การผลิตอะซีทิลเอสเทอเรส โดย *Streptomyces* sp. PC22

นางสาว เวฬุรีย์ ทองคำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1477-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACETYL ESTERASE PRODUCTION BY *Streptomyces* sp. PC22

MISS WARULEE THONGKAM

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1477-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22
โดย นางสาวเวฬุรีย์ ทองคำ
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวฬุรีย์ ทองคำ : การผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22 (ACETYL ESTERASE PRODUCTION BY *Streptomyces* sp. PC22) อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ 95 หน้า. ISBN: 974-53-1477-3

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโซ่กิ่งของไซแลนจาก *Streptomyces* sp. PC22 ผลการแปรชนิดของไซแลนที่มีขายทางการค้าได้แก่ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ช และไม้บีช พบว่าไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดโดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเมื่อใช้ร่วมกับแหล่งอินทรีย์หรืออนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ พอลิเพพโทน หรือ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.33 และ0.24 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วันที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นคือ 9 และ10 ตามลำดับ ผลการแปรวัสดุทางการเกษตรที่มี ไซแลนเป็นองค์ประกอบ เมื่อใช้เป็นแหล่งคาคาร์บอนแทนไซแลน ได้แก่ รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า ฟางข้าว เปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด กากเมล็ดฝ้าย และขี้เลื่อย พบว่าเปลือกข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อใช้ร่วมกับแหล่งอินทรีย์ หรืออนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ พอลิเพพโทน ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือ NH_4Cl ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.075 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้แอคติวิตีใกล้เคียงกับการใช้ไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.31 และ 0.29 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน ที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 9 จากการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์พบว่าอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือที่ 60 องศาเซลเซียส และ 6.5 มีความเสถียรสูงถึงอุณหภูมิ คือ 50 องศาเซลเซียส และจะสูญเสียแอคตีวิตี เกือบสมบูรณ์เมื่อบ่มที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างคือ 4.0 -9.0

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต..................................

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา..............................

ปีการศึกษา 2547 ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.........................

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4472413923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: ACETYL ESTERASE / *Streptomyces* sp. PC22

WARULEE THONGKUM : ACETYL ESTERASE PRODUCTION BY *Streptomyces* sp. PC22 THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 95 pp. ISBN: 974-53-1477-3

Optimal production conditions for acetyl esterase, one of the xylan debranching enzymes, by *Streptomyces* sp. PC22 were investigated. Among various sources of commercial available xylan which were from oat spelts, birchwood beechwood, birchwood xylan was the best carbon source. Using birchwood xylan at the optimal concentration of 1 % (w/v) with a suitable organic or inorganic nitrogen source which was polypeptone or $(NH_4)_2HPO_4$ at the concentration equivalent to 0.05% nitrogen (w/v) the maximum enzyme activity of 0.33 and 0.24 $U.ml^{-1}$ were obtained, respectively, when cultivated for 3 days at the initial pH of 9 and 10, respectively. When xylan-containing agricultural materials which were wheat bran, rice bran, rice straw, corn hulls, corn cobs, cotton seed hulls and saw dust were use as a carbon source instead of the commercial xylan , corn hull was found to be the best. Using corn hulls at the optimal concentration of 1.5% (w/v) with a suitable organic nitrogen which was polypeptone at the concentration equivalent to 0.05% nitrogen (w/v) or inorganic nitrogen which was NH_4Cl at the concentration equivalent to 0.075% nitrogen (w/v), activities obtained were comparable to those of with the commercial xylan by giving the maximum values of 0.31 and 0.29 $U.ml^{-1}$, respectively when cultivated for 2 days at the initial pH of 9. Preliminary study on the enzyme properties showed that it had temperature and pH optima of 60°C and 6.5, respectively, it was stable to temperature up to 50 °C and almost completely lost its activity when preinucubated for 30 min at 70°C. It was stable to a wide range of pH from 4.5-9.0

Department Microbiology	Student's signature..............................
Field of study Industrial Microbiology	Advisor's signature..............................
Academic year 2004	Co-advisor's signature........................

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

กราบขอพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนในงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ .... ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญตาราง .... ซ

สารบัญรูป .... ฌ

บทที่

1. บทนำ 1
2. ปริทรรศน์วรรณกรรม 5
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง 22
4. ผลการทดลอง 34
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 74

รายการอ้างอิง 82

ภาคผนวก 88

ภาคผนวก ก 89

ภาคผนวก ข 91

ภาคผนวก ค 92

ภาคผนวก ง 93

ภาคผนวก จ 94

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 95

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

2.1 แสดงปริมาณหมู่อะซีทิลในไซแลนไม้เนื้อแข็งชนิดต่างๆ.................................... 6

2.2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ไซโลสในการผลิตแอกอฮอล์...................................... 10

2.3 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส.............................. 13

2.4 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก จุลินทรีย์ต่าง.. 18

2.5 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ ต่างๆ.. 20

4.1 ปริมาณอะซีทิลเอสเทอเรสทั้งหมดภายในเซลล์และในน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหาร เลี้ยงเชื้อปริมาตร 60 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน... 34

4.2 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชุดที่ใช้ในการแปร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 7.0-11.0 และปริมาณเอนไซม์ที่สร้างขึ้นที่ค่า pH ที่เหมาะสม.. 61

4.3 ชุดองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสภายใต้ภาวะการแปรอุณหภูมิบ่มเชื้อที่ 30-50 องศาเซลเซียส และปริมาณเอนไซม์ที่สร้างขึ้นที่อุณหภูมิบ่มเชื้อ 40 องศาเซลเซียส........................... 64

4.4 สมบัติเบื้องต้นของอะซีทิลเอสเทอเรส... 73

5.1 แสดงชนิดของจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและระยะเวลาการเลี้ยงต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส.. 77

5.2 แสดงอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ อะซีทิลเอสเทอเรสโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.. 80

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้าง ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส	1
1.2	การย่อยสลายไซแลนด้วเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายไซแลน	3
2.1	องค์ประกอบทางเคมีของไซแลนจากไม้เนื้อแข็ง	6
2.2	แสดงโครงสร้างไซแลนที่พบในพืชทั่วไป	7
2.3	แสดงการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส	8
2.4	แสดงการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลิทอล	10
2.5	การหมักน้ำตาลไซโลสไปเป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์	11
2.6	แสดงการเปลี่ยนไซโลสเป็น furfural	12
4.1	ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส	36
4.2	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส	37
4.3	รูปแบบการเจริญของ *Streptomycese* sp. PC22	39
4.4	ผลการเปรียบเทียบอายุของหัวเชื้อต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22	40
4.5	ผลของความเข้มข้นของหัวเชื้อต่อการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22	42
4.6	ผลของไซแลนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.5 % ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส จาก *Streptomyce*s sp. PC22	44
4.7	ผลของความเข้มข้นไซแลนจากไม้เบิร์ชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp.PC22	45
4.8	ผลการทดลองใช้วัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับไซแลนจากไม้เบิร์ชที่ความเข้มข้น 1%เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22	48

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.9 ผลของความเข้มข้นเปลือกข้าวโพดต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22………………………………………………………… 49

4.10 ผลของระยะเวลาต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22 เลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 1.5 เปอร์เซ็นต์เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน…………... 50

4.11 ผลของอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ และพอลิเพพโทนเทียบเท่ากับไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.05 %ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส เมื่อใช้ไซแลนจากไม้เบิร์ช 1 %เป็นแหล่งคาร์บอน…………………………………………………………………...…. 52

4.12 ผลของอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ และพอลิเพพโทนเทียบเท่ากับไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.05% ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดความเข้มข้น 1.5% เป็นแหล่งคาร์บอน……………………………………………………….. 54

4.13 ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นไนโตรเจนต่างๆ เปรียบเทียบกับพอลิเพพโทนที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.05%ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสเมื่อใช้ 1% ไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอน……………………………………………... 56

4.14 ผลของ NH_4Cl ที่ความเข้มข้นไนโตรเจนต่างๆ เปรียบเทียบกับพอลิเพพโทนที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.05% ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสเมื่อใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน……………………………………………………………….. 57

4.15 ผลของระยะเวลาบ่มเชื้อต่อการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรส เมื่อมีไซแลนจากไม้เบิร์ช 1 % เป็นแหล่งคาร์บอนและ $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 0.05%.. 59

4.16 ผลของระยะเวลาบ่มเชื้อต่อการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรส เมื่อมีไซแลนจากเปลือกข้าวโพด 1.5% เป็นแหล่งคาร์บอนและ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 0.075%.. 60

4.17 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส เมื่อใช้ไซแลนจาก ไม้เบิร์ช 1%เป็นแหล่งคาร์บอน…………………………………… 62

4.18 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส เมื่อใช้เปลือกข้าวโพด 1.5%เป็นแหล่งคาร์บอน……………………………………… 63

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป (ต่อ)

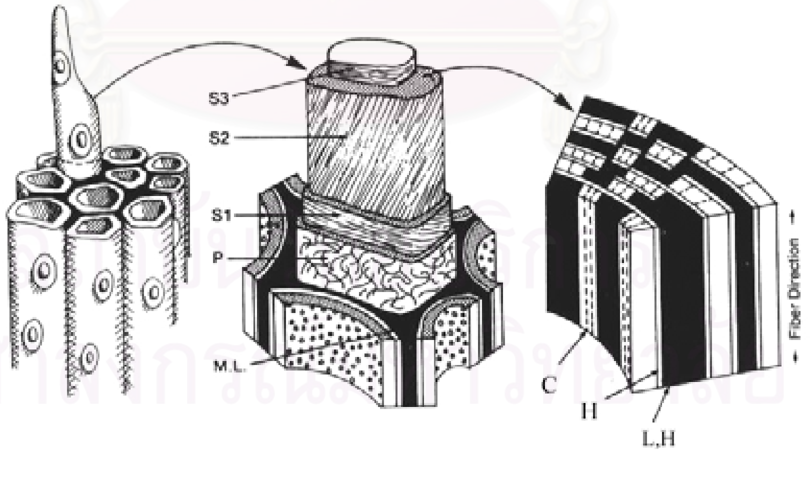
รูปที่		หน้า
4.19	ผลอุณหภูมิต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสในอาหารที่มีไซแลนจากไม้เบิร์ช 1% เป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม……………………………..	65
4.20	ผลอุณหภูมิต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพด 1.5%เป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม……………………………..	66
4.21	ผลอุณหภูมิต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22…..	68
4.22	ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก*Streptomyces* sp. PC22……………………………………………………………………………..	69
4.23	ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่ออุณหภูมิ………………………………………	71
4.24	ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อความเป็นกรดด่าง……………………………	72

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เซลล์พืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในธรรมชาติ ประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด ดังนี้ ชนิดแรกคือ เซลลูโลส (cellulose) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ บีตา -1,4- ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic) ที่เป็นสายตรง มีสูตรทั่วไปคือ $(C_2H_{10}O_5)_n$ พบประมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ชนิดที่สองคือ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลเพนโตส และ/หรือน้ำตาลเฮกโซส ได้แก่ ไซแลน กลูแคน แมนแนน ชนิดสุดท้ายคือ ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทพอลิฟีโนลิก (polyphenolic) ซึ่งแต่ละหน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะอีเทอร์ (Wong และคณะ, 1988) โดยองค์ประกอบทั้งสามจะมีความสัมพันธ์กันดังรูป



รูปที่ 1.1 โครงสร้าง ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส โดย C คือ เซลลูโลส, H คือ เฮมิเซลลูโลส และ L,H คือ ชั้นของลิกนินกับเฮมิเซลลูโลส ซึ่งเป็นส่วนประกอบของท่อลำเลียงน้ำในผนังชั้นที่สองของพืช S1-S3 คือ ผนังชั้นที่สอง P คือ ผนังชั้นแรก M.L. คือผนังชั้นกลาง (Kirk และCullen, 1998)

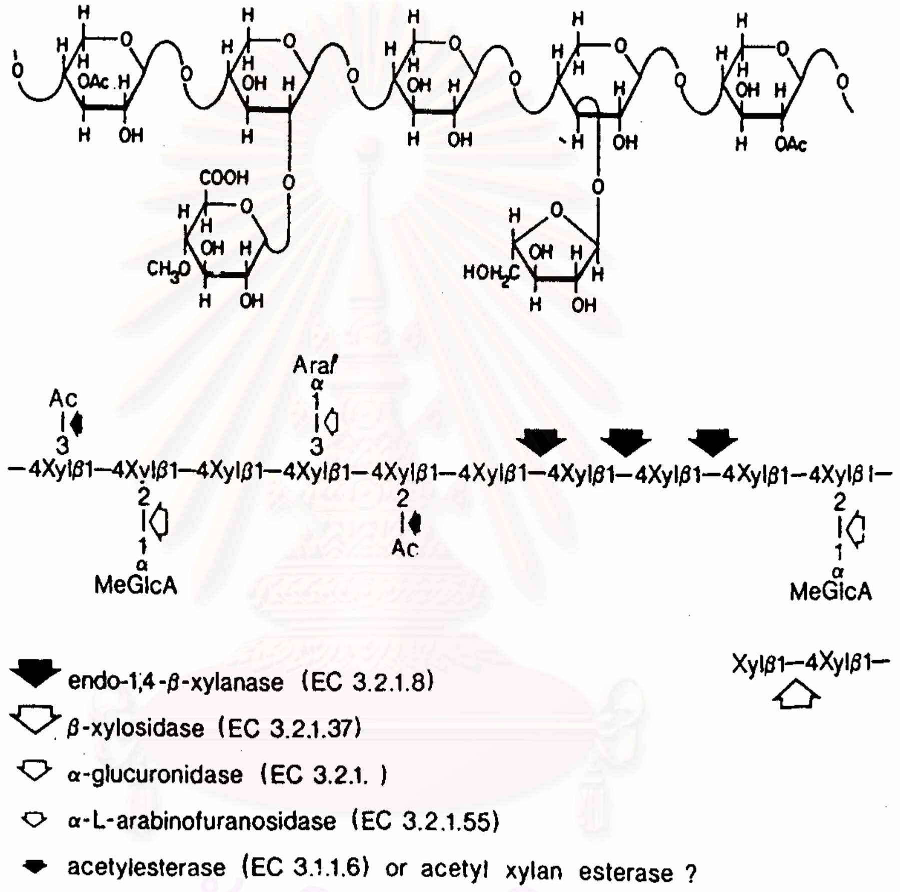
ไซแลนจัดเป็นเฮมิเซลลูโลสที่พบมากที่สุดในพืชโดยเป็นองค์ประกอบหลักของผนังชั้นที่ 2 ของพืช โดยพืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิดจะสร้างเซลล์ชั้นที่ 2 ที่มีลักษณะหนาเมื่อพืชเจริญเติบโตเต็มที่ อาจพบไซแลนได้บ้างในผนังชั้นที่หนึ่งของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งไซแลนที่พบในพืชแต่ละชนิดจะมีโครงสร้างหลักเหมือนกัน แต่จะแตกต่างกันที่บริเวณโซ่กิ่ง ปัจจุบันได้มีการศึกษาการย่อยสลายไซแลนเพื่อนำกลับมาใช้ประโยชน์เนื่องจากไซแลนเป็นทรัพยากรธรรมชาติ ที่สามารถใช้ได้ไม่มีวันหมด (Wong และคณะ 1988)

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถทำได้โดยใช้สารเคมี (chemical hydrolysis) และการย่อยด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน (Tsao และ Chiang,1983)

การย่อยสลายไซแลนด้วยสารเคมีคือ การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง โดยในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ จะต้มไม้ชิ้นเล็กๆ ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูงเพื่อกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสบางส่วน จากนั้นจะนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษโดยใช้ คลอรีน และ คลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide) ซึ่งพบว่าจะเกิดสารพิษที่เป็นสารประกอบของคลอรีนขึ้นซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก (Clarke และคณะ,1997)

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์จะมีความจำเพาะมากกว่าสารเคมี และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผลิตผลจากการย่อยสลายสามารถนำไปใช้ผลิตสารอื่นๆ ที่เกิดประโยชน์ได้การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์นั้นจะต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกันเรียกว่า เอนไซม์กลุ่มย่อยสลายไซแลนมีเอนไซม์ดังต่อไปนี้ ไซแลเนส (endo-β-1,4 Xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) ทำหน้าที่สลายพันธะ บีตา-ดี-ไซโลซิดิก ในสายหลักของไซแลนแบบสุ่ม (Saddler, 1993) โดยจะตัดโพลิเมอร์ของไซแลนสายยาวได้เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ และน้ำตาลไซโลส จากนั้นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์จะถูกย่อยต่อด้วยเอนไซม์อื่นๆ เช่น บีตาไซโลซิเดส (β-Xylosidsae หรือ β-1,4-Xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.37) ซึ่งจะย่อยสลายพันธะ บีตา-ดี-ไพราโนไซด์ทีละ1 หน่วยในสายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์หรือสายหลักของไซแลนจากบริเวณปลายสายด้าน นอนรีดิวซ์ได้เป็นน้ำตาลไซโลส แต่เนื่องจากสายของไซแลนจะมีหมู่ข้างเคียงหลายชนิดการย่อยสลายไซแลนอย่างสมบูรณ์จึงต้องสลายหมู่ข้างเคียงออกด้วยโดยมีเอนไซม์ดังต่อไปนี้ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส (α-L-arabinofuranosidase ;EC 3.2.1.55) ซึ่งย่อยสลายพันธะ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ แอลฟา-ดี-กลูคูโรโนสิเดส (α-D-glucuronidase ; EC 3.2.1.) สลายพันธะแอลฟา-1,4- ระหว่างแอลฟา-ดี-กลูคูโรนิค (α-D-glucuronic acid) หรือ 4-โอ-เมทธิล-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด (4-o-methyl glucuronic acid) กับสายหลัก และอะซีทิล(ไซแลน)เอสเทอเรส

(acetyl(xylan)esterase ; EC 3.1.1.6.) จะย่อยสลายพันธะบีตา-1,2 และ บีตา-1,3 ที่เชื่อมหมู่อะซีทิลกับสายหลักหรือไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดอะซีติก (Beg และคณะ 2001) โดยแผนภาพรวมการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้แสดงดังรูปที่ 1.2



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1.2 การย่อยสลายไซแลนด้วเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายไซแลน (Biely,1985)

Ac	แทน	หมู่อะซีทิล
Araf	แทน	แอล-อะราบิโนฟิวราโนส
MeGlcA	แทน	4-โอ-เมธิล-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด
Xyl	แทน	ดี-ไซโลส

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาอะซีทิลเอสเทอเรสซึ่งเป็นหนึ่งในเอนไซม์ย่อยสลายโซ่กิ่งของไซแลนจาก *Streptomyces* sp. PC22 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างสูง รวมถึงสามารถสร้างไซแลนเนสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Ungchaithum และ Pinphanichakarn, 1998)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาปัจจัยและภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสจากเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 และศึกษาสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ที่ได้

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22

2. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22

3. ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

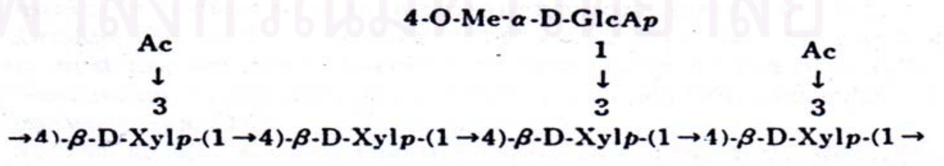
ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ไซแลน

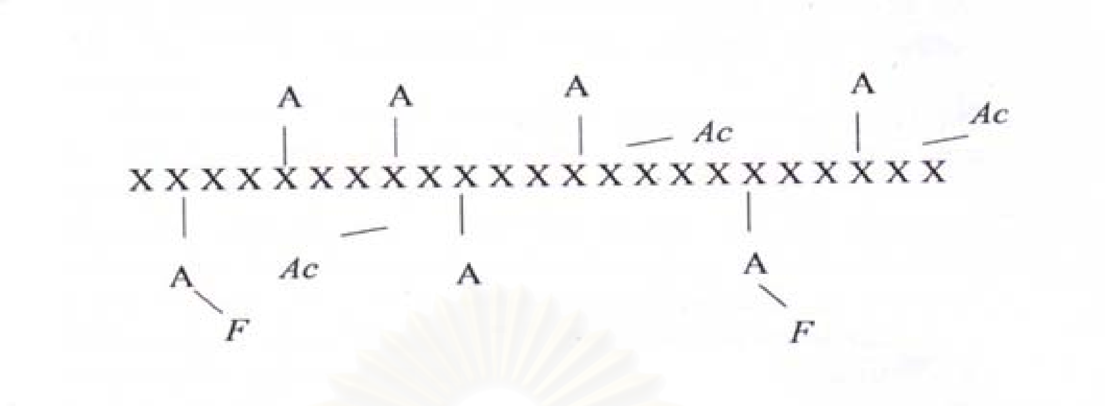
ไซแลนเป็นเฮมิเซลลูโลสประเภทหนึ่ง ที่ทำหน้าที่เชื่อมประสานชั้นของเซลลูโลสและลิกนิน โดยเชื่อมกับชั้นของลิกนินด้วยพันธะโควาเลนท์ และเชื่อมกับชั้นเซลลูโลสด้วยพันธะนอน-โควาเลนท์ หน้าที่หลักคือทำการป้องกันการย่อยสลายชั้นเซลลูโลสจากเอนไซม์เซลลูเลส (Beg และคณะ, 2001) ไซแลนพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น หญ้า เฟิร์น มอส ไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง ไซแลนเป็นสายของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ บีตา-(1,4)-ดี- ไซโลไพราโนส ซึ่งจะมีหมู่ข้างเคียง มาเชื่อมต่อที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 และ 3 หมู่ข้างเคียงที่มาเชื่อมต่อ ได้แก่ แอลฟา-แอล-อะราบิโนส แอลฟา-กลูคูโรนิคแอซิด หมู่อะซีทิล และอาจมีหมู่เฟอร์รูริล มาเกาะอยู่ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 2.1 - 2.3 ไซแลนจากพืชแต่ละชนิดมีหมู่ข้างเคียงชนิดต่างๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.1 ได้แสดงถึงปริมาณที่แตกต่างกันของหมู่อะซีทิลในไซแลนจากไม้เนื้อแข็งชนิดต่างๆ (Linden และคณะ, 1990) ในไม้เนื้อแข็งจะมีอัตราส่วนของ น้ำตาลไซโลสและหมู่อะซีทิลเป็น 10 ต่อ 7 (Kantelinen และคณะ, 1993) ส่วนหญ้าและธัญพืช เช่น ฟางข้าวสาลี เปลือกเมล็ดฝ้าย ก็พบว่ามีหมู่อะซีทิลเป็นหมู่ข้างเคียงเช่นกันแต่มีปริมาณต่ำกว่าของไม้เนื้อแข็ง (Mcdermid และคณะ, 1990) ส่วนไซแลนจากไม้เนื้ออ่อนบางชนิดพบว่ามีหมู่อะซีทิลเป็นหมู่ข้างเคียงประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ (Maijala ,2000) บางชนิดก็ไม่พบหมู่อะซีทิลเป็นหมู่ข้างเคียง (Basaran และ Hang, 2000) หน้าที่หลักของหมู่อะซีทิลคือการปกป้องไม่ให้สายหลักของไซแลนถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส ซึ่งมีรายงานว่าไซแลนที่มีหมู่อะซีทิลมาก การย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ก็ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ย่อยสลายสายหลัก และอะซีทิลเอสเทอเรสมากขึ้น (Mcdermid และคณะ, 1990)

ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณหมู่อะซีทิลในไซแลนไม้เนื้อแข็งชนิดต่างๆ โดย Samara, 1992 (อ้างถึงโดย Linden และคณะ, 1994)

ชนิดของไม้เนื้อแข็ง	ปริมาณหมู่อะซีทิล (% น้ำหนักต่อน้ำหนัก)
Aspen	3.4
Balsa	4.2
Basswood	4.2
Beech	3.9
Yellow Birch	3.3
White Birch	3.1
Paper Birch	4.4
American Elm	3.9
Shellbark Hickory	1.8
Red Maple	3.8
Sugar Maple	3.2
Mesquite	1.5
Overcup Oak	2.8
Southern Red Oak	3.3
Tan Oak	3.8



รูปที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของไซแลนจากไม้เนื้อแข็ง (Hon และ Shiraishi, 1990)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างไซแลนที่พบในพืชทั่วไป (Kanauchi และ Bamforth, 2003)

X	แทน	ไซโลส
A	แทน	หมู่อะราบิโนส
F	แทน	หมู่ เฟอร์ริล
Ac	แทน	หมู่อะซิทิล

2.2 อะซีทิล(ไซแลน)เอสเทอเรส (EC 3.1.1.6.)

