ให้พลังงาน รวมทั้งมีสารที่เหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ เช่นกรดอะมิโนบางชนิดที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้

### 5.2.1 แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

เอนไซม์บางชนิดโดยเฉพาะเอนไซม์เหนี่ยวนำที่ใช้ในการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ส่วนมากจะถูกยับยั้งการสังเคราะห์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่ใช่ง่าย เช่น กลูโคส เป็นต้น ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า catabolite repression เอนไซม์หลายชนิดที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมถูกยับยั้งการสังเคราะห์ได้โดยวิธีนี้ การหลีกเลี่ยงการใช้แหล่งคาร์บอนที่ทำให้เกิด catabolite repression ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้จุลินทรีย์มีการผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น (สมใจ, 2545)

จิตรลดา และคณะ (2551) ทำการเพาะเลี้ยง thermophilic *Anoxybacillus sp.* สายพันธุ์ JT-12 ที่คัดแยกจากระบบบำบัดน้ำทิ้งโรงงานกระดาษ ในอาหารที่มีไซแลนจากแหล่งต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสพบว่า thermophilic *Anoxybacillus sp.* สายพันธุ์ JT-12 ผลิตน้ำตาล xyloetraose เป็นผลิตภัณฑ์หลักเมื่อเพาะเลี้ยงใน birchwood xylan เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ขณะที่การย่อย birchwood xylan และ oat spelt xylan ด้วย crude xylanase (0.2 ยูนิต) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโล โอลิโกแซ็กคาไรด์ต่างๆ อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ birchwood xylan เป็นซับสเตรทได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ขณะที่เมื่อใช้ oat spelt xylan เป็นซับสเตรทได้น้ำตาลไซโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

ชนิดา และคณะ (2545) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต Cellulase-free xylanase จากเชื้อ alkaliphilic *B. firmus* K-1 โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ชั่งข้าวโพดและรำข้าวแทนการใช้ไซแลนซึ่งมีราคาแพง พบว่าเปลือกข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดต่อการผลิตไซแลเนส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ 3 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสเพิ่มขึ้นร้อยละ 62 เมื่อเทียบกับสูตรอาหารเดิมที่ใช้ไซแลนร้อยละ 0.5

### 5.2.2 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source)

แหล่งไนโตรเจนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน ไนโตรเจนเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการสร้างโปรตีนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน บางชนิดสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ การเปลี่ยนชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีผลในการผลิตเอนไซม์บางชนิด (Cowing and Merrill, 1996) ดังนั้นการเลือกแหล่งไนโตรเจนจะต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อนั้น ๆ (Boze *et al.*, 1995)

Gessese and Mamo (1999) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ peptone yeast extract และ tryptone ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลเนสจากเชื้อ *Bacillus* sp. AR-009 พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม yeast extract peptone และ tryptone ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Pham *et al.* (1998) ที่ได้รายงานการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลเนสจากเชื้อ *B. polymyxa* CTET153 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลเนส คือ yeast extract

Learthslarus *et al.* (2002) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลเนสจากเชื้อ *B. firmus* K-1 พบว่าความเข้มข้นของยูเรียร้อยละ 0.4 แอมโมเนียมไนเตรทร้อยละ 0.2 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 โซเดียมไนเตรทร้อยละ 0.4 และโพแทสเซียมไนเตรดร้อยละ 0.6 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุด มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซแลเนส 1.6, 1.44, 1.31, 0.89 และ 0.40 หน่วยต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

Kapoor *et al.* (2008) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *B. pumilus* MK001 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งไนโตรเจนจาก yeast extract จะให้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสสูงที่สุด 990 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

## 6. เชื้อแอกติโนมัยสิท *Microbispora siamensis* DMKUA245<sup>T</sup>

Boondeang (2011) ได้รายงานการแยกเชื้อแอกติโนมัยสิทในวงศ์ Streptosporangiaceae จากดินในประเทศไทย พบว่า *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> เป็นแอกติโนมัยสิททนร้อนสายพันธุ์ใหม่ (Boondeang *et al.*, 2009) ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้ สายพันธุ์ทนร้อน *M. siamensis* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุดเมื่อเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส การปรับปรุงการเพิ่มผลผลิตของสายพันธุ์นี้มี 3 ขั้นตอน ดังนี้ การคัดเลือกปัจจัย 5 ปัจจัย (ไซแลน เคซีน แมกนีเซียมซัลเฟต ไคโทแซนเซียม และอุณหภูมิ) การใช้ Plackett-Burman ในการคัดเลือกปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตมากที่สุด การหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตมากที่สุด ได้แก่ เคซีน แมกนีเซียม และอุณหภูมิ ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยใช้ CCD และยืนยันสภาวะโดยรูปแบบของสมการกำลังสอง โดยเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองกับสภาวะเริ่มต้น พบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อสายพันธุ์ทนร้อน *M. siamensis* DMKUA 245 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วย ไซแลน 10 กรัมต่อลิตร เคซีน 0.16 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียม 0.05 กรัมต่อลิตร ไคโทแซนเซียม 0.1 กรัมต่อลิตรและอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้กิจกรรมของเอนไซม์ 44 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในการทดลองระดับพลาสติก เคซีนที่ความเข้มข้นต่ำเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและลดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อไซลานเนส กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 292 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 72 ชั่วโมง ที่สภาวะไม่มีการคุมพีเอช มีการให้อากาศ 0.5 vvm ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ซึ่งเพิ่มการผลิต 49 เท่า เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่ปรับปรุง เอนไซม์ไซลานเนสบริสุทธิ์มีกิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ 219.4 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โปรตีน จาก SDA-PAGE พบว่าไซลานเนสบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 65.8 คาลตัน พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 5.5 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ไซลานเนสยังคงเหลือกิจกรรมในช่วงพีเอชกว้าง (4-11) และทนอุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส ไซลานเนสบริสุทธิ์ถูกกระตุ้นโดย  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  และ  $\text{Mg}^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และถูกยับยั้งโดย  $\text{Mn}^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ EDTA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ไซลานเนสบริสุทธิ์มีความจำเพาะต่อไซแลนสูง แสดงให้เห็นว่าเป็นไซลานเนสที่แท้จริง ค่า  $K_m$  ต่อไซแลน คือ 3.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลผลิตของการย่อยไซลานเนส ได้น้ำตาลไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น แสดงว่าไซลานเนสบริสุทธิ์เป็นชนิด endo  $\beta$ -1,4 ไซลานเนส

## 7. การเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เบต้าไซลานเนส

เอนไซม์เบต้าไซลานเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นได้ด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (Lindner *et al.*, 1994; Kyu *et al.*, 1994; Purkarthofer and Steiner, 1995) สารเหนี่ยวนำเอนไซม์เบต้าไซลานเนสส่วนมากจะป็นไซแลนซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของเซลล์ (Alam, 1994) พบว่าการเติมไซแลนลงในวัสดุหมักมีผลในการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา (Kitpreechavanich *et al.* 1984; Alam *et al.*, 1994)

Phuong *et al.* (1996) รายงานการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจาก *B. polymyxa* พบว่าเอนไซม์เบต้าไซลานเนสเป็นแบบ constitutive และถูกเหนี่ยวนำได้ดีที่สุดเมื่อใช้ไซแลนหรือวัตถุดิบที่มีส่วนผสมของไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่การใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสไม่มีผลต่อการเหนี่ยวนำของเอนไซม์

การสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *B. circulans* B<sub>5</sub> ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยไซแลนนั้น พบว่าแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ เช่น ไซโลสหรือไซแลน สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ ส่วนอะราบิโนสหรือไซแลนสามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์อะราบิโนฟูราโนซิเดสและยังพบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลานเนสเป็นแบบ constitutive (สันฐิติย์, 2541) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำตาลแต่ละชนิด ไซโลส อะราบิโนส กาแล็คโตส มอลโตสและไซโลไบโอส สามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสได้ไม่เท่ากัน โดยไซโลสและไซโลไบโอสที่ความเข้มข้นต่ำๆ สามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ได้ แต่แหล่งคาร์บอนที่เป็น อะราบิโนส กาแล็คโตส และมอลโตส ต้องใช้ความเข้มข้นสูงในการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ และการเติมไซโลสอะราบิโนส กาแล็คโตส มอลโตสหรือไซโลไบโอส ลงในอาหารที่มีไซแลนทำให้มีการสร้างเอนไซม์มากขึ้น (Kyu *et al.*, 1994)

การศึกษาการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *B. circulans* AB16 เมื่อเลี้ยงในอาหาร basal medium ที่มีน้ำตาลซูโครส อะราบิโนส มอลโตส ไซโลส กลีเซอรอล ฟรุคโทสและกลูโคส ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าน้ำตาลต่าง ๆ จะถูกใช้หมดภายใน 24 ชั่วโมง และมีการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในช่วง 0.82-2.52 หน่วยต่อมิลลิลิตร และการใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นแหล่งคาร์บอนส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้น้อยมากหรือไม่สร้าง (Ashita *et al.*, 2000)

เอนไซม์ไซลานเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. strain XE สามารถเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ได้โดยสารที่เกิดจากการแตกตัวของไซแลนคือไซโลโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ ในขณะที่เดียวกันหากมีการสะสมของไซโลโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเกิดการยับยั้งการสร้างเอนไซม์แบบ catabolic repression ได้ (Samain *et al.*, 1997)

การสร้างเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อรา *Trichoderma reesei* สามารถเหนี่ยวนำได้โดยการเติมไซแลนและไซโลไบโอสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่ sophorose จะเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีกว่าเอนไซม์เซลลูเลส และการเติมไซโลสสามารถเหนี่ยวนำการสร้างเซลลูเลสและไซลานเนสได้ดีใน *Aspergillus terreus* (Hrmova *et al.*, 1989)

#### 8. การใช้เอนไซม์ไซลานเนสและไซโลซิเตสเพื่อย่อยไซแลนในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรมประเภทลิกโนเซลลูโลสได้มีการนำมาใช้ประโยชน์หลากหลาย เช่น การเป็นแหล่งอาหารเพื่อใช้เลี้ยงเห็ด ทำปุ๋ยหมัก และใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้แหล่งอาหารโปรตีนสำหรับเป็นอาหารสัตว์ (Meevotism *et al.*, 2527; Han, 1978; George, 1983; Laukevics *et al.*, 1984; Lynch, 1988) นอกจากนั้นการย่อยสารคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในวัสดุเหลือทิ้งเหล่านั้นให้เป็นสารมีค่าต่อไปก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งของการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งเหล่านั้น

Kitpreechavanich *et al.* (1984) ได้รายงานการผลิตน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร จากไซแลนที่ได้จากไม้ ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยไซแลนจากไม้ 100 กรัมต่อลิตร เอนไซม์ไซลานเนสที่ผลิตจาก *H. lanuginosa* 480 หน่วยต่อมิลลิลิตรและกิจกรรมของเบต้าไซโลซิเตสที่ผลิตจาก *A. fumigatus* 16 หน่วยต่อมิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Mônica *et al.* (2004) ได้ใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *T. lanuginosus* IOC-4145 ปริมาณ 3000 หน่วยต่อกรัมวัสดุในการย่อยชานอ้อยและซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ค้างที่อุณหภูมิสูง โดยได้ปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงสุด คิดเป็น 24 และ 52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปริมาณไซโลสที่ย่อยได้จากการย่อยด้วยกรด

วิเชียร และคณะ (2537) ได้ใช้เอนไซม์ไซลานเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *H. lanuginosus* ในการแยกสกัดไซแลนจากซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ NaOH ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า

ประสิทธิภาพการแยกสกัดคิดเป็นประมาณ 80 % ของเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในซังข้าวโพดหลังจากการบ่มที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ เมื่อย่อยซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ต่าง 10 กรัมที่บรรจุในถังปฏิกรณ์เอนไซม์แบบคอลัมน์โดยผ่านสารละลายเอนไซม์ ไชลานเนส 100 มิลลิลิตรที่มีกิจกรรมไชลานเนส 22.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ 10 มิลลิลิตรของเอนไซม์ chitopearel BCW 2510 ที่ตรึงเอนไซม์บนตัวไซโลซีเตส ที่ผลิตจาก *A. fumigatus* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 4.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากย่อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ไซโลส 12 กรัมต่อลิตร แต่ยังมีไซโลไบโอส ประมาณ 5 กรัมต่อลิตร

Shekiro *et al.* (2012) ได้ศึกษาการย่อยไซแลนใน corn stover ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจาง ด้วยเอนไซม์ผสมทางการค้า การย่อยด้วยวิธีเอนไซม์หลังจากการปรับสภาพจะช่วยให้ได้น้ำตาลไซโลสและลดการเกิดสารพิษได้อย่างมาก พบว่าประมาณ 70 % ของไซโลโอลิโกที่ได้หรือ 80% ของไซแลนที่มีอยู่สามารถถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้

## 9. การออกแบบการทดลอง Plackett-Burman design (PBD)

Plackett-Burman design (PBD) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสำหรับการหาค่าประกอบของอาหารที่เหมาะสม ในปี ค.ศ. 1946 R.L. Plackett และ J.P. Burman ได้ตีพิมพ์ผลงานที่มีชื่อเสียงเรื่อง "The Design of Optimal Multifactorial Experiments" ในวารสาร *Biometrika* (vol. 33)

ในการทดลองที่มีตัวแปรหรือปัจจัยที่ต้องการศึกษาหลายปัจจัย จะมีอุปสรรคเกี่ยวกับสิ่งทดลอง (treatment) ที่มีเป็นจำนวนมาก เช่น ถ้าจัดสิ่งทดลองแบบ  $2^n$  จะพบว่าถ้ามีปัจจัย 8 ปัจจัยจะมีสิ่งทดลองทั้งหมด 128 สิ่งทดลอง เป็นต้น จึงเป็นการยากที่จะทำการทดลองทั้ง 256 สิ่งทดลอง ดังนั้น Plackett and Burman Design จะใช้สำหรับการศึกษาเพื่อคัดเลือกรายการ (screening) ปัจจัยที่มีความสำคัญหรือมีอิทธิพลต่อการทดลองที่จะศึกษา กล่าวคือจากแผนการทดลองนี้จะทำให้สามารถวิเคราะห์ถึงผลกระทบหลักของปัจจัยที่ศึกษาเท่านั้น ซึ่งการทดลองแบบนี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial experiment) หรืออาจจัดให้เป็นแฟคทอเรียลบางส่วน (fractional factorial) ที่มีการจัดให้เป็นอิสระต่อกัน (orthogonal) ใช้เพื่อคัดเลือกรายการในการพัฒนาสูตร หรือพัฒนากรรมวิธีการผลิตจาก 10 ถึง 20 ปัจจัยที่ได้จากการทดสอบเบื้องต้นให้เหลือ 1 ถึง 4 ปัจจัย โดยที่ไม่ต้องทำการทดลองในขนาดใหญ่ ซึ่งสามารถลดจำนวนการทดลองโดยใช้เทคนิคนี้ แต่มีข้อเสีย คือไม่สามารถศึกษาถึงผลของปฏิสัมพันธ์ (interaction) ต่างๆ ที่มีในการทดลองได้ วิธีนี้เหมาะที่จะใช้ในการทำการทดลองเพื่อคัดกรองปัจจัยที่ไม่มีความสำคัญทางสถิติออก การจัดการ

ทดลองจะใช้  $2^k$  factorial arrangement ( $k = N-1$ ) เป็นพื้นฐาน โดยจะมีแบบแผนมาตรฐาน (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** แผนมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือก  $N-1$  ปัจจัยในการทดลอง  $N$  ครั้ง

N	ปัจจัยที่ต้องการกรันกรอง, $k = N-1$																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
8	+	+	+	-	+	-	-																
12	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-												
16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-								
24	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-

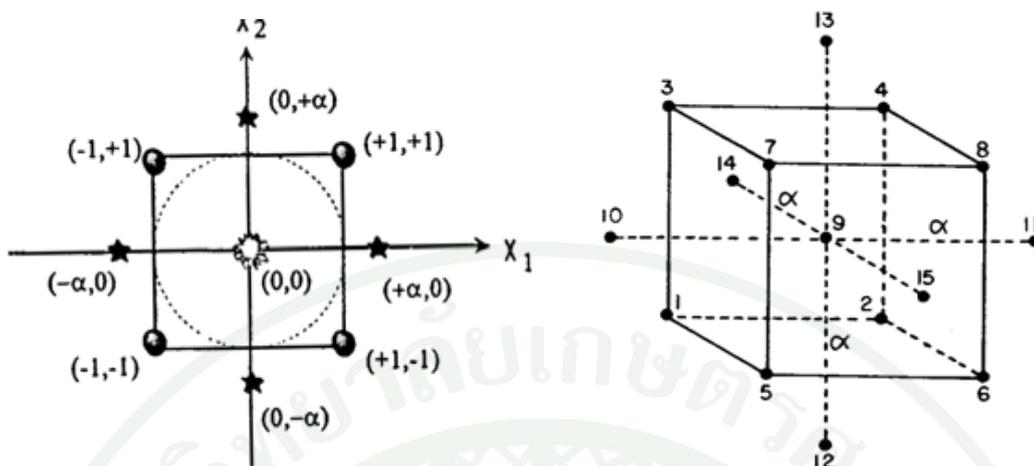
หมายเหตุ N คือ จำนวนครั้งของสิ่งทดลอง

ที่มา: Plackett and Burman (1946)

การออกแบบการทดลองที่นำมาใช้ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมด้วยการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง ได้แก่ การทดลองแบบ Box-Benhken design (BBD) central composite design (CCD) หรือ factorial design เป็นต้น

## 10. แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD)

เป็นแผนการทดลองที่ดัดแปลงมาจากการจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล ซึ่งเป็นการเพิ่มสิ่งทดลองระหว่างระดับของปัจจัย แต่เป็นการลดสิ่งทดลอง โดยจาก 33 factorial design จะมีสิ่งทดลองทั้งหมด 27 สิ่งทดลอง ในขณะที่ CCD 3 ปัจจัย จะมีการทดลองทั้งหมด  $23 + (2 \times 3 + 1)$  โดยที่เทอม  $(2n+1)$  เป็นจุดพิเศษที่เพิ่มขึ้นมา และเพิ่มการทดลองที่จุดตรงกลาง 3 ถึง 5 ซ้ำ จะได้เท่ากับ 20 สิ่งทดลอง (ไพโรจน์, 2544) ดังแสดงในภาพที่ 3 และตารางที่ 3



ก. แบบ 2 ตัวแปร

ข. แบบ 3 ตัวแปร

ภาพที่ 3 แสดงสิ่งทดลอง (design points) สำหรับสมการกำลังสอง

ที่มา: Gacular and Singh (1984); Hu (1999)

การคำนวณค่าระดับจริงที่ใช้ในการทดลอง ใช้สมการในการเปลี่ยนรหัส ดังนี้ (Neter *et al.*, 1996)

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \dots\dots\dots (1)$$

โดย  $x_i$  คือ ค่ารหัสของปัจจัยในการทดลอง

$X_i$  คือ ค่าจริงของปัจจัยในการทดลอง

$X_0$  คือ ค่าเฉลี่ยของระดับของปัจจัยในการทดลอง

$\Delta X_i$  คือ ค่าช่วงกลางของระดับของปัจจัยในการทดลอง

ตารางที่ 3 ค่าของ code level ใน central composite design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย

สิ่งทดลอง	ระดับของปัจจัย			สิ่งทดลอง	ระดับของปัจจัย		
	ปัจจัย	ปัจจัย	ปัจจัย		ปัจจัย	ปัจจัย	ปัจจัย
	A	B	C		A	B	C
1	-1	-1	-1	11	0	-1.68	0
2	-1	-1	1	12	0	1.68	0
3	-1	1	-1	13	0	0	-1.68
4	-1	1	1	14	0	0	1.68
5	1	-1	-1	15	0	0	0
6	1	-1	1	16	0	0	0
7	1	1	-1	17	0	0	0
8	1	1	1	18	0	0	0
9	-1.68	0	0	19	0	0	0
10	1.68	0	0	20	0	0	0

ที่มา: อนุวัฒน์ (2549)

### 11. วิธีพื้นผิวตอบสนอง

การวางแผนการทดลองเริ่มนำไปใช้ในทางเกษตรเป็นครั้งแรกซึ่ง Montgomery (1984) ได้กล่าวไว้ว่า Fisher ได้นำวิธีการทางสถิติและการวิเคราะห์ข้อมูลไปใช้กับผลการทดลองที่สถานีทดลองทางการเกษตรในกรุงลอนดอนที่ประเทศอังกฤษ วิธีการดังกล่าวคือการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ซึ่งเป็นวิธีการหลักในการวิเคราะห์ข้อมูลจากการวางแผนงานทดลอง แต่แนวคิดของ Fisher นี้สามารถนำไปประยุกต์ในงานวิจัยสาขาอื่นๆ ได้เป็นอย่างดี ขั้นตอนต่อมาของการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาเงื่อนไขของปัจจัยต่างๆ ในกระบวนการผลิตนั้นๆ โดยใช้วิธีการทางสถิติขั้นสูงคือวิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) ซึ่ง Khuri and Cornell (1987) กล่าวไว้ว่าได้มีงานวิจัยด้านนี้ตั้งแต่ช่วงปี ค.ศ. 1930 หรืออาจจะก่อนหน้านั้น การใช้วิธีการหาพื้นผิวตอบสนองได้ประสบผลสำเร็จและนำไปประยุกต์ในงานวิจัยสาขาต่างๆ เช่น วิศวกรรม วิทยาศาสตร์การอาหาร ชีววิทยา และในวงการอุตสาหกรรม เป็นต้น

การออกแบบการทดลองเพื่อการปรับปรุงคุณภาพ (design of experiment: DOE) แต่ละกระบวนการผลิตนั้นจะมีจำนวนปัจจัยต่าง ๆ หลายปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพ ต้นทุนและคุณภาพของกระบวนการผลิต แต่ปัญหาก็คือจะสามารถหาจุดที่เหมาะสมของปัจจัยเหล่านั้นได้อย่างไร ดังนั้นการออกแบบการทดลองเป็นวิธีที่จะช่วยให้เราสามารถการทดลองและเก็บข้อมูลอย่างเป็นระบบ แล้วนำข้อมูลเหล่านั้นไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ ซึ่งจะทำได้ผลลัพธ์ที่เชื่อถือว่าควรจะต้องปรับตั้งปัจจัยต่าง ๆ อย่างไร เพื่อให้ได้กระบวนการทำงานมีประสิทธิภาพ ต้นทุนการผลิตต่ำ และได้สินค้าคุณภาพดี นอกจากนี้การออกแบบการทดลองจะใช้เวลาและค่าใช้จ่ายในการทดลองที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับการลองผิดลองถูก การออกแบบการทดลองที่นำมาใช้ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมด้วยการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง ได้แก่ การทดลองแบบ Box-Benken design (BBD) central composite design (CCD) หรือ factorial design เป็นต้น

การหาพื้นผิวตอบสนองนั้นมีจุดประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตอบสนอง (Y) กับกลุ่มของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตอบสนองนั้นๆ วิธีการดังกล่าวนี้ใช้การวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) มาประยุกต์ในการหารูปแบบความสัมพันธ์ที่เรียกว่ารูปแบบพหุนาม (polynomial model) โดยทั่วไปรูปแบบของพื้นผิวตอบสนองจะพิจารณารูปแบบพหุนามลำดับที่ 1 (first order model) หรือลำดับที่ 2 (second order model) ส่วนการประมาณค่าพารามิเตอร์หรือสัมประสิทธิ์การถดถอยในรูปแบบดังกล่าวจะใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (นวรรตน์, 2548; อนุวัตร, 2549) รูปแบบพหุนามลำดับที่ 1 โดยทั่วไปมีการนำมาเฉพาะบางแผนการทดลองซึ่ง Khuri and Cornell (1987) ได้กล่าวไว้ คือการออกแบบเชิงแฟกทอเรียล 2 ระดับ ( $2^k$  factorial) รูปแบบพหุนามลำดับที่ 2 มีแผนการทดลอง เช่น Box-Benken design, Central composite design, การออกแบบเชิงแฟกทอเรียล 3 ระดับ ( $3^k$  factorial) เป็นต้น นั่นคือจะต้องมีระดับการทดลองอย่างน้อย 3 ระดับ Khuri and Cornell (1987) ซึ่งรูปแบบพหุนามลำดับที่ 2 สำหรับ k ตัวแปรมีรูปแบบดังสมการที่ 1

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_1 x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \dots \dots \dots (2)$$

โดยที่ Y คือ ตัวแปรตอบสนอง

$\beta$  คือ สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอย

$x_i, x_j$  คือ ตัวแปรอิสระ

$\epsilon$  คือ ความคลาดเคลื่อน

## 12. การวิเคราะห์การถดถอย

การวิเคราะห์การถดถอยเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไป ในการวิเคราะห์การถดถอยจะเรียกตัวแปรที่สนใจว่าตัวแปรตาม (dependent variable) ส่วนตัวแปรที่แทนปัจจัยต่างๆ เรียกตัวแปรอิสระ (independent variable) โดยเริ่มพิจารณาว่าตัวแปรตาม และตัวแปรอิสระมีความสัมพันธ์กันในลักษณะใด สร้างรูปแบบการถดถอยเพื่อแทนลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร และสร้างสมการการถดถอย(regression equation) จากรูปแบบที่กำหนดนั้น โดยวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (least squares method) นอกจากนี้สมการการถดถอยที่สร้างขึ้นจะเป็นสมการที่เหมาะสมหรือไม่นั้น จะพิจารณาได้จากค่าสถิติ และการทดสอบสมมติฐานค่าสถิติที่ใช้ เช่น ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination ;  $R^2$ ) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจปรับแล้ว (adjusted coefficient of determination ;  $R^2_{adj}$ ) ส่วนการทดสอบสมมติฐานเป็นการพิจารณาว่ามีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัว มีอิทธิพลหรือ มีส่วนในการอธิบายความผันแปรของตัวแปรตามหรือไม่ (นารัตน์, 2548)

ในการวิเคราะห์การถดถอยเพียง 1 ตัวแปร เราเรียกการวิเคราะห์การถดถอยนี้ว่า การวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย (simple regression analysis) ส่วนกรณีที่มีตัวแปรอิสระมากกว่า 1 ตัวแปรจะเรียกการวิเคราะห์การถดถอยนี้ว่า การวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ (multiple regression analysis)

ข้อกำหนดในการวิเคราะห์การถดถอย

- ก. ข้อมูลตัวแปรตามมีการแจกแจงแบบปกติ
- ข. ค่าเฉลี่ยของค่าคลาดเคลื่อนมีค่าเท่ากับศูนย์
- ค. ความแปรปรวนของค่าคลาดเคลื่อนมีค่าคงที่
- ง. ค่าคลาดเคลื่อนแต่ละตัวเป็นอิสระต่อกัน

### 11.1 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย

เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ 1 ตัว และตัวแปรตาม รูปแบบสมการการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย แสดงดังสมการที่ 2 (วิรัชช, 2546)

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_1 x_i + \varepsilon \quad \dots\dots\dots (3)$$

## 11.2 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ

เป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลที่มีตัวแปรอิสระตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไป ซึ่งเขียนสมการการถดถอยเชิงพหุคูณเมื่อมีตัวแปรอิสระ k ตัว แสดงดังสมการที่ 3 (วิรัชช, 2546)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad \dots\dots\dots (4)$$

### 11.2.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการถดถอยเชิงพหุคูณ

เป็นการทดสอบว่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ( $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ ) มีค่าเท่ากับ 0 หรือไม่ ซึ่งถ้าพบว่ามีอย่างน้อย 1 ค่าที่ไม่เท่า 0 แสดงว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตอบสนอง (Y) และตัวแปรอิสระ ( $X_1, X_2, \dots, X_k$ )

สมมติฐานที่ใช้ทดสอบ คือ

$$H_0 : \beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = 0$$

(ตัวแปรหรือปัจจัยที่ศึกษาไม่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอ็นไซม์)

$$H_1 : \beta_i \text{ อย่างน้อย 1 ค่าที่ไม่เท่ากับ 0}$$

(มีตัวแปรหรือปัจจัยอย่างน้อย 1 ตัว ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอ็นไซม์)

ถ้ายอมรับ  $H_0$  หมายความว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม

ถ้าปฏิเสธ  $H_0$  หมายความว่ามีความสัมพันธ์กับตัวแปรอิสระ  $X_i$  อย่างน้อย 1 ตัวที่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม แสดงว่าสมการการถดถอยที่สร้างสามารถอธิบายการผันแปรของตัวแปรอิสระได้

