



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ เทคโนโลยีชีวภาพ  
สาขา ภาควิชา

เรื่อง การผลิต การทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และคุณสมบัติของไซลันเนสจาก  
*Streptomyces mexicanus* 901

Production, Partial Purification and Characterization of Xylanase from  
*Streptomyces mexicanus* 901

นามผู้วิจัย นางสาวแพรสาข ไชบุคคี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ( ..... รองศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประกาศกร, Ph.D. .... )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ( ..... รองศาสตราจารย์วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย, Ph.D. .... )

หัวหน้าภาควิชา ( ..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D. .... )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( ..... รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. .... )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิต การทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และคุณสมบัติของไซลันเนสจาก

*Streptomyces mexicanus* 901

Production, Partial Purification and Characterization of Xylanase from

*Streptomyces mexicanus* 901

โดย

นางสาวแพรสาข ไชบุญดี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อขอความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แพรสาย ไชบุตรดี 2557: การผลิต การทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และคุณสมบัติของ  
ไซลानเนสจาก *Streptomyces mexicanus* 901 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
(เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D. 92 หน้า

*Streptomyces mexicanus* 901 เป็นแอคติโนมัยสีที่คัดแยกจากน้ำเสียของโรงงานกระดาษ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง และสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 5.0-9.0 เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน พบว่า *S. mexicanus* 901 สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง ISP2 ตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ของ *S. mexicanus* 901 บนอาหารแข็งที่มีไซแลน คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และแป้ง ความเข้มข้น 1.0% พบว่าสามารถผลิตไซแลนส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และอะไมเลส ได้ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลนส ในอาหาร ISP2 ที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ความเข้มข้นแตกต่างกัน (0.5-2.0%) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *S. mexicanus* 901 สามารถผลิตไซแลนสได้ดีที่สุดในอาหารที่มีซังข้าวโพดความเข้มข้น 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน เมื่อนำไซแลนสมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน และเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี พบว่าไซแลนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.41 เท่า ไซแลนสที่บริสุทธิ์บางส่วนนี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วงพีเอช 3.0-6.0 และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส กิจกรรมของไซแลนสถูกกระตุ้นในสภาวะที่มี  $Mn^{2+}$  ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และถูกยับยั้งโดย EDTA ผลจากการยับยั้งของ EDTA แสดงให้เห็นว่าไซแลนสต้องการไอออนโลหะในการทำงานของเอนไซม์

ลายมือชื่อนิพนธ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Pearsai Khaibuddee 2014: Production, Partial Purification and Characterization of Xylanase from *Streptomyces mexicanus* 901. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Mangkorn Rodprapakorn, Ph.D. 92 pages.

*Streptomyces mexicanus* 901 was thermophilic actinomycete isolated from waste water in paper industry and growth occurred between pH 5.0-9.0. When actinomycetes were grown on different medium it was found that *S. mexicanus* 901 grew well on ISP2 agar. Enzyme production of *S. mexicanus* 901 on agar medium containing with 1.0% xylan, CMC and starch were investigated. The result found that *S. mexicanus* 901 could produce xylanase, CMCase and amylase. Optimum condition on xylanase production in ISP2 medium with various agricultural waste as carbon sources at various concentrations (0.5-2.0%) was studied. The maximum level of xylanase production by *S. mexicanus* 901 was observed when used 2.0% corncob as carbon source at initial pH 7.0, 50° C in shaking condition at 250 rpm for 5 day. Crude xylanase was partially purified by ultrafiltration and gel filtration chromatography. The result showed that xylanase was purified 6.41 fold. Partial purified xylanase exhibited highest activity at pH 5.0 and 50°C. Stability was high at pH range 3.0-6.0 and 30-50°C. Xylanase activity was stimulated by 10 mM Mn<sup>2+</sup> and was inhibited by EDTA. The inhibitory effect of EDTA indicates that metal ions are needed for xylanase activity.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. มังกร โรจน์ประภากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และสนับสนุนในการเรียน รวมทั้งการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด กราบขอบพระคุณ รศ.ดร. วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ รศ. ดร. วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน และ รศ.ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอบคุณทุกคำปรึกษา คำแนะนำ น้ำใจ กำลังใจ และความช่วยเหลือที่ดีมาจากพี่ออฟ พี่พิมพ์ พี่มุนี พี่ฝ้าย พี่เอมมี หวาน เอ้ แคร่ ทราญ ปุ๊กลูก เป้ เบน และบุคคลที่มีได้กล่าวไว้ในที่นี้ ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีอุปสรรคบ้าง แต่ความช่วยเหลือ และน้ำใจที่ได้รับเป็นพลังที่ทำให้ต่อสู้กับปัญหาจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณที่เจ้าหน้าที่ทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้อบรม ให้กำลังใจ กำลังทรัพย์ และสนับสนุนทางการศึกษาด้วยดีตลอดมา

แพรสสาย ไชบุญดี  
ตุลาคม 2557

## สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	27
ผลและวิจารณ์	33
สรุปและข้อเสนอแนะ	57
สรุป	57
ข้อเสนอแนะ	58
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	59
ภาคผนวก	69
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและบัพเฟอร์	70
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ทางเคมี	76
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง	85
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	92

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	12
2	สารที่ใช้เป็นตัวกลางในการเชื่อมโยงไว้กันเป็นเม็ดเจลในเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี	18
3	คุณสมบัติของไซลानะสจาก <i>Streptomyces</i> species	21
4	การทำไซลานะสจาก <i>Streptomyces mexicanus</i> 901 ให้บริสุทธิ์บางส่วน	48
5	ผลของไอออน โลหะและสารคีเลตต่อการทำงานของไซลานะสที่บริสุทธิ์บางส่วน	55
ตารางผนวกที่		
ก1	ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานะส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และอะไมเลสของ <i>Streptomyces mexicanus</i> 901	86
ก2	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญของ <i>Streptomyces mexicanus</i> 901	86
ก3	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตไซลานะสของ <i>Streptomyces mexicanus</i> 901	86
ก4	การผลิตไซลานะสจาก <i>Streptomyces mexicanus</i> 901 โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน	87
ก5	ผลความเข้มข้นของซังข้าวโพดต่อการผลิตไซลานะสจาก <i>Streptomyces mexicanus</i> 901	87
ก6	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตไซลานะสจาก <i>Streptomyces mexicanus</i> 901	88
ก7	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไซลานะสจาก <i>Streptomyces mexicanus</i> 901	88
ก8	ผลของความเร็วยรอบในการเขย่าต่อการผลิตไซลานะสจาก <i>Streptomyces mexicanus</i> 901	89

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ค9	ผลของพีเอชต่อการทำงานของไซลเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน	89
ค10	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไซลเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน	90
ค11	ผลของพีเอชต่อความเสถียรของไซลเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน	90
ค12	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไซลเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน	91
ค13	การย่อยไซเลนของไซลเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน	91

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของไซแลนและการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่ม ไซลาโนไลติกเอนไซม์	4
2	ลักษณะโคโลนีของ <i>Streptomyces mexicanus</i> 901 บนสูตรอาหารที่ แตกต่างกัน	34
3	การติดสีแกรมและลักษณะเส้นใยของ <i>Streptomyces mexicanus</i> 901	35
4	ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ ของ <i>Streptomyces</i> <i>mexicanus</i> 901	36
5	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญของ <i>Streptomyces mexicanus</i> 901	38
6	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตไซลาเนสของ <i>Streptomyces</i> <i>mexicanus</i> 901	39
7	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไซลาเนสจาก <i>Streptomyces</i> <i>mexicanus</i> 901	41
8	ผลความเข้มข้นของซังข้าวโพดต่อการผลิตไซลาเนสจาก <i>Streptomyces</i> <i>mexicanus</i> 901	42
9	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตไซลาเนสจาก <i>Streptomyces mexicanus</i> 901	43
10	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไซลาเนสจาก <i>Streptomyces mexicanus</i> 901	45
11	ผลของความเร็วยวรอบในการเขย่าต่อการผลิตไซลาเนสจาก <i>Streptomyces</i> <i>mexicanus</i> 901	46
12	ปริมาณโปรตีนและค่ากิจกรรมของไซลาเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ บางส่วนด้วยเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี Sephadex G-100 column	47

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไซลานีสจาก <i>Streptomyces mexicanus</i> 901 ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ SDS-PAGE	49
14	ผลของพีเอชต่อการทำงานของไซลานีสที่บริสุทธิ์บางส่วน	51
15	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไซลานีสที่บริสุทธิ์บางส่วน	52
16	ผลของพีเอชต่อความเสถียรของไซลานีสที่บริสุทธิ์บางส่วน	53
17	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไซลานีสที่บริสุทธิ์บางส่วน	54
18	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปล่อยออกมาที่เวลาต่างๆ ในระหว่างการย่อยไซแลนของไซลานีสที่บริสุทธิ์บางส่วน	56
ภาพผนวกที่		
ข1	กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส	79
ข2	กราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)	81

## การผลิต การทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และคุณสมบัติของไซลานเนสจาก

### *Streptomyces mexicanus* 901

## Production, Partial Purification and Characterization of Xylanase from

### *Streptomyces mexicanus* 901

#### คำนำ

ลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในธรรมชาติเฮมิเซลลูโลสจะอยู่ร่วมกับเซลลูโลสและลิกนิน ทำหน้าที่เป็นตัวประสานกลุ่มเส้นใยของผนังเซลล์พืชทำให้เซลล์พืชมีความแข็งแรงและคงรูป โดยไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสมีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4-linkage และมีน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ไซแลนพบมากในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายในประเทศเกษตรกรรมอย่างประเทศไทย เมื่อเฮมิเซลลูโลสถูกย่อยสลายโดยสมบูรณผลิตภัณฑ์ ที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล กรดอินทรีย์ โปรตีนเซลล์เดียว หรือผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่มีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรม การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสสามารถทำได้โดยวิธีการทางเคมีหรือการย่อยด้วยเอนไซม์

ไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไซแลน ในการย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณนั้นต้องอาศัยเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกเอนไซม์ ที่สามารถย่อยบริเวณโครงสร้างหลักของไซแลนและบริเวณ โข่งกึ่งของไซแลน มีการนำไซแลนสมาใช้ย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อเปลี่ยน ให้เป็นสารที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ไซแลนเนสยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม บางประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ช่วยทำให้สัตว์มีการดูดซึมและย่อยอาหารของสัตว์ได้ดีขึ้น ในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ จะช่วยทำให้น้ำผลไม้มีความใส อุตสาหกรรมขนมปังมีการนำไซแลนเนสมาใช้เพื่อเพิ่มคุณภาพของขนมปัง ทำให้ขนมปังขึ้นฟูเนื้อสัมผัสดี และอุตสาหกรรมกระดาษมีการนำไซแลนเนสใช้ในการปรับสภาพของเยื่อกระดาษก่อนการฟอกขาวซึ่งช่วยลดปริมาณคลอรีนในการฟอกเยื่อกระดาษ (Beg *et al.*, 2001) และลดการปล่อยสารพิษสู่สิ่งแวดล้อม

จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตไซแลนเนสที่สำคัญในระดับอุตสาหกรรม มีรายงานว่าทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์สามารถผลิตไซแลนเนสได้ โดยสามารถผลิตได้ในปริมาณมากและใช้ระยะเวลาสั้น

แต่ในการผลิตไชลานะนั้นจะมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ทั้งในเรื่องของเครื่องมือ และสารอาหารที่ใช้ในการหมัก โดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญ ของจุลินทรีย์ และเหนียวทำให้มีการผลิตไชลานะนั้นแหล่งคาร์บอนราคาถูกจึงได้รับความสนใจในมุมมองทางการค้า ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ใช้ในการผลิตไชลานะนั้นก็คือ ไชเลน พบมากในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น เปลือกข้าวโพด ชังข้าวโพด ฟางข้าว รำข้าวสาลี และแกลบซึ่งมีราคาถูก ในการผลิตไชลานอกจากแหล่งคาร์บอนแล้วสภาวะแวดล้อมในการผลิต ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ และอัตราการให้อากาศ ก็มีผลในการผลิต ไชลานะของจุลินทรีย์เช่นกัน

จากการศึกษาของ Sirisuntornsakul *et al.* (2013) ได้ทำการคัดแยกแอกติโนมัยซีทจากน้ำเสียโรงงานกระดาษ ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงและมีประสิทธิภาพในการผลิตไชลานะ โดยคัดเลือกสายพันธุ์ *Streptomyces mexicanus* 901 ซึ่งนอกจากสามารถผลิตไชลานะได้ในปริมาณที่สูงแล้วยังมีการผลิตเซลลูโลสอีกด้วย

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึง ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกในการผลิตไชลานะจาก *Streptomyces mexicanus* 901 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไชลานะ จากนั้นนำไชลานะที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และศึกษาการทำงานและความเสถียรต่ออุณหภูมิและพีเอชของไชลานะเพื่อประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

## วัตถุประสงค์

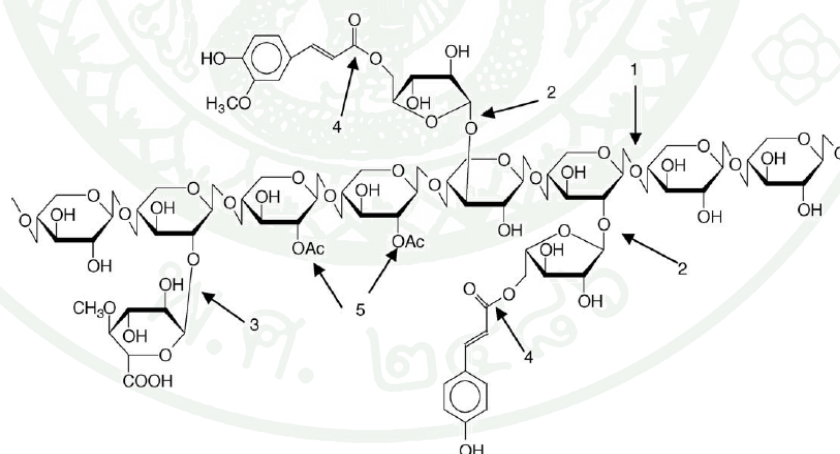
1. ศึกษาสัณฐานวิทยาและคุณลักษณะของ *Streptomyces mexicanus* 901
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซลานเนส
3. ศึกษาการทำไซลานเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน
4. ศึกษาคุณสมบัติของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน



## การตรวจเอกสาร

### 1. ไชแลน

ไชแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสซึ่งพบมากในผนังเซลล์พืชมีน้ำตาล ไชโลส เป็นแกนหลัก (backbone) จับกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4-linkage และมีน้ำตาลชนิดอื่นๆ ทำหน้าที่เป็นโซ่กิ่ง (branch chain) ได้แก่ acetyl group, arabinosyl group และ glucuronosyl group (Biely, 1985; Wong *et al.*, 1988) ในธรรมชาติโครงสร้างของไชแลนมักอยู่ร่วมกับคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆ โดยเชื่อมกันแบบ non-covalent bond ไชแลนส่วนใหญ่ในเฮมิเซลลูโลสยึดเกาะกับเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน ดังนั้นไชแลนจึงมีหน้าที่เป็นตัวประสานระหว่างโครงสร้างของเส้นใยกับผนังเซลล์พืช นอกจากนี้โครงสร้างของไชแลนยังมีความแตกต่างกันขึ้นกับแหล่งที่พบ เช่น ในหญ้ามีโครงสร้างหลักเป็นโฮโมพอลิเมอร์ของไชโลส ในขณะที่ไชแลนในเมล็ดธัญพืชมีโครงสร้างที่มีกิ่งก้านมาก คือเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ และยังมีกลุ่มอื่นต่อที่โซ่กิ่งของแกนหลัก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอะราบินอสและกรดคลุกคูโลนิก ดังนั้นการย่อยไชแลนให้สมบูรณ์ นอกจากต้องใช้ไชแลนสชนิดเอนโดและเอกโซแล้วยังต้องใช้เอนไซม์ที่ย่อยโซ่กิ่งอีกด้วย (ภาพ ที่ 1) เอนไซม์ทั้งระบบนี้รวมเรียกว่า ไชลานโนไลติกเอนไซม์ (เปี่ยมสุข, 2551)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของไชแลนและการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไชลานโนไลติกเอนไซม์  
1: endoxylanases; 2:  $\beta$ -L-arabinofuranosidases; 3: glucuronidases; 4: feruloyl and coumaroyl esterases; 5: acetyl xylan esterases

ที่มา: Chávez *et al.* (2006)

## 2. ไชลานโพลิติกเอนไซม์ (Xylanolytic enzymes)

ไชลเลนเป็น heteropolysaccharide มีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขาถูกย่อยสลายได้โดยเอนไซม์ในกลุ่มไชลานโพลิติกเอนไซม์ เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโครงสร้างหลักของไชลเลน ได้แก่ เอนโดไชลานเนส และเอกโซไชลานเนส โดยเอนไซม์เหล่านี้จะทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะ  $\beta$ -1,4 linkage ที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลไซโลสในแกนหลัก และมีเอนไซม์อีกกลุ่มหนึ่งที่ทำหน้าที่ย่อยสลายบริเวณโซ่กิ่งของไชลเลน ได้แก่ acetylxylan esterase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase และ ferulic acid esterase การใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกันจะทำให้การย่อยสลายไชลเลนมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยส่วนที่เป็นโซ่กิ่งจะช่วยลดผลของ steric effect ที่เกิดจากการย่อยสลายไชลเลนโดยเอนโดไชลานเนส (Silva *et al.*, 1994; Stone *et al.*, 1996) ไชลานเนสแบ่งออกเป็น 6 ชนิด ตามตำแหน่งของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Sunna and Antranikian, 1997) ดังนี้

2.1 เอนโดไชลานเนส (endoxylanase) หรือ 1,4- $\beta$ -D-xylan xylohydrolase (EC 3.2.1.8) ย่อยสลายไชลเลนโดยทำลายพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) จากทางด้านในของเฮเทอโรไชลเลน (heteroxylan) การเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้ต่อสับสเตรทจะเป็นแบบสุ่ม ขึ้นอยู่กับความยาวของเฮเทอโรไชลเลน จำนวนโซ่กิ่งของสับสเตรทหรือหมู่แทนที่บนสับสเตรทผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ที่จะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นไซโลไตรโอส (xylotriose) ไซโลไบโอส (xylobiose) และไซโลส (xylose) เอนโดไชลานเนสยังแบ่งออกได้เป็นชนิดที่ไม่สามารถย่อยสลายไชลเลนที่มีโซ่กิ่งและชนิดที่สามารถย่อยสลายไชลเลนที่มีโซ่กิ่ง

เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของเอนโดไชลานเนสจากแหล่งต่างๆ พบว่ามี 2 กลุ่มใหญ่ คือ เอนโดไชลานเนสในไกลโคซิดไฮโดรเลสสกุลที่ 10 และ 11 ซึ่งเอนโดไชลานเนสสกุลที่ 10 จะมีขนาดใหญ่ (มากกว่า 30 kDa) โครงสร้าง ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barrel รูปคล้ายถ้วย มีโครงรูปที่ยึดหยุ่น และใช้สับสเตรทได้หลากหลายมากกว่าเอนโดไชลานเนสสกุล 11 ที่มีขนาดเล็กกว่า ซึ่งมีขนาดน้อยกว่า 30 kDa และมีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นแผ่นพับบีตา เอนโดไชลานเนสสกุล 10 ย่อยสับสเตรทไชลเลนใกล้กับตำแหน่งที่มีการแทนที่หรือมีโซ่ข้างได้ดีกว่า ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเล็กกว่า (เปี่ยมสุข, 2551)

2.2 เอกโซไชลานเนส (exoxylanase) หรือ 1,4- $\beta$ -D-xylan xylohydrolase (EC 3.2.1.37) ย่อยสลายไชลเลน และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายยาว จากทางด้านปลายของสาย ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นไซโลไบโอส หรือไซโลเตตระโอส การทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อความยาวของสายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สั้นลง หรือถูกยับยั้งด้วยผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น

2.3 เบต้าไซโลซิเดส ( $\beta$ -xylosidase) หรือ  $\beta$ -D-xyloside xylohydrolase (EC 3.2.1.37) เป็น exoglycosidases ย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ และไซโลไบโอสจากปลายนอนรีดิวิซ์ (non reducing end) ได้เป็นไซโลส เบต้าไซโลซิเดสมีมวลโมเลกุลระหว่าง 60-360 kDa นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายartificial substate เช่น *p*-nitrophenyl,  $\beta$ -D-xyloside มีรายงานว่าเบต้าไซโลซิเดสสามารถย่อยสลายไซแลนได้ แต่อัตราการย่อยสลายเกิดขึ้นช้ามากโดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส การทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อความยาวของสายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นหรือเมื่อปริมาณไซโลสเพิ่มขึ้น จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเบต้าไซโลซิเดสพบในเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์

2.4 เอนไซม์แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟูรานซิเดส ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidase; EC 3.2.1.55) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการย่อยสลายไซแลน แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ *exo-acting*  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) สามารถย่อยสลาย *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranosides และกิ่งก้านของอะราบินแนน และอีกชนิดคือ *endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinase* (EC 3.2.1.99) จะจำเพาะต่ออะราบินแนนที่เป็นเส้นตรงเท่านั้น โดยที่เอนไซม์  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase สามารถย่อยสลายพันธะได้ทั้ง 1,3- $\alpha$ -L-arabinofuranosides และ 1,5- $\alpha$ -L-arabinofuranosides ในอะราบินโนไซแลนให้อะราบินโนส และสายพอลิเมอร์ของไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์

2.5 เอนไซม์แอลฟากลูคูโรนิเดส ( $\alpha$ -glucuronidase; EC 3.2.1.139) ย่อยสลายพันธะ  $\alpha$ -1, 2 glycosidic ระหว่างกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) และไซโลสในกลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) ให้ 4-O-methylglucuronic acid และไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์ โดยความจำเพาะต่อสับสเตรทของ  $\alpha$ -glucuronidase ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ที่ได้จาก *Agaricus bisporus* ต้องการสับสเตรทเป็นกลูคูโรโนไซแลนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ

2.6 อะซิติกไซแลนเอสเทอเรส (acetylxylan esterase; EC 3.1.1.6) เอนไซม์นี้จะกำจัดหมู่โออะซิติก (O-acetyl) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และที่ 3 ในสายอะซิติกไซแลน (acetylxylan) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะซิติก (acetic acid) และพอลิเมอร์ของไซโลส จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตอะซิติกไซแลนเอสเทอเรส ได้แก่ ราและแบคทีเรีย

2.7 เฟอร์รูติกแอซิดเอสเทอเรส (ferulic acid esterase; EC 3.1.1.73) และพารา-คิมเมอร์ริกแอซิดเอสเทอเรส (*p*-coumaric acid esterase; EC 3.1.1.1) กรดเฟอร์รูติกและ *p*-coumaric acid เชื่อมด้วยพันธะเอสเทอร์ โดยเฟอร์รูติกแอซิดเอสเทอเรสจะทำลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างไซข้าง (side

chain) ของอะราบิโนสและกรดเฟอร์รูริกในไซแลน คล้ายกับ *p*-coumarid acid esterase จะทำลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างอะราบิโนส และ *p*-coumarid acid ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดเฟอร์รูริก

### 3. แหล่งของไซลานเนส

ไซลานเนสเป็นเอนไซม์สำคัญที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายไซแลน ซึ่งมีรายงานว่าทั้งแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท เชื้อรา และยีสต์สามารถผลิตไซลานเนสได้ โดยจุลินทรีย์ต่างๆ มักผลิตไซลานเนสออกมามากกว่า 1 ชนิด และส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไซลานโนไลติกเอนไซม์ได้จะสามารถผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ร่วมด้วย (Ohmiya *et al.*, 1997) ซึ่งแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายไซแลนได้ต่างกันทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่มีขนาดต่างกันด้วย มีรายงานการผลิตไซลานเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ จำนวนมาก และเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิสูงมีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในกระบวนการทางอุตสาหกรรม เพราะนอกจากจะมีกิจกรรมเอนไซม์สูงแล้วยังมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงอีกด้วย ซึ่งเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ได้จริงในอุตสาหกรรม