อะซีทิลเอสเทอเรส ถูกจัดว่าเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายผนังเซลล์พืชโดยในปี 1963, Frohwein และคณะ (อ้างถึงโดย Linden และคณะ, 1994) ได้ค้นพบเอนไซม์อะซีทิลเอสเทอเรสย่อยสลายซับสเตรสชนิดต่างๆ ที่มีหมู่อะซีทิลเป็นองค์ประกอบ เช่น acetyl-mannose, acetyl-glucose, acetyl-maltose และ acetyl-cellobiose พบว่าซับสเตรทเหล่านั้นถูกย่อยสลายได้ ในปี 1981 Williams และ Withers ได้รายงานถึงการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสอีกครั้ง จากการคัดแยกแบคทีเรียมากกว่า 100 สายพันธุ์จากลำไส้ของสัตว์ พบว่ากว่า 30 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้นั้นมีความสามารถในการย่อยสลายไซแลนได้และตรวจพบว่ามีแอคติวิตีของเอสเทอเรสอยู่ด้วย อย่างไรก็ตามแอคติวิตีของเอสเทอเรสต่อการย่อยสลายอะซีทิลไซแลนยังไม่ได้รับการสนใจมากนักจนกระทั่งในปี 1985 Biely ได้รายงานถึงการทำงานของ อะซีทิล (ไซแลน) เอสเทอเรส (EC 3.1.1.6.) เป็นครั้งแรก

2.2.1 หน้าที่ของอะซีทิลเอสเทอเรส

อะซีทิลเอสเทอเรสจัดเป็นเอนไซม์สำคัญชนิดหนึ่งในกลุ่มย่อยสลายหมู่ข้างเคียงของไซแลน โดยทำหน้าที่ในการสลายพันธะ บีตา -1,2 และ บีตา -1,3 ของหมู่อะซีทิลที่เชื่อมอยู่กับสายไซแลน ส่งผลให้เอนไซม์ย่อยสลายสายหลักเข้าย่อยสลายไซแลนได้ดีขึ้นผลผลิตที่ได้จากการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส คือ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลไซโลส และกรดอะซีติก (Johnson และคณะ, 1988) ซึ่งการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสแสดงดังรูปที่ 2.3

Acetyl esterase + H_2O

o - Acetyl-1,4-β-xylooligosaccharides ⟶ 1,4-β-xylooligosaccharides + acetic acid

รูปที่ 2.3 แสดงการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส (Johnson และคณะ, 1988)

2.2.2 การทำงานร่วมกันระหว่างอะซีทิลเอสเทอเรสและไซแลเนส

หมู่อะซีทิลมีหน้าที่ป้องกันสายไซแลนจากการย่อยสลายของเอนไซม์ และป้องกันไม่ให้ผนังเซลล์ของพืชถูกทำลาย จากการศึกษาการย่อยหญ้าแห้งในลำไส้ของสัตว์ พบว่า ไซแลนที่มีหมู่ข้างเคียงเป็นอะซีทิลจะถูกย่อยได้ยาก และยิ่งมีจำนวนหมู่อะซีทิลมากอัตราการย่อยสลายจะลดลง แต่เมื่อนำอะซีทิลไซแลนมาทำการสลายหมู่อะซีทิลออกก่อนด้วยสารเคมีพบว่า ไซแลนจะถูกย่อยสลายได้เพิ่มมากขึ้น และเช่นเดียวกันเมื่อทำการเตรียมไซแลนชนิดเดียวกันโดยใช้อะซีทิลเอสเทอเรสแทนสารเคมีพบว่าช่วยให้เกิดการย่อยสลายไซแลนได้ดีขึ้น Puls และคณะ (1991) รายงานว่าเมื่อนำอะซีทิล-4-O-เมทิลกลูคูโรโนไซแลน จากไม้บีชมาย่อยด้วยอะซีทิลเอสเทอเรสร่วมกับไซแลนเนส พบว่าจะถูกย่อยสลายได้ดีขึ้น พบน้ำตาลไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส เป็นจำนวนมาก ซึ่งมากกว่าการใช้ไซแลเนสเพียงชนิดเดียว เมื่อ Poutanen และคณะ (1990) ศึกษาถึงการทำงานของไซแลเนสร่วมกับอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Tricoderma reesei* พบว่าทั้งสองเอนไซม์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

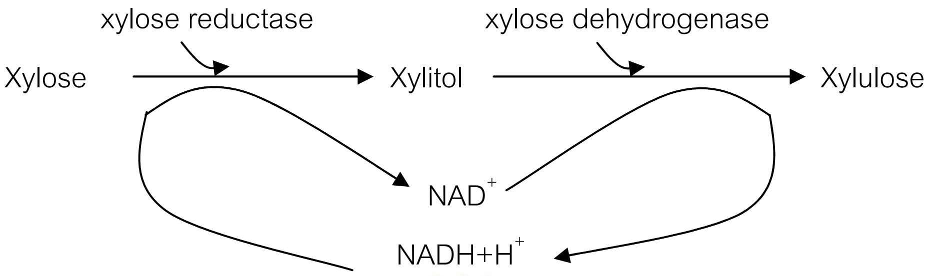
ส่งเสริมซึ่งกันและกันในการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก โดยพบว่าเมื่อใช้ อะซีทิลเอสเทอเรสดึงหมู่อะซีทิล จากไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ ออกจะทำให้ เกิดการย่อยสลายไซแลนได้อย่างสมบูรณ์ Biley และคณะ (1988) พบว่าหากไซแลนได้รับการย่อยสลายหมู่ข้างเคียงก่อนไซแลนเนสจะทำงานได้ดีขึ้น Poutanen และคณะ (1990) พบว่าหากไซแลนเนสทำงานก่อนจะช่วยทำให้อะซีทิลเอสเทอเรสทำงานได้ดีเช่นกัน

อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการทำงานอะซีทิลเอสเทอเรสร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลายสายหลักช่วยทำให้เกิดการย่อยสลายไซแลนได้อย่างสมบูรณ์จะได้ผลผลิตสุดท้ายคือ น้ำตาลไซโลส และกรดอะซีติกซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อีกมากมาย

<u>การใช้ประโยชน์จากน้ำตาลไซโลส</u>

เมื่อเกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ของไซแลนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้คือ น้ำตาลไซโลส ซึ่งสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย เช่น ในการผลิต high fructose corn sweetener โดยน้ำตาลไซโลสจะถูกนำไปใช้เป็นสารกระตุ้นในการสร้างเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส (D-Xylose ketol isomerase; EC 5.3.1.5) ซึ่งจะเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นน้ำตาลฟรักโทส (D-fructose) ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในอุตสหกรรมการผลิตขนมหวานและลูกกวาด น้ำตาลไซโลสยังถูกนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตไซลิทอล ซึ่งเป็นสารที่ใช้ทางการแพทย์ทดแทนน้ำตาลให้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน หรือใช้เพื่อให้ความหวานในลูกอม ยาสีฟัน หมากฝรั่ง โดยไม่ทำให้ฟันผุ (Uchida และคณะ, 1992) โดยมีกระบวนการเปลี่ยนดังรูปที่ 2.4 นอกจากนี้ยังใช้น้ำตาลไซโลสเป็นสารอาหารให้กับจุลชีพ เพื่อใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว และใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงโดยเป็นสารตั้งต้นในการผลิตแอลกอฮอล์ (Tsujibo และคณะ, 1990) ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตแอลกอฮอล์ และสารอื่นๆ ได้ แสดงดังตารางที่ 2.2 และการเปลี่ยนไซโลสเป็นแอลกอฮอล์แสดงดังรูปที่ 2.5

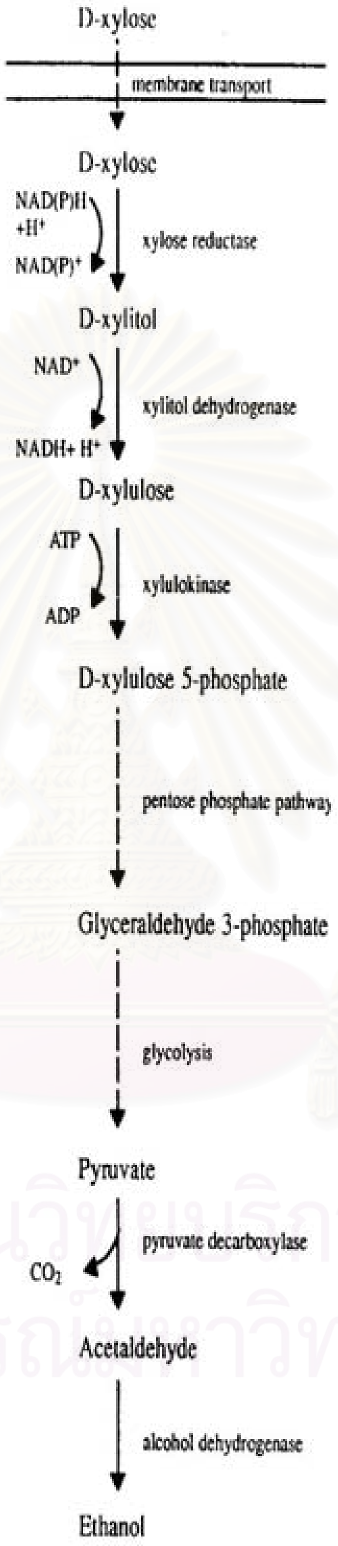
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.4 แสดงการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลิทอล (Walker, 1998)

ตารางที่ 2.2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ไซโลสในการผลิตแอลกอฮอล์

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aurebasidium pullulans	Biely, 1985
Candida shehatae	Biely, 1985
Fusarium oxysporum	Biely, 1985
Candida tenuis	Walker, 1998
Candida blankii	Walker, 1998
Pichia stipitis	Walker, 1998
Pichia segobiensis	Walker, 1998
Pachysolen tannophilus	Walker, 1998
Kluyeromycese marxianus	Walker, 1998
Kluyeromycese cellobiuvorus	Walker, 1998
Brettanomyces naardenensis	Walker, 1998
Debaryomyces nepalensis	Walker, 1998
Schizosaccharomyces pombe	Walker, 1998
Debaryomyces polymorpha	Walker, 1998
Schizosaccharomyces pombe	Walker, 1998



รูปที่ 2.5 การหมักน้ำตาลไซโลสไปเป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์ (Walker, 1998)

น้ำตาลไซโลสสามารถนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิต Furfural หรือที่รู้จักกันในชื่อ furfurol, furol และ furfuraldehyde เมื่อกลั่นได้ใหม่ๆ จะเป็นของเหลวไม่มีสี จุดติดไฟง่ายระเหยได้ และเมื่อสัมผัสกับอากาศหรือแสงสว่างจะมีกลิ่น ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเคมี เช่น นำมาทำเป็นตัวทำละลายในการทำให้บริสุทธิ์ของน้ำมันหล่อลื่นคุณภาพสูง, ยางสนและน้ำมันพืช และยังได้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต ไนลอน เรซิน น้ำมันเคลือบเงา การเปลี่ยนแปลงไซโลสเป็น furfural แสดงดังรูปที่ 2.6

$$\underset{\text{Xylose}}{C_5H_{10}O_5} \longrightarrow \underset{\text{Furfural}}{C_5H_4O_2} + 3H_2O$$

รูปที่ 2.6 การเปลี่ยนไซโลสเป็น furfural (การใช้ประโยชน์จากกากอ้อย, 2541)

2.2.3 การใช้ประโยชน์จากอะซีทิลเอสเทอเรสในด้านอื่นๆ

อะซีทิลเอสเทอเรสสามารถทำงานร่วมกับไซแลนเนสในการฟอกสีเยื่อกระดาษทำให้ช่วยลดใช้สารเคมี เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ และคลอรีน เนื่องจากการย่อยสลายไซแลนในเยื่อกระดาษจะทำให้ลิกนินซึ่งเกาะกับไซแลนหลุดออกไป ส่งผลให้กระดาษมีความขาวและสว่างมากขึ้น ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้นำอะซีทิลเอสเทอเรสไปใช้ในด้านอื่นๆ นอกเหนือจากการทำงานร่วมกับไซแลนเนส เช่นนำไปใช้ในการย่อยสลายหมู่อะซีทิลในคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆ รวมถึงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอีกด้วย ซึ่ง Biley และคณะ (2003) พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสสามารถดึงหมู่อะซีทิลจาก vinyl acetate ,triacetin และ ethyl acetate ในสภาวะที่มีน้ำน้อยได้ ผลการทดลองพบว่าได้ผลดีมาก ซึ่งเป็นการทดลองเริ่มต้นเพื่อเป็นทางเลือกในการดัดแปลงโอลิโกแซคคาร์ไรด์และพอลิแซคคาไรด์ต่างๆ ในอนาคต

2.3 แหล่งของอะซีทิลเอสเทอเรส

อะซีทิลเอสเทอเรสพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท ยีสต์ รา จุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักสร้างและปลดปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) แต่มีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์เก็บไว้ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus aculeatus	Leeuwen และคณะ, 1992
A. awamori	Koseki และคณะ, 2005
A. carneus	Biley และคณะ, 2004
A. clavatus	Linden และคณะ, 1994
A. japonicus	Linden และคณะ, 1994
A. oryzae	Altaner และคณะ, 2003
A. nidulans	Linden และคณะ, 1994
A. niger	Linden และคณะ, 1994
A. versicolor	Linden และคณะ, 1994
Aureobasidium pullulans	Biley และคณะ, 2004
Bacillus pumilus	Degrassi และคณะ, 2000
Butyrivibrio fibrisolvens	Hespell และ O'Bryan-Shah, 1988
Caldocellum saccharolyticum	Luthi และคณะ, 1990
Candida guilliermondii	Basaran และ Hang, 2000
Clostridium cellulovorans	Kosugi และคณะ, 2002
Cryptococcus albidus	Lee และคณะ, 1987
C. laurentii	Lee และคณะ, 1987
C. luteolus	Lee และคณะ, 1987
Fibrobacter succinogenes	Mcdermid และคณะ, 1990

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Fusarium oxysporum	Christakopoulos และคณะ, 1999
Melanocarpus albomyces IIS 68	Saraswat และ Bisaria, 1997
Neocallimastix patriciarum	Dalrymple และคณะ, 1997
Orpinomyces sp.	Blum และคณะ, 1999
Penicillium purpurogenum	Chavez และคณะ, 2004
Phanerochaete chrysosporium	Biley และคณะ, 2004
Pichia abadieae	Lee และคณะ, 1987
P. lindnerii	Lee และคณะ, 1987
Pseudomonas fluorescens	Ferreir และคณะ, 1993
Rhodosporidium toruloides	Lee และคณะ, 1987
Rhodotorula muciaginosa	Lee และคณะ, 1987
Schizophyllum commune	Linden และคณะ, 1994
Streptomycese flavogriseus	Linden และคณะ, 1994
S. lividans	Altaner และคณะ, 2003
S. olivochromogenes	Linden และคณะ, 1994
S. thermoviolaceus OPC-520	Tsujibo และคณะ, 1997
Termitomyces clypeatus	Mukhopadhyay และคณะ, 1997
Thermoanaerobacterium sp.	Shao และ Wiegel, 1995
Thermomonospora fusca	Linden และคณะ, 1994
Tricoderma reesei	Linden และคณะ, 1994
Trichosporon cutaneum	Lee และคณะ, 1987
T. pullulan	Lee และคณะ, 1987

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรส

Biely และ คณะ (1988) ได้ศึกษาการเลี้ยง *Trichoderma reesei* และ *Schizophyllum commune* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย แบคโตเพบโตน 0.0735% $(NH_4)_2SO_4$ 0.666% ยูเรีย 0.15 % $CaCl_2$ 0.15 % $MgSO_4$ 0.15 % citric acid 0.584% K_2HPO_4 0.771 % และมีการแปรแหล่งคาร์บอนดังนี้คือ 0.1 % ของ ดี-กลูโคส, ดี-ไซโลส, ดี-เซลโลไบโอส, larchwood xylan ,birchwood xylan และ เซลลูโลส ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเชิงซ้อนสามารถชักนำการสร้างเอนไซม์ได้ดีจึงทำการแปรแหล่งคาร์บอนเพิ่มเติมโดยใช้ 0.9% larchwood xylan ร่วมกับ 0.1% เซลลูโลส (9:1) เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับเมื่อใช้ชนิดเดียวพบว่าแหล่งคาร์บอนผสม ส่งผลให้มีการสร้างเอนไซม์ดีที่สุดใน *Trichoderma reesei* สายพันธุ์ QM 9414 และ RUT C-30 โดยแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสสูงสุด 0.40 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน และ 0.367 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลา 5 วัน ตามลำดับ สำหรับ *Schizophyllum commune* พบว่ามีเอนไซม์แอคติวิตีสูงสุด คือ 0.35 หน่วยต่อมิลลิลิตรเมื่อใช้ 1% เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 11 วัน

Mcdermid และคณะ (1990) เลี้ยง *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85 โดยใช้ 0.6% แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน แปรแหล่งคาร์บอนดังนี้คือ 0.3% Avicel microcrystalline cellulose เลี้ยงเป็นเวลา 25 ชั่วโมงและ 0.5% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเลี้ยงเป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส สูงสุดคือ 1.5 และ 4.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

Bachmann และMcCarthy (1991) เลี้ยง *Thermonospora fusca* โดยมี 0.2 % ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต หรือ carboxymethylcellulose เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสโดยบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด คือ 0.006 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Dupont และคณะ (1996) เลี้ยง *Streptomyces lividans* โดยมีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส พบการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสสูงสุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 69 ชั่วโมง

Mukhopadhyay และคณะ (1997) แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อ *Termitomyces clypeatus* เมื่อใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 1 % พบว่าส่งผลต่อการสร้างเอนไซม์เรียงตามลำดับดังนี้ กลูโคส แป้ง ไซโลส อะราบิโนส อะราบิแนน อะราบิโนกาแลคแตน ไซแลนจากไม้เบิร์ช เซลลูโลส แอคติวิตี คือ 0.25, 0.22, 0.28, 0.86, 0.68, 1.14 และ 0.52 หน่วยต่อกรัมไมซีเลียม และพบว่าเมื่อใช้ เซลลูโลสกับไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกันโดยใช้ เซลลูโลส 0.5% และไซแลน 0.5% แอคติวิตีคือ 1.32 หน่วยต่อกรัมไมซีเลียม แต่ถ้าใช้ไซแลน 1% กับเซลลูโลส อะซีเทต 0.1% จะให้แอคติวีตีสูงสุดคือ 1.64 หน่วยต่อกรัมไมซีเลียม

Saraswat และ Bisaria (1997) เลี้ยง *Melanocarpus albomyces* IIS 68 ในอาหารที่ประกอบด้วย 0.05% ยูเรีย, 0.06% KH_2PO, 0.04% K_2HPO_4, 0.05% $MgSO_4.7H_2O$ และ 1.0 % สารสกัดจากยีสต์ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารคือ 6.0 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 125 ชั่วโมง โดยแปรชนิดของแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น อะราบิโนส กลูโคส ไซลิทอล และไซโลส ความเข้มข้น 0.2% ได้แอคติวิตี 2.9, 2.68, 2.02, และ3.61 หน่วยต่อกรัมไมซีเลียมตามลำดับ และเมื่อใช้พอลิแซคคาไรด์ คือ ไซแลนจากไม้บีช, ไซแลนจากไม้เบิร์ช, ไซแลนจากไม้ลาค, ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต, Avicel cellulose, Carboxymethyl cellulose และ Solka Floc ได้แอคติวิตี ดังนี้ 4.34, 3.5, 4.93, 5.27, 2.84, 2.08 และ 2.00 หน่วยต่อกรัมไมซีเลียมตามลำดับ แหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร กากอ้อย ซังข้าวโพด เปลือกถั่ว และ ฟางข้าวสาลี ได้แอคติวิตี ดังนี้ 5.20, 10.25, 4.0 และ 12.9 หน่วยต่อกรัมไมซีเลียมตามลำดับ ซึ่งพบว่าฟางข้าวสาลีให้แอติวีตีสูงที่สุด

Degrassi และคณะ (1998) ศึกษา *Bacillus pumilus* โดยเลี้ยงในอาหาร ที่มี 0.5 % เปลือกข้าวโพด หรือไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต พบเอนไซม์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสสูงในช่วง 40-72 ชั่วโมง โดยเมื่อเลี้ยงในไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตให้แอคติวิตี 0.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อเลี้ยงใน ซังข้าวโพดให้แอคติวิตี 0.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Christakopoulos และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Fusarium oxysporum* โดยเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย NaH_2PO_4 10.0, KH_2PO_4 1.0, $CaCl_2$ 0.3 $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 กรัมต่อลิตร มี 1 % แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้ กลูโคส 0.02% หรือ 0.1 % ซังข้าวโพด, ฟางข้าวสาลี ,ผิวมะเขือเทศ และ รำข้าวสาลี เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ซังข้าวโพด สามารถชักนำการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส ได้ดีกว่าฟางข้าวสาลี ผิวมะเขือเทศ และ รำข้าวสาลี โดยมีแอคติวิตี เรียงตามลำดับ

ดังนี้คือ 0.71, 0.39, 0.38 และ 0.06 หน่วยต่อมิลลิลิตร และพบว่าความเข้มข้นของซังข้าวโพดที่เหมาะสมคือ 3%และระยะเวลาเลี้ยงเชื้อที่ให้แอคติวิตีสูงสุด คือ 4 วัน

Basaran และ Hang (2000) พบว่าเมื่อเลี้ยง *Candida guilliermondii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบ ด้วย 0.67% สารสกัดจากยีสต์ และแปรแหล่งคาร์บอนคือไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไซแลนจากไม้เบิร์ช หรือ ซังข้าวโพด ความเข้มข้น 1% บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ซังข้าวโพดให้แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสสูงสุดคือ 0.85 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง

Chave และคณะ (2004) พบว่า *Pennicillium purpurogenum* สร้างอะซีทิลเอสเทอเรสได้ดี เมื่อมี 0.1% ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อใช้ไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอนกลับสร้างเอนไซม์ได้ปริมาณน้อย และแทบจะไม่พบแอคติวิตีเลยเมื่อใช้ กลูโคส ไซโลส หรือ ไซลิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ซึ่ง ตรวจสอบแอคตีวิตีโดยวิธี western blot และพบว่า ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงมีผลต่อการแสดงออกของยีนโดยพบว่าเอนไซม์ถูกชักนำให้เกิดการสร้างในอาหารทีมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็นกลาง

Koseki และคณะ (2005) รายงานการเลี้ยง *Pichia pastoris* ที่ได้รับยีนในการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Aspergillus awamori* ในอาหาร BMGY ซึ่งประกอบด้วย สารสกัดจากยีสต์ 1% เพพโทน 2% กลีเซอรอล 1% (v/v) ไบโอติน 0.00004 % $(NH_4)_2SO_4$ 1.34 % และเมธานอล 0.5% (v/v) พบว่าให้แอคติวิตีประมาณ 2.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน

2.5 สมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรส

2.5.1 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

อะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่างๆ มีสมบัติในแง่ของอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°ซ)	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus aculeatus	40	5.5	Leeuwen และคณะ, 1992
A.awamori	37	6.0-7.0	Koseki และคณะ, 2005
A.clavatus	37	6.5	Linden และคณะ, 1994
A. japonicus	37	6.5	Linden และคณะ, 1994
A. nidulans	37	6.5	Linden และคณะ, 1994
A. niger	37	6.5	Linden และคณะ, 1994
A. versicolor	37	6.5	Linden และคณะ, 1994
Bacillus pumilus	45	8.5	Degrassi และคณะ, 1998
Candida Guilliermondii	60	7.5	Basaran และ Hang, 2000
Caldocellum saccharolyticum	70	6.0	Luthi และคณะ, 1990
Clostridium cellulovorans	50	6.0	Kosugi และคณะ, 2002
Fusarium oxysporum	55	6.5	Christakopoulos และคณะ, 1999
Orpinomyces sp.	30	9.0	Blum และคณะ, 1999
Schizophyllum commune	30	6.5	Linden และคณะ, 1994
Streptomycese flavogriseus	50	6.0	Linden และคณะ, 1994
S. lividans	70	5.5-8.5	Dupont และคณะ, 1996

ตารางที่ 2.4 (ต่อ) อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°ซ)	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
S. olivochromigenes	50	6.0	Linden และคณะ, 1994
Termitomyces clypeatus	50	6.5	Mukhopadhyay และคณะ, 1997
Thermoanaerobacterium sp.	84	7.5	Shao และ Wiegel, 1995
Tricoderma reesei	30	6.5	Linden และคณะ, 1994

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5.2 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างของอะซีทิลเอสเทอเรส

อะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่างๆ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างแตกต่างกันออกไป แสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างของอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ (°ซ)	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus aculeatus	50, 20 ชั่วโมง	6.0-7.0	Leeuwen และคณะ, 1992
A. awamori	50, 1 ชั่วโมง	7.0-9.0	Koseki และคณะ 2005
Bacillus pumilus	50,1 ชั่วโมง	8.0-9.0	Degrassi และคณะ, 1998
Candida guilliermondii	20-60 ,12 ชั่วโมง	5.8-8.0	Basaran และ Hang, 2000
Clostridium cellulovorans	30, 12 ชั่วโมง	3.0-7.0	Kosugi และคณะ, 2002
Termitomyces clypeatus	50 , 1 ชั่วโมง	4.5-8.0	Mukhopadhyay และคณะ, 1997
Thermoanaerobacterium sp.	50-60,1 ชั่วโมง	8.0-9.0	Shao และ Wiegel, 1995
Shizophyllum commune	37,30 นาที	4.5-9.0	Halgasova และคณะ, 1994
Streptomycese lividans	72, 15 นาที	-	Dupont และคณะ, 1996

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรายงานข้างต้น พบว่ามีการศึกษาอะซีทิลเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เนื่องจาก อะซีทิลเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายหมู่ข้างเคียงของสายไซแลน เชื้อส่วนใหญ่ผลิตได้ในปริมาณน้อย เมื่อเทียบกับเอนไซม์ย่อยสลายสายหลัก ดังนั้นงานวิจัยนี้สนใจศึกษาการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีที่ภาวะเป็นด่างและอุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นสมบัติที่เหมาะสมในการเลี้ยงระดับอุตสาหกรรม และจากการศึกษาของสุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) พบว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูง ทั้งยังมีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิในช่วงกว้าง ดังนั้นอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผลิตได้น่าจะมีสมบัติใกล้เคียงกัน ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการศึกษาขั้นต่อๆ ไป

บทที่ 3

อุปกรณี เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ของ Amerex Instruments Inc. บริษัท กิบไทยจำกัด.
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerator centrifuge) รุ่น Kubota 1920 บริษัท แบง เทรดดิ้ง 1992 จำกัด.
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของ Kubota, Japan.
4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Digital pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 ของ Eutech Cybernetics, Singapore.
5. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer บริษัทเพอร์กิน แอลเมอร์จำกัด
6. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-S และ รุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
7. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, U.S.A
8. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co, Ltd., ญี่ปุ่น, รุ่น MLS-3020 บริษัท Sanyo Electrics, ญี่ปุ่น
9. ฮีมาไซโทมิเตอร์ (Haemacytometer) Schott Duran, เยอรมนี
10. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, ญี่ปุ่น
11. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น HS-124 บริษัท ISSCO, สหรัฐอเมริกา
12. เครื่องผสมสาร (Mixer) รุ่น vortex-genies 2 G560E บริษัท Scientific Industries Inc., สหรัฐอเมริกา
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Temppet บริษัท T-80 Tokyo Rikakikai, ญี่ปุ่น และ รุ่น W 760 บริษัท Memmert, เยอรมนี
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น (Refrigerator centrifuge) รุ่น Avanti Centrifuge J-30I บริษัท Beckman, Germany
15. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 100, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, ฝรั่งเศส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. พารา-ไนโตรเฟนิล อะซีเทต (ρ-nitrophenyl acetate) ของ Sigma, สหรัฐอเมริกา
2. พารา-ไนโตรฟีนอล (ρ-nitrophenol) ของ Sigma, สหรัฐอเมริกา
3. อะลูมินา (Alumina) ของ Sigma, สหรัฐอเมริกา
4. ไซแลนจากไม้เบิร์ช (Birchwood Xylan) ของ Sigma, สหรัฐอเมริกา
5. ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelt xylan) ของ Sigma, สหรัฐอเมริกา
6. ไซแลนจากไม้บีช (Beechwood Xylan) ของ Sigma, สหรัฐอเมริกา
7. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) ของ BDH, อังกฤษ
8. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, เยอรมนี
9. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Carlo Erba Regenti, อิตาลี
10. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4{\cdot}7H_2O$) บริษัท Carlo Erba Regenti, อิตาลี
11. เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4{\cdot}7H_2O$) บริษัท Unilab, สหรัฐอเมริกา
12. ทวีน 80 (Tween 80) บริษัท Fluka, เยอรมันนี
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, เยอรมนี
14. กรดเกลือ (HCl) บริษัท J.T. Baker, สหรัฐอเมริกา
15. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
16. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) บริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
17. ทริปโตน (Tryptone) บริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
18. พอลิเพพโทน บริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
19. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Unilab, สหรัฐอเมริกา
20. แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) บริษัท Fluka, เยอรมนี
21. แอมโมเนียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) บริษัท Fluka, เยอรมนี
22. โพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) บริษัท May & Baker, อังกฤษ
23. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) บริษัท Merck, เยอรมนี
24. กลูโคสโมโนไฮเดรต ($C_6H_{12}O_6{\cdot}H_2O$) บริษัท Merck, เยอรมนี
25. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท Merck, เยอรมนี
26. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4{\cdot}5H_2O$) บริษัท Merck, เยอรมนี
27. น้ำกลั่น (distilled water)

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 และการเตรียมอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.1.1 การเตรียมสปอร์

ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารแข็งชนิดเอียงข้าวไรท์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วันจนสายใยเจริญเต็มที่ แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 วันเพื่อให้เกิดการสร้างสปอร์จำนวนมาก นำมาขูดสปอร์โดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวแขวนลอยดูดสปอร์แขวนลอยที่ได้ มากรองผ่านชุดกรองสปอร์ (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) นำสปอร์แขวนลอยที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จึงเทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างสปอร์ด้วยน้ำ 2 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 2×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บเป็นปริมาตรน้อยๆ (aliquots) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.1.2 การเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 โดยถ่ายสปอร์ที่ความหนาแน่น 2×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวย (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.1.3 การเลี้ยงเพื่อตรวจสอบแหล่งสะสมอะซีทิลเอสเทอเรส

ถ่ายหัวเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 จากข้อ 3.3.1.2 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ (Xylan complex medium ภาคผนวก ก หมายเลข 2) pH 9.0 ที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelt xylan) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ นำส่วนน้ำใสที่ได้ซึ่งเรียกว่า crude enzyme มาวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 รอบ โดยนำเซลล์ที่ได้มาทำให้แตกโดยบดรวมกับผงอะลูมินาในโกร่ง ด้วยอัตราส่วนน้ำหนักเซลล์เปียกต่ออะลูมินาเท่ากับ 1 ต่อ 1 จากนั้นเติม 0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 เพื่อเป็นตัวทำละลาย นำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอคติวิตีของ อะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

การวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Kormelink และคณะ (1993) โดยสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.1 มิลลิลิตร 10 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรเฟนิล อะซีเทต (*p*-nitrophenyl acetate) ที่ละลายอยู่ในเมทานอลในน้ำความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) 0.3 มิลลิลิตร 0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายอะซีทิลเอสเทอเรส ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำส่วนผสมนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้ พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*- nitrophenol) ความเข้มข้นในช่วง 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1 หน่วยของอะซีทิลเอสเทอเรส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย พารา-ไนโตรเฟนิลอะซีเทต แล้วให้ พารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะข้างต้น

3.3.3 การหารูปแบบการเจริญ ของ *Streptomyces sp.* PC22

ถ่าย 100 ไมโครลิตรของสปอร์ *Streptomyces* sp. PC22 ที่ความหนาแน่น 2×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.3.4 การหาอายุหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยที่ ความหนาแน่น 2×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร ลงใน TSB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นถ่าย 5 เปอร์เซ็นต์ หัวเชื้อ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ระยะ mid log phase (ค่าดูดกลืนแสง 1.2) และ ระยะ late log phase (ค่าดูดกลืนแสง 1.6) ลงใน 30 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ pH 9.0 ที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 5 วัน วิเคราะห์ แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.5 ความเข้มข้นของหัวเชื้อต่อการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรส

เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4 โดยเลือกที่ mid log หรือให้ค่าดูดกลืนแสง 1.2 จากนั้นแปรความเข้มข้นของหัวเชื้อ 5 และ10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไซแลนคอมเพล็กซ์ ที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 5 วัน วิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.6 ผลของชนิดและปริมาณของไซแลนต่อการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.6.1 ชนิดไซแลน

เตรียมหัวเชื้อ ตามวิธีในข้อ 3.3.5 แล้วถ่ายหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงใน 30 มิลลิลิตร อาหารไซแลนคอมเพล็กซ์ โดยแปรชนิดของไซแลนซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนดังนี้ คือ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelt xylan) ไซแลนจากไม้เบิร์ช (Birchwood xylan) และไซแลนจากไม้บีช (Beechwood xylan) ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 5 วัน เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.6.2 การหาความเข้มข้นของไซแลนจากไม้เบิร์ชที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.6.1 โดยใช้ไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอนและแปรความเข้มข้น 0.5 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส ติดตามเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 1 ถึง 5 วัน นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.7 ผลของวัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆ ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.7.1 ชนิดของวัสดุทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการเป็นแหล่งคาร์บอน

วัสดุทางการเกษตรที่ใช้แทนไซแลนจากไม้เบิร์ชในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ มีดังนี้ ฟางข้าว (rice straw), ซังข้าวโพด (corn cob), เปลือกข้าวโพด (corn hulls), กากเมล็ดฝ้าย (cotton seed hulls), ขี้เลื่อย (saw dust), รำข้าวเจ้า (rice bran) และรำข้าวสาลี (wheat bran) โดยมีวิธีการเตรียมดังนี้ ฟางข้าว ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และขี้เลื่อย อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำวัสดุต่างๆ ยกเว้นรำข้าวไปบดให้ละเอียด สำหรับกากเมล็ดฝ้ายนำมากำจัดลิกนินโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของกากเมล็ดฝ้าย 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (Detroy และคณะ, 1981) จากนั้นกรองและล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 แล้วจึงนำไปอบแห้งบดให้ละเอียด ก่อนใช้วัสดุทางการเกษตรทุกชนิดนำไปร่อนด้วยตะแกรงขนาด 60 เมช

ถ่ายสปอร์ *Streptomyces* sp. PC22 ความหนาแน่น 2×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร TSB pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวย (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำเชื้อที่ระยะ mid log phase (ค่าดูดกลืนแสง 1.2) มาเป็นหัวเชื้อโดยใช้ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาหารไซแลนคอมเพล็กซ์ pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับไซแลนจากไม้เบิร์ชที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.7.2 ความเข้มข้นของวัสดุทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.7.1 โดยใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน และแปรความเข้มข้นที่ 0.5 1 1.5 2 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.7.3 ศึกษาเวลาในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสเมื่อมีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.7.2 โดยมีเปลือกข้าวโพดความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 5 วัน เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.8 หาแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.8.1 ชนิดของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้ คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) และ โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) โดยเปรียบเทียบให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเดิมคือ พอลิเพพโทน ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (nitrogen content) โดยวิธี Kjeldahl (Stayermark,1951) ด้วยความเอื้อเฟื้อของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่ามีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก

ต่อน้ำหนัก) และในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ มีพอลิเพพโทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

เลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.3.6.2 ที่ความเข้มข้นของไซแลนที่เหมาะสม และตามวิธีการในข้อ 3.3.7.3 และเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) หรือโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) ให้มีความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนเท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีพอลิเพพโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.8.2 ความเข้มข้นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.3.8.1 แต่แปรความเข้มข้นของอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดที่เหมาะสมของแต่ละแหล่งคาร์บอนในรูปความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ 0.025 0.05 0.075 0.1 และ 0.125 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.8.3 ระยะเวลาการบ่มเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสเมื่อใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.8.2 แต่แปรระยะเวลาบ่มเชื้อตั้งแต่ 1 ถึง 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.9 ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.8.3 แต่แปรระดับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 6.0-11.0 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาเหมาะสมตามข้อ 3.3.8.3 เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

3.3.10 อุณหภูมิการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

เลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในข้อ 3.3.9 แต่แปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อในช่วง 30-50 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.11 การศึกษาสมบัติบางประการของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces sp.* PC22

3.3.11.1 การเตรียมอะซีทิลเอสเทอเรสเข้มข้นโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces* sp. PC22 ที่ต้องการศึกษาสมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสทั้งหมดมาตกตะกอน ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากน้ำใสด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ในปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์เดิมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปปั่นแยกส่วนตะกอนออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ส่วนใสที่ได้คืออะซีทิลเอสเทอเรสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว

3.3.11.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำอะซีทิลเอสเทอเรสจากข้อ 3.3.11.1 มาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยผันแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มในช่วง 35-70 องศาเซลเซียส

3.3.11.3 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำอะซีทิลเอสเทอเรสจากข้อ 3.2.11.1 มาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.11.2 ยกเว้นแปรความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาเป็น 4.0-6.5 โดยใช้บัฟเฟอร์ในช่วงความเป็นกรดด่างต่างๆ ดังนี้

0.5 โมลาร์ โซเดียมอะซิเทต บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 4.0-6.5
0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอตเฟต บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 6.0-8.0
0.5 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 8.0-9.0

3.3.11.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

บ่มอะซีทิลเอสเทอเรสจากข้อ 3.2.11.1 ใน 0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่อุณหภูมิในช่วง 35-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหา แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 ภายใต้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมโดยมีอะซีทิลเอสเทอเรสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.3.11.5 ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มอะซีทิลเอสเทอเรสจากข้อ 3.2.11.1 ที่ pH 4.0-9.0 ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ดังระบุในข้อ 3.2.11.3 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาหาแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 ภายใต้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมโดยมีอะซีทิลเอสเทอเรสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การตรวจสอบแหล่งสะสมของอะซีทิลเอสเทอเรสที่สร้างโดย *Streptomyces* sp. PC22

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22 มาก่อน ดังนั้นการทดลองเบื้องต้นจึงจำเป็นต้องตรวจสอบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสที่ *Streptomyces* sp. PC22 สร้างขึ้นเป็นเอนไซม์ชนิดที่สร้างและเก็บไว้ในเซลล์ หรือ ปล่อยออกนอกเซลล์ โดยทำการเปรียบเทียบแอคติวิตีทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ในน้ำเลี้ยงเชื้อและภายในเซลล์ โดยทำการทดลองตามวิธีที่รายงานไว้ใน บทที่ 3 ข้อ 3.3.1.3 และวิเคราะห์แอคติวิตีภายใต้ภาวะที่รายงานโดย (Kormelink และคณะ,1993)

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าปริมาณเอนไซม์ทั้งหมดในน้ำเลี้ยงเชื้อสูงกว่าภายในเซลล์ อะซีทิลเอสเทอเรสจึงจัดเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แล้วปลดปล่อยออกนอกเซลล์ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อๆ ไปจะวิเคราะห์เอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.1 ปริมาณอะซีทิลเอสเทอเรสทั้งหมดภายในเซลล์และในน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 60 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน

แหล่งวิเคราะห์เอนไซม์	ปริมาณเอนไซม์ทั้งหมด (หน่วย)
น้ำเลี้ยงเชื้อ	1.89 ±0.11
เซลล์สกัด	0.13 ± 0.08

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ภาวะเหมาะสมเบื้องต้นในการทำงานของเอนไซม์

จากผลการทดลองข้อ 4.1 ได้ใช้การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีที่รายงานโดย (Kormelink และคณะ,1993) ซึ่งบ่มปฏิกิริยาที่ 40 องศาเซลเซียส pH 6 แต่วิธีดังกล่าวอาจไม่ใช่ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ อะซีทิลเอสเทอเรส จาก *Streptomyces* sp. PC22 ดังนั้น การทดลองนี้จึงทำการหาอุณหภูมิ ชนิดของบัฟเฟอร์ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อๆ ไป

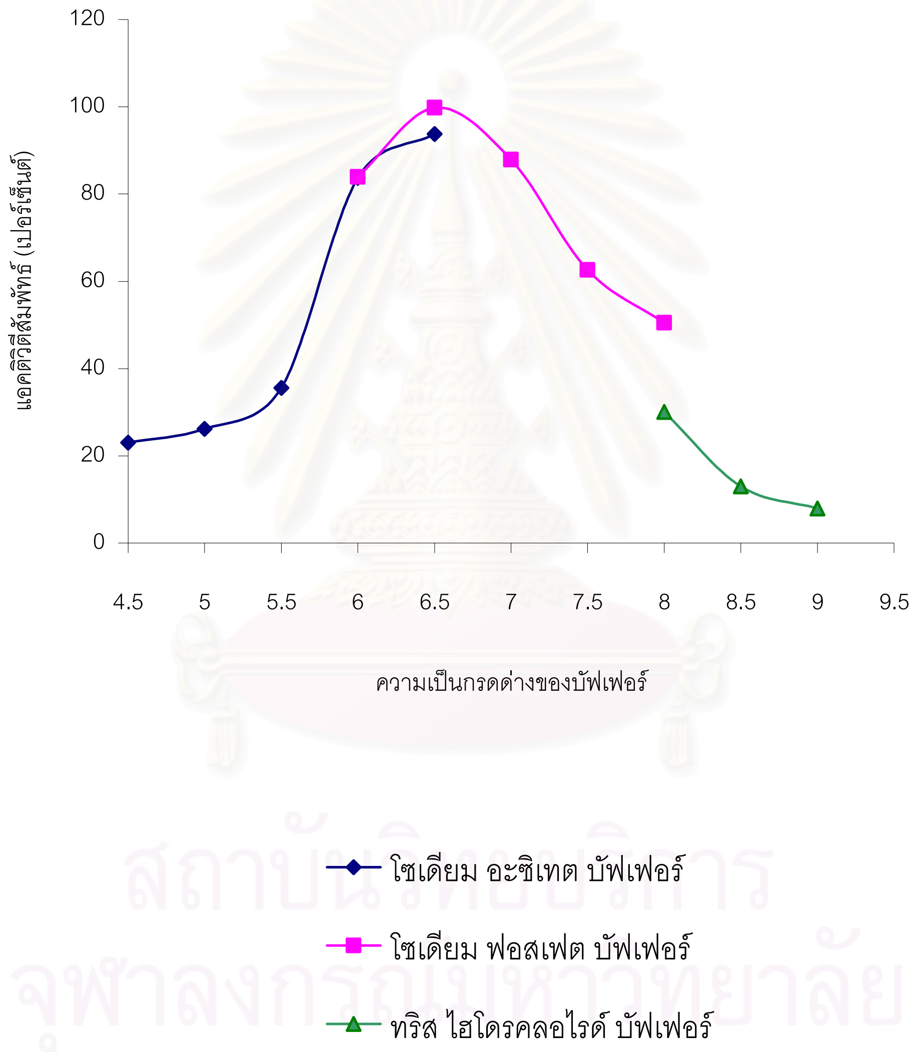
4.2.1 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของ อะซีทิลเอสเทอเรส

จากการบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4.0 - 9.5 พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสคือ 6.5 โดยชนิดของบัฟเฟอร์คือ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ดังนั้นในการวิเคราะห์แอคติวิตีต่อไปจะใช้ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5

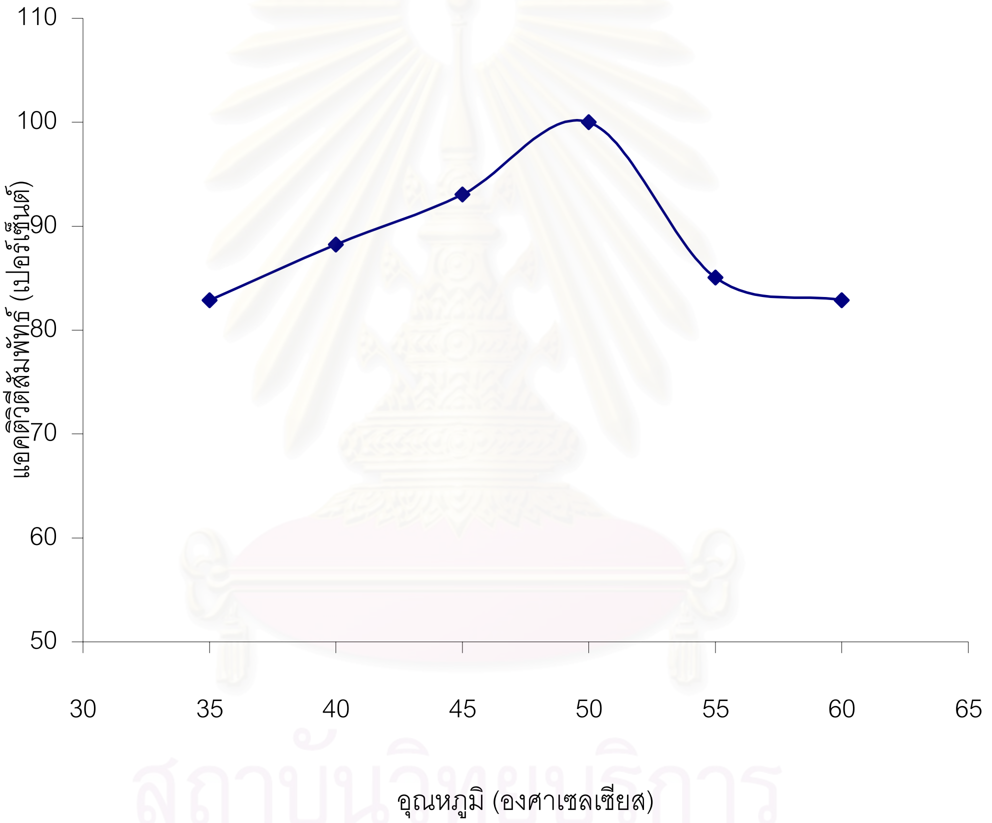
4.2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

จากการศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือค่าความเป็นกรดด่าง ที่ 6.5 โดยชนิดของบัฟเฟอร์คือ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จึงเลือกใช้ค่าความเป็นกรดด่างจากข้อ 4.2.1 มาทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ อะซีทิลเอสเทอเรส โดยบ่มหลอดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิตั้งแต่ 35 – 60 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสที่อุณหภูมิต่างๆ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วงกว้าง โดยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นในการวิเคราะห์แอคติวิตีครั้งต่อไปจะบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส คือ ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการทดลองต่อจากนี้ไปจะใช้ภาวะนี้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส



รูปที่ 4.1 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

4.3 การหารูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. PC22 อายุของหัวเชื้อ

4.3.1 รูปแบบการเจริญของ *Streptomyces sp.* PC22

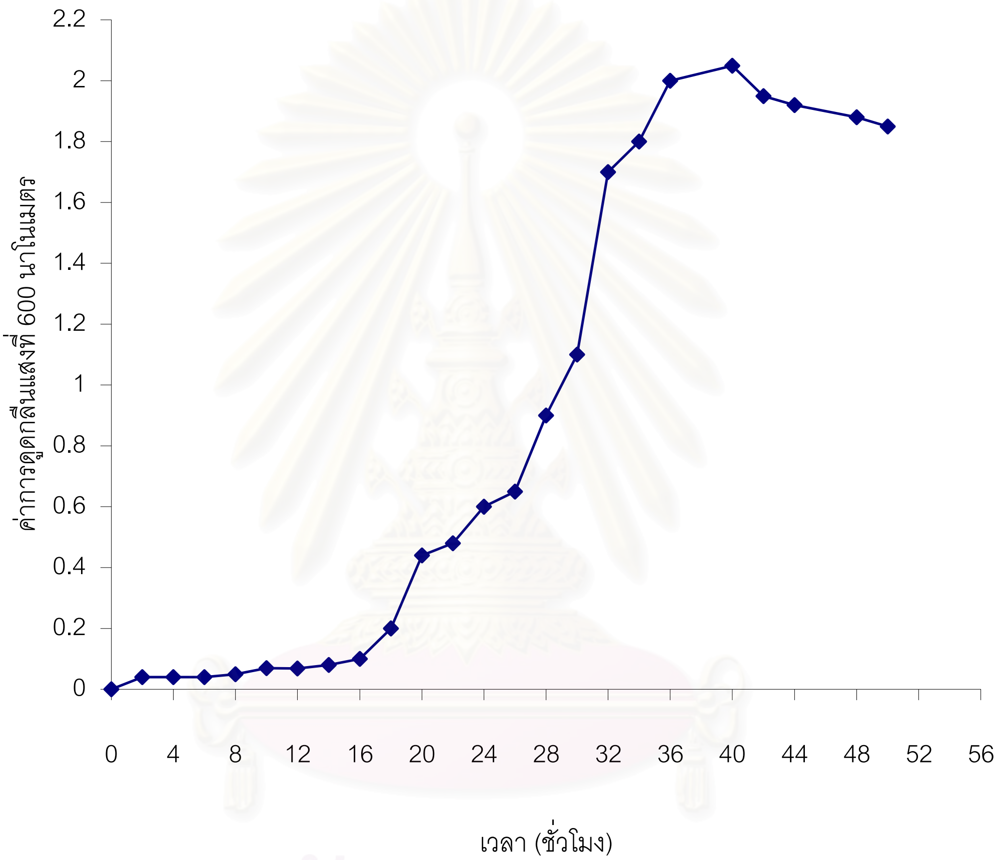
การศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อนี้ เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลในการหาช่วงอายุที่เหมาะสมสำหรับเตรียมหัวเชื้อซึ่งทำโดยนำสปอร์ *Streptomyces* sp. PC22 ที่ความหนาแน่น 2×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงใน TSB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่ 45 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ผลทดลองพบว่า *Streptomyces sp.* PC22 เมื่อเจริญในช่วง mid log จะมีค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.2 และเมื่อเจริญถึงช่วง late log จะมีค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.6 ดังแสดงในรูปที่ 4.3

4.3.2 ผลของอายุหัวเชื้อต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

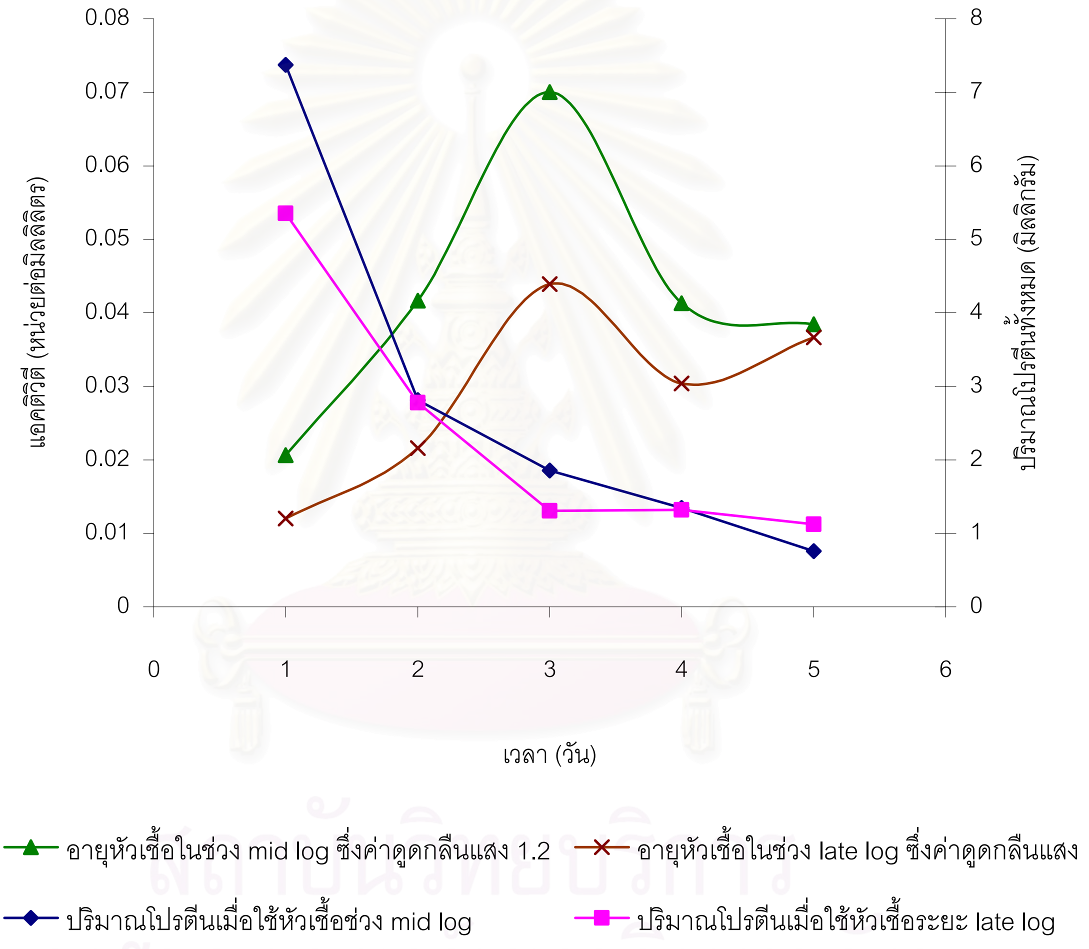
การทดลองนี้ทำการเปรียบเทียบอายุของหัวเชื้อต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส โดยแปรอายุของหัวเชื้อในช่วง mid log phase (ค่าดูดกลืนแสง 1.2 ที่ 600 นาโนเมตร) และ ระยะ late log phase (ค่าดูดกลืนแสง 1.6 ที่ 600 นาโนเมตร) โดยเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับผลการทดลองในข้อ 4.3.1 ติดตามการเจริญโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนได้ค่าตามต้องการจึงถ่ายหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไซแลนคอมเพล็กซ์ (xylan complex medium) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelt xylan) 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 5 วัน และวิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าอายุหัวเชื้อในช่วง mid log ให้แอคติวิตีสูงสุดประมาณ 0.07 หน่วยต่อมิลลิลิตร สูงกว่าการใช้หัวเชื้อในช่วง late log ซึ่งให้แอคติวิตีสูงสุดเพียงประมาณ 0.04 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการทดลองต่อๆ ไปจึงเลือกใช้อายุหัวเชื้อในช่วง mid log



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.3 รูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. PC22



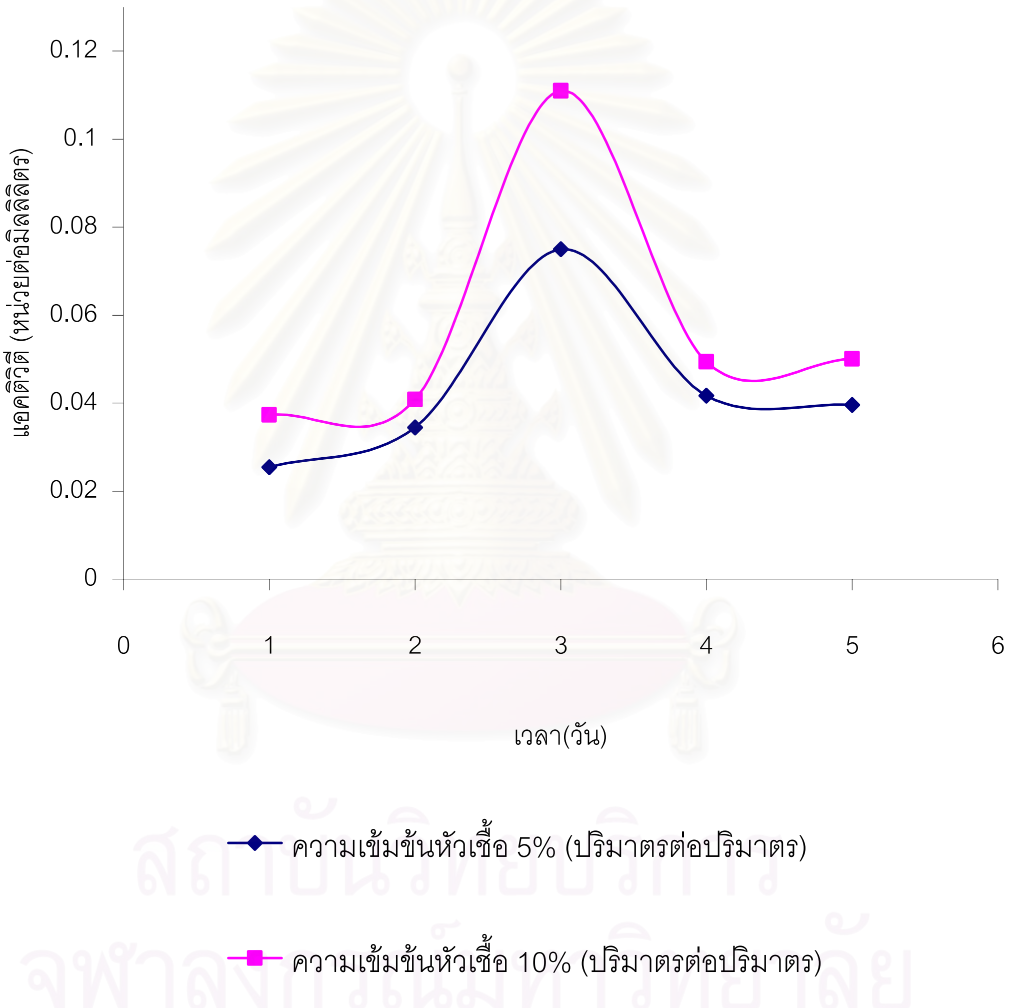
รูปที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบอายุของหัวเชื้อต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22

4.4 ผลของความเข้มข้นหัวเชื้อต่อการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรส

การทดลองนี้แปรความเข้มข้นของหัวเชื้อที่มีอายุในช่วง mid log ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 1.2 ที่สองความเข้มข้น คือ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยถ่ายลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ ที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 5 วัน วิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่าความเข้มข้นของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส คือ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยแอคติวิตีเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 3 คือ 0.13 หน่วยต่อมิลลิตร ขณะที่หัวเชื้อที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 3 เช่นกัน แต่มีค่าเพียงประมาณ 0.07 หน่วยต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงจะใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของหัวเชื้อต่อการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22

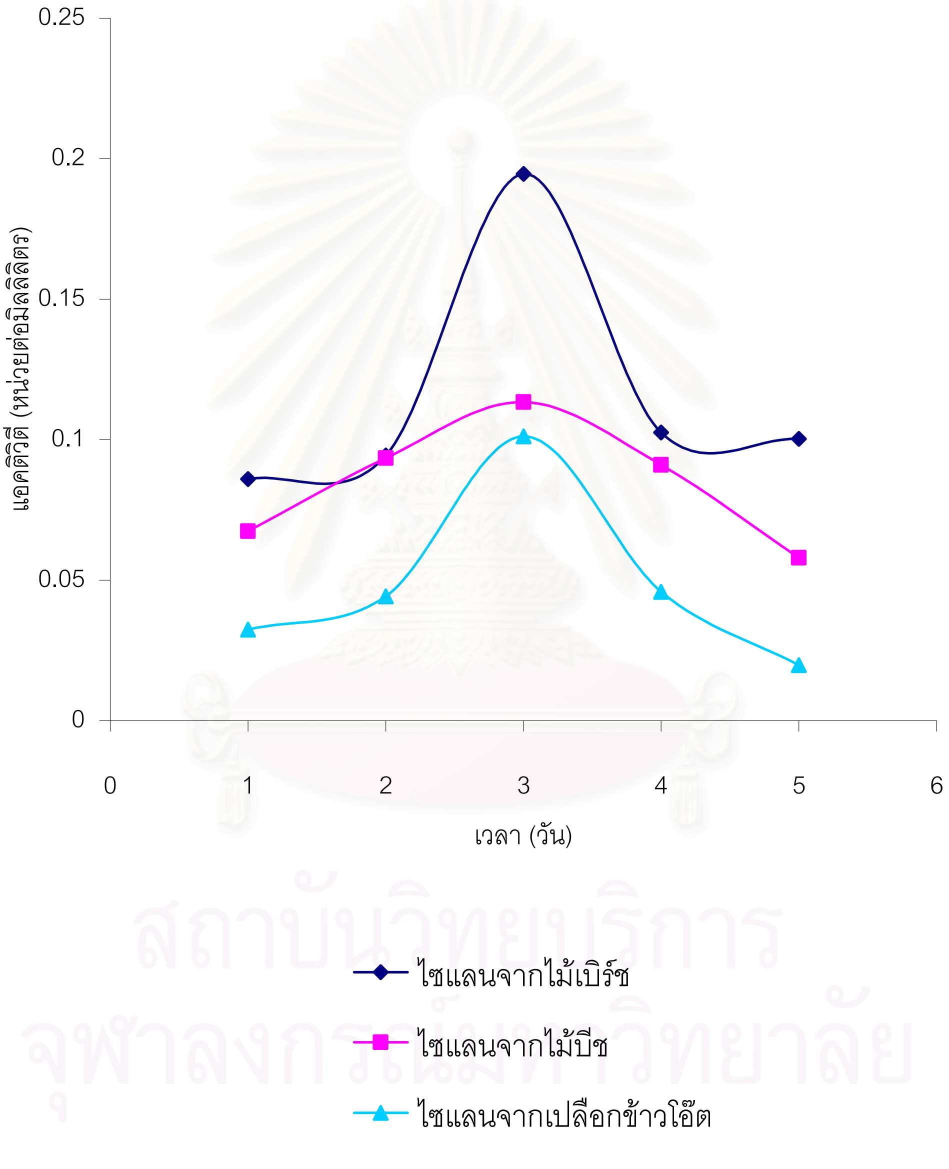
4.5 ผลของไซแลนจากแหล่งต่าง ๆต่อการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22

จากการแปรไซแลนชนิดต่างๆ 3 ชนิดเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้แก่ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไซแลนจากไม้เบิร์ช (Birchwood xylan) และไซแลนจากไม้บีช (Beechwood xylan) ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 5 วัน วิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6 ไซแลนจากไม้เบิร์ช (Birch wood xylan) ให้แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสสูงสุดในวันที่ 3 คือประมาณ 0.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร ขณะที่ไซแลนอีก 2 ชนิดให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดต่ำกว่ามาก ดังนั้นจึงเลือกไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรส

4.6 ผลของความเข้มข้นของไซแลนจากไม้เบิร์ชต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

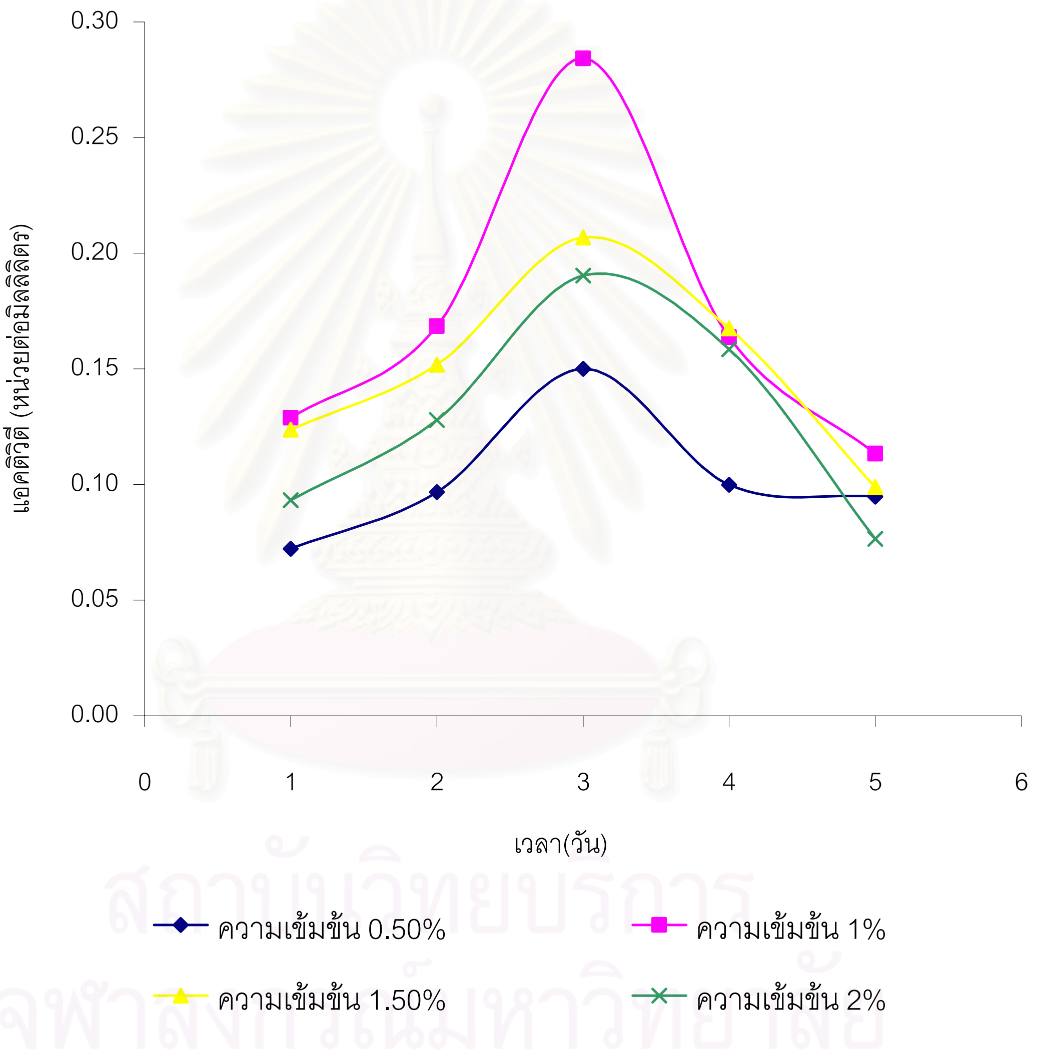
จากการแปรความเข้มข้นของไซแลนจากไม้เบิร์ช ที่ 0.5 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารไซแลนคอมเพล็กซ์แล้ววิเคราะห์ แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสทุกวันเป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7 พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสคือ 1 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาการเลี้ยงที่เหมาะสมคือ 3 วันโดยให้แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสสูงสุดประมาณ 0.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.6 ผลของไซแลนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.5% ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22



รูปที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นไซแลนจากไม้เบิร์ชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส จาก *Streptomyces* sp. PC22

4.7 วัสดุทางการเกษตรชนิดต่าง ๆในการเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

4.7.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนจากวัสดุทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

เนื่องจากไซแลนจากไม้เบิร์ช ซึ่งผลิตขายทางการค้ามีราคาแพง งานวิจัยนี้จึงทดลองใช้วัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆ ที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบได้แก่ ฟางข้าว, ซังข้าวโพด, เปลือกข้าวโพด, กากเมล็ดฝ้าย, ขี้เลื่อย, รำข้าวเจ้า และรำข้าวสาลี เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับไซแลนจากไม้เบิร์ช ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces sp.* PC22

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.8 พบว่าเปลือกข้าวโพดให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าวัสดุทางการเกษตรชนิดอื่นๆ โดยค่าที่ได้คือ 0.15 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่ถึงอย่างไรแอคติวิตีที่ได้ก็ยังต่ำกว่าการใช้ไซแลนจากไม้เบิร์ช ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมของเปลือกข้าวโพด

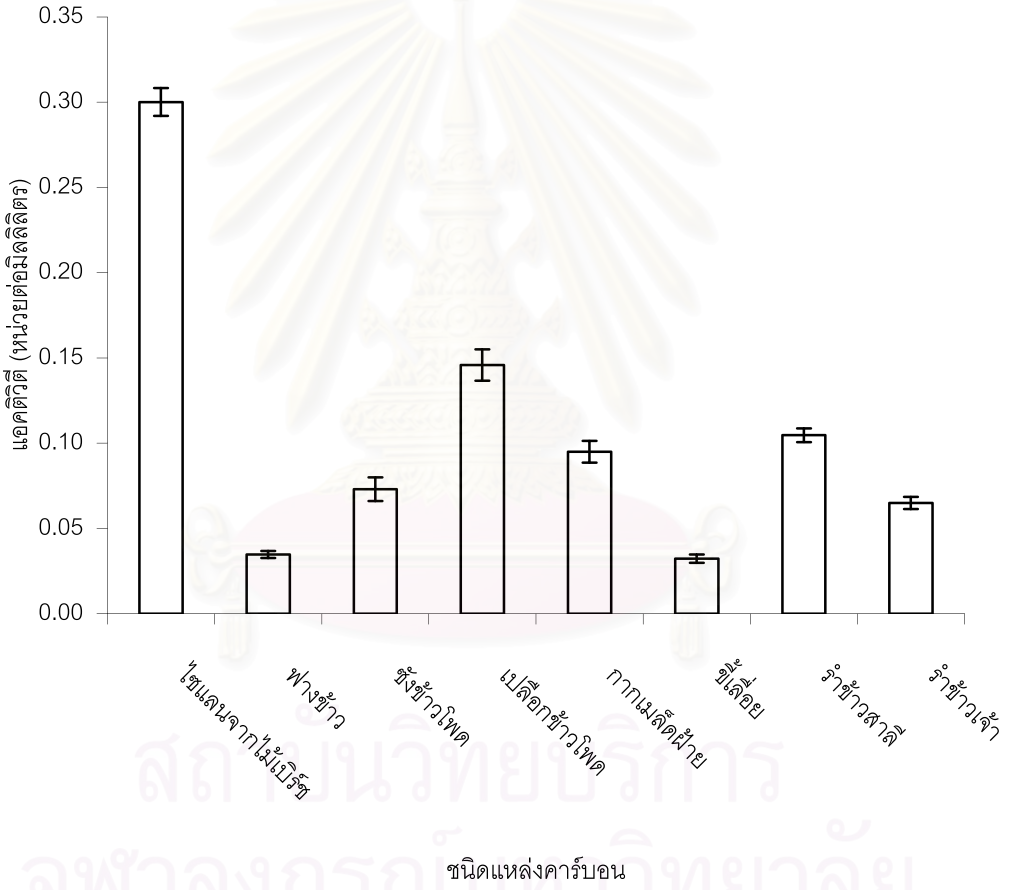
4.7.2 ผลของความเข้มข้นเปลือกข้าวโพดต่อการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22

จากการใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน แทนไซแลนทางการค้า ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลน คอมเพล็กซ์ โดยแปรความเข้มข้นที่ 0.5 1 1.5 2 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วันแล้ววิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.9 พบว่าเปลือกข้าวโพดเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสสูงสุดคือ 0.22 หน่วยต่อมิลลิตรและเมื่อใช้ความเข้มข้นของเปลือกข้าวโพดมากเกินไปจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูงอาจส่งผลต่อการถ่ายเทอากาศทำให้การผลิตเอนไซม์มีประสิทธิภาพลดลงจึงเลือกความเข้มข้นเปลือกข้าวโพด 1.5 เปอร์เซ็นต์มาใช้ในการทดลองต่อไป

4.7.3 ผลของระยะเวลาบ่มเชื้อต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสเมื่อใช้เปลือกข้าวโพด 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

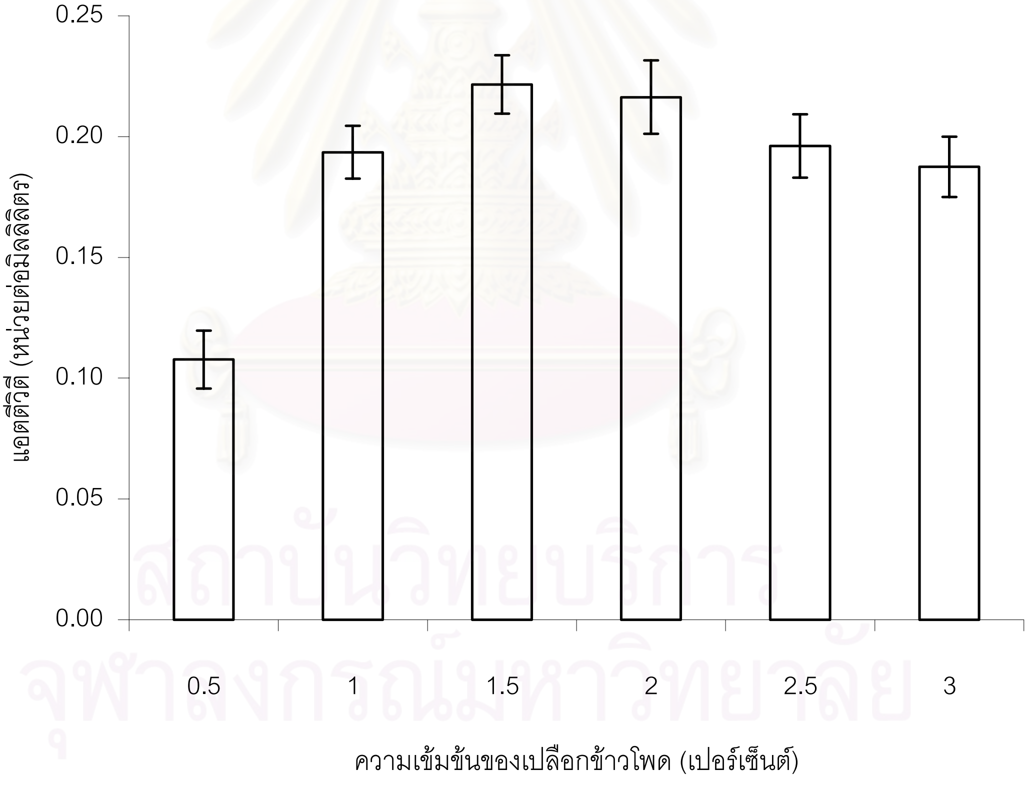
จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไซแลนคอมเพล็กซ์ ที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และแปรระยะเวลาบ่มเชื้อในช่วง 1 ถึง 5 วัน แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.10 พบว่าระยะเวลาบ่มเชื้อ 2 วันให้แอคติวิตีเอนไซม์สูงสุดประมาณ 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

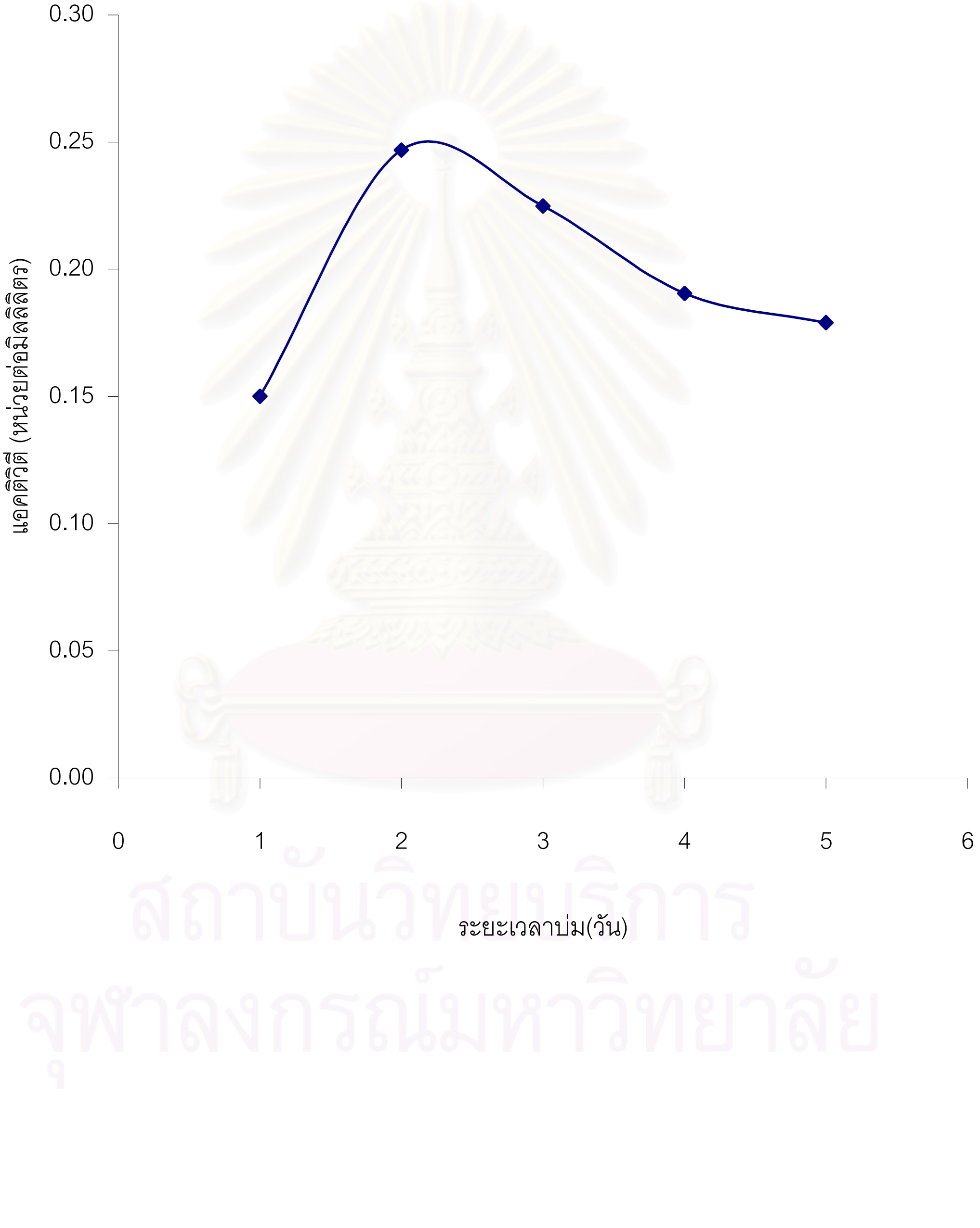


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.8 ผลการทดลองใช้วัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับไซแลนจาก ไม้เบิร์ช ที่ความเข้มข้น 1%เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 4.9 ผลของความเข้มข้นเปลือกข้าวโพดต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 4.10 ผลของระยะเวลาต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสโดย *Streptomyces* sp. PC22 เลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 1.5 เปอร์เซ็นต์เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

4.8 ผลของอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

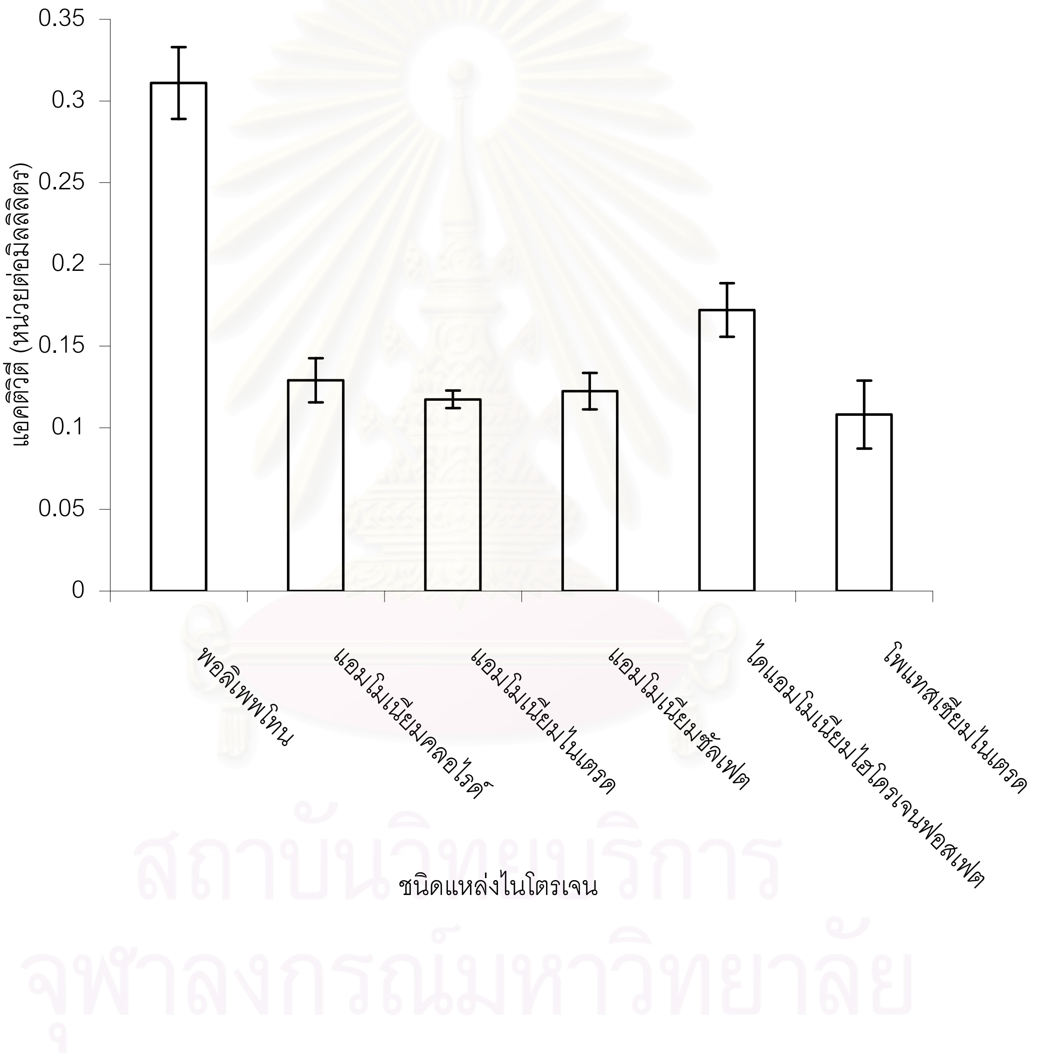
ในการทดลองเบื้องต้นที่ผ่านมาได้ใช้ พอลิเพพโทน เป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งมีราคาค่อนข้างแพง ถ้ามีการเลี้ยงเชื้อในระดับอุตสาหกรรม จำเป็นต้องใช้ปริมาณมากซึ่งจะทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง อนินทรีย์ไนโตรเจนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าจะนำมาใช้ทดแทนได้ เนื่องจากอนินทรีย์ไนโตรเจนส่วนใหญ่ราคาไม่สูงนักและสามารถใช้ในปริมาณที่น้อยกว่าแต่ยังคงให้ปริมาณไนโตรเจน เทียบเท่ากับพอลิเพพโทน

จากการทดลองวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl พบว่าพอลิเพพโทน ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะมีไนโตรเจนเท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร ดังนั้นอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นำมาทดสอบเบื้องต้น จะใช้ในปริมาณที่เทียบเท่ากับพอลิเพพโทนเมื่อคำนวณในรูปของไนโตรเจน และแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) และ โพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3)

4.8.1 ชนิดของอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส เมื่อใช้ไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอน

การทดลองนี้ใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ ไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน คือ NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$ และ KNO_3 ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน วิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสเทียบกับชุดควบคุมที่มีพอลิเพพโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.11 พบว่า$(NH_4)_2SO_4$ ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดคือประมาณ 0.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามแอคติวิตีที่ได้ก็ยังต่ำกว่าเมื่อใช้พอลิเพพโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 4.11 ผลของอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ และพอลิเพพโทนเทียบเท่ากับไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.05% ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส เมื่อใช้ไซแลนจากไม้เบิร์ช 1%เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน

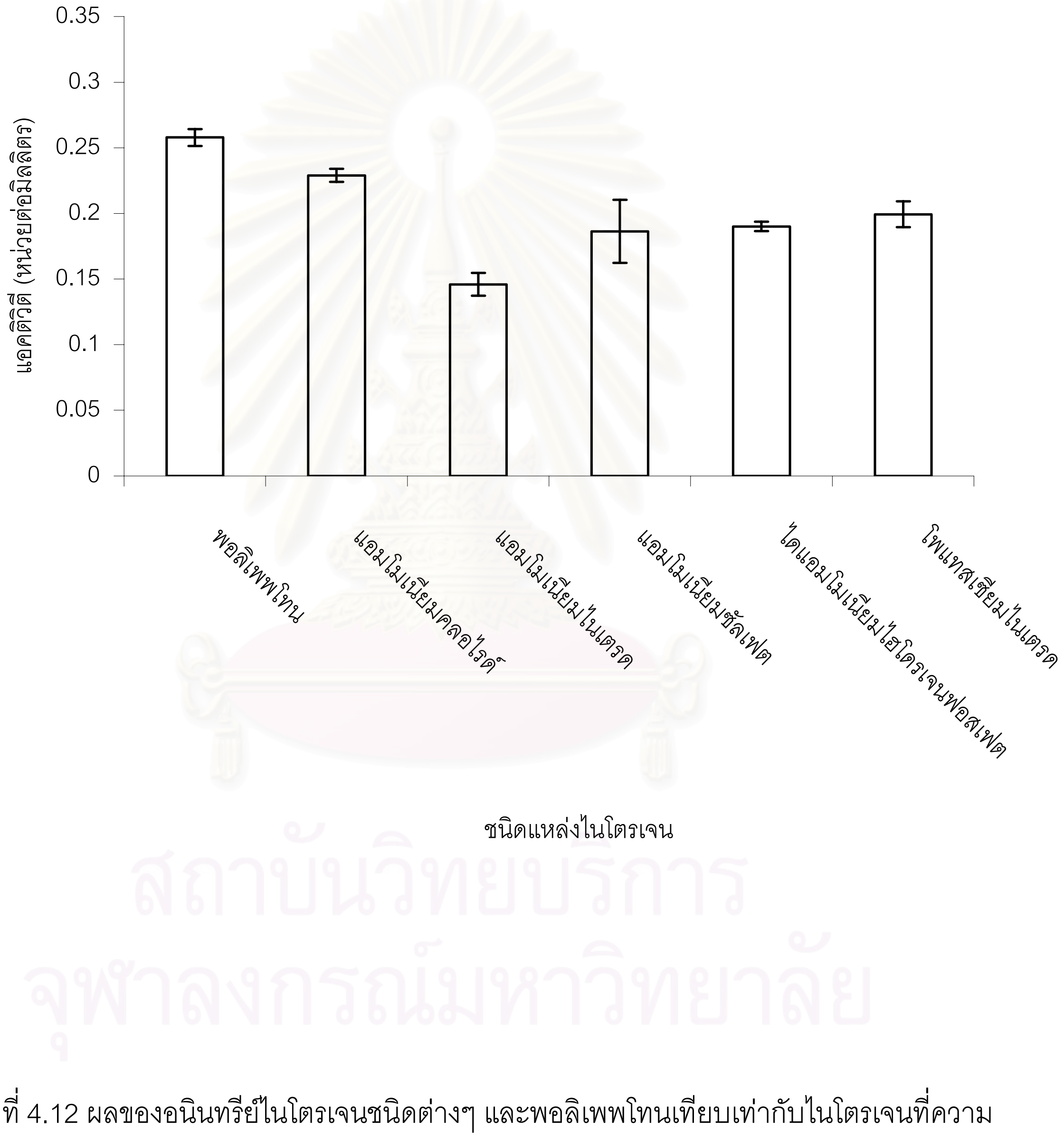
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8.2 ชนิดของอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสเมื่อใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

การทดลองนี้มี 1.5 เปอร์เซ็นต์ เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน แปรแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน คือ NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$ และ KNO_3 ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน วิเคราะห์แอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสเทียบกับชุดควบคุมที่มีพอลิเพพโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.12 พบว่า NH_4Cl ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดประมาณ 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าเมื่อใช้พอลิเพพโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนเล็กน้อย อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของอนินทรีย์ไนโตรเจนในผลการทดลองข้อ 4.8.1 และ 4.8.2 อาจจะยังไม่ได้ค่าที่เหมาะสม ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะแปรความเข้มข้นของอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดที่เหมาะสมเมื่อใช้ร่วมกับแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 ผลของอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ และพอลิเพพโทนเทียบเท่ากับไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.05% ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดความเข้มข้น 1.5% เป็นแหล่งคาร์บอนเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน

4.9 ผลของความเข้มข้นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

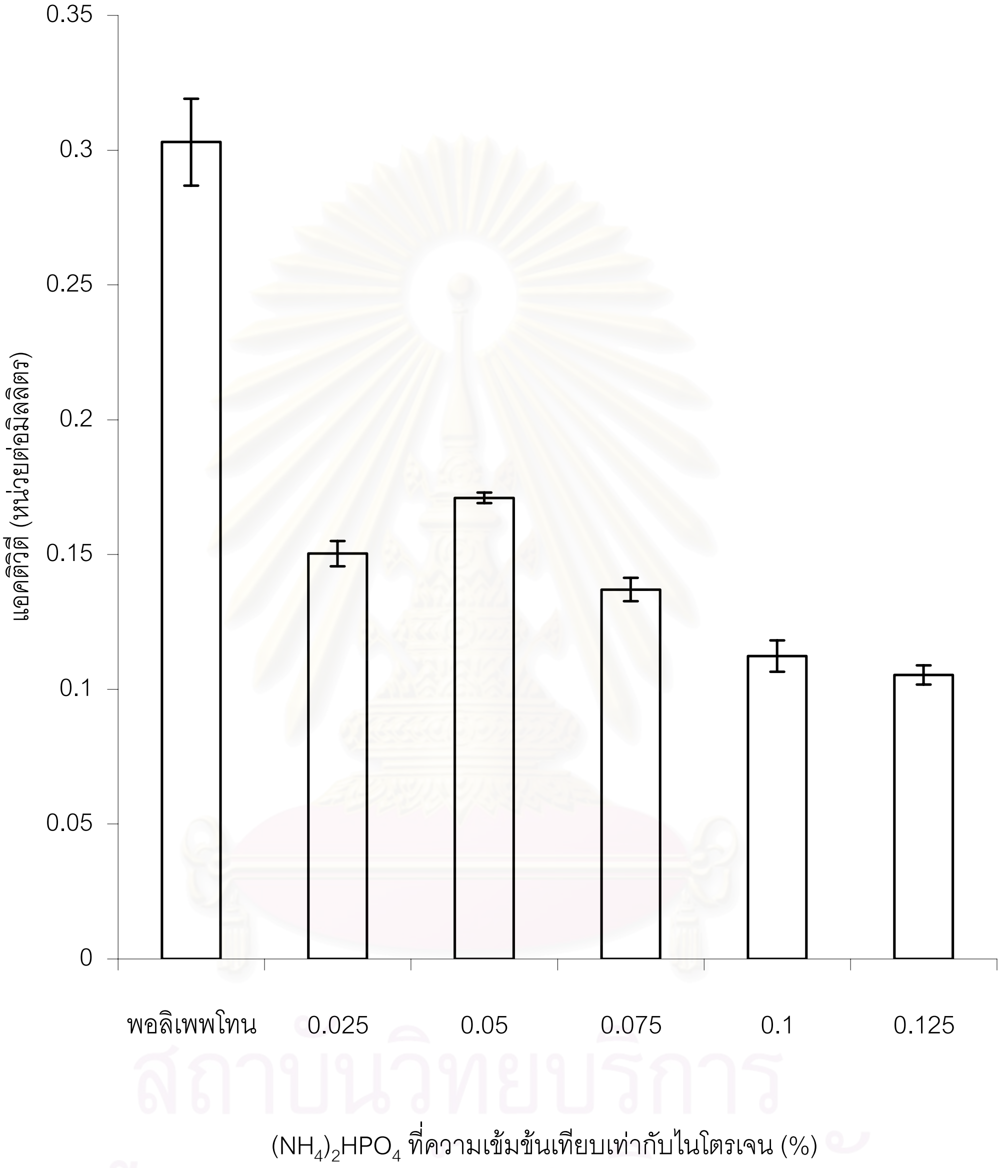
4.9.1 ผลของความเข้มข้น $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสโดย มีไซแลนจากไม้เบิร์ช เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.8.1 แต่แปรปริมาณ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่เทียบเท่ากับไนโตรเจนเป็น 0.025 0.05 0.075 0.1 และ 0.125 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.13 พบว่าที่ความเข้มข้นไนโตรเจนเท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ก็ยังเป็นค่าที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด คือประมาณ 0.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร

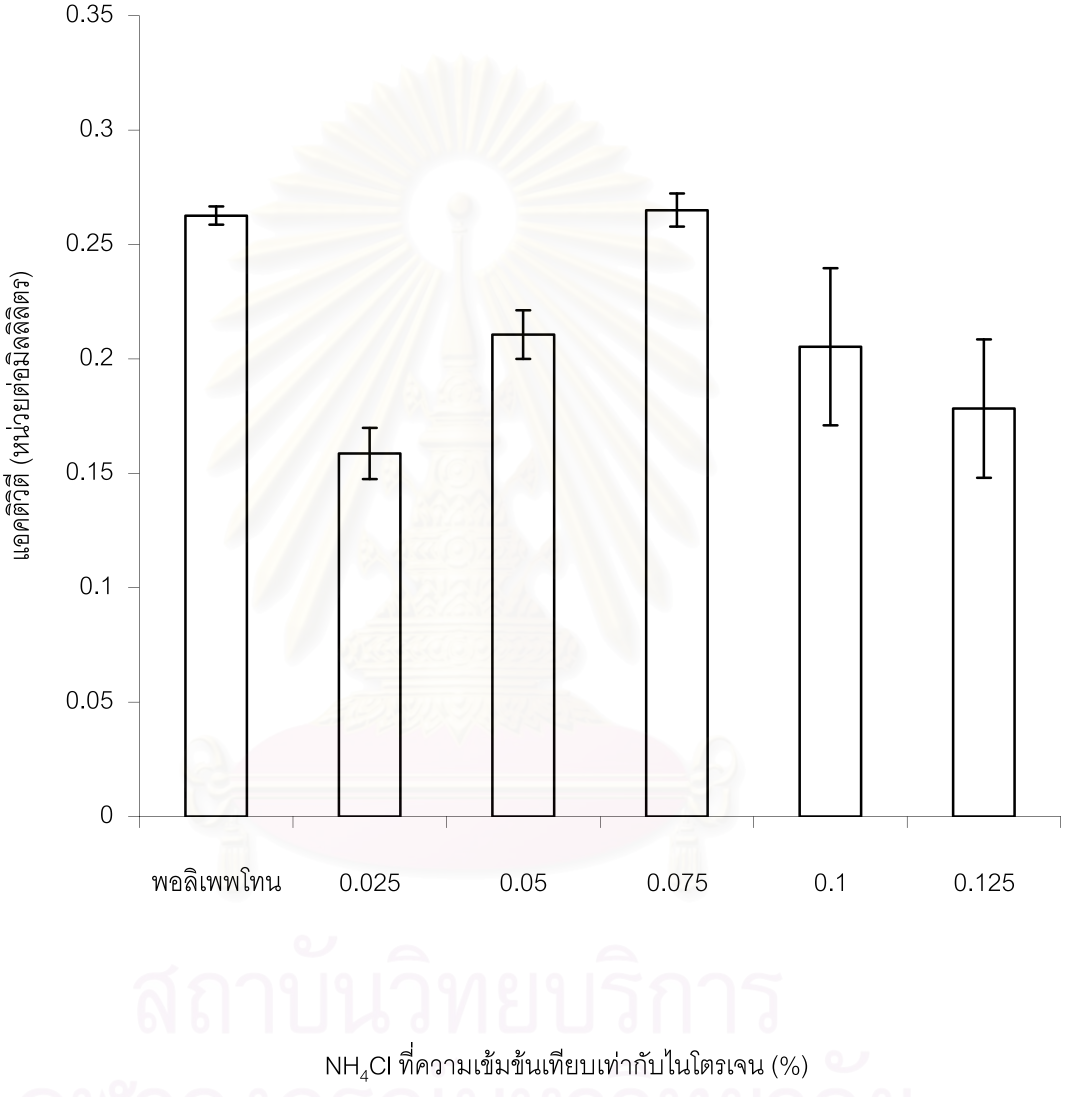
4.9.2 ผลของความเข้มข้น NH_4Cl ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสเมื่อใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.8.2 แต่แปรปริมาณ NH_4Cl ที่เทียบเท่ากับปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.025 0.05 0.075 0.1 และ 0.125 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.14 พบว่าที่ความเข้มข้นไนโตรเจนเท่ากับ 0.075 เปอร์เซ็นต์ ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ประมาณ 0.27 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งทัดเทียมกับการใช้พอลิเพพโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



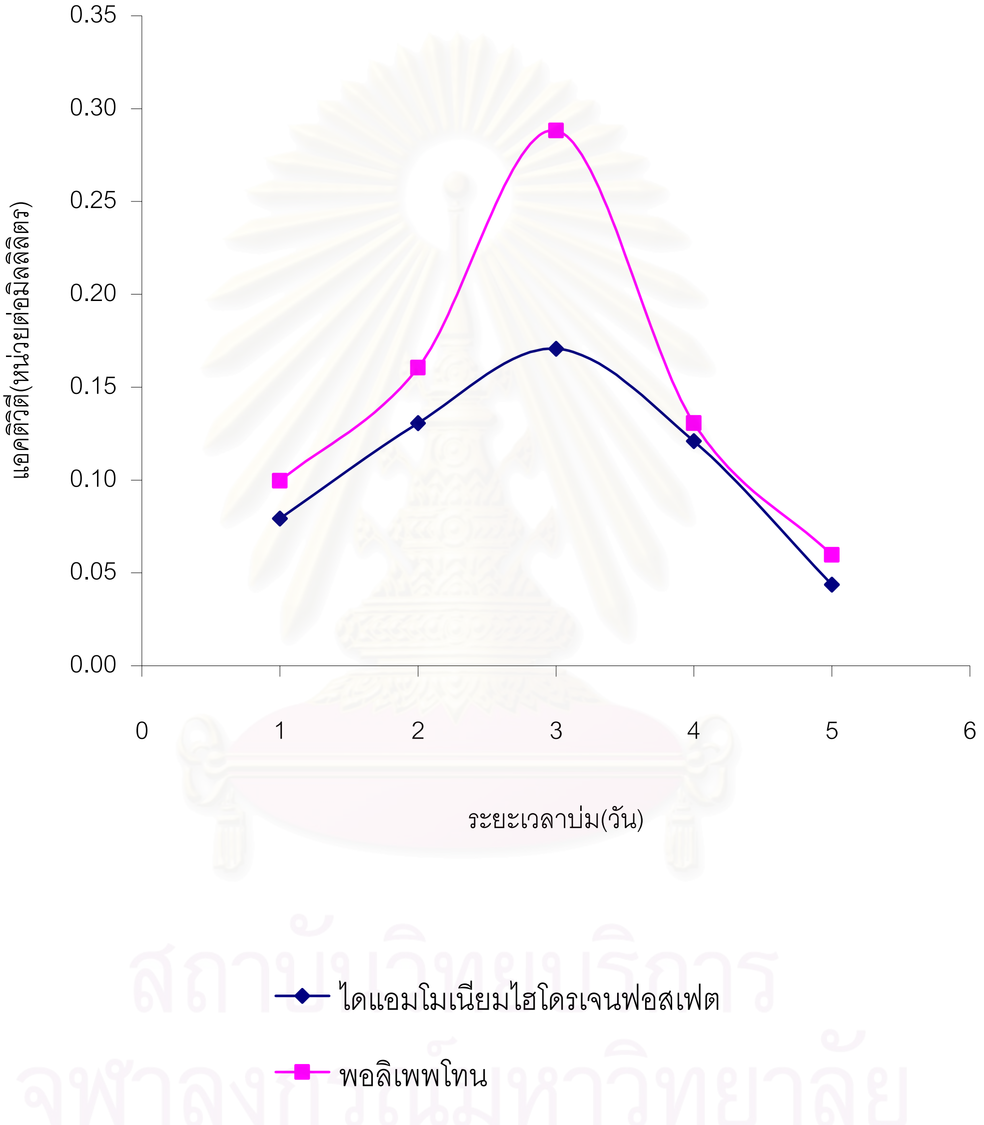
รูปที่ 4.13 ผลของ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นไนโตรเจนต่างๆ เปรียบเทียบกับพอลิเพพโทนที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.05%ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสเมื่อใช้ 1%ไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอนเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน



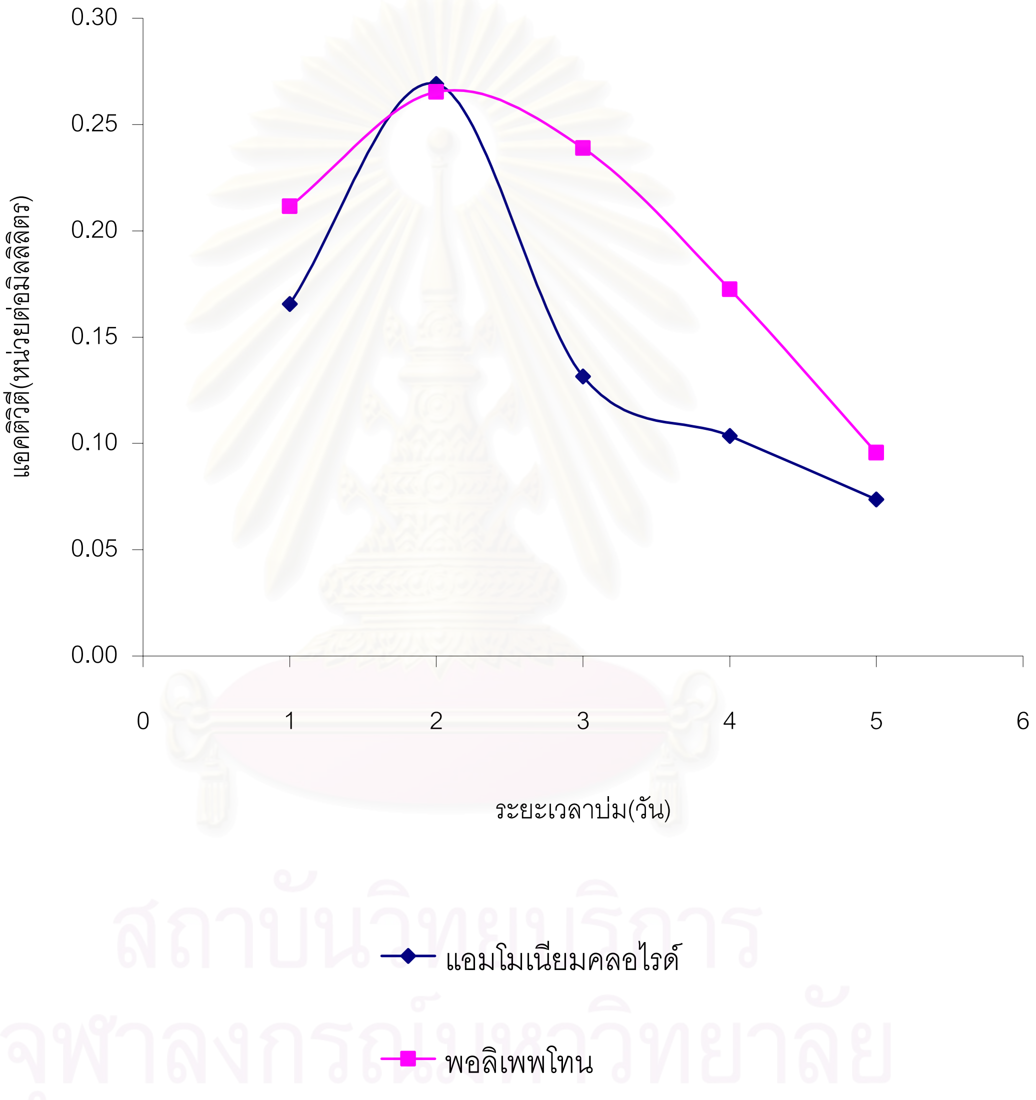
รูปที่ 4.14 ผลของ NH_4Cl ที่ความเข้มข้นไนโตรเจนต่างๆ เปรียบเทียบกับพอลิเพพโทนที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.05% ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสเมื่อใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน

4.10 ระยะเวลาการบ่มเชื้อกับการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสเมื่อใช้อนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับพอลิเพพโทน

จากผลการทดลองข้อ 4.9 พบว่าเมื่อใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ ไซแลนจากไม้เบิร์ชเป็นแหล่งคาร์บอน อนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสคือ $(NH_4)_2HPO_4$ ซึ่งมีความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้เปลือกข้าวโพด 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน อนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสคือ NH_4Cl ที่มีความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.075 เปอร์เซ็นต์ การทดลองนี้ได้ทำการแปรระยะเวลาการบ่มเชื้อ เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 ถึง 5 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 4.15 พบว่าเมื่อมีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดคือ 3 วัน ทั้งกรณีที่ใช้พอลิเพพโทน หรือ $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนส่วนผลการทดลองในรูปที่ 4.16 พบว่าเมื่อใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนระยะเวลาเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คือ 2 วัน ทั้งกรณีที่ใช้อินทรีย์หรืออนินทรีย์ไนโตรเจน



รูปที่ 4.15 ผลของระยะเวลาบ่มเชื้อต่อการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสเมื่อมีไซแลนจากไม้เบิร์ช 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและ $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 0.05%



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.16 ผลของระยะเวลาบ่มเชื้อต่อการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสเมื่อมีไซแลนจาก เปลือกข้าวโพด 1.5% เป็นแหล่งคาร์บอนและ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 0.075%

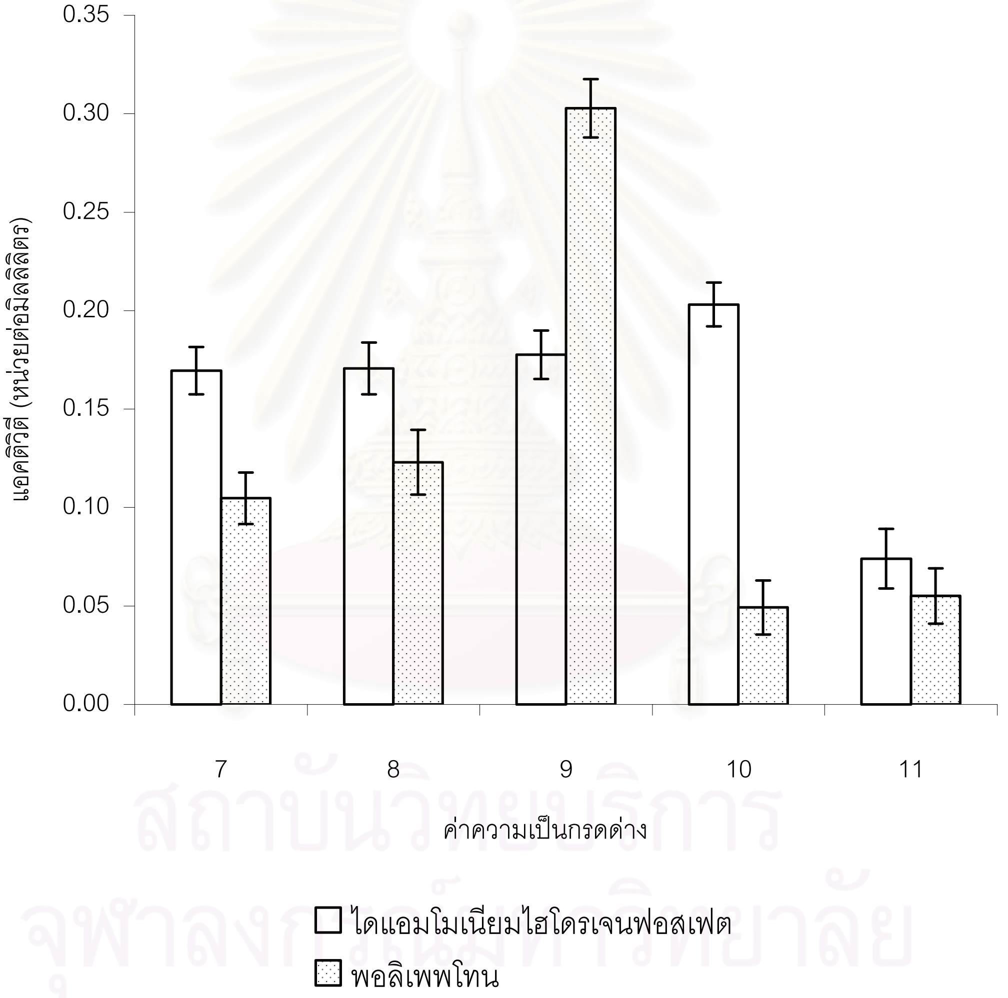
4.11 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนร่วมกับแหล่งอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน ตามข้อมูลที่ได้ในการทดลองข้อ 4.10 มี 4 ชุดดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.2 แล้วแปรระดับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 7.0-11.0

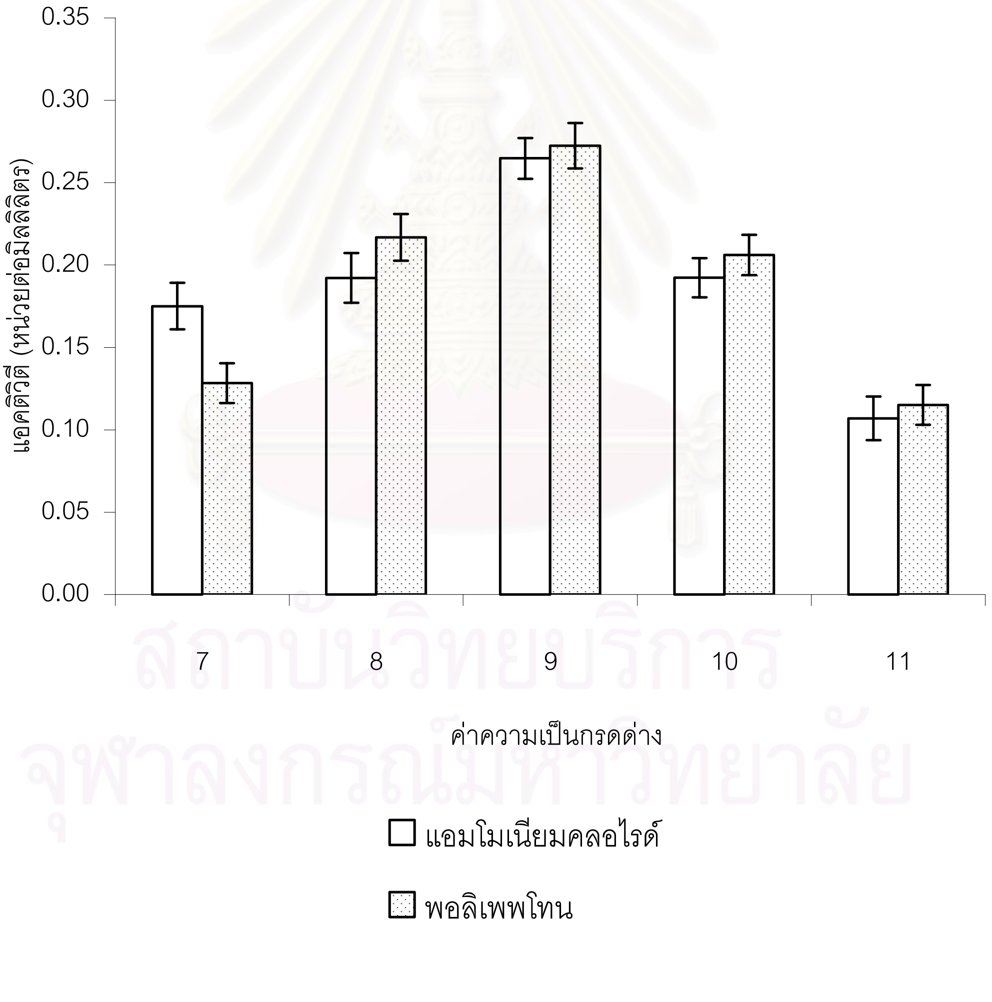
ตารางที่ 4.2 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชุดที่ใช้ในการแปรความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 7.0-11.0 และปริมาณเอนไซม์ที่สร้างขึ้นที่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

ชุดที่	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	อะซีทิลเอสเทอเรสที่ค่า pH ที่เหมาะสม (หน่วย/มล.)
1	ไซแลนจาก ไม้เบิร์ช (1%)	พอลิเพพโทน (0.05% N)	0.30 (pH 9)
2	ไซแลนจาก ไม้เบิร์ช (1%)	$(NH_4)_2HPO_4$ (0.05% N)	0.20 (pH 10)
3	เปลือกข้าวโพด (1.5 %)	พอลิเพพโทน (0.05% N)	0.30 (pH 9)
4	เปลือกข้าวโพด (1.5 %)	NH_4Cl (0.075% N)	0.27 (pH 9)

ผลการทดลองพบว่าค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชุดที่ 1 อยู่ที่ 9 (รูปที่ 4.17) เช่นเดียวกับ ชุดที่ 3 และ 4 (รูปที่ 4.18) ส่วนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชุดที่ 2 มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมค่อนข้างสูงคือ 10 ซึ่งได้สรุปปริมาณเอนไซม์ที่สร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมในตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.17 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส เมื่อใช้ไซแลนจากไม้เบิรช์ 1%เป็นแหล่งคาร์บอนเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 4.18 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส เมื่อใช้เปลือกข้าวโพด 1.5%เป็นแหล่งคาร์บอนเลี้ยงเป็นเวลา 2วัน

4.12 ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

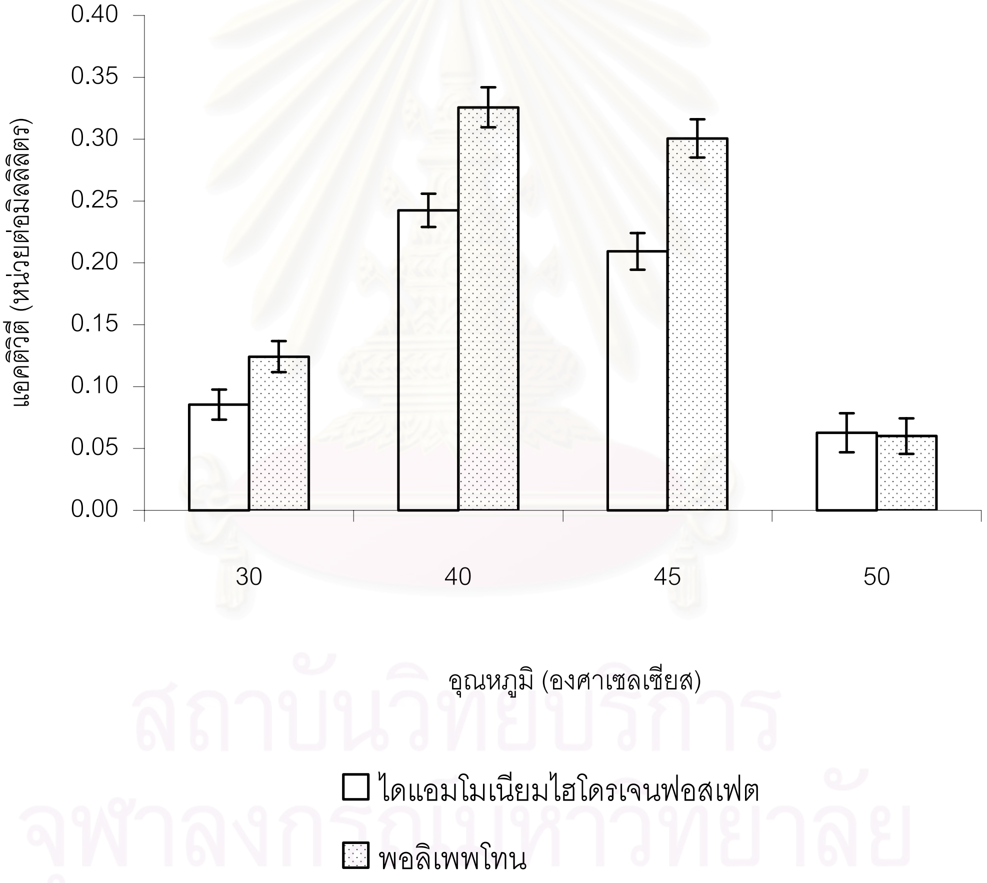
นำภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 4.11 มาเลี้ยงเชื้อดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.3 แล้วแปรอุณหภูมิบ่มเชื้อในช่วง 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.3 ชุดองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสภายใต้ภาวะการแปรอุณหภูมิบ่มเชื้อที่ 30-50 องศาเซลเซียสและปริมาณเอนไซม์ที่สร้างขึ้นที่อุณหภูมิบ่มเชื้อ 40 องศาเซลเซียส

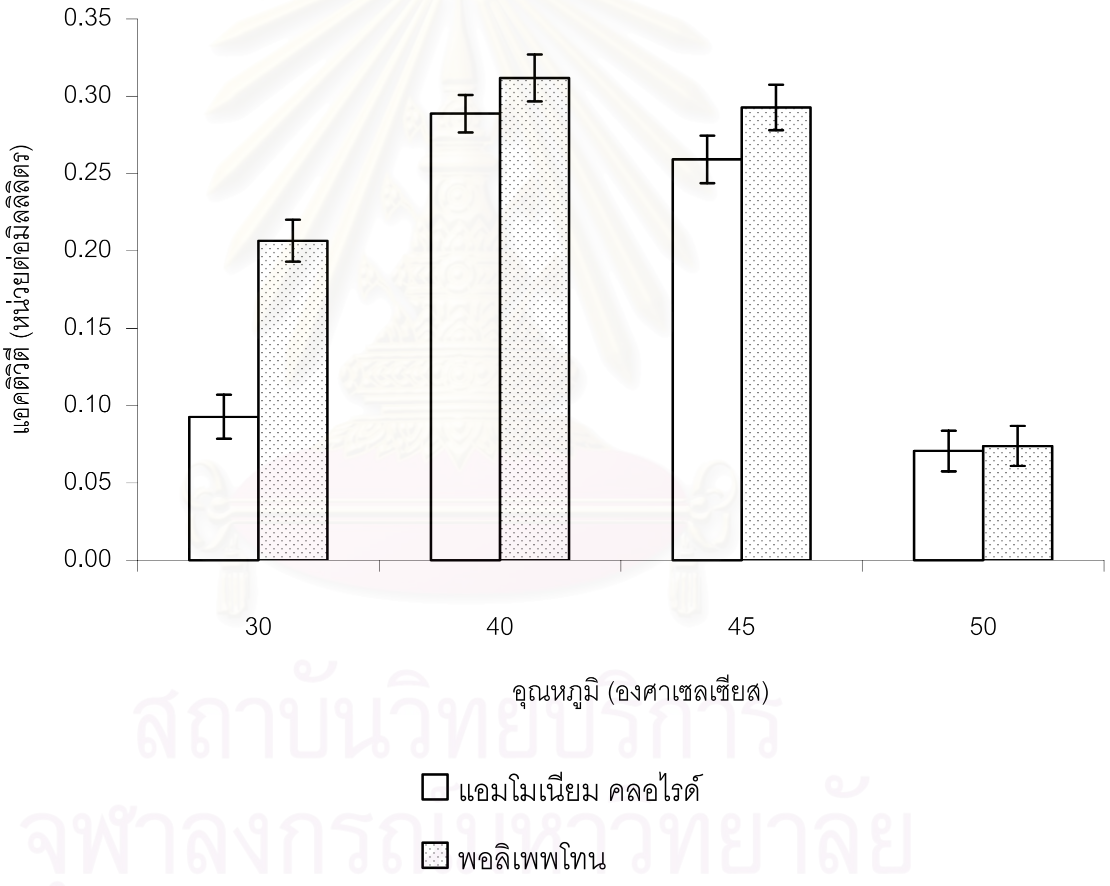
ชุดที่	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)	ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	อะซีทิลเอสเทอเรสจากการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส (หน่วย/มล.)
1	ไซแลนจาก ไม้เบิร์ช (1%)	พอลิเพพโทน (0.05% N)	3	9	0.33
2	ไซแลนจาก ไม้เบิร์ช (1%)	$(NH_4)_2HPO_4$ (0.05% N)	3	10	0.24
3	เปลือกข้าวโพด (1.5 %)	พอลิเพพโทน (0.05% N)	2	9	0.31
4	เปลือกข้าวโพด (1.5 %)	NH_4Cl (0.075% N)	2	9	0.29

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.19 และ 4.20 พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่าอุณหภูมิบ่มเชื้อที่เหมาะสมซึ่งให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเอนไซม์สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 4.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.19 ผลอุณหภูมิต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสในอาหารที่มีไซแลนจากไม้เบิร์ช 1%เป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.20 ผลอุณหภูมิต่อการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพด 1.5% เป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน

4.13 ศึกษาสมบัติบางประการของอะซีทิลเอสเทอเรส

นำอะซีทิลเอสเทอเรสที่ได้จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC 22 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.12 โดยมีไซแลนจากไม้เบิร์ช 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน คือ พอลิเพพโทน ซึ่งมีความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ และผ่านการเตรียมให้เข้มข้นตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 2.5 มาศึกษาสมบัติเบื้องต้นดังนี้

4.13.1 ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

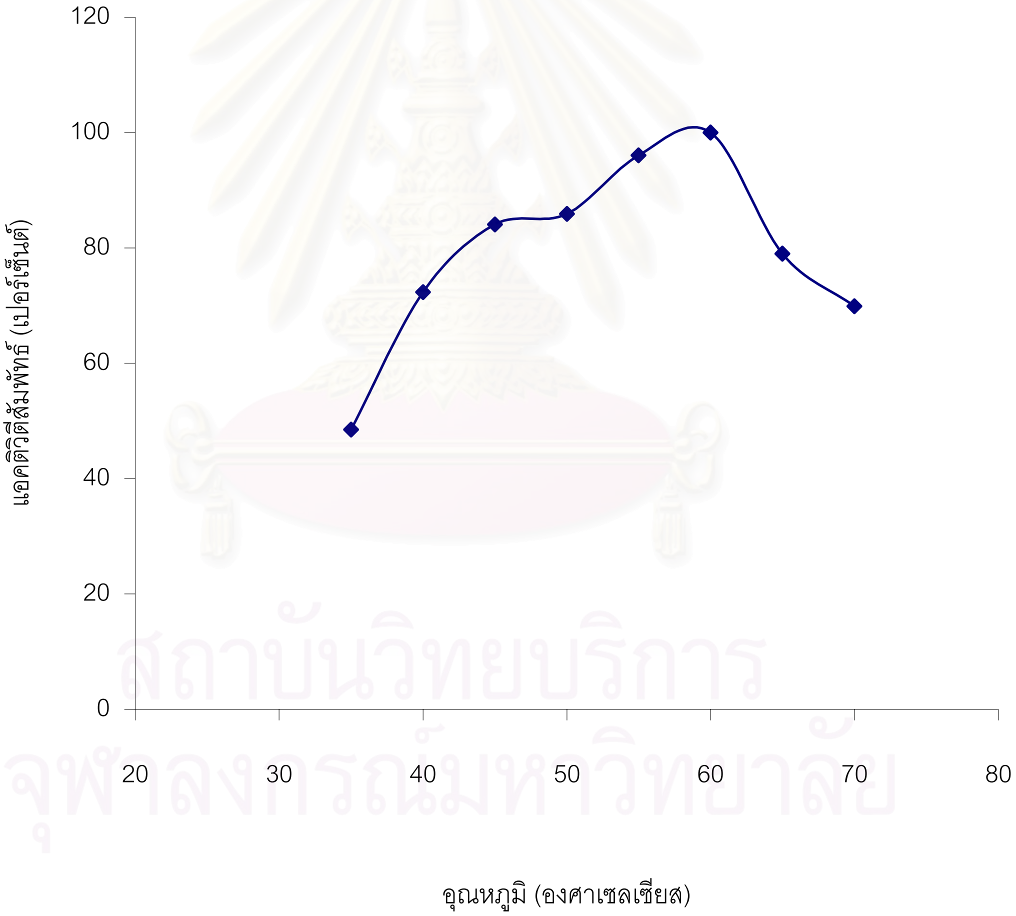
4.13.1.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 35-70 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 60 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 4.21 ดังนั้นในการวิเคราะห์แอคติวิตีครั้งต่อไปจะบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

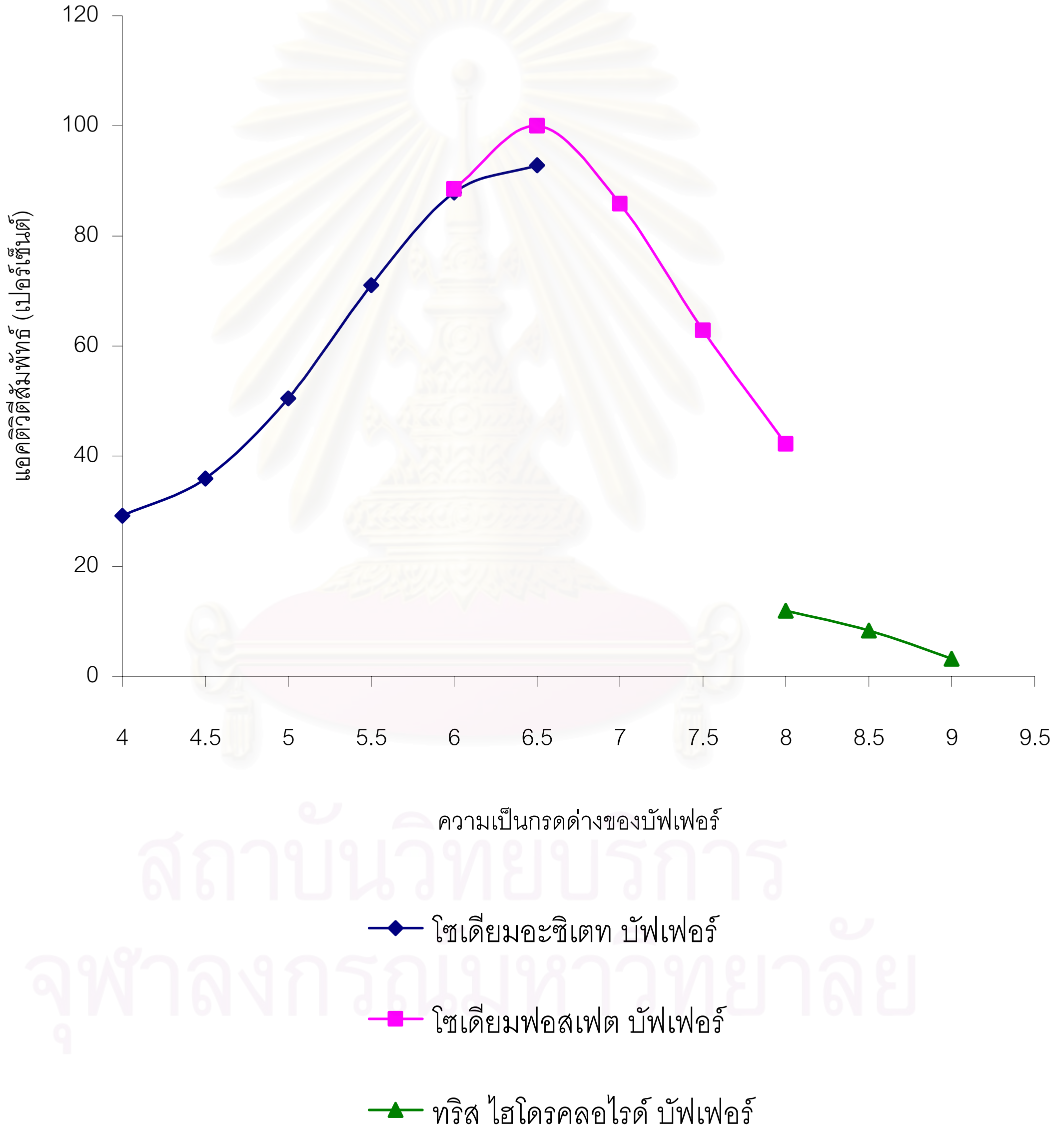
4.13.1.2 ผลความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส ในบัฟเฟอร์ที่แปรความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-9.0 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.22 พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 6.0-7.0 โดยที่ pH 6.5 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.21 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22



รูปที่ 4.22 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22

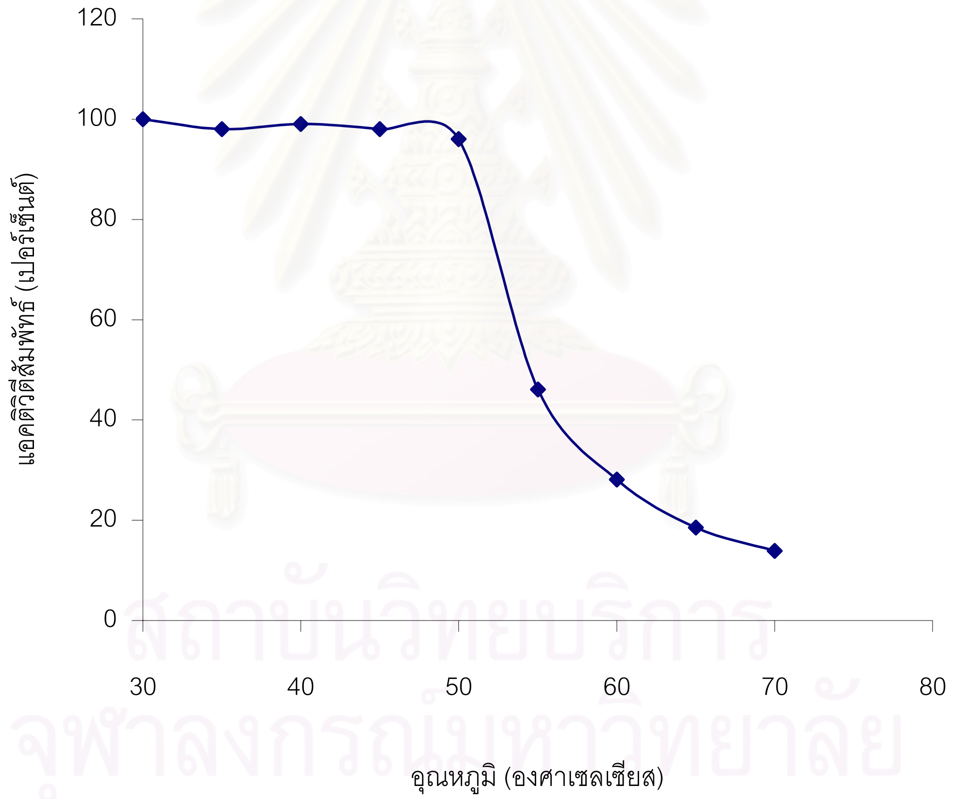
4.13.2 ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรส

4.13.2.1 ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่ออุณหภูมิ

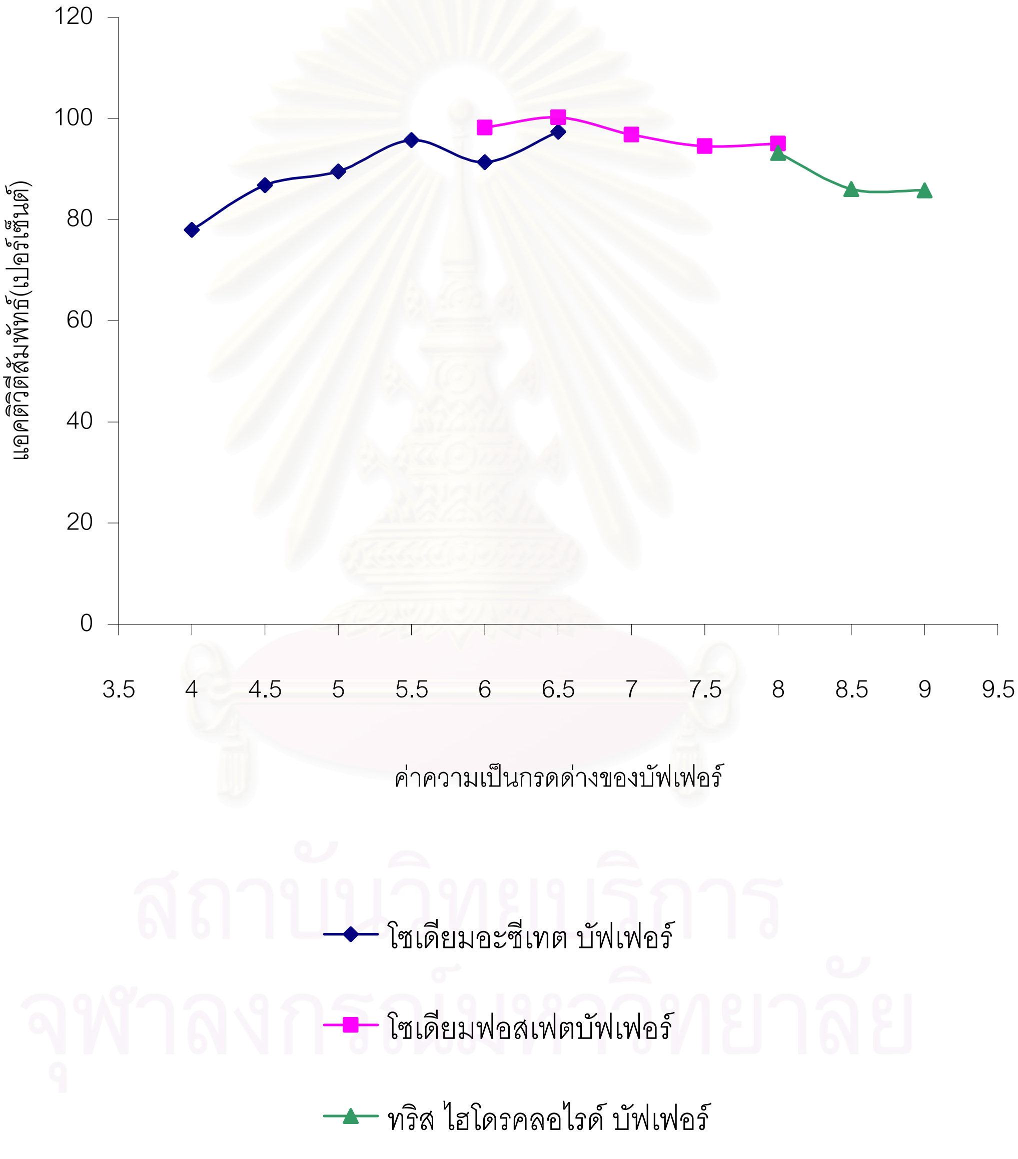
นำอะซีทิลเอสเทอเรสมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยแปรอุณหภูมิในช่วง 35-70 องศาเซลเซียสบ่มนาน 30 นาที จากนั้นนำไปหาแอคติวิตีที่เหลือภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.23 พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสมีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึงประมาณ 50 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีอยู่สูงถึงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว

3.13.2.2 ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อความเป็นกรดด่าง

เมื่อนำอะซีทิลเอสเทอเรสมาบ่มในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่มีความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-9.0 นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหาแอคติวิตีที่เหลือภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า เอนไซม์มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงกว้าง คือตั้งแต่ 4.5-9.0 แต่ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4 จะทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีมากกว่าค่าความเป็นกรดด่างอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.23 ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่ออุณหภูมิ โดยให้อะซีทิลเอสเทอเรสที่ไม่ผ่านการบ่มมีแอคติวิตี 100 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.24 ความเสถียรของอะซีทิลเอสเทอเรสต่อความเป็นกรดด่าง โดยให้อะซีทิลเอสเทอเรสที่ไม่ผ่านการบ่มมีแอคติวิตี 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.4 สมบัติเบื้องต้นของอะซีทิลเอสเทอเรส

สมบัติเบื้องต้น	อะซีทิลเอสเทอเรส
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน	60 องศาเซลเซียส
ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน	pH 6.5
ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	สูงถึง50 องศาเซลเซียส, เมื่อบ่มเป็นเวลา 30นาที
ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างกรดด่าง	pH 4.0-9.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

อะซีทิลเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ย่อยสลายหมู่ข้างเคียงของไซแลน ทำให้ไซแลนถูกย่อยสลายได้อย่างง่ายและสมบูรณ์โดยเอนไซม์ย่อยสายหลัก สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกสีเยื่อกระดาษ การผลิตน้ำตาลไซโลส การปรับปรุงคุณภาพอาหารสัตว์ และยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการดึงหมู่อะซีทิลออกจากพอลิแซคคาไรด์ชนิดอื่นๆ ด้วย

อะซีทิลเอสเทอเรสพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดส่วนใหญ่สร้างและปลดปล่อยออกนอกเซลล์ เช่น *Streptomyces lividans* (Doupont และคณะ, 1996), *Thermomonospora fusca* (Bachmann และคณะ, 1991) *Candida guilliremondii* (Basaran และ Hang, 2000) แต่ก็มีจุลินทรีย์บางชนิดที่สร้างเอนไซม์เก็บไว้ในเซลล์ เช่น *Caldocellum saccharrolyticum* (Luthi และคณะ, 1990) *Thermoanaerobacterium* sp. Strain JW/SL-YS485 (Shao และ Wiegel, 1995) *Orpinomyces* sp. Strain PC-2 (Blum และคณะ, 1999) สำหรับงานวิจัยนี้พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สร้างและปล่อยอะซีทิลเอสเทอเรสออกนอกเซลล์

จากการนำไซแลนชนิดต่างๆ ที่มีขายทางการค้ามาทดลองใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 และมีพอลิเพพโทนซึ่งมีความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าไซแลนจากไม้เบิร์ชที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตี 0.33 หน่วยต่อมิลลิลิตรเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ซึ่งสูงกว่า ไซแลนจากไม้บีช และจากเปลือกข้าวโอ๊ต จากตารางที่ 2.1 ในบทที่ 2 พบว่าไม้เบิร์ชและไม้บีช เป็นไม้เนื้อแข็งทั้งคู่ ซึ่งไซแลนจากไม้เนื้อแข็ง มีหมู่อะซีทิลเป็นองค์ประกอบสูงคือประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นไซแลนจากไม้ทั้ง 2 ชนิดนี้น่าจะมีประสิทธิภาพดีใกล้เคียงกันในการชักนำการสร้างเอนไซม์ แต่ผลการทดลองนี้พบว่าไซแลนจากไม้บีชให้แอคติวิตีต่ำกว่ามาก จึงเป็นไปได้ว่าไซแลนที่เตรียมจากไม้บีชอาจผ่านขั้นตอน deacetylation ทั้งนี้จากการสังเกตพบว่าไซแลนจากไม้เบิร์ช แขวนลอยในน้ำได้ดีกว่าไซแลนจากไม้บีช ดังมีรายงานโดย Beg และคณะ (2001) ว่าไซแลนที่มีหมู่อะซีทิลปริมาณสูงจะแขวนลอยในน้ำได้ดี อย่างไรก็ตามบริษัทผู้ผลิตไม่ได้ระบุปริมาณหมู่อะซีทิลในไซแลนทั้ง 2 ชนิดนี้ ส่วนไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต มีรายงานว่าเป็นอะราบิโนไซแลน และมีหมู่อะซีทิลปริมาณต่ำประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ (Johnson และคณะ, 1988) ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพต่ำในการชักนำการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรส

ได้มีรายงานถึงการนำวัสดุทางการเกษตรหลายชนิดสามารถมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างอะซีทิลเอสเทอเรสได้เช่น ซังข้าวโพด (Basaran และ Hang, 2000) รำข้าวสาลี (Christov และ Prior, 1993) หรือ ฟางข้าวสาลี (Christakopoulos และคณะ, 1999) งานวิจัยนี้ได้นำวัสดุทางการเกษตร เช่น เปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี ฟางข้าว กากเมล็ดฝ้าย และขี้เลื่อย มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนไซแลนจากไม้เบิร์ช เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์และเป็นการลดขยะให้แก่สิ่งแวดล้อม ผลการทดลองพบว่าเปลือกข้าวโพดความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีสูงสุดคือ 0.31 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน ดังนั้นจึงคาดว่าไซแลนในเปลือกข้าวโพดมีหมู่อะซีทิลปริมาณสูงเป็นองค์ประกอบ แต่ถ้าหากเพิ่มความเข้มข้นของเปลือกข้าวโพดมากขึ้นกว่านี้ พบว่าแอคติวิตีของอะซีทิลเอสเทอเรสจะลดต่ำลง อาจเนื่องจากเมื่อความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดเพิ่มขึ้นทำให้การส่งผ่านของอากาศสู่อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ทั่วถึง การทดลองที่ผ่านมาใช้พอลิเพพโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เนื่องจากพอลิเพพโทนเป็นสารที่มีราคาแพง จึงได้ทดลองใช้อนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ มาเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าเมื่อใช้ไซแลนจากไม้เบิร์ชความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน อนินทรีย์ไนโตรเจนให้ผลผลิตเอนไซม์สูงคือ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นเทียบเท่าเทียบเท่า 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยให้แอคติวิตี 0.24 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ NH_4Cl ที่ความเข้มข้นเทียบเท่าไนโตรเจน 0.075 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยให้ผลผลิต 0.29 หน่วยต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมส่วนใหญ่ยังคงเดิมคือที่ 9.0 ยกเว้นเมื่อมีแหล่งคาร์บอนคือไม้เบิร์ชความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนคือ $(NH_4)_2HPO_4$ มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเปลี่ยนไปเป็น 10.0 อาจเนื่องจาก HPO_4^{2-} มีค่า pK3 เท่ากับ 12.38 (Voet และ Vote, 1995) ดังนั้นจึงต้องการค่าความเป็นกรดด่างสูง เพื่อให้การแตกตัวของอิออนเกิดขึ้นได้ดีแต่อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 11.0 การสร้างเอนไซม์กลับลดลง (รูปที่ 4.17) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *Streptomyces* sp. PC22 เจริญได้ไม่ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่า 10.0

ตารางที่ 5.1 ได้แสดงเปรียบเทียบปริมาณอะซีทิลเอสเทอเรสที่สร้างโดย *Streptomyces* sp. PC22 กับจุลินทรีย์อื่นๆ ที่เลี้ยงในภาวะที่เหมาะสม จากข้อมูลในตาราง พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สามารถผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสในปริมาณสูงเมื่อเปรียบเทียบกับ จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และยังใช้ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อค่อนข้างสั้น นอกจากนั้นการใช้เปลือกข้าวโพด และ NH_4Cl ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนราคาถูก ที่หาได้ง่ายให้ผลผลิตใกล้เคียงกับการใช้ไซแลน

ร่วมกับพอลิเพพโทนซึ่งมีราคาแพง ดังนั้นถ้ามีการผลิตเอนไซม์นี้ในระดับอุตสาหกรรมก็จะสามารถทำได้โดยใช้ต้นทุนการผลิตต่ำ

จากการเปรียบเทียบสมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรสที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. PC22 กับของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่มีผู้รายงานไว้ดังแสดงในตารางที่ 5.2 พบว่าอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 มีสมบัติค่อนข้างดีกว่าจากจุลินทรีย์อื่นๆ หลายชนิด เพราะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงและที่ค่าความเป็นกรดด่างค่อนข้างสูง และแม้ที่ 70 องศาเซลเซียสหรือที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ก็ยังคงมีแอคติวิตีอยู่ในเกณฑ์สูง (รูปที่ 4.21 และ 4.22)

ผลการศึกษานี้ พบว่าการผลิตอะซีทิลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 สามารถใช้วัสดุทางการเกษตรคือ เปลือกข้าวโพดมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนไซแลนทางการค้าได้ และสามารถใช้ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 9.0 ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพียง 2 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 ชนิดของจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและระยะเวลาการเลี้ยงปริมาณอะซีทิลเอสเทอเรส

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ซ)	pH	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)	แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp. PC22	ไซแลนจาก ไม้เบิร์ช (1%)	พอลิเพพโทน (0.05 % N)	40	9.0	3	0.33	งานวิจัยนี้
	ไซแลนจาก ไม้เบิร์ช (1%)	$(NH_4)_2HPO_4$ (0.05 % N)	40	10.0	3	0.24	
	เปลือกข้าวโพด (1.5 %)	พอลิเพพโทน (0.05 % N)	40	9.0	2 วัน	0.31	
	เปลือกข้าวโพด (1.5 %)	NH_4Cl (0.075 % N)	40	9.0	2 วัน	0.29	
Fusarium oxysporum	ซังข้าวโพด (3%)	$(NH_4)_3PO_4$ (0.1%)	30	9.0	5 วัน	0.71	Christakopoulos และคณะ ,1999
Bacillus pumilus	ซังข้าวโพด (0.5%)	-	37	7.0	40 ชม.	0.1	Degrassi และคณะ, 1998

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 (ต่อ) ชนิดของจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและระยะเวลาการเลี้ยงปริมาณอะซีทิลเอสเทอเรส

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	อุณหภูมิ (°ซ)	pH	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)	แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	เอกสารอ้างอิง
Termitomyces clypeatus	ไซแลนจากไม้เบิร์ช (1%)+ เซลลูโลสอะซิเทต (0.1%)	สารสกัดจากยีสต์ (0.5%)	-	-	6	1.64	Mukhopadhyay และคณะ, 1997
Streptomycese C-248	รำข้าวสาลี (1%)	-	37	-	3	0.02	Christov และ Prior ,1993
Streptomycese C-254	รำข้าวสาลี (1%)	-	37	-	3	0.14	Christov และ Prior, 1993
Streptomycese flavogriseus 45-CD	รำข้าวสาลี (1%)	-	37	-	3	0.08	Christov และ Prior, 1993
Aspergillus awamori VTT- D-75028	รำข้าวสาลี (3%)	-	30	5.0	4	0.18	Christov และ Prior ,1993

ตารางที่ 5.1 (ต่อ) ชนิดของจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและระยะเวลาการเลี้ยงปริมาณอะซีทิลเอสเทอเรส

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	อุณหภูมิ(°ซ)	pH	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)	แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	เอกสารอ้างอิง
Rodotorula Mucilaginosa NRC 21 1003	Triacetin (1%)	-	30	5.5	5 วัน	0.003	Christov และ Prior,1993
Streptomycese C-248	รำข้าวสาลี (1%)	-	37	-	3	0.02	Christov และ Prior,1993
Thermomonospora fusca	ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (0.2%)	สารสกัดจากยีสต์ (0.1%)	50	-	80 ชม.	< 0.1	Bachmann และMccarthy, 1991
Trichoderma reesei QM 91414	larchwood(0.9%) +cellulose(0.1%)	ยูเรีย (0.15%)	30	-	6	0.4	Biely และSchneider,1988
Trichoderma reesei RUT-C30	larchwood(0.9%) +cellulose(0.1%)	ยูเรีย (0.15%)	30	-	5	0.367	Biely และ Schneider,1988
Schizophyllum commune	cellulose (1%)	ยูเรีย (0.15%)	30	-	11	0.35	Biely และ Schneider,1988

หมายเหตุ : - คือไม่ระบุ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.2 สมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรส จาก *Streptomyces* sp. PC22 เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°ซ)	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ(°ซ)	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp. PC22	60	50, 30 นาที	6.5	4.0-9.0	จากการทดลอง
Aspergillus aculeatus	40	50, 20 ชม,	5.5	6.0-7.0	Leeuwen และคณะ, 1992
A.awamori	37	50, 1 ชม..	6.0-7.0	7.0-9.0	Koseki และคณะ, 2005
A.clavatus	37	--	6.5	-	Linden และคณะ, 1994
A. japonicus	37	-	6.5	-	Linden และคณะ, 1994
A. nidulans	37	-	6.5	-	Linden และคณะ, 1994
A. niger	37	-	6.5	-	Linden และคณะ, 1994
A. versicolor	37	-	6.5	-	Linden และคณะ, 1994
Bacillus pumilus	45	50,1 ชม.	8.5	8.0-9.0	Degrassi และคณะ, 2000
Candida Guilliermondii	60	20-60 ,12 ชม.	7.5	5.8-8.0	Basaran และ Hang, 2000
Caldocellum saccharolyticum	70	-	6.0	-	Luthi และคณะ, 1990
Clostridium cellulovorans	50	30, 12 ชม.	6.0	3.0-7.0	Kosugi และคณะ, 2002
Fusarium oxysporum	55	-	6.5	-	Christakopoulos และคณะ, 1999

ตารางที่ 5.2 (ต่อ) สมบัติของอะซีทิลเอสเทอเรส จาก *Streptomyces* sp. PC22 เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°ซ)	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ(°ซ)	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	เอกสารอ้างอิง
Orpinomyces sp.	30	-	9.0	-	Blum และคณะ, 1999
Schizophyllum commune	30	37,30 นาที	6.5	4.5-9	Linden และคณะ, 1994
Streptomycese flavogriseus	50	-	6.0	-	Linden และคณะ, 1994
S. lividans	70	72, 15 นาที	5.5-8.5	-	Dupont และคณะ, 1996
S. olivochromigenes	50	-	6.0	-	Linden และคณะ, 1994
Termitomyces clypeatus	50	50 , 1 ชม.	6.5	4.5-8	Mukhopadhyay และคณะ, 1997
Thermoanaerobacterium sp.	84	50-60,1 ชม.	7.5	8.0-9.0	Shao และ Wiegel, 1995
Tricoderma reesei	30	-	6.5	-	Linden และคณะ, 1994

หมายเหตุ : - คือไม่ระบุ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2541. การใช้ประโยชน์ของกากอ้อย. วารสารน้ำตาล. 34 : 4-21.

สุมาลี อึ้งใจธรรม. 2539. ไซแลเนสและบีตาไซโลซิเดสจาก *Streptpmyces* spp. ที่ชอบร้อนและด่าง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Altaner, C., Saak, B., Tenkanen, M., Eyzaguirre, J., Fauld, C. B., Biely, P., Viikari, L., Siika-aho, M., and Puls, J. 2003. Regioselective deacetylation of cellulose acetates by acetyl xylan esterases of different CE- families. J. Biotecnol. 105: 95-104.

Bachmann, S. L., and Mccarthy, A. J. 1991. Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Themomonospor fusca*. Appl. Environ. Microbiol. 57(8): 2121-2130.

Basaran, P., and Hang, Y. D. 2000. Purification and characterization of acetyl esterase from *Candida gulliermondii*. Lett. Appl. Microb. 30: 167-171.

Beg, O. K., Kapooe, M., Mahajan, L., and Hoondal, G. S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 326-338.

Biely, P. 1985. Microcbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol. 3(11): 286-290.

Biely, P., Mackenzie, C. R., and Schncider, H. 1988. Production of acetyl xylan esterase by *Trichoderma reesei* and *Schizophyllum commune*. Can. J. Microbiol. 34: 767-772.

Biely, P., Mastihubova, M., Grange, D. C., Zyl, W. H., and Prior, B. A. 2004. Enzyme-coupled assay of acetylxylan esterases on monoacetylated 4-nitrophenyl β-D-xylopyranosides. Anal. Biochem. 332: 109-115.

Biely, P., Puls, J., and Schneider, H. 1985. Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. FEBS. Lett. 1861: 80-84.

Biley, P., Wong, K. K. Y., Suckling, I. D., and Spanikova, S. 2003. Transacetylations to carbohydrates catalyzed by acetyl xylan esterase in the presence of organic solvent. Biochim. Biophys. Acta. 1623: 62-71.

Blum, D. L., Li, X. L., Chen, H., and Ljungdahl, L. G. 1999. Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2. Appl. Environ. Microbiol. 65(9): 3990-3995.

Chavez, R., Schachter, K., Navarro, C., Peirano, A., Bull, P., and Eyzaaguirre, J. 2004. The acetyl xylan esterase II gene from *Penicillium Purpurogenum* is differentially expressed in several carbon sources and tightly regulated by pH. Biol Res. 37: 107-113.

Christakopoulos, P., Mamma, D., Kekos, D., and Maeris, B. J. 1999. Enhanced acetyl esterase production by *Fusarium oxysporum*. World J. Microbiol Biotechnol. 15: 443-446.

Christov, P. L., and Prior, B. A. 1993. Esterases of xylan-degrading microorganisms: production properties and significance. Enzyme. Microb. Technol. 15: 460-475

Clarke, J. L., Rixon, J. E., Ciruela, A., Gilbert, H. J., and Hazlewood, G. P. 1997. Family-10 and Family-11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleach ability of hardwood and softwood paper pulps. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 177-183.

Dalrymple, B. P., Cybinski, D. H., Layton, I., Mcsweeney, C. S., Xue, G. P., Swadling Y. J. O., and Lowry, J. B. 1997. Three *Neocallimastix patriciarum* esterase associated with the degradation of complex polysaccharides are members of a new family of hydrolases. Microbiology. 143: 2605-2614.

Degrassi, G., Okeke, B. C., Bruschi, C. V., and Venturi, V. 1998. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Bacillus pumilus*. Appl. Environ. Microbiol. 64(2): 789-792.

Degrassi, G., Kojic, M., Ljubijankie, G., and Venturi, V. 2000. The acetyl xylan esterase of *Bacillus pumilus* belong to a family of esterase with broad substrate specificity. Microbiology. 146: 1585-1591.

Detroy, R. W., Lindenfelser, L. A., Sommer, S., and Orton, W. L. 1981. Bioconvertion of wheat straw to ethanol : chemical modification , enzymatic hydrolysis and fermentation. