



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การคัดแยกแอคติโนมัยสีทชอบอุณหภูมิสูง และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต
เอนไซม์ไคลาเนสจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ

Screening and Optimization for Xylanase Production by Thermophilic
Actinomycete from Paper Industry

نامผู้วิจัย นางสาวชุตินันท์ ศิริสุนทรสกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์มังกร ไรจน์ประภากร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสิ่งนี้ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดแยกแอคติโนมัยซีทชอบอุณหภูมิสูง และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต
เอนไซม์ไคซานเนสจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ

Screening and Optimization for Xylanase Production by Thermophilic Actinomycete from
Paper Industry

โดย

นางสาวชุตินันท์ ศิริสุนทรสกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุตินันท์ ศิริสุนทรสกุล 2557: การคัดแยกแอคติโนมัยสีทชอบอุณหภูมิสูง และศึกษา
สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์
มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D. 91 หน้า

คัดแยกแอคติโนมัยสีทจำนวน 26 ไอโซเลท จากโรงงานกระดาษ จังหวัดราชบุรี โดย
เพาะเลี้ยงบนอาหาร Berg's medium ที่ประกอบด้วยไฮโดรเจน 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน
ฟิเชอ 7.2 นาน 5 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าทั้งหมด 26 ไอโซเลท ปรากฏส่วนไ
รอบโคโลนีเมื่อทำการบ่มนาน 3 วัน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 7 กลุ่มตามลักษณะการสร้างเส้น
ใยและสปอร์ รวมถึงรงควัตถุที่ผลิตออกมา บนอาหารแข็ง ISP2 และ ISP3 จากนั้นนำไปทดสอบ
การผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสในอาหาร ISP2 ที่เติมไฮโดรเจนเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 50 องศา
เซลเซียส ฟิเชอ 7.2 นาน 5 วัน พบว่าไอโซเลท 901 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสสูงสุดเท่ากับ
18.46 หน่วยต่อมิลลิกรัม การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยหาลำดับเบสของยีน 16S
rDNA โดยใช้โปรแกรม Blast พบว่าไอโซเลท 901 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces*
mexicanus ซึ่งมีค่าความเหมือนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเลี้ยง *S. mexicanus* 901 ใน
อาหาร ISP2 พบว่า *S. mexicanus* 901 ผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสได้สูงสุด (24.56 หน่วยต่อมิลลิกรัม) เมื่อ
S. mexicanus 901 เข้าสู่ระยะตาย ในการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า
ซังข้าวโพดซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสได้สูงที่สุด (23.10 หน่วยต่อมิลลิ
กรัม) และที่ความเข้มข้นของซังข้าวโพด 2.0 เปอร์เซ็นต์เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสมาก
ที่สุด (28.14 หน่วยต่อมิลลิกรัม) กากถั่วเหลืองสามารถเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน yeast extract
ได้ดีที่สุด และที่ความเข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสโดยพบกิจกรรม
สูงถึง 28.48 หน่วยต่อมิลลิกรัม และเมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไโซลานเนสที่อุณหภูมิและฟิเชอ
ต่างๆโดยใช้ไฮโดรเจนเป็นสับสเตรท พบว่าเอนไซม์ไโซลานเนสสามารถทำงานได้ดีที่ฟิเชอ 5.5 และ
อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรต่อฟิเชอในช่วงกรด หรือฟิเชอ 3.0-5.0 และสามารถ
ทนอุณหภูมิได้ในช่วงกว้างคือ 30-70 องศาเซลเซียส

Chutinun Sirisuntornsakul 2014: Screening and Optimization for Xylanase Production by Thermophilic Actinomycete from Paper Industry. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Mangkorn Rodprapakorn, Ph.D. 91 pages.

Twenty six isolates of actinomycetes were screened from paper industry wastewater of Ratchaburi Province. Berg's medium was used in isolation contained 0.5% xylan as carbon source at pH 7.2 and 50 °C for primary screening. The result showed positive clear zone of all 26 isolates after incubated for 3 days. Determination of morphological characteristics revealed that 26 isolates were assigned to 7 groups based on their color of spore mass, substrate mycelium and ability to produce soluble pigment on ISP2 and ISP3. Among them, isolate 901 showed the highest xylanase activity up to 18.46 unit/ml when cultivated in ISP2 with 0.5% xylan as carbon source (pH 7.2, 50 °C) at 5 days of incubation. Molecular identification base on 16S rDNA gene sequence revealed that the isolate 901 shared 100% similarity with *Streptomyces mexicanus*. In cultivation also proved that the maximum of xylanase activity (24.56 unit/ml) was observed at the death phase. The effect of agricultural wastes as carbon source and nitrogen source on xylanase production were investigated. The result show corn cob gave high xylanase production (23.10 unit/ml) and found that 2.0% corn cob was verified to be suitable carbon source for xylanase production (28.14 unit/ml). The result also showed soy bean was the most effective nitrogen source which 1.6% soy bean meal provides highest xylanase activity at 28.48 unit/ml. The characterization of xylanase was determined. The result showed optimum pH and temperature for xylanase activity at pH 5.5 and 70 °C, respectively. In addition, xylanase was stable in acid range at pH 3.0-5.0 and could tolerate in wide temperature range at 30-70 °C.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____/____/____

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มังกร โรจน์ประภากร ประธานกรรมการที่
ปรึกษา ที่กรุณาช่วยเหลือและให้คำแนะนำ ตลอดจนการทำวิทยานิพนธ์การศึกษาระดับปริญญาโท
ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก
และ รศ.ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไข
วิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ พี่พิม พี่พี พี่ตาล พี่มูนี่ พี่แพรว พี่บอล พี่ฝ่าย ลูกกบ ทนาย และเพื่อนๆ พี่ๆ
ข้างเคียง ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือ เป็นกำลังใจให้กันและดูแลกันมาโดยตลอด ขอขอบคุณพี่
เจ้าหน้าที่ทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้การช่วยเหลือจนการทำวิจัยวิทยานิพนธ์เสร็จ
สิ้น

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อไพฑูรย์-คุณแม่เสาวลักษณ์ ศิริสุนทรสกุล ที่ให้ทุนสนับสนุนใน
การทำวิจัยวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณเสี่ยคิม และเจ้เคັก และเพื่อนๆ อีกหลายๆ คนที่อยู่เคียงข้างคอย
เป็นห่วงเป็นใย ให้กำลังใจตลอดจนสำเร็จการศึกษา

ชุตินันท์ ศิริสุนทรสกุล

พฤษภาคม 2557

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	28
สรุปและข้อเสนอแนะ	50
สรุป	50
ข้อเสนอแนะ	52
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	53
ภาคผนวก	63
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายบัฟเฟอร์	64
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ทางเคมีและวิธีการทดลอง	68
ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบจากการทดลอง	74
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	91

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	7
2	จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไโกลาเนส	12
3	ปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	14
4	กระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษด้วยสารเคมี	20
5	สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำเสียจาก บริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี	28
6	อัตราส่วนของบริเวณส่วนใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Hydrolytic capacity, HC)	30
7	การจัดกลุ่มแอคติโนมัยสีททั้ง 7 กลุ่มบนอาหาร ISP3 และ ISP2	33
ตารางผนวกที่		
ข1	ความเข้มข้นของน้ำตาลไฮโดส	71
ค1	กิจกรรมของเอนไซม์ไโกลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากเชื้อแอคติโนมัยสีท ที่คัดแยกได้จากน้ำเสียของ บริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี ทั้งหมด 7 ไอโซเลท บนอาหารเหลว ISP2 ที่มีไซแกลน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรท ปมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน	81
ค2	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของแอคติโนมัยสีททั้ง 7 ไอโซเลท ในอาหารเหลว ISP2 ที่มีสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรท	82
ค3	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ <i>S. mexicanus</i> 901 ต่อการสร้างเอนไซม์ ไโกลาเนส เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ที่มีไซแกลน 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็น สับสเตรท	83
ค4	กิจกรรมของเอนไซม์ไโกลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จาก <i>S. mexicanus</i> 901 โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน	84

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค5 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (ยูนิตต่อลิตร) จาก <i>S. mexicanus</i> 901 โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2	84
ค6 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (ยูนิตต่อลิตร) จาก <i>S. mexicanus</i> 901 เมื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆโดยเลี้ยงในอาหาร ISP2	85
ค7 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (ยูนิตต่อลิตร) จาก <i>S. mexicanus</i> 901 เมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2	85
ค8 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสจาก <i>S. mexicanus</i> 901	86
ค9 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสจาก <i>S. mexicanus</i> 901	87
ค10 ความเสถียรของเอนไซม์ไซลานเนสจาก <i>S. mexicanus</i> 901 ที่พีเอชต่างๆ	88
ค11 ความเสถียรของเอนไซม์ไซลานเนสจาก <i>S. mexicanus</i> 901 ที่อุณหภูมิต่างๆ	88
ค12 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจาก <i>S. mexicanus</i> 901 จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 โดยแปรผันแหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)	89
ค13 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจาก <i>S. mexicanus</i> 901 จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 โดยแปรผันความเข้มข้นของซังข้าวโพด ด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)	89
ค14 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจาก <i>S. mexicanus</i> 901 จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจนด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)	90
ค15 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจาก <i>S. mexicanus</i> 901 จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 โดยแปรผันความเข้มข้นของกากถั่วเหลืองด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)	90

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท
2	โครงสร้างทางเคมีของไซแลน
3	โครงสร้างของพืชที่ประกอบด้วยไซแลนและเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลน 1) endo-b-1,4-xylanases (EC 3.2.1.8), 2) b-xylosidase (EC 3.2.1.37), 3) α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), 4) α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), 5) Feruloyl esterase (EC 3.1.1.73), 6) acetylxylan esterase (EC 3.1.1.72), 7) glucuronoyl esterase (EC ยังไม่กำหนด)
4	กระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษด้วยสารเคมี
5	ตัวอย่างบริเวณส่วนไส้ที่เกิดจากเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากไอโซเลท 901 ออกมาย่อยสลายไซแลนบนอาหาร Berg's medium (ซ้าย) และเมื่อนำไปย้อม ด้วยคองโกเรด(ขวา)
6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของไอโซเลท 901 (ซ้าย) และ 1036 (ขวา)
7	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของแอคติโนมัยสีททั้ง 7 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท 901 (◆), 903 (■), 910 (▲), 1004 (●), 1013 (□), 1021 (○) และ 1102 (Δ) เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 โดยมีไซแลนเป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน
8	Phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของไอโซเลท 901
9	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ <i>Streptomyces mexicanus</i> 901 (■) และการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (●) เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 ที่มีไซแลน เป็นสับสเตรท อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน
10	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อศึกษาแหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งทาง การเกษตร คือ ช้างข้าวโพด (●) แกลบ (◆) เปลือกข้าวโพด (▲) ไซแลน (■) และฟางข้าว (—) โดยเลี้ยงในอาหาร ISP2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่อเวลาเมื่อแปรผันความเข้มข้นของซังข้าวโพดเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (▲), 1.0 เปอร์เซ็นต์ (■), 1.5 เปอร์เซ็นต์ (●) และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (◆) ตามลำดับ โดยเลี้ยงในอาหาร ISP2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน	42
12	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนคือ yeast extract (◆), beef extract (■), peptone (▲), soy bean meal (●) และ baker yeast (—) ตามลำดับ โดยเลี้ยงในอาหาร ISP2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน	43
13	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อแปรผันความเข้มข้นของกากถั่วเหลือง 0.4% (■), 0.8% (▲), 1.2% (◆) และ 1.6% (●) ตามลำดับ โดยเลี้ยงในอาหาร ISP2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน	45
14	กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เมื่อศึกษาการทำงาน (◆) และความเสถียร (■) ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก <i>S. mexicanus</i> 901 ที่พีเอช 3.0 ถึง 12.0	47
15	กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เมื่อศึกษาการทำงาน (◆) และความเสถียร (■) ของเอนไซม์ไซลาเนสจาก <i>S. mexicanus</i> 901 ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 90 องศาเซลเซียส	49
ภาพผนวกที่		
ข1	กราฟมาตรฐานการหาปริมาณของน้ำตาลไซโลสโดยวิธี DNS	72
ค1	ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำในบริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี โดยคัดแยกบนอาหาร Berg's medium ที่มีไซแลนเป็นสับสเตรท อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน	75
ค2	ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำในบริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี โดยคัดแยกบนอาหาร Berg's medium ที่มีไซแลนเป็นสับสเตรท อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน	78

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค3 ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของไอโซเลทต่างๆ ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำในบริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี	79
ค 4 ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลทต่างๆ บนอาหารแข็ง ISP3 (ขวา) และ ISP3 (ซ้าย)	80
ค 5 ลำดับเบสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ของแอคติโนมัยสัท ไอโซเลท 901	82

การคัดแยกแอคติโนมัยสีทชอบอุณหภูมิสูง และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ

Screening and Optimization for Xylanase Production by Thermophilic Actinomycete from Paper Industry

คำนำ

ในปัจจุบันกระแสอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมมีมากขึ้น ทำให้โรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ หันมาสนใจการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตทดแทนการใช้สารเคมี โดยเอนไซม์ชนิดหนึ่ง ที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมคือ ไซลานเนส ซึ่งประโยชน์ของไซลานเนสที่นำมาประยุกต์ใช้คือ การฟอกสีเยื่อกระดาษในโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ โดยเอนไซม์ไซลานเนส จะเข้าไปย่อยสลายไซแลน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส เพื่อให้กระดาษมีสีที่ขาวขึ้น (Viikari *et al.*, 1986) การทำให้น้ำผลไม้ใสในอุตสาหกรรมอาหารและเบเกอรี่ โดยเอนไซม์ไซลานเนสจะไปกำจัดส่วนของ arabinoxylan ที่เป็นองค์ประกอบในแป้งออกไป ทำให้เกิดรูปทรงแป้น (Godfrey and West, 1996) การบำบัดน้ำเสียในอุตสาหกรรมทอผ้า (Tanticharoen and Cheevadhanarak, 1984) อุตสาหกรรมอาหารสัตว์จะนำไปผสมในอาหารสัตว์ เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ รวมถึงเอนไซม์ไซลานเนสจะสร้างสารที่มีประโยชน์ต่อจุลินทรีย์เฉพาะถิ่นในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Gilbert and Hazlewood, 1993) การนำเอนไซม์จาก จุลินทรีย์มาใช้ในกระบวนการผลิตอุตสาหกรรมต่างๆ นั้น มีส่วนช่วยในการลดต้นทุนในกระบวนการผลิต เนื่องจากการใช้เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ จะมีต้นทุนที่ต่ำกว่าการใช้สารเคมี

เอนไซม์ไซลานเนสมักพบได้ในจุลินทรีย์ทั่วไป เช่น รา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสีท แต่ในงานวิจัยได้สนใจเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากแอคติโนมัยสีทเนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูง และทนต่อพีเอชและอุณหภูมิในช่วงกว้าง ทำให้เหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม โดยเอนไซม์ไซลานเนสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนจัดอยู่ในกลุ่ม xylanolytic enzymes แบ่งออกได้เป็น 7 ชนิด ตามตำแหน่งของสับสเตรทที่เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (Anwar and Garabed, 1997) โดยไซแลนเป็นวัตถุดิบที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติเนื่องจากเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสที่อยู่ในผนังเซลล์พืช และโครงสร้างทางเคมีของไซแลนประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลดีไซโลส (D-xylose) (Filho, 1998)

ความสำคัญจากประโยชน์ในด้านต่างๆของเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ จึงทำการคัดแยก และศึกษา แอคติโนไมซีต ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสได้ในปริมาณสูง โดยการคัดแยกต้อง คำนึงถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม และสามารถนำวัสดุเหลือทิ้ง ทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งอาหาร ของจุลินทรีย์ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการผลิต อีกทั้งยังช่วย เพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และทำการ หาสภาวะที่เหมาะสม ต่อการทำงานของ เอนไซม์เพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ โดย ข้อมูลต่างๆที่ได้จากการวิจัยไปประยุกต์ใช้ ในอุตสาหกรรมและ ใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อ เพิ่มประสิทธิภาพในการ นำไปใช้ในระดับ อุตสาหกรรมต่อไป

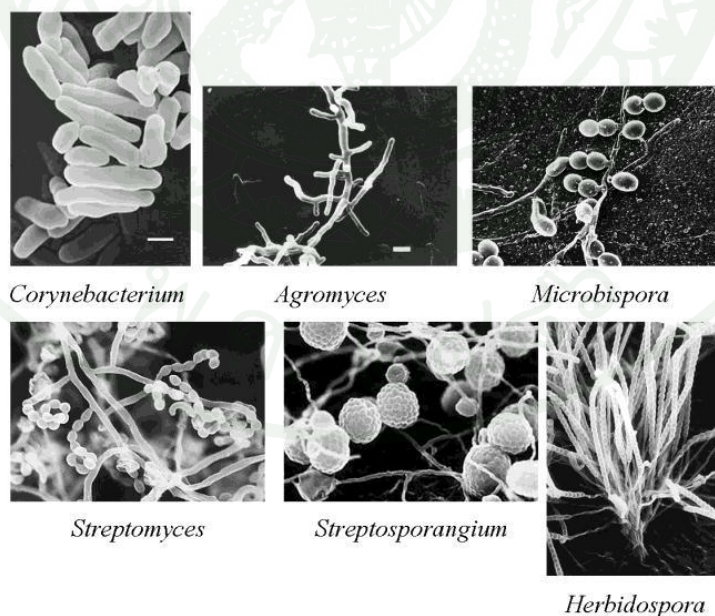
วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกแอคติโนมายส์ที่ชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตเอนไซม์ไโซลเนสจากโรงงานผลิตกระดาษ
2. เพื่อจัดจำแนกชนิดของแอคติโนมายส์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไโซลเนสได้ในปริมาณสูง
3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไโซลเนส

การตรวจเอกสาร

แอกติโนมัยสีท (Actinomycete)

แอกติโนมัยสีทจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งอยู่ในอันดับ (Order) Actinomycetales ประกอบด้วย 8 วงศ์ ได้แก่ *Actinomycetaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Dermatophilaceae*, *Actinoplanaceae*, *Micromonosporaceae*, *Streptomycetaceae*, *Nocardiaceae* and *Frankiaceae* (Kalakoutski and Agre, 1976) แอกติโนมัยสีทจัดเป็นแบคทีเรียที่มีการเจริญของเส้นใยคล้ายกับเชื้อรา แต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าประมาณ 0.5-1.0 ไมโครเมตร (Alexander, 1977) แอกติโนมัยสีทมีการสร้างสปอร์ได้ทั้งบนเส้นใยอาหาร และบางชนิดมีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า โคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) หรือสปอร์ที่ไม่มีถุงหุ้ม (conidia) โดยสามารถแบ่งกลุ่มแอกติโนมัยสีทออกตามรูปร่างและการเรียงตัวของสปอร์ออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว หรือสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายสั้นๆ กลุ่มที่สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว กลุ่มที่สร้างสปอร์อยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ และกลุ่มที่สร้างสปอร์นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด



ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยสีท

ที่มา: Miyadoh (1997)

แหล่งที่พบ

แอกติโนมัยสีทสามารถพบได้ทั้งในน้ำ ปุ๋ยหมัก โคลนตม รากพืช และในดิน โดยส่วนใหญ่แล้วจะพบแอกติโนมัยสีทกลุ่ม *Streptomyces* มากที่สุดคือ ประมาณ 70-90 เปอร์เซ็นต์ อันดับสองคือ *Nocardia* ประมาณ 10-30 เปอร์เซ็นต์ และอันดับสาม คือ *Micromonospora* ประมาณ 1-15 เปอร์เซ็นต์ โดยเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับ พีเอช คุณสมบัติทางกายภาพ และปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน (Alexander, 1977)

ความสำคัญของแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์ที่มีการสร้างสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ไม่ว่าจะเป็น สารต้านมะเร็ง สารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช และสารปฏิชีวนะ (Goodfellow *et al.*, 1988) ในการผลิตสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยสีทจะส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศวิทยาในดิน เนื่องจากเป็นสารที่พบได้ตามธรรมชาติ จึงมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจาก สามารถย่อยสลายได้ง่าย เป็นพิษน้อย ราคาถูกกว่าสารปฏิชีวนะที่ ผลิตจากสารเคมี (Goodfellow, 1985)

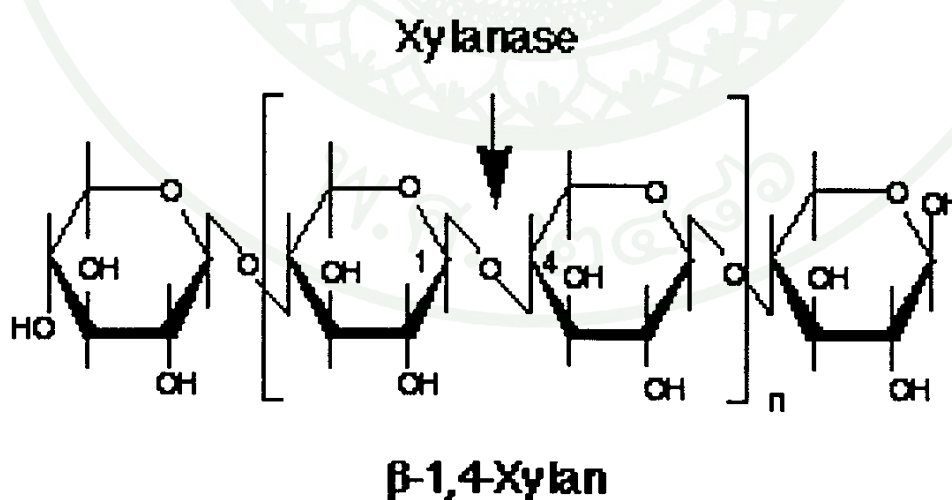
แอกติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยจะพบ *Streptomyces* ได้มากที่สุด รวมถึง *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Nocardia* และ *Microbispora* (Alexander, 1977) และยังพบแอกติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่อุณหภูมิสูง คือ *Thermomonospora* และ *Streptomyces* (Czoch and Mordarski, 1988) นอกจากนี้ยังมีแอกติโนมัยสีทบางกลุ่มที่สามารถย่อยลิกนินได้คือ *Streptomyces* และ *Micromonospora* และแอกติโนมัยสีทที่สามารถย่อยไคตินได้คือ *Streptomyces* และ *Micromonospora* อีกทั้งแอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่เช่น *Streptomyces*, *Nocardia* และ *Micromonospora* สามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนได้ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเพื่อการเจริญ (Alexander, 1977)

Thermomonospora และ *Streptomyces* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ย่อยเซลลูโลส และไซแลน ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ และ *S. griseus*, *S. antibioticus*

และ *Amycolatopsis orientalis* สามารถผลิตเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายไคติน โดยเอนไซม์ที่แอคติโน - มัยส์ผลิตขึ้นมานี้ถือว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมต่างๆเป็นอย่างมาก

ไซแลน (xylan)

ไซแลนเป็นวัตถุดิบที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติเนื่องจากเป็นองค์ประกอบหลักของ เฮมิเซลลูโลสที่อยู่ในผนังเซลล์พืช โครงสร้างทางเคมีของไซแลนประกอบด้วยหน่วยย่อยของ น้ำตาลดีไซโลส (D-xylose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-ไซโลไพราโนซิด (β -1,4-D-xylopyranosyl) ในแต่ละแหล่งของ ไซแลนจะมีการเชื่อมต่อที่แตกต่างกัน (Filho, 1998) ใน สาหร่ายน้ำจืดและสาหร่ายทะเลมีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีที่เชื่อมต่อกัน ด้วยพันธะ β -1,3-D-ไซโลไพราโนซิด (β -1,3-D-xylopyranosyl) (Koki, 1999) ดังภาพที่ 2 ภายใน ผนังเซลล์พืช ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของเซลลูโลสประมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์ ลิกนินประมาณ 15-30 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลสประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ และ เพกตินประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโครงสร้างของพืชจะมีเซลลูโลสเรียงตัวอยู่ในรูปไมโครไฟบริลเพื่อช่วยสร้างความแข็งแรง ส่วนที่ เชื่อมระหว่างผนังเซลล์จะเป็นสารประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ เฮมิเซลลูโลส และเพกติน โดยลิกนิน จะหุ้มอยู่ชั้นนอกสุดของผนังเซลล์เนื่องจากมีลักษณะที่แข็ง (วิเชียร, 2535)



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของไซแลน

ที่มา: วิเชียร (2535)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้ง	องค์ประกอบ (เปอร์เซ็นต์)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
เปลือกข้าวโพด	32	28	13
ชานอ้อย	33	22	14
ชังข้าวโพด	45	35	15
ตอข้าวโพด	35	25	35
ฟางข้าว	35	25	17
ฟางข้าวสาลี	50	30	15
ฟางข้าวไร้ด	49.3	25	14-22
ไม้เนื้อแข็ง	45.8	30.7	20.3
ไม้เนื้ออ่อน	43.8	24.5	29.5
รำข้าว ¹	34	24.5	28.2
รำข้าวสาลี ¹	36	28.3	20.1

ที่มา: Bisaria (1991)

¹Gupta and Madamwar (1997)

เอนไซม์ไซลานเนส (xylanase)

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนจัดอยู่ในกลุ่ม Xylanolytic enzymes แบ่งออกได้เป็น 7 ชนิด ตามตำแหน่งของสับสเตรทที่เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (Anwar and Garabed, 1997)

1. เบต้าไซโลซิเดส (β -D-xyloside xylohydrolase; EC 3.2.1.37) เป็นเอนไซม์จากเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้เป็นเ็กโซไกลโคซิเดสที่พบใน extracellular หรือ cell-bound โดยขึ้นกับระยะเวลาในการเพาะเชื้อและชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีขนาดประมาณ 30-60 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วย sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และมีค่า isoelectric point (pI) ในช่วง 3.3-7.3 โดยสามารถย่อยสลายไซโลไบโอส และ

ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ได้ไซโลส ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงที่ตำแหน่ง terminal non-reducing glycosidic linkage ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะลดลงตามความยาวของไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่เพิ่มขึ้น หรือความเข้มข้นของไซโลสที่เพิ่มมากขึ้นโดยสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้จาก artificial substrates เช่น *p*-nitrophenyl β -D-xyloside ได้ *p*-nitrophenol ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์

2. เอ็กโซไซลานเนส (1,4- β -D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.37) สามารถย่อยสลายไซแลน และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายยาว ทางด้านนอกของสายไปเป็นไซโลไบโอส หรือไซโลเตตระโอส โดยกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเมื่อความยาวของสายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ลดลง หรือถูกยับยั้งด้วยผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นและสามารถย่อยน้ำตาลชนิดอื่นๆ เช่น α -arabinoglucuronoxylan และ methyl- β -D-xylopyranoside ได้

3. เอ็นโดไซลานเนส (1,4- β -D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.8) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในพืช แบคทีเรีย และเชื้อรา มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 11,000-85,000 ดาลตัน และค่า pI ในช่วง 3.6-10.3 เอ็นโดไซลานเนสที่มีค่า pI ในช่วงที่เป็นกรดจะมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ และเอ็นโดไซลานเนสจะทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลนโดยจะเข้าไปทำลายพันธะ β -1,4-glycosidic ที่ด้านในของสาย โดยตำแหน่งของพันธะที่ถูกทำลายจะขึ้นกับความยาวของสาย heteroxylan degree of branch substituents และ subsite pattern of hydrolase ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นจะเป็นลำดับของไซโลโอลิโกแซคคาไรด์จากนั้นจะถูกเบต้าไซโลซิเดส ย่อยจนได้เป็นไซโลส โดยเอนไซม์เอ็นโดไซลานเนสยังแบ่งออกได้ 2 ชนิดคือ ชนิดที่ย่อยไซแลนที่มี branch chain และไม่มี branch chain

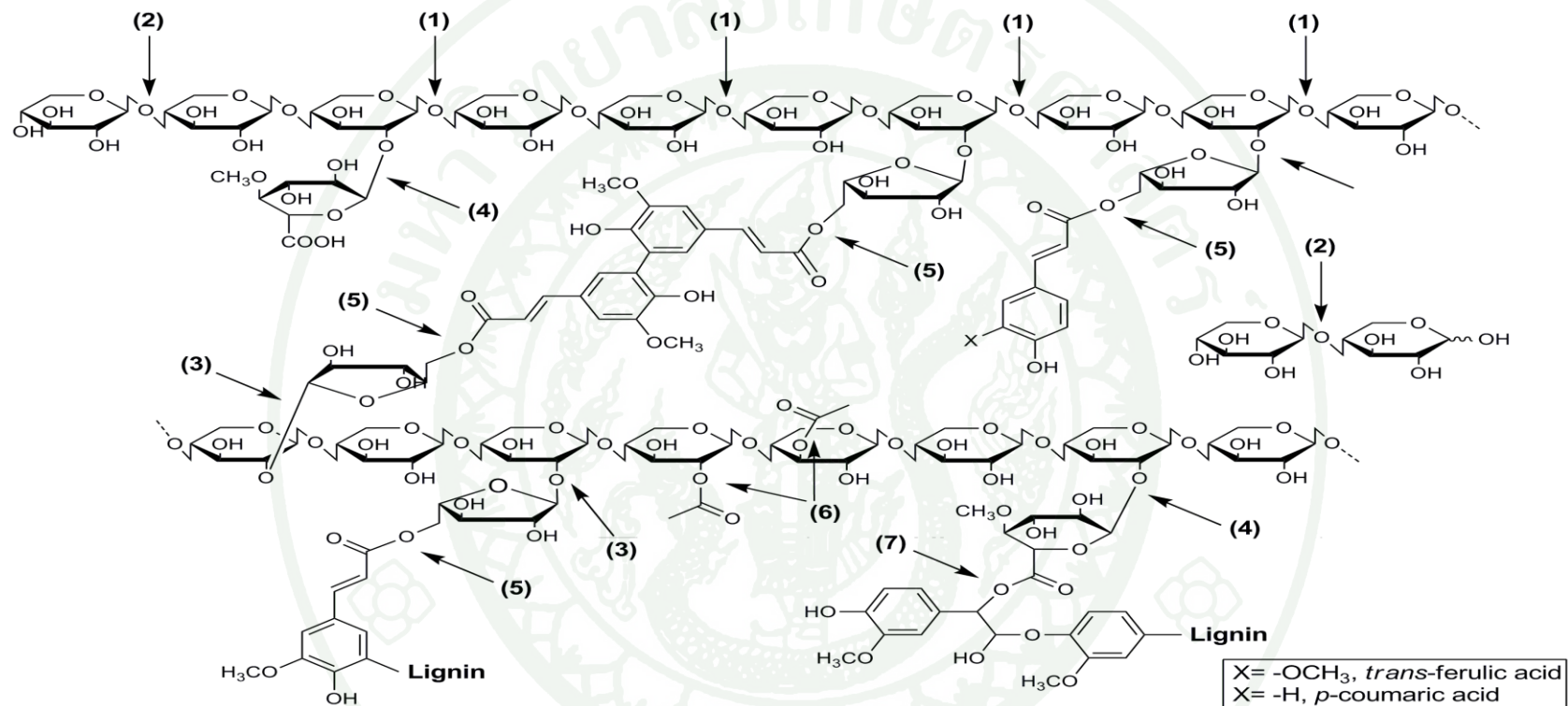
4. อะซิติกเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์พบได้จาก เชื้อราและแบคทีเรีย โดยเอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะ O-acetyl residues ในส่วนที่เป็น backbone ของไซแลนใน acetylxylan ที่ตำแหน่ง C2 และ C3 จะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นกรดอะซิติกและสายพอลิเมอร์ของไซโลส ซึ่งสามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ได้โดยใช้ artificial substrate เช่น *p*-nitrophenyl acetate, 4-methylumbelliferyl acetate หรือ α -naphthyl acetate

5. อะราบินโนฟูรานไคติเดสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากพืช แบคทีเรีย และเชื้อรา เป็น monomers หรือ dimeric, tetrameric และ octameric โดยมีขนาดใหญ่กว่า 495 กิโลดาลตัน และมีค่า pI อยู่ในช่วง 2.5-9.3 สามารถย่อยพันธะ 1,3- α -L-arabinofuranosyl และ 1,5- α -L-arabinosyl ของ arabinoxylan ให้อะราบินโนสและสายพอลิเมอร์ของไซโลส โดยจะทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ artificial substrate เช่น *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside (pNPA) arabinan arabinogalactae type I และ II polymeric arabinoxylan หรือ arabinose-substituted xylo-oligosaccharides โดยจะทำลายที่ตำแหน่ง α -1,2- α -1,3- หรือ α -1,5- ซึ่งเชื่อมกันกับ arabinose substitute ได้อะราบินโนส

6. กลูคูโรนิเดสผลิตได้จากแบคทีเรียและเชื้อรา โดยมีขนาดโมเลกุลประมาณ 366 กิโลดาลตัน และค่า pI อยู่ในช่วง 2.5 และ 3.0 โดยจะเข้าไปสลายพันธะ α -1,2 ระหว่างกรดกลูคูโรนิก และไซโลส ของ 2-O-(4-methyl- α -D-glucopyranosyluronic acid) xylobiose หรือ larchwood xylan ให้ 4-O-methylglucuronic acid และได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส และสามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ได้จาก thin-layer chromatography (TLC) หรือ high performance liquid chromatography (HPLC) หรือ gas chromatography (GC)

7. Phenolic acid esterases เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ ระหว่าง arabinose side chain และ ferulic acid ในไซแลนได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็น ferulic acid

จากการจัดกลุ่มของเอนไซม์ไซแลเนสนี้พบว่าเอนไซม์ อะซิติกเอสเทอเรส อะราบินโนฟูรานไคติเดส กลูคูโรนิเดส และ Phenolic acid esterases เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลนที่ตำแหน่ง side chain ที่อยู่ในพืช ซึ่งภายในโครงสร้างของพืชจะมีลิกนินเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ไซแลเนสย่อยสลายพันธะต่างๆ จะทำให้ลิกนินหลุดออกจากโครงสร้างของไซแลน ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างของพืชที่ประกอบด้วยไซลันและเฮนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซลัน 1) endo--1,4-xylanases (EC 3.2.1.8), 2) b-xylosidase (EC 3.2.1.37), 3) α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), 4) α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), 5) Feruloyl esterase (EC 3.1.1.73), 6) acetylxyloxy esterase (EC 3.1.1.72) และ 7) glucuronoyl esterase (EC ยังไม่กำหนด)

ที่มา: Evangelos *et al.* (2557)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

รา (fungi)

ราส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบ extracellular (Eriksson and Winell, 1968) และเจริญได้ดีที่พีเอชต่ำ ส่วนมากจะศึกษา *Trichoderma* spp. และ *Aspergillus* spp. (Wong et al., 1988) และยังมีเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆ อีกเช่น ยีสต์ในตระกูล *Trichosporon* และ *Cryptococcus* (Tan et al., 1987) ในดินส่วนใหญ่จะพบเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งแตกต่างกันตามสภาพดิน และส่วนใหญ่เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มักจะพบใน ดินที่มีการทับถมกันของอินทรีย์วัตถุ ซึ่งมีอุณหภูมิค่อนข้างสูง Charest et al. (2004) พบว่าที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะพบเชื้อราเป็นจำนวนมากแต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะไม่พบเชื้อราเลย

แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสส่วนใหญ่จะเป็น *Bacillus* spp. โดยเอนไซม์ ไซลาเนสที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมานี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีมวลโมเลกุลต่ำกว่า 30 กิโลดาลตัน และ กลุ่มที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดาลตัน ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจะ แปรผันตามค่า pI โดยทั่วไปค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากแบคทีเรียมีค่าสูง กว่าเชื้อราเล็กน้อย (Okazaki et al., 1985) และแบคทีเรียในกลุ่มนี้ยังสามารถสร้างสปอร์ได้ เช่นเดียวกับราแต่ต้องเจริญในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *Clostridium* sp. (Katz and Reese, 1968) ซึ่งในปัจจุบันการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากแบคทีเรียเป็นที่นิยมมากกว่าเนื่องจากสามารถ ควบคุมกระบวนการผลิตได้ง่ายและมีความปลอดภัยมากกว่าเชื้อรา

แอกติโนมัยสีท (Actinomycetes)

แอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่มีการเจริญเหมือนเชื้อรา ต้องการอากาศในการเจริญสูง แต่มีอัตราการเจริญเติบโตได้ช้ากว่าเชื้อราและแบคทีเรีย แอกติโนมัยสีทเจริญได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง และอุณหภูมิ 65-75 องศาเซลเซียส (Tuomela *et al.*, 2000) เชื้อแอกติโนมัยสีทมีความสามารถในการย่อยสลายอินทรีย์สาร เช่น เซลลูโลส ลิกนิน และไคติน รวมถึงโปรตีนต่างๆ ที่อยู่ในกองปุ๋ยหมัก อีกทั้งยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ เพื่อทำลายเชื้อโรคในพืช และรวมถึงสภาพแวดล้อมในกองปุ๋ยหมักที่อุณหภูมิสูง จึงส่งผลดีต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค และทำลายไข่ของแมลงศัตรูพืชได้อีกด้วย (Jan and Chen, 2003)

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติก

ชนิด	สายพันธุ์จุลินทรีย์	ที่มา
แบคทีเรีย	<i>Aeromonas caviae</i>	Kubata <i>et al.</i> , 1995
	<i>Bacillus alcalophilus</i> *	Rius and Loren, 1998
	<i>Bacillus polymyxa</i> *	Morales <i>et al.</i> , 1993
	<i>Bacillus circulans</i> *	Qureshy <i>et al.</i> , 2000
	<i>Bacillus fermus</i> *	Tseng <i>et al.</i> , 2002
	<i>Bacillus subtilis</i>	Sa-Pereira <i>et al.</i> , 2002
	<i>Cellulomonas fimi</i>	Stalbrand <i>et al.</i> , 1998
	<i>Cellulomonos pachnodae</i>	Cazemier <i>et al.</i> , 1999
	<i>Clostridium</i> sp.	Alexander, 1997
	<i>Corynebacterium</i> sp.	Alexander, 1997
	<i>Cytophange</i> sp.	Alexander, 1997
	<i>Erwinia Chrysanthemi</i>	Hurlbert and Preston, 2001
	<i>Polyangium</i> sp.	Alexander, 1977
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Alexander, 1977

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชนิด	สายพันธุ์จุลินทรีย์	ที่มา
แบคทีเรีย	<i>Sporocytophage</i> sp.	Alexander, 1977
	<i>Thermotoga maritime</i>	Winterhalter and Liebl, 1995
	<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	Shao <i>et al.</i> , 1995
	<i>Vibrio</i> sp.	Alexander, 1977
รา	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Li <i>et al.</i> , 2000
	<i>Aspergillus niger</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2002
	<i>Aspergillus fischeri</i> *	Chandra and Chandra, 1995
	<i>Acrophialophora nainiana</i>	Salles <i>et al.</i> , 2000
	<i>Chaetomium thermophile</i>	Ganji <i>et al.</i> , 1989
	<i>Cephalosporium</i> sp.*	Kang <i>et al.</i> , 1996
	<i>Fusarium oxysporum</i> *	Kang <i>et al.</i> , 1996
	<i>Penicillium</i> sp.	Godfrey <i>et al.</i> , 1996
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Singh <i>et al.</i> , 2000
	<i>Talaromyces</i> sp.	Godfrey <i>et al.</i> , 1996
แอคติโนมัยซีต	<i>Micromonospora</i> sp.	Alexander, 1977
	<i>Nocardia</i> sp.	Alexander, 1977
	<i>Streptomyces</i> sp.	Beg <i>et al.</i> , 2000
	<i>Streptomyces lividans</i>	Ducros <i>et al.</i> , 2000
	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Alexander, 1977
	<i>Thermomonospora curvata</i>	Alexander, 1977

หมายเหตุ: (*) จุลินทรีย์ที่ชอบต่ำ

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไโซลเนส

1. อาหาร

1.1 แหล่งคาร์บอน

ในการผลิตเอนไซม์ไโซลเนสสามารถใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้ไซแลน เช่น ข้าวฟ่าง รำข้าวสาลี เปลือกข้าวโพด แกลบ ชังข้าวโพด และซีลี้อย เป็นต้น ซึ่งแต่ละปีประเทศไทยมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งมีองค์ประกอบของ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งล้วนแต่เป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้มากมาย เช่น โรงงานกระดาษ (Ander, 1994) โรงงานอาหารสัตว์ (Gilbert and Hazlewood, 1993) อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (Suurnakki *et al.*, 1997) และโรงงานทอผ้า (Godfrey and West, 1996)

ตารางที่ 3 ปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ชนิด	วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	ปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (ตัน)
ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์	ต้นและใบ	21,120.59
	ชังและเปลือก	4,508.89
ถั่วลิสง	เปลือก	265.92
ถั่วเหลือง	ต้นและใบ	54
มันสำปะหลังโรงงาน	ต้นและใบ	920.97
	เหง้า	1,227.96
อ้อยโรงงาน	ยอด	2,484
	ชานอ้อย	3,726
ข้าว	แกลบ	6,518.66
	ฟางข้าว	33,726.98
ลำไย	กิ่งและก้าน	153
	เปลือกและเมล็ด	79.56

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชนิด	วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	ปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (ตัน)
กาแฟ	เปลือกและกะลา	36
ยางพารา	กิ่งและก้าน	318
	อื่นๆ	165.36

ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (2544)

ดุษณี (2549) พบว่าเมื่อมีการเลี้ยงเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 โดยนำฟางข้าวมาเป็นแหล่งคาร์บอนจะสามารถผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสได้สูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 236 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ต่อมา Leartslarus *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสโดยใช้ ชานอ้อย ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และรำข้าว พบว่า *Bacillus firmus* K-1 สามารถใช้เปลือกข้าวโพดได้ดีที่สุด Hemlata *et al.* (2011) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces rameus* โดยใช้ชานอ้อย รำข้าว รำข้าวสาลี และชังข้าวโพด 1 เปอร์เซ็นต์แทนการเติมไฮแลนพบว่า เมื่อเลี้ยงด้วยชานอ้อย จะให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 185 หน่วยต่อมิลลิลิตร และในชังข้าวโพดน้อยที่สุดเท่ากับ 64 หน่วยต่อมิลลิลิตร

1.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนถือว่าเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงการผลิตเอนไซม์ไฮลาเนส ไม่ว่าจะเป็น peptone, yeast extract, tryptone และ beef extract เป็นต้น ซึ่ง Gessesse and Mamo (1999) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน พบว่า เมื่อทำการเลี้ยง *Bacillus* sp. AR-009 บนอาหารที่เติม yeast extract จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮลาเนสสูงที่สุด รองลงมาคือ tryptone และ peptone ต่อมา Shah *et al.* (1999) ได้มีการใช้ soy bean milk เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮลาเนสสูงกว่าการใช้ yeast extract

แหล่งไนโตรเจนอื่นๆที่นิยมใช้คือ แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต และโซเดียมไนเตรท ซึ่งเมื่อทำการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกจากเชื้อ *Bacillus firmus* K-1 พบว่า ยูเรีย จะให้กิจกรรมของไฮโดรไลติกมากที่สุดเท่ากับ 1.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัม รองลงมาคือ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท และโพแทสเซียมไนเตรทตามลำดับ (Leartslarus *et al.*, 2002) แต่เมื่อนำไปเลี้ยงโดยเชื้อ *Aspergillus niger* USM A1 พบว่า มีการใช้โซเดียมไนเตรท ในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกได้มากที่สุดเท่ากับ 34 ยูนิตต่อกรัม รองลงมาคือยูเรีย ยีสต์สกัด เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรท ตามลำดับ (Pang and Ibrahim, 2005)

2. อุณหภูมิ

จุลินทรีย์ชนิดต่างๆจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่นั่นถือว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่ง Hemlata *et al.* (2011) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces rameus* ที่อุณหภูมิต่างๆพบว่า เชื้อ *Streptomyces rameus* สามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกได้ในช่วงอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส แต่จะให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรไลติกมากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรไลติกจะมีค่าลดลง

Kulkarni and Rao (1996) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติก จาก *Bacillus* sp. NCIM59 โดยใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งอาหารพบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. NCIM59 สามารถสร้างเอนไซม์ไฮโดรไลติกได้ดีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แต่ในทางกลับกัน Shah *et al.* (1999); Sa-Pereira *et al.* (2002); Heck *et al.* (2005) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของ *Bacillus* sp. ในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกคือ 60 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงกว่านี้กิจกรรมของไฮโดรไลติกจะลดลง ในเชื้อ *Bacillus polymyxa* สายพันธุ์ CECT153 และ CECT6319T จะผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกได้ดีที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ สายพันธุ์ CECT153 ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ CECT6319T ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3. ฟีเอช

Hemlata *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาฟีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Streptomyces rameus* พบว่า ที่ฟีเอช 4.0 เชื้อเริ่มมีการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงที่ฟีเอช 8.5 เป็นฟีเอชที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด และ สัตยัทศน์ (2554) ได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 โดยปรับฟีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสพบว่าที่เวลา 12 ชั่วโมง เชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 0.99 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รวมถึง Silva *et al.* (2005) ได้ทำการหาสภาวะของฟีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Thermoascus aurantiacus* พบว่าที่ฟีเอช 5.0 เป็นฟีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลาเนส

ประโยชน์ของเอนไซม์ไซลาเนสในอุตสาหกรรม

เอนไซม์ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้หลายประเภท โดยส่วนใหญ่ไซลาเนสจะถูกนำไปใช้มากในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับวัสดุทางการเกษตร เช่น อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ อุตสาหกรรมอาหาร และใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมทอผ้า เป็นต้น โดยการนำไปใช้งานนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้สูงขึ้น การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ หรือการลดปริมาณของเสียที่ปล่อยออกจากโรงงาน ซึ่งได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นสิ่งที่ได้จากธรรมชาติและไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม รวมถึงไม่มีปฏิกิริยารุนแรง จึงมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้จริงในอุตสาหกรรม และเกิดประโยชน์สูงสุด (สัตยัทศน์, 2554)

1. อุตสาหกรรมเบเกอรี่ เช่นในแป้งโด (dough) ที่ใช้สำหรับทำขนมปังและขนมอบมีส่วนประกอบของโปรตีนที่รวมตัวกันเป็นร่างแหซึ่งเรียกว่ากลูเตน (gluten) ซึ่งโครงสร้างของกลูเตนที่รวมตัวกันอย่างเป็นระเบียบจะมีผลอย่างมากต่อลักษณะปรากฏและคุณภาพของขนมปัง ทำให้ขนมปังขึ้นฟูเนื้อสัมผัสดีและไม่กระด้าง แต่ในปัจจุบันมีการนำเอนไซม์หลายชนิดมาใช้ทดแทนสารเคมีจำพวก bromates และ azodicarbonamide ในการเพิ่มคุณภาพของกลูเตน เช่น เอนไซม์ Alpha-amylase, Xylanase และ Glucose oxidase จะทำหน้าที่ย่อยแป้งในโดให้เป็นน้ำตาลเดกซ์ทรินและยีสต์ จะทำการเปลี่ยนน้ำตาลเดกซ์ทรินให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และ

แอลกอฮอล์โดยกลูเตนจะทำหน้าที่กักเก็บก๊าซที่ได้จากยีสต์ทำให้โดสามารถขึ้นฟูได้ดี (proofing and baking)

2. อุตสาหกรรมผลิตเอทานอล ในกระบวนการผลิตเอทานอลทั่วไปส่วนใหญ่จะใช้กรดในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ หรือใช้ความร้อนสูงร่วมด้วย ในกระบวนการย่อยสลายเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นน้ำตาลรีดิคซ์ (Morjanoff and Gray, 1987) ซึ่งจะมีสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) เกิดขึ้น โดยฟีนอลจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ ดังนั้นจึงต้องมีการกำจัด ฟีนอลออกไป โดยใช้เอนไซม์ฟีนอลิกซิเดสแลคเคส (phenoloxidase laccase) การใช้เรซิน และการใช้ถ่านกัมมันต์ (activated carbon) จากนั้นจึงนำด่างมาใช้ในการปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ 7 เพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ (Watson *et al.*, 1984) แต่เมื่อมีการนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในกระบวนการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย โดยมีองค์ประกอบเป็นไซแลนและเซลลูโลส ภายหลังจากการย่อยจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส และน้ำตาลกลูโคส ตามลำดับ แล้วจึงใช้ยีสต์หมักน้ำตาลที่ได้เปลี่ยนเป็นเอทานอล (Puls, 1993) ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบในการผลิตเอทานอลคือสามารถลดขั้นตอนการกำจัดฟีนอลและการปรับพีเอชให้เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์

3. อุตสาหกรรมอาหารสัตว์จะนำเอนไซม์ไซแลเนสมาช่วยในการย่อยสารอาหารอื่นๆ ที่ไม่ใช่แป้งและโปรตีน เช่น สัตว์กระเพาะเดี่ยว (Monogastric animals) เช่น สัตว์ปีก และสุกร เป็นกลุ่มที่ต้องการการเสริมเอนไซม์ลงไปในการอาหารมากที่สุด เนื่องจากสัตว์เหล่านี้ไม่มีกระเพาะหมักในทางเดินอาหารส่วนต้น จึงไม่มีจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์มาช่วยย่อยอาหาร ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ย่อยอาหารที่สัตว์กระเพาะเดี่ยวผลิตได้เองนั้นมีเพียงไม่กี่ชนิด เช่น อะมัยเลส (Amylase) สำหรับย่อยแป้ง และโปรติเอส (Proteases) สำหรับย่อยโปรตีน แต่ในขณะที่สัตว์เคี้ยวเอื้องนั้นมีสารอาหารอื่นเช่น ในกากถั่วเหลือง รำข้าว ข้าวโพด และข้าวบาร์เลย์ มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีชื่อว่า เบต้า-แมนแนน (β -mannan) ไซแลน (Xylan) เบต้า-กลูแคน (β -glucan) และเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่มาก ดังนั้นหากเราเติมเอนไซม์ย่อยพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้ลงไปในการอาหารสัตว์ ก็จะช่วยย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้สัตว์ดูดซึมไป ใช้เป็นพลังงานในการดำรงชีวิตได้ เอนไซม์ที่นิยมเติมลงไปได้แก่ β -mannanase, xylanase, β -glucanase และ cellulase (Gilbert and Hazlewood, 1993)

4. อุตสาหกรรมเครื่องดื่มและน้ำผลไม้ ในการบดหรือสกัดน้ำผลไม้เพื่อผลิตเครื่องดื่ม และน้ำผลไม้เหล่านั้นจะมีเพคติน (pectin) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในเซลล์ของพืชแขวนลอยอยู่ ทำให้น้ำผลไม้ขุ่นและมีลักษณะปรากฏที่ไม่ดี จึงมีการนำเอนไซม์ในกลุ่ม pectolytic enzyme ได้แก่ Polygalacturonase, Pectinesterase, Pectinlyase และ Hemicellulase มาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำผลไม้ให้ดีขึ้น เนื่องจากเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิที่ไม่สูงมาก (โดยประมาณต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตน้ำผลไม้) และส่วนมากจะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 4.0-6.0 (พีเอชที่เกิดจากกรดของผลไม้) เพื่อกำจัดเพคตินที่แขวนลอยอยู่ในน้ำผลไม้ ทำให้เพคตินเปลี่ยนสภาพไปเป็นน้ำตาลและสามารถละลาย น้ำได้ดี น้ำผลไม้จึงใสขึ้น (clarification) โดยประโยชน์ของเอนไซม์ไซลาลเนสในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้คือจะไม่ทำให้ สี หรือ วิตามินของผลไม้เกิดการสูญเสียไป (Suurnakki *et al.*, 1997)

5. อุตสาหกรรมทอผ้า ในกระบวนการทอผ้า จะมีน้ำเสียที่ออกมาจากกระบวนการทอผ้า ทำให้เมื่อปล่อยน้ำเสียลงสู่แม่น้ำลำคลองจะทำให้เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีการใช้เอนไซม์ไซลาลเนสมาช่วยในการบำบัดน้ำเสียก่อนการปล่อยลงสู่แม่น้ำลำคลอง ซึ่งเกิดประโยชน์หลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นต้นทุนในการบำบัดน้ำเสียเนื่องจากการบำบัดด้วยเอนไซม์จะมีต้นทุนที่ต่ำกว่าการบำบัดด้วยกระบวนการทางเคมี (Tanticharoen and Cheevadhanarak, 1984)

6. อุตสาหกรรมกระดาษ ในโรงงานกระดาษจะมีการนำเอนไซม์ไซลาลเนสไปใช้ในขั้นตอนการล้างเยื่อคราฟท์ (brown stock washing) ซึ่งเป็นเยื่อกระดาษเริ่มต้นที่ได้จากการย่อย และสกัดเยื่อกระดาษจากเนื้อไม้ โดยมีลักษณะเหนียวและมีสีคล้ำจากลิกนิน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการล้างเยื่อคราฟท์คือ ต้องการไลกลินอกออกจากเยื่อกระดาษให้มากที่สุด ก่อนที่จะป้อนเยื่อคราฟท์เข้าสู่ขั้นตอนการฟอกเยื่อกระดาษ ในขั้นตอนนี้ ได้นำเอนไซม์ xylanase มาใช้แทนการล้างด้วยน้ำเพียงอย่างเดียว โดยเอนไซม์ xylanase จะทำหน้าที่ย่อยไซแลน (xylan) ในโครงสร้างเฮมิเซลลูโลสที่ผนึกรวมอยู่กับลิกนิน ทำให้ลิกนินหลุดล่อนจากเยื่อคราฟท์ง่ายขึ้น ซึ่งช่วยลดปริมาณการใช้น้ำในการล้างเยื่อคราฟท์ และที่สำคัญ คือ ลดปริมาณสารคลอรีนที่ใช้ในขั้นตอนการฟอกเยื่อคราฟท์ได้ถึง 20-25 เปอร์เซ็นต์ จึงนำไปสู่การลดปริมาณสารเคมีที่ออกจากกระบวนการฟอกเยื่อด้วย จึงเรียกกรรมวิธีนี้ว่า “Bleach Boosting” หมายความว่า ช่วยให้การฟอกเยื่อกระดาษง่ายขึ้นนั่นเอง

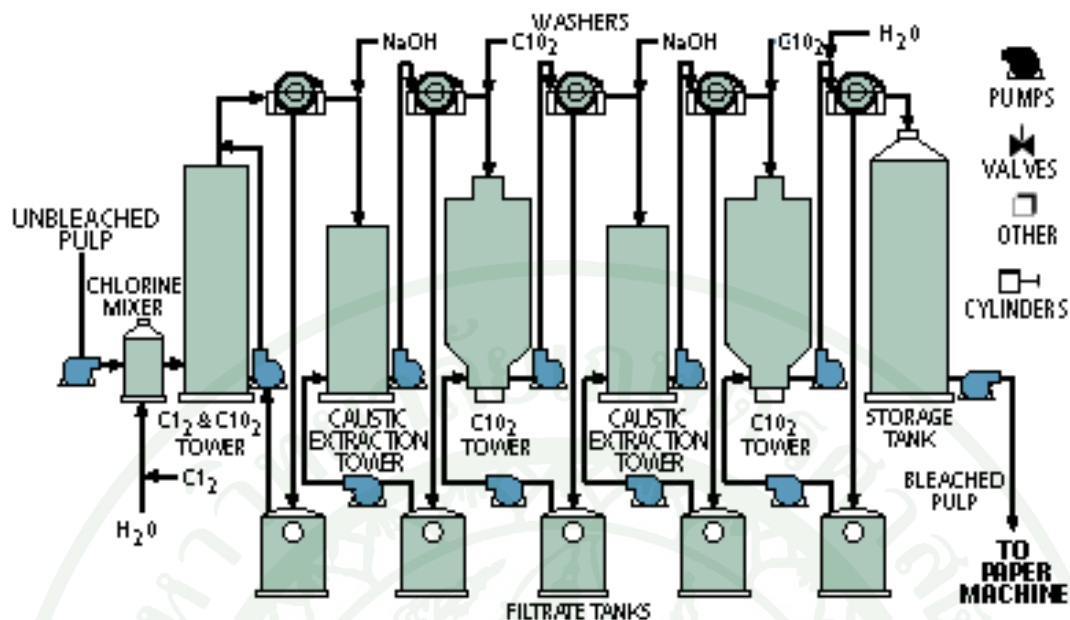
ในปี 2544 เพยาร์ พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสมีผลต่อปริมาณคลอรีนไดออกไซด์ที่ใช้ในการฟอกสี โดยเยื่อชานอ้อยที่ผ่านการย่อยสลายด้วย crude xylanase สามารถประหยัด คลอรีนไดออกไซด์ได้ถึง 69 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยูคาลิปตัสประหยัดได้ 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่นระยะเวลาในการฟอกสีได้ 50 เปอร์เซ็นต์ คือจากระยะเวลาในการฟอกสี 2 ชั่วโมง เหลือเพียง 1 ชั่วโมง โดยที่เยื่อกระดาษยังคงมีค่า brightness เท่ากับเยื่อกระดาษที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ รวมถึงเยื่อกระดาษที่ผ่านการย่อยด้วย crude xylanase เมื่อนำมาฟอกสีจะส่งผลดีต่อคุณสมบัติด้านความแข็งแรงของกระดาษ โดยพบว่า burst index, tear index และ tensile index มีค่าสูงขึ้น

โดยสารเคมีที่นิยมใช้ในกระบวนการผลิตกระดาษเช่น คลอรีน (C) คลอรีนไดออกไซด์ (D) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (E) โดยในกระบวนการผลิตจะประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ซึ่งจะมีชื่อเรียกตามสารเคมีที่ใช้ฟอก และขั้นตอนการฟอกจะเรียงลำดับตามอักษรที่ใช้เรียก เช่น การฟอกแบบ CEDED

ตารางที่ 4 กระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษด้วยสารเคมี

สารเคมี	สัญลักษณ์	ขั้นตอนการฟอก
Chlorine	C	Chlorination
Sodium hydroxide	E	Extraction
Calcium hypochlorite	H	Hypochlorite
Chlorine dioxide	D	Chlorine dioxide
Hydrogen peroxide	P	Peroxide
Oxygen	O	Oxygen
Ozone	Z	Ozone
Acid	A	Acid

ที่มา: Chesterton (2011)



ภาพที่ 4 กระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษด้วยสารเคมี

ที่มา: Chesterton (2011)

โดยสารเคมีที่ใช้จะเรียงลำดับดังนี้ CEDED หรือ DEDED ซึ่งสารเคมีต่างๆที่ใช้เหล่านี้ เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการจะเกิดสารพิษของ สารประกอบคลอไรด์ (chloride) ออกสู่ธรรมชาติ (Viikari *et al.*, 1986)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1 ตู้เขี่ยเชื้อ (microflow biological safety cabinet)
- 2 ตู้บ่มเชื้อที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (low temperature incubator)
- 3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- 4 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
- 5 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- 6 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 7 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
- 8 ไมโครปิเปต (micropipette) P20, P200, P1,000
- 9 เครื่องเขย่าเชื้อที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator รุ่น vision: vs-8480 SFN, Scientific Co., LTD)
- 10 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- 11 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
- 12 เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆในการทำวิจัย

วิธีการ

1. การคัดแยกแอกติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคลาเนส

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจาก บริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี ทำการเจือจางในสารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) ให้เหมาะสม จากนั้นนำตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหาร Berg's medium ที่มีไคเลน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน คัดเลือกโคโลนีของแอกติโนมัยสีท ที่สามารถย่อยไคเลนได้ สังเกตได้จากบริเวณใสรอบโคโลนี (clear zone) นำโคโลนีที่สร้างบริเวณใสมาลากลงบนอาหาร Berg's medium บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วนำมาจุดลงบนอาหาร Berg's medium ด้วยวิธี agar spot บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นนำเพลทที่เกิดบริเวณส่วนใสรอบโคโลนีมาย้อมสีด้วยคองโกเรด 1 เปอร์เซ็นต์ (1% congo red) ทำการวัดและบันทึกอัตราส่วนของบริเวณส่วนใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Hydrolytic capacity, HC) (Wen-Jing, 2005)

$$\text{ค่า HC} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสรอบโคโลนี (เซนติเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)}}$$

2. ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรมแอกติโนมัยสีท

นำโคโลนีบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 1 มาทำการจัดกลุ่มแอกติโนมัยสีทโดยการ ย้อมสีแกรม จากนั้นนำไปตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทำการจัดกลุ่มแอกติโนมัยสีทโดยสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน

3. จัดกลุ่มแอกติโนมัยสีท โดยใช้อาหาร ISP2 และ ISP3

นำแต่ละโคโลนีบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 1 มาลากลงบนอาหารแข็งสำหรับบ่งบอกคุณสมบัติของแอกติโนมัยสีทตามมาตรฐาน ISP (International Streptomyces Project) คือ ISP2 และ ISP3 (Shirling and Gottlieb, 1966) ซึ่งเป็นการศึกษาลักษณะเส้นสายของสปอร์ โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ทำการจัดกลุ่มของแอกติโนมัยสีทโดยสังเกตลักษณะของ

ผิวหน้าโคโลนี ขนาดของโคโลนี การสร้างเม็ดสีและสปอร์ รวมถึงความสามารถในการผลิตเม็ดสีรงควัตถุของแอคติโนมัยสีทในอาหารแข็ง

4. การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสได้สูง

นำเชื้อแอคติโนมัยสีทบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮลาเนส ถ่ายลงในอาหาร ISP2 ที่มีไซแลนและเซลลูโลสเป็นสับสเตรท เพื่อวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไฮลาเนส และเซลลูเลส ตามลำดับ โดย พี่เชอเริ่มต้นเท่ากับ 7 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงในอาหารชนิดเดิม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เพื่อเก็บ crude enzyme โดยเก็บเฉพาะส่วนใส หรือ supernatant มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไฮลาเนส และเซลลูเลส (ภาคผนวกที่ ข 2) จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS (Dinitrosalicylic acid) (Miller, 1959)

เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไฮลาเนส และเซลลูเลส จากไอโซเลทต่างๆ โดยคัดเลือกไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮลาเนสสูงที่สุด และกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำที่สุด

5. ตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA

นำแอคติโนมัยสีทที่ผ่านการคัดแยกมาทำการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะต่อบริเวณอนุรักษ์ของยีน โดยใช้เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยนำเจลไปแช่ในสารละลาย เอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 5-10 นาที ตรวจสอบด้วยเครื่อง UV-transilluminator ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder จากนั้นทำการหาลำดับเบสยีน 16S rDNA ด้านปลาย 5' โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านขั้นตอนทำบริสุทธิ์ ไปหาลำดับเบสโดยตรง (direct sequencing) ด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสของยีน 16S rDNA ด้านปลาย 5' ของแอคติโนมัยสีท มาเปรียบเทียบกับข้อมูลยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมดที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank,

EMBL และ DDBL โดยใช้โปรแกรม Blastn (Basic Local Alignment Search Tool) ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

6. ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

6.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยเตรียมอาหาร ISP2 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร โดยเติมแหล่งคาร์บอนคือ แกลบ ไชเลน เปลือกข้าวโพด ชั่งข้าวโพด และฟางข้าว ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ บรรจุในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมกล้ำเชื้อลงไปปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 5 วัน นำมาวิเคราะห์หาคิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

6.2 ศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

การศึกษ ปริมาณของแหล่งคาร์บอนทำได้โดย เลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยหาปริมาณที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 5 วัน นำมาวิเคราะห์หาคิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

6.3 ศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยเตรียมอาหาร ISP2 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งไนโตรเจนคือ baker yeast, peptone, beef extract และกากถั่วเหลือง ทดแทน yeast extract และทำการแปรผันความเข้มข้น 0.4, 0.8, 1.2 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ บรรจุในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมกล้ำเชื้อลงไป 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 5 วัน นำมาวิเคราะห์หาคิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

7. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไโซลาเนส

7.1 พีเอช

ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์นั้นเราจะศึกษาพีเอชในระบบ Sorensen โดยศึกษาช่วงของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไโซลาเนส โดยแปรผันค่าพีเอชเท่ากับ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 และ 12.0 ตามลำดับ โดยใช้สารละลาย Na-Citrate-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในการปรับพีเอชในช่วง 3.0-5.0 และใช้สารละลาย Phosphate บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในการปรับพีเอชในช่วง 6.0-8.0 และใช้สารละลาย Glycine-NaOH บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในการปรับพีเอชในช่วง 9.0-12.0 จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลาเนสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสับสเตรท

7.2 อุณหภูมิ

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไโซลาเนส โดยใช้พีเอชที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไโซลาเนสสูงที่สุด และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลาเนสที่ อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

8. ศึกษาความเสถียรต่อเอนไซม์ไโซลาเนส

8.1 พีเอช

นำเอนไซม์ไโซลาเนสที่ได้มาทำการศึกษาความเสถียร โดยนำไปบ่มในพีเอช ตั้งแต่ 3.0 ถึง 12.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยเตรียมสารละลาย Na-Citrate-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในการปรับพีเอชในช่วง 3.0-5.0 ใช้สารละลาย Phosphate บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในการปรับพีเอชในช่วง 6.0-8.0 และใช้สารละลาย Glycine-NaOH บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในการปรับพีเอชในช่วง 9.0 ถึง 12.0 จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลาเนสโดยใช้พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม

8.2 อุณหภูมิ

นำเอนไซม์ไซลาลเนสที่ได้มาทำการศึกษาความเสถียร โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนสโดยใช้พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม

9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

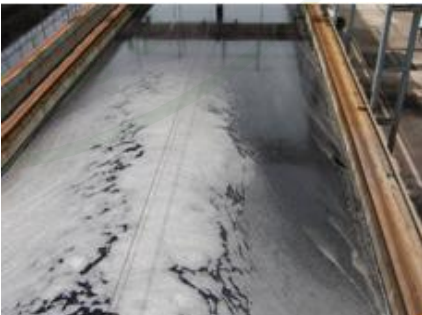
ทำการทดลองทั้งหมดโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomize design; CRD) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Duncan's multiple range test

ผลและวิจารณ์

1. การคัดแยกแอคติโนมายส์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลเนส

ในการคัดแยกแอคติโนมายส์ แหล่งจุลินทรีย์ถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่ง เนื่องจากต้องคำนึงถึงสภาวะต่างๆที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่เราต้องการศึกษา เช่น พีเอช อุณหภูมิ สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมา ดังนั้นในการคัดแยกแอคติโนมายส์ จึงจำเป็นที่จะต้องหาสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณของไซเลนมาก ซึ่งไซเลนนั้นเป็นส่วนประกอบที่อยู่ในเนื้อไม้ ผู้ทำการทดลองจึงเลือกโรงงานกระดาษของบริษัท เอสซีจี เปเปอร์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี เป็นแหล่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ตารางที่ 5 สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำเสียจาก บริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี

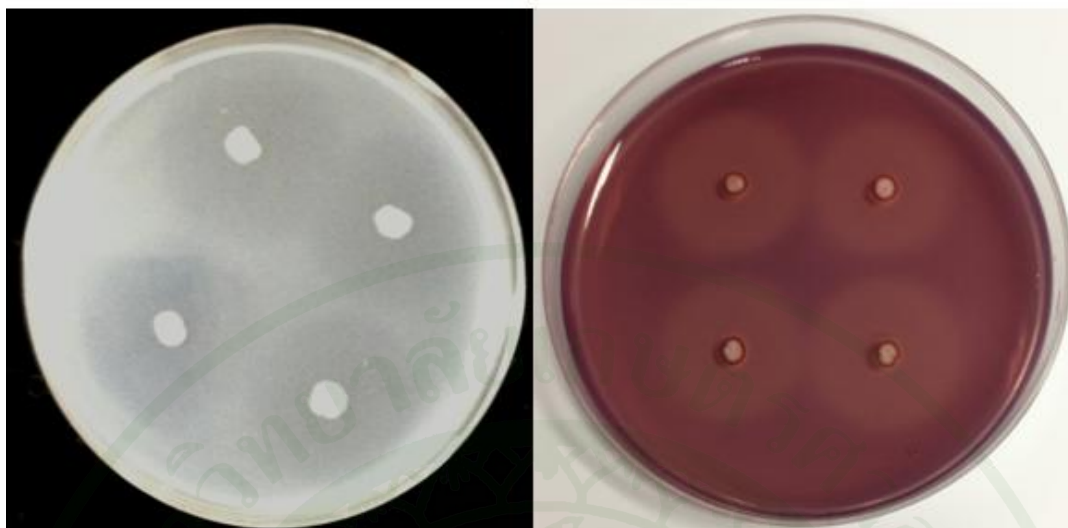
จุดที่	แหล่งน้ำ	พีเอช	
1	แหล่งน้ำบริเวณเครื่องสับไม้	6.95	
2	น้ำจากกระบวนการต้มเยื่อไม้	7.20	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

จุดที่	แหล่งน้ำ	พีไอ
3	น้ำจากระบบบำบัดน้ำเสีย	6.65
4	น้ำตะกอนจุลินทรีย์จากบ่อเติมอากาศ	7.72
5	แหล่งน้ำธรรมชาติในโรงงาน	8.10



เมื่อทำการเจือจางความเข้มข้นของน้ำเสียให้เหมาะสม และนำไปเกลี่ยลงบนอาหารแข็งที่เติมไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์เป็นสับสเตรท เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูง และผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสออกมาใช้ในการย่อยสลายไซแลน ในการคัดเลือกจุลินทรีย์นี้มีจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ทั้งหมด 183 ไอโซเลท จากนั้นเมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยการนำไปปลูกลงบนอาหารเดิมพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสได้ ทั้งหมด 51 ไอโซเลท โดยคัดเลือกเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีส่วนใสรอบๆ โคโลนีนำไปทำ agar plot บนอาหาร Berg's medium บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน (ภาพผนวก ค1 และ ค2) วัดอัตราส่วนของบริเวณส่วนใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 5 ตัวอย่างบริเวณส่วนใสที่เกิดจากเอนไซม์ไฮลาเนสที่ผลิตจากไอโซเลข 901 ออกมาย่อยสลายไฮแลนบนอาหาร Berg's medium (ซ้าย) และเมื่อนำไปย้อมด้วยคองโกเรด(ขวา)

ตารางที่ 6 อัตราส่วนของบริเวณส่วนใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Hydrolytic capacity, HC)

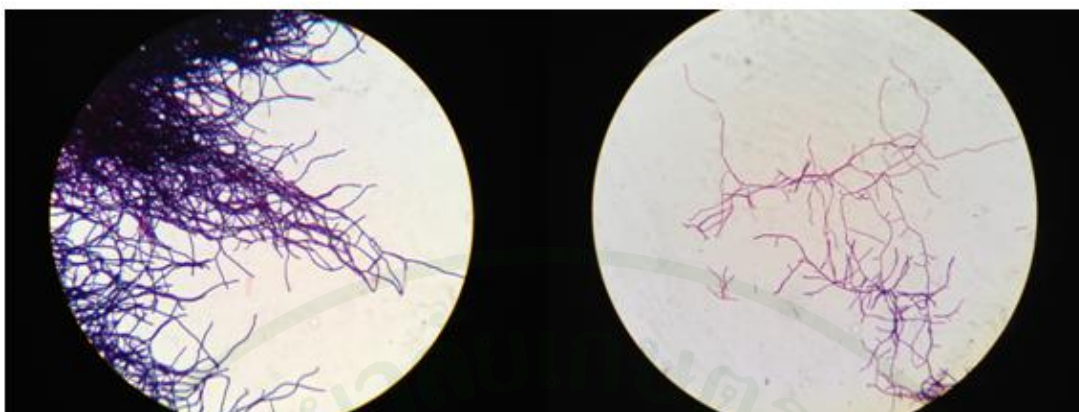
ไอโซเลข	ค่า HC	ไอโซเลข	ค่า HC	ไอโซเลข	ค่า HC
901	1.5	1004	1.3	1021	1.5
902	1.5	1005	1.2	1022	1.5
903	1.5	1006	1.3	1024	1.2
904	1.5	1007	1.5	1026	1.5
907	1.5	1008	1.5	1027	2
908	1.5	1009	1.3	1028	1.3
909	1.5	1010	1.25	1029	1.5
910	1.7	1011	1.3	1031	1.5
911	1.5	1012	1.5	1032	1.5
912	1.7	1013	1.5	1033	1.5

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ไอโซเลท	ค่า HC	ไอโซเลท	ค่า HC	ไอโซเลท	ค่า HC
913	2	1014	1.5	1034	1.3
914	1.5	1015	1.3	1035	1.3
915	1.3	1016	1.3	1036	1.5
916	2	1017	1.3	1037	2
1001	1.75	1018	1.5	1038	1.5
1002	1.3	1019	1.3	1101	2
1003	1.5	1020	1.5	1102	2

2. ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรมแอคติโนมัยสีท

นำเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 51 ไอโซเลท ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเมื่อนำไปย้อมสีด้วย crystal violet และ safranin O เชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยจึงติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก แต่มีเพียง 26 ไอโซเลทเท่านั้น ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นเส้นสายสปอร์ตรงยาว (rectiflexible) ดังแสดงในภาพที่ 6 ซึ่งที่ผิวหน้าโคโลนีมีลักษณะด้านและขรุขระ มีสปอร์ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับรา ดังนั้นจึงมีความใกล้เคียงกับแอคติโนมัยสีท และอีก 25 ไอโซเลทพบว่า ที่ผิวหน้าของโคโลนีมีลักษณะมันวาว บางไอโซเลทผิวหน้าเยิ้ม และเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะมีลักษณะโครงสร้างเป็นท่อนสั้นและท่อนยาวคล้ายกับ *Bacillus* sp.

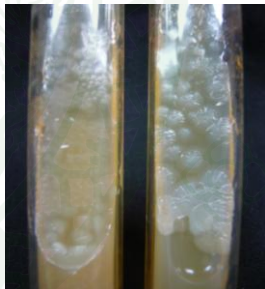


ภาพที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของไอโซเลท 901 (ซ้าย) และ 1036 (ขวา)

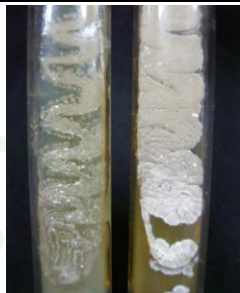
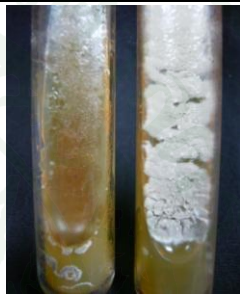
3. จัดกลุ่มแอคติโนมัยสีท โดยใช้อาหาร ISP2 และ ISP3

นำจุลินทรีย์แกรมบวกทั้ง 51 ไอโซเลท มาทำการคัดเลือกเฉพาะที่เป็นแอคติโนมัยสีทโดยสังเกตจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็ง glucose-yeast extract-malt extract agar หรือ ISP2 และอาหารข้าวโอ๊ต (oat meal agar) หรือ ISP3 เช่น การสร้างรงควัตถุ เมลานิน สีของโคโลนี ลักษณะเส้นใย พบว่าเป็นแอคติโนมัยสีททั้งหมด 26 ไอโซเลท ได้แก่ 901, 902, 903, 904, 907, 908, 909, 910, 912, 916, 1003, 1004, 1007, 1008, 1009, 1013, 1014, 1015, 1019, 1021, 1022, 1024, 1029, 1031, 1032 และ 1102 (ภาพผนวก ค4) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของแอคติโนมัยสีท ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 7 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมีลักษณะที่คล้ายกันคือ มีเส้นใยชูขึ้นบนอากาศ บนผิวหน้าโคโลนีมีสปอร์เกิดขึ้นลักษณะคล้ายฝุ่นผง ส่วนโคโลนีจะมีผิวหนานุ่มเมื่อโคโลนีมีอายุมาก ซึ่งแต่ละไอโซเลทที่จัดกลุ่มรวมกันนั้น จะจัดกลุ่มตามสีของสปอร์และเส้นใย รวมถึงรงควัตถุที่แอคติโนมัยสีทสร้างลงบนอาหาร ISP2 และ ISP3 ดังตารางที่ 7 โดยแต่ละกลุ่มมีไอโซเลทดังต่อไปนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลท 904 และ 1004 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท 912 และ 1013 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลท 1008, 1009, 1021, 1024 และ 1029 กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลท 910, 1031 และ 1032 กลุ่มที่ 5 ได้แก่ ไอโซเลท 902, 903 และ 1014 กลุ่มที่ 6 ได้แก่ ไอโซเลท 1015, 1019 และ 1102 กลุ่มที่ 7 ได้แก่ ไอโซเลท 901, 907, 908, 909, 916, 1003, 1007 และ 1022

ตารางที่ 7 การจัดกลุ่มแอคติโนมัยสีททั้ง 7 กลุ่มบนอาหาร ISP3 และ ISP2

กลุ่มที่	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	จำนวนไอโซเลท	อาหาร ISP3 และ ISP2
1	สีสปอร์ ดำ สีเส้นใย ส้ม สิ่งมีชีวิตในอาหาร - ISP2 น้ำตาลอมส้ม - ISP3 ไม่สร้างรงควัตถุ	2	
2	สีสปอร์ ขาว สีเส้นใย ขาว สิ่งมีชีวิตในอาหาร - ISP2 ไม่สร้างรงควัตถุ - ISP3 ไม่สร้างรงควัตถุ	2	
3	สีสปอร์ ไม่มี สีเส้นใย ขาว สิ่งมีชีวิตในอาหาร - ISP2 ส้มอมเหลือง - ISP3 ส้มอมเหลือง	5	
4	สีสปอร์ เทา สีเส้นใย ขาวอมเหลือง สิ่งมีชีวิตในอาหาร - ISP2 น้ำตาลอมเหลือง - ISP3 ไม่สร้างรงควัตถุ	3	

ตารางที่ 7 (ต่อ)

กลุ่มที่	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ไอโซเลท	อาหาร ISP3 และ ISP2
5	สีสปอร์ เทา สีเส้นใย ขาว สิ่งรบกวนในอาหาร - ISP2 น้ำตาลอมส้ม - ISP3 ไม่สร้างรบกวน	3	
6	สีสปอร์ เทา สีเส้นใย น้ำตาล สิ่งรบกวนในอาหาร - ISP2 น้ำตาลอมส้ม - ISP3 น้ำตาลอมส้ม	3	
7	สีสปอร์ เทา สีเส้นใย ขาว สิ่งรบกวนในอาหาร - ISP2 ส้ม - ISP3 ไม่สร้างรบกวน	8	

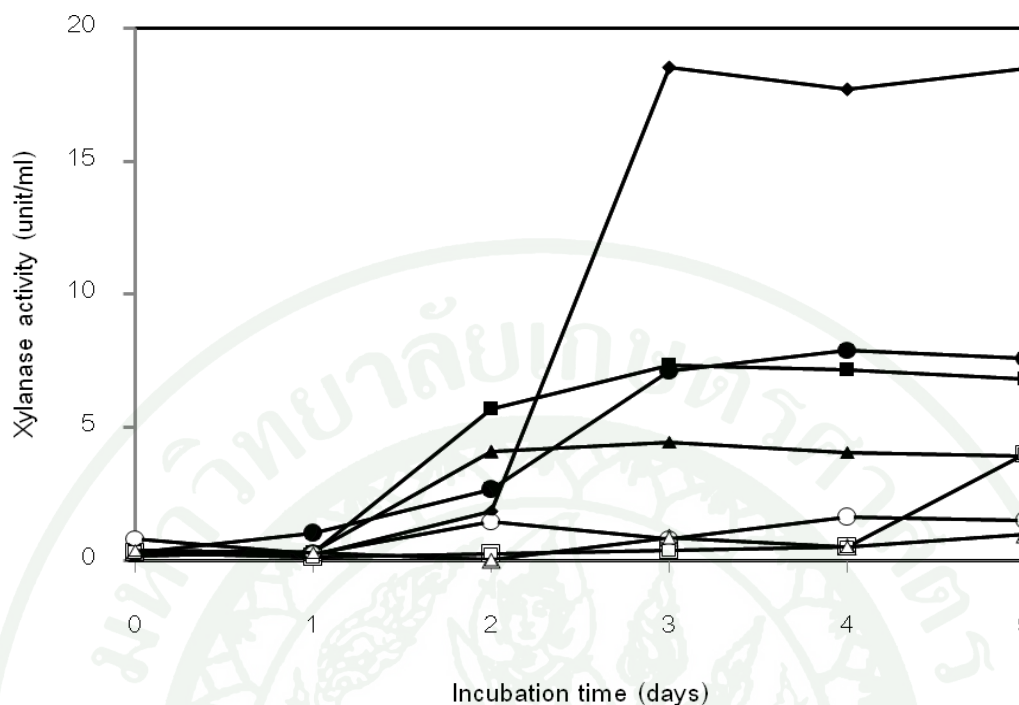
ในการจัดกลุ่มแอคติโนมัยซีททั้ง 26 ไอโซเลท บนอาหาร ISP2 และ ISP3 พบว่าอาหารทั้งสองชนิดนี้จะเหนี่ยวนำให้มีการเจริญและการสร้างรงควัตถุที่แตกต่างกันดังเช่น ในกลุ่มที่ 5 และ 6 บนอาหาร ISP2 แอคติโนมัยซีททั้งสองกลุ่มมีการสร้างสปอร์ขาว เมื่ออายุมากขึ้นสปอร์จะเปลี่ยนเป็นสีเทาและผิวหน้าจะเริ่มยุบ และมีการสร้างรงควัตถุน้ำตาลอมส้มเหมือนกัน แต่บนอาหาร ISP3 แอคติโนมัยซีททั้งสองกลุ่มมีการเจริญที่แตกต่างกันก็คือ ในกลุ่มที่ 5 แอคติโนมัยซีทมีการสร้างเส้นใยสีขาว ไม่สามารถสร้างรงควัตถุได้ แต่ในกลุ่มที่ 6 แอคติโนมัยซีทสร้างเส้นใยสีน้ำตาลและสร้างรงควัตถุน้ำตาลอมส้ม ซึ่งทำให้เป็นข้อแตกต่างในการพิจารณาการแบ่งกลุ่มเบื้องต้น

จากนั้นนำแต่ละกลุ่มมาทำการคัดเลือกออกมา 1 ไอโซเลท โดยพิจารณาจาก ค่าอัตราส่วนของบริเวณส่วนใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของจุลินทรีย์ หรือ ค่า HC และความสามารถในการเจริญ เช่น ระยะเวลาในการบ่ม การสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยซีท โดยในกลุ่มที่ 1 ถึง 7 ได้คัดเลือกไอโซเลท 1004, 1013, 1021, 910, 903, 1102 และ 901 ตามลำดับ ในขั้นตอนต่อไปจะคัดเลือกไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮาลาเนส สูงที่สุด โดยนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ที่เติมไซแลนเป็นสับสเตรทเพื่อใช้ในการกระตุ้นให้แต่ละไอโซเลทผลิตเอนไซม์ไฮาลาเนสออกมาย่อยสลายไซแลนได้อย่างเต็มที่ โดยนำไป บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

4. การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮาลาเนสได้สูง

จากการวิเคราะห์ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ไฮาลาเนสของแต่ละไอโซเลทที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร โดยนำไปเลี้ยงในอาหาร ISP2 ที่มีไซแลน 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นสับสเตรท พบว่าในวันที่ 1 ของการเลี้ยงแต่ละไอโซเลทยังไม่มีการผลิตไฮาลาเนส และเริ่มมีการผลิตไฮาลาเนสออกมาในปริมาณสูง ในวันที่ 2 ส่วนในวันที่ 3 ถึง 5 ของการเลี้ยง แต่ไอโซเลท 901 มีความสามารถในการผลิตไฮาลาเนสได้ สูงที่สุดเท่ากับ 18.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 และเริ่มคงที่ เมื่อทำการเลี้ยงไปจนถึงวันที่ 5 พบว่าไอโซเลท 901 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไฮาลาเนสเท่ากับ 18.46 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ไอโซเลท 1004, 903, 1013, 910, 1021 และ 1102 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไฮาลาเนส เท่ากับ 7.61, 6.81, 4.03, 3.93, 1.50 และ 0.99 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 7

เมื่อนำมาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสพบว่าแต่ละไอโซเลทมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณของเอนไซม์ไฮาลาเนสคือ ไอโซเลท 901, 1004, 903, 1013, 910, 1021 และ 1102 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮาลาเนส เท่ากับ 2.45, 2.09, 1.98, 1.69, 1.36, 0.98 และ 0.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นแสดงว่าแอคติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการย่อยองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสที่อยู่ในเนื้อไม้ได้มากกว่าเซลลูโลส



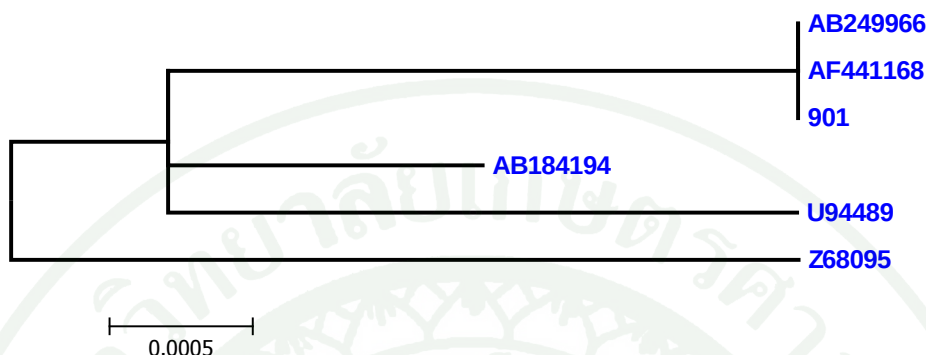
ภาพที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนสของแอคติโนมัยซีททั้ง 7 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท

901 (◆), 903 (■), 910 (▲), 1004 (●), 1013 (□), 1021 (○) และ 1102 (△) เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 โดยมีไซลาลเป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน

5. ตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA

จากการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสปริมาณสูงนั้นพบว่า แอคติโนมัยซีทไอโซเลท 901 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้ สูงที่สุด จึงนำไปตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลยีน 16S rRNA ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมดที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank, EMBL และ DDBL โดยใช้โปรแกรม Blastn (Basic Local Alignment Search Tool) ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> พบว่าไอโซเลท 901 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces mexicanus* ซึ่งมีค่าความเหมือน (%similarity) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ผลจากการทำการวิเคราะห์ Phylogenetic Tree ของไอโซเลท 901 โดยการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม หรือ Neighbor-Joining method (NJ) ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 Phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของไอโซเลท 901

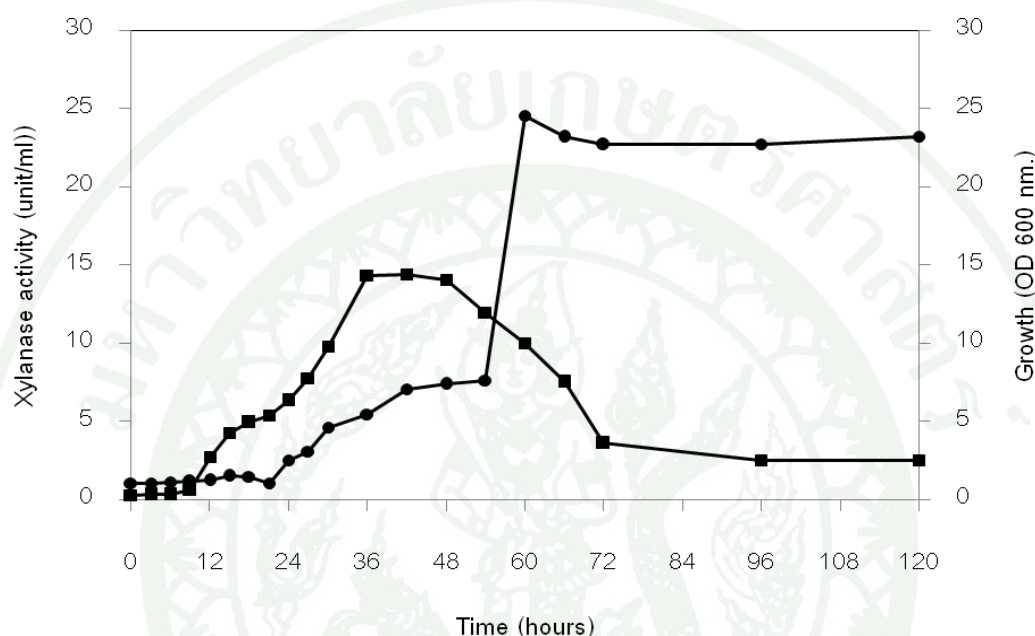
AB249966 หมายถึง	<i>Streptomyces mexicanus</i> strain: NBRC 100915
AF441168 หมายถึง	<i>Streptomyces mexicanus</i> strain: CH-M-1035
AB184194 หมายถึง	<i>Streptomyces chromofuscus</i> strain: NBRC 12851
U94489 หมายถึง	<i>Streptomyces thermocarboxydovorans</i> DSM 44296
Z68095 หมายถึง	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>

Streptomyces sp. สามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปทั้งบนบกและในน้ำ โดยจะเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ (Saprophytes) สปอร์ของ *Streptomyces* sp. สามารถทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าเส้นใย เนื่องจากมีผนังเซลล์ที่หนา มีประจุเป็นลบและทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเส้นใย

Streptomyces mexicanus 901 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีการเจริญคล้ายคลึงกับเชื้อรา จัดอยู่ในกลุ่มชอบอุณหภูมิได้สูง (thermophile) คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *Streptomyces mexicanus* 901 สามารถเจริญได้แต่โคโลนีฝังอยู่ในผิวน้ำอาหาร ไม่มีสปอร์เกิดขึ้น แต่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส *Streptomyces mexicanus* 901 เจริญได้ดี มีสปอร์สีขาวขึ้นบนผิวของโคโลนี ต้องการอากาศในการเจริญ (Strictly aerobes) เส้นใยเหนือผิวน้ำอาหารที่เจริญเต็มที่สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายโซ่ สามารถสร้างรงควัตถุได้หลายสีและยังสามารถสร้างรงควัตถุที่แพร่ลงในอาหารได้อีกด้วย โดยจะเจริญได้ดีที่พีเอช 7.0 หรือพีเอชที่เป็นกลาง ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Goodfellow et al. (1988) คือ *Streptomyces mexicanus* เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มทน

อุณหภูมิสูง (thermotolerant) และเส้นใย (vegetative hyphae) มีขนาด 0.5-2.0 ไมโครเมตร สามารถแตกกิ่งแขนงได้แต่ไม่ค่อยแตกหักเป็นท่อน สามารถสร้างรงควัตถุได้หลายสี

6. ศึกษาการเจริญของ *Streptomyces mexicanus* 901 ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *Streptomyces mexicanus* 901 (■) และการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส (●) เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 ที่มีไซแลนเป็นสับสเตรท อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *Streptomyces mexicanus* 901 ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส พบว่าเมื่อทำการเลี้ยง *S. mexicanus* 901 บนอาหาร ISP2 ที่เติมไซแลนเป็นสับสเตรท เขยาที่ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในช่วงเริ่มต้น *S. mexicanus* 901 อยู่ในระยะพักตัว (Lag phase) ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์เริ่มมีการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมใหม่ ในระยะนี้จะไม่มีการแบ่งตัวเกิดขึ้น แต่เนื่องจากในการเลี้ยงกล้าเชื้อทำการเลี้ยงในอาหาร ISP2 เช่นเดียวกันจึงทำให้มีระยะพักตัวที่สั้น และในชั่วโมงที่ 9 *S. mexicanus* 901 เริ่มเข้าสู่ระยะที่จุลินทรีย์เกิดการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ (Exponential phase หรือระยะ Log phase) ซึ่งการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาเท่าๆกัน ระยะนี้การเจริญของจุลินทรีย์จะมากที่สุด และ สารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างรวดเร็ว โดยการแบ่งเซลล์จะสัมพันธ์กับการสังเคราะห์โปรตีนพลาซิม และกิจกรรมทางเคมีของจุลินทรีย์ จำนวนของจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า จึงทำ

ให้ลักษณะของเส้นโค้งเป็น exponential ในช่วงที่ 36 จะเป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีจำนวนสูงสุดและคงที่ (Stationary phase) ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก คือ ถึงแม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แต่การแบ่งตัวจะเท่ากับอัตราการตาย เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด รวมถึงอาจมีการขับของเสียออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม และในช่วงที่ 48 จะเข้าสู่ระยะที่จุลินทรีย์จะมีการตายอย่างมาก และรวดเร็วอย่างคงที่ (Death phase หรือ Decline phase) แบบ exponential หรือ logarithm ซึ่งอาจมีสาเหตุหลักๆมาจากสารอาหารที่จุลินทรีย์ใช้นั้นมีอย่างจำกัด จึงทำให้ไม่เพียงพอต่อการเจริญ (Kenneth, 2012)

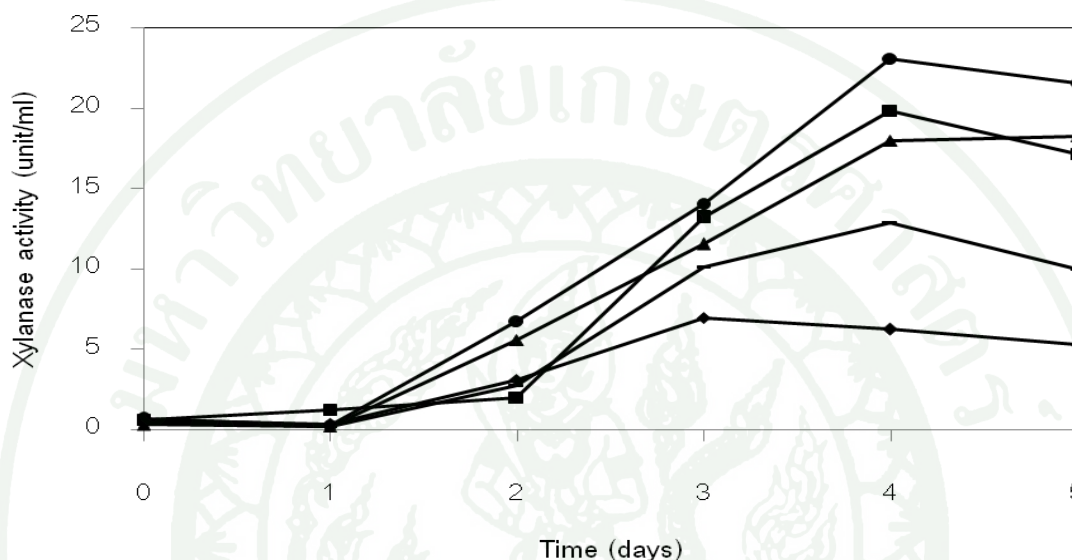
เมื่อพิจารณาเอนไซม์ไซลาเนส จาก *S. mexicanus* 901 พบว่าในช่วงแรก *S. mexicanus* 901 อยู่ในระยะพักตัว ซึ่งมีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ต่ำมาก แต่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง *S. mexicanus* 901 เริ่มมีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมานอกเซลล์เพิ่ม มากขึ้น ซึ่งตรงกับระยะของ *S. mexicanus* 901 เกิดการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ และระยะการเกิดเท่ากับอัตราการตาย จนในช่วงที่ 60 พบว่า *S. mexicanus* 901 มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ออกมาอย่างมากและรวดเร็วจาก 7.64 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในช่วงที่ 54 เป็น 24.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นระยะที่ *S. mexicanus* 901 เข้าสู่ช่วงตายอย่างรวดเร็ว หรือเรียกว่าเป็นการผลิตเอนไซม์แบบทุติยภูมิ (Secondary Metabolite) คือ ปริมาณการผลิตเอนไซม์จะมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ หรือจุลินทรีย์จะมีการผลิตเอนไซม์ออกมาหลังจากที่จุลินทรีย์หยุดการเจริญเติบโตไปแล้ว

7. ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

7.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นสารอาหารที่จำเป็น อย่างมาก ต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ เช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ และแป้ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นปัจจัยสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตสารบางชนิดออกนอกเซลล์ เช่น เอนไซม์ เป็นต้น ดังนั้นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจนำมาใช้เป็นอาหารของจุลินทรีย์ เนื่องจากในโครงสร้างของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรนั้น มีองค์ประกอบของไซแลน ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของเฮมิเซลลูโลสที่อยู่ในเนื้อไม้ และไซแลนนั่นเองที่เป็นตัวเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยจิตรลดา (2550) ได้ทำการศึกษาการผลิตน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์และ

อนุพันธ์ของน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากไซเลนและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดย *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 พบว่า crude enzyme ที่ได้จาก *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 สามารถย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้แก่ เปลือกข้าวโพด ชังข้าวโพด ฟางข้าว และชานอ้อยได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์



ภาพที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเมื่อศึกษาแหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ ชังข้าวโพด (●) แกลบ (◆) เปลือกข้าวโพด (▲) ไซเลน (■) และฟางข้าว (—) โดยเลี้ยงในอาหาร ISP2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรคือ แกลบ เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว และชังข้าวโพด แทนการใช้ไซเลน โดย *S. mexicanus* 901 สามารถใช้ ชังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีที่สุด เนื่องจากในโครงสร้างของชังข้าวโพดประกอบไปด้วย ปริมาณเฮมิเซลลูโลส 35 เปอร์เซ็นต์ (Singh et al., 2000) และมีปริมาณไซเลนมากถึง 20.8 เปอร์เซ็นต์ (จิรนาถ, 2543) ซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำให้ *S. mexicanus* 901 ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้มากที่สุดในวันที่ 4 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 23.10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าการผลิตเอนไซม์โดยใช้ ไซเลนบริสุทธิ์เป็นสับสเตรท 3.24 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว และ แกลบ มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสเท่ากับ 28, 25 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งส่งผลโดยตรงกับ ปริมาณการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส คือค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 17.99, 12.92 และ 6.26 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยผลของแหล่งคาร์บอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับ Roberto et al. (2005) ซึ่งทำการศึกษการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส เมื่อ

ทำการเลี้ยงบนอาหารแข็งจากเชื้อ *Thermoascus aurantiacus* โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรคือ รำข้าวสาลี อ้อย ชานอ้อย เปลือกส้ม ชังข้าวโพด หนุ่สาด หนุ่แห้ง ขี้เลื่อย และ ฟางข้าวโพด เป็นสับสเตรท โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน พบว่า ชังข้าวโพด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรไลติกมากที่สุดเท่ากับ 107 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอื่นๆและ อานนท์ (2541) ได้ทำการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกจากเชื้อรา *Humicola lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce โดยใช้ชังข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ โดยนำไป บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 725-729 หน่วยต่อกรัม วัสดุหมักแห้ง เมื่อเลี้ยงนาน 5 วัน

เนื่องจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เหลือในแต่ละปีนั้นมีปริมาณมาก ตัวอย่างเช่น ชังข้าวโพดมีปริมาณเหลือทิ้งมากถึง 4,508.89 ตัน และ แกลบที่มีปริมาณเหลือทิ้งประมาณ 6,518.66 ตัน (ตารางที่ 3) ดังนั้นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์เพื่อเป็นอาหาร เลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ทดแทนการใช้ไขมันซึ่งมีราคาที่สูงมาก และยังถือว่าเป็นการลดต้นทุนในการผลิตได้อีกด้วย

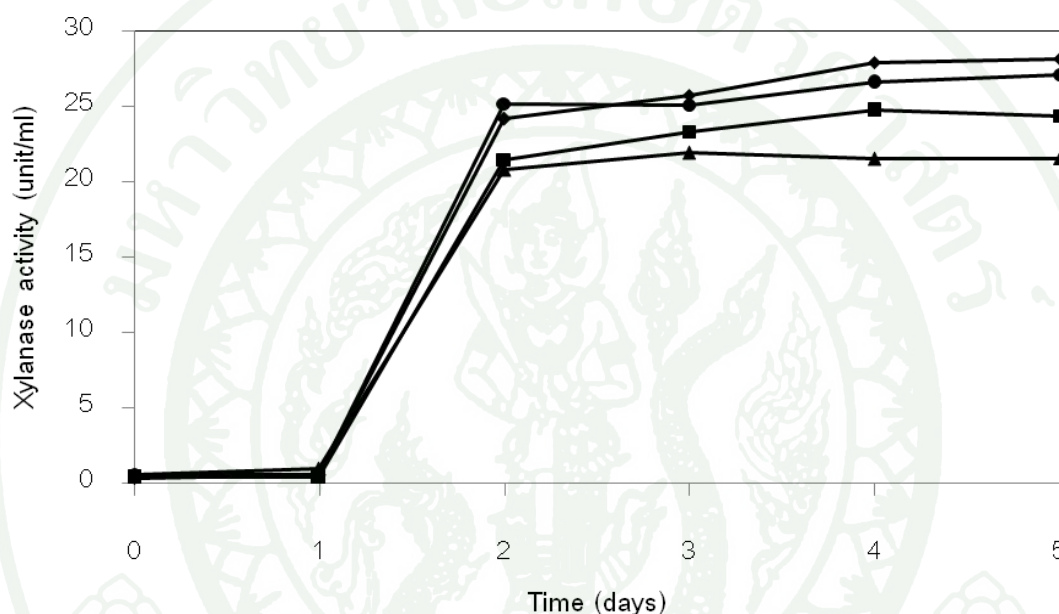
7.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

นอกจากแหล่งคาร์บอนที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของ เชื้อจุลินทรีย์แล้ว ความเข้มข้นก็เป็นอีกตัวแปรหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต รวมถึงการ ผลิตเอนไซม์ด้วย เพราะว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรท จะส่งผลต่อการเจริญของ จุลินทรีย์และการผลิตเอนไซม์ แต่ในทางกลับกันถ้าความเข้มข้นของสับสเตรทมากเกินไปอาจ ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ได้ ดังนั้นเพื่อให้เป็นการใช้สับสเตรทให้เกิดประโยชน์ และคุ้มค่ามากที่สุด จึงต้องทำการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน หรือชังข้าวโพด ให้เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. mexicanus* 901

จากการศึกษาความเข้มข้นที่ 0.5, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าเมื่อมี การเพิ่มปริมาณชังข้าวโพดลงในสูตรอาหาร ISP2 จะทำให้ปริมาณของเอมิเซลลูโลสสูง ขึ้น รวมถึง ปริมาณของไขมันสูงขึ้นไปอีกด้วย จากภาพที่ 11 จะเห็นว่าในสูตรอาหารดั้งเดิมของ ISP2 จะ มีการเติมชังข้าวโพดเป็นสับสเตรท 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรไลติก สูงสุด ในวันที่ 4 เท่ากับ 24.71 หน่วยต่อมิลลิกรัม และเริ่มลดลงในวันที่ 5 เหลือ 24.32 หน่วยต่อมิลลิกรัม

แต่เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของซังข้าวโพดเป็น 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสเพิ่มมากขึ้น ตามปริมาณความเข้มข้นของซังข้าวโพด โดย

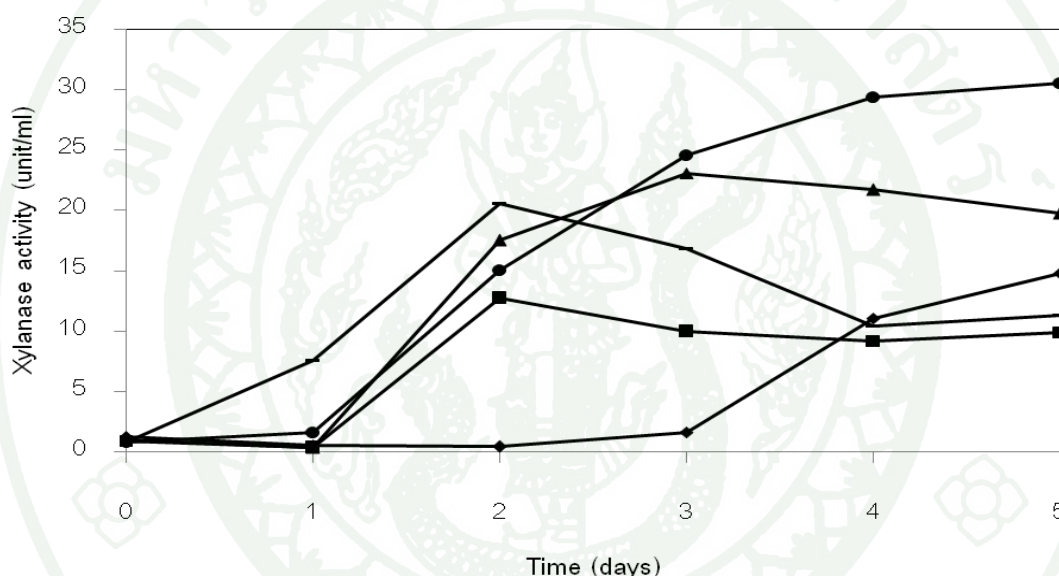
S. mexicanus 901 สามารถย่อยสลายซังข้าวโพดและนำไซแลนไปในการเจริญเติบโตและเหนียวทำให้มีการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้เพิ่มมากขึ้นเท่ากับ 21.53, 27.09 และ 28.14 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน โดยความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนสต่อเวลาเมื่อแปรผันความเข้มข้นของซังข้าวโพดเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (▲), 1.0 เปอร์เซ็นต์ (■), 1.5 เปอร์เซ็นต์ (●) และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (◆) ตามลำดับ โดยเลี้ยงในอาหาร ISP2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

7.3 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นแหล่งอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์เช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน ไม่ว่าจะเป็นสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดอะมิโน และ เกลือไนโตรเจน เป็นต้น ในการศึกษาแหล่งไนโตรเจนเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสให้ได้ปริมาณสูง จึงเลือกใช้ beef extract, peptone, baker yeast และกากถั่วเหลือง แทนการใช้ yeast extract ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่เลือกมาศึกษานั้น มีปริมาณกรดอะมิโนสูง ซึ่งจะช่วยให้ *S. mexicanus* 901 เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดี



ภาพที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนสเมื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนคือ yeast extract (◆), beef extract (■), peptone (▲), soy bean meal (●) และ baker yeast (—) ตามลำดับ โดยเลี้ยงในอาหาร ISP2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

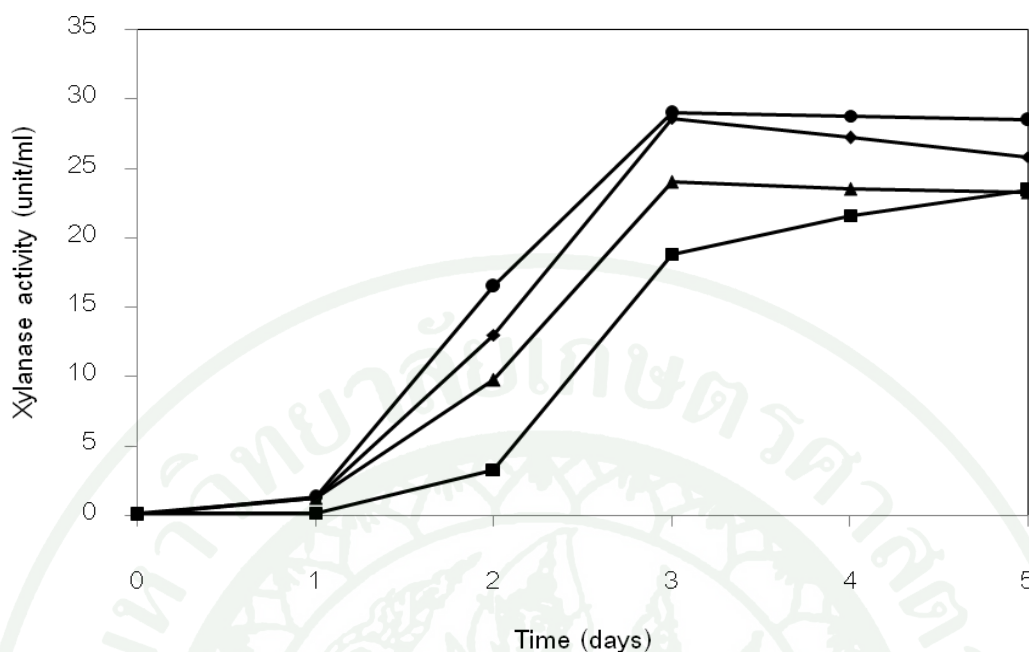
จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่างๆพบว่า กากถั่วเหลือง เป็นแหล่งไนโตรเจนที่อุดม - สมบูรณ์มากเนื่องจากใน กากถั่วเหลืองมีปริมาณโปรตีนสูงถึง 34 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้งและแร่ธาตุอื่นๆ เป็นองค์ประกอบอีกมาก เช่น ไขมัน 18.7 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 26.7 เปอร์เซ็นต์ จึงส่งเสริมให้ *S. mexicanus* 901 ผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้สูงสุดเท่ากับ 30.54 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน รองลงมาคือ peptone ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนสมากที่สุด เมื่อเลี้ยงนาน 3 วันเท่ากับ 23.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วน baker

yeast และ beef extract มีกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรเลสสูงสุด เมื่อเลี้ยงนาน 2 วัน เท่ากับ 20.52 และ 12.69 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดย yeast extract หรือแหล่งไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร ISP2 จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรเลสต่ำที่สุดคือ 14.75 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยผลของแหล่งไนโตรเจนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับ Shah *et al.* (1999) ได้ศึกษาการใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเลสสูงกว่าการใช้ yeast extract

จากการใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนแทน yeast extract ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่าย ราคาถูก มีคุณค่าทางอาหารที่สูงเหมาะแก่การนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเลสจาก *S. mexicanus* 901 ได้มากถึง 15.79 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งคุ้มค่าและเหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ สุมาลี (2539) ได้ทำการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยไฮโดรเจน 1.0 เปอร์เซ็นต์ และคอร์นสตีฟลิเคอร์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนทำการเลี้ยงนาน 2 วันพบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สามารถผลิตไฮโดรเลสได้สูงสุดที่ 14.68 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อมีการนำกากถั่วเหลืองที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.45 เปอร์เซ็นต์ มาใช้แทนคอร์นสตีฟ ลิเคอร์ จะผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสได้ 10.82 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

7.3 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เมื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *S. mexicanus* 901 โดยใช้กากถั่วเหลืองทดแทนการใช้ yeast extract ซึ่งความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนถือว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่เราต้องการศึกษา เพื่อเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ไฮโดรเลสให้ได้มากที่สุดโดยที่ใช้แหล่งไนโตรเจนให้คุ้มค่าและมีปริมาณเหมาะสมที่สุด จากสูตรอาหาร ISP2 ได้ทำการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไปจากเดิม 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็น 0.8, 1.2 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลันเนสเมื่อแปรผันความเข้มข้นของกากถั่วเหลือง 0.4% (■), 0.8% (▲), 1.2% (◆) และ 1.6% (●) ตามลำดับ โดยเลี้ยงในอาหาร ISP2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

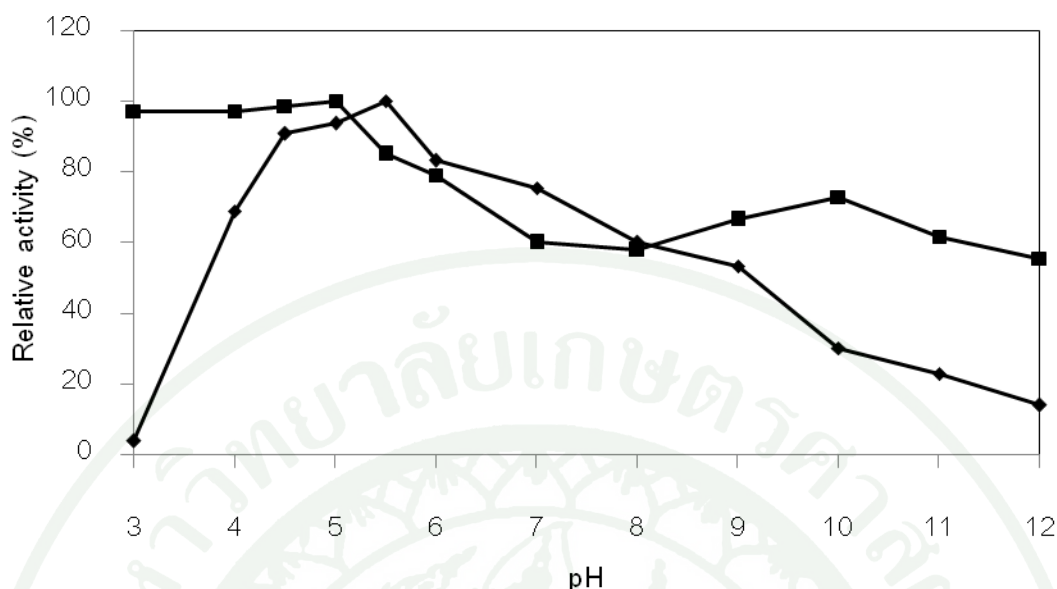
จากการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ กาก ถั่วเหลืองพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไซลันเนสจะเพิ่มขึ้นโดยแปรผันตามความเข้มข้น คือ ที่ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลันเนสเท่ากับ 23.42 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.8, 1.2 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลันเนสเท่ากับ 23.25, 25.80 และ 28.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การใช้แหล่งไนโตรเจน 1.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อความต้องการของ *S. mexicanus* 901 ในการผลิตเอนไซม์ไซลันเนส โดยความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

8. สภาวะที่เหมาะสมและความเสถียรต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนส

เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาของสับสเตรทจนได้เป็นผลิตภัณฑ์ออกมา โดยการทำงานของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ และสภาวะที่เหมาะสม เช่น พีเอช อุณหภูมิ รวมถึงการเติมแร่ธาตุต่างๆ ที่ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นหรือลดลง ดังนั้นในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ไซลานเนสเพื่อใช้ในการย่อยสลายไซแลน ซึ่งเป็นสับสเตรท จนได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวออกมาคือน้ำตาลไซโลสนั้น จึงต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

8.1 พีเอช

เมื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอช 3.0 ถึง 12.0 พบว่า ในสภาวะความเป็นกรดสูงหรือพีเอช 3.0 เอนไซม์จะมีประสิทธิภาพการทำงานที่ต่ำมาก และเมื่อให้เอนไซม์ทำงาน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยมีไซแลนเป็นสับสเตรท เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสพบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์ 4 เปอร์เซ็นต์ และจะมีค่าเพิ่มมากขึ้น เมื่อให้เอนไซม์ทำงานที่พีเอชสูงขึ้น คือที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5 จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์เท่ากับ 69, 91, 94 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จาก *S. mexicanus* 901 สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 5.5 แต่เมื่อความเป็นกรดลดลงหรือที่พีเอช 6.0 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะเริ่มลดลงเหลือ 83 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเอนไซม์ไซลานเนสทำงานในสภาวะเป็นกลางหรือพีเอช 7.0 จะเหลือประสิทธิภาพในการทำงานเท่ากับ 76 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่พีเอชเป็นด่างตั้งแต่พีเอช 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 และ 12.0 พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์จะเท่ากับ 60, 53, 30, 23 และ 14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ได้สอดคล้องกับ Seyis and Aksoz (2005) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จาก *Trichoderma harzianum* 1073 D3 พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสจะทำงานได้ดีที่พีเอช 5.0 และเอนไซม์ยังมีความเสถียรที่พีเอช 3.0 ถึง 7.0 โดยมีประสิทธิภาพมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลานเนสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ C-1 ซึ่งสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 6.0



ภาพที่ 14 กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เมื่อศึกษาการทำงาน (◆) และความเสถียร (■) ของเอนไซม์ไฮลาเนสจาก *S. mexicanus* 901 ที่พีเอช 3.0 ถึง 12.0

Roberto *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮลาเนสจาก *Thermoascus aurantiacus* พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 5.5 ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งโดยใช้ขี้ข้าวโพดเป็นสับสเตรท เลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน Kitsada and Pairon (2000) ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติของเอนไซม์ไฮลาเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี ion-exchange และ gel filtration chromatography และนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮลาเนส พบว่าที่พีเอช 5.5 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และเอนไซม์ไฮลาเนสมีความเสถียรที่พีเอชเป็นกรด และอุณหภูมิในช่วง 35 ถึง 50 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์จะเริ่มลดลง

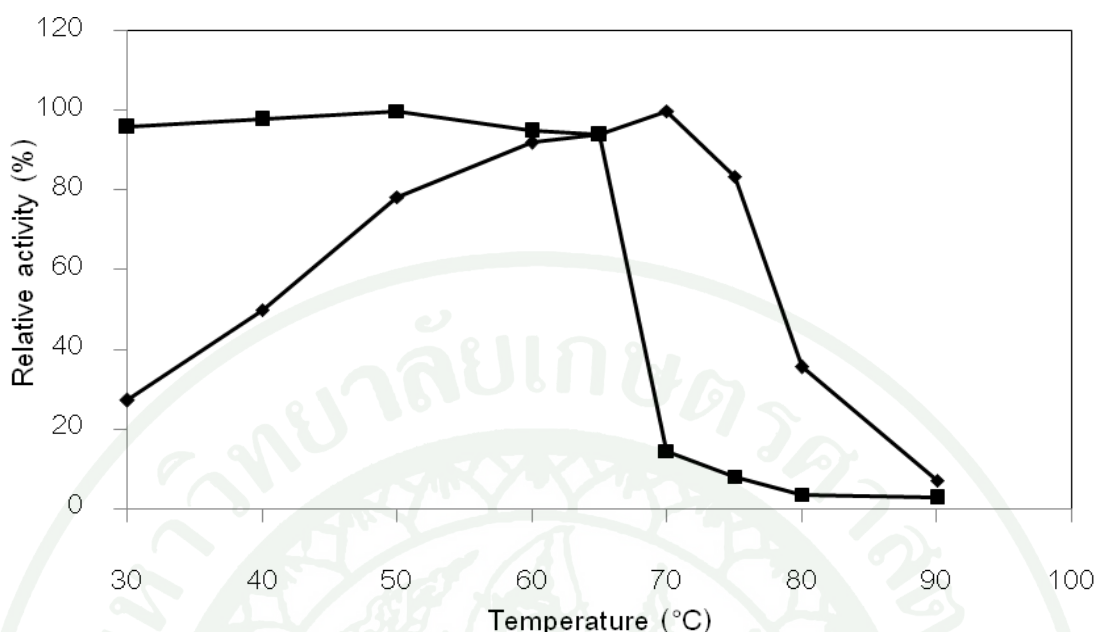
ความเสถียรหรือความคงตัวของเอนไซม์ถือว่าเป็นเรื่องที่สำคัญต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เนื่องจากในกระบวนการผลิตในบางขั้นตอนต้องใช้เวลาอันจึงทำการศึกษาความเสถียรที่พีเอช 3.0 ถึง 12.0 โดยบ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง พบว่าที่พีเอช 3.0, 4.0 และ 5.0 หรือในสภาวะกรด เอนไซม์ยังสามารถทำงานได้ ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เท่ากับ 97, 97 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อพีเอชเริ่มสูงขึ้น หรือมีสภาวะเป็นด่างมากขึ้น

ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์จะลดลงจนเหลือ 58 เปอร์เซ็นต์ที่พีเอช 8.0 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Carlos *et al.* (2002) เมื่อศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลานเนสจาก *Bacillus caldoolyolyticus* และ *Bacillus* sp. strain AKI พบว่าเมื่อศึกษาความเสถียรของพีเอชที่ 5.5 ถึง 8.0 พบว่าเอนไซม์จะเสียสภาพและประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเหลือเพียง 12 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

8.2 อุณหภูมิ

เมื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสจาก *S. mexicanus* 901 พบว่า เอนไซม์ไซลานเนสสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ กับสับสเตรทจาก 30 องศาเซลเซียสไปจนถึง 70 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ คือ ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เท่ากับ 27, 50, 78, 92, 94 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไซแลน ซึ่งสอดคล้องกับ จักรกฤษณ์ (2548) ที่ได้ทำการศึกษา multiple xylanases จากบาซิลลัสทนด่างพบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 70 องศาเซลเซียสเอนไซม์จะเริ่มเสียสภาพ ส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ลดลง กล่าวคือเมื่อเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 75 องศาเซลเซียสเอนไซม์จะมีประสิทธิภาพในการทำงานลดลงเหลือ 83 เปอร์เซ็นต์ และลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 36 และ 7 เปอร์เซ็นต์เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 และ 90 องศาเซลเซียสตามลำดับ

ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไซลานเนสจาก *S. mexicanus* 901 เมื่อนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ นาน 1 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังมีประสิทธิภาพในการทำงานสูงเท่ากับ 96, 98 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นมากกว่า 60 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วจนเหลือเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 15 กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เมื่อศึกษาการทำงาน (◆) และความเสถียร (■) ของเอนไซม์ไฮลาเนสจาก *S. mexicanus* 901 ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 90 องศาเซลเซียส

ดังนั้นจะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเนื่องจากเอนไซม์สามารถทนอุณหภูมิสูงได้นาน และยังสามารถทำงานได้ 100 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับ Marta *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของไฮลาเนส ทนต่างจาก *Bacillus pumilus* พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษาในสภาวะที่ใช้ในการฟอกสีเยื่อไม้ในโรงงานกระดาษ ต่อมาในปี 2005 Roberto *et al.* ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไฮลาเนสจาก *Thermoascus aurantiacus* พบว่าเอนไซม์ไฮลาเนสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทำการบ่มไว้นาน 24 ชั่วโมง

Carlos *et al.* (2002) ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไฮลาเนสจาก *Bacillus caldoolylolyticus* และ *Bacillus* sp. Strain AKI พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60, 70 และ 100 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์จะเสียสภาพทำให้เหลือประสิทธิภาพในการทำงานเท่ากับ 10, 11 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ในการคัดแยกแอสโคสปอร์ของเชื้อราจากน้ำเสียของ บริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี โดยคัดแยกบนอาหารแข็งที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสับสเตรทพบว่า เป็นแอสโคสปอร์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท ซึ่งคัดเลือกจาก อัตราส่วนของบริเวณส่วนใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ที่สูง และ เมื่อทำการศึกษาทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าแอสโคสปอร์ทั้งหมดเป็นแกรมบวก ลักษณะเป็น เส้นสายสปอร์ตรงยาว (rectiflexible) ซึ่งเป็นลักษณะของแอสโคสปอร์ และเมื่อจัดกลุ่มแอสโคสปอร์บนอาหาร ISP2 และ ISP3 พบว่าโคโลนีมีลักษณะกลม มีฝุ่นผงอยู่ด้านบน มีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ จึงสามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม ตามการสร้างรงควัตถุเมลานิน สีของโคโลนี และลักษณะเส้นใย

การคัดเลือกแอสโคสปอร์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสได้สูง ในอาหาร ISP2 ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสับสเตรท โดยเปรียบเทียบทั้ง 7 กลุ่ม พบว่าในกลุ่มที่ 7 ไอโซเลท 901 มีกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรเลสสูงที่สุดเท่ากับ 18.46 ยูนิตต่อมิลลิกรัม จากนั้นนำไป ตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA โดยใช้โปรแกรม Blastn พบว่าไอโซเลท 901 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces mexicanus* ซึ่งมีค่าความเหมือน (%similarity) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นสับสเตรททดแทนการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสูตรอาหาร ISP2 เพื่อผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสจาก *S. mexicanus* 901 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเลสระหว่างการใช้ แกลบ เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว และซังข้าวโพด ตามลำดับ เป็นสับสเตรท นั้น ซังข้าวโพดจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเลสสูงที่สุดเท่ากับ 23.10 ยูนิตต่อมิลลิกรัม รองลงมาคือ เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว และแกลบ ตามลำดับ จากนั้นเมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของซังข้าวโพดต่อการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลส พบว่าที่ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเลสสูงที่สุดเท่ากับ 28.14 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

การใช้ beef extract, peptone, baker yeast และกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนการใช้ yeast extract ในสูตรอาหาร ISP2 พบว่ากากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด

เนื่องจาก *S. mexicanus* 901 สามารถผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 30.54 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ peptone, yeast extract, baker yeast และ beef extract ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากถั่วเหลืองจาก 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็น 0.8, 1.2 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับในสูตรอาหาร ISP2 พบว่าที่ความเข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ *S. mexicanus* 901 จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไฮลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 28.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือความเข้มข้นเท่ากับ 1.2, 0.8 และ 0.4 ตามลำดับ

จากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไฮลาเนสที่อุณหภูมิและพีเอชต่างๆโดยใช้ไซแลนเป็นสับสเตรทพบว่า พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮลาเนสเท่ากับ 5.5 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการทนต่อพีเอชและอุณหภูมิพบว่าเอนไซม์ไฮลาเนสมีความเสถียรต่อพีเอชในช่วง 3-5 และสามารถทนอุณหภูมิได้ในช่วง 30-70 องศาเซลเซียส

ข้อเสนอแนะ

1. การนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ จะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต เอนไซม์ไฮลาเนสในถังหมักขนาดใหญ่ เพื่อให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮลาเนสที่สูงขึ้น และอาจทำการเพิ่มไออนหรือโลหะ เพื่อกระตุ้นให้ *S. mexicanus* 901 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงขึ้น

2. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไฮลาเนส นั้นเป็นการศึกษาในรูปของ crude enzyme ดังนั้นอาจมีการปนเปื้อนของสารอาหาร หรือเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่มีผลต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ไฮลาเนส ดังนั้นถ้าเอนไซม์ไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น จะทำให้ทราบถึงคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ถูกต้องมากขึ้น

3. การนำเอนไซม์ไปใช้จริงในโรงงานกระดาษในขั้นตอนการล้างเยื่อไม้ โดยเอนไซม์ที่ใช้ นั้นเป็น crude enzyme อาจทำให้มีเอนไซม์เซลลูเลสปนเปื้อนอยู่และเกิดการย่อยสลายเซลลูโลสในเนื้อไม้และส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณผลผลิตกระดาษได้ ดังนั้นจึงควรนำ crude enzyme ไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น อันจะส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนในเนื้อไม้เพิ่มมากขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2545. รายงานพลังงานของประเทศไทย

2545. แหล่งที่มา: http://www.dede.go.th/dede/_index.php?id=96, 19 กรกฎาคม

2557.

ดุชนี ธนะบริพัฒน์. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสจากเชื้อรา

Fusarium moniliforme TISTR 3175. รายงานการวิจัยในโครงการ BRT 2549: 64-73.

เพียรวิ มากสิน. 2544. การประยุกต์ใช้กลุ่มเอนไซม์ไฮโดรไลสทนด่างจาก alkaliphilic

Bacillus firmus K1 ในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษคราฟท์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

จักรกฤษณ์ เตชะอภัยกุล. 2548. การศึกษา multiple enzyme จากบาซิลลัสทนด่าง.

วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

จิตรลดา สุทธิกรอมร. 2550. การผลิตน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์และอนุพันธ์ของน้ำตาล

ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากไซแลนและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดย thermophilic *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

จิรนาถ บุญคง. 2543. การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนสและ

ไฮโดรไลสจาก alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2535. การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและไซแลนจาก

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรมโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenunits รหัส 4-45-IF. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสตร์). 26(3): 296-306.

สุมาลี อึ้งใจธรรม. 2539. **ไซแลเนสและปีตาไซโลสิดีสจาก *Streptomyces* spp. ที่ชอบร้อนและชอบต่าง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สัณฐ์ ศันจัญญ์ศักดิ์. 2554. **การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลเนสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* และการใช้ประโยชน์ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อานนท์ ประเสริฐศรี. 2541. **การผลิตเอนไซม์ไซแลเนสจากเชื้อรา *Humicola lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce ด้วยกระบวนการหมักแบบ solid state โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Alexander, M. 1977. **Introduction to Soil Microbiology**. 2nd ed. Wiley and Sons, New York.

Ander, P. 1994. **FEMS Microbiol. Rev.** Wiley and Sons, New York.

Anwar, S. and A. Garabed. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit Rev Biotechnol.** 17: 39-67.

Beg, Q.K., B. Bhushan, M. Kapoor and G.S. Hoondal. 2000. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. **Enzyme Microbiol Technol.** 27: 459-466.

Berg, B., B.V. Hofstan and G. Pettersson. 1972. Growth and cellulase formation by *Cellulivibrio fulvus*. **J Appl Bacteriol.** 35: 201-214.

Bisaria, B.S. 1991. Bioprocess of agro-residues to glucose and chemicals, pp. 187-223. In A.M. Martin (ed.). **Bioconversion of Waste Material to Industrial Products**. Elsevier. Appl Science London.

- Carlos, A.M.C., L.L.M. Meire, B.L. Angelica and F.S. Roberta. 2002. Production and properties of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. **Braz Arch Biol Tech.** 45: 413-418.
- Cazemier, A.E., J.C. Verdoes, A.J. Ooyen and H.J. Camp. 1999. Molecular and biochemical characterization of two xylanases-encoding genes from *Cellulomonas pachnodae*. **Appl Environ Microbiol.** 65: 4099-4107.
- Chandra, R.K. and T.S. Chandra. 1995. A cellulase-free xylanases from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri*. **Biotechnol Lett.** 17: 309-314.
- Charest, M.H., H. Antoun and C.J. Beauchamp. 2004. Dynamics of water-soluble carbon substances and microbial populations during the composting of de-inking paper sludge. **Biores Technol.** 91: 53-67.
- Chesterton, A.W. Company. 2011. **Pulp and paper**. Available Source: <http://www.chesterton.com/ENU/Industries/Pages/IndustryWiseProductList.aspx?ID=13>, April 10, 2013.
- Czoch, W.P. and M. Mordarski. 1988. Actinomycete Enzymes. In M. Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordaski, eds. **Actinomycetes in Biotechnology**. Academic Press, San Diego. 219-283.
- Ducros, V., S.J. Charnock, U. Derewenda, Z.S. Derewenda, Z. Dauter, C. Dupont, F. Shareck, R. Morosoli, D. Kluepfel and G.J. Davies. 2000. Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10. **J Biol Chem.** 275: 23030-23026.
- Ericksson, K. and M. Winell. 1968. Purification and characterization of a fungal β -mannanase. **Acta Chem Scan.** 22: 1924-1934.

- Evangelos T., M. Maria, C. Marianna, X. Charilaos and C. Paul. **Enzyme-aided extraction of bioactive components from biomass.** แหล่งที่มา: <http://www.chemeng.ntua.gr/biotechmass/extraction.html>, 3 มิถุนายน 2557.
- Filho E.X.F. 1998. **Recent research developments in microbiology.** Research Signpost. India.
- Ganji, R.K., P.J. Vithayathil and S.K. Murthy. 1989. Purification and characterization of two xylanases from *Chaetomium thermophile* var. *coprophile*. **Can J Microbiol.** 35: 836-824.
- Gessesse, A. and G. Mamo. 1999. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. **Enzyme Microb Tech.** 25: 68-72.
- Gilbert, H.J. and G.P. Hazlewood. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. **J Gen Microbiol.** 139: 184-194.
- Godfrey, T. and S. West. 1996. **Industrial Enzymology : The Application of Enzymes in Industry.** MacMillan, New York.
- Goodfellow, M. 1985. **Bacterial Systematics.** Blackwell Scientific, London.
- Goodfellow, M., S.T. Williams and M. Mordarski. 1988. **Actinomycetes In Biotechnology.** Academic Press, London.
- Gupta, A. and D. Madamwar. 1997. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulose and β -glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. **Biotech Progress.** 13(2): 166-169.

- Heck, J.X., S.H. Flores, P.F. Hertz and M.A.Z. Ayub. 2005. Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. **Process Biochem.** 40: 107-112.
- Hemlata, J.B., S.R. Sukalkar, S.M.Z. Uzma and T.A. Kadam. 2011. Production of xylanase by *Streptomyces rameus* grown on agricultural wastes. **Biotechnol Bioinf Bioeng.** 1(4): 505-512.
- Holmalahti, J., A.V. Wright and A.O. Raatikainen. 1994. Variations in the spectra of biological activities of actinomycetes isolated from different soils. **Lett Appl Microbiol.** 18: 1544-1546.
- Hurlbert, C.J. and F.L. Preston. 2001. Functional characterization of a novel xylanases from a corn strain of *Erwinia chrysanthemi*. **J Bacteriol.** 183: 2093-2100.
- Jan, H.D. and K.S. Chen. 2003. Production and characterization of thermostable cellulase from *Streptomyces* transformant T3-1. **World J Microbiol Biotechnol.** 19: 8-263.
- Kalakoutski, L.V. and N.S. Agre. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. **Bacteriol Rev.** 40: 469-524.
- Kang, K.M., J.P. Maeng and H.Y. Rhee. 1996. Purification and characterization of two xylanases from Alkalophilic *Cephalosporium* sp. strain RYM-202. **Appl Environ Microbiol.** 62: 3480-3482.
- Katz, M. and E.T. Reese. 1968. Production of glucose by enzymatic hydrolysis of cellulose. **Appl Microbiol.** 16: 419-420.

- Kenneth, T. 2012. **The Growth of Bacterial Populations.** แหล่งที่มา:
http://textbookofbacteriology.net/growth_3.html, 19 พฤษภาคม 2557.
- Kitsada W. and P. Pairoh. 2000. Purification and characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. PC22. **J Sci Chula Univ.** 25: 245-258.
- Koki, H. 1999. Alkaliphiles: Some application of their products for biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev.** 63: 735-750.
- Kubata, K.B., K. Takamizawa, K. Kawai, T. Suzuki and H. Horitsu. 1995. Xylanase IV, an exoxylanase of *Aeromonas caviae* ME-1 which produces xylotetraose as the only low-molecular-weight oligosaccharide from xylan. **Appl Microbiol Biotechnol.** 61: 1666-1668.
- Kulkarni, N. and M. Rao. 1996. Application of xylanase from alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59 in biobleaching of bagasse pulp. **J Biotechnol.** 51: 167-173.
- Leartslarus, C., K. Ratanakhanokchai and K.L. Kyu. 2002. Optimization of extracellular cellulase-free xylanase production by alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1. **KMUTT Research and Development Journal.** 25: 3-13.
- Li, K., P. Azadi, R. Collins, J. Tolan, S.J. Kim and L.K. Eriksson. 2000. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme Microbiol Technol.** 27: 89-94.
- Marta C.T.D., C.A.P. Ana, P.P. Edilberto, N.P. Alexandre and T.F. Telma. 2000. Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*. **Braz J Microbiol.** 31: 90-94.

- McCarthy, A.J. and S.T. Williams. 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment-a review. **Gene**. 115: 189-192.
- Miller, G.M. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem**. 31: 426-428
- Miyadoh, S. 1997. **Atlas of Actinomycetes**. Asakura Publishing. Tokyo, Japan.
- Morales, P., A. Madarro, J. A. Perez-Gonzalez, J. M. Sendra, F. Pinaga and A. Flors. 1993. Purification and characterization of alkaline xylanases from *Bacillus polymyxa*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 59: 1376-1382.
- 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: 722-741.
- Okazaki, W., T. Akiba, K. Horikoshi and R. Akahoshi. 1985. Purification and characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* spp. **Agr Biol Chem**. 49: 2033-2039.
- Pang, P.K. and C.C. Ibrahim. 2005. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM All via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. **Songklanakarin J Sci Technol**. 27: 325-326.
- Puls, J. 1993. **Bioconversion of Forest and Agricultural Residues**. Willingford. CAP International.
- Qureshy, A.F., L. A. Khan and S. Khanna. 2000. Expression of *Bacillus circulans* Teri-42 xylanases gene in *Bacillus subtilis*. **Enzym Microb Tech**. 27: 227-223.

- Rius, N. and G.J. Loren. 1998. Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of neutrophilic and alkalophilic gram-positive bacteria. **Appl Environ Microbiol** 64: 1344-1349.
- Roberto D.S., S.L. Ellen, W.M. Carolina, M.M. Mariana, K.P. Yong and G. Eleni. 2005. Production of xylanase and cmcase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantilacus* miehe. **Braz J Microbiol**. 36: 235-241.
- Sa-Pereira, P., A. Mesquita, J. Duarte, M. Barros and M. Costa-Ferreira. 2002. Rapid production of thermostable cellulase-free xylanases strain of *Bacillus subtilis* and its properties. **Enzym Microb Tech**. 30: 924-933.
- Salles, B.C., R.B. Cunha, W. Fontes, M.V. Sousa and E.X.F. Filho. 2000. Purification and characterization of a new xylanases from *Acrophialophora nainiana*. **Appl Environ Microbiol**. 54: 1344-1349.
- Seyis, I. and N. Aksoz. 2005. Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. **Braz Arch Biol Tech**. 48: 187-193.
- Shah, A.K., S.S. Sidid, A. Ahmad and M.V. Rele. 1999. Treatment of bagasse pulp with cellulase-free xylanase from an alkalophilic *Bacillus* sp. Sam-3. **Biores Technol**. 68: 133-140.
- Shao, W., S. Deblois and J. Wiegel. 1995. A high-molecular-weight, cell-associated xylanases isolated from exponential growing *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485. **Appl Environ Microbiol**. 61: 937-940.
- Shirling, E.D. and D. Gortlieb. 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species. **Int J Syst Bacteriol**. 16: 313-340.

- Silva, R.D., E.S. Lago, C.W. Merheb, M.M. Macchione, Y.K. Park and E. Gomes. 2005. Production of xylanase and cmcase in solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantilacus* miehe. **Braz J Microbiol.** 36: 235-241.
- Singh, S., B. Pillay and B. Prior. 2000. Thermal stability of β -xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strain. **Enzym Microb Tech.** 26: 502-508.
- Stalbrand, H., D.S. Mansfield, N.L. Saddler, G.D. Kilburn, R. Antony, J. Warren and R.N. Gilkes. 1998. Analysis of molecular size distributions of cellulose molecules during hydrolysis of cellulose by recombinant *Cellulomonas fimi* β -1.4-Glucanase. **Appl Environ Microbiol.** 64: 2374-2379.
- Suurnakki, A., M. Tenkanen, L. Buchert and L. Viikari. 1997. Hemicellulase in the bleaching of chemical pulp. **Adv Biochem Eng Biotechnol.** 57: 261-287.
- Tan, L.U.L., P. Mayer and J.H. Saddler. 1987. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus auranticus*. **Canadian J Microbiol.** 33: 689-692.
- Tanticharoen, M. and S. Cheevadhanarak. 1984. The Production of Cellulase and Xylanase from Cellulolytic Microorganisms Isolated from Pineapple Anaerobic DigesterII. Activities Studies, pp. 493-505. **Annual report of ASEAN working group on the management and utilization of food waste material.** Asean Committee on Science and Technology. Australia.
- Tseng, J.M., N.M Yap, K. Ratanakhanokchai, L. K. Kyu and T. S. Chen. 2002. Purification and characterization of two cellulase free xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. **Enzym Microb Technol.** 30: 590-595.

- Tuomela, M., M. Vikman, A. Hatakka and M. Itavaara. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Biores Technol.** 72: 169-183.
- Viikari, L., M. Ranua, A. Kantelinen and L.M. Sundquist. 1986. **Biobleaching with Enzymes.** Stockholm.
- Watson, N.E., B.A Prior and P. Lategan. 1984. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from d-xylose by *Pichia tannophilus*. **Enzym Microb Technol.** 6: 451-455.
- Wen-Jing, L., W. Hong-Tao, Y. Shi-Jian, W. Zhi-Chao and N. Yong-Feng. 2005. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. **J Gen Appl Microbiol.** 51: 353-360.
- Winterhalter, C. and W. Liebl. 1995. Two extremely thermostable xylanase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritime* MSB8. **Appl Environ Microbiol.** 61: 1810-1815.
- Wong, K.K.Y., L.U.L. Tan and I.N. Saddler. 1988. Multiplicity of p-I,4-xylanase in microorganisms : function and application. **Rev Microbiol.** 52: 305-317.
- Zhao, J., X. Li, Y. Qu and P. Gao. 2002. Xylanases pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw. **Enzym Microb Technol.** 30: 734-740.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายบัฟเฟอร์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Berg's medium (Berg *et al.*, 1972)

NaNO ₃	0.20	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.05	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	กรัม
MnSO ₄ ·2H ₂ O	0.002	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.002	กรัม
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.002	กรัม
Xylan (beechwood, sigma)	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.2 ด้วยไฮเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.2 ISP2 (Shirling and Gottlieb, 1966)

Yeast extract	0.4	กรัม
Malt extract	0.1	กรัม
Dextrose	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.2 ด้วยไฮเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.3 ISP3 (Shirling and Gottlieb, 1966)

Oatmeal	20	กรัม
Agar	18	กรัม
Trace salt solution	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.2 ด้วยไฮเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Trace salt solution

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ต้มข้าวโอ๊ต ให้เดือดในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร กรองกากออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นเติม Trace salt solution ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.2 ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

*หมายเหตุ ในการเก็บรักษาเชื้อลงในอาหารแข็งจะมีการเติมวุ้น 1.5 กรัม

2. สารละลายบัฟเฟอร์ (Sorensen buffer system)

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1 สารละลายโซเดียมซิเตรท-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (Sodium citrate-HCl buffer)

สารละลาย A: เตรียมสารละลายโซเดียมซิเตรท (Na-citrate) ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งโซเดียมซิเตรท 6.80 กรัม ละลายในน้ำ 1.0 ลิตร

สารละลาย B: เจือจางกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์

นำสาร A มาผสมกับสาร B และปรับพีเอชตามที่ต้องการ

2.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer)

สารละลาย A: เตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.40 กรัม ละลายในน้ำ 1.0 ลิตร

สารละลาย B: เตรียมสารละลายโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 6.80 กรัม ละลายในน้ำ 1.0 ลิตร

นำสาร A มาผสมกับสาร B ปรับพีเอชตามที่ต้องการ

2.3 สารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (glycine-NaOH buffer)

สารละลาย A: เตรียมสารละลายไกลซีน-โซเดียมคลอไรด์ (Glycine-NaCl) ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งไกลซีน (Glycine) 3.75 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2.92 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร

สารละลาย B: เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 กรัม ละลายในน้ำ 1.0 ลิตร

นำสาร A มาผสมกับสาร B ปรับพีเอชตามที่ต้องการ



1. สีย้อมแกรมและวิธีการย้อมแกรม

1.1 สีย้อมแกรม

1.1.1 Ammonium oxalate crystal violet

Crystal violet 2 กรัม

Ethanol 95% 20 กรัม

ละลาย Crystal violet และ Ethanol ให้เข้ากัน จากนั้นเติม Ammonium oxalate aqueous solution เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ 80 มิลลิลิตร

1.1.2 Gram's iodine

Crystal's iodine 1 กรัม

Potassium iodine 2 กรัม

น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

ละลาย Crystal's iodine และ Potassium iodine ในน้ำกลั่นให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยากับแสง

1.1.3 Ethanol 95%

1.1.4 Safranin water solution

สารละลาย Safranin 10 มิลลิลิตร

(น้ำ Safranin 2.5 % ละลายใน ethanol 95%)

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำสารละลาย Safranin มาผสมกับน้ำกลั่น นำไปกรองผ่านกระดาษกรองก่อนใช้

1.2 การย้อมสีแกรม (Gram Staining)

เริ่มจากการเตรียมสเมียร์เชื้อแอคติโนมัยสีทจากอาหารแข็ง โดยนำห้วงเยื่อเชื้อไปเผาไฟจนแดงรอให้เย็น จากนั้นนำห้วงเยื่อเชื้อมาจุ่มลงในอาหารเหลวที่มีเชื้ออยู่ 2-3 ห้วง นำมาเกลี่ยให้เชื้อมีการแผ่กระจายเป็นวงเล็กๆ ลงบนสไลด์ที่สะอาดปราศจากคราบไขมัน รอให้เชื้อที่ทำการสเมียร์ไว้แห้ง จากนั้นนำไปทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ เพื่อให้เซลล์ยึดติดกับแผ่นสไลด์ให้แน่น โดยนำไปลงผ่านเนื้อเปปโลไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยที่ทำการสเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาที เทสี crystal violet ที่ค้างไว้ออกจากสไลด์ นำไปชะด้วยสารละลายไอโอดีน และหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยที่ทำการสเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเทสารละลายไอโอดีนที่อยู่บนสไลด์ออก แล้วนำไปชะด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จนไม่มีสีม่วงละลายออกมาไม่ควรใช้เวลาในการชะนานเกิน 20 วินาที จากนั้นนำไปผ่านน้ำเบาๆ ชั้บให้แห้ง ด้วยกระดาษที่สะอาด ย้อมทับโดยการหยดสี safranin O ให้ท่วมรอยที่ทำการสเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาที เทสี safranin O ที่อยู่บนสไลด์ทิ้ง แล้วล้างผ่านน้ำเบาๆ และชั้บให้แห้ง จากนั้นนำไปตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์

2. วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1.1 สารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959)

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

เตรียมโดยละลาย Sodium hydroxide ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆเติม 3,5-Dinitrosalicylic acid คนให้ละลายจนหมด และเติม Sodium potassium tartrate คนให้ละลาย นำไปเติมน้ำกลั่นให้ครบ 2.0 ลิตร

หมายเหตุ: ในการเตรียมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid ต้องเตรียมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2.1.2 สารละลายสับสเตรท

Birch wood xylan	1	กรัม
Buffer solution	100	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายสับสเตรท 1% โดยละลายไซแลนในสารละลายบัฟเฟอร์
ฟิเชชี่ที่ต้องการ

2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

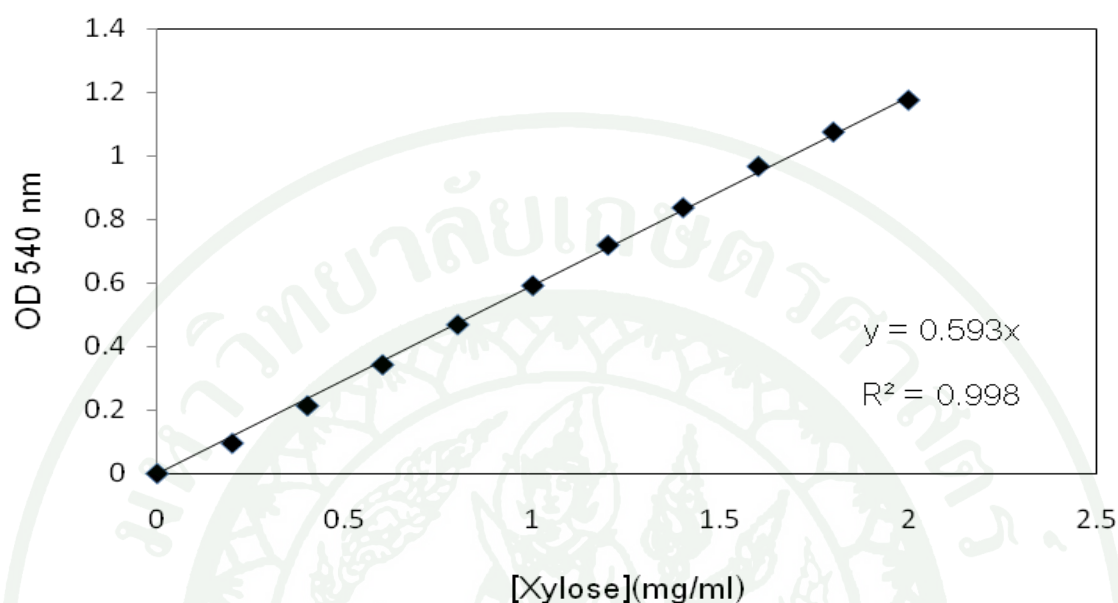
เตรียมสารละลายน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งน้ำตาลไซโลส 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร และทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆดังตาราง

ตารางผนวกที่ ข1 ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส

[xylose] ($\mu\text{g/ml}$)	Xylose solution (ml)	H ₂ O (ml)
0	0	0.5
400	0.1	0.4
800	0.2	0.3
1,200	0.3	0.2
1,600	0.4	0.1
2,000	0.5	0

นำสารละลายน้ำตาลไซโลสที่เจือจางแล้วแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร
เติมสารละลาย DNS 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที ให้ DNS ทำ
ปฏิกิริยากับน้ำตาลไซโลสอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำไปแช่แข็งน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยานาน 5 นาที

เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำไปสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานการหาปริมาณของน้ำตาลไซโลสโดยวิธี DNS

2.3 วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส (ดัดแปลงมาจาก Miller, 1959)

วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS (Dinitrosalicylic acid) ซึ่งใช้น้ำตาลไซโลสเป็นมาตรฐาน โดยการเตรียมสารละลายไซแลนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยนำไซแลน 1 กรัม มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 นำมา 0.1 มิลลิลิตร และเอนไซม์ที่ผ่านการเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทำการผสมสารละลายทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันนำไปปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์ไซลานเนส ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไซแลน จนได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

2.4 วิเคราะห์หาคีจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

การวิเคราะห์หาคีจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นมาตรฐาน และทำการเตรียมสารละลายสับสเตรทเซลลูโลสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยละลายในสารละลายซีเตรทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.0 นำมาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางเหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทำการผสมสารละลายทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวิเคราะห์หาคีจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจนได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

3. การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาถ่ายลงในอาหาร ISP2 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 18-24 ชั่วโมง

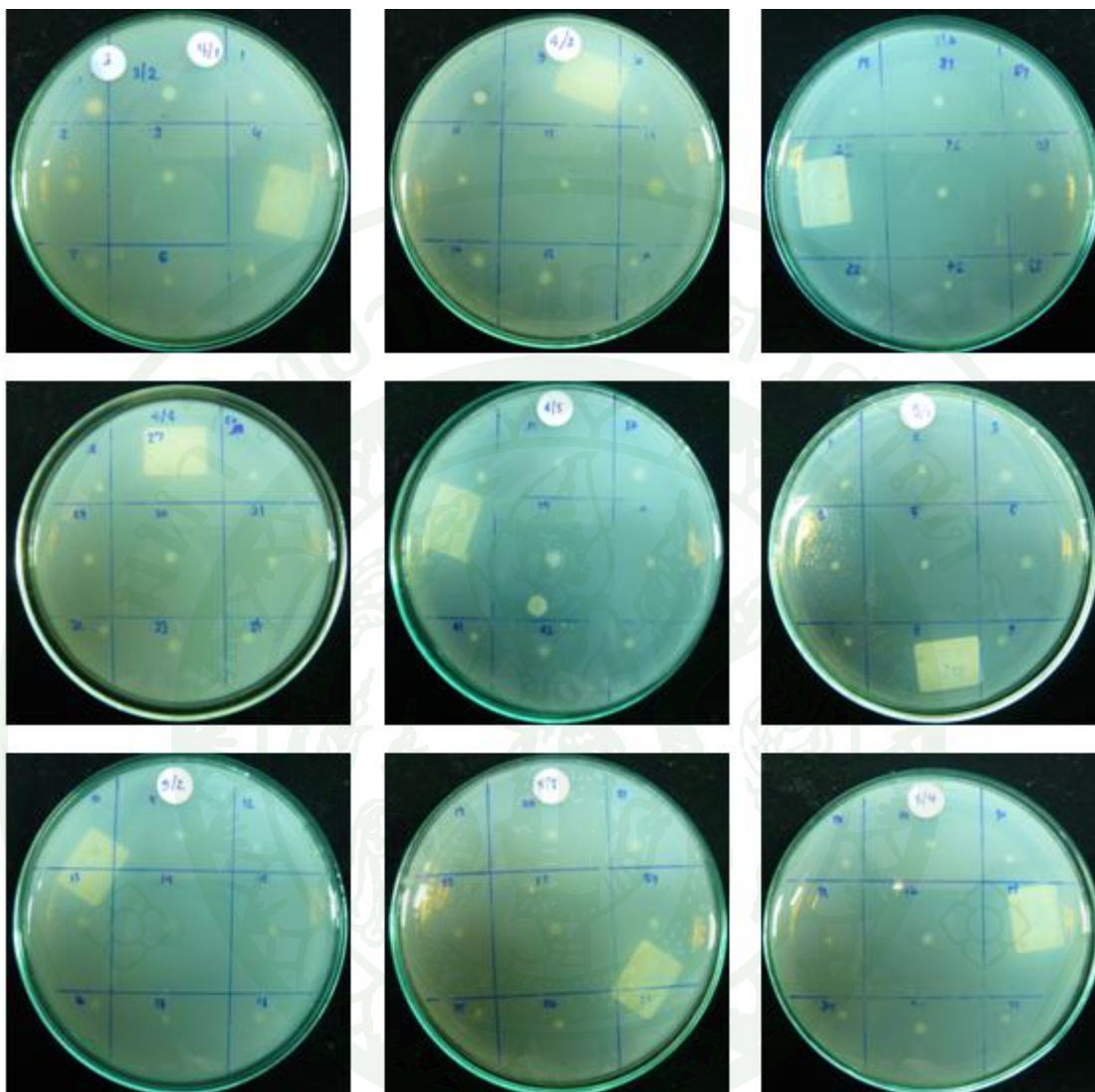
4. การเตรียมแหล่งคาร์บอน

นำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรคือ แกลบ เปลือกข้าวโพด ชังข้าวโพด และฟางข้าว มาทำการล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกต่างๆที่ติดมาออกให้หมด นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดไฟฟ้า และนำไปร่อนบนตะแกรงขนาด 40 เมช (mesh) เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย จากนั้นนำวัสดุเหลือทิ้งที่ผ่านการร่อนไปล้างในน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง เพื่อกำจัดน้ำตาลที่อยู่ในโครงสร้างและนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman) ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ (vacuum pump) นำไปอบแห้งอีกครั้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

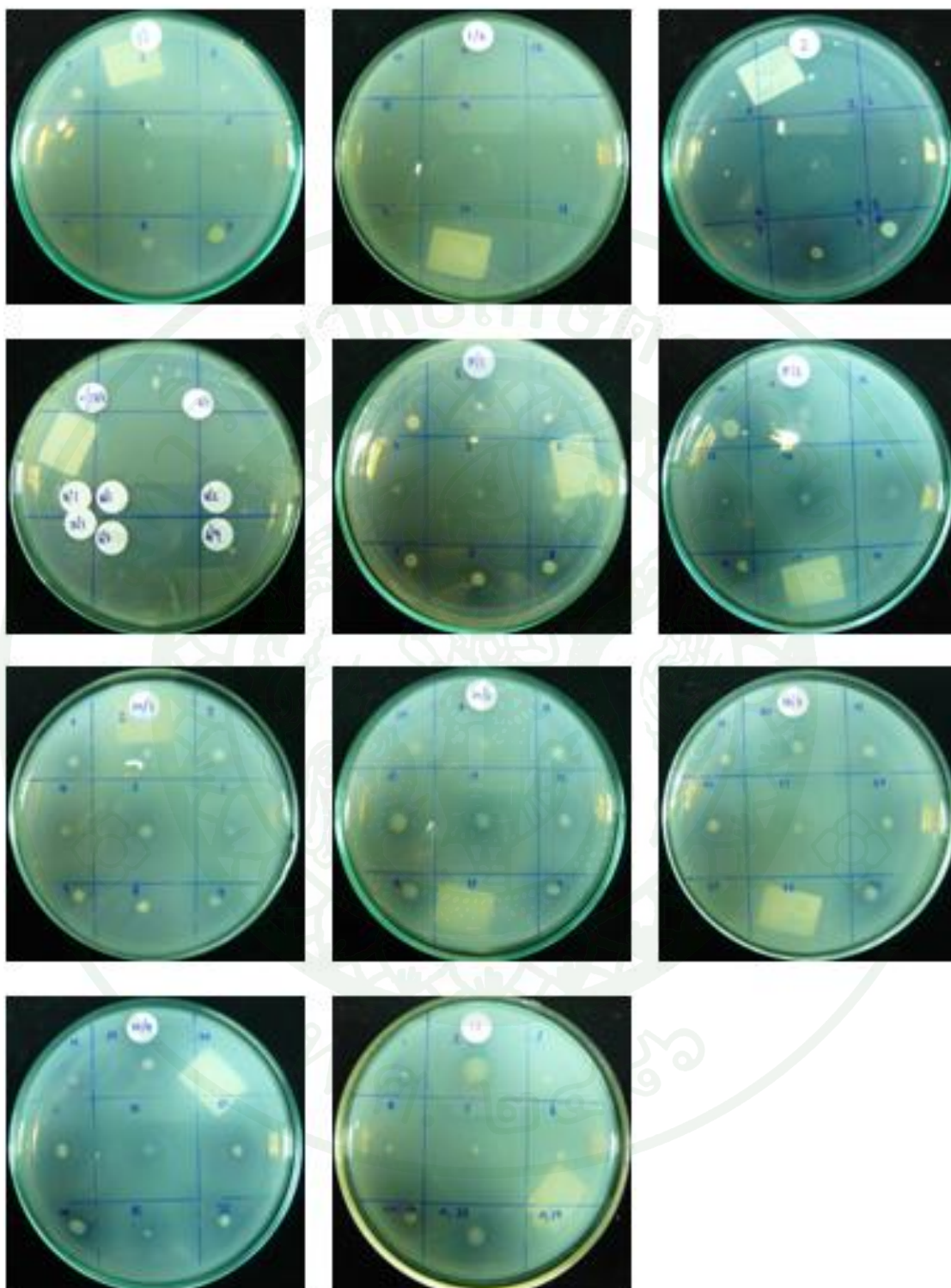


ภาคผนวก ค
ข้อมูลจากการทดลอง

คัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคลาเนส

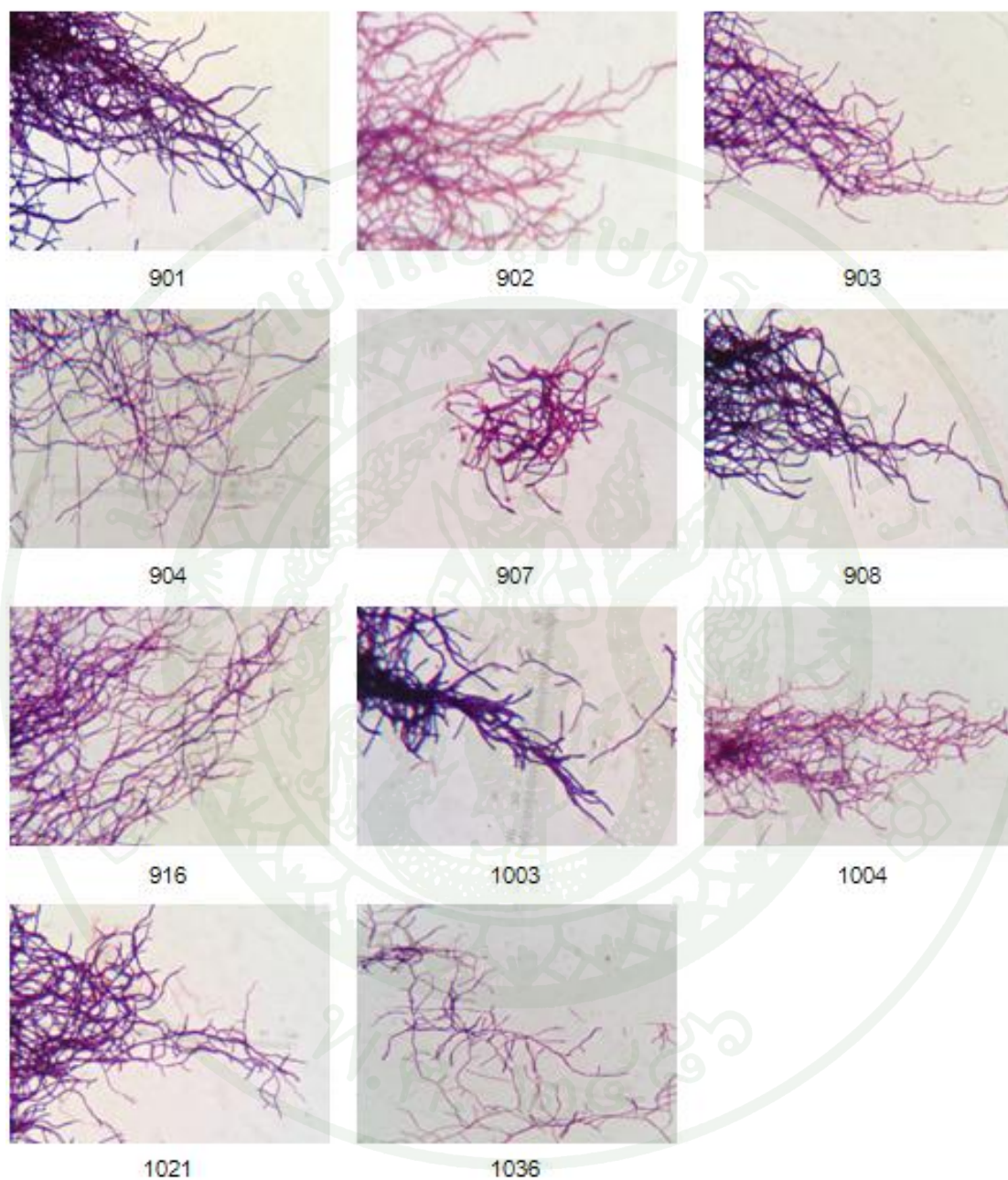


ภาพผนวกที่ ค1 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำในบริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี โดยคัดแยกบนอาหาร Berg's medium ที่มีไคเลนเป็นสับสเตรท อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน



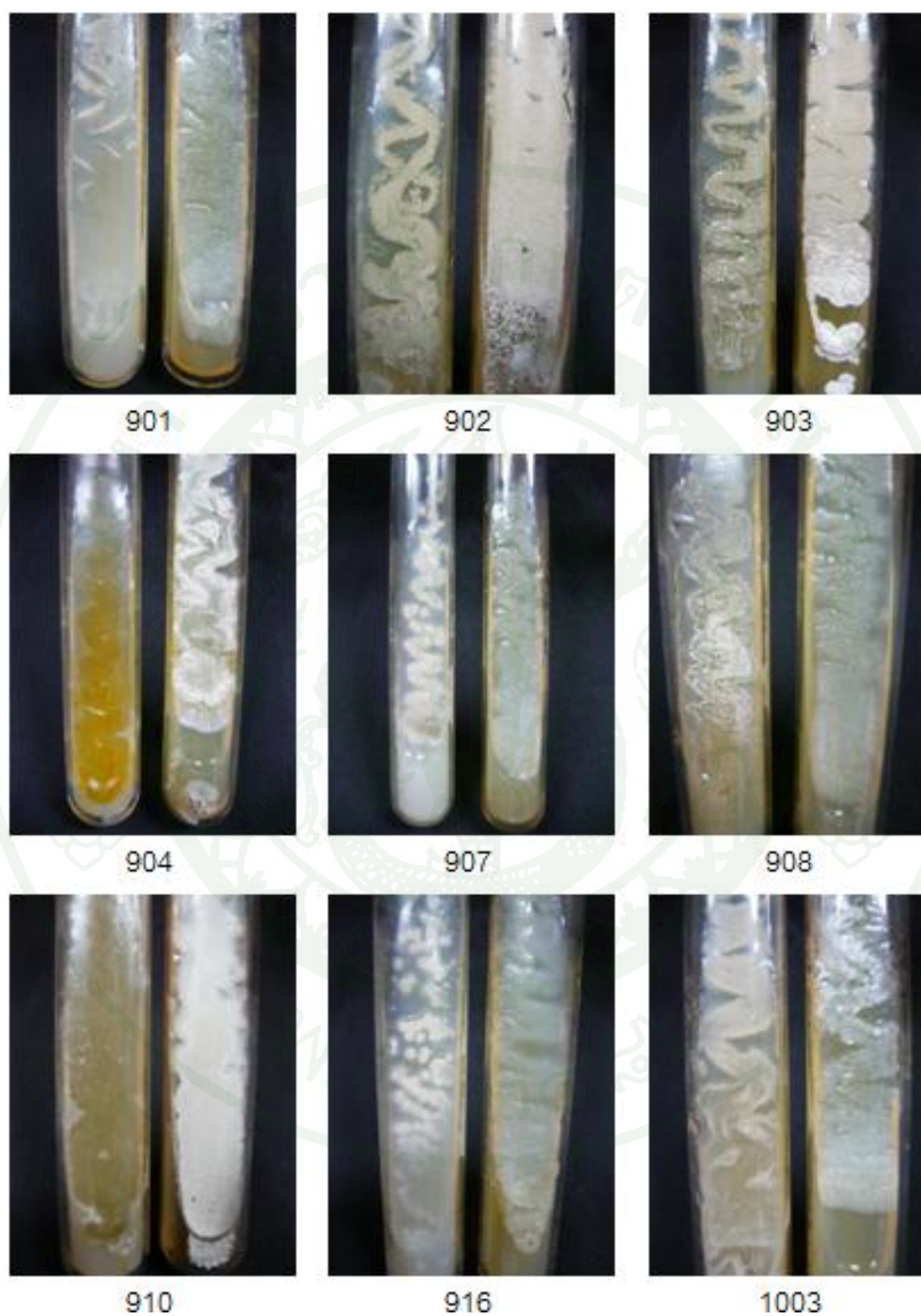
ภาพผนวกที่ ค2 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำในบริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี โดยคัดแยกบนอาหาร Berg's medium ที่มีไซแลนเป็นสับสเตรท อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

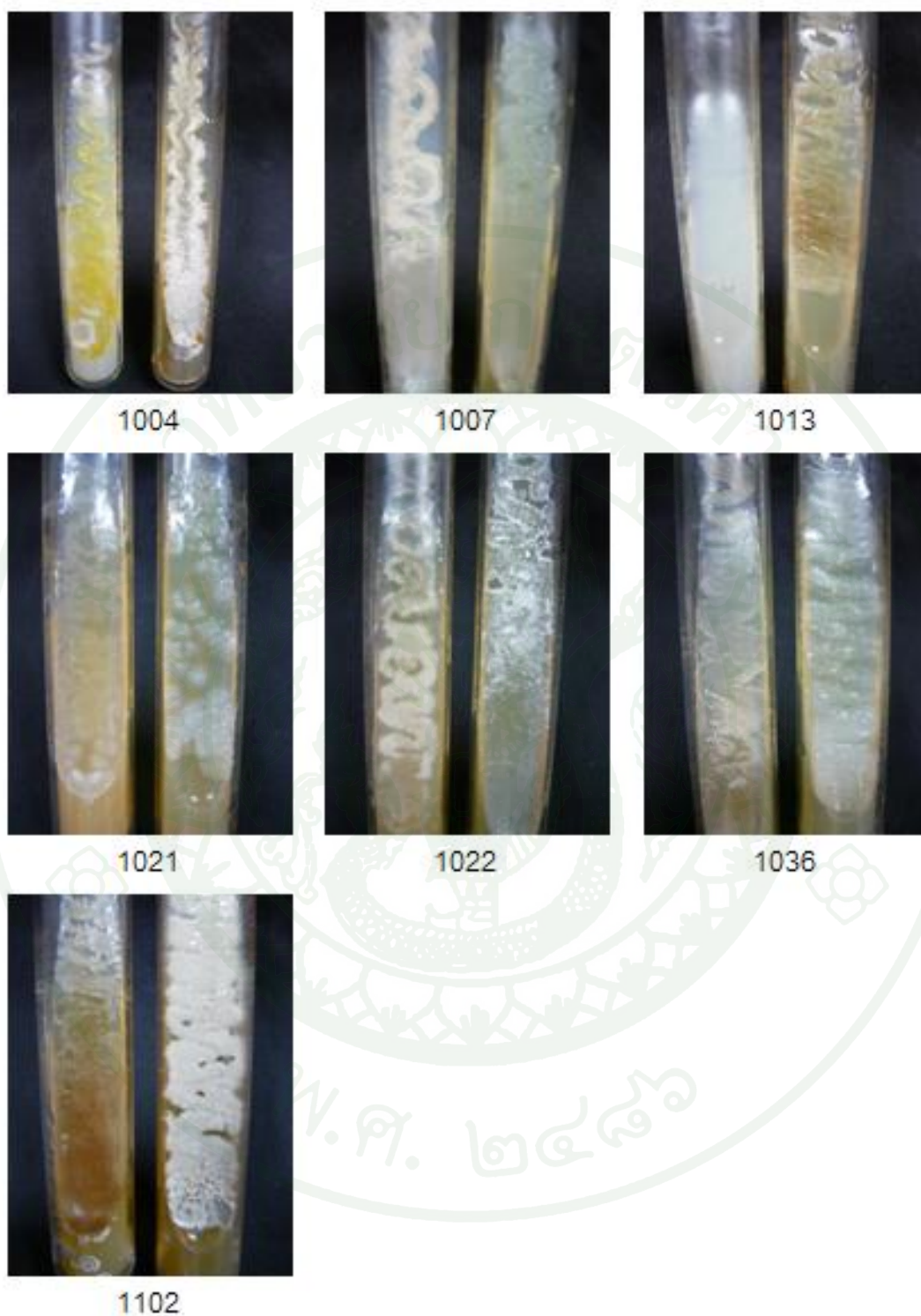


ภาพผนวกที่ ค3 ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ของไฮโซเลทต่างๆ ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำในบริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็ง ISP2 และ ISP3



ภาพผนวกที่ ค4 ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลตต่างๆ บนอาหารแข็ง
ISP3 (ขาว) และ ISP3 (ซ้าย)



ภาพผนวกที่ ค4 (ต่อ)

ตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA

GGGTGGAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGA
GGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC
GCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCG
GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCCG
GGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGA
TCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
GAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCA
ACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGC
ATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGA
AACATCCAGAGATGGGTGCCCCCTTGTTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTG
TCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTC
GTGTTGCCAGCAGGCC

ภาพผนวกที่ ค5 ลำดับเบสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ของแอคติโนมัยซีท

ไอโซเลท 901

ตารางผนวกที่ ค1 กิจกรรมของเอนไซม์ไคลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากเชื้อแอคติโนมัยสีที่คัดแยกได้จากน้ำเสียของ บริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี ทั้งหมด 7 ไอโซเลท บนอาหารเหลว ISP2 ที่มีไคเลน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตอร์ท บ่มที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน

เวลา (วัน)	ไอโซเลท						
	901	903	910	1004	1013	1021	1102
0	0.25±0.06	0.37±0.06	0.19±0.07	0.32±0.05	0.28±0.08	0.82±0.04	0.39±0.06
1	0.21±0.01	0.29±0.07	0.35±0.04	1.03±0.02	0.12±0.05	0.24±0.01	0.31±0.07
2	1.87±0.16	5.68±0.07	4.08±0.07	2.65±0.09	0.25±0.05	1.47±0.06	0.03±0.08
3	18.50±0.07	7.33±0.05	4.46±0.16	7.14±0.16	0.39±0.10	0.83±0.10	0.84±0.12
4	17.70±0.12	7.16±0.04	4.07±0.09	7.91±0.06	0.51±0.06	1.64±0.11	0.52±0.11
5	18.46±0.11	6.81±0.19	3.93±0.16	7.61±0.10	4.03±0.16	1.50±0.07	0.99±0.14

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค2 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของแอคติโนมัยสีททั้ง 7 ไอโซเลท ในอาหาร
 เหลว ISP2 ที่มีสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์
 เป็นสับสเตรท

ไอโซเลท	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
A901	2.45±0.15
A903	1.98±0.07
A910	1.36±0.07
A1004	2.09±0.06
A1013	1.69±0.09
A1021	0.98±0.02
A1102	0.55±0.11

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *S. mexicanus* 901 ต่อการสร้างเอนไซม์
ไซลานเนส เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ที่มีไซแลน 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็น
สับสเตรท

เวลา (ชั่วโมง)	การเจริญของ <i>S. mexicanus</i> 901 (ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	0.29	1.06±0.08
3	0.32	1.07±0.14
6	0.33	1.15±0.09
9	0.60	1.24±0.13
12	2.75	1.25±0.13
15	4.28	1.51±0.14
18	4.95	1.45±0.21
21	5.40	1.06±0.24
24	6.36	2.52±0.06
27	7.80	2.95±0.26
30	9.79	4.67±0.12
36	14.37	5.47±0.07
42	14.42	7.10±0.15
48	14.07	7.41±0.09
54	11.97	7.64±0.15
60	10.03	24.56±0.28
66	7.53	23.20±0.11
72	3.62	22.70±0.04
96	2.55	22.76±0.06
120	2.54	23.20±0.04

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค4 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จาก *S. mexicanus* 901 โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	แหล่งคาร์บอน				
	แกลบ	ไซแลน	เปลือกข้าวโพด	ฟางข้าว	ซังข้าวโพด
0	0.63±0.22	0.63±0.21	0.35±0.19	0.49±0.06	0.69±0.04
1	0.35±0.06	1.27±0.11	0.22±0.23	0.25±0.22	0.32±0.06
2	3.12±0.29	2.03±0.11	5.59±0.15	2.73±0.07	6.78±0.16
3	6.97±0.06	13.23±0.24	11.56±0.07	10.16±0.27	14.10±0.35
4	6.26±0.01	19.86±0.11	17.99±0.13	12.92±0.17	23.10±0.09
5	5.31±0.24	17.16±0.06	18.27±0.15	10.00±0.09	21.58±0.09

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค5 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จาก *S. mexicanus* 901 โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2

เวลา (วัน)	ความเข้มข้นของซังข้าวโพด (เปอร์เซ็นต์)			
	0.5	1.0	1.5	2.0
0	0.36±0.13	0.54±0.03	0.56±0.05	0.32±0.08
1	0.36±0.03	0.90±0.11	0.54±0.03	0.56±0.05
2	21.44±0.00	20.74±0.03	25.16±0.13	24.13±0.37
3	23.29±0.19	21.87±0.24	25.05±0.03	25.71±0.26
4	24.71±0.34	21.47±0.00	26.55±0.08	27.88±0.00
5	24.32±0.32	21.53±0.03	27.09±0.48	28.14±0.05

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค6 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จาก *S. mexicanus* 901
เมื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆโดยเลี้ยงในอาหาร ISP2

เวลา (วัน)	แหล่งไนโตรเจน				
	Yeast Extract	Beef Extract	Peptone	Soy bean meal	Baker Yeast
0	1.24±0.11	0.86±0.05	0.96±0.19	0.73±0.03	0.77±0.03
1	0.54±0.08	0.30±0.11	0.30±0.05	1.61±0.05	7.53±0.05
2	0.37±0.05	12.69±0.13	17.48±0.08	15.05±0.08	20.52±0.03
3	1.61±0.11	9.93±0.06	23.05±0.11	24.56±0.03	16.81±0.03
4	11.04±0.13	9.14±0.00	21.68±0.03	29.38±0.16	10.40±0.08
5	14.75±0.03	9.89±0.00	19.71±0.05	30.54±0.11	11.30±0.13

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค7 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จาก *S. mexicanus* 901
เมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหาร ISP2

เวลา (วัน)	ความเข้มข้นของกากถั่วเหลือง (เปอร์เซ็นต์)			
	0.4	0.8	1.2	1.6
0	0.15±0.05	0.04±0.11	0.13±0.19	0.04±0.00
1	0.17±0.08	1.20±0.26	1.26±0.08	1.27±0.05
2	3.28±0.19	9.74±0.05	12.98±0.34	16.47±0.08
3	18.81±0.00	23.98±0.21	28.61±0.24	28.99±0.03
4	21.59±0.26	23.50±0.00	27.19±0.29	28.78±0.11
5	23.42±0.05	23.25±0.29	25.80±0.08	28.48±0.05

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค8 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสจาก *S. mexicanus* 901

พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
3.0	4
4.0	69
4.5	91
5.0	94
5.5	100
6.0	83
7.0	76
8.0	60
9.0	53
10.0	30
11.0	23
12.0	14

ตารางผนวกที่ ค9 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลลาเนสจาก *S. mexicanus* 901

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมเอนไซม์ลิพัส (เปอร์เซ็นต์)
30	27
40	50
50	78
60	92
65	94
70	100
75	83
80	36
90	7

ตารางผนวกที่ ค10 ความเสถียรของเอนไซม์ไฮโดรไลสจาก *S. mexicanus* 901 ที่พีเอชต่างๆ

พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
3.0	97
4.0	97
5.0	100
6.0	79
7.0	60
8.0	58
9.0	67
10.0	73
11.0	62
12.0	56

ตารางผนวกที่ ค11 ความเสถียรของเอนไซม์ไฮโดรไลสจาก *S. mexicanus* 901 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
30	96
40	98
50	100
60	95
70	15
80	4
90	3

ตารางผนวกที่ ค12 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสจาก *S. mexicanus* 901 จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 โดยแปรผันแหล่งคาร์บอน จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

C-source	Subset for alpha = .05				
	1	2	3	4	5
husk	6.2573				
straw		12.9228			
Corn			17.9930		
husk				19.8603	
Xylan					23.1002
Corn cob					
Sig.	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางผนวกที่ ค13 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสจาก *S. mexicanus* 901 จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 โดยแปรผันความเข้มข้นของซังข้าวโพด ด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

[corn cob] (%)	Subset for alpha = .05			
	1	2	3	4
1.0	21.5289			
0.5		24.3208		
1.5			27.0939	
2.0				28.1432
Sig.	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางผนวกที่ ค14 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจาก *S. mexicanus* 901 จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจน ด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

N-source	Subset for alpha = .05				
	1	2	3	4	5
Beef extract	9.8932				
Baker yeast		11.2985			
Yeast eztract			14.7461		
Peptone				19.7114	
Soy bean meal					30.5415
Sig.	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางผนวกที่ ค15 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจาก *S. mexicanus* 901 จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 โดยแปรผันความเข้มข้นของกากถั่วเหลืองด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

[soy bean meal] (%)	Subset for alpha = .05		
	1	2	3
0.8	23.2528		
0.4	23.4214		
1.2		25.8010	
1.6			28.4804
Sig.	.340	1.000	1.000

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวชุตินันท์ ศิริสุนทรสกุล
 เกิดวันที่ 29 กรกฎาคม 2531
 สถานที่เกิด จังหวัดกรุงเทพมหานคร
 ประวัติการศึกษา วท.บ (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 ตำแหน่งปัจจุบัน -
 สถานที่ทำงานปัจจุบัน -
 ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -
 ทักษะการศึกษาที่ได้รับ -