### 11.2.2 การตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอย

#### 1) Normal probability plot ของค่าคลาดเคลื่อน

เป็นวิธีการสร้างกราฟที่พล็อตค่าของข้อมูลจริงที่เกิดขึ้นกับค่าที่คาดไว้ (expected value) ถ้าข้อมูลตัวอย่างสุ่มมาจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติแล้วค่าที่คาดไว้จะเป็นเส้นตรง และค่าจริงจะอยู่รอบๆ เส้นตรงนั้นโดยค่าที่อยู่เหนือเส้นตรงแสดงว่าค่าจริงมากกว่าค่าที่คาดไว้ ส่วนค่าที่อยู่ใต้เส้นตรง คือค่าที่น้อยกว่าค่าที่คาดไว้ใช้ในการตรวจสอบความคลาดเคลื่อนมีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่

#### 2) การทดสอบความคงที่ของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

เป็นการตรวจสอบความเป็นอิสระหรือความคงที่ของความคลาดเคลื่อนโดยใช้กราฟการกระจาย (scatterplot) ระหว่างค่า regression standardized residual บนแกน Y กับค่า regression predicted value บนแกน X พบว่าจุดมีการกระจายอย่างไม่มีรูปแบบและกระจายรอบศูนย์ แสดงว่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนค่อนข้างคงที่

#### 3) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination ; $R^2$ )

เป็นสัดส่วนหรือเปอร์เซ็นต์ที่ตัวแปรทำนายสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามเขียนเป็นสูตรได้ดังนี้

$$R^2 = \frac{\text{ความผันแปรของ } Y \text{ เนื่องจากอิทธิพลของ } X_1, X_2, \dots, X_k}{\text{ความผันแปรทั้งหมด}}$$

Hu (1999) รายงานว่าสมการที่มักนำไปใช้ควรมีค่า  $R^2$  อย่างน้อย 0.75 หากสูงกว่า 0.90 ถือว่าดีมาก (ค่า  $R^2$  มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดยที่ 0 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ใดๆ ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม แต่ที่ 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างสมบูรณ์) เนื่องจากข้อเสียของสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ คือเมื่อตัวแปรอิสระเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่า  $R^2$  เพิ่มขึ้นตามไปด้วย อีกทั้งในกรณีที่จำนวนข้อมูลในตัวอย่างมีน้อย การพิจารณาค่า  $R^2$  อาจคลาดเคลื่อนเพราะค่า  $R^2$  มีค่า

สูงเกินความเป็นจริง การแก้ไขทำได้โดยใช้ค่า adjust  $R^2$  แทน ซึ่งถ้า adjust  $R^2$  มีค่ามากกว่า 64 เปอร์เซ็นต์ (>0.64) แสดงว่ารูปแบบสมการเหมาะสม

#### 4) การเลือกสมการการถดถอยที่ดีที่สุด

ในการวิจัยเชิงปริมาณตัวแปรอิสระที่นำมาศึกษาจะมีหลายตัวแปร สมการการถดถอยที่เหมาะสมควรเป็นสมการที่มีตัวแปรอิสระน้อยที่สุด และอธิบายความผันแปรของตัวแปรตามได้ดีที่สุด ดังนั้นเมื่อมีตัวแปรอิสระหลายตัวจึงควรเลือกตัวแปรอิสระที่สำคัญ การเลือกตัวแปรอิสระที่สำคัญจะทำได้ด้วยวิธีการเลือกสมการการถดถอยแบบต่างๆ ซึ่งวิธีการเลือกสมการการถดถอยที่ดีที่สุดที่ใช้กันมากได้แก่ วิธีพิจารณาทุกสมการ (all possible regression) วิธีลดตัวแปรอิสระ (backward elimination procedure) วิธีเพิ่มตัวแปรอิสระ (forward selection procedure) และวิธีเพิ่มตัวแปรอิสระแบบขั้นตอน (stepwise procedure) (นารัตน์, 2548)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. อุปกรณ์ในการเลี้ยงเชื้อ

- 1.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง (Sanyo, Belgium)
- 1.2 เครื่องชั่ง (Satorious, Germany)
- 1.3 พีเอชมิเตอร์ (Eutech, Singapore)
- 1.4 เครื่องบ่มแบบเขย่า (Vision Scientific, Korea)
- 1.5 พีเอช โพรบและตัวควบคุม (TOA, Japan)
- 1.6 เครื่องเซนตริฟิวซ์ควบคุมความเย็น (Tomy รุ่น RB-18, Tomy Seiko Co., Ltd., Japan)
- 1.7 เครื่องแก้วสำหรับเลี้ยงเชื้อ (Pyrex, USA)

#### 2. อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- 2.1 เครื่องอเล็กโตรโฟริซิสสำหรับดีเอ็นเอ (Mupid 2 plus, Japan)
- 2.2 เครื่องอเล็กโตรโฟริซิสสำหรับโปรตีน (Hofer SE 260, USA)
- 2.3 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-9200, Reyligh, China)
- 2.4 เครื่องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา (Olympus, Japan)
- 2.5 เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (BioDoc-It System, UVP, USA)
- 2.6 TLC Plate (Silica gel 60, 20×20; Merck)
- 2.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (JEIO TECH, South Korea)
- 2.8 เครื่องผสมสารละลาย (GENIE 2, USA)
- 2.9 เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ (Agilent, USA)

## วิธีการ

### 1. การเตรียมฟางข้าว

เตรียมฟางข้าว โดยลดขนาดฟางข้าวด้วยการสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นบดด้วยเครื่องบด Ball mill และร่อนฟางข้าวด้วยตระแกรงขนาด 40-60 mesh นำฟางข้าวที่ได้ไปล้างในน้ำปะปาเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำฟางข้าวมาปรับสภาพด้วยด่าง NaOH ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งฟางข้าว 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 1 ลิตร แล้วเติม 1 % NaOH ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มสารละลายฟางข้าวที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างฟางข้าวด้วยน้ำปะปา จนกระทั่งฟิเอชเป็นกลาง แล้วนำฟางข้าวไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ส่งฟางข้าวที่ไม่ปรับสภาพและฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างไปวิเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ที่ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตารางที่ 4 แสดงองค์ประกอบต่าง ๆ ในฟางข้าวที่ไม่ปรับสภาพและฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยด่าง

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของฟางข้าวที่ไม่ปรับสภาพและฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง

	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)	Ash (%)	Total (%)
Untreated rice straw	44.11	25.01	7.86	13.78	90.76
NaOH-pretreated rice straw	58.11	21.68	4.15	8.95	92.89

### 2. เชื้อจุลินทรีย์

#### 2.1 เชื้อแอกติโนมัยสิต

เชื้อแอกติโนมัยสิตที่ใช้ในการทดลอง คือ *Microbispora siamensis* DMKUA 245<sup>T</sup> ซึ่งเป็นเชื้อแอกติโนมัยสิตท่อนร้อนชนิดใหม่ ที่มีการรายงานการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลลานเนส (Boondaeng *et al.*, 2009)

## 2.2 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ได้คัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซแลนจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกสร้างสปอร์ จำนวน 180 สายพันธุ์ ที่เก็บรักษาในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

### 3. การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกสร้างสปอร์ที่มีความสามารถย่อยสลายไซแลน

นำเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกสร้างสปอร์จำนวน 180 สายพันธุ์ ที่เจริญบนอาหาร NA (Nutriment Agar) pH 7 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไซแลน ด้วยวิธีการจุดเชื้อ (point inoculation) ลงบนอาหารแข็ง xylan medium ซึ่งประกอบด้วยสารอาหาร ดังนี้ ไซแลน (Birchwood xylan, Sigma) 5 กรัมต่อลิตร,  $K_2HPO_4$  1 กรัมต่อลิตร,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 กรัมต่อลิตร, เปปโตน 1 กรัมต่อลิตร และวุ้น 15 กรัมต่อลิตร จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ราดสี Congo red ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 15 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที สังเกตความสามารถในการย่อยสลายไซแลนจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีเชื้อ บันทึกระยะเวลาความกว้างของโคโลนีเชื้อ และบริเวณใส

คัดเลือกเชื้อแกรมบวกสร้างสปอร์สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายไซแลนบนอาหารแข็ง เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสในอาหารเหลวซึ่งมีฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างเป็นองค์ประกอบ

### 4. ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสในอาหารเหลวที่มีฟางข้าวเป็นองค์ประกอบ

#### 4.1. การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อสำหรับทดสอบ โดยนำเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสร้างสปอร์ที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 3 มาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (pH 7) บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง จากนั้นวัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วย เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความขุ่น 0.7 เพื่อใช้เป็นกัลลาเชื้อเริ่มต้น

#### 4.2. ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดส

ถ่ายกัลลาเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเหลว ซึ่งประกอบด้วยสารอาหาร ดังนี้ ฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยค่าต่าง 10 กรัมต่อลิตร,  $K_2HPO_4$  1 กรัมต่อลิตร,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 กรัมต่อลิตร และเปปโตน 1 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนส เบต้าไซโลซิเดส

คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสได้สูงสุดเพื่อศึกษาการเหนี่ยวนำ การผลิตและสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ในการทดลองต่อไป

### 5. การระบุชนิดของแบคทีเรีย

#### 5.1 ศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรียและลักษณะ โคลโลนิ

ศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียโดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ลงบนอาหาร NA slant บ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษา ลักษณะทางพื้นฐานวิทยาของเชื้อบริสุทธิ์โดยการตรวจลักษณะการเจริญ ลักษณะ โคลโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 5.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา ได้แก่ การทดสอบ VP การเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ความสามารถในการใช้ซิงค์และโพแทสเซียม การเจริญในอาหาร NB + NaCl 5% 7% และ 10% การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง เคซีน และเจลาติน การรีดิวส์ไนเตรท การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต เช่น ดี(+)-กลูโคส แอล(-)-อะราบีโนส ดี(+)-ไซโลส ดี(+)-แมนนิทอล และแลคโตส เป็นต้น ตามวิธีการของ Gordon (1989) ตรวจสอบบันทึกผลเป็นผลบวกหรือลบ

### 5.3 การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของยีนบริเวณ 16S rRNA

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกสร้างสปอร์สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกในอาหาร Luria-Bertani medium (LB medium) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำใส่ทิ้ง จากนั้นทำการสกัดแยกดีเอ็นเอโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Pospiech and Neumann (1995) โดยแขวนลอยตะกอนเซลล์ใน SET buffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA และ 20 mM Tris-HCl) 0.5 มิลลิลิตร เติม lysozyme (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร นำไป vortex แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม proteinase K ปริมาตร 14 ไมโครลิตร และ SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของ proteinase K เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ SDS เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์) ผสมให้เข้ากันโดยวิธีการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยวิธีการกลับหลอดไปมา ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่อมาเติม chloroform ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยวิธีการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol และผสมโดยวิธีการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย EtOH ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้แห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer (10 mM Tris และ 1 mM EDTA·2Na พีเอช 8) ปริมาตร 100-200 ไมโครลิตร (เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส)

เพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 16S rRNA จากดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ไพรเมอร์ 27F, 1541R, 518F และ 1429R (Lane, 1991; Anzai *et al.*, 1997) นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในบริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Eztaxon (Chun *et al.*, 2007) หลังจากนั้นนำข้อมูลที่คล้ายกันของลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแกรมบวกสร้างสปอร์สายพันธุ์เปรียบเทียบ (Type strain) ที่มีความใกล้เคียงกันทำ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW ซึ่งอยู่ในชุดโปรแกรม BioEdit จากนั้นใช้โปรแกรม MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) สร้างต้นไม้วิวัฒนาการชาติพันธุ์จากข้อมูลความแตกต่างของลำดับเบส โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) ประเมินค่าความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 ครั้ง (Felsenstein, 1985) ระยะห่างของลำดับเบส (Distance) ถูกคำนวณโดย Kimura 2-parameter (Kimura, 1980)

## 6. การศึกษาการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เบต้าไซลาเนสของเชื้อแบคทีเรีย *B. pumilus* DMKUB39 และเชื้อแอกติโนมัยสีท *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup>

### 6.1. การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> โดยการเพาะเลี้ยง *M. siamensis* DMKUA 245<sup>T</sup> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 (pH 7) และบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง จากนั้นวัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้ได้เท่ากับ 0.7 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น สำหรับการเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* DMKUB39 ให้ใช้วิธีตามข้อ 4.1

### 6.2. ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลาเนส

ถ่ายกล้าเชื้อ *M. siamensis* DMKUA 245<sup>T</sup> และ *B. pumilus* DMKUB 39 ที่เตรียมได้จากข้อ 6.1 ปริมาณ 10 % ในอาหาร basal medium ซึ่งประกอบด้วยสารอาหารดังนี้ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 กรัมต่อลิตร, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.2 กรัมต่อลิตร, เปปโตน 1 กรัมต่อลิตร และแหล่งคาร์บอน 10 กรัมต่อลิตร โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ไชเลน กลูโคส ไซโลส กาแลคโตส มอล

โตส แมนนิทอล ฟรุกโตส ซอบิทอล แลคโตส ไซลิตอล ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ เซลโลไบโอส และไซโอไบโอส ทำการบ่มเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับ *M. siamensis* DMKUA 245<sup>T</sup> นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ออก ส่วนใสนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนส และน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

คัดเลือกน้ำตาลที่มีสามารถในการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB 39 และ *M. siamensis* DMKUA 245<sup>T</sup> ได้สูงและต่ำที่สุด เพื่อนำไปศึกษาการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ในการทดลองข้อที่ 6.3 ต่อไป

6.3 ศึกษาผลการเติมน้ำตาลที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> และ *B. pumilus* DMKUB39 ในอาหาร basal medium ที่มีไซแลนความเข้มข้น 1 % โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเติมน้ำตาลที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 6.2 ซึ่งผ่านการกำจัดเชื้อแล้ว ลงไปในพลาสติกอาหารให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำตาลเป็น 1 % และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อต่ออีก 2 วัน เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนส

7. การศึกษาปัจจัยและค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดส

7.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

การเตรียมกล้าเชื้อของ *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ทำตามวิธีการในข้อ 4.1 สำหรับการเตรียมกล้าเชื้อผสม นำกล้าเชื้อเดี่ยวของแต่ละสายพันธุ์มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 และใช้กล้าเชื้อผสมปริมาณ 10 % เพื่อทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในการทดลองต่อไป

7.2 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

ถ่ายกล้าเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ที่เตรียมได้จากข้อ 7.1 ปริมาณ 10 % ในอาหาร basal medium ซึ่งประกอบด้วยสารอาหาร ดังนี้ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่า 10 กรัมต่อลิตร,  $K_2HPO_4$  1 กรัมต่อลิตร,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน 10 กรัมต่อลิตร โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ peptone, beef extract, casein, gelatin, urea, tryptone, yeast extract,  $NH_4Cl$ ,  $NH_4NO_3$  และ  $(NH_4)_2SO_4$  ทำการบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลันเนสและเบต้าไซโลซิเดส

7.3 การศึกษาปัจจัยและค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

7.3.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนสและเบต้าไซโลซิเดส โดยวิธี Plackett-Burman design

ทำการคัดเลือกชนิดของสารอาหารและปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman ปัจจัยที่ทำการศึกษามีทั้งหมด 9 ปัจจัย ได้แก่ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่า ( $X_1$ ), peptone ( $X_2$ ),  $K_2HPO_4$  ( $X_3$ ),  $KH_2PO_4$  ( $X_4$ ),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $X_5$ ),  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  ( $X_6$ ), อุณหภูมิ ( $X_7$ ), ความเร็วรอบ ( $X_8$ ) และพีเอชเริ่มต้น ( $X_9$ ) โดยแต่ละปัจจัยจะทำการศึกษา 2 ระดับ ได้แก่ ระดับต่ำ (-1) และระดับสูง (+1) ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การกำหนดระดับต่ำ (-) และระดับสูง (+) ของชนิดสารอาหารและปัจจัยที่ศึกษาเพื่อใช้กำหนดแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman

Variables	Level	
	Low (-)	High (+)
$X_1$ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง (g/l)	5	30
$X_2$ Peptone (g/l)	0.5	2.5
$X_3$ $K_2HPO_4$ (g/l)	0.1	2
$X_4$ $KH_2PO_4$ (g/l)	0.1	2
$X_5$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/l)	0.1	0.3
$X_6$ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (g/l)	0	0.238
$X_7$ อุณหภูมิ ( $^{\circ}C$ )	37	42
$X_8$ ความเร็วรอบ (rpm)	100	200
$X_9$ พีเอชเริ่มต้น	7	9

เมื่อนำปัจจัยที่ต้องการศึกษาในระดับต่ำ (-1) และระดับสูง (+1) ที่กำหนดได้ไปออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี Plackett-Burman ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 12 การทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 6 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมของ *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ตามการทดลองที่ออกแบบการทดลองไว้ โดยเพาะเลี้ยงในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าตามความเร็วรอบที่กำหนด เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยทำการทดลองละ 3 ซ้ำ และทำการเก็บตัวอย่างโดยนำมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที หลังจากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปหากิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสและเบต้าไซลานเนส จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS Statistics 17.0 (Statsoft, USA) และนำตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสและเบต้าไซลานเนส ไปศึกษาเพื่อหาค่าที่เหมาะสมต่อไปด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

ตารางที่ 6 แบบการทดลองในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลาลเนสโดยใช้แผนการทดลอง Plackett-Burman

Run no.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
2	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
3	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
4	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
5	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
6	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
7	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
8	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
9	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
10	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
11	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

7.3.2 การหาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลาลเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม โดยใช้วิธีพินผิวตอบสนอง

นำเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 มาศึกษาปัจจัยร่วมที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลาลเนสและเบต้าไซโลซิเดสด้วยวิธีพินผิวตอบสนอง ในการศึกษานี้ได้ใช้รูปแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) โดยปัจจัยที่จะนำมาศึกษามาจากการทดลองข้อที่ 7.3.1 ซึ่งพบว่าเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลาลเนสและเบต้าไซโลซิเดสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) โดยแต่ละปัจจัยที่ทำการศึกษาก็จะแบ่งออกเป็น 5 ระดับ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ตามแบบการทดลองที่ได้ออกแบบไว้ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าตามความเร็ว

รอบที่กำหนดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ และทำการเก็บตัวอย่างโดยการปั่นเหวี่ยงเซลล์ออก หลังจากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปหากิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดส จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ Statistica 10.0 software (Statsoft, USA) นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้หาสมการถดถอยแบบพหุคูณ (multiple regressions) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสกับปัจจัยที่นำมาศึกษา โดยใช้โปรแกรม Statistica 10.0 software (Statsoft, USA) หลังจากนั้นนำไปทำนายค่าของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสได้สูงสุดโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ Statistica 10.0 software (Statsoft, USA).

## 8. การศึกษาการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ในถังหมักแบบกวนขนาด 1 ลิตร

### 8.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

การเตรียมกล้าเชื้อผสมโดยทำตามวิธีการในข้อ 7.1 เพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสในถังหมักแบบกวน

### 8.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อผสมในถังหมักแบบกวน

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมในถังหมักแบบกวนขนาด 1 ลิตร ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 0.5 ลิตร โดยทำการถ่ายหัวเชื้อ (จากข้อ 8.1) ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในถังหมักแบบกวนขนาด 1 ลิตร ซึ่งภายในถังหมักประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดส และควบคุมอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ควบคุมอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อนำตัวอย่างไปวัดการเจริญของเชื้อและวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดส

## 9. การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสที่ผลิตจากเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

### 9.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

หากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยบ่ม Crude enzyme ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับไซแลนที่ละลายอยู่ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์เบต้าไซลานเนส และเบต้าไซโลซิเดสที่เกิดขึ้น

### 9.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์

บ่ม Crude enzyme ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสที่เหลือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

### 9.3 ศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่เจือจางอยู่ในบัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ ชิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.0, 3.5 และ 4.0 อะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5 ชิเตรทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0, 7.5 และ 8.0 ทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.0, 8.5 และ 9.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาบ่มกับไซแลนที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์พีเอชนั้น ๆ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสที่เกิดขึ้น

### 9.4 ศึกษาผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์

นำเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาบ่มกับบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ ได้แก่ ชิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.0, 3.5 และ 4.0 อะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น

0.1 โมลาร์ พีเอช 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5 ซิเตรทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0, 7.5 และ 8.0 ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.0, 8.5 และ 9.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ

## 10. การวิเคราะห์

### 10.1 กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนส

ตรวจสอบกิจกรรมของไซลานเนสโดยใช้สารละลายไซแลน (Birchwood xylan, Sigma) เป็นสับสเตรท โดยตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยวิธี DNS (dinitrosalicylic acid) (Miller, 1972) โดยใช้ไซโลส (Sigma-Aldrich Inc. Germany) เป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

### 10.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส

ตรวจสอบกิจกรรมเบต้าไซโลซิเดส โดยใช้ *p*-nitrophenyl- $\beta$ -xylopyranoside เป็นสับสเตรท ตรวจวัดปริมาณ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้ *p*-nitrophenol (Sigma-Aldrich Inc., Germany) เป็นสารละลายมาตรฐาน

### 10.3 ปริมาณโปรตีน

ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเอนไซม์โดยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) และใช้สารละลาย Bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน

### 10.4 วิธี SDS-PAGE

นำสารละลายเอนไซม์มาตรวจสอบขนาดของโปรตีน โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีการของ Laemmli *et al.* (1970)

### 10.6 การวัดการเจริญของแบคทีเรีย

นำสารละลายเซลล์มาเจือจางในสารละลายชนิดเดียวกันให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมแล้วนำไปนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนี

### 10.7 การหาน้ำหนักแห้ง

10.7.1 นำหลอดเซนทรีฟิวส์บที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งที่แน่นอน

10.7.2 จากนั้นนำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนทรีฟิวส์ที่เตรียมไว้แล้วเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

10.7.3 หลอดเซนทรีฟิวส์บที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งที่แน่นอน ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่

## ผลและวิจารณ์

### 1. ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน

ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน จากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสร้างสปอร์ทั้งหมด 180 สายพันธุ์ ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่ FB11, KMS 2.1-1, KMS 2.2-1, A5, DMKUB12, DMKUB24, DMKUB25, DMKUB39, DMKUB54, DMKUB75, DMKUB76, DMKUB90, DMKUB103, DMKUB119, DMKUB135, DMKUB142, DMKUB143, DMKUB153, DMKUB157 และ DMKUB160 ที่สามารถย่อยสลายไขมันบนอาหารแข็งได้ โดยสังเกตจากการเกิดบริเวณใสรอบ ๆ โคลินิของเชื้อ อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคลินิ ของแบคทีเรียทั้ง 20 สายพันธุ์ แสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ความสามารถในการย่อยสลายไขมันบนอาหารแข็งของแบคทีเรีย 20 สายพันธุ์

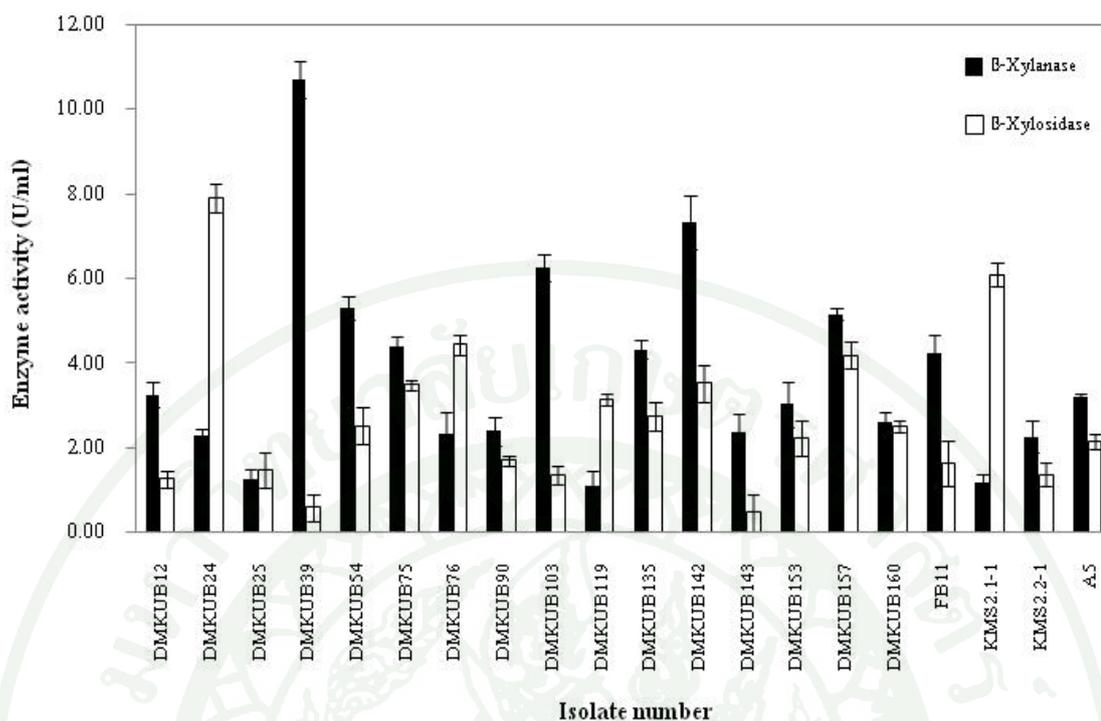
สายพันธุ์จุลินทรีย์	อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสต่อ เส้นผ่านศูนย์กลางโคลินิ
DMKUB12	1.25
DMKUB24	2.13
DMKUB25	1.20
DMKUB39	2.70
DMKUB54	1.50
DMKUB75	2.14
DMKUB76	1.30
DMKUB90	2.43
DMKUB103	1.06
DMKUB119	2.14
DMKUB135	2.08
DMKUB142	1.05
DMKUB143	1.30

## ตารางที่ 7 (ต่อ)

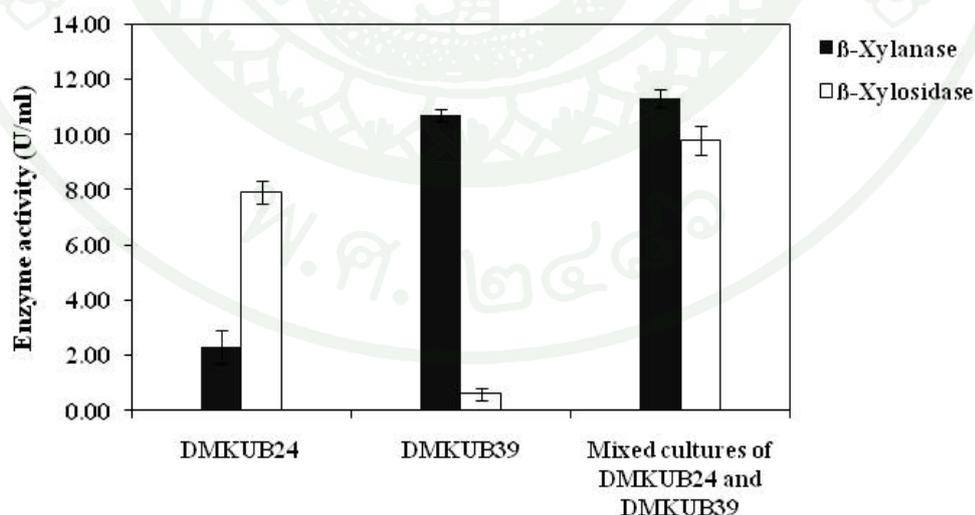
สายพันธุ์จุลินทรีย์	อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสต่อ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี	
	DMKUB153	1.66
DMKUB157	1.20	
DMKUB160	1.94	
FB11	1.24	
KMS 2.1-1	1.30	
KMS 2.2-1	1.85	
A5	1.03	

## 2. ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสในอาหารเหลวที่มีฟางข้าวเป็นองค์ประกอบ

จากการนำเชื้อแบคทีเรียจำนวน 20 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 1 ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายไซแลนบนอาหารแข็ง มาทดสอบการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสในอาหารเหลวที่มีฟางข้าวเป็นองค์ประกอบ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ DMKUB24 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 7.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้เท่ากับ 2.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ DMKUB39 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 10.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสได้เท่ากับ 0.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4) จากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว จึงทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ไปศึกษาการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสในการทดลองต่อไป นอกจากนี้จากการทดลองเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างสายพันธุ์ DMKUB24 และ DMKUB39 ในอาหาร basal medium ที่มีฟางข้าวเป็นองค์ประกอบ พบว่าเชื้อผสมมีการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสสูงสุดเท่ากับ 11.3 และ 9.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าการผลิตเอนไซม์ทั้งสองในเชื้อเดี่ยวแต่ละชนิด (ภาพที่ 5)



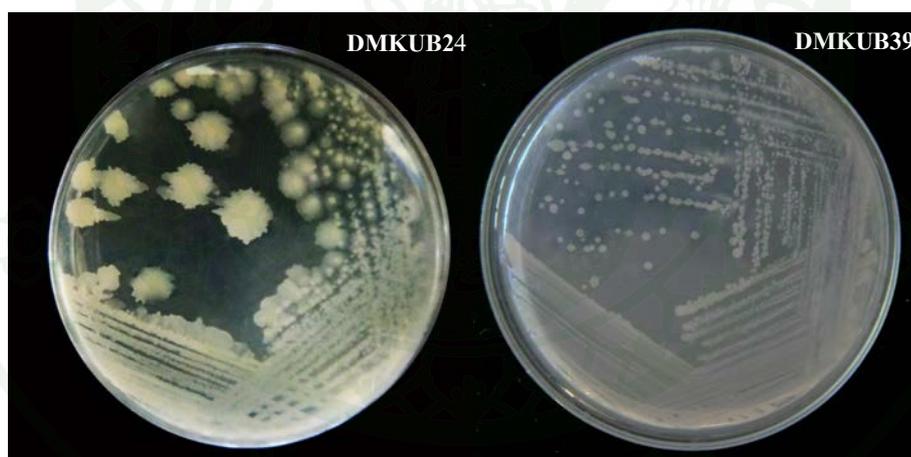
ภาพที่ 4 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อแบคทีเรีย 20 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวซึ่งมีฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างเป็นองค์ประกอบ



ภาพที่ 5 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อเดี่ยวสายพันธุ์ DMKUB24 สายพันธุ์ DMKUB39 และเชื้อผสมระหว่างสองสายพันธุ์ ในอาหารเหลวซึ่งมีฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างเป็นองค์ประกอบ

### 3. การระบุชนิดของแบคทีเรีย

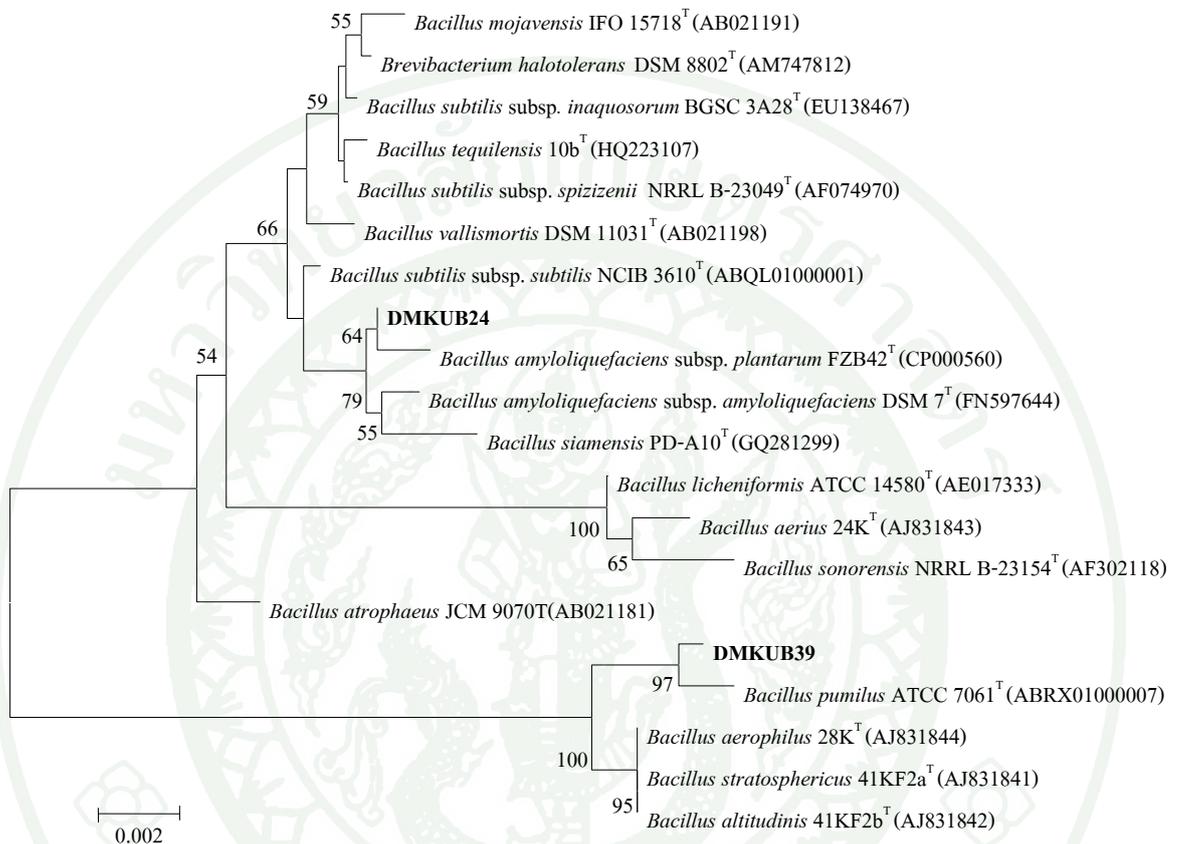
นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งได้แก่ DMKUB24 และ DMKUB39 มาดูลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหาร Nutrient Agar (NA) พบว่า สายพันธุ์ DMKUB24 มีลักษณะโคโลนีสีครีม ขุ่น รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ผิวหน้าโคโลนีเป็นคลื่นเล็กน้อย ในขณะที่ สายพันธุ์ DMKUB39 มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น รูปร่างกลม ขอบเรียบ โคโลนีขนาดเล็กน้อย (ภาพที่ 5) ถึงแม้ว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์จะมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่เพื่อทำการวิเคราะห์หาสายพันธุ์ที่แน่นอน จึงได้ทำการทดสอบทางชีวเคมีบางประการตามวิธีของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (ตารางที่ 12) และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนบริเวณ 16s rRNA โดยการสกัด DNA แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนบริเวณ 16s rRNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F, 1541R, 518F และ 1429R จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบหาสายพันธุ์ของแบคทีเรียกับฐานข้อมูลของ Genbank ร่วมกับผลที่ได้จากการทดสอบชีวเคมีต่อไป



ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ DMKUB24 และ DMKUB39 ที่เลี้ยงบนอาหาร NA medium

จากการวิเคราะห์ลำดับเบส 16s rRNA ที่ได้ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวภาพเพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ DMKUB39 (accession number KF673350) มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus pumilus* ATCC7061T (accession number ABRX01000007) 99.46% และสายพันธุ์ DMKUB24 (accession number KF673349) มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus*

*amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42T (accession number CP000560) 99.87% นำเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ DMKUB24 และ DMKUB39

เมื่อตรวจสอบสมบัติทางชีวเคมี (ตารางที่ 8) พบว่าเชื้อสายพันธุ์ DMKUB24 ให้ผลการทดสอบตรงกับ การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ DMKUB39 ให้ผลการทดสอบตรงกับ การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *B. pumilus* ดังนั้นจากผลของการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rRNA และการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ตรงกัน สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อสายพันธุ์ DMKUB24 คือ *B. amyloliquefaciens* และเชื้อสายพันธุ์ DMKUB39 คือ *B. pumilus*

ตารางที่ 8 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ DMKUB24 และ DMKUB39  
เปรียบเทียบกับ *B. amyloliquefaciens* และ *B. pumilus*

คุณสมบัติ	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย			
	DMKUB24	<i>B. amyloliquefaciens</i> <sup>1</sup>	DMKUB39	<i>B. pumilus</i> <sup>1</sup>
การทดสอบ VP	+	+	+	+
pH ในอาหาร VP	5.50	ND	5.1	4.8-5.5
การเจริญใน anaerobic agar	-	-	-	-
ทดสอบการ Motile	+	+	+	+
การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	+	+	-	-
การเจริญใน NB + NaCl				
5%	+	+	+	ND
7%	+	+	+	+
10%	-	D	-	ND
การเจริญใน NB pH 5.7	+	+	+	+
การผลิตกรดจาก				
ดี(+)-กลูโคส	+	+	+	+
แอล(-)-อะราบีโนส	+	+	+	+
ดี(+)-ไซโลส	+	+	+	+
ดี(+)-แมนนิทอล	+	+	+	+
แลคโตส	+	+	-	-
การใช้				
ซิเตรท	+	+	+	+
โพρφิโรเนต	-	-	-	-
การย่อยสลาย				
แป้ง	+	+	-	-
เอสคิวรีน	+	+	+	+
ฟีนอลอะลานีน	-	-	+	+
ไทโรซีน	-	-	-	-
ทวิน 80	+	+	+	+
เจลาติน	+	+	+	+
เคซีน	+	+	+	+

หมายเหตุ + คือ การทดสอบที่ให้ผลบวก - คือ การทดสอบที่ให้ผลลบ D คือการทดสอบที่ให้ผล  
ผันแปร ND=ไม่พบข้อมูล

<sup>1</sup>ที่มา: Bergey's manual of Systematic bacteriology, second edition volume three (2009)

#### 4. ผลการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 และ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup>

##### 4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39

เมื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญและการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อแบคทีเรีย *B. pumilus* DMKUB39 โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพเขย่าในอาหาร basal medium ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ ไชแลน กลูโคส ไชโลส กาแลคโตส มอลโตส แมนนิทอล ฟรุคโตส ซอบิทอล แลคโตส ไชลิทอล ไชโลโอลิโกแซคคาไรด์ เซลโลไบโอส และไซโอไบโอส ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีน้ำหนักแห้งระหว่าง 0.9-5.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 9) ส่วนในอาหารที่มีไชแลนเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. pumilus* DMKUB39 สามารถเจริญเติบโตได้เช่นเดียวกัน แต่การหาน้ำหนักแห้งยังไม่แม่นยำเนื่องจากยังมีตะกอนของไชแลนปะปนอยู่นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหารที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนก็มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. pumilus* DMKUB39 ทั้งนี้เนื่องมาจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมี casein เป็นส่วนประกอบ ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนแทนได้

สำหรับการสร้างเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 นั้นพบว่าเมื่อใช้ไชแลนเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้ 17.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนในอาหารที่มีกลูโคสนั้น เชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ผลิตเอนไซม์ได้รองลงมาคือ 5.38 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สำหรับแหล่งคาร์บอนอื่นได้แก่ แมนนิทอล กาแลคโตส ไชโลส มอลโตส ฟรุคโตส ซอบิทอล แลคโตส ไชลิทอล ไชโลโอลิโกแซคคาไรด์ เซลโลไบโอส และไซโอไบโอส และในอาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน เชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณต่ำระหว่าง 0.3-4.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 9) และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนส

ตารางที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *B. pumilus* DMKUB39 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในสภาพเขย่า

Carbon source	Dry weight (mg/ml)	$\beta$ -Xylanase activity (U/ml)
Xylan	ND	17.7 $\pm$ 0.4
Xylooligosaccharides	4.02 $\pm$ 0.02	3.78 $\pm$ 0.9
Xylobiose	4.97 $\pm$ 0.05	4.34 $\pm$ 0.8
Xylose	3.10 $\pm$ 0.06	0.33 $\pm$ 0.7
Xylitol	4.12 $\pm$ 0.06	4.23 $\pm$ 0.2
Glucose	5.88 $\pm$ 0.07	5.38 $\pm$ 0.1
Galactose	2.20 $\pm$ 0.08	3.14 $\pm$ 0.4
Maltose	1.23 $\pm$ 0.02	2.10 $\pm$ 0.9
Manitol	0.97 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.5
Fructose	2.22 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.7
Sorbitol	3.34 $\pm$ 0.06	1.64 $\pm$ 0.5
Lactose	3.97 $\pm$ 0.02	2.37 $\pm$ 0.6
Cellobiose	3.06 $\pm$ 0.03	1.89 $\pm$ 0.4
None	0.92 $\pm$ 0.09	0.11 $\pm$ 0.3

หมายเหตุ ND = ไม่ได้ทำการตรวจวัด

4.2 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup>

จากการศึกษาการเจริญและการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> ซึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพเขย่าในอาหาร basal medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่าเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> เจริญได้ดีในอาหารที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกับเชื้อ *B. pumilus* DMKUB

39 โดยมีน้ำหนักแห้งระหว่าง 3.0-5.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 10) ส่วนในอาหารที่มีไซแลนพบว่าเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> สามารถเจริญเติบโตได้เช่นเดียวกัน

สำหรับการสร้างเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> พบว่าเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างเอนไซม์ได้ 9.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนในอาหารที่มีแมนนิทอลนั้น เชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> สร้างเอนไซม์ได้รองลงมาคือ 3.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร แหล่งคาร์บอนอื่นได้แก่ กาแล็คโตส กลูโคส ไซโลส มอลโตส ฟรุคโตส ซอบิทอล แลคโตส ไซลิตอล ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ เซลโลไบโอส และไซโอไบโอส และในอาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนนั้นเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณต่ำระหว่าง 0.3-1.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 10) และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนส

**ตารางที่ 10** กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในสภาพเยว้า

Carbon source	Dry weight (mg/ml)	β-Xylanase activity (U/ml)
Xylan	ND	9.44 ± 0.6
Xylooligosaccharides	3.34 ± 0.03	0.51 ± 1.6
Xylobiose	3.86 ± 0.05	0.58 ± 1.1
Xylose	3.10 ± 0.06	0.18 ± 1.0
Xylitol	3.23 ± 0.07	0.47 ± 1.2
Glucose	1.26 ± 0.03	0.39 ± 0.6
Galactose	4.20 ± 0.02	1.27 ± 0.7
Maltose	3.23 ± 0.08	0.40 ± 0.7
Manitol	5.98 ± 0.04	3.54 ± 0.8
Fructose	3.57 ± 0.12	0.73 ± 0.2
Sorbitol	3.45 ± 0.05	0.77 ± 0.4
Lactose	3.27 ± 0.03	0.54 ± 1.2

## ตารางที่ 10 (ต่อ)

Carbon source	Dry weight (mg/ml)	$\beta$ -Xylanase activity (U/ml)
Cellobiose	3.67 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.7
None	1.02 $\pm$ 0.06	0.02 $\pm$ 0.4

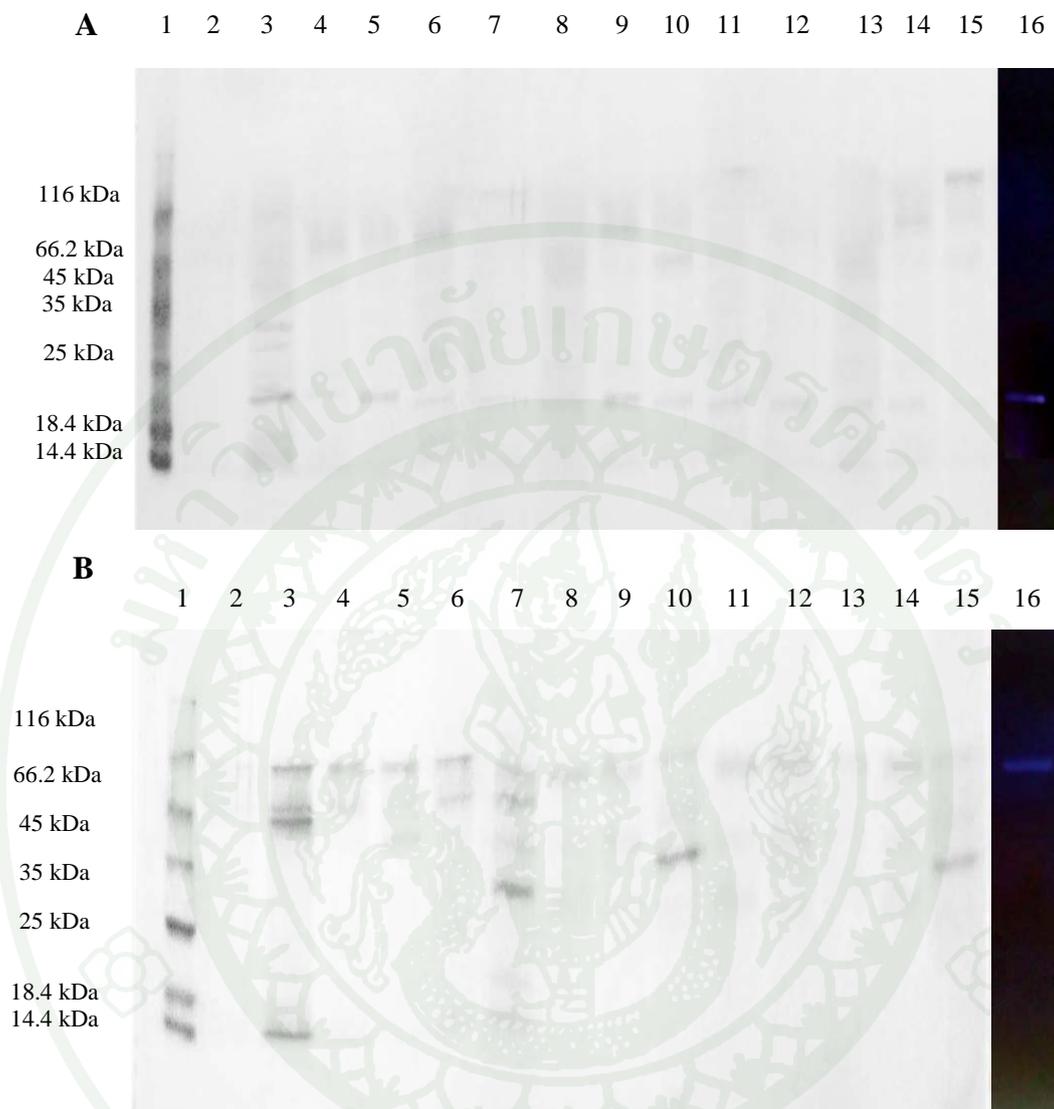
หมายเหตุ ND = ไม่ได้ทำการตรวจวัด

จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 และ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> เจริญได้ดีในแหล่งอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ และสามารถเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้ดีเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 และ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> ยังสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและแมนนิทอลเป็นสารเหนี่ยวนำได้ ตามลำดับ แต่ประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไซแลน สำหรับน้ำตาลชนิดอื่นๆ ที่เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นก็พบว่าเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 และ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> สามารถสร้างเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้ในปริมาณเล็กน้อย เอนไซม์ส่วนนี้จึงเป็นเอนไซม์ประเภท constitutive ซึ่งเซลล์มีการผลิตอยู่ตลอดเวลาแต่มีปริมาณน้อย นอกจากนี้จากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า การเหนี่ยวนำของเชื้อในกลุ่มแอกติโนมัยซีทและแบคทีเรียมีความแตกต่างกัน ถึงแม้ว่าเชื้อทั้งสองจะมีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามมีการรายงานการเหนี่ยวนำเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *B. circulans* B<sub>6</sub> พบว่าการเติมไซแลน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร basal medium มีผลเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 3.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร (สันทณีย์, 2541)

เมื่อนำน้ำใสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 และ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ มาทำ SDS-PAGE พบว่าแต่ละแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้ และแหล่งคาร์บอนทุกชนิด มีการผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20 และ 66.2 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ และ 8B (เลนที่ 2-15) แต่เมื่อนำน้ำใสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 และ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> มาทำ active-PAGE พบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสเฉพาะในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสในอาหารเหลวไซแลนมีปริมาณสูง จึงสามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ผ่านการทำ

active- PAGE ได้ ดังแสดงในภาพที่ 8A และ 8B (เลนที่ 16) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเชื้อ *Bacillus* sp. strain K-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี ไชแลน 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีไซลเนส 2 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 23 และ 45 กิโลดาลตัน (Ratanakhanokchai และคณะ, 1999) สำหรับเชื้อ *Cellulomonas* sp. N.C.I.M. 2353 มีรายงานว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารไชแลนสามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ได้ 3 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุล 23, 33 และ 53 กิโลดาลตัน (Chaudhary และ Deobagkar, 1997)





ภาพที่ 8 SDS-PAGE และ active-PAGE ของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 (A) และ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> (B) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

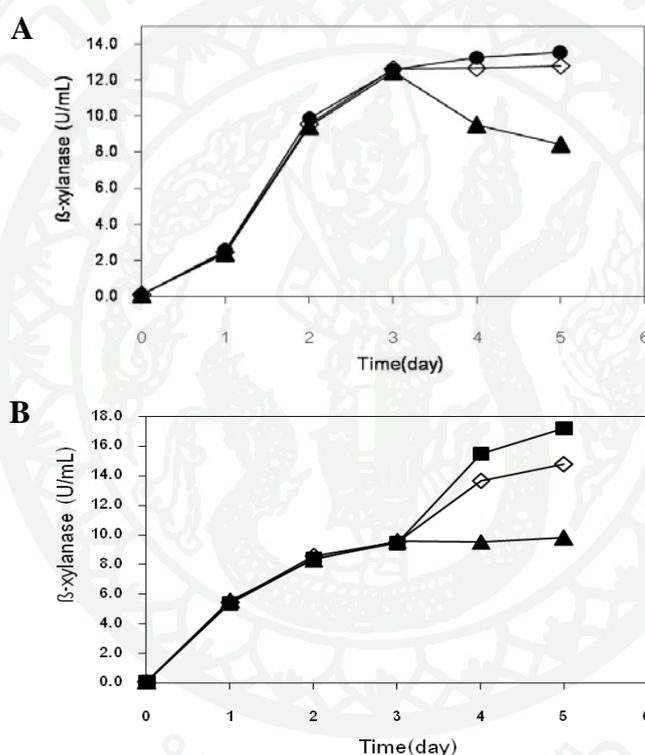
- |  |             |                         |
|--|-------------|-------------------------|
| 1. Marker  | 6. มอลโตส   | 11. กลูโคส              |
| 2. ไม่มีแหล่งคาร์บอน   | 7. แมนนิทอล | 12. ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ |
| 3. ไซแลน   | 8. ฟรุคโตส  | 13. เซลโลไบโอส          |
| 4. ไซโลส   | 9. ซอบิทอล  | 14. ไซโอไบโอส           |
| 5. กาแลคโตส  | 10. แลคโตส  | 15. ไซลิตอล             |
| 16. active-PAGE ของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวไซแลน |             |                         |

#### 4.3.2 ผลของการเติมน้ำตาลแมนนิทอลและไซโลสลงในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อ *M.siamensis* DMKUA245<sup>T</sup>

จากผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส ของเชื้อ *M.siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> พบว่าน้ำตาลแมนนิทอลมีความสามารถในการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสรองลงมาจากไซแลน ในขณะที่การใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสต่ำที่สุด ดังนั้นจึงนำน้ำตาลทั้งสองชนิดดังกล่าว มาศึกษาการเหนี่ยวนำและการยับยั้งการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ *M.siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> ในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 3 วัน เชื้อมีการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสสูงสุดที่ 9.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเติมสารละลายแมนนิทอลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ และเพาะเลี้ยงเชื้อต่อจนครบ 5 วัน เพื่อดูการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส พบว่าเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> ยังคงมีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเท่ากับ 17.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเติมน้ำตาลไซโลสเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> กลับมีการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสลดลงเหลือเพียง 8.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงไว้ในภาพที่ 9B

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 และ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> มีผลให้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสลดลง โดยไปมีผลยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์เบต้าไซลานเนสที่ถูกเหนี่ยวนำโดยไซแลน ปรากฏการณ์นี้เป็นลักษณะของการเกิด enzyme repression ตามที่อธิบายกลไกการสังเคราะห์ในเชื้อยีสต์ *Cryptococcus albidus* (Biely, 1985) ผลการทดลองนี้คล้ายกับกับผลการทดลองของ Kyu *et al.* (1994) ซึ่งกล่าวว่าเชื้อ *B. circulans* B<sub>6</sub> สร้างเอนไซม์ในอาหารที่มีไซโลสช้ากว่าในอาหาร ไซแลนและเมื่อเติมไซโลส 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงในอาหารไซแลน มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสลดลงเล็กน้อย โดยที่ 72 ชั่วโมงเป็นเวลาเชื้อสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดในอาหาร ไซแลน โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 5.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร ขณะที่ในอาหารไซแลนที่มีการเติมไซโลสมีกิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลานเนสเพียง 4.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มเวลาเลี้ยงเชื้อเอนไซม์เบต้าไซลานเนสกลับลดลง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Pou-Llinas and Driguez (1987) พบว่าเชื้อ *Pullularia pullulans* สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้โดยการใส่ไซโลส

ในขณะที่เดียวกันการเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 และการเติมแมนนิทอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสเพิ่มขึ้น ซึ่งปรากฏการดังกล่าวเป็นลักษณะของการเกิด enzyme induction Amare and Gashaw, 1999 ได้รายงานการว่า การใช้น้ำตาลกลูโคสสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ *Bacillus* sp. AR-009 ได้ ในขณะที่ Maria *et al.*, 1990 รายงานการใช้น้ำตาลผสมกลูโคสและไซโลสในการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส *Aspergillus terreus*



ภาพที่ 9 ผลการเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ลงในอาหารไซแลนต่อการเหนี่ยวนำเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 (A) และ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> (B) ภายหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารไซแลนเป็นเวลา 3 วัน

- ◇ อาหารไซแลน
- อาหารไซแลนที่เติมแมนนิทอล
- ▲ อาหารไซแลนที่เติมไซโลส
- อาหารไซแลนที่เติมกลูโคส
- ↓ วันที่เติมน้ำตาล

## 5. ปัจจัยและค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

จากผลของการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่าต่าง โดยใช้เชื้อเดี่ยว *B. pumilus* DMKUB39 *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 และเชื้อผสมของทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสได้มากกว่าการเลี้ยงเชื้อเดี่ยวแต่ละชนิด ดังนั้นจึงทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง

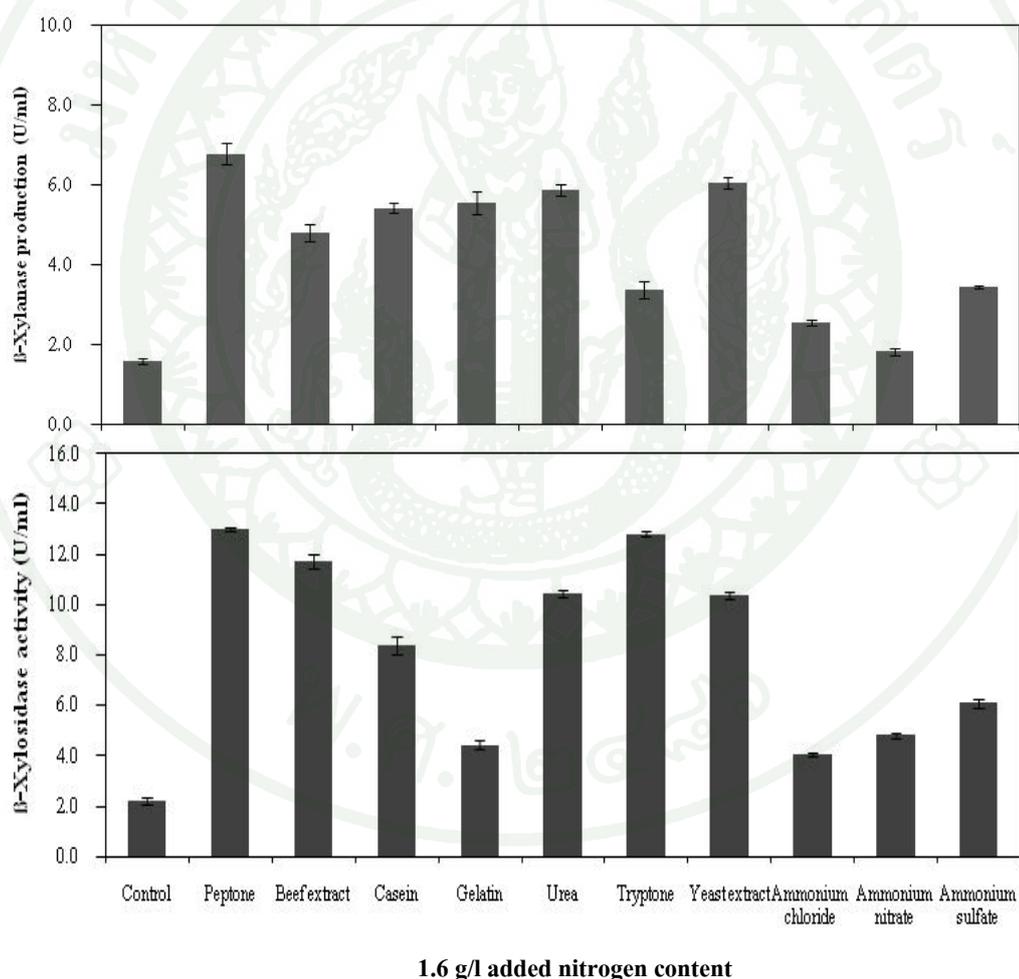
### 5.1 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ในอาหาร basal medium ซึ่งประกอบด้วยสารอาหาร ดังนี้ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่าต่าง 10 กรัมต่อลิตร,  $K_2HPO_4$  1 กรัมต่อลิตร,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ peptone, beef extract, casein, gelatin, urea, tryptone, yeast extract, ammonium chloride, ammonium nitrate และ ammonium sulfate 10 กรัมต่อลิตร พบว่าการเติม peptone และ yeast มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสสูงสุดและรองลงมา กล่าวคือมีการผลิตเอนไซม์ 6.8 และ 6.0 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ การเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแหล่งอนินทรีย์ ได้แก่ ammonium chloride, ammonium nitrate และ ammonium sulfate มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสลดลง โดยลดลงเท่ากับ 2.6, 1.8 และ 3.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 1.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 10A

ในขณะที่การเติม peptone และ tryptone มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสสูงสุดและรองลงมา กล่าวคือมีการผลิตเอนไซม์ 13.0 และ 12.8 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ การเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแหล่งอนินทรีย์ ได้แก่ ammonium chloride, ammonium nitrate และ ammonium sulfate มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสลดลง โดยลดลงเท่ากับ

4.0, 4.8 และ 6.0 หน่วยต่อมิลลิเมตรตามลำดับ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 2.2 หน่วยต่อมิลลิเมตร ดังแสดงในภาพที่ 10B

จากการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ดังนั้นจึงเลือก peptone เป็นหนึ่งในปัจจัยที่จะนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ต่อไป



ภาพที่ 10 แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส (A) และเบต้าไซโลซิเดส (B) ระหว่างเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

## 5.2 ผลของชนิดสารอาหารและปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสตามแผนการทดลองที่ออกแบบโดยวิธี Plackett-Burman

เมื่อศึกษาชนิดของสารอาหารซึ่งได้แก่ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง ( $X_1$ ), peptone ( $X_2$ ),  $K_2HPO_4$  ( $X_3$ ),  $KH_2PO_4$  ( $X_4$ ),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $X_5$ ),  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  ( $X_6$ ) และปัจจัยทางกายภาพซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ( $X_7$ ), ความเร็วรอบ ( $X_8$ ) และพีเอชเริ่มต้น ( $X_9$ ) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตามแผนการทดลองที่ออกแบบโดยวิธี Plackett-Burman ซึ่งมีการทดลองทั้งหมด 12 การทดลอง พบว่าในแต่ละการทดลองมีกิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อผสมในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 11

**ตารางที่ 11** กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 และปริมาณเซลล์ในแต่ละการทดลองที่ออกแบบโดยวิธี Plackett-Burman

Run no.										Enzyme production (U/ml)		Viable cell count (CFU/ml)	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$X_9$	$\beta$ -xylosidase	$\beta$ -xylanase	DMKUB 24	DMKUB 39
	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	10.3	14.9	$1.2 \times 10^9$
2	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	12.3	6.3	$2.3 \times 10^9$	$3.4 \times 10^8$
3	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	7.7	2.8	$2.0 \times 10^8$	$9.6 \times 10^7$
4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	9.0	10.5	$1.9 \times 10^8$	$7.6 \times 10^9$
5	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	10.5	12.4	$5.9 \times 10^9$	$7.9 \times 10^9$
6	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	11.2	8.4	$9.1 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$
7	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	11.0	3.7	$6.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^7$
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	14.2	1.7	$9.3 \times 10^9$	$3.0 \times 10^7$
9	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	13.7	2.1	$9.0 \times 10^9$	$5.0 \times 10^7$
10	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	7.3	5.0	$6.0 \times 10^8$	$1.9 \times 10^7$
11	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	12.0	6.4	$3.6 \times 10^9$	$1.5 \times 10^9$
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8.3	5.2	$1.2 \times 10^8$	$3.6 \times 10^7$

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ทั้ง 12 การทดลองไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS Statistics 17.0 (Statsoft, USA) เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไคลาเนสและเอนไซม์เบต้าไคลาเนสของเชื้อผสม ตารางที่ 12 และ 13 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (coefficient estimate) ค่า Mean square ค่าสถิติ F (*F*-value) และค่านัยสำคัญของการทดสอบ (*P*-value)

จากการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) ของการผลิตเอนไซม์เบต้าไคลาเนสจากเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.990 ซึ่งสามารถใช้อธิบายการผลิตเอนไซม์เบต้าไคลาเนสได้ 99.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 1.0 เปอร์เซ็นต์ไม่สามารถอธิบายได้ ซึ่งเป็นผลจากตัวแปรอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้

**ตารางที่ 12** ผลวิเคราะห์ทางสถิติจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman โดยการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ 9 ปัจจัย ต่อผลิตเอนไซม์เบต้าไคลาเนสจากเชื้อผสมระหว่าง *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

Variable code	Variables	Coefficient estimate	Mean square	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value
	Corrected model		21.232	23.045	0.042
	intercept	6.60917	524.17	568.94	0.002
X <sub>1</sub>	NaOH-treated rice straw (g/l)	2.96583	105.55	114.57	0.009 <sup>a</sup>
X <sub>2</sub>	Peptone (g/l)	1.56583	29.422	31.935	0.030 <sup>a</sup>
X <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l)	-1.17750	16.638	18.059	0.051
X <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/l)	-0.82250	8.118	8.811	0.097
X <sub>5</sub>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/l)	0.02083	0.005	0.006	0.947
X <sub>6</sub>	CoCl <sub>2</sub> (g/l)	0.74083	6.586	7.149	0.116
X <sub>7</sub>	Temperature (°C)	-0.59583	4.26	4.624	0.164
X <sub>8</sub>	Shaking speed (rpm)	-1.21083	17.593	19.096	0.049 <sup>a</sup>
X <sub>9</sub>	Initial pH	-0.49250	2.911	3.159	0.217

<sup>a</sup> Significant at  $P < 0.05$ ;  $R^2 = 0.990$ , Adjust  $R^2 = 0.947$

ตารางที่ 13 ผลวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี Plackett-Burman ออกแบบการทดลองต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสมของ *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

Variable code	Variables	Coefficient estimate	Mean square	F-value	P-value
	Corrected model		6.037	35.706	0.028
	intercept	10.62500	1354.6	8011.9	0.000
X <sub>1</sub>	NaOH-treated rice straw (g/l)	-0.51500	3.183	18.823	0.049 <sup>a</sup>
X <sub>2</sub>	Peptone (g/l)	-0.09667	0.112	0.663	0.501
X <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l)	-0.20833	0.521	3.08	0.221
X <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/l)	-0.23667	0.672	3.975	0.184
X <sub>5</sub>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/l)	1.65333	32.802	194	0.005 <sup>a</sup>
X <sub>6</sub>	CoCl <sub>2</sub> (g/l)	0.26333	0.832	4.921	0.157
X <sub>7</sub>	Temperature (°C)	0.07000	0.059	0.348	0.615
X <sub>8</sub>	Shaking speed (rpm)	0.12667	0.193	1.139	0.398
X <sub>9</sub>	Initial pH	1.15333	15.962	94.404	0.010 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Significant at  $P < 0.05$ ;  $R^2 = 0.994$ , Adjust  $R^2 = 0.966$

จากการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) ของการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.990 ซึ่งสามารถใช้อธิบายการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้ 99.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 0.6 เปอร์เซ็นต์ไม่สามารถอธิบายได้ ซึ่งเป็นผลจากตัวแปรอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้

เมื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสตามลำดับ โดยจะพิจารณาจากค่า  $P$ -value ที่น้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่ 0.05 ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่ามีเพียง 5 ตัวแปร ได้แก่ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง ( $X_1$ ) peptone ( $X_2$ ) MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ( $X_5$ ) ความเร็วรอบ ( $X_8$ ) และพีเอชเริ่มต้น ( $X_9$ ) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) ดังแสดงใน

ตารางที่ 14 ดังนั้นจึงนำปัจจัยดังกล่าวไปศึกษาหาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสมระหว่าง *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองต่อไป แต่เนื่องจากการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดส โดยใช้ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างเป็นวัตถุดิบในระดับพลาสติกต้องการการหมุนเวียนอากาศสูง จึงกำหนดความเร็วรอบสำหรับการหาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 200 รอบต่อนาที

ตารางที่ 14 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสมระหว่าง *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

Variable code	Variables	Influencing factors		Selected factors
		$\beta$ -xylosidase	$\beta$ -xylanase	
$X_1$	NaOH-treated rice straw (g/l)	+	+	+
$X_2$	Peptone (g/l)	-	+	+
$X_3$	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/l)	+	-	+
$X_8$	Shaking speed (rpm)	Fixed at 200 rpm		
$X_9$	Initial pH	+	-	+

5.3 ผลการศึกษาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

นำปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสมระหว่าง *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ทั้ง 4 ปัจจัย ได้แก่ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง ( $X_1$ ), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ( $X_3$ ) และพีเอชเริ่มต้น ( $X_9$ ) มาหาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง รูปแบบที่ใช้ในการออกแบบการทดลอง คือ central composite design ทำการทดลองโดยแบ่งปัจจัยที่ทำการศึกษาทั้ง 4 ปัจจัยออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -2, -1, 0, +1 และ +2 (ตารางที่ 15) ในแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 30 การทดลอง โดยทำการทดลองในระดับกลางจำนวน 3 ซ้ำ (การทดลองที่ 25-30) เมื่อทำการทดลองตามแผนการทดลองทั้ง 30 การทดลอง พบว่าในแต่ละการ

ทดลองมีค่าของกิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 15 การกำหนดระดับของแต่ละปัจจัยที่ศึกษาโดยวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD)

Independent variables	Level				
	-2	-1	0	1	2
NaOH-treated rice straw ( $X_1$ ) (g/L)	10	15	20	25	30
Peptone ( $X_2$ ) (g/L)	0.5	1	1.5	2	2.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O ( $X_3$ ) (g/L)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Initial pH medium ( $X_9$ )	7	7.5	8	8.5	9

ตารางที่ 16 ผลของการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ในแต่ละการทดลอง โดยใช้การออกแบบการทดลอง Central composite design

Runs	Code-setting level				Enzyme production (U/ml)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>9</sub>	β-xylosidase	β-xylanase
1	-1	-1	-1	-1	7.83	1.02
2	1	-1	-1	-1	17.71	8.05
3	-1	1	-1	-1	14.67	5.98
4	1	1	-1	-1	25.83	13.57
5	-1	-1	1	-1	7.17	1.47
6	1	-1	1	-1	15.17	5.57
7	-1	1	1	-1	5.50	1.76
8	1	1	1	-1	20.00	8.7
9	-1	-1	-1	1	7.33	2.48
10	1	-1	-1	1	10.67	4.06
11	-1	1	-1	1	14.67	15.73
12	1	1	-1	1	20.83	12.9
13	-1	-1	1	1	12.67	1.92
14	1	-1	1	1	9.33	3.77
15	-1	1	1	1	27.50	20.33
16	1	1	1	1	15.50	7.46
17	-2	0	0	0	7.33	1.33
18	2	0	0	0	14.33	5.89
19	0	-2	0	0	14.67	6.18
20	0	2	0	0	21.50	9.57
21	0	0	-2	0	11.67	8.4
22	0	0	2	0	21.67	7.62
23	0	0	0	-2	19.00	9.6

ตารางที่ 16 (ต่อ)

Runs	Code-setting level				Enzyme production (U/ml)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>9</sub>	β-xylosidase	β-xylanase
24	0	0	0	2	7.50	5.07
25	0	0	0	0	26.78	16.15
26	0	0	0	0	26.56	16.79
27	0	0	0	0	26.50	16.43
28	0	0	0	0	26.42	16.16
29	0	0	0	0	26.58	16.43
30	0	0	0	0	26.33	16.03

#### 5.4 ผลการวิเคราะห์การถดถอย

##### 5.4.1 การทดสอบสมมติฐานของสมการการถดถอย

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส จากผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 17 พบว่าค่าสถิติ F เท่ากับ 6.85 ด้วย degree of freedom (df) เท่ากับ (14, 15) มีค่านัยสำคัญของการทดสอบ (*P*-value) เท่ากับ 0.003 ซึ่งให้เห็นว่าปัจจัยที่ศึกษามีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่การผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสมี ค่าสถิติ F เท่ากับ 6.99 ด้วย degree of freedom (df) เท่ากับ (14, 15) มีค่านัยสำคัญของการทดสอบ (*P*-value) เท่ากับ 0.002 ซึ่งให้เห็นว่าปัจจัยที่ศึกษามีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares	F-value	P-value
<b><math>\beta</math>-xylanase activity</b>					
Model	837.7736	14	59.84097	6.8541	0.0003
Residual	130.9600	15	8.73067		
Total	968.7336	29			
$R^2 = 0.8648$					
$Adj-R^2 = 0.7386$					
<b><math>\beta</math>-xylosidase activity</b>					
Model	1360.336	14	97.16657	6.997485	0.0002
Residual	208.289	15	13.88593		
Total	1568.621	29			
$R^2 = 0.8672$					
$Adj-R^2 = 0.7430$					

#### 5.4.2 การประมาณสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงพหุคูณของการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนส

เมื่อประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนส ( $Y$ ) เพื่อทดสอบความมีนัยสำคัญของตัวแปรที่ศึกษา โดยพิจารณาจากค่า  $P$ -value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่ 0.05 และทิศทางของอิทธิพลว่ามีอิทธิพลทางบวก หรือทางลบต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนส ดังแสดงในตารางที่ 18 พบว่าตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนส ได้แก่ พจน์ของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง ( $X_1$ ), พีเอช ( $X_9$ ), พจน์ระหว่างฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและพีเอชเริ่มต้น ( $X_1X_9$ ), พจน์ระหว่าง peptone และพีเอชเริ่มต้น ( $X_2X_9$ ), พจน์กำลังสองของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง ( $X_1^2$ ), พจน์กำลังสองของ peptone ( $X_2^2$ ) พจน์กำลังสองของ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $X_5^2$ ) และพจน์กำลังสองของพีเอชเริ่มต้น ( $X_9^2$ ) รูปแบบสมการการถดถอยที่เหมาะสม ดังแสดงในสมการที่ 5

ตารางที่ 18 ค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนส

Variables	Coefficients estimate	Standard error	t-value	P-value
(Constant)	-703.1240	163.2956	-4.3060	0.0006 <sup>a</sup>
X <sub>1</sub>	13.8310	2.6095	5.3000	0.0000 <sup>a</sup>
X <sub>2</sub>	-20.2400	25.7025	-0.7870	0.4432
X <sub>5</sub>	66.3010	128.5127	0.5160	0.6134
X <sub>9</sub>	144.2160	37.1409	3.8820	0.0014 <sup>a</sup>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-0.3940	0.2954	-1.3310	0.2028
X <sub>1</sub> X <sub>5</sub>	-1.6680	1.4773	-1.1300	0.2766
X <sub>1</sub> X <sub>9</sub>	-0.9480	0.2954	-3.2090	0.0058 <sup>a</sup>
X <sub>2</sub> X <sub>5</sub>	-8.7980	14.7738	-0.5950	0.5603
X <sub>2</sub> X <sub>9</sub>	7.5730	2.9547	2.5630	0.0216 <sup>a</sup>
X <sub>5</sub> X <sub>9</sub>	11.8070	14.7738	0.7990	0.4366
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-0.1240	0.0225	-5.5010	0.0000 <sup>a</sup>
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-8.1440	2.2567	-3.6080	0.0025 <sup>a</sup>
X <sub>5</sub> <sup>2</sup>	-200.3030	56.4185	-3.5500	0.0029 <sup>a</sup>
X <sub>9</sub> <sup>2</sup>	-8.6890	2.2567	-3.8500	0.0015 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Significant at  $P < 0.05$

$$\begin{aligned}
 Y_I = & -703.124 + 13.831X_1 - 20.240X_2 + 66.301X_5 + 144.216X_9 - 0.394X_1X_2 - 1.668X_1X_5 - 0.948X_1X_9 - \\
 & 8.798X_2X_5 + 7.573X_2X_9 + 11.807X_5X_9 - 0.124X_1^2 - 8.144X_2^2 - 200.303X_5^2 - 8.689X_9^2 \dots\dots\dots (5)
 \end{aligned}$$

จากสมการที่ 5 สังเกตได้ว่าตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร ได้แก่ X<sub>1</sub>, X<sub>5</sub> และ X<sub>9</sub> มีอิทธิพลทางบวก (มีสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง (Y<sub>I</sub>) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าวค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลันเนสมีค่าเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ X<sub>2</sub> มีอิทธิพลทางลบ (มีสัมประสิทธิ์เป็นลบ) ต่อค่าตอบสนอง (Y<sub>I</sub>) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าวค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลันเนสมีค่าลดลง

จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า ไซลานเนส พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.8648 แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของ เอนไซม์เบต้าไซลานเนสที่ได้ เป็นผลจากตัวแปรอิสระทั้ง 4 ตัวแปร 86.48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 13.52 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลจากตัวแปรอิสระอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้

#### 5.4.3 การประมาณสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงพหุคูณของการผลิตเอนไซม์เบต้า ไซโลซิเดส

เมื่อประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสเพื่อทดสอบความมีนัยสำคัญของตัวแปรที่ศึกษา โดยพิจารณาจากค่า  $P$ -value น้อยกว่าระดับ นัยสำคัญที่ 0.05 และทิศทางของอิทธิพลว่ามีอิทธิพลทางบวก หรือทางลบต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า ไซลานเนส ดังแสดงในตารางที่ 19 พบว่าตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส( $Y_2$ ) ได้แก่ พจน์ของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่า ( $X_1$ ), พีเอชเริ่มต้น ( $X_9$ ), พจน์ระหว่างฟางข้าว ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่าและพีเอชเริ่มต้น ( $X_1X_9$ ), พจน์กำลังสองของฟางข้าวที่ผ่านการปรับ สภาพด้วยค่า ( $X_1^2$ ), พจน์กำลังสองของ peptone ( $X_2^2$ ), พจน์กำลังสองของ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $X_5^2$ ) และ พจน์กำลังสองของพีเอชเริ่มต้น ( $X_9^2$ ) รูปแบบสมการการถดถอยที่เหมาะสม ดังแสดงในสมการที่ 6

ตารางที่ 19 ค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า  
ไซโลซิลเดส

Variables	Coefficients estimate	Standard error	t-value	P-value
(Constant)	-1010.9564	205.9388	-4.9090	0.0002 <sup>a</sup>
X <sub>1</sub>	17.4379	3.2910	5.2986	0.0001 <sup>a</sup>
X <sub>2</sub>	-7.0693	32.4145	-0.2181	0.8303
X <sub>5</sub>	-67.8466	162.0726	-0.4186	0.6814
X <sub>9</sub>	218.7948	46.8399	4.6711	0.0003 <sup>a</sup>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.0488	0.3726	0.1310	0.8975
X <sub>1</sub> X <sub>5</sub>	-2.9226	1.8631	-1.5686	0.1376
X <sub>1</sub> X <sub>9</sub>	-1.2345	0.3726	-3.3129	0.0047 <sup>a</sup>
X <sub>2</sub> X <sub>5</sub>	-10.3574	18.6319	-0.5559	0.5865
X <sub>2</sub> X <sub>9</sub>	5.0952	3.7263	1.3673	0.1917
X <sub>5</sub> X <sub>9</sub>	37.1426	18.6319	1.9935	0.0647
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-0.1582	0.0284	-5.5578	0.0001 <sup>a</sup>
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-8.5680	2.8460	-3.0105	0.0088 <sup>a</sup>
X <sub>5</sub> <sup>2</sup>	-249.6173	71.1517	-3.5082	0.0032 <sup>a</sup>
X <sub>9</sub> <sup>2</sup>	-13.4014	2.8460	-4.7087	0.0003 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Significant at  $P < 0.05$

$$\begin{aligned}
 Y_2 = & -1010.957 + 17.438X_1 - 7.069X_2 - 67.8466X_5 + 218.7948X_9 + 0.0488X_1X_2 - 2.9226X_1X_5 - \\
 & 1.2345X_1X_9 - 10.3574X_2X_5 + 5.0952X_2X_9 + 37.1426X_5X_9 - 0.1582X_1^2 - 8.5680X_2^2 \\
 & - 249.6173X_5^2 - 13.4014X_9^2 \dots\dots\dots (6)
 \end{aligned}$$

จากสมการที่ 6 สังเกตได้ว่าตัวแปรอิสระทั้ง 2 ตัวแปร ได้แก่ X<sub>1</sub> และ X<sub>9</sub> มีอิทธิพลทางบวก (มีสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง (Y<sub>2</sub>) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าวค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลาเนสมีค่าเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ X<sub>2</sub> และ X<sub>5</sub> มีอิทธิพลทาง

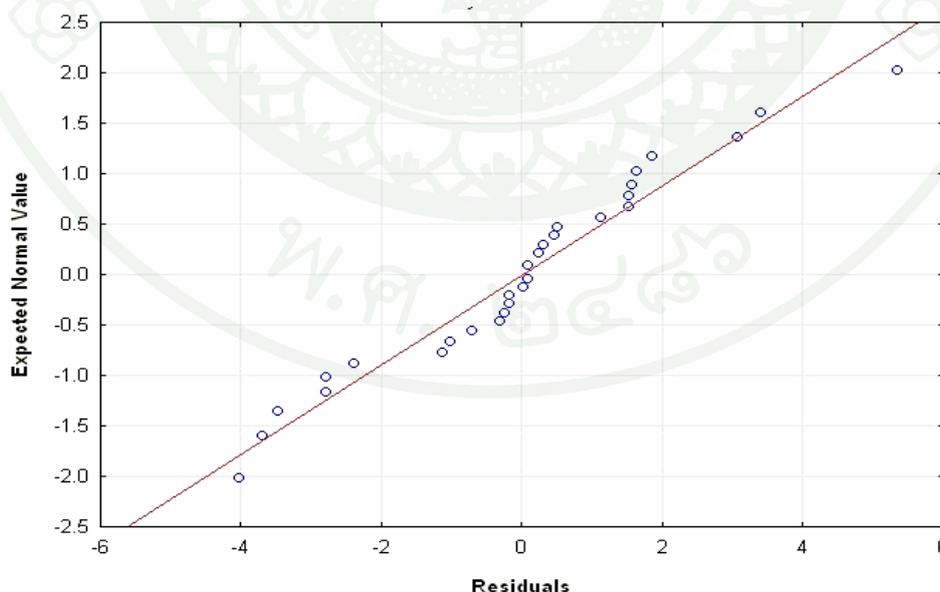
ลบ (มีสัมประสิทธิ์เป็นลบ) ต่อค่าตอบสนอง ( $Y_2$ ) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าวค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสมีค่าลดลง

จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสิ้นใจ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.8672 แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสที่ได้ เป็นผลจากตัวแปรอิสระทั้ง 4 ตัวแปร 86.72 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 13.28 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลจากตัวแปรอิสระอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้

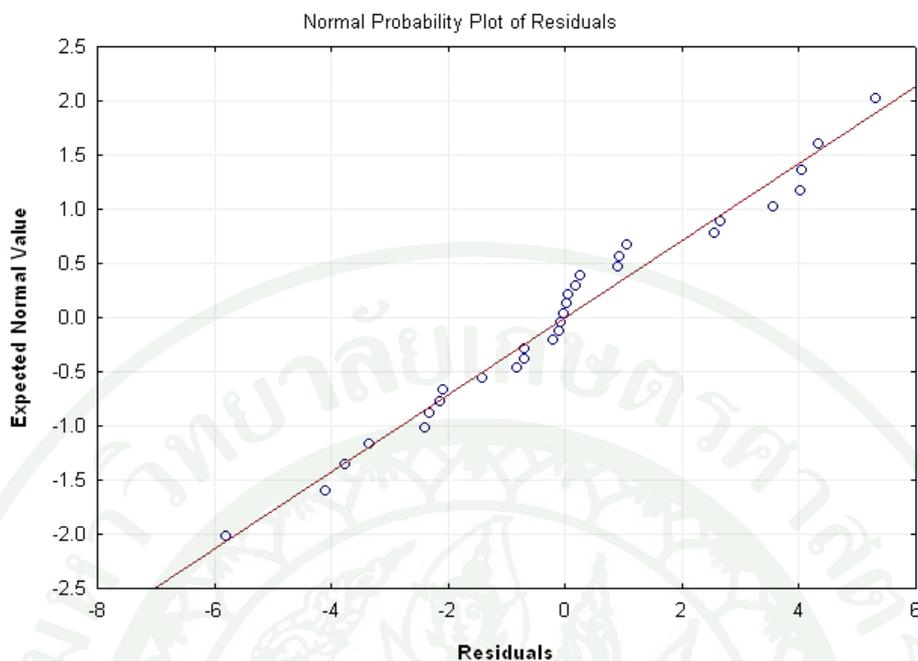
## 5.5 การตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอย

### 5.5.1 การทดสอบการแจกแจงแบบปกติของการผลิตเอนไซม์

จากการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอยโดยวิธี normal probability plot พบว่าลักษณะของจุดบนกราฟส่วนใหญ่มีการกระจายตัวในแนวเส้นตรง ดังแสดงในภาพที่ 11 และ 12 ดังนั้นจึงสรุปว่าความคลาดเคลื่อนมีการแจกแจงเป็นแบบปกติ และเป็นไปตามข้อกำหนดเบื้องต้นของการวิเคราะห์การถดถอย



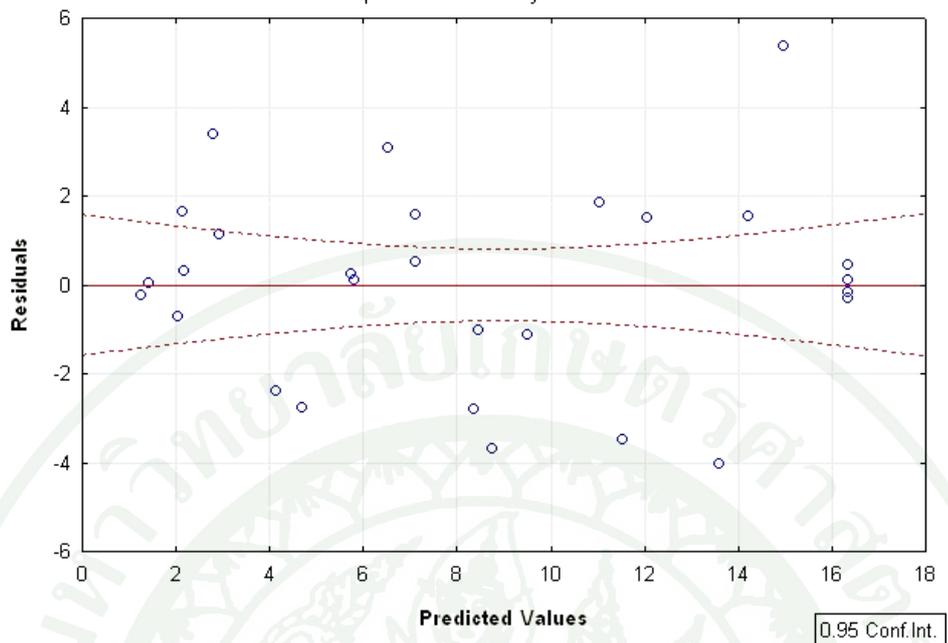
ภาพที่ 11 Normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อนต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24



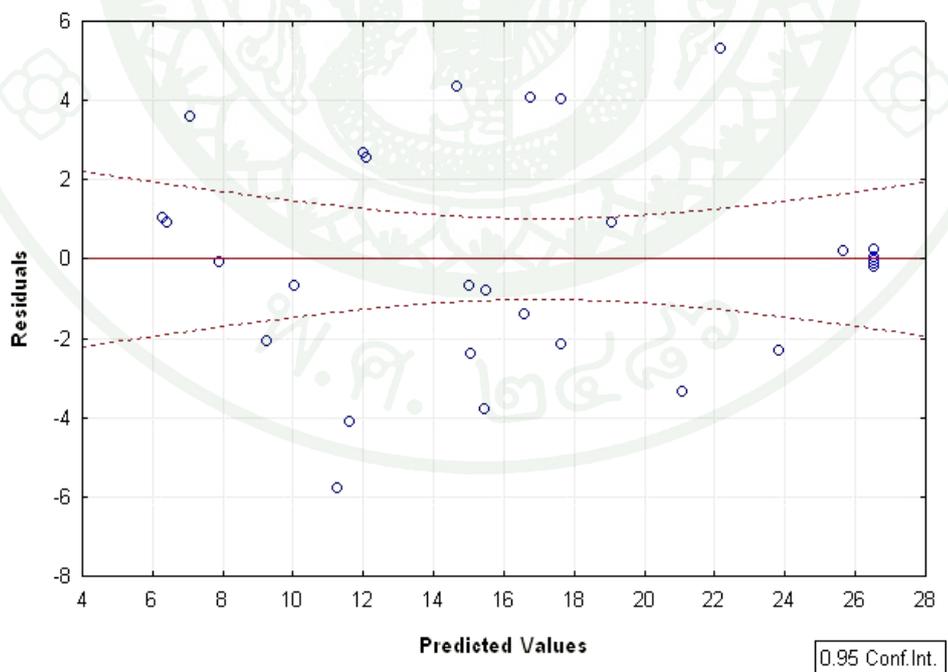
ภาพที่ 12 Normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อนต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซินได้จากเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

### 5.5.2 การทดสอบความคงที่ของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

จากกราฟการกระจายระหว่างค่า Residuals บนแกน Y กับค่า predicted value บนแกน X พบว่าจุดมีการกระจายอย่างไม่มีรูปแบบ และกระจายรอบศูนย์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 13 และ 14



ภาพที่ 13 Scatter plot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนายต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไคลาเนสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24



ภาพที่ 14 Scatter plot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนายต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไคซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

ดังนั้นเมื่อทำการตรวจสอบความเหมาะสมของรูปแบบสมการการถดถอยด้วยวิธีวิเคราะห์ ความคลาดเคลื่อนกับการพล็อตกราฟ normal probability plot และ scatter plot สามารถสรุปได้ว่ารูปแบบของสมการการถดถอยหรือสมการความสัมพันธ์ที่ได้จากการทดลองนั้นเป็นรูปแบบที่เหมาะสมแล้ว ขั้นตอนต่อไปจึงนำสมการการถดถอยที่ได้ไปใช้ทำนายการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ต่อไป

#### 5.6 การเปรียบเทียบค่าจริงจากการทดลองและค่าทำนายกิจกรรมของเอนไซม์

เมื่อนำสมการการถดถอยที่เหมาะสม (สมการที่ 5 และ 6) ไปทำนายผลความเข้มข้นของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่า, peptone,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และพีเอชเริ่มต้นในระดับที่ศึกษาต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ผลการทำนาย ดังแสดงในตารางที่ 20

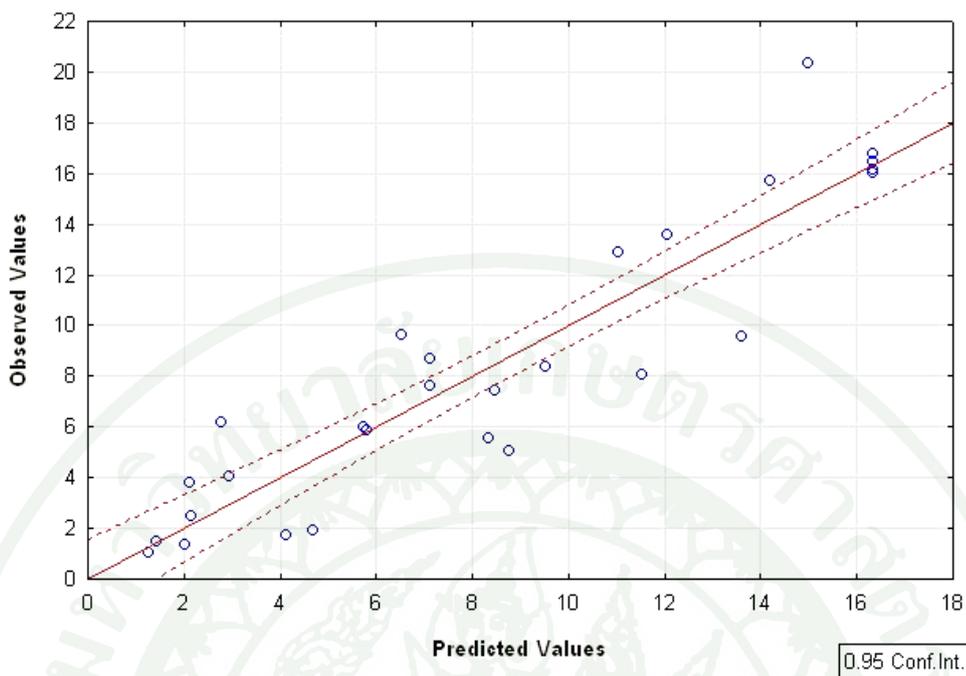
**ตารางที่ 20** ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กับค่าทำนายกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสในแต่ละการทดลอง

Runs	Code-setting level				Enzyme production (U/ml)			
					$\beta$ -xylosidase		$\beta$ -xylanase	
	$X_1$	$X_2$	$X_5$	$X_9$	Observed	Predicted	Observed	Predicted
1	-1	-1	-1	-1	7.83	7.90	1.02	1.35
2	1	-1	-1	-1	17.71	21.06	8.05	11.69
3	-1	1	-1	-1	14.67	12.00	5.98	5.81
4	1	1	-1	-1	25.83	25.65	13.57	12.2
5	-1	-1	1	-1	7.17	9.25	1.47	1.52
6	1	-1	1	-1	15.17	16.57	5.57	8.52
7	-1	1	1	-1	5.50	11.28	1.76	4.22
8	1	1	1	-1	20.00	19.09	8.7	7.28
9	-1	-1	-1	1	7.33	6.28	2.48	2.26
10	1	-1	-1	1	10.67	7.10	4.06	3.11

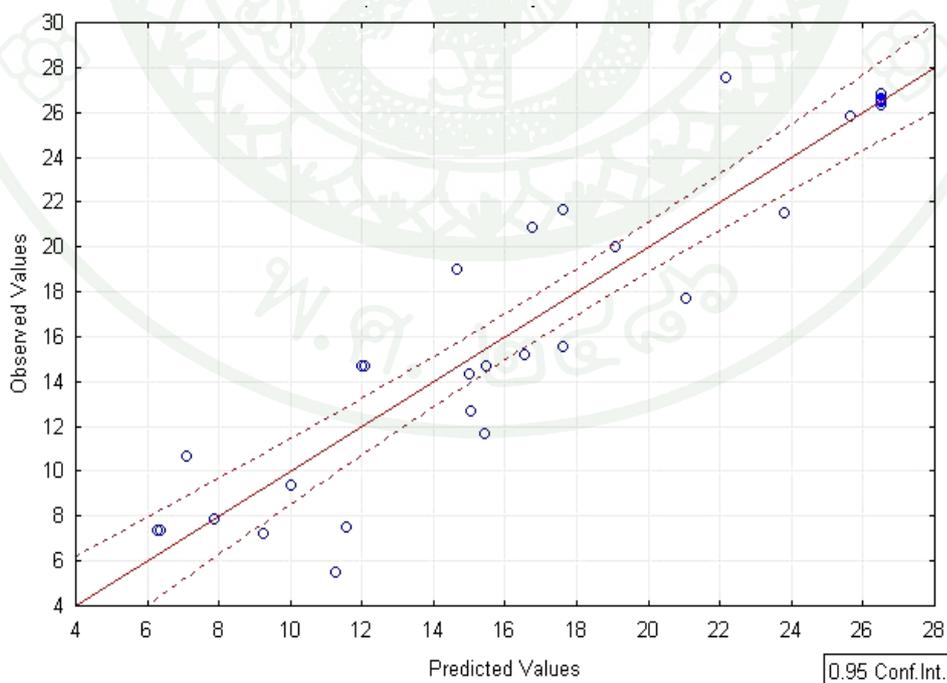
ตารางที่ 20 (ต่อ)

Runs	Code-setting level				$\beta$ -xylosidase		$\beta$ -xylanase	
	$X_1$	$X_2$	$X_5$	$X_9$	Observed	Predicted	Observed	Predicted
11	-1	1	-1	1	14.67	15.48	15.73	14.29
12	1	1	-1	1	20.83	16.78	12.9	11.2
13	-1	-1	1	1	12.67	15.06	1.92	4.79
14	1	-1	1	1	9.33	10.03	3.77	2.31
15	-1	1	1	1	27.50	22.19	20.33	15.06
16	1	1	1	1	15.50	17.64	7.46	8.64
17	-2	0	0	0	7.33	6.40	1.33	2.1
18	2	0	0	0	14.33	15.02	5.89	6.01
19	0	-2	0	0	14.67	12.10	6.18	2.92
20	0	2	0	0	21.50	23.82	9.57	13.7
21	0	0	-2	0	11.67	15.44	8.4	9.64
22	0	0	2	0	21.67	17.65	7.62	7.24
23	0	0	0	-2	19.00	14.66	9.6	6.63
24	0	0	0	2	7.50	11.60	5.07	8.9
25	0	0	0	0	26.78	26.53	16.15	16.45
26	0	0	0	0	26.56	26.53	16.79	16.45
27	0	0	0	0	26.50	26.53	16.43	16.45
28	0	0	0	0	26.42	26.53	16.16	16.45
29	0	0	0	0	26.58	26.53	16.43	16.45
30	0	0	0	0	26.33	26.53	16.03	16.45

จากสมการการถดถอยที่ใช้ทำนายค่าของกิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลลันเนส พบว่าค่าทำนายมีแนวโน้มของทิศทางสอดคล้องกับค่าจริงที่ได้จากการทดลอง แสดงดังภาพที่ 15 และ 16



ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสที่ได้จากการทดลองและค่าทำนายของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

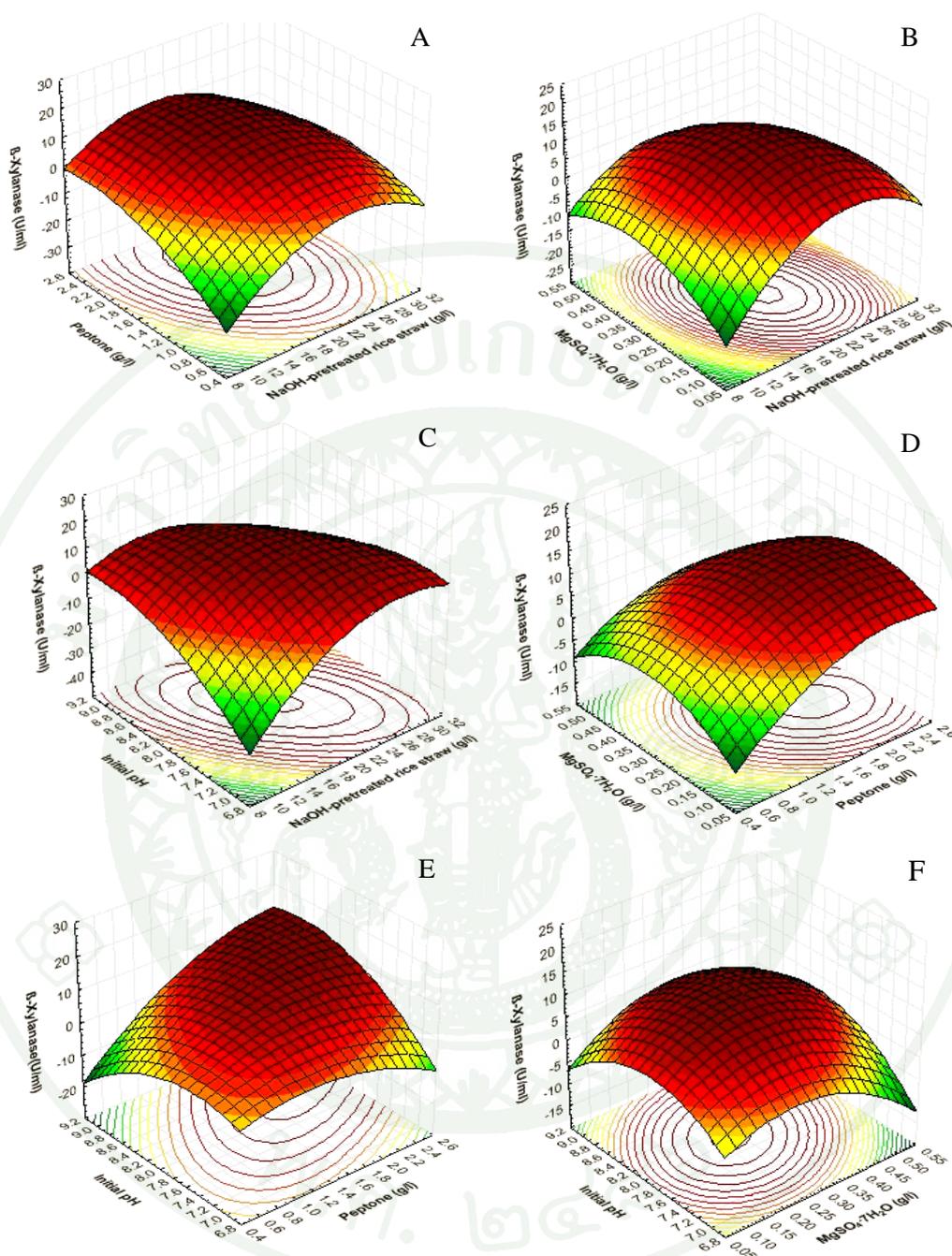


ภาพที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสที่ได้จากการทดลองและค่าทำนายของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

## 5.7 ผลของการหาค่าที่เหมาะสมของตัวแปรที่ศึกษาต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดส

จากการใช้วิธี Plackett-Burman ออกแบบการทดลอง พบว่ามี 4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดส จากเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ได้แก่ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง ( $X_1$ ), peptone ( $X_2$ ),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $X_3$ ) และพีเอชเริ่มต้น ( $X_4$ ) ซึ่งเป็นเพียงการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสเท่านั้น ดังนั้นเพื่อหาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ทั้งสองจากเชื้อผสมระหว่าง *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 จึงนำตัวแปรทั้ง 4 ตัวแปร มาสร้างกราฟภาพพื้นผิวตอบสนอง (ภาพ 3 มิติ) และคอนทัวร์พล็อต (ภาพ 2 มิติ) โดยกราฟจะแสดงถึงอิทธิพลของแต่ละตัวแปรและปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดส จากภาพที่ 17 แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์พล็อตของปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัย ได้แก่ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง peptone  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และ พีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อผสมระหว่าง *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 โดยภาพที่ 17A แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์พล็อตของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและ peptone ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส ภาพที่ 17B แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์พล็อตของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส ภาพที่ 17C แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์พล็อตของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส ภาพที่ 17D แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์พล็อตของ peptone และ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส ภาพที่ 17E แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์พล็อตของ peptone และพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส ภาพที่ 17F แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์พล็อตของ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

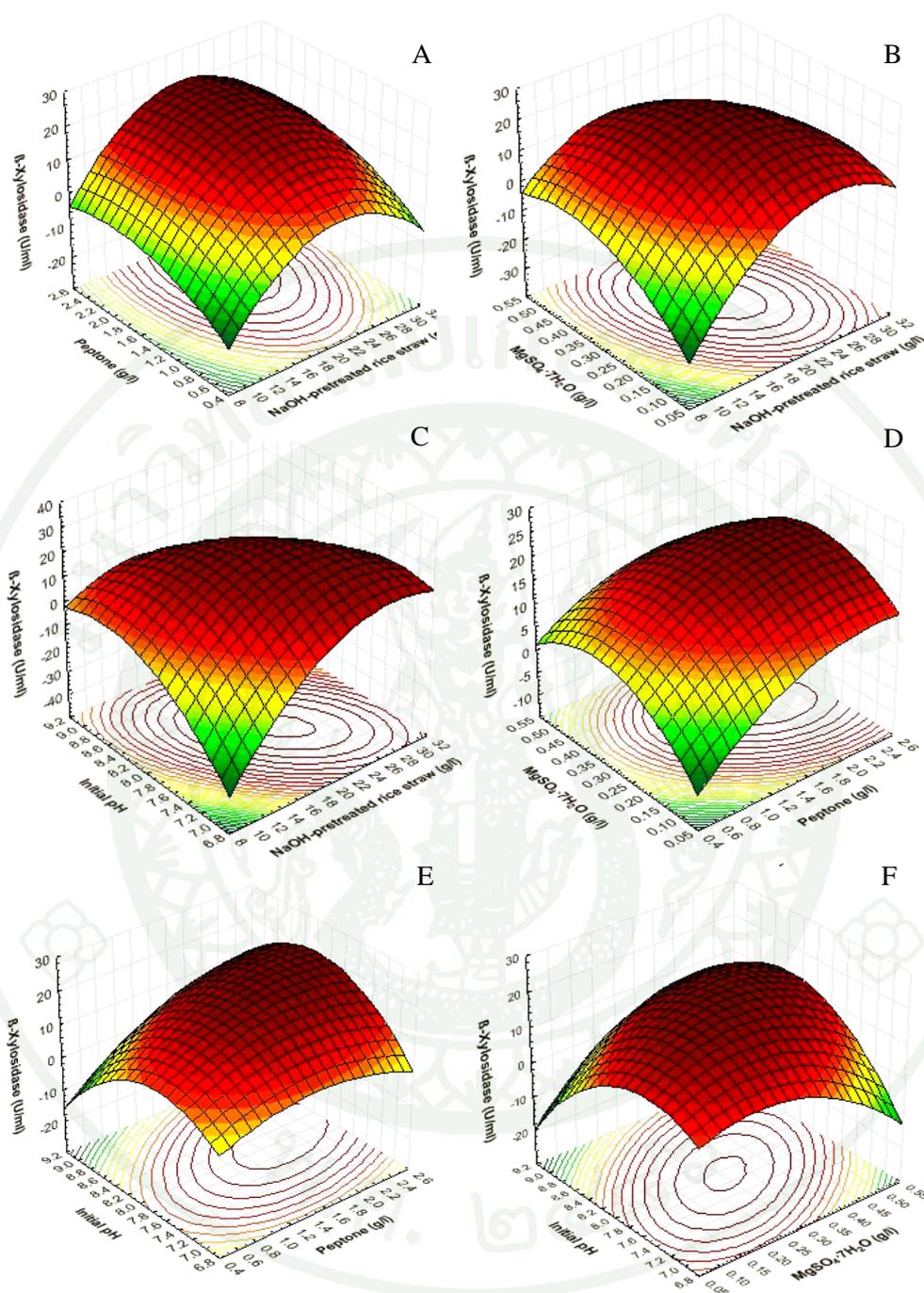
จากรูปพื้นผิวตอบสนองสามารถทำนายได้ว่าการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสเพิ่มสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง 18.7 กรัมต่อลิตร peptone 2.0 กรัมต่อลิตร  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3 และใช้พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.3



ภาพที่ 17 กราฟพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างและ peptone (A) ปัจจัยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างและ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (B) ปัจจัยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างและพีเอชเริ่มต้น (C) peptone และ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (D) peptone และพีเอชเริ่มต้น (E)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และพีเอชเริ่มต้น (F) ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนสจากเชื้อผสมระหว่าง *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

จากภาพที่ 18 แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทราสต์ของปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัย ได้แก่ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง peptone  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และ พีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสมระหว่าง *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 โดยภาพที่ 18A แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทราสต์ของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและ peptone ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสภาพที่ 18B แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทราสต์ของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสภาพที่ 18C แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทราสต์ของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสภาพที่ 18D แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทราสต์ของ peptone และ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  การผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสภาพที่ 18E แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทราสต์ของ peptone และพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส ภาพที่ 18F แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทราสต์ของ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

จากรูปพื้นผิวตอบสนองสามารถทำนายได้ว่าการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสเพิ่มสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง 20.1 กรัมต่อลิตร peptone 2.0 กรัมต่อลิตร  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.28 และใช้พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0



ภาพที่ 18 กราฟพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและ peptone (A) ปัจจัยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (B) ปัจจัยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและพีเอชเริ่มต้น (C) peptone และ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (D) peptone และพีเอชเริ่มต้น (E)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และพีเอชเริ่มต้น (F) ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสมระหว่าง *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

จากการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองทั้ง 12 ภาพ พบว่าจุดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสคือ ใช้ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่าความเข้มข้นเท่ากับ 18.7 กรัมต่อลิตร, peptone 2.0 กรัมต่อลิตร,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.3 ซึ่งจากสมการที่ 5 ทำนายว่าเมื่อใช้สภาวะดังกล่าวมีผลทำให้เชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 สามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้สูงสุด 17.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการทดลองจริงเพื่อยืนยันผลการทำนาย พบว่าเชื้อผสมสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้เท่ากับ 21.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสได้ 23.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวช่วยทำให้เชื้อผสมผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสเพิ่มขึ้น 1.9 เท่า เมื่อเทียบกับสูตรอาหารดั้งเดิมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสเพียง 11.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสคือ ใช้ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่าความเข้มข้นเท่ากับ 20.1 กรัมต่อลิตร, peptone 2.0 กรัมต่อลิตร,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.28 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ซึ่งจากสมการที่ 6 ทำนายว่าเมื่อใช้สภาวะดังกล่าวมีผลทำให้เชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 สามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสได้สูงสุด 27.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการทดลองจริงเพื่อยืนยันผลการทำนาย พบว่าเชื้อผสมสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสได้เท่ากับ 31.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้ 15.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวช่วยทำให้เชื้อผสมผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสเพิ่มขึ้น 3.2 เท่า เมื่อเทียบกับสูตรอาหารดั้งเดิมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสเพียง 9.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร

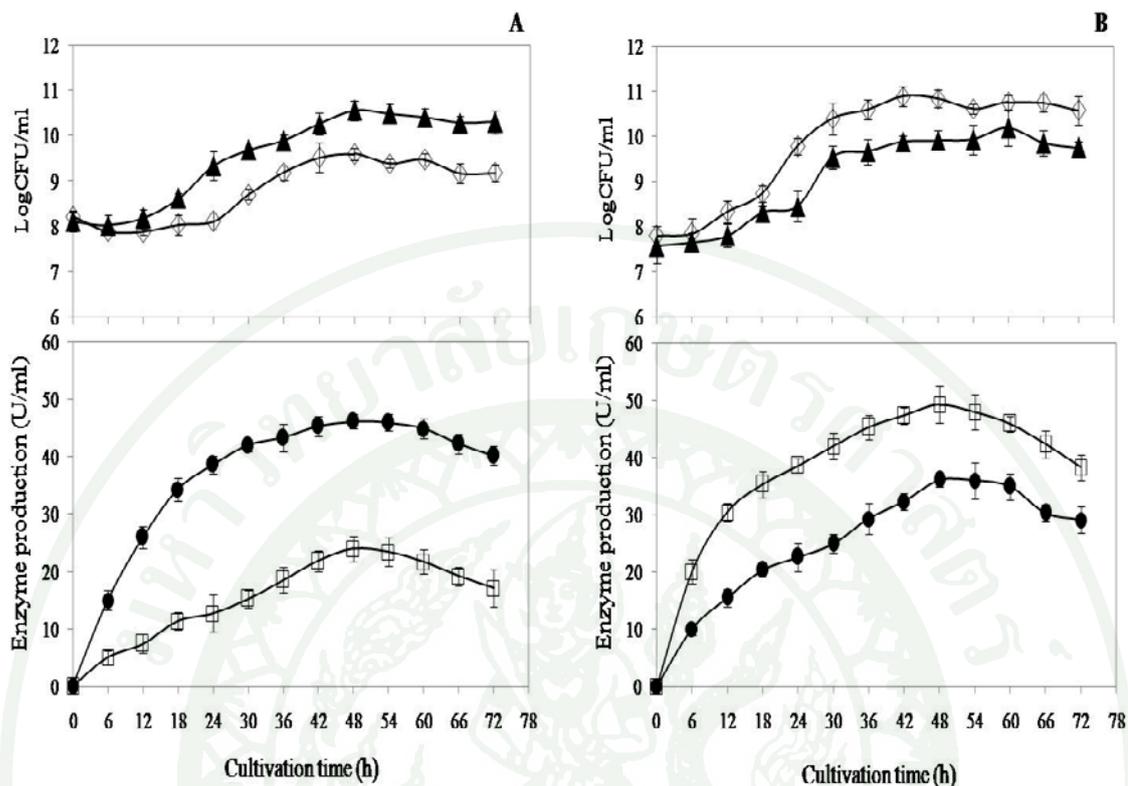
## 6. ผลของการศึกษาการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ในถังหมักแบบกวน

ทั้งนี้เพื่อเป็นขยายการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากระดับฟลาสกมาเป็นระดับถังหมัก จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 โดยใช้สูตรอาหาร 2 สูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิดในถังหมักแบบกวนขนาด 1 ลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมภายในถังหมักซึ่งบรรจุปริมาณอาหารแต่ละชนิดเท่ากับ 0.5 ลิตร ควบคุมอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที และอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อผสมโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อ

การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อผสมสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส และเบต้าไซโลซิเดส ได้สูงสุดเท่ากับ 49.3 และ 36.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 21) หลังจากนั้นพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อผสมโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อผสมสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดส ได้สูงสุดเท่ากับ 24.0 และ 46.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 21) หลังจากนั้นพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เริ่มลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังแสดงในภาพที่ 32

เมื่อตรวจสอบการเจริญของเชื้อระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมในสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิด พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 สามารถเจริญได้ดี โดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 10.8 logCFU/ml ในขณะที่เชื้อ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 เจริญได้น้อยกว่าโดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 10.0 logCFU/ml แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 สามารถเจริญได้ดีโดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 10.6 logCFU/ml ในขณะที่เชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 เจริญได้น้อยกว่าโดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 9.6 logCFU/ml ดังแสดงในภาพที่ 19

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมของ *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ด้วยอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส ในถังหมักขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส และเบต้าไซโลซิเดสสูงกว่าการเลี้ยงในระดับฟลาสก์ถึง 2.3 และ 1.5 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อผสมของ *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ด้วยอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส และเบต้าไซโลซิเดสสูงกว่าการเลี้ยงในระดับฟลาสก์ถึง 1.5 และ 1.4 เท่า ตามลำดับ



ภาพที่ 19 เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสม ในถังหมักแบบกวนโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส (A) และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส (B) ที่มีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อ ปริมาตรอาหารต่อนาที และอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที

- : เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส
- ◻ : เอนไซม์เบต้าไซลานเนส
- ▲ : การเจริญของเชื้อสายพันธุ์ DMKUB24
- ◊ : การเจริญของเชื้อสายพันธุ์ DMKUB39

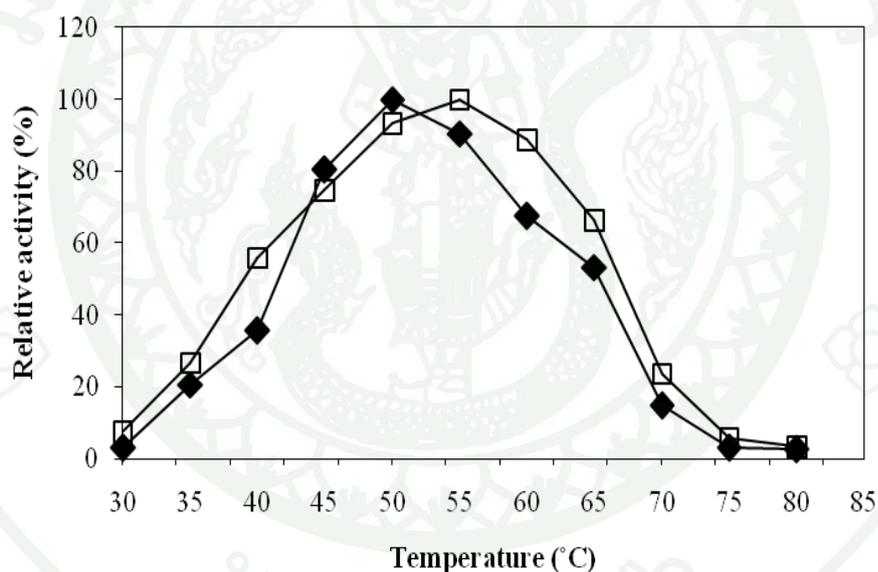
ตารางที่ 21 การผลิตเอนไซม์เบต้าไคซานเนสและเบต้าไคซิเลสจากเชื้อผสมระหว่าง *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

Medium	Conditions	$\beta$ -xylosidase production (U/mL)	$\beta$ -xylanase production (U/mL)
<b>Un-optimized medium</b> 10.0 g/L NaOH-treated rice straw 1.0 g/L casein 0.2 g/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1.0 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<b>Shaking flask</b> Shaking speed 150 rpm Initial pH at 7.0 Temperature of 37°C	9.8	11.3
<b>Optimized medium I for <math>\beta</math>-xylosidase</b> 20.1 g/L NaOH-treated rice straw 2.0 g/L peptone 0.28 g/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.1 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>Shaking flask</b> Shaking speed 200 rpm Initial pH at 8.03 Temperature of 37°C  <b>1 L Fermentor</b> Agitation speed 200 rpm Aeration rate of 1 vvm Controlled pH at 8.03 Temperature of 37°C	31.2    46.1	15.6    24.0
<b>Optimized medium II for <math>\beta</math>-xylanase</b> 18.7 g/L NaOH-treated rice straw 2.0 g/L peptone 0.3 g/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.1 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>Shaking flask</b> Shaking speed 200 rpm Initial pH 8.3 Temperature 37°C  <b>1 L Fermentor</b> Agitation speed 200 rpm Aeration rate of 1 vvm Controlled pH at 8.3 Temperature 37°C	23.3    36.1	21.1    49.3

## 7. การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสม

### 7.1 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสคือ 50 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสคือ 55 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 20 เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่าหรือมากกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองลดลง และยังพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส ยังคงทำงานได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์

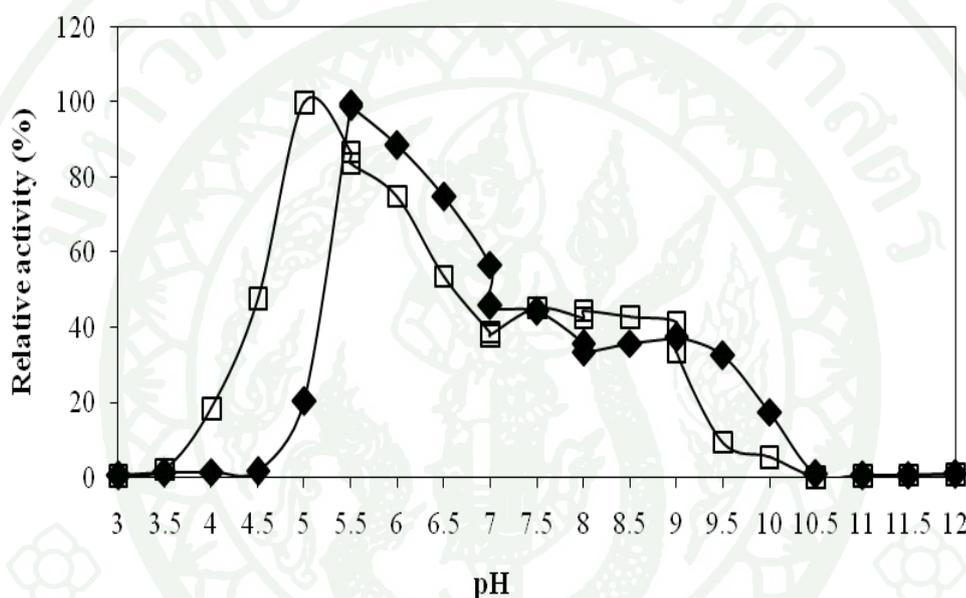


ภาพที่ 20 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสที่ผลิตจากเชื้อผสมของ *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

- ◆ เอนไซม์เบต้าไซลานเนส
- เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส

## 7.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสม ในช่วงพีเอช 4.0-12.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสคือ 5.5 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสคือ 5.0 ดังแสดงในภาพที่ 21

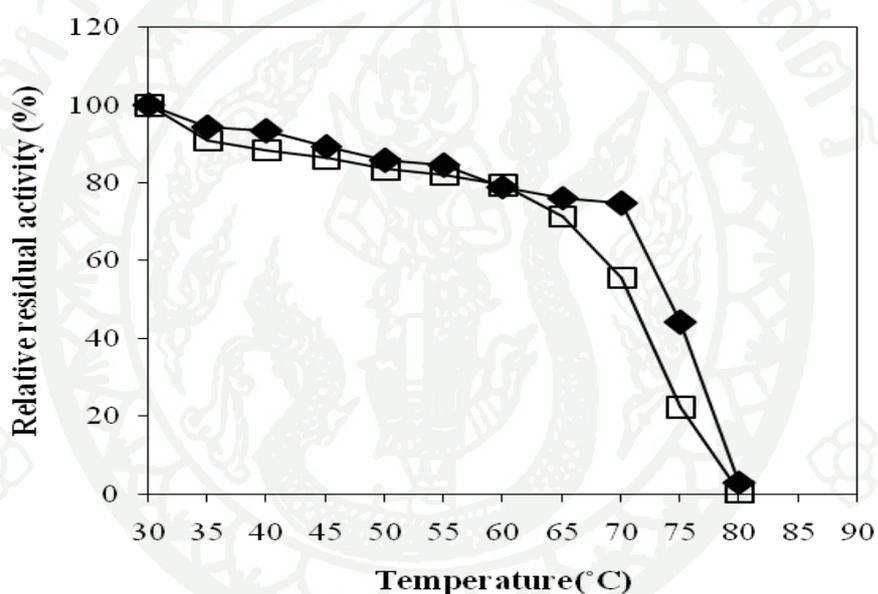


ภาพที่ 21 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสที่ผลิตจากเชื้อผสมของ *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

- ◆ เอนไซม์เบต้าไซลานเนส
- เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส

### 7.3 ผลของอุณหภูมิต่อการคงทนของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการคงทนของเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์เบต้าไคลาเนสจากเชื้อผสมสามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 70 องศาเซลเซียส และสามารถทนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งยังคงพบกิจกรรมของเอนไซม์คงเหลือถึง 45 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เอนไซม์เบต้าไคโลซิเดสจากเชื้อผสมสามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 65 องศาเซลเซียส และสามารถทนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งยังคงพบกิจกรรมของเอนไซม์คงเหลือถึง 58 เปอร์เซ็นต์ดังแสดงในภาพที่ 22

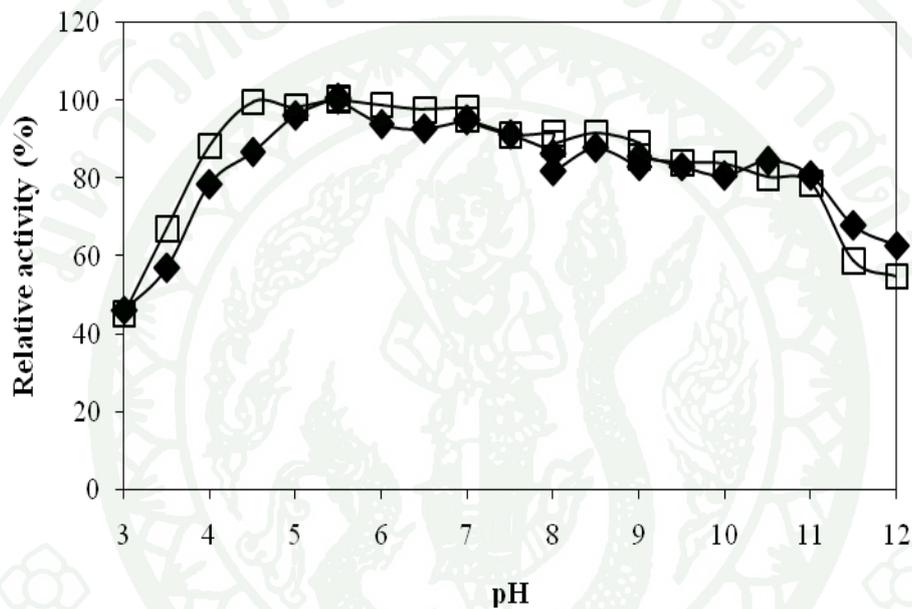


ภาพที่ 22 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์เบต้าไคลาเนสและเบต้าไคโลซิเดสที่ผลิตจากเชื้อผสมของ *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

- ◆ เอนไซม์เบต้าไคลาเนส
- เอนไซม์เบต้าไคโลซิเดส

#### 7.4 ผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสม ในช่วงพีเอช 4.0-12.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์เบต้าไซลานเนสสามารถทนพีเอชได้ในช่วงที่กว้างตั้งแต่ 5.0-11.0 และ เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสสามารถทนพีเอชได้ในช่วงที่กว้างตั้งแต่ 4.5-11.0 ดังแสดงในภาพที่ 23



ภาพที่ 23 ผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสที่ผลิตจากเชื้อผสมของ *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24

- ◆ เอนไซม์เบต้าไซลานเนส
- เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน จากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสร้างสปอร์ทั้งหมด 180 สายพันธุ์ ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 20 สายพันธุ์ ที่สามารถย่อยสลายไขมันบนอาหารแข็งได้ เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไกลูโคซิเดสและเบต้าไซโลซิเดส ในอาหารเหลวที่มีฟางข้าวเป็นองค์ประกอบ พบว่าเชื้อสายพันธุ์ DMKUB24 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสได้สูงที่สุด ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ DMKUB39 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้าไกลูโคซิเดสได้สูงที่สุด ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ไปศึกษาการผลิตเอนไซม์เบต้าไกลูโคซิเดสและเบต้าไซโลซิเดสในการทดลองต่อไป

จากฐานฐานวิทยา ลักษณะการเจริญและการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าเชื้อสายพันธุ์ DMKUB24 มีความใกล้เคียงกับ *B. amyloliquefaciens* มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสบนยีน 16S rRNA เท่ากับ 99.87 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อสายพันธุ์ DMKUB24 ใกล้เคียง *B. pumilus* มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสบนยีน 16S rRNA เท่ากับ 99.46 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาการเหนี่ยวนำเอนไซม์เบต้าไกลูโคซิเดสด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 และ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> ซึ่งเป็นแอกติโนมัยสิทชนิดใหม่ ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่าไขมันสามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไขมันได้สูงสุดเท่ากับ 17.7 และ 5.38 หน่วยต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับแหล่งคาร์บอนอื่นได้แก่ แมนนิทอล กาแล็คโตส ไซโลส มอลโตส ฟรุกโตส ซอบิทอล แลคโตส ไซลิทอล ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ เซลโลไบโอส และไซโอไบโอส เชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณต่ำและไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไกลูโคซิเดสในอาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน เมื่อนำเลี้ยงเชื้อของ *B. pumilus* DMKUB39 และ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> ที่มีไขมันและน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน มาทำ SDS-PAGE และ active-PAGE พบเอนไซม์เบต้าไกลูโคซิเดสหลักที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20 และ 66.2 กิโลดาลตัน ตามลำดับ การเติมกลูโคสลงในอาหารเหลวที่มีไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส

ลานเนสเพิ่มขึ้น โดยในอาหารไซแลนเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 มีการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสได้ 12.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน แต่เมื่อเติมกลูโคสลงในอาหารไซแลน พบว่าเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 สามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสเพิ่มขึ้นถึง 13.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การเติมไซโลสมีผลไปยังการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนส โดยมีเอนไซม์ลดลงเท่ากับ 9.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร การเติมแมนนิทอลลงในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสเพิ่มขึ้น โดยในอาหารไซแลนเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> มีการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสได้ 9.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน เมื่อมีการเติมแมนนิทอลลงในอาหารไซแลน พบว่าเชื้อ *M. siamensis* DMKUA245<sup>T</sup> สามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสเพิ่มขึ้นถึง 17.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การเติมไซโลสมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนส โดยมีการผลิตเอนไซม์ลดลงเท่ากับ 8.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร

จากการหาปัจจัยและค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสและเบต้าไซโลซิเดสของเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสและเบต้าไซโลซิเดสโดยใช้วิธี Plackett-Burman ออกแบบการทดลอง ได้แก่ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง, peptone,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  และพีเอชเริ่มต้น เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสและเบต้าไซโลซิเดสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการศึกษาค่าอิทธิพลของทั้ง 4 ปัจจัยต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสและเบต้าไซโลซิเดสด้วยการวางแผนการทดลองแบบ Central composite design และวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง พบว่าจุดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนส คือ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง 18.7 กรัมต่อลิตร, peptone 2.0 กรัมต่อลิตร และ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.3 ซึ่งทำนายว่าเมื่อใช้สภาวะดังกล่าวเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 จะสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสได้เท่ากับ 17.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการทดลองจริงเพื่อยืนยันผลการทำนายพบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสได้เท่ากับ 21.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสภาวะดังกล่าวช่วยให้เชื้อผสมผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.9 เท่า เมื่อเทียบกับอาหารสูตรเดิมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซแลนเนสเพียง 11.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สูตรอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส คือการใช้ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ 20.1 กรัมต่อลิตร, peptone 2.0 กรัมต่อลิตร และ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.28 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.03 ซึ่งทำนายว่าเมื่อใช้สภาวะดังกล่าวเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 จะสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสได้เท่ากับ 27.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการทดลองจริงเพื่อยืนยันผลการทำนาย

พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสได้เท่ากับ 31.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสภาวะดังกล่าวช่วยให้เชื้อผสมผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น 3.2 เท่า เมื่อเทียบกับอาหารสูตรเดิมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสเพียง 9.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 โดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิดในถังหมักแบบกวน พบว่าเชื้อผสมสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 49.3 และ 46.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมในถังหมักแบบกวนสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงในพลาสติก

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมและความคงทนของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสจากเชื้อผสม *B. pumilus* DMKUB39 และ *B. amyloliquefaciens* DMKUB24 ในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดส คือ 50 และ 55 องศาเซลเซียส ส่วนผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสพบว่าสามารถทนที่อุณหภูมิ 65 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสเท่ากับ 5.5 และ 5.0 สามารถทนพีเอชได้ในช่วงที่กว้างระหว่าง 5.0-11.0 และ 4.5-11.0 ตามลำดับ

#### ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาปริมาณและความเข้มข้นของเอนไซม์ผสมที่เหมาะสมต่อการย่อยไซแลนให้เป็นไซโลส
2. ควรศึกษาอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในถังหมักเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดสในถังหมักขนาด

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จิตรลดา จูติกอรรณ, ภัทรา ผาสอน, กนก รัตนะกนกชัย และ คิน เลย์ คู. 2551. การผลิตน้ำตาลไซโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากไซแลนโดย thermophilic *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12, น. 88-95. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 (สาขาวิทยาศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชนิดา เลิศศาลักษ์, กนก รัตนะกนกชัย และ คิน เลย์ คู. 2545. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต Cellulase-free xylanase จาก alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 25: 3-13.

ชลนิชา ขลิบทอง. 2545. การคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus* ที่ผลิตเอนไซม์อาหารสัตว์และปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ solid state ที่ใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบหลัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชนวรรณ ศรีนาง, จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ, คิน เลย์ คู, กนก รัตนะกนกชัย และ ยันเช็คลี. 2551. ผลิตภัณฑ์จากการหมัก *Bacillus* sp. Strain TW-1 ในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 31: 291-304.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2541. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

นวรรตน์ จันทร์กระเวน. 2548. การออกแบบการทดลองเพื่อปรับปรุงคุณภาพของแรงเดือนลูกบอลในกระบวนการเชื่อมวงจร : กรณีศึกษาโรงงานผลิตเซมิคอนดักเตอร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิทยากร ลิมทอง. 2531. อิทธิพลของจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสต่อการผลิตปุ๋ยหมักจากฟางข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- ไพโรจน์ วิริยาริ. 2544. การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง. พิมพ์ครั้งที่ 1 ภาควิชาเทคโนโลยีการ  
พัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- ภัทรา ผาสอน, สันตณีย์ รัตติธรรมกุล, กนก รัตนะกนกชัย และ คิน เลย์ คู. 2544. การผลิตไซลานเนส  
และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Bacillus circulans* B6 เมื่อเจริญใน xylan medium, น.  
56-63. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39  
(สาขาวิทยาศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช, วรรณิการ์ ดวงมาลัย, สุนีย์ โชตินิรนาท และ นภา โล่ห์ทอง. 2536. การใช้  
ประโยชน์จากขังข้าวโพดด้วยจุลินทรีย์, น 62 -74. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของ  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31 (สาขาวิทยาศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,  
กรุงเทพฯ.
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช, Seigo Sato, Masatoshi Matsumura และนภา โล่ห์ทอง. 2537. การแยกสกัด  
และย่อยไซแลนในขังข้าวโพดด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 27:  
142-158.
- วิเชียร สีสุข. 2532. การย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus*  
*fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1-F. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศูนย์สถิติการเกษตร. 2557. สถิติการผลิตการเกษตรตามชนิดพืช. แหล่งที่มา: [http://production.doae.go.th/estimate/reportP2/reportP2\\_display.php](http://production.doae.go.th/estimate/reportP2/reportP2_display.php). 25 พฤษภาคม 2557.
- สันตณีย์ รัตติธรรมกุล. 2541. การศึกษาการผลิตและคุณสมบัติของ xylanolytic enzyme จาก  
*Bacillus circulans* B<sub>6</sub>. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า  
ธนบุรี, กรุงเทพฯ.
- สมใจ ศิริ โภค. 2545. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพฯ.

อนุวัตร แจ่มชัด. 2549. สถิติสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการประยุกต์. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อานนท์ ประเสริฐศรี, วิเชียร กิจปรีชาวนิช, สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, จรัญ เจตนะจิตร และ นภา โฉมทอง. 2543. การผลิตเอนไซม์  $\beta$ -xylanase ที่ปราศจากเซลล์จากเชื้อรา *Humicola lanuginosa* (GRIFFON AND MAUBLANC) BUNCE ด้วยกระบวนการหมักแบบ solid State, น. 279-294. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 (สาขาวิทยาศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Abdulla, H.M. and S.A. El-Shatoury. 2007. Actinomycetes in rice straw decomposition. **Waste Manage.** 27: 850–853.

Agbor, V.B., N. Cicek, R. Sparling, A. Berlin and D.B. Levin. 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biochnology Advance.** 29(6): 675-685.

Alam, M., I. Gomes, G. Mohiuddin and M.M. Hoq. 1994. Production and characterization of thermostable xylanase by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocellulose. **Enzyme Microb. Technol.** 16: 298-302.

Anisha, G.S., R.K. Sukumaran and P. Prema. 2007. Statistical optimization of  $\alpha$ -galactosidase production in submerged fermentation by *Streptomyces griseoloalbus* using response surface methodology. **Food Technol Biotechnol.** 46: 171-177.

Anzai, Y., Y. Kudo and H. Oyaizu. 1997. The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas* and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 47: 249-251.

Ashita, D., J.K. Gupta, B.M. Jauhari and Khanna. 2000. A cellulase poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. **Bioresource Technol.** 73: 273-277.

- Badhan, A.K., B.S. Chadha, J. Kaur, H.S. Saini and M.K. Bhat. 2007. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzyme by thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* IMI 387099. **Bioresource Technol.** 98: 504-510.
- Bastawade, K.B. 1992. Xylan structure microbial xylanase and their mode of action. **World J. Microbial and Biotechnol.** 8: 353-368.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic system. **Trends in Biotechnology.** 3: 286-289.
- Biely, P., M. Vrsanska and S. Kucar. 1992. Identification and mode of action of endo (1, 4) xylanases, pp. 81-95. In J. Visser (ed.). **Xylan and Xylanases.** Elsevier Science Publisher B.
- Boondaeng, A., U. Ishida, T. Tamura, S. Tokuyama and V. Kitpreechavanich. 2009. *Microbispora siamensis* sp. nov., a thermotolerant actinomycete isolated from soil. **Int J Syst Evol Microbiol.** 59: 3136-3139.
- Cao, Y., D-J. Meng, J. Lu and J. Long. 2008. Statistical optimization of xylanase production by *Aspergillus niger* AN-13 under submerged fermentation using response surface methodology. **Afr J Biotechnol.** 7: 631-638.
- Chen, J., D. Li, Y. Zhang and Q. Zhou. 2005. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *Chaetomium thermophilum*. **J Gen Appl Microbiol.** 55: 175-181.
- Chen, K.C., T.C. Lee and J.Y. Houg. 1992. Search method for the optimal medium for the production of lactase by *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme Microb Tech.** 14(8): 659-664.
- Chen, W.P and A.W. Anderson. 1980. Extraction of hemicelluloses from ryegrass straw for the production of glucose isomerase and use of resulting straw residue for animal feed. **Biotech. Bioeng.** 22: 519-513.

- Chun, J., J. Lee, M. Kim, S. Kim, B. K. Kim and Y. Lim. 2007. Eztaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequence. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57: 2259-2261.
- Collins, T., C. Gerday and G. Feller. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.** 29: 3-23.
- Coughlan, M.P. and G.P. Hazlewood. 1993.  $\beta$ -1, 4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 17: 259-289.
- Cuiping, L., W. Chuangzhi., Yanyongjie and H. Haitao. 2004. Chemical elemental characteristics of biomass fuels in China. **Biomass and Bioenergy.** 27: 119-130.
- Dekker, R.F.H. 1983. Bioconversion of hemicelluloses: Aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* OM 9414 and enzymic saccharification of hemicelluloses. **Biotech. Bioeng.** 25: 1127-1140.
- DJekrif-Dakhmouche, S., Z. Gheribi-Aoulmi, Z. Meraihi and L. Bennamoun. 2005. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **J Food Eng.** 73: 190-197.
- Doyle, P.T., C. Devendra and G.R. Pearce. 1986. Rice Straw as Feed for Ruminants. **International development program of Australian Universities and Collages.**
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** 39:783-791.

- Francis, F., A. Sabu, K.M. Nampoothiri, S. Ramachandran, S. Ghosh, G. Szakacs and A. Pandey. 2002. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochem Eng J.** 15: 107-115.
- Gacalar, M.C. and J. Singh. 1984. **Statistical method in food and consumer research**. Applied science, London.
- Garrote, G., H. Dominguez and J. C. Parajo. 2002. Auto hydrolysis of corncob: study of nonisothermal operation for xylooligosaccharide production. **J. Food Engineering.** 52: 211-218.
- George, U and T.K. Ghose. 1983. Bioconversion of rice straw into improved fodder in cattle, pp. 32-39. In C.A. Shacklady (ed). **The use of organic residues in rural communities**. The United Nations University, Tokyo
- Gessese, A. and Mamo, G. 1999. High-level xylanase production by alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid state fermentation. **Enzyme. Microb. Tech.** 25: 68-72.
- Givens, J.D. 1996. **Air quality annual report**. Louisiana department of environmental quality, Baton Rouge, LA.
- Goodwin, T.W. and E.T. Mercer. 1972. **Introduction to Plant Biochemistry**. Pergamon Press, New York. 359 p.
- Han, Y.W. 1978. Microbial utilization of straw. **Adv. Appl. Microbiol.** 23: 119-153.
- Heck, J.X., S.H. Flores, P.F. Hertz and M.A.Z. Ayub. 2005. Optimization of cellulose-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid state cultivation. **Process. Biochem.** 40: 107-112.

- Hrmova, M., P. Biely and M. Vrsanska. 1986. Specific cellulase and  $\beta$ - xylanase in *Trichoderma reesei* QM 9414. **Arch. Microbiol.** 144: 307-311.
- \_\_\_\_\_. 1989. Cellulose and xylan-degrading enzyme of *Aspergillus terreus* and *A. niger*. **Enzyme Microbiol. Technol.** 11: 610-616.
- Hu, R. 1991. **Microorganisms in alkaline environments.** Kodansha, Tokyo.
- Inoue, H., S. Yano, T. Endo, T. Sakaki and S. Sawayama. 2008. Combining hot- compressed water and ball milling pretreatments to improve the efficiency of enzymatic hydrolysis of eucalyptus. **Biotechnol Biofuels.** 1(2): 1-9.
- James, R.W., A.W. David, F.T Christopher. 1990. Characterisation of xylanases produced in liquid and compost cultures of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*: **Mycological research** 104(7): 810-819.
- Jin, S. and H. Chen. 2006. Structural properties and enzymatic hydrolysis of rice straw. **ProcessBiochem.** 41: 1261–1264.
- Kapoor, M.L., M. Nair and R .C. Kuhad. 2008. Cost-effective xylanaseproduction from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. **Biochem. Eng. J.** 38: 88-97.
- Karimi, K., S. Kheradmandinia and M.J. Taherzadeh. 2006. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. **Biomass Bioenergy** 30(3): 247-253.
- Khuri, A.I. and J.A. Cornell. 1987. **Response surface designs and analyses.** Marcel Dekber, New York.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.** 16: 111-120.

- Kitpreechavanich, V., M. Hayashi and S. Nagai. 1984. Production of xylan degrading enzyme by thermophilic fungi, *Aspergillus fumigatus* and *Humicola lanuginosa*. **J. Ferment Technol.** 62 (1): 63-69.
- Knob A., C.R.F. Terrasan and E.C. Carmona. 2010.  $\beta$ -Xylosidases from filamentous fungi: An overview. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 26: 389-407.
- Krishna, C. 1999. Production of cellulose by solid state bioprocessing of banana waste. **Bioresource. Technol.** 69: 231-239.
- Kulkarni, N. and M. Rao. 1996. Application of xylanase from alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM59 in biobleaching of bagasse pulp. **J. Biotechnol.** 51: 167-173.
- Kyu, K., K. Ratanakhanokchai, D. Uitapap and M. Tanticharoen. 1994. Induction of xylanase in *Bacillus circulans* B<sub>6</sub>. **Bioresource Technol.** 48: 163-167.
- La Grange, D.C., I.S. Pretorius, M. Claeysens and W.H. Van Zyl. 2001. Degradation of Xylan to D-Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Co expressing the *Aspergillus niger*  $\beta$ -Xylosidase (*xlnD*) and the *Trichoderma reesei* Xylanase II (*xyn2*) Genes. **Appl Environ Microb.** 67: 5512-5519.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175. In Stackebrandt, E and M. Goodfellow eds. **Nucleic acid techniques in bacterial systematic.** John Wiley & Sons, Chichester.
- Laukevics, J.J., U. E.V Apsite and R.P. Tengerdy. 1984. Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. **Biotech. Bioeng.** 26: 1465-1474.
- Leartslarus, C., K. Rattanakhanokchai and K. L. Kyu. 2002. Optimization of extracellular cellulose-free xylanase production by alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1. **KMUTT Research and development Journal.** 25: 3-13.

- Lee, Y.E., S.E. Lowe and G. Zeikus. 1993. Regulation and characterization of xylanolytic enzyme of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. **Applied and Environmental Microbiology**. 59: 763-771.
- Linder, C., J. Stulke and M. Hecker. 1994. Regulation of xylanolytic enzyme in *Bacillus subtilis*. **Microbiol.** 140: 753-757.
- Liu, B-L., T-M. Rou1, Y.K. Rao and Y-M. Tzeng. 2007. Effect of pH and Aeration Rate on the Production of Destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. **Int J Appl Sci Eng.** 5(1): 17-26.
- Lowry, O.H., Roasebrough, N.J., Fan, A.L. and Randail, R.S. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. 193: 265-275.
- Lynch, J.M. 1988. Utilization of lignocellulosic waste, pp. 715-835. In C.S. Gutteridge and J. R. Norris (eds). Aspects of Applied Microbiology. **The Society for Applied Bacteriology Symp18**. Blackwell Scientific Publication , Oxford.
- Meevotison, V., T.W. Flegel, T.Glinsukoru, N. Sobhon and S. Kiatpapan . 2527. Fungi to upgrade rice straw as a ruminant feed, pp. 132-147. **In Proceeding on the utilization of Rural and Urban Wastes**. 26-28 January 1984. Chulalongkorn Univ. Bangkok.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.
- Montgomery, D.C. 1984. **Design and analysis of experiment**. John Wiley and Sons, New York.
- Nath, D. and M. Rao. 2001. pH dependent conformational and structure change of xylanase from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. (NCIM59). **Enzyme. Microb. Tech.** 28: 397-403.

- Neter, J., M.H. Kutner, C.J. Nachtsheim and W. Wasserman. 1996. **Applied linear statistical models**. 4<sup>th</sup> ed. WBC McGaw-Hill, New York.
- Pham, P.L., P. Taillandier, P. Delma and M. Strehaiano. 1998. Production of xylanase by *Bacillus polymyxa* using lignocellulosic waste. **Ind. Crop Prod.** 7:195-203.
- Plackett, R.L. and J.P. Burman. 1946. The design of optimum multifactorial experiments, **Biometrika** 33: 305-325.
- Poorma, C.A. and P. Prema. 2007. Production of cellulose free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid state fermentation and its application in waste paper recycling. **Bioresource Technol.** 98: 450-490.
- Pospiech, A and B. Neumann. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. **Trens Genet.** 11: 2217-218.
- Purkarthofer, H., M. Sinner and Steiner. 1993. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization of production in submerged and solid state culture. **Enzyme Microbiol Technol.** 15: 677-682.
- Purkarthofer, H. and W. Steiner. 1995. Induction of endo xylanase in the fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microbiol. Technol.** 17: 114-118.
- Ratanakhanokchai, K., K.L. Kyu and M. Tanticharoen. 1999. Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. **Appli. Environ. Microb.** 65: 694-697.
- Reddy, V., P. Reddy, B. Pillay and S. Singh. 2002. Effect of aeration on the production of hemicellulases by *Thermomyces lanuginosus* SSBP in a 30 L bioreaction. **Process Biochem.** 37: 1221-1228.

- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4: 406-425.
- Samain, E., Ph. Debeire and J. P. Touzel. 1997. High level production of a cellulase-free xylanase in glucose- limited fed bath culture of a thermophilic *Bacillus* strain. **J. of Biotechnol.** 58: 71-78.
- Samar, S., R.K. Malik., R. Mangat., S. Singh and M. Ram. 1999. Effect of rice straw burning on the efficacy of the herbicides in wheat (*Triticum aestivum*). **Ind. J. Agronomy.** 44: 361–366.
- Shekiri J., E.M. Kuhn, M.J. Selig, N.J. Nagle, S.R. Decker and T. Elander. 2012. Enzymatic conversion of xylan residues from dilute acid-pretreated corn stover. **Appl Biochem Biotechnol** DOI 10.1007/s12010-012-9786-5
- Shen, H., J. Chen., Z. Zhong., W. Zhao., D. Ni., B. Tang and E.V. Valdes. 2003. Study on the application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technique for the prediction of fiber composition and silicification of rice straw. **Sci. Agric. Sin.** 36 (9): 1086–1090.
- Singh S, B. Pillay, V. Dilsook and B.A. Prior. 2000. Production and properties of hemicellulases by a *Thermomyces lanuginosus* strain. **J. Appl. Microbiol.** 88: 975-982.
- Sunna A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. **Critical Reviews in Biotechnol.** 17( 1 ): 39-67
- Suzuki T., E. Kitagawa , F. Sakakibara , K. Ibata , K. Usui and K. Kawai. 2001. Cloning, expression, and characterization of a family 52 beta-xylosidase gene (xysB) of a multiple xylanase-producing bacterium, *Aeromonas caviae* ME-1. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 65: 487-94.
- Tamura, K., J. Dudley, A. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Mol. Biol. Evol.** 24(8):1596–1599.

Tomme, P., R.A.J. Warren and N.R. Gilkes. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi.

**Advances in Microbial Physiology**. 37: 1-81.

Vadiveloo, J. 2000. Nutritional properties of the leaf and stem of rice straw. **Anim. Feed**

**sci.Technol.** 83: 57-65.

Wang, H. and H.Z. Chen. 2007. A novel method of utilizing the biomass resource: Rapid

liquefaction of wheat straw and preparation of biodegradable polyurethane foam (PUE).

**J Chinese Inst. Chem. Eng.** 38(2): 95

Wong, K.K.Y. and J.N. Saddler. 1991. *Tricoderma* xylanases, their properties and application, p.

171-180. In J. Visser (ed.) xylan and xylanases Elsevier Science publisher B. V, Netherland.

Wong, K.K.Y., L.U.L. Tan and J.N. Saddler. 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1, 4 xylanase in

microorganisms: function and applications. **Microbiological Reviews**. 52: 305-317.

Wurzburg, O.B. 1972. Starch in the food industry. **CRC handbook food additives**. 12: 361-

395.



ภาคผนวก

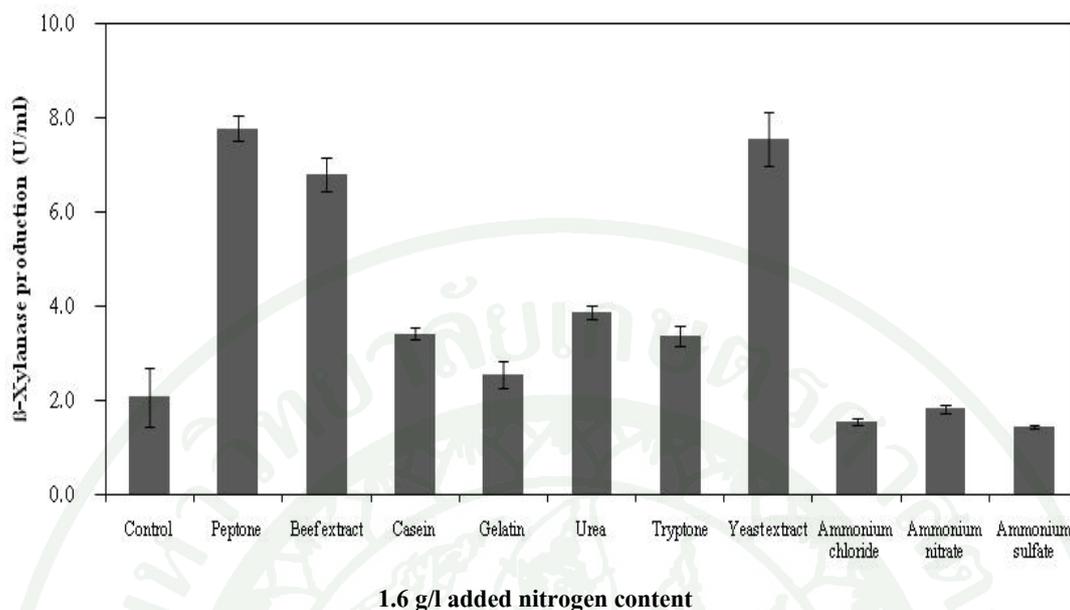


ภาคผนวก ก  
ผลข้อมูลการทดลอง

## 1. การศึกษาปัจจัยและค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลानเนสของเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39

### 1.1 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลानเนสของเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ในอาหาร basal medium ซึ่งประกอบด้วยสารอาหาร ดังนี้ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง 10 กรัมต่อลิตร,  $K_2HPO_4$  1 กรัมต่อลิตร,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ peptone, beef extract, casein, gelatin, urea, tryptone, yeast extract, ammonium chloride, ammonium nitrate และ ammonium sulfate 10 กรัมต่อลิตร พบว่าการเติม peptone และ yeast มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลानเนสสูงสุดและรองลงมา กล่าวคือมีการผลิตเอนไซม์ 7.8 และ 7.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ การเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแหล่งอนินทรีย์ ได้แก่ ammonium chloride, ammonium nitrate และ ammonium sulfate มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลानเนสลดลงอย่างชัดเจน โดยลดลงเท่ากับ 1.6, 1.8 และ 1.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 2.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพผนวกที่ ก1 จากการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลानเนสของเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ดังนั้นจึงเลือก peptone เป็นหนึ่งในปัจจัยที่จะนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลानเนสของเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ต่อไป



ภาพผนวกที่ ก1 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39

1.2 ผลของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสตามแผนการทดลองที่ออกแบบโดยวิธี Plackett-Burman

เมื่อศึกษาชนิดของสารอาหารซึ่งได้แก่ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง ( $X_1$ ), peptone ( $X_2$ ),  $K_2HPO_4$  ( $X_3$ ),  $KH_2PO_4$  ( $X_4$ ),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $X_5$ ),  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  ( $X_6$ ) และปัจจัยทางกายภาพซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ( $X_7$ ), ความเร็วรอบ ( $X_8$ ) และพีเอชเริ่มต้น ( $X_9$ ) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตามแผนการทดลองที่ออกแบบโดยวิธี Plackett-Burman ที่มีการทดลองทั้งหมด 12 การทดลอง พบว่าในแต่ละการทดลองมีกิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลานเนสที่ผลิตโดยเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางผนวกที่ ก1

ตารางผนวกที่ ก1 กิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ในแต่ละ การทดลองที่ออกแบบโดยวิธี Plackett-Burman

Run no.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	$\beta$ -xylanase activity (U/ml)	Viable cell count (CFUs/ml)
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	2.2	$5.6 \times 10^7$
2	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	8.2	$4.2 \times 10^8$
3	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	7.0	$4.7 \times 10^8$
4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	16.5	$8.7 \times 10^8$
5	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	14.7	$9.6 \times 10^8$
6	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	10.2	$5.7 \times 10^8$
7	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	6.2	$3.4 \times 10^8$
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1.6	$5.7 \times 10^7$
9	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	8.5	$6.1 \times 10^8$
10	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	10.2	$8.3 \times 10^8$
11	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1.3	$2.7 \times 10^7$
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3.8	$4.9 \times 10^7$

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ทั้ง 12 การทดลองไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS Statistics 17.0 (Statsoft, USA) เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสของ *B. pumilus* DMKUB39 ตารางผนวกที่ ก2 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (coefficient estimate) ค่า Mean square ค่าสถิติ F (*F*-value) และค่านัยสำคัญของการทดสอบ (*P*-value) เมื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส โดยจะพิจารณาจากค่า *P*-value ที่น้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่ 0.05 ซึ่งจากการวิเคราะห์ พบว่ามีเพียง 3 ตัวแปร ได้แก่ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง (X<sub>1</sub>), CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (X<sub>6</sub>) และพีเอชเริ่มต้น (X<sub>9</sub>) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (*P*<0.05) นอกจากนี้จากผลการทดลองในตารางผนวกที่ ก1 ยังสามารถสังเกตได้ว่าการทดลองในรันที่ 4, 5, 6 และ 10 ซึ่งเป็นรันที่มีการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสในปริมาณสูง จะมีอัตราการเจริญของเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 สูงเช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นไปได้ว่าสูตรอาหารในรันดังกล่าวส่งเสริมการ

เจริญเติบโตของเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ซึ่งเป็นผลให้มีการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสในปริมาณมากตามไปด้วย

ตารางผนวกที่ ก2 ผลวิเคราะห์ทางสถิติจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman โดยการศึกษปัจจัยต่าง ๆ 9 ปัจจัยต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39

Variable code	Variables	Coefficient estimate	Mean square	F-value	P-value
	Corrected model		29.075	21.535	0.045
	intercept	7.548	683.728	506.409	0.002
X <sub>1</sub>	ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่าต่าง (g/l)	2.788	93.298	69.102	0.014 <sup>a</sup>
X <sub>2</sub>	Peptone (g/l)	0.840	8.467	6.271	0.129
X <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l)	-0.080	0.077	0.057	0.833
X <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/l)	-0.481	2.784	2.062	0.287
X <sub>5</sub>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/l)	-2.201	58.168	43.083	0.051
X <sub>6</sub>	CoCl <sub>2</sub> (g/l)	-1.490	26.641	19.732	0.022 <sup>a</sup>
X <sub>7</sub>	อุณหภูมิ (°C)	1.281	19.712	14.600	0.062
X <sub>8</sub>	ความเร็วรอบ (rpm)	1.176	16.615	12.306	0.072
X <sub>9</sub>	พีเอชเริ่มต้น	1.730	35.915	26.601	0.035 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Significant at  $P < 0.05$ ;  $R^2 = 0.990$ , Adjust  $R^2 = 0.944$

จากการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) ของการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.990 ซึ่งสามารถใช้อธิบายการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้ 99.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 1.0 เปอร์เซ็นต์ไม่สามารถอธิบายได้ ซึ่งเป็นผลจากตัวแปรอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้

### 1.3 ผลการศึกษาจุดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสโดยเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

หลังจากทำการศึกษาคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 โดยใช้วิธีทางสถิติ Plackett-Burman ออกแบบการทดลอง นำปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสมาศึกษาหาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง สำหรับรูปแบบที่ใช้ในการออกแบบการทดลอง คือ Central composite design สำหรับปัจจัยที่นำมาศึกษามีทั้งหมด 3 ปัจจัย ได้แก่ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง ( $X_1$ ),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $X_2$ ) และพีเอชเริ่มต้น ( $X_3$ ) โดยแต่ละปัจจัยที่ทำการศึกษาระเบียงออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -1.68, -1, 0, +1 และ +1.68 ในแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 17 การทดลอง โดยทำการทดลองในระดับกลางจำนวน 3 ซ้ำ (การทดลองที่ 15-17) เมื่อทำการทดลองตามแผนการทดลองทั้ง 17 การทดลอง พบว่าในแต่ละการทดลองมีค่าของกิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลานเนสที่แตกต่างกัน โดยการทดลองที่ 15 ประกอบด้วย ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง 15 กรัมต่อลิตร, peptone 0.5 กรัมต่อลิตร,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1 กรัมต่อลิตร,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 กรัมต่อลิตร และ  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.12 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 42 องศาเซลเซียส, ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 22.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางผนวกที่ ก3

ตารางผนวกที่ 3 ผลของการวิเคราะห์ห้กิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลานเนส ของเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ในแต่ละการทดลอง โดยใช้วิธี Central composite design ออกแบบการทดลอง

Run No.	Level			$\beta$ -xylanase production (U/mL)
	X1	X6	X9	
1	-1	-1	-1	3.5
2	-1	-1	1	4.3
3	-1	1	-1	4.2
4	-1	1	1	3.5
5	1	-1	-1	11.5
6	1	-1	1	15.3
7	1	1	-1	5.4
8	1	1	1	2.1
9	-1.68	0	0	1.9
10	1.68	0	0	5.2
11	0	-1.68	0	4.1
12	0	1.68	0	2.5
13	0	0	-1.68	3.6
14	0	0	1.68	4.2
15	0	0	0	22.5
16	0	0	0	20.3
17	0	0	0	20.9

## 1.4 ผลการวิเคราะห์การถดถอย

### 1.4.1 การทดสอบสมมติฐานของสมการการถดถอย

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส จากผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางผนวกที่ ก4 พบว่าค่าสถิติ F เท่ากับ 8.07 ด้วย degree of freedom (df) เท่ากับ (9, 7) มีค่านัยสำคัญของการทดสอบ ( $P$ -value) เท่ากับ 0.0058 ซึ่งให้เห็นว่าปัจจัยที่ศึกษามีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99.4 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ก4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares	F-value	P-value
<b><math>\beta</math>-xylanase activity</b>					
Model	755.0773	9	83.89747	8.07	0.0058
Residual	72.7735	7	10.39621		
Total	827.8508	16			
$R^2 = 0.9120$					
Adj- $R^2 = 0.7990$					

### 1.4.2 การประมาณสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงพหุคูณ

เมื่อประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส เพื่อทดสอบความมีนัยสำคัญของตัวแปรที่ศึกษา โดยพิจารณาจากค่า  $P$ -value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่ 0.05 และทิศทางของอิทธิพลว่ามีอิทธิพลทางบวก หรือทางลบต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส ดังแสดงในตารางผนวกที่ ก5 พบว่าตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส ได้แก่ พจน์ของพีเอช ( $X_9$ ), พจน์กำลังสองของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง ( $X_1^2$ ), พจน์กำลังสองของ  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $X_6^2$ ) และพจน์กำลังสองของพีเอช ( $X_9^2$ ) รูปแบบสมการการถดถอยที่เหมาะสม ดังแสดงในสมการที่ 1

ตารางผนวกที่ ก5 ค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า  
ไซลานเนส

Variables	Coefficients estimate	Standard error	t-value	P-value
(Constant)	-1450.39	257.559	-5.631	0.0007
X <sub>1</sub>	7.67	3.857	1.990	0.0869
X <sub>6</sub>	749.34	316.362	2.369	0.0497
X <sub>9</sub>	341.70	62.051	5.507	0.0009 <sup>a</sup>
X <sub>1</sub> X <sub>6</sub>	-7.95	3.799	-2.092	0.0747
X <sub>1</sub> X <sub>9</sub>	0.02	0.456	0.037	0.9713
X <sub>6</sub> X <sub>9</sub>	-35.75	37.999	-0.940	0.3781
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-0.22	0.038	-5.639	0.0008 <sup>a</sup>
X <sub>6</sub> <sup>2</sup>	-1546.07	270.431	-5.717	0.0007 <sup>a</sup>
X <sub>9</sub> <sup>2</sup>	-21.09	3.842	-5.488	0.0009 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Significant at  $P < 0.05$

$$Y = -1450.39 + 7.67X_1 + 749.34X_6 + 341.704X_9 - 7.95X_1X_6 + 0.02X_1X_9 - 35.75X_6X_9 - 0.22X_1^2 - 1546.07X_6^2 - 21.09X_9^2 \dots \dots \dots \text{สมการที่ 1}$$

จากสมการที่ 1 สังเกตได้ว่าตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร ได้แก่ X<sub>1</sub> X<sub>6</sub> และ X<sub>9</sub> มีอิทธิพลทางบวก (มีสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง (Y) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าวค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสมีค่าเพิ่มสูงขึ้น

จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R<sup>2</sup>) เท่ากับ 0.9120 แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนสที่ได้ เป็นผลจากตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร 91.20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 8.80 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลจากตัวแปรอิสระอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้

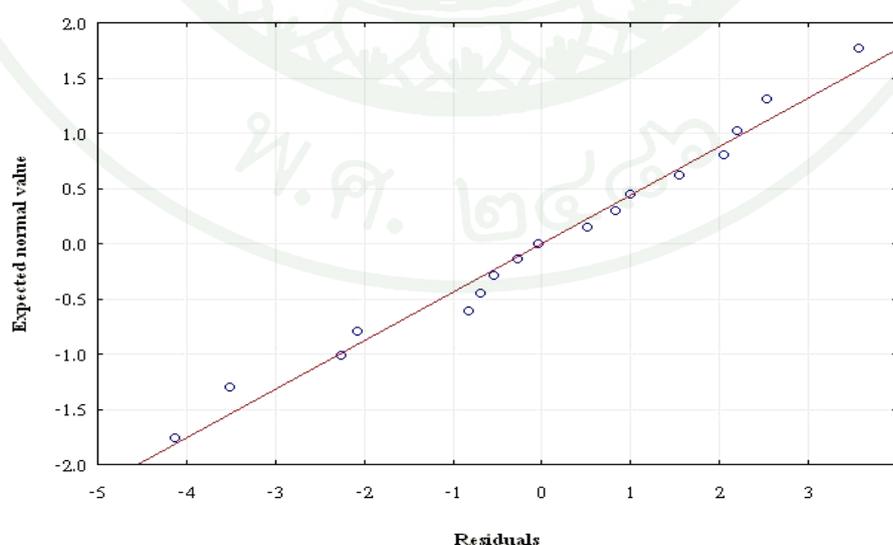
Hu (1999) รายงานสมการที่มักนำไปใช้ควรมีค่า  $R^2$  อย่างน้อย 0.75 หากสูงกว่า 0.90 ถือว่าดีมาก (ค่า  $R^2$  มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดยที่ 0 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ใดๆ ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม แต่ที่ 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างสมบูรณ์) อีกทั้งถ้า Adjust  $R^2$  มีค่ามากกว่า 64 เปอร์เซ็นต์ ( $>0.64$ ) แสดงว่ารูปแบบสมการเหมาะสม

### 1.5 การตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอย

ก่อนที่จะนำสมการการถดถอยไปใช้ได้จะต้องทำการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอย (Model adequacy checking) ก่อน เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบคือ การวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อน (residual analysis) ถ้าหากแบบจำลองถูกต้องความคลาดเคลื่อนจะต้องไม่มีรูปแบบ โดยการตรวจสอบความเหมาะสมมีดังนี้

#### 1.5.1 การทดสอบการแจกแจงแบบปกติ

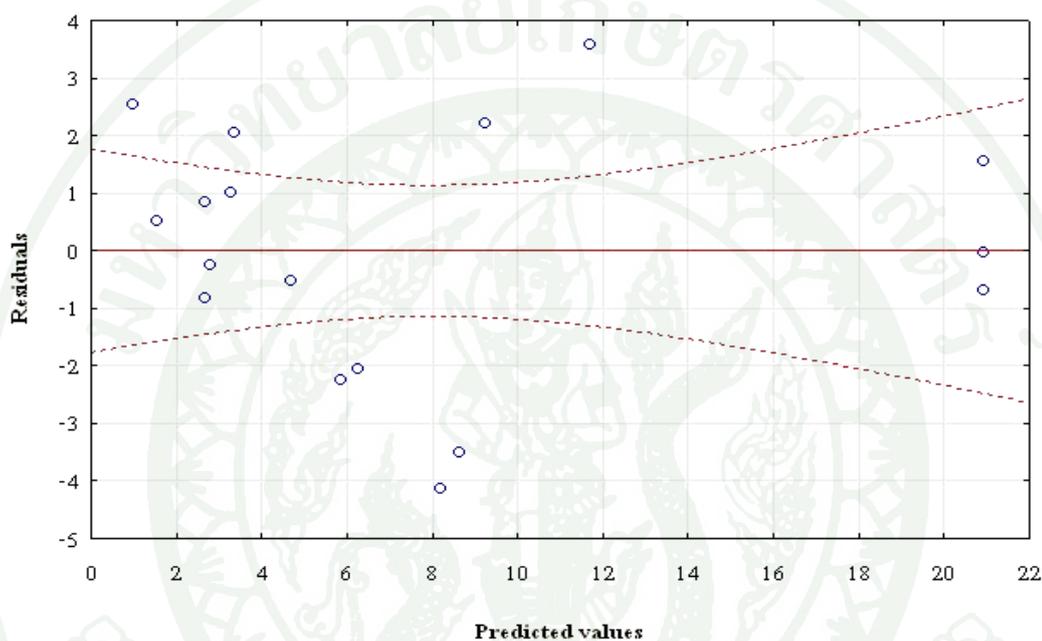
จากการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอยโดยวิธี normal probability plot พบว่าลักษณะของจุดบนกราฟส่วนใหญ่มีการกระจายตัวในแนวเส้นตรง ดังแสดงในภาพผนวกที่ ก2 ดังนั้นจึงสรุปว่าความคลาดเคลื่อนมีการแจกแจงเป็นแบบปกติ และเป็นไปตามข้อกำหนดเบื้องต้นของการวิเคราะห์การถดถอย



ภาพผนวกที่ ก2 Normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อน

### 1.5.2 การทดสอบความคงที่ของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

จากกราฟการกระจายระหว่างค่า residuals บนแกน Y กับค่า predicted value บนแกน X พบว่าจุดมีการกระจายอย่างไม่มีรูปแบบ และกระจายรอบศูนย์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในภาพผนวกที่ ก3



ภาพผนวกที่ ก3 Scatter plot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนาย

ดังนั้นเมื่อทำการตรวจสอบความเหมาะสมของรูปแบบสมการการถดถอย ด้วยวิธีวิเคราะห์ ความคลาดเคลื่อนกับการพล็อตกราฟ normal probability plot และ scatter plot สามารถสรุปได้ว่ารูปแบบของสมการการถดถอยหรือสมการความสัมพันธ์ที่ได้จากการทดลองนั้น เป็นรูปแบบที่เหมาะสมแล้ว ขั้นตอนต่อไปจึงนำสมการการถดถอยที่ได้ไปใช้ทำนายการผลิต เอนไซม์เบต้าไซลันต่อไป

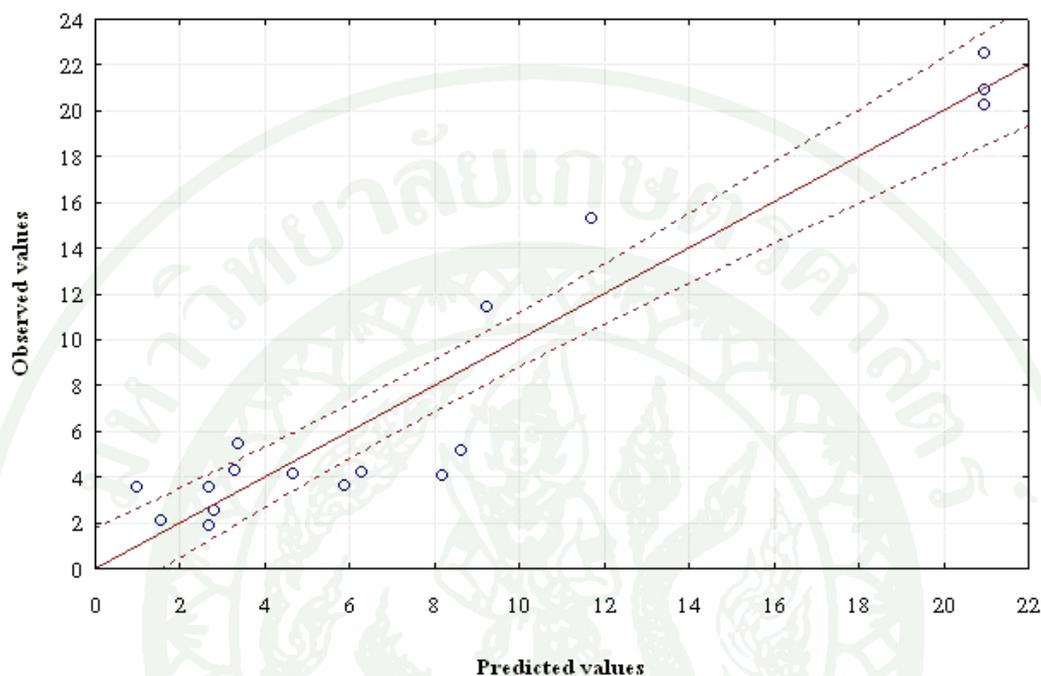
### 1.6 การเปรียบเทียบค่าจริงจากการทดลอง และค่าทำนายกิจกรรมของเอนไซม์

เมื่อนำสมการการถดถอยที่เหมาะสม (สมการที่ 1) ไปทำนายผลความเข้มข้นของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่าต่าง,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  และพีเอชเริ่มต้นในระดับที่ศึกษาต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ผลการทำนายดังแสดงในตารางผนวกที่ 6

ตารางผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กับค่าทำนายกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลันเนสในแต่ละการทดลอง

Run No.	Level			Actual level			$\beta$ -xylanase (U/mL)	
	X1	X6	X9	X1	X6	X9	Observed	Predicted
1	-1	-1	-1	10	0.06	7.5	3.5	1.0
2	-1	-1	1	10	0.06	8.5	4.3	3.3
3	-1	1	-1	10	0.18	7.5	4.2	4.6
4	-1	1	1	10	0.18	8.5	3.5	2.6
5	1	-1	-1	20	0.06	7.5	11.5	9.2
6	1	-1	1	20	0.06	8.5	15.3	11.7
7	1	1	-1	20	0.18	7.5	5.4	3.3
8	1	1	1	20	0.18	8.5	2.1	1.5
9	-1.68	0	0	6.6	0.12	8	1.9	2.6
10	1.68	0	0	23.4	0.12	8	5.2	8.6
11	0	-1.68	0	15	0.02	8	4.1	8.1
12	0	1.68	0	15	0.22	8	2.5	2.7
13	0	0	-1.68	15	0.12	7.16	3.6	5.8
14	0	0	1.68	15	0.12	8.84	4.2	6.2
15	0	0	0	15	0.12	8	22.5	20.95
16	0	0	0	15	0.12	8	20.3	20.95
17	0	0	0	15	0.12	8	20.9	20.95

จากสมการการถดถอยที่ใช้ทำนายค่าของกิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลानเนส พบว่าค่าทำนายมีแนวโน้มของทิศทางสอดคล้องกับค่าจริงที่ได้จากการทดลอง แสดงดังภาพที่ 13



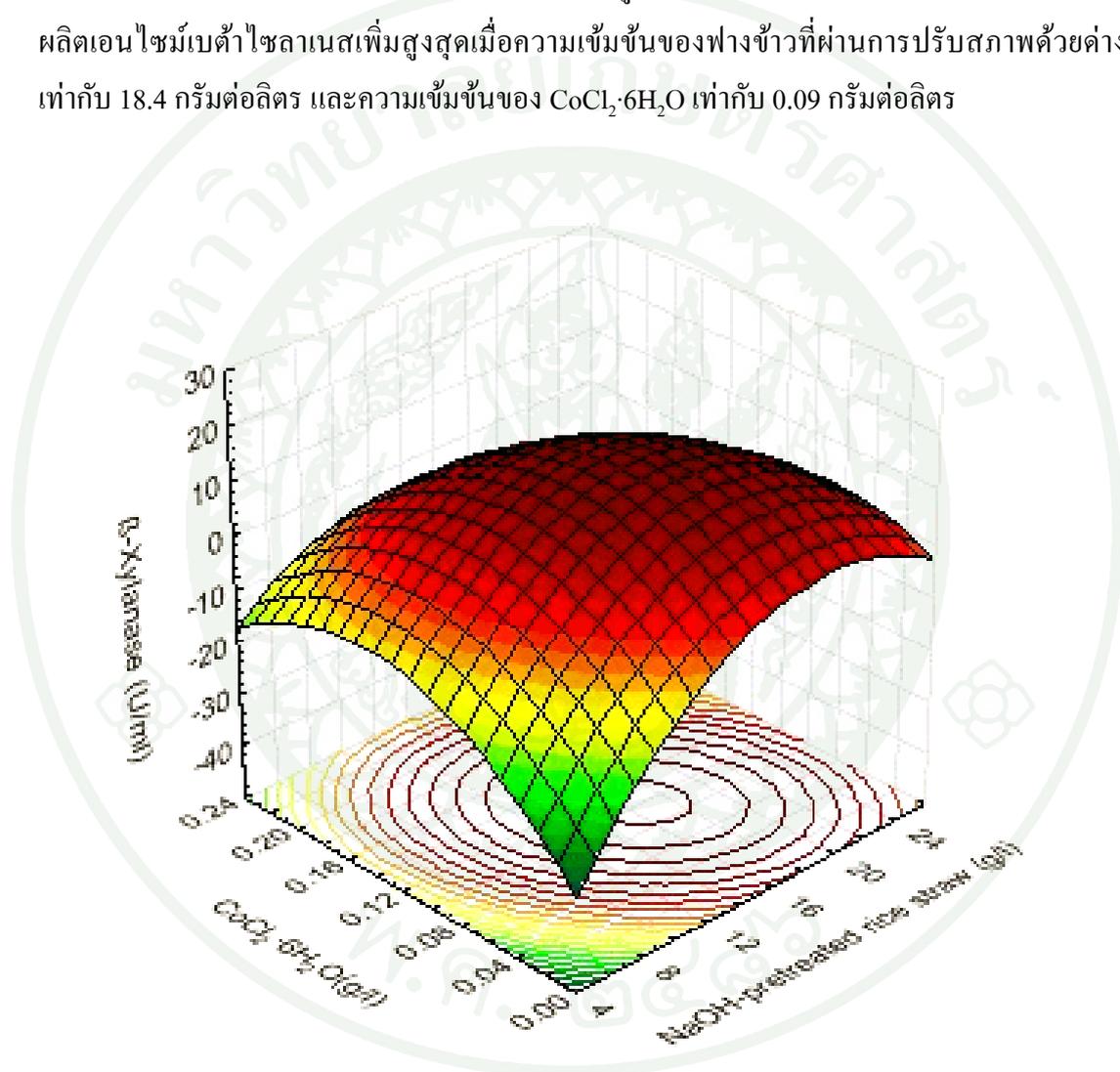
ภาพผนวกที่ ก4 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลानเนสที่ได้จากการทดลอง และ ค่าทำนาย

#### 1.7 ผลของการหาค่าที่เหมาะสมของตัวแปรที่ศึกษาต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลानเนส

จากการใช้วิธี Plackett-Burman ออกแบบการทดลอง พบว่ามี 3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลानเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ได้แก่ ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง ( $X_1$ ),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $X_6$ ) และพีเอชเริ่มต้น ( $X_9$ ) ซึ่งเป็นเพียงการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลानเนสเท่านั้น ดังนั้นเพื่อหาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลानเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 จึงนำตัวแปรทั้ง 3 ตัวแปร มาสร้างกราฟภาพพื้นผิวตอบสนอง (ภาพ 3 มิติ) และคอนทัวร์พล็อต (ภาพ 2 มิติ) โดยกราฟจะแสดงถึงอิทธิพลของแต่ละตัวแปร และปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลानเนส

จากภาพผนวกที่ ก5 แสดงผลของภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์พล็อตของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและ  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลानเนสจากเชื้อ *B.*

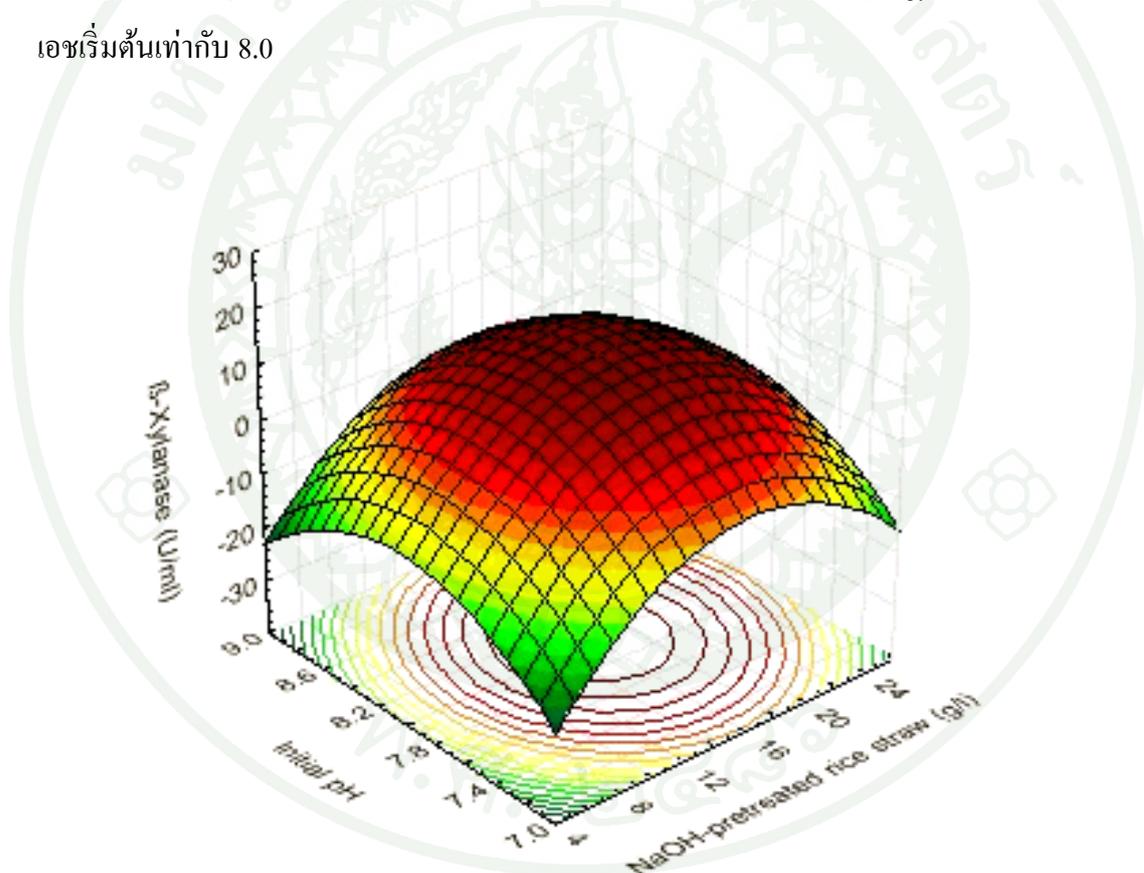
*pumilus* DMKUB39 โดยกำหนดค่าพีเอชเริ่มต้นที่ระดับกลางของการทดลองเท่ากับ 8.0 จากภาพแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของฟางข้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อยู่ระหว่าง 14.0-19.0 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของ  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  อยู่ระหว่าง 0.08-0.13 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและ  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ออกจากช่วงที่เหมาะสมจะมีผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์เบต้าไซลาลานลดลง จากรูปพื้นผิวตอบสนองสามารถทำนายได้ว่า การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลาลานสเพิ่มสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างเท่ากับ 18.4 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  เท่ากับ 0.09 กรัมต่อลิตร



ภาพผนวกที่ 65 กราฟพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและ  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลาลานสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39

ในขณะที่ภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์พล็อตของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลาลานสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 (ภาพ

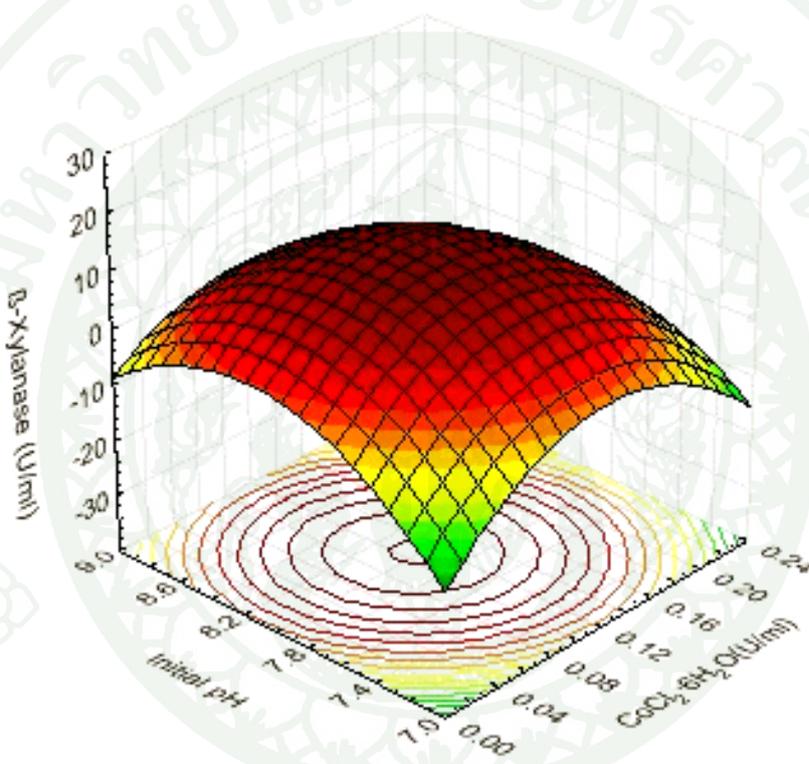
ผนวกที่ 6) กำหนดให้ความเข้มข้นของ  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  อยู่ที่ระดับกลางของการทดลอง ซึ่งเท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตร พบว่าช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างมีค่าระหว่าง 13.0-20.0 กรัมต่อลิตร ในขณะที่พีเอชเริ่มต้นมีค่าระหว่าง 7.7-8.4 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่าง มีผลทำให้เชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนสลดลง นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชเริ่มต้นจะช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนส ในขณะที่เดียวกันถ้าพีเอชเริ่มต้นในอาหารน้อยกว่า 7.0 การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนสจะลดลง จากการทำนายดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ อย่างไรก็ตามจากพื้นผิวตอบสนองทำนายว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนสคือ ความเข้มข้นของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างเท่ากับ 18.4 กรัมต่อลิตรและพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0



ภาพผนวกที่ 6 กราฟพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39

สำหรับภาพพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์พล็อตของ  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  และพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลันเนส โดยกำหนดความเข้มข้นของฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างที่

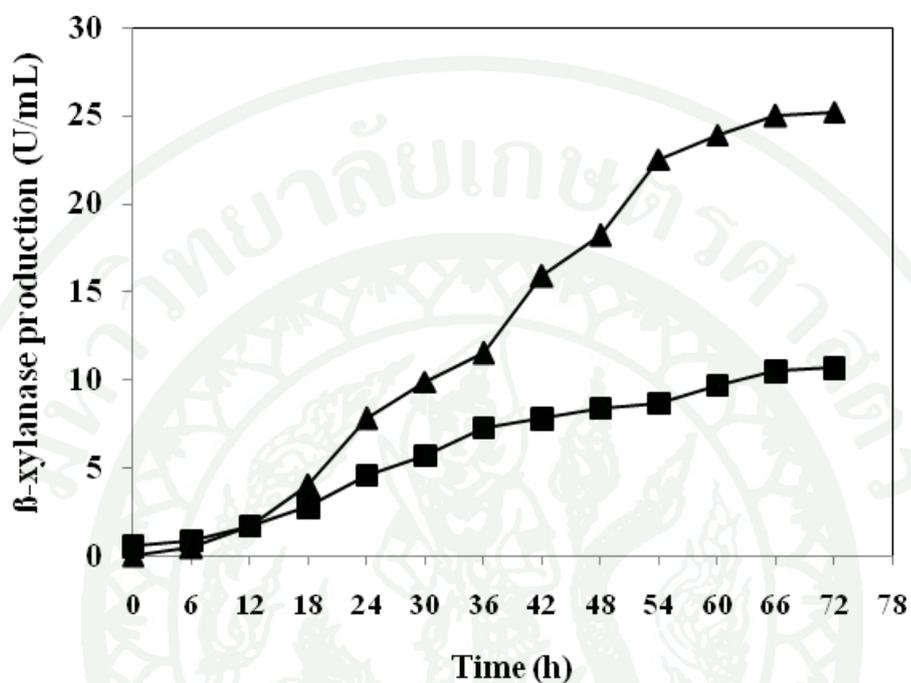
ระดับกลางของการทดลองเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพผนวกที่ ก7 พบว่าช่วงความเข้มข้นของ  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อยู่ระหว่าง 0.06-0.15 กรัมต่อลิตร ในขณะที่พีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วงระหว่าง 7.7-8.4 การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  มากกว่า 0.15 กรัมต่อลิตร และพีเอชต่ำกว่า 7.0 จากพื้นผิวตอบสนองทำนายว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสคือ  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.09 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0



ภาพผนวกที่ ก7 กราฟพื้นผิวตอบสนองและคอนทัวร์แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  และพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39

จากการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองทั้ง 3 ภาพ พบว่าจุดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสคือ ใช้ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่าความเข้มข้นเท่ากับ 18.4 กรัมต่อลิตร,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.09 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ซึ่งจากสมการที่ 1 ทำนายว่าเมื่อใช้สภาวะดังกล่าวมีผลทำให้เชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 สามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้สูงสุด 20.74 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการทดลองจริงเพื่อยืนยันผลการทำนาย พบว่าเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 สามารถผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสได้เท่ากับ 25.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 20 และสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวช่วยทำให้เชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ผลิตเอนไซม์

เบต้าไซลानเนส เพิ่มขึ้น 2.23 เท่า (ภาพผนวกที่ 8)เมื่อเทียบกับสูตรอาหารดั้งเดิมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซลานเนส เพียง 10.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร



ภาพผนวกที่ 8 การผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนสจากเชื้อ *B. pumilus* DMKUB39 ก่อน (■) และหลัง (▲) การศึกษาหาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้าไซลานเนส

ตารางผนวกที่ ก7 รหัสของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกสร้างสปอร์ จำนวน 180 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

รหัสเดิม	รหัส	รหัสเดิม	รหัส	รหัสเดิม	รหัส
KBKU2	DMKUB1	BKU15	DMKUB31	BKU45	DMKUB61
KBKU6	DMKUB2	BKU16	DMKUB32	BKU46	DMKUB62
KBKU9	DMKUB3	BKU17	DMKUB33	BKU47	DMKUB63
KBKU10	DMKUB4	BKU18	DMKUB34	BKU48	DMKUB64
KBKU11	DMKUB5	BKU19	DMKUB35	BKU49	DMKUB65
KBKU14	DMKUB6	BKU20	DMKUB36	BKU50	DMKUB66
KBKU15	DMKUB7	BKU21	DMKUB37	BKU51	DMKUB67
KBKU19	DMKUB8	BKU22	DMKUB38	BKU52	DMKUB68
KBKU21	DMKUB9	BKU23	DMKUB39	BKU53	DMKUB69
KBKU22	DMKUB10	BKU24	DMKUB40	BKU54	DMKUB70
KBKU27	DMKUB11	BKU25	DMKUB41	BKU55	DMKUB71
KBKU28	DMKUB12	BKU26	DMKUB42	BKU56	DMKUB72
KBKU29	DMKUB13	BKU27	DMKUB43	BKU57	DMKUB73
KBKU30	DMKUB14	BKU28	DMKUB44	BKU58	DMKUB74
KBKU33	DMKUB15	BKU29	DMKUB45	BKU59	DMKUB75
KUKB35	DMKUB16	BKU30	DMKUB46	BKU60	DMKUB76
BKU1	DMKUB17	BKU31	DMKUB47	BKU61	DMKUB77
BKU2	DMKUB18	BKU32	DMKUB48	BKU62	DMKUB78
BKU3	DMKUB19	BKU33	DMKUB49	BKU63	DMKUB79
BKU4	DMKUB20	BKU34	DMKUB50	BKU64	DMKUB80
BKU5	DMKUB21	BKU35	DMKUB51	BKU65	DMKUB81
BKU6	DMKUB22	BKU36	DMKUB52	BKU66	DMKUB82
BKU7	DMKUB23	BKU37	DMKUB53	BKU67	DMKUB83
BKU8	DMKUB24	BKU38	DMKUB54	BKU68	DMKUB84
BKU9	DMKUB25	BKU39	DMKUB55	BKU69	DMKUB85
BKU10	DMKUB26	BKU40	DMKUB56	BKU70	DMKUB86
BKU11	DMKUB27	BKU41	DMKUB57	BKU71	DMKUB87
BKU12	DMKUB28	BKU42	DMKUB58	BKU72	DMKUB88
BKU13	DMKUB29	BKU43	DMKUB59	BKU73	DMKUB89
BKU14	DMKUB30	BKU44	DMKUB60	BKU74	DMKUB90

ตารางผนวกที่ ก7 (ต่อ)

รหัสเดิม	รหัส	รหัสเดิม	รหัส	รหัสเดิม	รหัส
BKU75	DMKUB91	-	DMKUB121	-	DMKUB151
BKU76	DMKUB92	-	DMKUB122	-	DMKUB152
BKU77	DMKUB93	-	DMKUB123	-	DMKUB153
BKU78	DMKUB94	-	DMKUB124	-	DMKUB154
BKU79	DMKUB95	-	DMKUB125	-	DMKUB155
BKU80	DMKUB96	-	DMKUB126	-	DMKUB156
BKU81	DMKUB97	-	DMKUB127	-	DMKUB157
BKU82	DMKUB98	-	DMKUB128	-	DMKUB158
BKU83	DMKUB99	-	DMKUB129	-	DMKUB159
BKU84	DMKUB100	-	DMKUB130	-	DMKUB160
BKU85	DMKUB101	-	DMKUB131	-	KM 1
BKU86	DMKUB102	-	DMKUB132	-	KM 3
BKU87	DMKUB103	-	DMKUB133	-	KM 10
BKU88	DMKUB104	-	DMKUB134	-	KM 11
BKU89	DMKUB105	-	DMKUB135	-	KM 16
BKU90	DMKUB106	-	DMKUB136	-	KMS 1/1
BKU91	DMKUB107	-	DMKUB137	-	KMS ½
BKU92	DMKUB108	-	DMKUB138	-	KMS 2.1-1
BKU93	DMKUB109	-	DMKUB139	-	KMS 2.1Y-1
BKU94	DMKUB110	-	DMKUB140	-	KMS 2.1Y-2
BKU95	DMKUB111	-	DMKUB141	-	KMS 2.1Y-3
BKU96	DMKUB112	-	DMKUB142	-	KMS 2.1Y-4
BKU97	DMKUB113	-	DMKUB143	-	KMS 2.1Y-5
BKU98	DMKUB114	-	DMKUB144	-	KMS 2.2-1
BKU99	DMKUB115	-	DMKUB145	-	KMS 2.2-2
BKU100	DMKUB116	-	DMKUB146	-	KMS 2.2-3
BKU101	DMKUB117	-	DMKUB147	-	FB 11
BKU102	DMKUB118	-	DMKUB148	-	<i>Bacillus</i> sp. A5
BKU103	DMKUB119	-	DMKUB149	-	KMS 9
BKU104	DMKUB120	-	DMKUB150	-	KMS 10



ภาคผนวก ข  
อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1. ISP-2 (yeast extract – malt extract)

Yeast extract	4.0	กรัมต่อลิตร
Malt extract	10.0	กรัมต่อลิตร
Dextrose	4.0	กรัมต่อลิตร

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 2. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
pH 7.0		

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 3. Nutrient broth (NB)

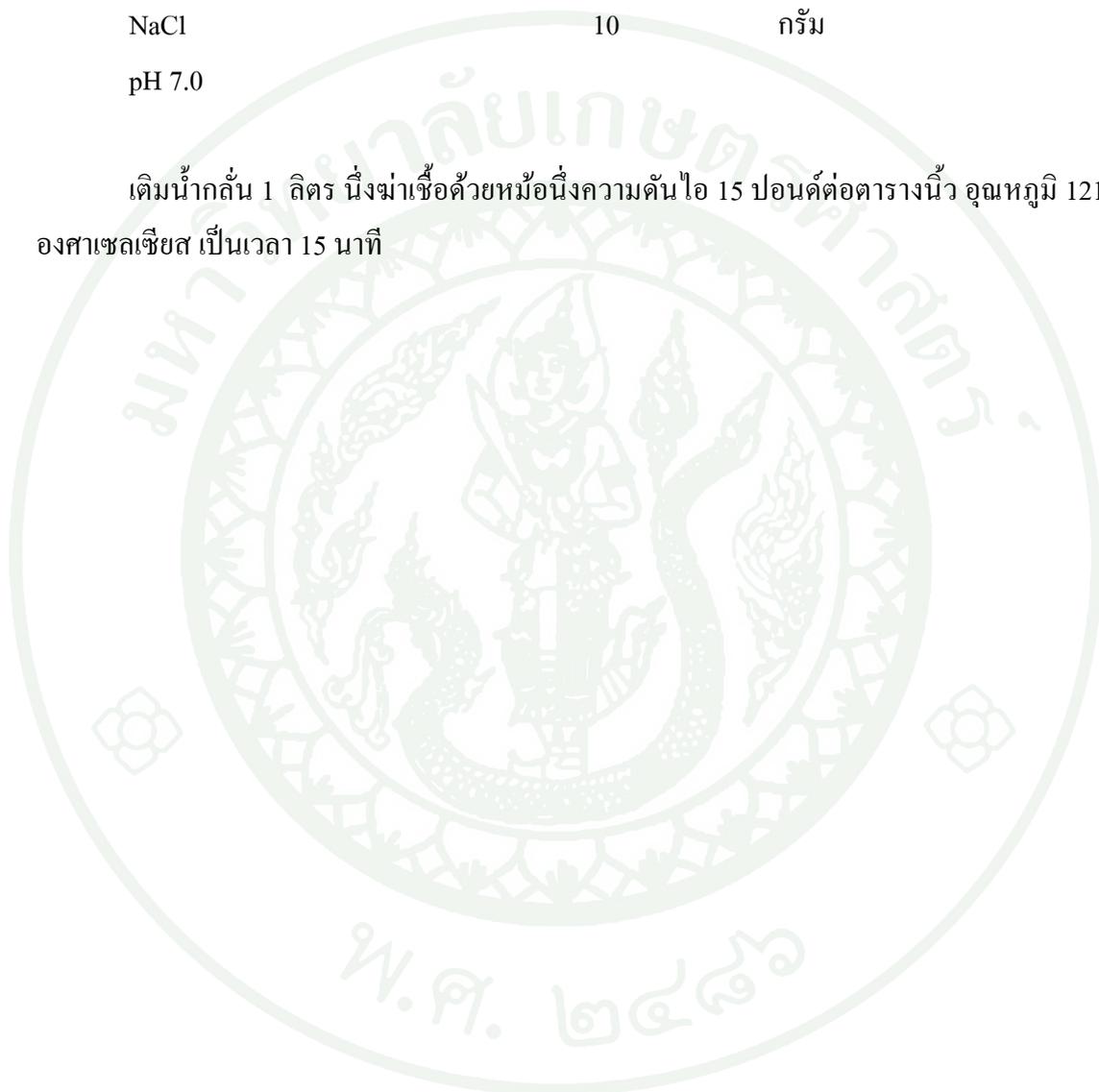
Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
pH 7.0		

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 4. Luria-Bertani medium (LB medium)

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
pH 7.0		

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที





ภาคผนวก ค  
สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

## 1. การเตรียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์

สารละลาย A: 0.2 M acetic acid ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  11.55 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M sodium acetate ( $\text{CH}_3\text{COONa}$  16.4 กรัม หรือ  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  27.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตาม pH ที่ต้องการ

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH
46.3	3.7	3.6
44.0	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.0	30.0	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.5	5.2
8.8	41.2	5.4
4.8	45.2	5.6

แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรทั้งหมดครบ 100 มิลลิลิตร

## 2. การเตรียมซีเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สารละลาย A: 0.1 M citric acid (19.21 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate (53.65 กรัม ของ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  หรือ 71.7 กรัม ของ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
44.6	5.4	2.6	24.3	25.7	5.0
42.2	7.8	2.8	23.3	26.7	5.2
39.8	10.2	3.0	22.2	27.8	5.4
37.7	12.3	3.2	21.0	29.0	5.6
35.9	14.1	3.4	19.7	30.3	5.8
33.9	16.1	3.6	17.9	32.1	6.0
32.3	17.7	3.8	16.9	33.1	6.2
30.7	19.3	4.0	15.4	34.6	6.4
29.4	20.6	4.2	13.6	36.4	6.6
27.8	22.2	4.4	9.1	40.9	6.8
26.7	23.3	4.6	6.5	43.6	7.0
25.2	24.8	4.8			

แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรทั้งหมดครบ 100 มิลลิลิตร

### 3. การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สารละลาย A: 0.2 M monobasic sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  27.6 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  53.65 กรัม หรือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71.7 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรทั้งหมดครบ 200 มิลลิลิตร

#### 4. การเตรียม Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer

สารละลาย A: 0.2 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane (24.2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M HCl

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
50.0	44.2	7.2
50.0	41.4	7.4
50.0	38.4	7.6
50.0	32.5	7.8
50.0	26.8	8.0
50.0	21.9	8.2
50.0	16.5	8.4
50.0	12.2	8.6
50.0	8.1	8.8
50.0	5.0	9.0

แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรทั้งหมดครบ 200 มิลลิลิตร

### 5. การเตรียม glycine-NaOH buffer

สารละลาย A: 0.2 M glycine ( $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  10.01 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M Sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$  8.0 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
50.0	4.0	8.6
50.0	6.0	8.8
50.0	8.8	9.0
50.0	12.0	9.2
50.0	16.8	9.4
50.0	22.4	9.6
50.0	27.2	9.8
50.0	32.0	10.0
50.0	38.6	10.4
50.0	45.5	10.6

แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรทั้งหมดครบ 200 มิลลิลิตร

## 6. SET buffer

### Stock

500 mM NaCl	29.25	กรัม
100 mM EDTA pH 8.0	37.2	กรัม
500 mM Tris-HCL pH 7.5	60.57	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

### สัดส่วนที่นำมาใช้

75 mM NaCl	37.5	มิลลิลิตร (500 mM)
25 mM EDTA pH 8.0	62.5	มิลลิลิตร (100 mM)
20 mM Tris-HCL pH 7.5	10	มิลลิลิตร (500 mM)
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	250	มิลลิลิตร

## 7. TE buffer

10 mM Tris-HCl  
1 mM EDTA·2Na  
pH 8

## 8. Congo red

Congo red	0.5	กรัม
Ethanol	5	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

- ชื่อ นางสาวชนาพร ตระกูลแจะ
- เกิดวันที่ 17 ธันวาคม 2529
- สถานที่เกิด อำเภอปรางค์บุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
- การศึกษา วท. บ. (เทคนิคการสัตวแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 1 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ทุนการศึกษา - ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์เพื่อการตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2552  
- ทุนวิจัยภายใต้โครงการ Japan-East Asia Network of Exchange for students and Youth (JENESYS) Programme มหาวิทยาลัยชิชิโอะกะ ประเทศญี่ปุ่น (1 ตุลาคม 2553 - 30 เมษายน 2554)
- ผลงานวิชาการ Trakunjae, C., S. Sukkhum and V. Kitpreechavanich. 2011. Induction and production of  $\beta$ -xylanase enzyme by *Bacillus pumilus* DMKUB39 using rice straw as raw material. The 10 th KU-KPS Conference. 6-7 December 2013