#### 3.1 ไซลานเนสจากแบคทีเรีย

López *et al.* (1998) รายงานว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตไซลานเนสที่มีขนาด 22-120 kDa และมีค่า pI อยู่ในช่วง 7.0-9.0 การผลิตไซลานเนสสูงสุดที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 7.8 โดยมีไซโลสและไซแลนเป็นตัวเหนี่ยวนำให้มีการผลิตไซลานเนส ซึ่งไซลานเนสมีความเสถียรที่ค่าพีเอช 9.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนคือ ไซโลไตรโอสและไซโลเตตระโอส แต่ไม่พบไซโลส

Battan *et al.* (2007) รายงานว่า *Bacillus pumilus* สามารถผลิตไซลานเนสที่มีกิจกรรมสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 มีความเสถียรในช่วงพีเอชเป็นค่า อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

Ko *et al.* (2010) รายงาน *Paenibacillus campinasensis* BL11 สามารถผลิตไซลานเนสที่มีมวลโมเลกุลขนาด 41 kDa มีกิจกรรมของไซลานเนสเป็น 10.5 U/ml ภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 การผลิตไซลานเนสสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน และไซลานเนสนี้มีความเสถียรที่พีเอชและอุณหภูมิสูงและมีศักยภาพในการนำไปใช้ในกระบวนการฟอกเชื้อ

Lo *et al.* (2010) รายงานว่า *Acinetobacter junii* ที่แยกได้จากดินทางใต้ของไต้หวัน สามารถผลิตไซลานเนสและเซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพ ในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลานเนสจากสายพันธุ์นี้คือที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 7.0 เมื่อเลี้ยงในอาหาร BHM ที่มี CMC และไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

### 3.2 ไซลานเนสจากแอคติโนมัยซีท

Tuncer *et al.* (1999) ศึกษาการผลิตเอนโดไซลานเนสจาก *Thermomonospora fusca* BD25 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน พบว่าสามารถผลิตเอนโดไซลานเนส ได้สูงสุด 2.68 U/ml และ 1.92 U/ml เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี oat spelt xylan และฟางข้าว ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

Nascimento *et al.* (2002) รายงานว่า *Streptomyces* sp. AMT-3 ที่แยกจากดินในประเทศ บราซิลสามารถผลิตไซลานเนสได้สูงที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี larchwood xylan เป็นแหล่งคาร์บอน โดยไซลานเนสมีกิจกรรมสูงในช่วงอุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.0

Ding *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตไซลานเนส จาก *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 พบว่าการผลิตไซลานเนสสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน และ beef peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่พีเอช 6.0 การผลิตไซลานเนสเพิ่มเป็นสองเท่าเมื่อเติม Tween-80 ความเข้มข้น 1.5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีค่ากิจกรรมของไซลานเนส เท่ากับ 1,653 U/ml

Yang *et al.* (2007) รายงานว่า *Thermobifida fusca* NTU22 สามารถผลิตไซลาโนไลติก เอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมของไซลานเนส เท่ากับ 14.0 U/ml เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีขานอ้อยเป็นแหล่ง คาร์บอนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ ไซลานเนสอยู่ในช่วงพีเอช 6.0-8.0 และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

Nawel *et al.* (2011) ศึกษาการผลิตไซลานเนสจาก *Jonesia denitrificans* ที่แยกได้จาก ดินในประเทศแอลจีเรีย เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลานเนสคือที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.5 มีค่ากิจกรรมของไซลานเนส สูงสุดเท่ากับ 10.81 U/ml และ สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซลานเนสคือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 ในสภาวะ

ที่มีไอออนโลหะ  $Mn^{2+}$  ส่งผลให้กิจกรรมของไซลานเนสเพิ่มขึ้น แต่ในขณะที่มี  $Hg^{2+}$  และ  $NH_4$  มีผลยับยั้งการทำงานของไซลานเนส

Kumar *et al.* (2012) ศึกษาการผลิตไซลานเนสใน *Streptomyces* sp. RCK-2010 พบว่าสามารถผลิตไซลานเนส ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซลานเนส พบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 นอกจากนี้ไซลานเนสยังมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงด้วย

### 3.3 ไซลานเนสจากรา

Khalil (2002) รายงานว่า *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 สามารถผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์และไซลานโนไลติกเอนไซม์ เมื่อเลี้ยงในอาหารมีขานอ้อยความเข้มข้น 1.0% ร่วมกับที่ไม่มีกลูโคส และมี กลูโคสความเข้มข้น 1.0% เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า เมื่อเลี้ยงในที่มีขานอ้อย 1.0% เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว และ สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซลานเนสคือที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0

Colina *et al.* (2003) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตไซลานเนสจาก *Trichoderma reesei* rut C-30 ในระดับพลาสติกและถังหมัก โดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากิจกรรมของไซลานเนสสูงสุดที่พีเอชเริ่มต้น ของอาหารเท่ากับ 4.8 ทั้งในระดับพลาสติกและถังหมัก เชื้อเจริญได้ดีใน 24 ชั่วโมงแรก และใช้โปรตีนที่ละลายน้ำได้จากฟางข้าวเป็นผลทำให้พีเอชของอาหารเพิ่มขึ้นเป็น 6.4-6.7 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลานเนส

Li *et al.* (2006) รายงานว่า *Paecilomyces thomophila* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตไซลานเนสที่มีค่ากิจกรรม 1,470 U/ml พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 75-80 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 และไซลานเนสมีความเสถียรในช่วงพีเอช 6.0-11.0

### 3.4 ไซลานเนสจากยีสต์

Bastawde *et al.* (1994) รายงานว่ายีสต์สายพันธุ์ใหม่ NCIM 3574 ที่คัดแยกจากเศษไม้ที่ผุเปื่อย พบว่ายีสต์สายพันธุ์นี้สามารถผลิตไซลานเนสได้ 40 U/ml และ 50 U/ml เมื่อเลี้ยงในอาหาร

ที่มีไซโลสและอะราบิโนส ตามลำดับ แต่ไม่พบกิจกรรมของไซลานเนสเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส ไซลานเนสที่ผลิตได้สามารถย่อยสลายไซแลน และให้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส ไซโลไบโอส และอะราบิโนส

#### 4. ลักษณะวิทยาและคุณลักษณะของ *Streptomyces mexicanus*

*S. mexicanus* เป็นแอโรบแบคทีเรีย ดิคตีแกรมบวกมีบ้างที่ดิคตีแกรมลบ เป็น thermophilic actinomycete สร้างเส้นใยอาหารที่มีการแตกแขนงได้ โดยเชื้อจะสร้างเส้นใยที่เจริญลงไปในอาหาร เรียกว่า เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และยังสร้างเส้นใยบนผิวโคโลนีเรียกว่าเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งรูปแบบการเรียงเส้นสายของสปอร์ (spore chains) เป็นแบบ Rectiflexibiles คือ เรียงต่อกันเป็นเส้นตรงหรือโค้งเล็กน้อย สปอร์เรียบ (smooth) และมีสีเขียว โครงสร้างสปอร์จะเป็นแบบทรงกลม (spherical) ขนาดประมาณ 0.88  $\mu\text{m}$  หรือมีรูปไข่ (oval) เล็กน้อย สีของเส้นใยอากาศมีสีเทาและมีเขียวเล็กน้อย ส่วน เส้นใยอาหาร มีสีเบจ (beige) เมื่อเลี้ยงบนอาหารมาตรฐาน (standard media) และสีของรงควัตถุที่ปล่อยออกมา (diffusible pigment) จะมีสี yellowish เกิดขึ้นบนอาหาร yeast-extract, malt-extract และ oatmeal agar และไม่มีการผลิตเมลานิน (melanin pigments) บนอาหาร peptone/iron หรือ tyrosine agars การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ ( $\text{H}_2\text{S}$ ) เป็นบวก สามารถย่อยสลายอาร์บูติน, แป้ง, ไซแลน, อะดีนีน, เคซีน, ไฮโปแซนทีน และไทโรซีน นอกจากนี้ยังสามารถใช้ arabinose, fructose, glucose, raffinose, mannitol, raffinose, xylose, galactose, maltose, glycerol, lactose, cellobiose, trehalose และ sodium acetate เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว *S. mexicanus* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-55 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอช 4.3-8.0 ในที่มี NaCl ความเข้มข้น 6.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ ampicillin (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) การเจริญจะถูกยับยั้งเมื่อมี chloram-phenicol, erythromycin, gentamicin, nalidixic acid sodium salt, kanamycin sulphate, rifampicin, tetracycline hydrochloride, thiostrepton และ NaCl ความเข้มข้น 7.0% (Petrosyan *et al.*, 2003)

## 5. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการผลิตไซลานเนสจากจุลินทรีย์

กระบวนการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการหมัก การผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณสูงจะต้องมีการควบคุมปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ ซึ่งไซลานเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเกิดขึ้นได้ โดยการใส่สารอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อและการผลิตไซลานเนส ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดและปริมาณของสารอาหารให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์จะทำให้ได้ไซลานเนสในปริมาณที่สูง นอกจากนั้นสภาวะแวดล้อมอื่นๆ ในการหมักก็มีผลต่อการผลิตไซลานเนสด้วยเช่นกัน

### 5.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยจะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ และแหล่งคาร์บอนยังมีความจำเป็นในการชักนำให้มีการผลิตไซลานเนสในจุลินทรีย์ นอกจากแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจะมีผลในการชักนำการผลิตไซลานเนสของจุลินทรีย์แล้ว ปริมาณของแหล่งคาร์บอนก็เป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตไซลานเนสของจุลินทรีย์ด้วย ถ้าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนน้อยเกินไปจะทำให้จุลินทรีย์เจริญและผลิตไซลานเนสได้อย่างไม่เต็มที่ แต่ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนมากเกินไปหรือมีความเข้มข้นมากเกินไปอาจจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ การเหนี่ยวนำการผลิตไซลานเนสของจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นโดยแหล่งอาหารที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบและมีลักษณะเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นโครงสร้างหลัก ซึ่งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรบางประเภทจะมีองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสค่อนข้างสูงและยังมีราคาถูก ดังนั้นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเหนี่ยวนำให้มีการผลิตไซลานเนสของจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจ

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นสารพวกกลีโคแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน อยู่รวมกันในผนังเซลล์พืช ซึ่งปริมาณองค์ประกอบของสารต่างๆ เหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (ตารางที่ 1) ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมในแต่ละปีจึงมีปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทต่างๆ เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อย และเปลือกถั่วเป็นจำนวนมาก การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์มีค่อนข้างน้อย ส่วนใหญ่จะถูกทิ้งสะสมเป็นของเสียแต่ในปัจจุบันมีการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น โดยนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตไซลานเนส เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและมีปริมาณมากในแต่ละปี

นอกจากนี้ยังนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นอาหารสัตว์ ปุ๋ย หรือนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำตาล โดยใช้เอนไซม์ที่สามารถย่อยองค์ประกอบที่เป็นพอลิแซคคาไรด์ในผนังเซลล์พืช ซึ่งได้แก่เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส น้ำตาลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการผลิตสารให้ความหวานที่มีมูลค่าสูง เช่น น้ำตาลไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Moure *et al.*, 2006) และไซลิทอล (Parajó *et al.*, 1998) กรดอินทรีย์ (Pandey *et al.*, 2000) หรือนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลทดแทนการผลิตเอทานอลจากแป้งหรือกระบวนการทางเคมีที่มีต้นทุนการผลิตสูงกว่า (Millati *et al.*, 2005)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ชนิดของวัสดุเหลือทิ้ง	องค์ประกอบ (%)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ฟางข้าวสาลี	50	30	15
ฟางข้าว	32	24	13
รำข้าวสาลี	36	28.3	20.1
รำข้าว	34	24.5	28.2
แกลบ	36	15	19
ซังข้าวโพด	42	39	14
เปลือกข้าวโพด	43.8	39.6	14.3
ชานอ้อย	33	30	29
เปลือกถั่ว	25-30	25-30	30-40
ไม้เนื้อแข็ง	40-55	34-40	18-25
ไม้เนื้ออ่อน	45-50	25-35	25-35
ขี้เลื่อย	55	14	21

ที่มา: Kuhad (1993); Howard *et al.* (2003); Kuhad *et al.* (2011)

## 5.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญ และการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์สามารถเจริญและให้ผลผลิตสูงในอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันไป ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจึงขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์

## 5.3 พีเอชเริ่มต้น

พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในสภาวะแวดล้อมของการหมักมีความสำคัญต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ชอบด่างสามารถเจริญได้ดีในสภาวะพีเอชสูงๆ ดังนั้นพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเจริญ และการสร้างผลผลิตจึงขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน

## 5.4 อุณหภูมิ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างผลผลิตอยู่ช่วงหนึ่ง ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าช่วงนี้จะส่งผลกระทบต่อเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะเจริญและสร้างผลผลิตได้ดีนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์

## 5.5 รอบในการเขย่าหรืออัตราการให้อากาศ

กระบวนการหมักนั้นส่วนใหญ่จะใช้จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน ซึ่งจุลินทรีย์จะใช้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักเพื่อการเจริญและการสร้างผลผลิต ดังนั้นในกระบวนการหมักจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการควบคุมการให้อากาศในปริมาณที่เพียงพอหรือมีการกวนในอัตราที่เหมาะสม โดยความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ

## 6. การทำไซลानเนสให้บริสุทธิ์

ปัจจุบันมีการนำไซลานเนสจากจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ โดยจะนำไซลานเนสมาใช้ในขั้นตอนการเตรียมเยื่อก่อนการฟอกเยื่อ ซึ่งไซลานเนสที่ปราศจากเซลลูเลสเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมกระดาษ เพราะ ไซลานเนสที่ปราศจากเซลลูเลสจะย่อยเพียงไซแลนที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสออกจากเยื่อกระดาษ โดยไม่ทำลายโครงสร้างของเซลลูโลสซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการทำกระดาษ ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์นั้นมีหลายระดับ เช่น ทำให้บริสุทธิ์จากสารอื่น (ไขมัน หรือ inhibitors) หรือทำให้ได้โปรตีนชนิดเดียว โดยไม่มีโปรตีนอื่นปะปน ซึ่งระดับความบริสุทธิ์ที่ต้องการขึ้นอยู่กับการทำเอนไซม์ไปใช้ โดยเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ดังนั้นการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จึงใช้หลักการเดียวกันกับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการพื้นฐานของลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของสารที่ต้องการแยก เช่น มวลหรือขนาด โมเลกุล ประจุไฟฟ้าบนโมเลกุล ความสามารถในการละลาย และความจำเพาะกับสารบางชนิด เป็นต้น หลักการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์สามารถทำได้หลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะตัวของสาร แต่ละชนิด

### 6.1 การทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้น

#### 6.1.1 อัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration)

อัลตราฟิลเตรชันเป็นกระบวนการแยกสารด้วยการกรองผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์หรือเมมเบรน (membrane) โดยใช้ความดันในการดันสารผ่านเมมเบรน ซึ่งเมมเบรนที่ใช้ในกระบวนการจะมีรูพรุน หรือ Molecular weight cut-off ที่แตกต่างกันไปในช่วง 1-300 kDa ในการแยกสารนั้นส่วนของสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะถูกดันผ่านเมมเบรน โดยอาศัยแรงดันในการดันสารให้ผ่านเมมเบรน โดยโปรตีนที่สนใจจะมีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนจึงไม่สามารถผ่านเมมเบรนออกไปได้ มักนิยมใช้ในการทำสารละลายโปรตีนให้เข้มข้นขึ้น โดยสามารถแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

#### 6.1.2 การตกตะกอนโปรตีน

การตกตะกอนโปรตีนเป็นวิธีที่นิยมใช้สำหรับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ซึ่งใช้เป็นขั้นตอนของกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งการทำเอนไซม์เข้มข้นขึ้น จากนั้นทำเอนไซม์ให้

บริสุทธิ์ขึ้น โดยเทคนิคโครมาโตกราฟี ความสามารถในการละลายของโปรตีนในตัวทำละลาย ขึ้นกับการกระจายของกลุ่มประจุที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ที่อยู่ บนผิวของโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งโปรตีนละลายน้ำได้ดีมีเหตุผลหลักสองประการคือ โมเลกุลของ โปรตีนส่วนที่ชอบน้ำสามารถเกิดแรงกิริยากับน้ำได้ เรียกส่วนนี้ว่า hydrophilic patches สามารถ เกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าเอาโมเลกุลของน้ำมาล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนได้ ทำให้โปรตีนละลาย น้ำได้ อีกสาเหตุหนึ่งคือ บนโมเลกุลของโปรตีนมีประจุไฟฟ้าสุทธิสูงกว่าแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตย์ทำให้ โมเลกุลของโปรตีนอยู่ห่างกัน จึงไม่สามารถรวมตัวเข้ามาอยู่ใกล้กันแล้วตกตะกอนลงมาได้ ดังนั้นปัจจัยใดที่สามารถเพิ่มปฏิกริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยตัวเอง (protein-protein interaction) หรือการลดปฏิกริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและน้ำ (protein-water interaction) ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนลดลง ทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอนมากขึ้น สำหรับการตกตะกอน โปรตีนที่นิยมใช้ในการทำไซลานเนสสำหรับบริสุทธิ์ และเป็นวิธีที่ไม่ทำให้เกิดการเสีย สภาพ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงค่าความแรง ไอออน (Change in ionic strength) ซึ่งการตกตะกอน โปรตีนโดยใช้เกลือชนิดที่มีความเป็นกลาง (Neutral salt) เป็นวิธีที่นิยมสำหรับการตกตะกอนลำดับส่วน โดยเฉพาะเกลือที่มีไคววาเลนต์ (divalent ion) เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  หรือ แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $\text{MgCl}_2$ ) จะมีอิทธิพลต่อการละลายของโปรตีนอย่างมาก ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ของเกลือ โปรตีนจะละลายน้ำได้ แต่เมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นจะมีแนวโน้มทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน เรียกว่า "salting out effect" โดยที่ความเข้มข้นของเกลือสูงจะไปเพิ่มความแรงไอออน (ionic strength) ของสารละลายให้สูงขึ้น จนกระทั่งไอออนของเกลือไปแย่งโมเลกุลของน้ำที่ ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีน ทำให้น้ำจับกับโปรตีนได้น้อยลง และโปรตีนเกิดการจับตัวกัน ตกตะกอนลงมา การรวมตัวกันของโปรตีนเกิดจากส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนโมเลกุลของโปรตีนแต่ละ ตัวเคลื่อนที่เข้ามาอยู่ใกล้กัน โดยแรงดึงดูดระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำด้วยตัวเอง และเกิดเป็นกลุ่ม ก้อนโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อน้ำหนักสะสมเพิ่มขึ้นก็เกิดการตกตะกอนลง เกลือที่นิยมใช้กัน มากที่สุด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากเกลือชนิดนี้มีค่าการละลายน้ำสูงมากและมีค่า สัมประสิทธิ์อุณหภูมิของการละลายค่อนข้างต่ำ (temperature coefficient of solubility) ในช่วง 0-30 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำได้ โดยไม่เกิดการ สลายตัวของโครงสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ที่สลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง แต่มีข้อควรระวังคือการ ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต มักจะทำให้เกิดการสูญเสียโปรตีนหรือเอนไซม์ทำให้ได้ ปริมาณผลได้ (Yield) ต่ำ นอกจากนี้ยังมีเกลือชนิดอื่นที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีน เช่น โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต โพตัสเซียมซัลเฟต และโซเดียมซัลเฟต เป็นต้น โดยเกลือที่มี ประจุแบบไคววาเลนต์ เช่น  $\text{SO}_4^{2-}$  และไตรวาเลนต์ เช่น  $\text{PO}_4^{3-}$  จะให้ผลในการตกตะกอนได้ดีกว่า

พวกที่มีไอออนเดี่ยว (univalent ion) เช่น  $\text{Cl}^-$  ตัวอย่างเช่น เกลือฟอสเฟตสามารถให้ค่า ionic strength สูงเป็น 3 เท่าของเกลือคลอไรด์ถ้าใช้ความเข้มข้นเป็น โมลาร์เท่ากัน

การตกตะกอน โปรตีนด้วยเกลือบางครั้งจำเป็นจะต้องมีการกำจัดเกลือออกจากโปรตีน เนื่องจากเกลือจะรบกวนต่อการวิเคราะห์หรือมีผลต่อขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ลำดับต่อไปที่ต้องการ Low Ionic Strength ในการกำจัดเกลือออกทำได้โดยการทำให้ Dialysis (ชรินทร์, 2542)

## 6.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (gel filtration chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสาร โดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างกันของขนาด มวล และรูปร่างของสารตัวอย่าง การแยกสารเกิดขึ้นบนตัวกลางที่เป็นเม็ดเจลที่มีรูพรุน ความพรุนของเม็ดเจลเกิดจากการเชื่อมโยงของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการสร้างเจล (gel matrix) โดยภายในเม็ดเจลแต่ละเม็ดมีขนาดช่องว่างที่จำเพาะซึ่งจะยอมให้สารที่มีขนาดโมเลกุลค่าหนึ่งผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ ส่วนสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าไม่สามารถผ่านเข้าไปได้จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ก่อน จึงสามารถแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและใหญ่ออกจากกันได้ สารที่นำมาทำเป็นตัวกลางในการเชื่อมโยงเป็นเม็ดเจลแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มด้วยกัน คือ

6.2.1 เดกซ์แทรน (Dextran) เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่ผลิตขึ้นโดยใช้แบคทีเรีย *Leuconostoc mesenteroides* จากนั้นทำให้เกิดรูพรุนโดย นำพอลิเมอร์ดังกล่าวมา ทำปฏิกิริยากับ อีพิคลอโรไฮดริน (epichlorohydrin) ซึ่งอีพิคลอโรไฮดรินจะมีหมู่กลีเซอรอล (glyceryl) ทำหน้าที่เชื่อมต่อกับสายเดกซ์แทรนที่ตำแหน่งต่างๆ เกิดโครงสร้างเป็นรูพรุน ในกระบวนการผลิตเดกซ์แทรนทางอุตสาหกรรมสามารถเตรียมให้ได้รูพรุนขนาดต่างๆ กัน โดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่างเดกซ์แทรนและอีพิคลอโรไฮดริน โดยเดกซ์แทรน มีชื่อทางการค้าว่า Sephadex แบ่งออกเป็นเกรดต่างกัน เรียกว่า G-type ซึ่งมีความแตกต่างกันของระดับการเชื่อมโยง (degree of cross linked) และช่วงของมวลโมเลกุลที่ยอมให้ผ่านเข้าไปในเม็ดเจล แสดงดังตารางที่ 2 คุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญของ Sephadex คือ ไม่ละลายในตัวทำละลายทุกชนิด มีความเสถียร ในน้ำ สารละลายเกลือ ตัวทำละลายอินทรีย์ สารละลายด่างและกรดอ่อน สำหรับคุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญของเดกซ์แทรน คือ สามารถทนอุณหภูมิและความดันสูงได้ แต่ถ้าอยู่ในรูปของเจลแห้งจะทนความร้อนได้ไม่เกิน 120 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้เกิดการหลอมตัวของเจล

6.2.2 พอลิอะคริลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel) เป็นเม็ดเจลที่เกิดจากการเชื่อมไขว้กันระหว่างอะคริลาไมด์เจลกับ N,N'-methylene-bis-acrylamide ด้วยพันธะเปปไทด์ได้ลักษณะเป็นโครงร่างตาข่าย มีชื่อทางการค้าว่า Bio-Gel แบ่งเกรดเป็น P-type มีช่วงของมวลโมเลกุลที่ยอมให้ผ่านเข้าไปในเม็ดเจล อยู่ในช่วง 0.1-400 kDa แสดงดังตารางที่ 2 ในการนำไปใช้งานมักจะนิยมใช้สำหรับแยกโปรตีนต่างๆ ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน คุณสมบัติที่สำคัญของพอลิอะคริลาไมด์เจลคือสามารถทนต่ออุณหภูมิและความดันสูงได้ มีความเสถียรในช่วงพีเอช 2.0-10.0 แต่ไม่ทนต่อสารประเภท oxidizing agent

6.2.3 อะกาโรสเจล (Agarose gel) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย D-galactose เชื่อมต่อกับ 3,6-anhydro-L-galactose ในการสร้างเจลต้องมีขั้นตอนการกำจัดประจุบนโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ออกก่อน โดยพอลิแซคคาไรด์แต่ละเส้นจะเข้ามารวมตัวกันแล้วพันเป็นเกลียวคู่ (double helix) จากนั้นจึงเกิดการเชื่อมเป็นร่างแหทำให้ได้เจลที่มีความคงตัวสูง Agarose gels มีชื่อทางการค้าว่า Sepharose แบ่งออกเป็น B-type แสดงดังตารางที่ 2 โดยช่วงของมวลโมเลกุลที่ยอมให้ผ่านเข้าไปในเม็ดเจลนั้น กว้างมากจึงเหมาะสำหรับการแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ๆ คุณสมบัติของอะกาโรสคือ มีความคงตัวสูงเนื่องจากพันธะไฮโดรเจนทำให้มีความเสถียรในน้ำและ สารละลายเกลือที่พีเอช 4.0-9.0 และทนต่อสารประเภท oxidizing agent มีข้อควรระวัง คือ หลีกเลี่ยงการใช้งานกับสารพวก chaotropic salt ซึ่งเป็นสารที่ทำลายพันธะไฮโดรเจนภายในสายพอลิเมอร์และ หลอมละลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จึงไม่สามารถนำมาผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูงได้ (ชรินทร์, 2542)

เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีนิยมใช้ในการแยกสารตามขนาดโมเลกุล ใช้ในการหามวลโมเลกุลของสาร และยังใช้ในการกำจัดเกลือออกจากโปรตีนหลังจากตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือมีรายงานว่าสามารถทำไซลานเนสจาก *Streptomyces rochei* ให้บริสุทธิ์เพียงตกตะกอนโปรตีนด้วย 60% แอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นนำมาผ่านเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีโดยใช้ คอลัมน์ Sephadex G-100 (Nadia *et al.*, 2010)

ตารางที่ 2 สารที่ใช้เป็นตัวกลางในการเชื่อมโยงไว้กันเป็นเม็ดเจล ในเจลฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี

ชนิดสารที่ใช้ทำเจล	ชื่อทางการค้า	ช่วงของมวลโมเลกุลที่ยอมให้ผ่าน เข้าในเม็ดเจล (kDa)
Dextran	Sephadex G-50	1-30
	Sephadex G-75	3-70
	Sephadex G-100	4-150
	Sephadex G-150	5-400
Polyacrylamide	Bio-Gel P-6	1-5
	Bio-Gel P-10	5-17
	Bio-Gel P-30	20-50
	Bio-Gel P-100	40-100
	Bio-Gel P-150	50-150
Agarose	Sepharose 6B	10-4000
	Sepharose 4B	60-20000
	Sepharose 2B	70-40000

ที่มา: ชรินทร์ (2542)

### 6.3 การทำไอโซเมตริกซ์ให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchanger chromatography) เป็นเทคนิคการแยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของค่าประจุ (net charge) ของสารตัวอย่าง มีเรซิน (resin) เป็นตัวกลางในการแลกเปลี่ยนประจุ เมื่อตัวแลกเปลี่ยนประจุถูกทำให้อิ่มตัวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ หรือสารละลายเกลือใดๆ ส่วนของสารที่มีประจุที่เป็นองค์ประกอบในบัฟเฟอร์หรือสารละลายเกลือจะเข้ามาล้อมรอบตัวแลกเปลี่ยนประจุเพื่อรักษาสภาพสมดุลย์ทางไฟฟ้า เรียกประจุเหล่านี้ว่า เคาน์เตอร์ไอออน (counter ion) เป็นไอออนที่มีประจุตรงข้ามกับเรซิน โดยสารตัวอย่างแต่ละชนิดจะมีประจุต่างกัน ซึ่งสามารถเกิดแรงกระทำทางไฟฟ้ากับประจุในส่วนเคาน์เตอร์ไอออนได้ต่างกัน สารที่มีประจุตรงข้ามกับเรซินและมีความแรงประจุสูงก็จะไปแทนที่เคาน์เตอร์แล้วเข้าไปยึดจับเรซินไว้ ส่วนสารที่มีประจุชนิดเดียวกันกับเรซินก็จะหลุดออกจากคอลัมน์ก่อนโดยแรงผลัก

ทางไฟฟ้าทำให้สามารถแยกสารผสมออกจากกันได้ เมื่อต้องการไล่อสารที่ถูกยึดจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุให้หลุดออกมาสามารถทำได้โดยการผ่านบัฟเฟอร์ที่มีประจุแรงกว่าเข้าไป ซึ่งจะไปแทนที่สารที่จับกับเรซินทำให้สารที่จับกับเรซินหลุดออกมาตามความแรงประจุของสาร จึงสามารถแยกสารที่มีความแรงของประจุต่างกันได้สารที่ใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุ ได้แก่ เซลลูโลสอะกาโรส โพลีเอมีน อะคริลิก (acrylic) หรือพอลิสไตรีน (polystyrene) ที่เชื่อมไขว้ด้วย divinylbenzene เป็นต้น ลักษณะที่สำคัญของสารเหล่านี้ คือ มีความเป็นรูพรุน (porosity) ซึ่งจะช่วยให้ผิวของการแลกเปลี่ยนประจุ เรซินที่เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม จากการเป็นประจุของหมู่ลิแกนด์ (ligand) คือ

### 6.3.1 แคทไอออนเอ็กซ์เชนจ์เรซิน (cation exchange resin)

เป็นเรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุบวก โดยที่ลิแกนด์ของเรซินชนิดนี้เป็นหมู่จำพวกกรด เมื่ออยู่ใน ionized form จะมีคุณสมบัติเป็นประจุลบ ประจุของแคทไอออนเอ็กซ์เชนจ์เรซินจึงเป็นประจุลบ โมเลกุลที่จะเข้าจับกับเรซินหรือที่เรียกว่า แคตไอออน จึงต้องเป็นประจุบวก (cation) แคทไอออนเอ็กซ์เชนจ์เรซินที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ ได้แก่ CM-Sephadex, CM-Sepharose และ CM-Cellulose เป็นต้น

### 6.3.2 แอนไอออนเอ็กซ์เชนจ์เรซิน (anion exchange resin)

เป็นเรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบ คุณสมบัติต่างๆ ก็จะเป็นลักษณะที่ตรงกันข้ามกับแคทไอออนเอ็กซ์เชนจ์เรซิน คือลิแกนด์เป็นหมู่ฟังก์ชันจำพวกเบส สภาพ ionized form มีคุณสมบัติประจุบวก เมื่อประจุของลิแกนด์เป็นบวก โมเลกุลที่จะเข้ามาจับหรือแคตไอออนจึงต้องเป็นประจุลบ (anion) แอนไอออนเอ็กซ์เชนจ์เรซินที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ ได้แก่ DEAE-Sepharose, DEAE-Cellulose, DEAE-Sephacel และ QAE-Sephadex เป็นต้น

สำหรับการประยุกต์ใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุในการแยกโปรตีน เรซินที่นิยมนำมาใช้มักจะเป็นชนิด weak เนื่องจากการชะสารที่จับกับเรซินให้หลุดออกมาจะใช้สภาวะที่ไม่รุนแรง ทำให้โปรตีนไม่เสียสภาพ การทำแอนไอโซมให้บริสุทธิ์เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เพราะแอนไอโซมส่วนมากที่ได้จากกระบวนการหมักจะอยู่ในรูปของสารผสมที่ประกอบด้วยเซลล์ และสารประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกใช้ไม่หมด นอกจากนี้แอนไอโซมที่อยู่ในน้ำหมักจะมีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นการเลือกวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการทำแอนไอโซมให้

บริสุทธิ์จึงขึ้นอยู่กับชนิดหรือคุณสมบัติของเอนไซม์ ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุล ค่า pI ค่าพีเอช และ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์ เป็นต้น นอกจากนี้ระดับความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ต้องการนำไปใช้ และเครื่องมือที่มีอยู่หรือที่สามารถหาได้เป็นอีกส่วนที่สำคัญในการเลือกวิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

คุณสมบัติของไซลानเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. จะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 20-54 kDa มีค่า pI อยู่ระหว่าง 4.2-10 และสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง 50-70 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงว่าไซลานเนสจาก *Streptomyces* sp. สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ ดังนั้นขั้นตอนการทำไซลานเนสให้บริสุทธิ์จึงไม่ต้องทำที่อุณหภูมิต่ำมากๆ แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของไซลันเนสจาก *Streptomyces* species

Microorganism	Xylanase	MW (kDa)	Final purification step	Optimum		pI	Reference
				pH	Temp (°C)		
<i>Streptomyces</i> sp. T7	-	21.8	Sephadex G-50	4.5-5.5	60	7.8	Keskar <i>et al.</i> (1989)
<i>Streptomyces</i> sp. 7b	-	30	CM-Sephadex	6.0	50	N.D	Bajaj and Singh (2010)
<i>S. roseiscleroticus</i>	-	22.6	Bio-Gel A	6.5-7.0	60	9.5	Grabski and Jeffries (1991)
<i>S. rameus</i> L2001	-	21.1	CM Sepharose	5.3	70	N.D	Li <i>et al.</i> (2010)
<i>Streptomyces</i> sp. 3137	X-I	50		5.5-6.5	60-65	7.1	
	X-II-A	25	Bio Gel P-100	5.0-6.0	60-65	10.1	Marui <i>et al.</i> (1985)
	X-II-B	25.68		5.0-6.0	60-65	10.3	
<i>Streptomyces</i> sp. EC10	X <sub>IA</sub>	32		7.0-8.0	60	6.8	
	X <sub>IB</sub>	22	Sephadex G-100	7.0-8.0	60	8.9	Lumba and Penninckx (1992)
	X <sub>II</sub>	21		7.0-8.0	60	5.2	
<i>Streptomyces</i> sp. A451	xyl I	22.8	Sephadex G-75	5.6	50	8.6	He <i>et al.</i> (1993)
	xyl II	33.1		5.4	50	8.9	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Microorganism	Xylanase	MW (kDa)	Final purification step	Optimum		pI	Reference
				pH	Temp (°C)		
<i>S. cyaneus</i>	I	37.5		8.0	72	5.1	
	II	34	DEAE-Sepharose	6.5	65	5.2	Wang <i>et al.</i> (1993)
	III	45		N.D	N.D	N.D	
<i>S. thermoviolaceus</i> OPC-520	I	54	Sephadex G-75	7.0	70	4.2	Tsujibo <i>et al.</i> (1992)
	II	33		7.0	60	8.0	
<i>S. actuosus</i> A-151	FI-A	30		5.0–6.0	70	N.D	
	FI-B	45		5.0–6.0	60	N.D	
	FII-A	26	CM-Sepharose CL-6B	5.0–6.0	70	N.D	Wang <i>et al.</i> (2003)
	FII-B	20		4.0	70	N.D	

หมายเหตุ N.D (not determined) หมายถึง ไม่ได้มีการระบุไว้

#### 6.4. อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนระหว่างขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยหลักการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนผ่านสนามไฟฟ้า โปรตีนที่มีประจุและขนาดของมวลโมเลกุลต่างกันจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกันทำให้สามารถแยกสารออกจากกันได้ โปรตีนที่มีประจุจะถูกบังคับให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม โปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่าจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโปรตีนขนาดเล็ก วิธีที่นิยมใช้ คือ อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE

หลักการของอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE คือ SDS จะทำให้โปรตีนเสียสภาพ เปลี่ยนสภาพจากทรงกลม (globular) ไปอยู่ในสภาพที่เหยียดตรง โดย SDS ที่มีประจุลบจะไปเกาะกับโปรตีนอย่างแน่นหนาทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ นอกจากนี้โปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยหลายหน่วยเกาะกันอยู่ก็จะแยกออกเป็นแต่ละหน่วยย่อย ดังนั้นการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีนทุกตัวในกรณีนี้ จึงเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างในน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว โดยจะเป็นการเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวก ซึ่งสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้จากระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว นอกจากนี้การปรากฏของแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีน

#### 7. ประโยชน์ของไซลानเนสในอุตสาหกรรม

ไซลานเนสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่ไซลานเนสจะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับวัสดุทางการเกษตร เช่น อุตสาหกรรมกระดาษและอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น โดยการนำไปใช้งานจะเป็นการปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้สูงขึ้น การเพิ่มคุณค่าทางอาหาร หรือการลดปริมาณของน้ำเสียที่ปล่อยออกจากโรงงาน ซึ่งได้รับความสนใจมาก เนื่องจากเป็นสิ่งที่ได้จากธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกับสิ่งแวดล้อมและไม่มีปฏิกิริยารุนแรงจึงมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้จริงในอุตสาหกรรม และให้ประโยชน์สูงสุด (Beg *et al.*, 2001)

### 7.1 อุตสาหกรรมกระดาษ

ในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ เยื่อที่จะนำมาทำกระดาษ นั้นจะมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาลซึ่งเกิดจากองค์ประกอบของลิกนินในวัตถุดิบ ในขั้นตอนการเตรียมเยื่อก่อนการฟอกเยื่อได้มีการนำโซลานามาใช้ในขั้นตอนนี้ โคลโซลานจะย่อยไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสออกจากเยื่อกระดาษ ช่วยให้การสกัดลิกนินออกจากเยื่อกระดาษในระหว่างขั้นตอนการต้มเยื่อได้ดีขึ้น (Saleem *et al.*, 2009) ทำให้เยื่อที่ได้มีความขาวสว่าง (brightness) เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดปริมาณการใช้คลอรีนในกระบวนการผลิตกระดาษ ช่วยลดการปล่อยสารพิษสู่สิ่งแวดล้อม และยังเป็น การลดการสูญเสียสัปสเตรทในกระบวนการผลิต เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงกับสัปสเตรทมากกว่าสารเคมี เพราะสารเคมีที่ใช้ในการฟอกเยื่อจะเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรง อีกทั้งยังทำให้สูญเสียสัปสเตรทอีกด้วย (Ander, 1994)

### 7.2 อุตสาหกรรมอาหารสัตว์

อุตสาหกรรมอาหารสัตว์มีการนำ โซลานามาผสมในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับอาหารสัตว์บางประเภท เช่น ไก่ หมู และวัว เนื่องจากการย่อยอาหารของสัตว์เหล่านี้มักเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ จึงใช้โซลานาเสริมในอาหารสัตว์เพื่อช่วยในการย่อยสลายพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharide, NSP) ประเภทเส้นใยเซลลูโลส และเพนโตแซน (pentosan) ทำให้มีผลไปช่วยลดความหนืด (viscosity) ในกระเพาะของสัตว์ และช่วยให้สัตว์สามารถดูดซึมสารอาหารได้ง่ายและเร็วขึ้น นอกจากนี้โซลานายังสร้างสารที่มีประโยชน์ต่อ microflora ของพวกสัตว์เคี้ยวเอื้องด้วย (Gilbert and Hezlewood, 1993)

### 7.3 การผลิตเอทานอล

ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นไซแลนและเซลลูโลส ภายหลังจากการย่อยจะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลกลูโคส ตามลำดับ จากนั้นจึงใช้ยีสต์หมักน้ำตาลที่ได้เปลี่ยนเป็นเอทานอล กระบวนการผลิตโดยส่วนใหญ่ใช้กรดในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้ หรือใช้ความร้อนสูงร่วมด้วยในการย่อยสลายเพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิซ (Morjanoff and Gray, 1987) กระบวนการผลิตเหล่านี้จะมีสารประกอบพวกฟีนอล (phenolic compound) เกิดขึ้น ซึ่งฟีนอลนี้จะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์จึงต้องการมีการกำจัดฟีนอลออกโดยวิธีต่างๆ เช่น การใช้เอนไซม์

ฟีนอกซิเดสแลคเคส (phenoloxidase laccase) การใช้เรซินและถ่านกัมมันต์ (active charcoal) จากนั้นจึงใช้ต่างในการปรับพีเอชให้เป็นกลางเพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ (Watson *et al.*, 1984) ส่วนกระบวนการผลิตอีกวิธีคือ การใช้เอนไซม์ย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าให้น้ำตาลรีดิวซ์สูง อีกทั้งยังสามารถใส่ยีสต์ลงไปเพื่อหมักให้เกิดเป็นเอทานอลได้เลย เป็นการลดขั้นตอนการกำจัดฟีนอลและการปรับพีเอชให้เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ (Martin *et al.*, 2002)

#### 7.4 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ในการทำขนม เช่น เค้ก คุกกี้ แครกเกอร์ และอาหารอื่นๆ เอนไซม์ไซลานเนสจะช่วยในการทำลายพันธะในพอลิแซคคาไรด์ ช่วยให้การทำขนมและอาหารเร็วขึ้น และช่วยเพิ่มความพรุนในขนมปัง โดยไซลานเนสจะไปกำจัดส่วนของอะราบิโนไซแลน (arabinoxylan) ที่เป็นองค์ประกอบในแป้ง (Butt *et al.*, 2008) นอกจากนี้ไซลานเนสยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกรองในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ ทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้น และช่วยลดความหนืดของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เข้มข้น โดยไซลานเนสจะทำหน้าที่ช่วยย่อยเฮมิเซลลูโลสที่เป็นสารแขวนลอยออก ทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้น โดยที่ไม่ทำให้สีหรือวิตามินของผลไม้สูญเสียไป (Godfrey and West, 1996)

#### 7.5 อุตสาหกรรมสิ่งทอ

หลังจากสิ้นสุดกระบวนการทอผ้าจะมีน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการถักทอและย้อมสีเกิดขึ้น ซึ่งหากถูกปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจะก่อความเสียหายให้กับสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก จึงได้มีการนำไซลานเนสมาใช้บำบัดน้ำทิ้งที่เกิดจากกระบวนการทอผ้าก่อนปล่อยออกสู่แม่น้ำลำคลอง ซึ่งจะช่วยลดความเป็นพิษของน้ำ และลดต้นทุนของการใช้สารเคมีลง ซึ่งต้นทุนที่ใช้ในการบำบัดด้วยเอนไซม์จะน้อยกว่าการผ่านกระบวนการเคมี (Tanticharoen and Cheevadhanarak, 1984) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไซลานเนสมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้ในขั้นตอนการลอกแป้ง (Desizing) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีความจำเป็นสำหรับผ้าทอ เนื่องจากในการทอผ้าจะต้องมีการลงแป้งเส้นด้ายขึ้นก่อนเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการทอและทนทานต่อการเสียดสีในระหว่างการทอมากขึ้น แต่ก่อนที่จะทำการย้อมหรือพิมพ์ผ้าต้องผ่านขั้นตอนการลอกแป้งออก ซึ่งการใช้เอนไซม์ในขั้นตอนนี้ทำให้คุณสมบัติของสิ่งทอที่ได้ดีกว่าการใช้สารเคมี (Battan *et al.*, 2012)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. ตู้เขี่ยเชื้อ (microflow biological safety cabinet)
2. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (temperature incubator)
3. เครื่องเขย่าเชื้อที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (thermo shaker)
4. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
5. เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง
6. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
7. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerator centrifuge)
10. เครื่องอัลตราฟิเตรชัน
11. เครื่องเก็บสารละลายจากคอลัมน์ (Fraction collector, Advantec SF-160)
12. อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์
13. เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆ ที่จำเป็น (ตั้งระบุในแต่ละการทดลอง)

## วิธีการ

### 1. แหล่งจุลินทรีย์

*Streptomyces mexicanus* 901 ที่เจริญบนอาหาร ISP2 โดยแยกมาจากน้ำเสียโรงงานกระดาษ (Sirisuntornsakul *et al.*, 2013)

### 2. การเตรียมแหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เปลือกข้าวโพด ชังข้าวโพด ฟางข้าว และแกลบ นำมาปั่นให้มีขนาดเล็กลงด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh จากนั้นล้างน้ำตาลที่ปนอยู่ออกด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งน้ำที่ชะออกมาไม่มีสีเหลืองให้นำมาอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแห้ง

### 3. การศึกษาพื้นฐานวิทยาและคุณสมบัติของ *S. mexicanus* 901

#### 3.1 สัณฐานวิทยาของ *S. mexicanus* 901

เลี้ยง *S. mexicanus* 901 บนอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน ได้แก่ ISP2, ISP3, ISP4, GYE, Berg's medium และ Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ตรวจสอบลักษณะและสีของโคโลนี การสร้างเส้นใย การติดสีแกรม และลักษณะสปอร์

#### 3.2 ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ คัดแปลงมาจาก ซาญูวิทซ์ (2546)

##### 3.2.1 ทดสอบความสามารถในการผลิตไซลันเนส

เลี้ยง *S. mexicanus* 901 บนอาหารแข็ง xylan medium บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นใช้สารละลายไอโอดีนเทบนจานอาหาร แบคทีเรียสามารถย่อยสลายไซลันเนสได้จะเกิด ส่วนใส (clear zone) ปรากฏอยู่รอบโคโลนี หากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Hydrolysis capacity; HC)

### 3.2.2 ทดสอบความสามารถในการผลิตคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส

เลี้ยง *S. mexicanus* 901 บนอาหารแข็ง CMC medium บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นย้อมสีด้วยสารละลาย Congo red นาน 15 นาที แล้วล้างสีออกด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ทำอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนในสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Hydrolysis capacity; HC)

### 3.2.3 ทดสอบความสามารถในการผลิตอะไมเลส

เลี้ยง *S. mexicanus* 901 บนอาหารแข็ง Yeast starch medium บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นใช้สารละลายไอโอดีนเทบนจานอาหาร ทำอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนในสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Hydrolysis capacity; HC)

### 3.3 พืชเริ่มต้นต่อการเจริญ

เลี้ยง *S. mexicanus* 901 ในอาหารเหลว ISP2 ที่มีค่าพีเอช 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 3 วัน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อแยกตกตะกอนเซลล์และ วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง

### 3.4 อุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตไซลานเนส

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตไซลานเนส โดยเลี้ยง *S. mexicanus* 901 ในอาหาร ISP2 ที่ค่าพีเอชที่เหมาะสม บ่ม ที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 3 วัน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มา วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และส่วนใสที่ได้นำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของไซลานเนส

#### 4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลานเนส

##### 4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไซลานเนส

เลี้ยง *Streptomyces mexicanus* 901 ในอาหารสูตร ISP2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ เปลือกข้าวโพด ชั่งข้าวโพด ฟางข้าว และแกลบ ศึกษาผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ดำเนินการโดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อมาทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของไซลานเนส

##### 4.2 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลานเนส

ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลานเนส โดยการเตรียมอาหาร ISP2 ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน ดังนี้ 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 เดิมกล้าเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไซลานเนส โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ดังนี้ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ที่พีเอชที่เหมาะสม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นาน 5 วัน นำมาปั่นเหวี่ยงและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อมาทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของไซลานเนส

##### 4.3 ผลความเร็วรอบการเขย่าต่อการผลิตไซลานเนสในระดับพลาสติก

เลี้ยง *S. mexicanus* 901 ในอาหาร ISP2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ควบคุมอุณหภูมิที่มีความเร็วแตกต่างกัน ดังนี้ 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นาน 5 วัน นำมาปั่นเหวี่ยงและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อมาทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของไซลานเนส

#### 4.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของไซลานเนส

วิเคราะห์หากิจกรรมของไซลานเนสของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยง *S. mexicanus* 901 ด้วยวิธีซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Saleem *et al.* (2009) โดยบ่มไซลานเนสร่วมกับไซเลนความเข้มข้น 1.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) (ภาคผนวก ข)

1 ยูนิต (U) ของไซลานเนส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อย สับสเตรต โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

#### 4.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) (ภาคผนวก ข ข้อ 2)

### 5. การทำไซลานเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน

#### 5.1 การทำไซลานเนสให้เข้มข้นขึ้นด้วยอัลตราฟิลเตรชัน

นำส่วนใสของไซลานเนสที่ได้จากการเลี้ยง *S. mexicanus* 901 ในสภาวะที่เหมาะสมมาผ่านอัลตราฟิลเตรชัน เพื่อไล่น้ำและโปรตีนที่ปนเปื้อนออก โดยใช้แผ่นกรอง เซลลูโลสที่มี Molecular weight cut-off เท่ากับ 10 kDa ไซลานเนสที่ได้นำไปศึกษาขั้นต่อไป

#### 5.2 เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

บรรจุเจล Sephadex G-100 ที่ผ่านการทำให้ พองตัวแล้ว (75.0% gel slurry) ลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร โดยการกวน 75.0% gel slurry ให้เข้ากันแล้วค่อยๆ เทลงในคอลัมน์จนเกือบเต็ม จากนั้นปล่อยให้วางเจลเซทตัวอย่างมีระบบด้วยอัตราการไหลคงที่จนกระทั่งได้ bed volume ที่ต้องการ จากนั้นปรับสภาพคอลัมน์ (equilibrate column) โดยการปล่อยซีเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 ผ่านคอลัมน์จนครบ 3 bed volum

นำไซลานเนสเข้มข้นที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาใส่ลงบนผิวหน้า เจล Sephadex G-100 ปล่อยให้ไซลานเนสเข้าไปในเจลจนหมด แล้วปล่อยให้สารละลายซีเตรทบัฟเฟอร์ไหลผ่านคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล (flow rate) 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร และชะด้วยบัฟเฟอร์ต่อไปเรื่อยๆ จนกระทั่งตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ไม่มีปริมาณ โปรตีนเมื่อวัดที่ค่า การดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร แต่อย่าปล่อยให้ผิวหน้าเจลแห้ง นำตัวอย่างแต่ละหลอดมา วิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของไซลานเนสและปริมาณ โปรตีนด้วยวิธีของ Lowry *et al.* (1951)

### 5.3 อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE

นำไซลานเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยอัลตราฟิลเตรชันและเจลฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟีมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไซลานเนสที่ได้ โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE (ภาคผนวก ข4) แล้วเปรียบเทียบแถบของโปรตีนที่ปรากฏบนเจลระหว่างไซลานเนสที่ ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและ Crude xylanase

## 6. ศึกษาคุณสมบัติของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

### 6.1 ผลของพีเอชต่อการทำงานของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

นำไซลานเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมา ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน ในช่วงพีเอช 3.0-12.0 โดยใช้สารละลายซีเตรทบัฟเฟอร์ควบคุมพีเอชในช่วง 3.0-5.0 ใช้สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ควบคุมพีเอชในช่วง 6.0-8.0 และใช้สารละลาย glycine-NaOH บัฟเฟอร์ควบคุม พีเอชในช่วง 9.0-12.0 (ภาคผนวก ข) ตรวจวัดกิจกรรมของไซลานเนสตามข้อ 3.4 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

### 6.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

นำไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วนมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของไซลานเนสตามข้อ 3.4 โดย บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 30-80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ที่ค่าพีเอชที่เหมาะสม

### 6.3 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของไซลानเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

นำไซลानเนส ที่บริสุทธิ์บางส่วนมา บ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ ที่พีเอช แตกต่างกัน 3.0-12.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบกิจกรรมของไซลานเนสที่เหลือตามข้อ 3.4 ที่สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซลานเนส

### 6.4 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

นำไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วนมาบ่มที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาตรวจสอบกิจกรรมของไซลานเนสที่เหลือตามข้อ 3.4 ที่สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซลานเนส

### 6.5 ผลของไอออนโลหะและสารคีเลตต่อการทำงานของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

วิเคราะห์ กิจกรรมของ ไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน ในสภาวะที่เหมาะสมที่มีไอออนของโลหะต่อไปนี้  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  และ  $\text{Ca}^+$  ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ 1.0% ไซแลนเป็นสับสเตรท เพื่อศึกษาผลการยับยั้งหรือกระตุ้นกิจกรรมของ ไซลานเนสจากไอออนของโลหะเหล่านี้

ศึกษาผลของสารคีเลตต่อการทำงานของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน โดยวัดกิจกรรมของไซลานเนสในสภาวะที่เหมาะสมที่มีสารคีเลต ได้แก่ ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

### 6.6 การย่อยไซแลนของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

ศึกษาการย่อยไซแลนของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน โดยบ่มไซแลน 2.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับไซลานเนส (10 U/ml) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆ นาน 180 นาที ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) แล้วนำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลามาเขียนกราฟ เพื่อตรวจสอบความสามารถในการย่อยไซแลนของไซลานเนส

## ผลและวิจารณ์

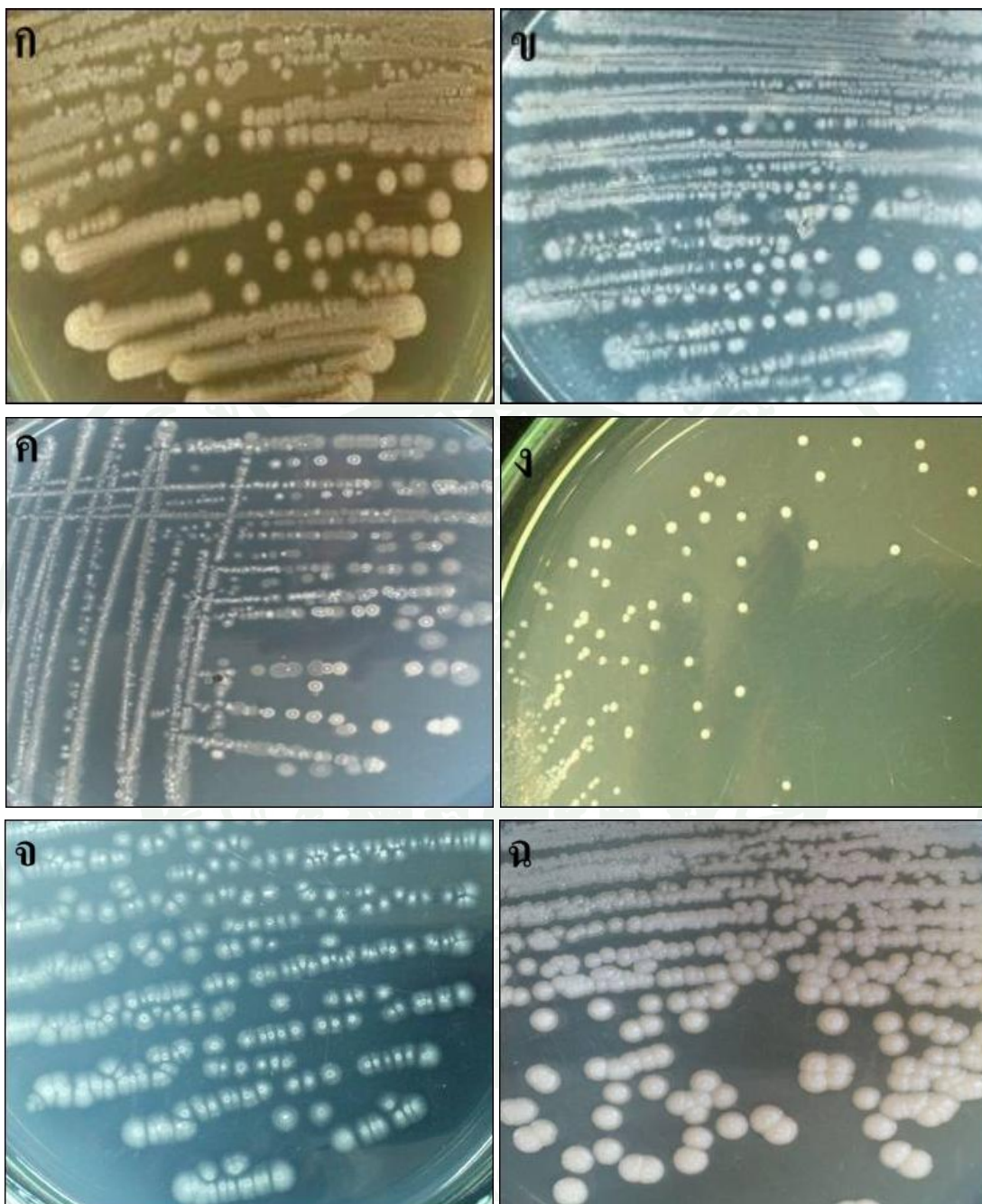
### 1. สัณฐานวิทยาและคุณสมบัติของ *Streptomyces mexicanus* 901

#### 1.1 สัณฐานวิทยาของ *Streptomyces mexicanus* 901

จากการเลี้ยง *S. mexicanus* 901 บนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง พบว่า *S. mexicanus* 901 เจริญได้ดีบนทุกสูตรอาหารโดย เจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร ISP2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนสูตรอาหาร นี้ ผิวของโคโลนีมีลักษณะขุ่น มีการสร้างสปอร์สีขาว เมื่ออายุมากขึ้นสปอร์จะมีสีน้ำตาล เทา และสีของ รังควัตถุที่ปล่อยออกมามีสีเหลืองน้ำตาล แสดงดังภาพที่ 2ก ส่วนลักษณะโคโลนีที่เจริญบนสูตร อาหาร ISP3 และ Berg's medium ผิวหน้าของโคโลนีมีลักษณะขุ่น มีสีขาวคล้ายผงแป้ง แสดงดังภาพที่ 2ข และ 2จ สำหรับสูตรอาหาร ISP4 โคโลนีมีสีขาว ลักษณะแข็งและฝังลงในเนื้อวุ้น โคโลนีมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 2ค) ลักษณะโคโลนีบนสูตรอาหาร NA มีสีขาว ผิวเรียบ โคโลนียึดติดแน่นกับผิวหน้า วุ้น โคโลนีมีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.0 มิลลิเมตร แสดงดัง ภาพที่ 2ง และบน สูตรอาหารแข็ง GYE พบว่าโคโลนีมีสีขาว ผิวหน้าโคโลนีวาว และ โคนูน โคโลนีมีขนาดใหญ่ แสดงดังภาพที่ 2ฉ

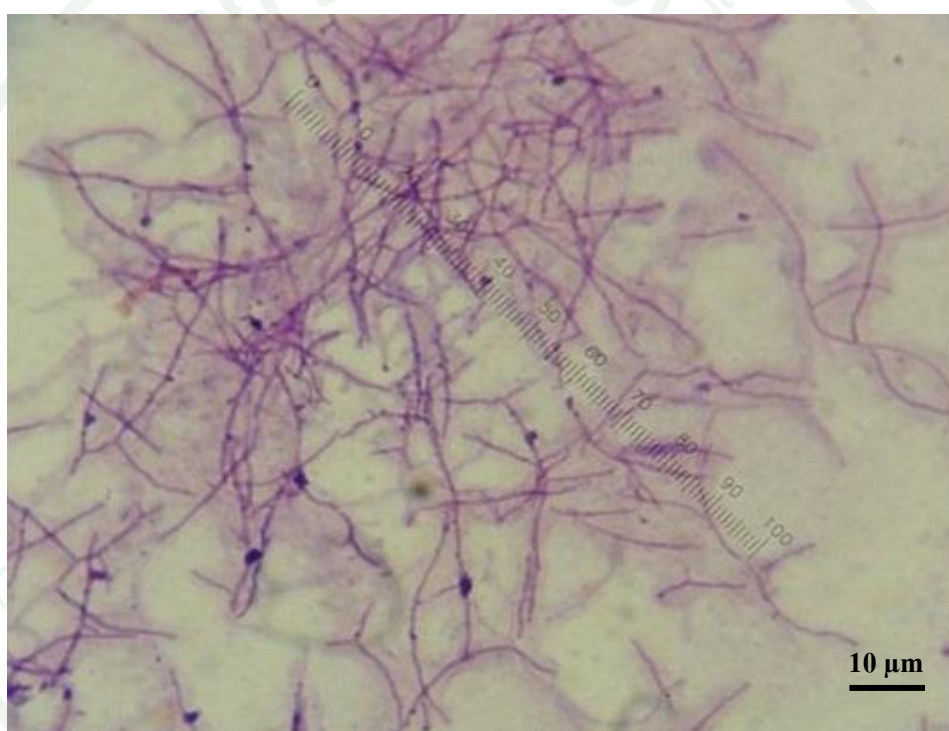
สอดคล้องกับการศึกษาของ Petrosyan *et al.* (2003) พบว่า *S. mexicanus* สามารถเจริญ ได้บนสูตรอาหาร ISP2, ISP3 และ ISP4 โดยสามารถเจริญได้ดีบนสูตรอาหาร ISP2 และ ISP3 เชื้อ จะสร้างเส้นใยบนผิวโคโลนีเรียกว่าเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) มีสีเทา และสร้างเส้นใยสำหรับ ยึดติดกับผิวอาหารเรียกว่าเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ที่มีสีเหลืองน้ำตาล และเมื่อเจริญบน สูตรอาหาร ISP4 จะสร้างเส้นใยอาหารที่มีสีเบจ

นอกจากนี้ยังใกล้เคียง กับการศึกษาสัณฐานวิทยาของ *Streptomyces* sp. 3B เมื่อเลี้ยง บนสูตรอาหารแตกต่างกัน พบว่า *Streptomyces* sp. 3B สามารถเจริญได้ดีเมื่อเลี้ยง บนสูตรอาหาร ISP2 โดยเชื้อจะสร้างเส้นใยอากาศมีสีขาว และสร้างเส้นใยอาหาร ที่มีสีเหลืองน้ำตาล เมื่อเลี้ยงเชื้อ บนสูตรอาหาร ISP3 สีของเส้นใยอากาศ จะมีสีขาว และสีของ เส้นใยอาหาร มีสีเหลืองน้ำตาลและ เมื่อเจริญบนสูตรอาหาร ISP4 เส้นใยอากาศ จะมีสีชมพูอ่อน และ เส้นใยอาหาร มีสีเหลืองน้ำตาล (Stefka *et al.*, 2005)



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของ *Streptomyces mexicanus* 901 บนสูตรอาหาร ก: ISP2, ข: ISP3, ค: ISP4, ง: NA, จ: Berg's medium ฉ: GYE

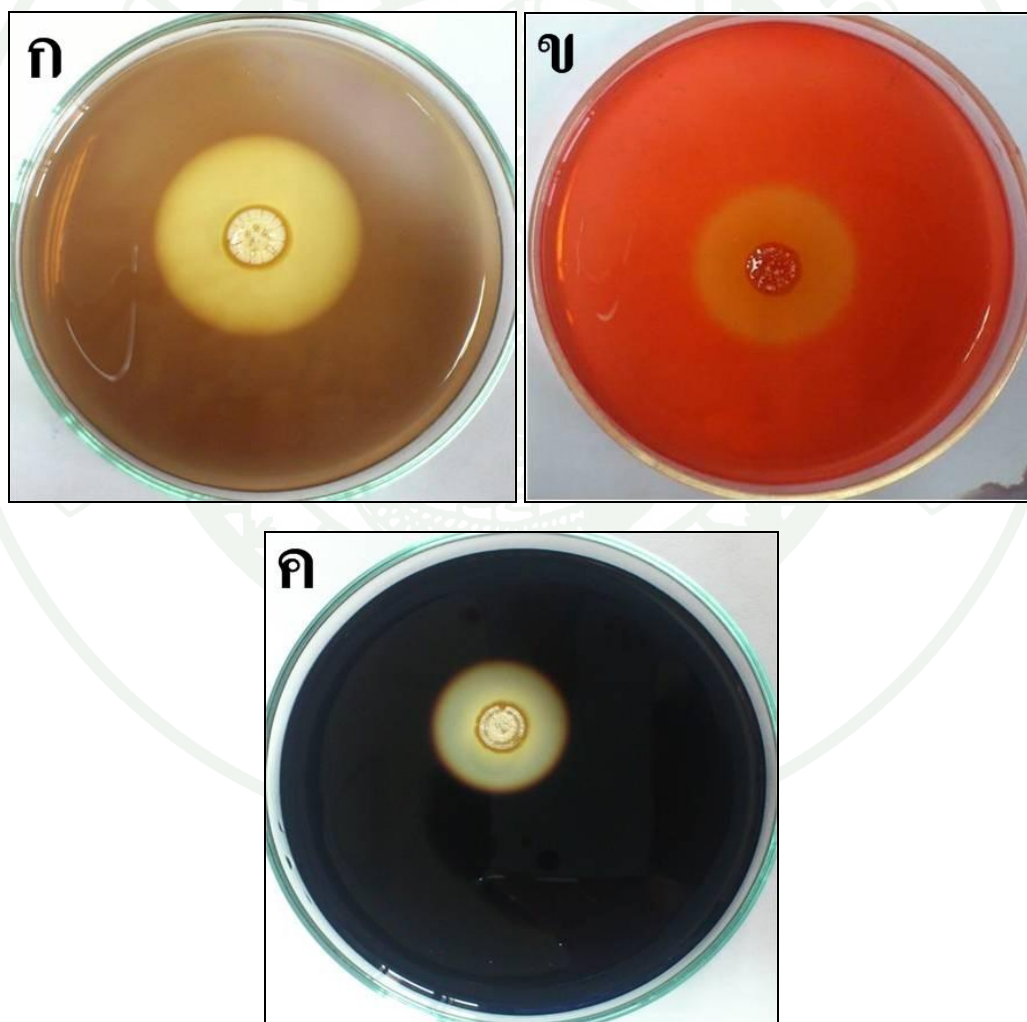
ศึกษาลักษณะของ *S. mexicanus* 901 โดยการย้อมสีแบบแกรม และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า จากภาพที่ 3 พบว่า *S. mexicanus* 901 ติดสีม่วงซึ่งเป็นผลมาจากสีของ crystal violet จึงสามารถระบุได้ว่า *S. mexicanus* 901 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยที่ติดสี crystal violet เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีปริมาณของไขมันที่น้อยกว่าเมื่อหยุดแอลกอฮอล์แล้วเกิดเป็น complex ของสีขึ้น ซึ่งไม่สามารถผ่านช่องของผนังเซลล์ออกมาได้จึงยังคงติดสี crystal violet และตรวจดูลักษณะของเส้นใยพบว่าเป็นเส้นใยยาวมีการแตกแขนง และอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยเส้นใยมีการแตกหักเป็นท่อน ส่วนของท่อนที่แตกหักไม่เคลื่อนที่



ภาพที่ 3 การติดสีแกรมและลักษณะเส้นใยของ *Streptomyces mexicanus* 901 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

## 1.2 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของ *S. mexicanus* 901

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ได้แก่ ไซลานเนส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และอะไมเลสจาก *S. mexicanus* 901 พบว่า *S. mexicanus* 901 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้งสามชนิด โดยสามารถผลิตไซลานเนสได้ดีที่สุด มีอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนในสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Hydrolysis capacity; HC) เท่ากับ 3.92 รองลงมาคือ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และอะไมเลส มีอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนในสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Hydrolysis capacity; HC) เท่ากับ 3.00 และ 1.67 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4



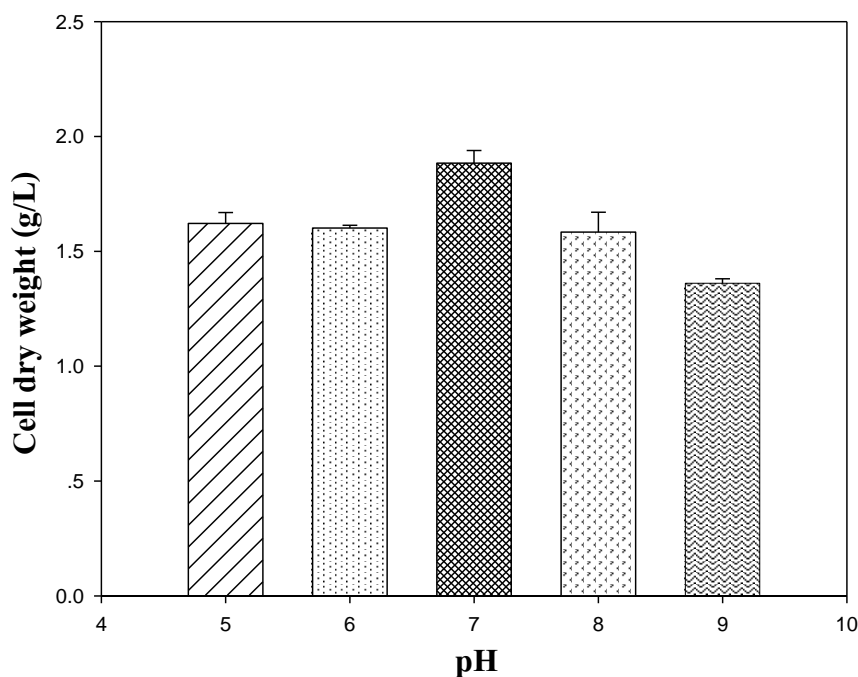
ภาพที่ 4 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ ของ *Streptomyces mexicanus* 901

ก: ไซลานเนส ข: คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ค: อะไมเลส

*S. mexicanus* 901 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้งไซลานเนส คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลส และอะไมเลส จึงสามารถนำมาใช้ในการย่อยสลายพอลิแซคคาไรด์ต่างๆ ได้โดยตรง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย เช่น โอลิโกแซคคาไรด์ กลูโคส หรือไซโลส สามารถนำมาเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตเอทานอล สารให้ความหวาน หรือผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่มีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในขั้นตอนการกำจัดหมึกออกจากกระดาษที่ใช้แล้วในอุตสาหกรรม การผลิตกระดาษรีไซเคิล (recycled paper) ซึ่งการนำจุลินทรีย์มาใช้โดยตรงจะช่วยลดต้นทุนในขั้นตอนการผลิตเอนไซม์ อย่างไรก็ตามการผลิตเพื่อให้ได้เอนไซม์ในปริมาณมากยังเป็นที่ต้องการในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากในบางอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมกระดาษต้องการไซลานเนสที่ปราศจากเซลลูเลสหรือมีเซลลูเลสปนอยู่ในปริมาณต่ำ นำมาใช้ในขั้นตอนการเตรียมเยื่อก่อนการฟอกเยื่อ จากคุณสมบัติของ *S. mexicanus* 901 ที่สามารถผลิตไซลานเนสได้ดีที่สุด ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงให้ความสนใจในการผลิตไซลานเนสจาก *S. mexicanus* 901

### 1.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญของ *S. mexicanus* 901

จากการศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญของ *S. mexicanus* 901 ในสูตรอาหาร ISP2 พบว่า *S. mexicanus* 901 สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 5.0-9.0 โดยเจริญได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.88 กรัมต่อลิตร แสดงดังภาพที่ 5 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Petrosyan *et al.* (2003) พบว่า *S. mexicanus* ที่คัดแยกจากดินในประเทศเม็กซิโกสามารถเจริญได้ในอาหาร minimal medium ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 4.3-8.0 เนื่องจาก *S. mexicanus* 901 เป็นแอคติโนมัยสีทที่เจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกลาง ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจะทำการเลี้ยง *S. mexicanus* 901 ในอาหาร ISP2 ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0



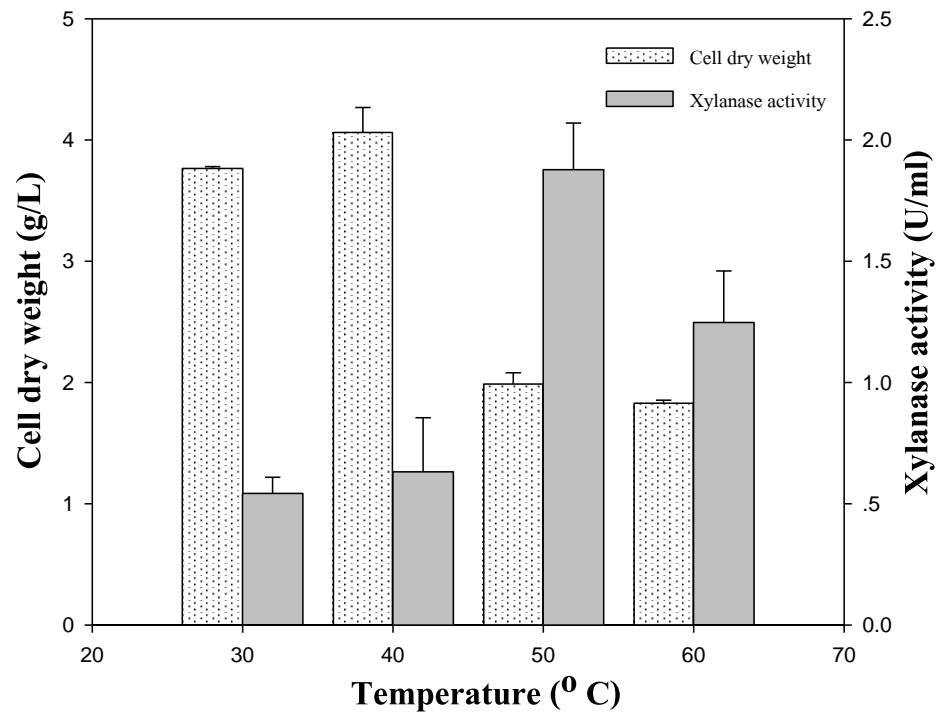
ภาพที่ 5 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญของ *Streptomyces mexicanus* 901

#### 1.4 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตไซลานเนสของ *S. mexicanus* 901

เนื่องจกงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การผลิตไซลานเนสจาก *S. mexicanus* 901 จึงได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญควบคู่ไปกับการผลิตไซลานเนส โดยเลี้ยง *S. mexicanus* 901 ในอาหาร ISP2 ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 นาน 3 วัน พบว่า *S. mexicanus* 901 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.06 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30, 50 และ 60 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.77 กรัมต่อลิตร, 1.99 กรัมต่อลิตร และ 1.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 6

เมื่อพิจารณาการผลิตไซลานเนสที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส พบว่า *S. mexicanus* 901 สามารถผลิตไซลานเนสได้ที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส แม้ไม่มีไซเลนซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำในการผลิตไซลานเนส โดยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส *S. mexicanus* 901 สามารถผลิตไซลานเนสได้ดีที่สุด มีค่ากิจกรรมของไซลานเนสเท่ากับ 1.88 U/ml รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 60, 40 และ 30 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของไซลานเนสเท่ากับ 1.25 U/ml, 0.63 U/ml และ 0.54 U/ml ตามลำดับ แม้ว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส *S. mexicanus* 901 สามารถเจริญได้ดีที่สุด แต่เนื่องจากการผลิต

ไซลานเนสในปริมาณน้อย ดังนั้นในการศึกษาการผลิตไซลานเนสจาก *S. mexicanus* 901 จะทำการทดลองที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 6 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตไซลานเนสของ *Streptomyces mexicanus* 901

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า *S. mexicanus* 901 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Petrosyan *et al.* (2003) พบว่า *S. mexicanus* ที่คัดแยกจากดินในประเทศเม็กซิโกเป็น thermophilic actinomycete สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-55 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังเจริญได้ดีในอาหาร minimal medium ที่มีไซลานเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

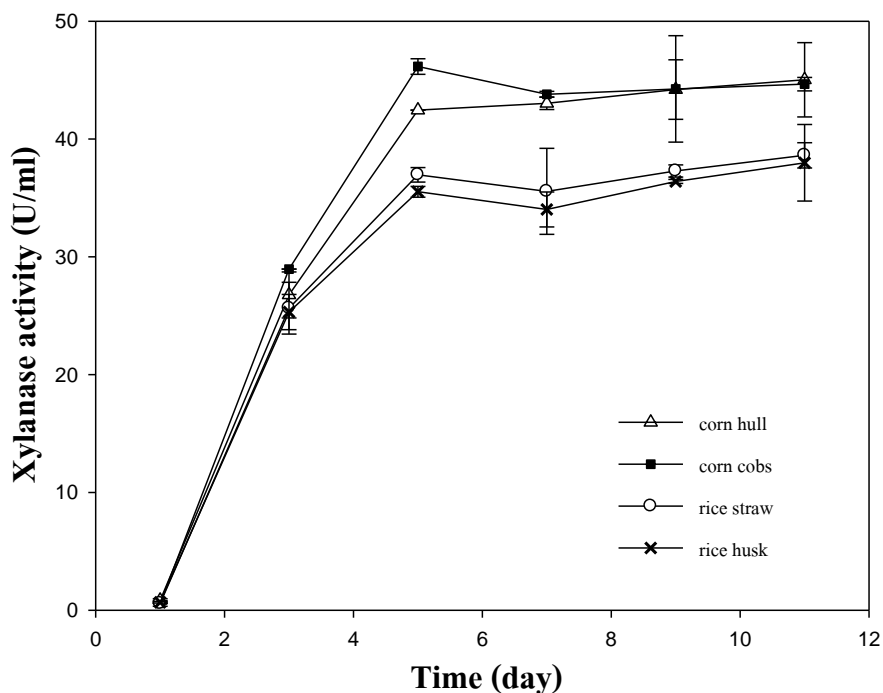
## 2. สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลาเนส

### 2.1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไซลาเนส

จากการเลี้ยงเชื้อ *S. mexicanus* 901 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน พบว่าการผลิตไซลาเนสสูงสุดเมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่ากิจกรรมของไซลาเนสเท่ากับ 46.16 U/ml รองลงมาคือเปลือกข้าวโพด ฟางข้าว และแกลบ มีค่ากิจกรรมของไซลาเนสเท่ากับ 42.45 U/ml, 36.97 U/ml และ 35.53 U/ml ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 7 ซังข้าวโพดสามารถเห็นยวนำการผลิตไซลาเนสได้สูงสุดเนื่องจากมีปริมาณของไซเลนสูงกว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่นและมีปริมาณลิกนินต่ำ (Kuhad *et al.*, 2011)

สอดคล้องกับ การศึกษาของ Ding *et al.* (2004) พบว่า *S. olivaceoviridis* E-86 ผลิตไซลาเนสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ beef peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ค่าพีเอช 6.0 และการศึกษาของ Li *et al.* (2006) พบว่า *Paecilomyces thomophila* สามารถผลิตไซลาเนสได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซังข้าวโพด ความเข้มข้น 4.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

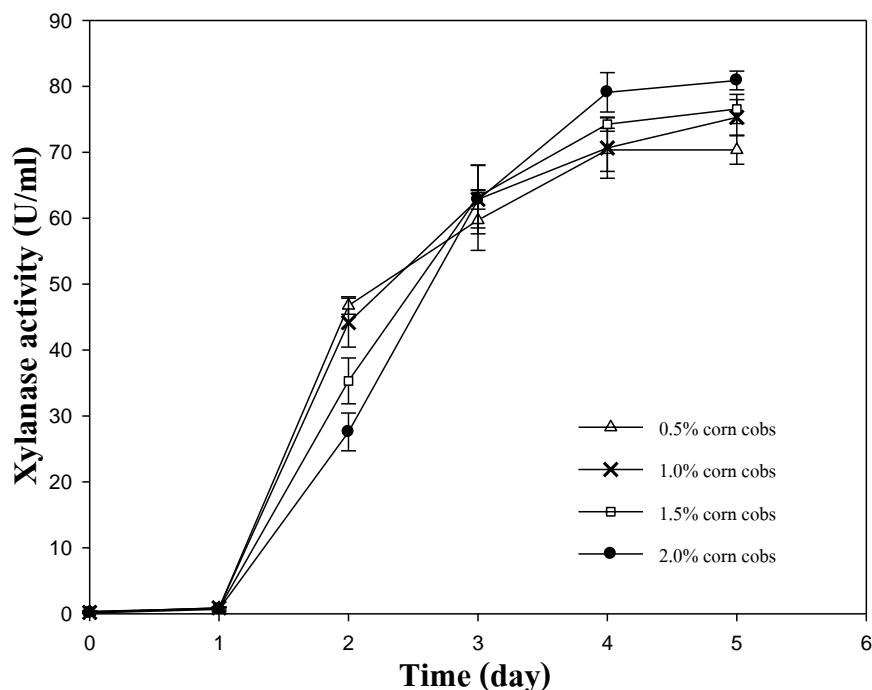
เมื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลาเนสเมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนต่างๆ พบว่าการผลิตไซลาเนส ของทุกแหล่งคาร์บอน ได้แก่ เปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด ฟางข้าว และแกลบ ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงมีการผลิตไซลาเนสในปริมาณน้อย แต่เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้นการผลิตไซลาเนสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และสูงสุด ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นการผลิตไซลาเนสคงที่ เมื่อใช้ซังข้าวโพด ฟางข้าว และแกลบเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนหลังจากวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง การผลิตไซลาเนสยังคงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ระยะเวลาในการผลิตไซลาเนสที่นานมากไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลาเนส เพราะนอกจากจะทำให้เสียเวลาแล้วยังทำให้สิ้นเปลืองพลังงานต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งถ้านำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมจะทำให้มีค่าใช้จ่ายในการผลิตที่สูง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้ระยะเวลาในการผลิตไซลาเนสนาน 5 วัน



ภาพที่ 7 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไซลานเนสจาก *Streptomyces mexicanus* 901

## 2.2 ผลของความเข้มข้นของซังข้าวโพดต่อการผลิตไซลานเนส

เมื่อผลิตไซลานเนสโดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 0.5%-2.0% พบว่าในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง (วันที่ 1-3) *S. mexicanus* 901 สามารถผลิตไซลานเนสที่ความเข้มข้นของซังข้าวโพดต่ำ (0.5% และ 1.0%) ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นสูง (1.5% และ 2.0%) ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงแรกจุลินทรีย์ยังมีปริมาณน้อย ปริมาณของซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นของซังข้าวโพดต่ำจึงเหมาะสมกับปริมาณของจุลินทรีย์ แต่เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น คือในวันที่ 4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยง การผลิตไซลานเนสที่ความเข้มข้นของซังข้าวโพดสูงดีกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ โดยสามารถผลิตไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 80.89 U/ml เมื่อใช้ซังข้าวโพดความเข้มข้น 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอน แสดงดังภาพที่ 8

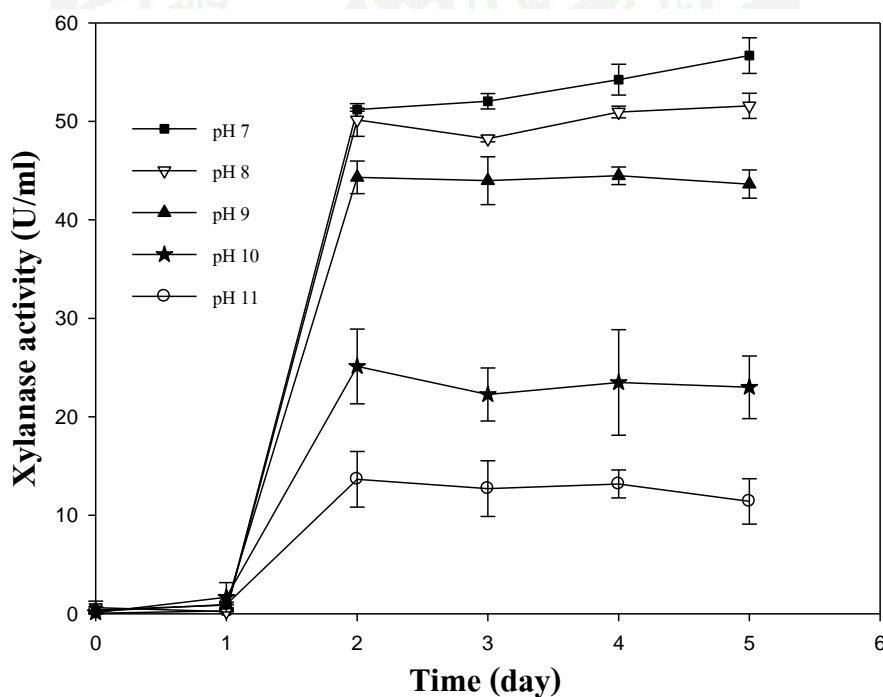


ภาพที่ 8 ผลความเข้มข้นของซังข้าวโพดต่อการผลิตไซลานเนสจาก *Streptomyces mexicanus* 901

ในการผลิตไซลานเนสจากจุลินทรีย์อื่นนอกจากแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมแล้วปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อการเจริญและการเหนี่ยวนำการผลิตไซลานเนส โดยการเหนี่ยวนำการผลิตไซลานเนสของจุลินทรีย์เกิดขึ้นจากแหล่งคาร์บอนที่มีไซเลนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลานเนส ในการเหนี่ยวนำการผลิตไซลานเนสนั้นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดเล็กที่มีอยู่ในซังข้าวโพดจะแพร่เข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์แล้วกระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิตไซลานเนสออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อย่อยไซเลนที่มีโมเลกุลใหญ่ซึ่งไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ให้มีโมเลกุลเล็กลง เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ จากนั้นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์จะผ่านเข้าเซลล์และกระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิตไซลานเนสต่อไป แต่ถ้าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนน้อยเกินไปจะทำให้จุลินทรีย์เจริญและผลิตไซลานเนสได้อย่างไม่เต็มที่ (สันทณีย์, 2541) จึงส่งผลให้ที่ความเข้มข้นของซังข้าวโพดต่ำผลิตไซลานเนสได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้นของซังข้าวโพดสูง

### 2.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตไซลานเนส

จากการเลี้ยง *S. mexicanus* 901 ในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน พบว่า *S. mexicanus* 901 สามารถผลิตไซลานเนสได้ในสภาวะที่มีค่าพีเอชกลางถึงสูง และการผลิตไซลานเนสสูงสุดเมื่อค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 รองลงมาคือที่ค่าพีเอช 8.0 และ 9.0 โดยมีค่ากิจกรรมของไซลานเนสเท่ากับ 56.18 U/ml, 51.58 U/ml และ 43.63 U/ml ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญได้ดีที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 และไซลานเนสที่ผลิตได้นั้นสามารถทำงานได้ดีที่ค่าพีเอช 7.0 และเมื่อค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเพิ่มขึ้นเป็น 10.0 และ 11.0 พบว่าการผลิตไซลานเนสลดลง มีค่ากิจกรรมของไซลานเนสเท่ากับ 23.0 U/ml และ 11.41 U/ml ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 9 สอดคล้องกับการผลิตไซลานเนสจาก *S. cuspidosporus* (Maheswari and Chandra, 2000), *Streptomyces* sp. Ab106 (Techapun *et al.*, 2002) และ *S. thermocarboxydus* subsp. MW8 (Chi *et al.*, 2013) ที่สามารถผลิตไซลานเนสได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 7.0



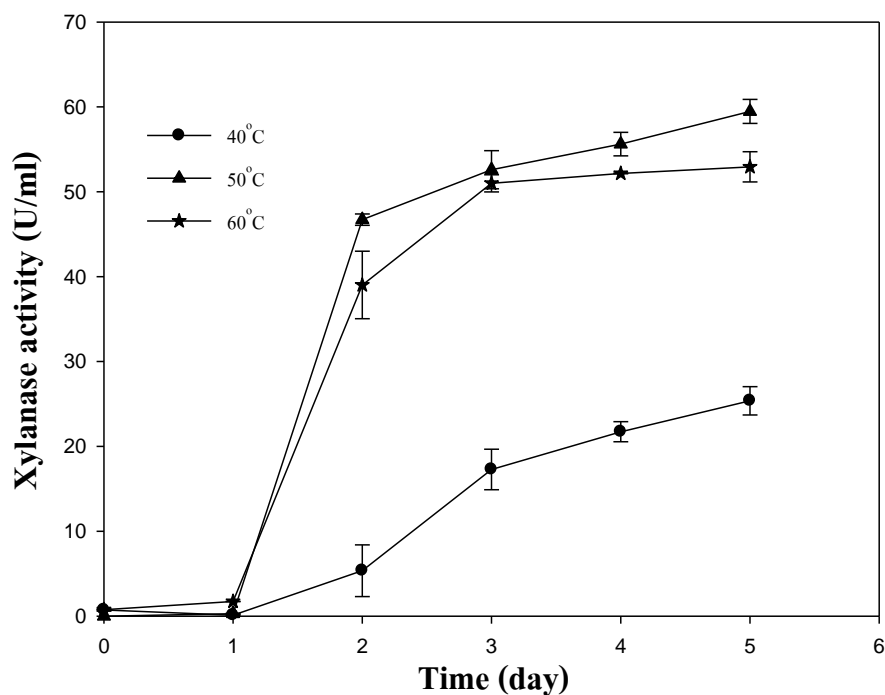
ภาพที่ 9 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตไซลานเนสจาก *Streptomyces mexicanus* 901

## 2.4 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไซลานเนส

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไซลานเนส พบว่า เมื่อเลี้ยง *S. mexicanus* 901 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สามารถผลิตไซลานเนสได้เท่ากับ 25.38 U/ml และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง เป็น 50 องศาเซลเซียส การผลิตไซลานเนสเพิ่มขึ้น มีค่ากิจกรรมของไซลานเนสเท่ากับ 59.47 U/ml แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเป็น 60 องศาเซลเซียส การผลิตไซลานเนสลดลง โดยมีค่ากิจกรรมของไซลานเนสเท่ากับ 52.94 U/ml แสดงดังภาพที่ 10

สำหรับค่ากิจกรรมของไซลานเนสที่ผลิตจาก *S. mexicanus* 901 เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงจาก 40 องศาเซลเซียส เป็น 50 องศาเซลเซียส ทำให้ไซลานเนสที่ผลิตจาก *S. mexicanus* 901 ทำงานได้มากขึ้น เพราะว่าการเพิ่มอุณหภูมิจะเป็นการเร่งให้ไซลานเนสเกิดปฏิกิริยาจับกับสับสเตรทได้มากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเป็น 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของไซลานเนสลดลง เนื่องจากที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นั้นสูงเกินไปส่งผลให้ไซลานเนสที่ผลิตได้เกิดการเสียสภาพ (สัญทัศน์, 2553)

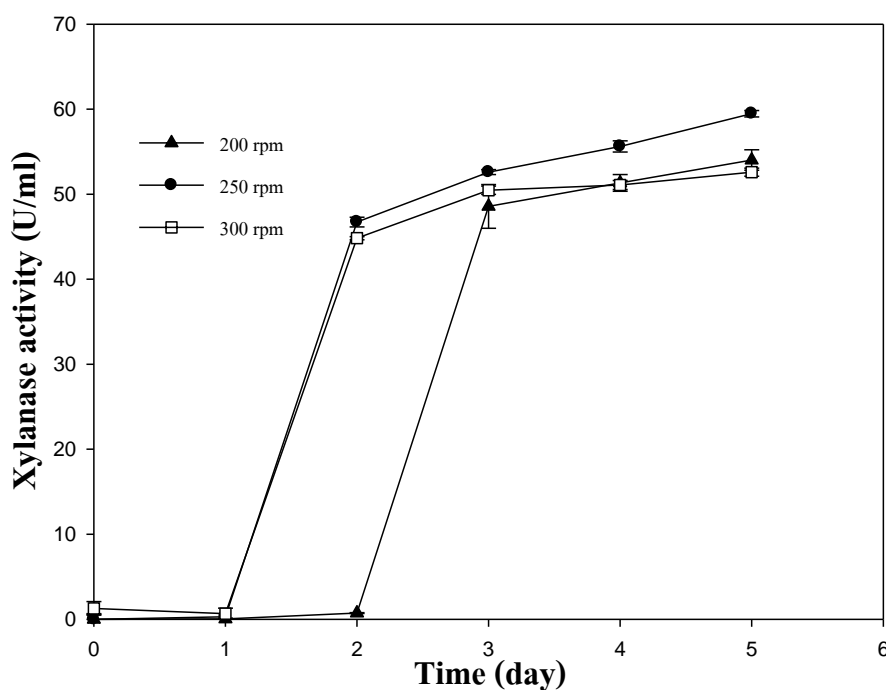
จากผลการทดลองพบว่า *S. mexicanus* 901 สามารถผลิตไซลานเนสได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Keskar *et al.* (1989) พบว่า *Streptomyces* sp. T7 ที่คัดแยกจากดินที่อุดมไปด้วยอินทรีย์วัตถุในประเทศอินเดีย สามารถผลิตไซลานเนสได้ดีเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Tsujibo *et al.* (1992) รายงานว่า *S. thermoviolaceus* OPC-520 สามารถผลิตไซลานเนสได้ดีเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และการศึกษาของ Techapun *et al.* (2003) พบว่า *Streptomyces* sp. Ab106 ผลิตไซลานเนสได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 10 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไซลานเนสจาก *Streptomyces mexicanus* 901

## 2.5 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตไซลานเนส

*S. mexicanus* 901 เป็นแอคติโนมัยซีทที่ต้องการอากาศในการเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์จากการศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตไซลานเนส พบว่าเมื่อเลี้ยง *S. mexicanus* 901 ในสภาวะที่เหมาะสมที่มีการเขย่าเพื่อให้อากาศความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สามารถผลิตไซลานเนสได้เท่ากับ 54.02 U/ml เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 250 รอบต่อนาที สามารถผลิตไซลานเนสได้ดีขึ้น โดยมีค่ากิจกรรมของไซลานเนสเท่ากับ 59.47 U/ml ทั้งนี้อาจเนื่องจากที่ความเร็วรอบในการเขย่าต่ำ (200 รอบต่อนาที) ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักไม่เพียงพอต่อการเจริญและผลิตไซลานเนส แต่เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 250 รอบต่อนาที ทำให้มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักเพิ่มขึ้น *S. mexicanus* 901 มีปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอต่อการเจริญและผลิตไซลานเนส และเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 300 รอบต่อนาที พบว่าการผลิตไซลานเนสลดลง มีค่ากิจกรรมของไซลานเนสเท่ากับ 52.59 U/ml แสดงดังภาพที่ 11 เนื่องจากความเร็วรอบในการเขย่าที่สูงมากอาจส่งผลให้เซลล์ของ *S. mexicanus* 901 เกิดการแตกหักและเจริญได้ไม่ดี ทำให้การผลิตไซลานเนสลดลง



ภาพที่ 11 ผลของความเร็วยรอบในการเขย่าต่อการผลิตไซลานเนสจาก *Streptomyces mexicanus* 901

### 3. การทำไซลานเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน

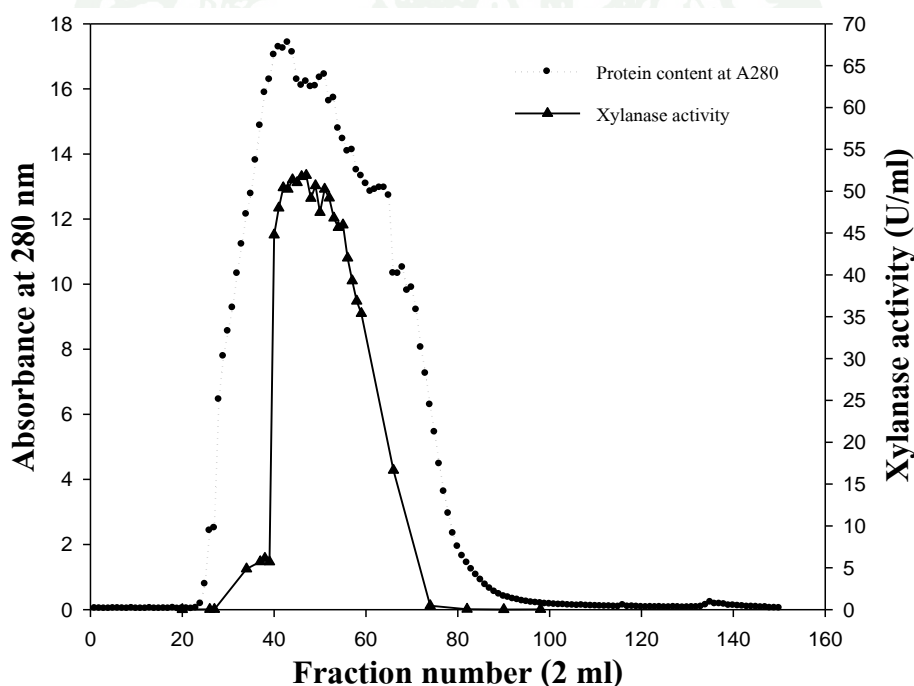
นำไซลานเนสที่ผลิตจาก *S. mexicanus* 901 มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยการนำไซลานเนสมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน จากนั้นนำมาผ่านเจลฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไซลานเนสด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE

#### 3.1 การทำไซลานเนสให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน

นำไซลานเนสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *S. mexicanus* 901 ปริมาตรรวม 1.0 ลิตร มาผ่านเครื่องอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้แผ่นกรองเซลลูโลสขนาด 10 kDa พบว่าไซลานเนสมีความเข้มข้นขึ้น โดยมีค่ากิจกรรมไซลานเนสทั้งหมดเท่ากับ 8,438.36 U มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 13.87 มิลลิกรัม โดยมีค่าแอกติวิตี้จำเพาะเท่ากับ 26.89 U/mg protein ซึ่งไซลานเนสเมื่อผ่านขั้นตอนนี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.11 เท่าของไซลานเนสเริ่มต้น แสดงดังตารางที่ 4

### 3.2 เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

เมื่อนำไซลานเนสที่ผ่านขั้นตอนการทำอัลตราฟิลเตรชันมาแยกไซลานเนสออกจากโปรตีนชนิดอื่นด้วยเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี มีอัตราการไหลเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำตัวอย่างแต่ละหลอดมาวัดปริมาณโปรตีนที่ค่าการดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร และหาค่ากิจกรรมของไซลานเนส พบว่าโปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ปรากฏกราฟออกมาเป็นส่วนเดียวในช่วงหลอดที่ 26-84 แสดงผลดังภาพที่ 12 เมื่อนำมาตรวจสอบค่ากิจกรรมของไซลานเนสจะปรากฏกราฟออกมาเป็นส่วนเดียวอย่างชัดเจน ซึ่งลักษณะกราฟของกิจกรรมไซลานเนสมีความสัมพันธ์กับกราฟของโปรตีน ทำการรวมไซลานเนสในช่วงหลอดที่ 40-60 แล้วนำมาวัดค่ากิจกรรมของไซลานเนสและปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) พบว่ามีค่ากิจกรรมของไซลานเนสทั้งหมดเท่ากับ 7,456.84 U และมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 134.52 มิลลิกรัม ไซลานเนสเมื่อผ่านเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.41 เท่าของไซลานเนสเริ่มต้น (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 12 ปริมาณ โปรตีนและค่ากิจกรรมของไซลานเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเจลฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี

ตารางที่ 4 การทำไซลานเนสจาก *Streptomyces mexicanus* 901 ให้บริสุทธิ์บางส่วน

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude xylanase	1,000	4,757.80	41,173.70	8.65	1.00	100.00
Ultrafiltration	20	313.87	8,438.36	26.89	3.11	20.50
Sephadex G-100	168	134.52	7,456.84	55.43	6.41	18.11

หมายเหตุ - Specific activity หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด (Total activity) ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total protein)

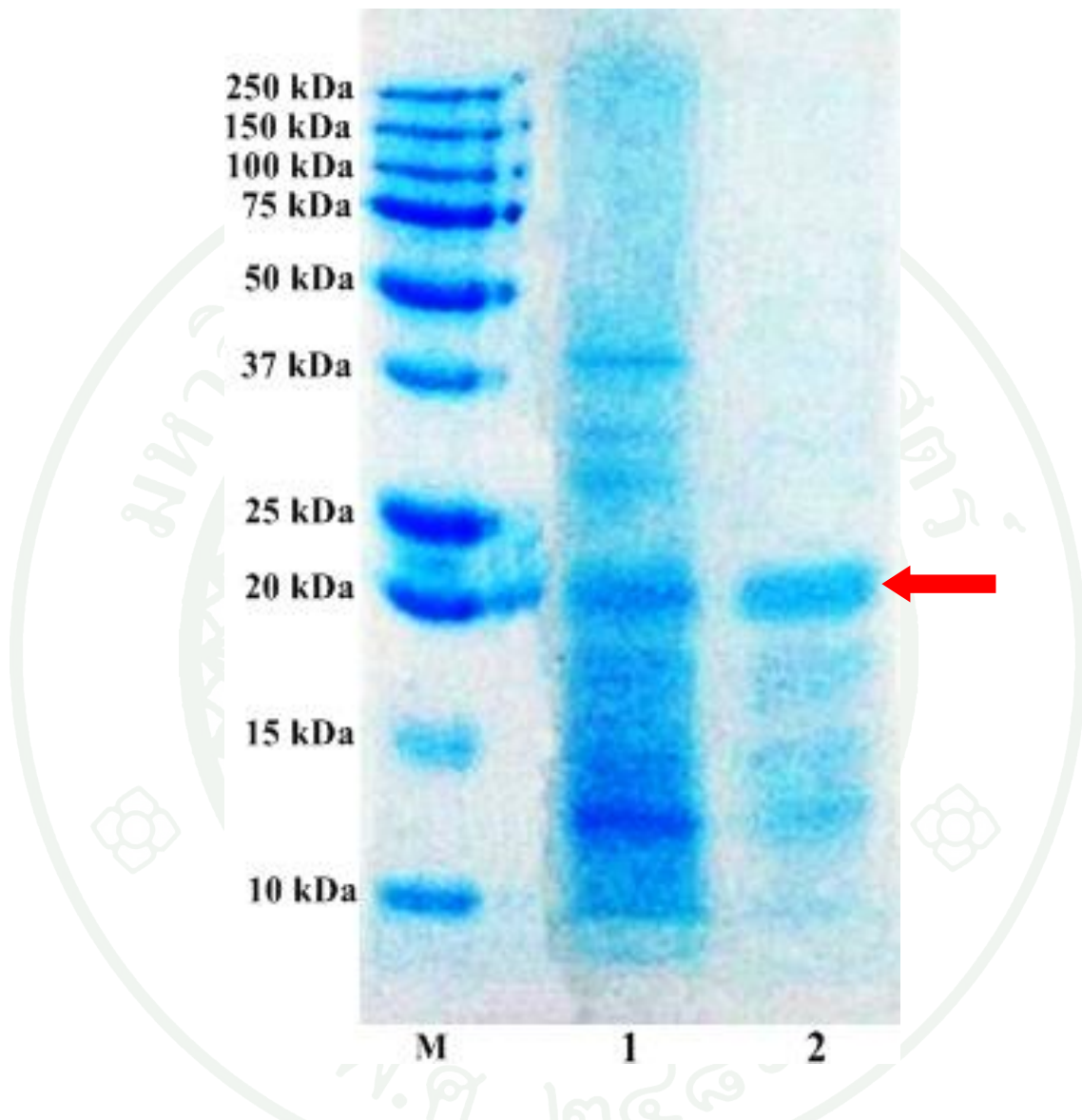
- ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ (Purification; fold) หมายถึง Specific activity ของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ต่อ Specific activity ของ Crude xylanase
- Recovery (%) คือ กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดของ Crude xylanase

### 3.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไซลานเนสด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำไซลานเนสที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของไซลานเนส โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE พบว่าจำนวนแถบโปรตีนที่ติดสีย้อมของไซลานเนสที่ผ่านขั้นตอนอัลตราฟิลเตรชันและเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (ช่องที่ 2) มีจำนวนน้อยกว่าในส่วนของ Crude xylanase (ช่องที่ 1) แสดงดังภาพที่ 13 บ่งบอกว่าไซลานเนสที่ได้มีความบริสุทธิ์ขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับตารางที่ 4 โดยไซลานเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.41 เท่าของไซลานเนสเริ่มต้น

จำนวนแถบโปรตีนของไซลานเนสที่ปรากฏเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล แสดงให้เห็นว่าไซลานเนสที่ได้จากทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20 kDa ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Li *et al.* (2010) ที่พบว่าไซลานเนสที่บริสุทธิ์ซึ่งผลิตจาก *S. rameus* L2001 มีน้ำหนักโมเลกุล 21 kDa และการศึกษา Wang *et al.* (2003) ที่พบว่าไซลานเนส FII-B ที่ผลิตจาก *S. actuosus* A-151 มีน้ำหนักโมเลกุล 20 kDa นอกจากนี้ Lumba and Penninckx (1992)

ศึกษาการทำไซลานเนสให้บริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. EC10 พบว่าไซลานเนส X<sub>1B</sub>, X<sub>2B</sub> มีน้ำหนักโมเลกุล 21 และ 22 kDa ตามลำดับ



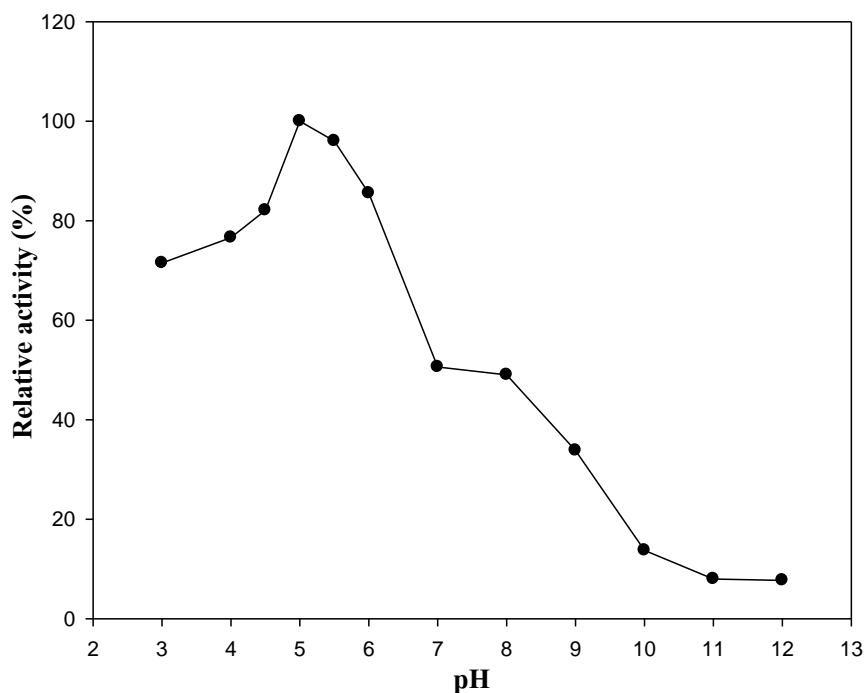
ภาพที่ 13 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไซลานเนสจาก *Streptomyces mexicanus* 901 ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ SDS-PAGE  
 ช่อง M โปรตีนมาตรฐาน  
 ช่อง 1 Crude xylanase  
 ช่อง 2 ไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

#### 4. คุณสมบัติของไชลาเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

##### 4.1 ผลของพีเอชต่อการทำงานของไชลาเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

การศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานของไชลาเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน โดยศึกษาในช่วงพีเอช 3.0-12.0 พบว่ามีค่ากิจกรรมของไชลาเนสสูงในช่วงพีเอช 3.0-6.0 ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) มากกว่า 70.0% และที่ค่าพีเอช 5.0 มีค่ากิจกรรมของไชลาเนสสูงสุดเท่ากับ 99.74 U/ml แต่ในสถานะที่เป็นด่าง (ค่าพีเอช 8.0-12.0) การทำงานของไชลาเนสลดลง โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เพียง 7.71% ที่ค่าพีเอช 12.0 แสดงดังภาพที่ 14 สอดคล้องกับรายงานของไชลาเนสที่ผลิตจาก *S. thermocyaneociolaceus* มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 5.0 (Shin *et al.*, 2009) และไชลาเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. 3137 สามารถทำงานได้ดีที่ค่าพีเอช 5.0-6.0 (Marui *et al.*, 1985) นอกจากนี้ยังใกล้เคียงกับไชลาเนสจาก *S. olivaceoviridis* A1 (Zhang *et al.*, 2003) และ *S. rameus* L2001 (Li *et al.*, 2010) ซึ่งทำงานได้ดีที่ค่าพีเอช 5.2 และ 5.3 ตามลำดับ

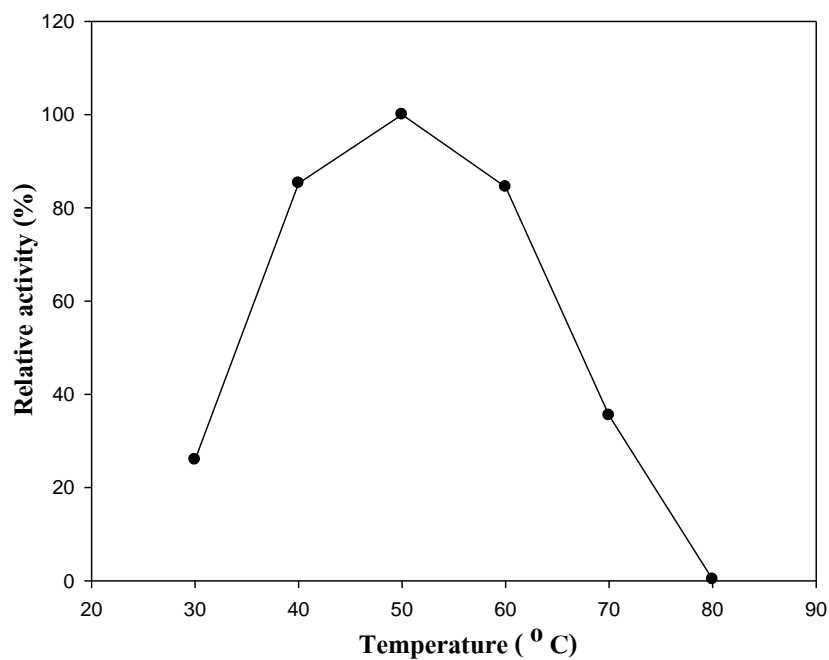
ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปมีผลต่อกิจกรรมของไชลาเนสโดยตรง เนื่องจากค่าพีเอชที่สูงมากหรือต่ำมากจะมีผลทำให้ประจุของไชลาเนสหรือสับสเตรทเปลี่ยนแปลงไปจนไม่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยากัน และยังทำให้บริเวณเร่งในโครงสร้างสามมิติของไชลาเนสเปลี่ยนแปลงไปด้วย ส่งผลให้กิจกรรมของไชลาเนสลดลง (Li *et al.*, 2010) โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอชแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์



ภาพที่ 14 ผลของพีเอชต่อการทำงานของไซลานีสที่บริสุทธิ์บางส่วน

#### 4.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไซลานีสที่บริสุทธิ์บางส่วน

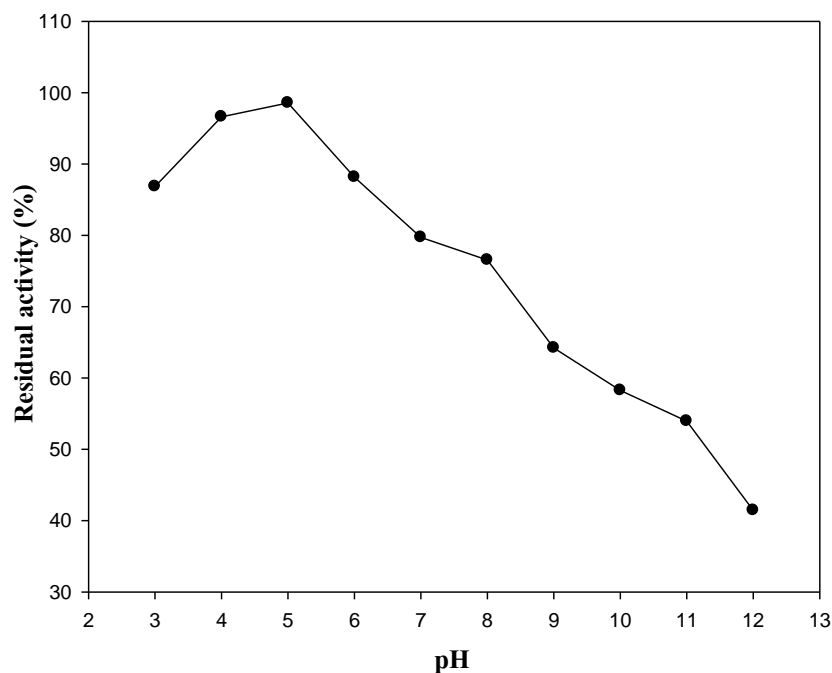
จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไซลานีสที่บริสุทธิ์บางส่วนในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 5.0 พบว่าไซลานีสที่บริสุทธิ์บางส่วนสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์มากกว่า 80.0% แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นความสามารถในการทำงานของไซลานีสลดลงมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เพียง 35.45% และ 0.29% ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 15 ทั้งนี้เพราะว่าการเพิ่มอุณหภูมิทำให้ไซลานีสสามารถย่อยไฮโดรไลซิสได้ดียิ่งขึ้น แต่การเพิ่มอุณหภูมินั้นมีขีดจำกัด เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงจุดที่ทำให้โครงสร้างสามมิติของไซลานีสเกิดการเสียสภาพ ส่งผลทำให้การทำงานของไซลานีสลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของไซลานีสจาก *Streptomyces* spp. SKK1-8 (Meryandini *et al.*, 2006), *Streptomyces* sp. 7b (Bajaj and Singh, 2010) และ *S. thermocarboxydus* subsp. MW8 (Chi *et al.*, 2013) ที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

#### 4.3 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

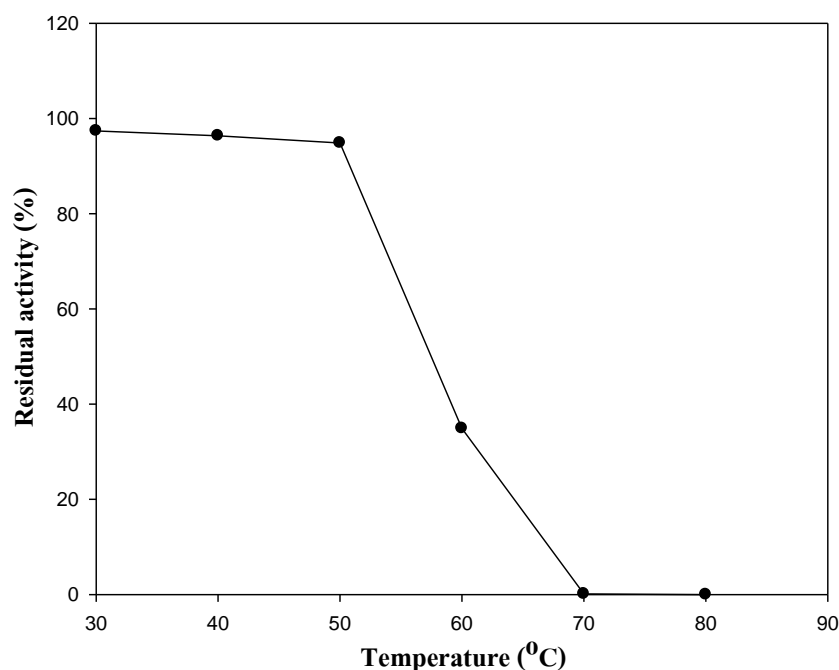
จากการศึกษาผลของพีเอชต่อความเสถียรของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน ในช่วงพีเอช 3.0-12.0 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่า ไซลานเนสมีความเสถียรในช่วงพีเอช 3.0-6.0 มีค่ากิจกรรมของไซลานเนสที่เหลือ (residual activity) มากกว่า 80.0% และมีความเสถียรสูงที่ค่าพีเอช 4.0-5.0 โดยมีค่ากิจกรรมของไซลานเนสที่เหลือสูงกว่า 90.0% แต่ในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูง (9.0-12.0) ความเสถียรของไซลานเนสลดลง ที่ค่าพีเอช 12.0 มีค่ากิจกรรมของไซลานเนสที่เหลือเพียง 41.44% แสดงดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

#### 4.4 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วนที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง พบว่า ไซลานเนสมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของไซลานเนสที่เหลือมากกว่า 90.0% แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นมากกว่า 50 องศาเซลเซียส ความเสถียรของไซลานเนสลดลงอย่างรวดเร็วและสูญเสียกิจกรรมของไซลานเนสทั้งหมดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ขึ้นไป (ภาพที่ 17) เนื่องจากที่สภาวะอุณหภูมิสูงมากๆ จะทำให้โครงสร้างของไซลานเนสเปลี่ยนแปลงไปจึงทำให้ความเสถียรของไซลานเนสลดลง นอกจากนี้ยังทำให้ความสามารถในการจับกันของไซลานเนสและสับสเตรทลดลงด้วย (Daniel, 1996)



ภาพที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไซลानเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

#### 4.5 ผลของไอออนโลหะและสารคีเลตต่อการทำงานของไซลानเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

กระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมมักจะมีไอออนโลหะเจือปนอยู่เพื่อประสิทธิภาพในการนำไปใช้งานจึงได้ศึกษาผลของไอออนโลหะต่อการทำงานของไซลानเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน แสดงดังตารางที่ 5 พบว่า  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  และ  $\text{Fe}^{2+}$  ไม่มีผลต่อการทำงานของไซลานเนสอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับรายงานของไซลานเนสจาก *Streptomyces* sp. CS624 (Mander *et al.*, 2014), *Jonesia denitrificans* (Nawel *et al.*, 2011) และ *Fusarium proliferatum* (Saha, 2002) ที่พบว่าไอออนโลหะเหล่านี้ไม่มีผลต่อการทำงานของไซลานเนส แต่ในสภาวะที่มี  $\text{Mn}^{2+}$  สามารถกระตุ้นการทำงานของไซลานเนสอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 126.67% เมื่อเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมไอออนโลหะ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของไซลานเนสจาก *Jonesia denitrificans* ที่ทำงานได้ดีขึ้นในสภาวะที่มี  $\text{Mn}^{2+}$  (Nawel *et al.*, 2011)

เมื่อศึกษาผลของ สารคีเลต (chelate) ต่อการทำงานของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าการทำงานของไซลานเนสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเติม 10 มิลลิโมลาร์ EDTA มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 87.43% เนื่องจาก EDTA จะเข้าไปจับกับไอออนโลหะใน โมเลกุลของเอนไซม์ทำให้หลุดออกมาทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป เป็นผลทำให้กิจกรรมของไซลานเนสลดลง

จากคุณสมบัตินี้แสดงให้เห็นว่าไซลานเนสที่ผลิตจาก *S. mexicanus* 901 ต้องการไอออนโลหะในการทำงานของเอนไซม์ สอดคล้องกับไซลานเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. CS624 (Mander *et al.*, 2014) และ *S. matensis* DW67 (Yan *et al.*, 2009)

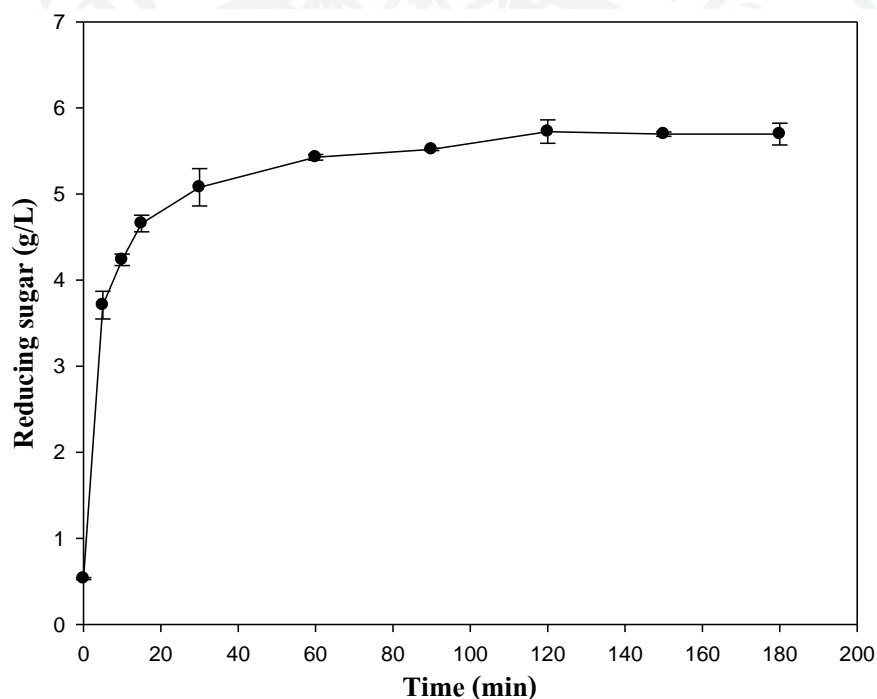
ตารางที่ 5 ผลของไอออนโลหะและสารคีเลตต่อการทำงานของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

ไอออนโลหะ/สารคีเลต	กิจกรรมของไซลานเนส (U/ml)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (%)
ชุดควบคุม	92.71±1.89	100.00 <sup>a</sup>
CaCl <sub>2</sub>	86.28±1.23	93.10 <sup>a</sup>
NaCl	88.02±1.39	94.97 <sup>a</sup>
KCl	86.86±1.39	93.72 <sup>a</sup>
MnSO <sub>4</sub>	117.40±1.89	126.67 <sup>b</sup>
MgSO <sub>4</sub>	89.01±0.98	96.03 <sup>a</sup>
FeSO <sub>4</sub>	88.19±1.48	95.16 <sup>a</sup>
EDTA	81.01±3.61	87.43 <sup>c</sup>

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ  
ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 โดยใช้วิธี Duncan Multiple Range Test

#### 4.6 รูปแบบการย่อยไซเลนของไซลานีสที่บริสุทธิ์บางส่วน

รูปแบบการย่อยไซเลนของไซลานีสที่บริสุทธิ์บางส่วนแสดงดังภาพที่ 18 จะเห็นได้ว่าการย่อยไซเลนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 5 นาทีแรก มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 3.71 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น แต่หลังจากที่เวลา 30 นาที การย่อยไซเลนเริ่มคงที่ สืบเนื่องจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เริ่มจะคงที่ เนื่องจากปริมาณของไซเลนที่ลดลง และเมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้นไซลานีสอาจเกิดการสูญเสียความเสถียรของเอนไซม์ เป็นผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงที่เมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น (Kuhad *et al.*, 1999)



ภาพที่ 18 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปล่อยออกมาที่เวลาต่างๆ ในระหว่างการย่อยไซเลนของไซลานีสที่บริสุทธิ์บางส่วน

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

*S. mexicanus* 901 เป็นแอคติโนมัยสิทที่คิดสังเคราะห์สร้างเส้นใยยาวที่มีการแตกแขนงและอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีการสร้างสปอร์สีขาว เมื่ออายุมากขึ้นสปอร์จะมีสีน้ำตาลเทา และสีของรงควัตถุที่ปล่อยออกมามีสีเหลืองน้ำตาลเกิดขึ้นบนอาหาร นอกจากนี้ยังสามารถผลิตไซลานเนส คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลส และอะไมเลสได้ โดยสามารถผลิตไซลานเนสได้ดีที่สุด มีอัตราส่วนระหว่างส่วนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 3.92 *S. mexicanus* 901 สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 5.0-9.0 โดยเจริญได้ดีที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 และสามารถเจริญได้ในช่วง อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส เนื่องจากงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การผลิตไซลานเนสจึงได้ศึกษาผลของการผลิตไซลานเนสเมื่อไม่มีไซแลนเป็นตัวย่นำในการผลิต พบว่า *S. mexicanus* 901 สามารถผลิตไซลานเนสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

การผลิตไซลานเนสสูงสุดเมื่อเลี้ยง *S. mexicanus* 901 ในอาหาร ISP2 ที่มีซังข้าวโพดความเข้มข้น 2.0% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน สำหรับการผลิตไซลานเนสโดยใช้ซังข้าวโพดซึ่งหาได้ง่ายและราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้ไซแลนที่มีราคาแพงนั้นจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตได้ นอกจากนี้ *S. mexicanus* 901 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมจึงไม่ต้องการการหล่อเย็นมากนักในระหว่างทำการหมัก ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตไซลานเนสลง

การทำไซลานเนสจาก *S. mexicanus* 90 ให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการทำให้ไซลานเนสให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน และจากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี โดยใช้เจล Sephadex G-100 ไซลานเนสที่แยกได้มีความบริสุทธิ์ขึ้น 6.41 เท่า และเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไซลานเนสด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE พบว่าจำนวนแถบโปรตีนของไซลานเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีจำนวนน้อยกว่าแถบโปรตีนของ Crude xylanase บ่งบอกว่าไซลานเนสที่แยกได้มีความบริสุทธิ์ขึ้น

ไซลानเนสที่บริสุทธิ์บางส่วนสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรในช่วงพีเอช 3.0-6.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง กิจกรรมของไซลานเนสถูกกระตุ้นในสถานะที่มี  $Mn^{2+}$  และกิจกรรมของไซลานเนสลดลงในสถานะที่มี EDTA เนื่องจาก EDTA จะเข้าไปจับกับไอออนโลหะในโมเลกุลของเอนไซม์ให้หลุดออกมาส่งผลให้โครงสร้างของไซลานเนสเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไซลานเนสที่ผลิตจาก *S. mexicanus* 901 ต้องการไอออนโลหะในการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วนสามารถย่อยสลายไซแลนได้ดี โดยน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปล่อยออกมาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่หลังจากที่เวลา 30 นาที น้ำตาลรีดิวซ์ที่ปล่อยออกมามีปริมาณคงที่

#### ข้อเสนอแนะ

1. การนำไซลานเนสไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมนั้นต้องการไซลานเนสในปริมาณมาก จึงควรศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตไซลานเนสในระดับดังกล่าว เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้งานได้จริงในอุตสาหกรรม
2. ไซลานเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรสามารถนำมาเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตเอทานอลหรือพลาสติกชีวภาพซึ่งได้รับความสนใจในปัจจุบัน ดังนั้นจึงควรศึกษาความสามารถในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของไซลานเนส เพื่อประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้งาน
3. ไซลานเนสที่ศึกษามีคุณสมบัติที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ เช่น ในอุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ หรืออุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น จึงควรศึกษาการประยุกต์ใช้ไซลานเนสในอุตสาหกรรมต่างๆ เหล่านี้

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ชรินทร์ เตชะพันธุ์. 2542. การทำ โปรตีนและเอนไซม์ให้บริสุทธิ์. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล. 2546. แอคติโนมัยสิทธิ์ที่หายากในดินจากพื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกราช และสถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณจากกลกิจ จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. เอนไซม์ตัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- สันตฉัย รัตติธรรมกุล. 2541. การศึกษาการผลิตและคุณสมบัติของไซลันโกลติกเอนไซม์จาก *Bacillus circulans* B6. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- สัตย์ทัศน์ สินจรรยาศักดิ์. 2553. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลันเนสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* และการใช้ประโยชน์ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Ander, P. 1994. Concluding remarks. **FEMS Microb. Rev.** 13: 387-390.
- Bajaj, B.K. and N.P. Singh. 2010. Production of xylanase from an alkalitolerant *Streptomyces* sp. 7b under solid-state fermentation, its purification, and characterization. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 62: 1804–1818.
- Bastawde, K.B., U.S. Puntambekar and D.V. Gokhale. 1994. Optimization of cellulase-free xylanase production by a novel yeast strain. **J. Ind. Microb. Biotechnol.** 13: 220-224.

- Battan, B., J. Sharma, S.S. Dhiman and R.C. Kuhad. 2007. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. **Enzyme Microb. Technol.** 41: 733–739.
- Battan, B., S.S. Dhiman, S. Ahlawat, R. Mahajan and J. Sharma. 2012. Application of thermostable xylanase of *Bacillus pumilus* in textile processing. **Indian J. Microbiol.** 52(2): 222–229.
- Beg Q. K., M. Kapoor, L. Mahajan and G.S. Hoondal. 2001. Microbial xylanase and their industrial application: review. **Appl. Microb. Biotechnol.** 56: 326-338.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnol.** 3: 286-290.
- Butt, M.S., M.Tahir-Nadeem, Z. Ahmad and M.T. Sultan. 2008. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technol. Biotechnol.** 46: 22-31.
- Chávez, R., P. Bull and J. Eyzaguirre. 2006. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **J. Biotechnol.** 123: 413–433.
- Chi, W.J., J.H. Lim, D.Y. Park, J.S. Park and S.K. Hong. 2013. Production and characterization of a thermostable endo-type  $\beta$ -xylanase produced by a newly isolated *Streptomyces thermocarboxydus* subspecies MW8 strain from Jeju Island. **Process Biochem.** 48: 1736–1743.
- Colina, A., B. Sulbarán de Ferrer, A. C. Aiello, A. Ferrer. 2003. Xylanase production by *Trichoderma reesei* rut C-30 on rice straw. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 108: 715-724.
- Daniel, R.M. 1996. The upper limits of enzyme thermal stability. **Enzyme Microb. Technol.** 19: 74-79.

- Ding, C.H., Z.Q. Jiang, X.T. Li, L.T. Li and I. Kusakabe. 2004. High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. **World J. Microb. Biotechnol.** 20: 7–10.
- Gilbert, H.J. and Hezlewood, G.P. 1993. Bacterial cellulase and xylanase. **J. Gen. Microb.** 139: 187-194.
- Godfrey, T. and West, S. 1996. **Industrial enzymology: The application of enzymes in industry.** MacMillan, New York.
- Grabski, A.C. and T.W. Jeffries. 1991. Production, purification and characterization of  $\beta$ -(1-4)-endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*. **Appl. Environ. Microb.** 57: 987-992.
- He, L., G.F. Bickerstaff, A. Paterson and J.A. Buswell. 1993. Purification and partial characterization of two xylanases that differ in hydrolysis of soluble and insoluble xylan fractions. **Enzyme Microb. Technol.** 15: 13-18.
- Howard, R.L., E. Abotsi, E.L. Jansen van Rensburg and S. Howard. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **Afr. J. Biotechnol.** 2: 602-619.
- Karadzic, I., A. Masui, L.I. Zivkovic and N. Fujiwara. 2006. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. **J. Biosci. Bioeng.** 102(2): 82-89.
- Keskar, S.S., M.C. Srinivasan and V.V. Deshpande. 1989. Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*. **Biochem. J.** 261: 49-55.

- Khalil, A.I. 2002. Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 18: 753–759.
- Ko, C.H., Z.-P. Lin, J. Tu, C.-H. Tsai, C.-C. Liu, H.-T. Chen and T.-P. Wang. 2010. Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis* BL11 and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 64: 13–19.
- Kuhad, R.C. 1993. Lignocellulose Biotechnology: current and future prospects. **Crit. Rev. Biotechnol.** 13 (2): 151-172.
- Kuhad, R.C., M. Manchanda and A., Singh. 1999. Hydrolytic potential of extracellular enzymes from a mutant strain of *Fusarium oxysporum*. **Bioprocess. Eng.** 20: 133-135.
- Kuhad, R.C., R. Gupta and Y.P. Khasa. 2011. Bioethanol production from lignocellulose: an overview, pp. 53-106. In B. Lal and P.M. Sarma, ed. **Wealth from waste: Trends and technologies.** TERI Press, India.
- Kumar, A., R. Gupta, B. Shrivastava, Y.P. Khasa and R.C. Kuhad. 2012. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** 74: 170 - 177.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227(5259): 680-685.
- Li, L., H. Tian, Y. Cheng and Z. Jiang. 2006. Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces themophila*. **Enzyme Microb. Technol.** 38: 780-787.

- Li, X.T., Y.L. She, B.G. Sun, H.L. Song, Y.P. Zhu, Y.G. Lv and H.X. Song. 2010. Purification and Characterization of a cellulase-free, thermostable xylanase from *Streptomyces rameus* L2001 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. **Biochem. Eng. J.** 52: 71-78.
- Lo, Y.C., W.C. Lu, C.Y. Chen, W.M. Chen and J.S. Chang. 2010. Characterization and high-level production of xylanase from an indigenous cellulolytic bacterium *Acinetobacter junii* F6-02 from southern Taiwan soil. **Biochem. Eng. J.** 53: 77-84.
- López, C., A. Blanco and F.I. Javier Pastor. 1998. Xylanase production by a new alkalitolerant isolate of *Bacillus*. **Biotechnol. Lett** 20: 243-246.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Lu, W.J., H.T. Wang, S.J. Yang, Z.C. Wang and Y.F. Nie. 2005. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. **J. Gen. Appl. Microb.** 51: 353-360.
- Lumba, F.L. and M.J. Penninckx. 1992. Characterization of multiple forms of  $\beta$ -xylanase produced by a *Streptomyces* sp. **Appl. Microb. Biotechnol.** 36: 733-738.
- Maheswari, M.U. and T.S. Chandra. 2000. Production and potential applications of a xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*. **World J. Microb. Biotechnol.** 16: 257-263.
- Mander, P., Y.H. Choi, G.C. Pradeep, Y.S. Choi, J.H. Hong, S.S. Cho, J.C. Yoo. 2014. Biochemical characterization of xylanase produced from *Streptomyces* sp. CS624 using an agro residue substrate. **Process Biochem.** 49: 451-456.

- Martín, C., M. Galbe, C.F. Wahlbom, B.Hahn-Hagerdal and L.J. Jonsson. 2002. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb. Technol.** 31: 274-282.
- Marui M., K. Nakanishi and T. Yasui. 1985. Purification and properties of three types of xylanases induced by Methyl  $\beta$ -Xyloside from *Streptomyces* sp. **Agric. Biol. Chem.** 49: 3399-3407.
- Meryandini, A., T. Hendarwin, D. Saprudin and Y. Lestari. 2006. Characterization of xylanase *Streptomyces* spp. SKK1-8. **Indonesian Biol. Soc.** 13: 151-155.
- Millati, R., L. Edebo and M.J. Taherzadeh. 2005. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor* and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose and wood hydrolyzates. **Enzyme Microb. Technol.** 36: 294-300.
- Miller, G.M. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.
- Morjanoff, P.J. and P.P. Gray. 1987. Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. **Biotechnol. Bioeng.** 29: 733-741.
- Moure, A., P. Gullón, H. Domínguez and J.C. Parajo. 2006. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochem.** 41: 1913-1923.
- Nadia, H.N., S.M. Mahdy, W.Gh. Shousha and H.S. Gehad. 2010. Purification and partial characterization of extracellular cellulase free xylanase from *Streptomyces rochei*. **J. Appl. Sci. Res.** 6: 1373-1378.

- Nascimento, R.P., R.R.R. Coelho, S. Marques, L. Alves, F.M. Gírio, E.P.S. Bon and M.T. Amaral-Collaco. 2002. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme Microb. Technol.** 31: 549–555.
- Nawel, B., B. Said, C. Estelle, H. Hakim, F. Duchiron. 2011. Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. **Process Biochem.** 46: 519–525.
- Ohmiya, K., K. Sakka, S. Karita and T. Kimura. 1997. Structure of cellulase and their application. **Biotechnol. Genet. Eng.** 14: 365-414.
- Pandey, A., C.R. Soccol, P. Nigam, V.T. Soccol, L.P.S. Vandenberghe and R. Mohan. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues II: Cassava Bagasse. **Bioresour. Technol.** 74: 81-87.
- Parajó, J.C., H. Dominguez and J.M. Dominguez. 1998. Biotechnological product of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresour. Technol.** 66: 25-40.
- Petrosyan, P., M.G. Varela, A.L. Madrigal, C. Huitrón and M.E. Flores. 2003. *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. **IJSEM.** 53: 269–273.
- Saha, B.C. 2002. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Process Biochem.** 37: 1279–1284.
- Saleem, M., M. R. Tabassum, R. Yasmin and M. Imran. 2009. Potential of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. XTR-10 in biobleaching of wood kraft pulp. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 63: 1119–1124.

- Shin J.H., J.H. Choi, O.S. Lee, Y.M. Kim, D.S. Lee, Y.Y. Kwak, W.C. Kim, and I.K. Rhee. 2009. Thermostable xylanase from *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* for optimal production of xylooligosaccharides. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** 14: 391-399.
- Silva, R.D., D.K. Yim and Y.K. Park. 1994. Application of thermostable xylanases from *Hemicola* sp. for pulp improvement. **J. Ferment. Bioeng.** 77: 109-111.
- Sirisuntornsakul, C., W. Sanpamongkolchai and M. Rodprapakorn. 2013. Screening of thermophilic actinomycetes for xylanase production from paper industry, pp. 516-520. **In The 25<sup>th</sup> Annual Meeting of The Thai Society for Biotechnology and International Conference.** 16-19 October 2013, Thai Society for Biotechnology. Bangkok, Thailand.
- Stefka, A.N., T. Nikoleta and Y. Ljubomira. 2005. Taxonomy of *Streptomyces* sp. strain 3B. **JCC.** 4: 36-42.
- Stone, J.E., A.M. Scallan, E. Donefer and E. Ahlgern. 1969. Digestibility as a simple function of a molecular of a similar size to a cellulase enzyme. **Adv. Chem. Ser.** 95: 219-241.
- Sunna, A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.** 17: 39-67.
- Tanticharoen, M. and S. Cheevadhanarak. 1984. The production of cellulase and xylanase from cellulolytic microorganisms isolated from pineapple anaerobic digester II. Activities studies. **Annual report of ASEAN working group on the management and utilization of food waste material** 493-505.

- Techapun, C., T. Charoenrat, M. Watanabe, K. Sasaki and N. Poosaran. 2002. Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106, using the central composite experimental design. **Biochem. Eng. J.** 12: 99-105.
- Techapun, C., N. Poosaran, M. Watanabe and K. Sasaki. 2003. Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulase-free xylanase production by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab 106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste. **J. Biosci. Bioeng.** 95 (3): 298-301.
- Tsujibo, H., K. Miyamoto, T. Kuda, K. Minami, T. Sakamoto, T. Hasegawa and Y. Inamori. 1992. Purification, properties and partial amino acid sequences of thermostable xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. **Appl. Environ. Microb.** 58: 371-375.
- Tuncer, M., A.S. Ball, A. Rob and M.T. Wilson. 1999. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. **Enzyme Microb. Technol.** 25: 38-47.
- Wang, P., J.C. Mason and P. Broda. 1993. Xylanases from *Streptomyces cyaneus*: their production, purification and characterization. **J. Gen. Microb.** 139: 1987-1993.
- Wang, S.L., Y.H. Yen, I.L. Shih, A.C. Chang, W.T. Chang, W.C. Wu and Y.D. Chai. 2003. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. **Enzyme Microb. Technol.** 33: 917-925.
- Watson, N.E., B.A. Prior and P. Lategan. 1984. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pichia tannophilus*. **Enzyme Microb. Technol.** 6: 451-455.

- Wong, K.K.Y., L.U.L. Tan and J.N. Saddler. 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4 xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microb. Rev.** 52: 305-317.
- Wung, P., J.C. Mason and P. Brodu. 1993. Xylanases from *Sreptomycetes cyaneus*: their production, purification and characterization. **J. Gen. Microb.** 139: 1987-1993.
- Yan, Q., S. Hao, Z. Jiang, Q. Zhai, W. Chen. 2009. Properties of a xylanase from *Streptomycetes matensis* being suitable for xylooligosaccharides production. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** 58: 72-77.
- Yang, C.H., S.F. Yang and W.H. Liu. 2007. Production of xylooligosaccharides from xylans by extracellular xylanases from *Thermobifida fusca*. **J. Agric. Food Chem.** 55: 3955-3959.
- Zhang H.L., B. Yao, Y.R. Wang, W.Z. Zhang and T.Z. Yuan. 2003. Characterization, gene cloning and expression of new xylanase XYNB with high specific activity. **Chin. Sci. Bull.** 48: 761-765.



ภาคผนวก



## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1.1 Nutrient agar (NA) ประกอบด้วย

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

### 1.2 Berg's medium ประกอบด้วย

NaNO <sub>3</sub>	2.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	กรัม
MnSO <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.02	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02	กรัม
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.02	กรัม
Oat spelt xylan	5.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

### 1.3 Yeast extract - malt extract agar (ISP2) ประกอบด้วย

Yeast extract	4.0	กรัม
Malt extract	10.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 7.0

## 1.4 Oatmeal agar (ISP3) ประกอบด้วย

Quaker white oats	20.0	กรัม
Trace salt solution	1.0	มิลลิลิตร
Distilled water	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 7.2

Trace salt solution :

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

## 1.5 Inorganic salts-starch agar (ISP4) ประกอบด้วย

Soluble starch	1.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	2.0	กรัม
Trace salt solution	1.0	มิลลิลิตร
Distilled water	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 7.2

## 1.6 Glucose Yeast Extract Agar (GYE) ประกอบด้วย

Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร
ปรับพีเอชให้เป็น 6.8		

## 1.7 Xylan medium

Xylan	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3	กรัม
$\text{CaCl}_2$	0.3	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

## 1.8 CMC medium

Carboxyl Methyl Cellulose	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

## 1.9 Yeast starch agar

Soluble starch	10.0 กรัม
Yeast extract	2.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
Distilled water	1.0 ลิตร
ปรับพีเอชให้เป็น 7.0	

## 2. บัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ตามระบบ Sorensen buffer

## 2.1 สารละลายซีเตรทบัฟเฟอร์

สารละลาย A: สารละลายกรดซิตริกเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่งกรดซิตริก 10.51 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย B: สารละลายโซเดียมซีเตรทเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่งไตรโซเดียมซีเตรท 14.70 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

## 2.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สารละลาย A: สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย B: สารละลายโมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่งโมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟต 6.81 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

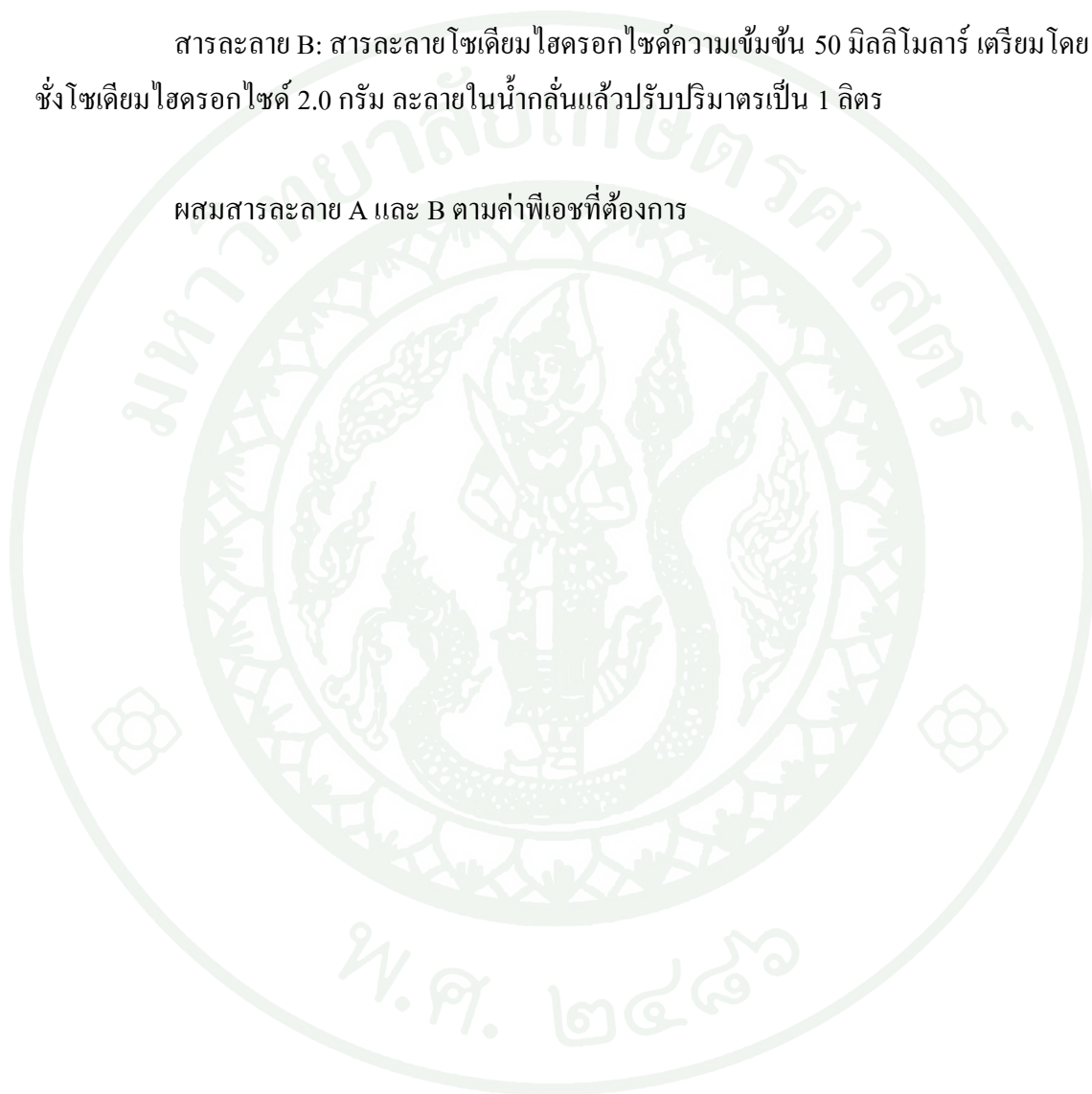
ผสมสารละลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

### 1.3 สารละลาย glycine-NaOH บัฟเฟอร์

สารละลาย A: สารละลาย glycine-NaCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่งไกลซีน 3.753 กรัม และ โซเดียมคลอไรด์ 2.92 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย B: สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ





## 1. การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์

### 1.1 การเตรียมสื่อ

#### 1.1.1 สารละลาย Congo red ความเข้มข้น 0.01%

Congo red	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย Congo red 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

#### 1.1.2 สารละลายไอโอดีน

Crystal's iodine	1.0	กรัม
Potassium iodine	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลาย Crystal's iodine 1.0 กรัม และ Potassium iodine 2.0 กรัม ให้เข้ากันโดยค่อยๆ เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 300 มิลลิลิตร เพื่อให้ผลึกละลายหมด จากนั้นเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา เพื่อป้องกันแสง ถ้าเก็บไว้นานจนสารละลายมีสีเหลืองไม่ควรนำมาใช้

### 1.2 การคำนวณค่า Hydrolysis capacity (HC) คัดแปลงมาจาก Lu *et al.* (2005)

ความสามารถในการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิดรายงานผลอยู่ในรูปของอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนในสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Hydrolysis capacity; HC) โดยคำนวณดังนี้

$$\text{Hydrolysis capacity (HC)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางส่วนในสรอบโคโลนี (มิลลิเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)}}$$

## 2. การวิเคราะห์กิจกรรมของไซลานเนส

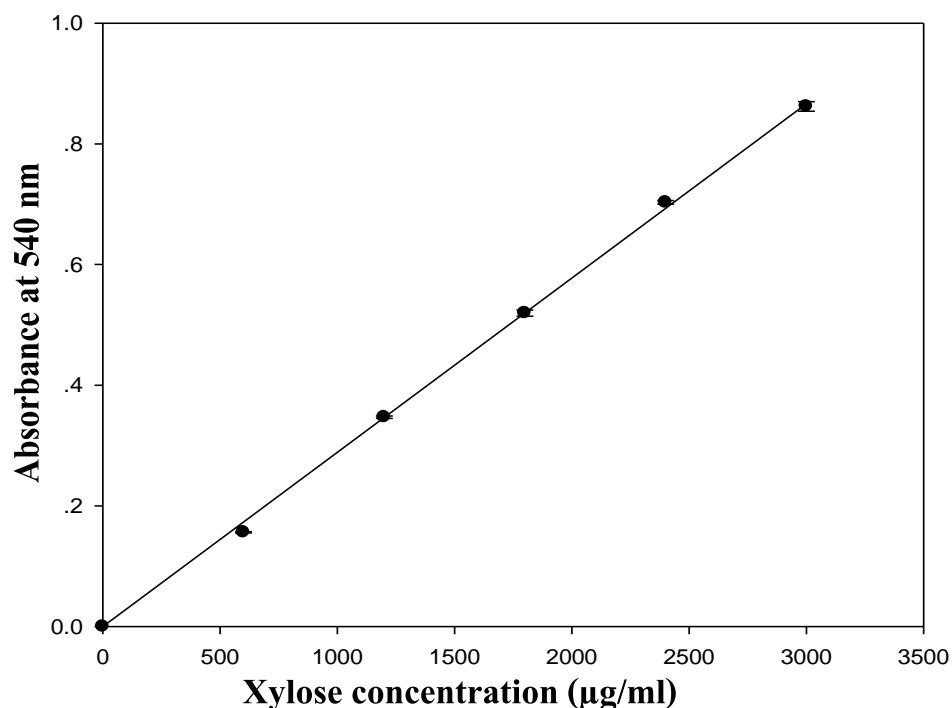
### 2.1 การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) ดัดแปลงมาจาก Miller (1959)

3,5-Dinitrosalicylic acid	20	กรัม
Sodium hydroxide	32	กรัม
Sodium potassium tartrate	600	กรัม

โดยชั่ง 3,5-Dinitrosalicylic acid 20 กรัม ละลายน้ำ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Sodium hydroxide จำนวน 300 มิลลิลิตรลงไป คนให้ใส แล้วค่อยๆ เติม Sodium potassium tartrate จำนวน 600 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 2,000 มิลลิลิตร และเก็บในที่มืด

### 2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส

เตรียมจากการใส่สารละลาย ไซโลสที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.0-3.0 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองซึ่งแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วเติมสารละลาย DNS 0.2 มิลลิลิตร นำไปต้มนาน 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาทันที ด้วยการแช่ น้ำแข็ง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลาย ไซโลส (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

### 2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของไซลานเนส

การวิเคราะห์กิจกรรมของไซลานเนส ดัดแปลงจากวิธีของ Saleem *et al.* (2009) โดยเตรียมสารละลายไซแลนความเข้มข้น 1.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ใช้เป็นสับสเตรท นำสารละลายไซแลนปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมาผสมกับ สารละลายเอนไซม์ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำมาเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปต้มนาน 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ในน้ำแข็งจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เตรียมสารละลาย blank โดยใช้ น้ำกลั่น 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด ทดลองแล้วเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์ตามขั้นตอนข้างต้น และหาค่ากิจกรรมของไซลานเนสโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

#### 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

##### 3.1.1 สารละลาย A

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	2.0	%
$\text{NaOH}$	0.1	โมลาร์

ซึ่ง  $\text{NaOH}$  0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติม  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2.0 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

##### 3.1.2 สารละลาย B

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.5	%
$\text{K}_4\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$	1.0	%

ซึ่ง  $\text{K}_4\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เติม  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

##### 3.1.3 สารละลาย C

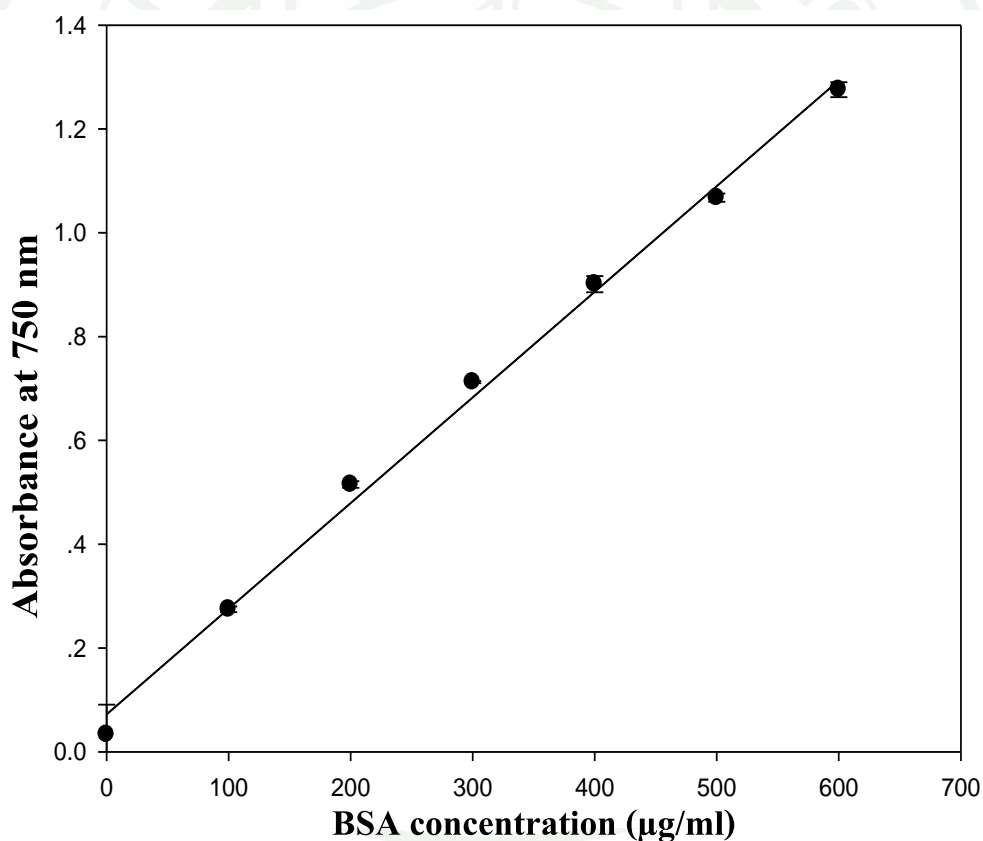
ผสมสารละลาย A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมทุกครั้งก่อนใช้

##### 3.1.4 สารละลาย D

เจือจางสารละลาย Folin-Ciocalteu ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 เตรียมทุกครั้งก่อนใช้

### 3.2 การเตรียมกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

นำใส่สารละลาย bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0-600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย C ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย D ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลาย bovine serum albumin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เตรียมสารละลาย blank โดยใช้ น้ำกลั่น ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นวิเคราะห์ตามขั้นตอนข้างต้น



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

### 3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี ของ Lowry *et al.* (1951) โดยนำตัวอย่างเอนไซม์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย C ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย D ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และหาค่าปริมาณโปรตีน โดยนำค่าการดูดกลืนแสง เทียบกับปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin

## 4. อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE ดัดแปลงจาก Laemmli (1970)

### 4.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

4.1.1 สารละลาย 30.0% Acrylamide/Bis โดยใช้ชุดสำเร็จ (BIO-RAD)

4.1.2 สารละลาย SDS ความเข้มข้น 10.0%: เตรียมโดยชั่ง SDS 10.0 กรัม ละลายในน้ำ ที่กำจัดไอออน (deionized water) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร กวนเบาๆ จนสารละลายใส ปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร

4.1.3 สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8: เตรียมโดยละลาย Tris base 27.23 กรัม ในน้ำที่กำจัดไอออนปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 8.8 ด้วยสารละลาย กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6.0 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 150 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1.4 สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8: เตรียมโดยละลาย Tris base 6.0 กรัม ในน้ำที่กำจัดไอออนปริมาตร 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วยสารละลายกรด ไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6.0 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  ความเข้มข้น 10.0%: เตรียม โดยละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม ในน้ำที่กำจัดไอออน 1 มิลลิลิตร เตรียมทุกครั้งก่อน ใช้งาน

#### 4.1.6 TEMED (N, N, N', N'-tetra ethylene diamine)

4.1.7 สารละลาย Running buffer พีเอช 8.3: เตรียมโดยชั่ง Tris base 30.3 กรัม ไกลซีน 144 กรัม และ SDS 10.0 กรัม ละลายในน้ำที่กำจัดไอออน ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 0 ลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1.8 Sample buffer (SDS reducing buffer) (BIO-RAD): สำหรับการใช้น้ำนำ Sample buffer ปริมาตร 950 มิลลิลิตร มาผสมกับ  $\beta$ -mercaptoethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

#### 4.1.9 สารละลายสี Coomassie blue โดยใช้ชุดสีข้อมสำเร็จ (BIO-RAD)

#### 4.1.10 ชุดโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (10-250 kDa)

### 4.2 การเตรียมเจล (slab gel)

4.2.1 การเตรียมสารละลาย Resolving gel หรือ Running gel โดยผสมสารละลาย 30.0% Acrylamide/Bis ปริมาตร 8 มิลลิลิตร สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลาย SDS ความเข้มข้น 10.0% ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และน้ำที่กำจัดไอออน ปริมาตร 6.8 มิลลิลิตร นำสารละลายไปกำจัดฟองอากาศ (degas) นาน 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 10.0% ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ TEMED ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ให้มีฟองอากาศ นำสารละลายเจลเทลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกของชุดเครื่องมือ ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว

4.2.2 สารละลาย Stacking gel ที่เตรียมโดยผสมสารละลาย 30.0% Acrylamide/Bis ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สารละลาย SDS ความเข้มข้น 10.0% ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำที่กำจัดไอออน ปริมาตร 1.1 มิลลิลิตร นำสารละลายไปกำจัดฟองอากาศ นาน 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 10.0% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ให้มีฟองอากาศ จากนั้นเทสารละลายเจลลงบน Resolving gel ที่แข็งตัว ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทำช่อง (well) สำหรับใส่ตัวอย่างโดยใส่หวี (template comb) ลงบน Stacking gel ทิ้งไว้

จนเจลแข็งตัว นำหัวออกจะเกิดช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง จากนั้นเติม Running buffer ลงใน chamber โดยให้เจลแช่อยู่ในบัฟเฟอร์

#### 4.3 วิธีการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE

นำชุดโปรตีนมาตรฐานและตัวอย่างโปรตีนที่ทราบความเข้มข้นมาเติมด้วย Sample buffer ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 4 นาที ทำให้เย็นลง จากนั้นนำมาใส่ลงในแต่ละช่องโดยใช้ปริมาตร 20-25 ไมโครลิตร โดยใช้กระแสไฟฟ้า 35 มิลลิแอมแปร์ และค่าความต่างศักย์ 180 โวลต์ หยุดกระแสไฟฟ้าเมื่อแถบสีน้ำเงินเคลื่อนที่ลงมาเกือบถึงด้านปลายของ Resolving gel จากนั้นนำแผ่นเจลออกจากชุดเครื่องมือมาย้อมด้วยชุดย้อมสำเร็จ Coomassie blue นาน 50 นาที เทสีย้อมทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำที่กำจัดไอออนจนเห็นแถบที่ของโปรตีนที่ต้องการชัดเจน

#### 5. การหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปั่นเหวี่ยงน้ำหมักที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แยกส่วนใส (supernatant) เพื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นแลนำไปเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที อีกครั้ง เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้ใส่ลงบนแผ่นออลูมิเนียมฟอยล์ที่ทราบน้ำหนักแห้งและนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำแผ่นออลูมิเนียมฟอยล์มาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (desicator) ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังสมการ

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักแผ่นออลูมิเนียมฟอยล์และเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักแผ่นออลูมิเนียมฟอยล์(กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}}$$



ภาคผนวก ค  
ข้อมูลสืบจากการทดลอง

**ตารางผนวกที่ ค1** ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และอะไมเลสของ *Streptomyces mexicanus* 901

เอนไซม์	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)		Hydrolysis capacity (HC)
	ส่วนในสรอบโคโลนี	โคโลนี	
ไซลานเนส	51	13	3.92
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	30	10	3.00
อะไมเลส	25	10	1.67

**ตารางผนวกที่ ค2** ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญของ *Streptomyces mexicanus* 901

ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
5.0	1.621±0.05
6.0	1.601±0.01
7.0	1.884±0.06
8.0	1.584±0.09
9.0	1.361±0.02

**ตารางผนวกที่ ค3** ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตไซลานเนสของ *Streptomyces mexicanus* 901

อุณหภูมิ (°C)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	Xylanase activity (U/ml)
30	3.765±0.02	0.543±0.07
40	4.062±0.21	0.632±0.22
50	1.987±0.09	1.878±0.19
60	1.829±0.03	1.248±0.21

**ตารางผนวกที่ ค4** การผลิตไซลานเนสจาก *Streptomyces mexicanus* 901 โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	Xylanase activity (U/ml)			
	เปลือกข้าวโพด	ซังข้าวโพด	ฟางข้าว	แกลบ
1	0.84±0.14	0.59±0.01	0.57±0.24	0.68±0.07
3	26.77±1.95	28.96±0.00	25.64±2.20	25.32±1.50
5	42.45±0.00	46.16±0.66	36.97±0.62	35.53±0.46
7	43.03±0.53	43.80±0.25	35.60±3.65	34.02±1.48
9	44.20±2.52	44.25±4.52	37.29±0.52	36.40±0.17
11	45.03±3.15	44.66±0.58	38.62±1.07	37.99±3.25

**ตารางผนวกที่ ค5** ผลความเข้มข้นของซังข้าวโพดต่อการผลิตไซลานเนสจาก *Streptomyces mexicanus* 901

เวลา (วัน)	Xylanase activity (U/ml)			
	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
0	0.28±0.14	0.20±0.01	0.36±0.03	0.13±0.03
1	0.85±0.00	0.89±0.02	0.82±0.23	0.66±0.33
2	46.75±1.32	44.17±3.71	35.32±3.48	27.57±2.87
3	59.71±4.60	62.86±5.22	63.27±4.74	62.79±1.41
4	70.37±3.27	70.65±4.58	74.26±1.08	79.10±2.99
5	70.35±2.17	75.30±2.69	76.57±2.21	80.89±1.41

ตารางผนวกที่ ค6 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตไซลานเนสจาก *Streptomyces mexicanus* 901

เวลา (วัน)	Xylanase activity (U/ml)				
	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11
0	0.051±0.07	0.631±0.66	0.378±0.35	0.110±0.10	0.269±0.00
1	0.300±0.01	0.211±0.25	0.872±0.29	1.677±1.49	0.943±0.00
2	51.20±0.16	50.14±1.67	44.32±1.65	25.12±3.80	13.66±2.83
3	52.04±0.78	48.24±0.32	43.98±2.43	22.27±2.69	12.71±2.83
4	54.23±1.56	50.95±0.59	44.48±0.89	23.49±5.36	13.18±1.42
5	56.18±1.81	51.58±1.28	43.63±1.43	23.00±3.18	11.41±2.31

ตารางผนวกที่ ค7 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไซลานเนสจาก *Streptomyces mexicanus* 901

เวลา (วัน)	Xylanase activity (U/ml)		
	อุณหภูมิ 40°C	อุณหภูมิ 50°C	อุณหภูมิ 60°C
0	0.724±0.13	0.0±0.58	0.761±0.05
1	0.115±0.08	0.290±0.06	1.726±0.00
2	5.354±3.05	46.72±0.66	39.02±3.98
3	17.28±2.39	52.60±2.25	50.99±1.01
4	21.73±1.19	55.62±1.38	52.16±0.05
5	25.38±1.67	59.47±1.41	52.94±1.78

**ตารางผนวกที่ ๘** ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตไซลานเนสจาก

*Streptomyces mexicanus* 901

เวลา (วัน)	Xylanase activity (U/ml)		
	200 รอบต่อนาที	250 รอบต่อนาที	300 รอบต่อนาที
0	0.00±0.67	0.00±0.58	1.280±0.80
1	0.036±0.10	0.290±0.03	0.652±0.66
2	0.724±0.05	46.72±0.56	44.82±0.18
3	48.57±2.57	52.60±0.29	50.46±0.49
4	51.33±0.98	55.62±0.65	51.08±0.52
5	54.02±1.20	59.47±0.38	52.59±0.48

**ตารางผนวกที่ ๙** ผลของพีเอชต่อการทำงานของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

pH	Xylanase activity (U/ml)	Relative activity (%)
3.0	71.32±2.57	71.49
4.0	76.40±1.24	76.61
4.5	81.87±0.90	82.08
5.0	99.74±1.62	100.00
5.5	95.74±1.60	96.00
6.0	85.31±1.02	85.54
7.0	50.46±0.82	50.60
8.0	48.89±0.80	49.02
9.0	33.76±6.02	33.80
10.0	13.70±0.91	13.74
11.0	7.98±0.13	8.00
12.0	7.69±0.13	7.71

ตารางผนวกที่ ค10 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

อุณหภูมิ (°C)	Xylanase activity (U/ml)	Relative activity (%)
30	25.59±0.02	25.97
40	84.04±0.92	85.27
50	98.55±0.06	100.00
60	83.25±0.06	84.47
70	34.94±2.68	35.45
80	0.290±0.00	0.294

ตารางผนวกที่ ค11 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

pH	Xylanase activity (U/ml)	Relative activity (%)
ชุดควบคุม	100.89±3.37	100.00
3.0	87.61±4.75	86.84
4.0	97.47±2.38	96.60
5.0	99.435±0.74	98.56
6.0	88.95±0.66	88.16
7.0	80.41±2.65	79.71
8.0	77.22±1.80	76.54
9.0	64.78±1.30	64.21
10.0	58.78±0.72	58.26
11.0	54.43±2.56	53.95
12.0	41.80±2.54	41.44

ตารางผนวกที่ ค12 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

อุณหภูมิ (°C)	Xylanase activity (U/ml)	Relative activity (%)
ชุดควบคุม	93.76±1.49	100.00
30	91.31±7.23	97.38
40	90.34±2.31	96.35
50	88.93±3.16	94.85
60	32.71±0.23	34.88
70	0.140±0.00	0.149
80	0.00±0.00	0.00

ตารางผนวกที่ ค13 การย่อยไซแลนของไซลานเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน

เวลา (นาที)	Reducing sugar (mg/ml)
0	0.533±0.01
5	3.71±0.16
10	4.24±0.07
15	4.66±0.10
30	5.08±0.22
60	5.43±0.03
90	5.52±0.01
120	5.73±0.14
150	5.70±0.03
180	5.70±0.13

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวเพชรสาย ไชบุคดี
วันที่เกิด	7 มิถุนายน 2530
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดกำแพงเพชร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยนเรศวร
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

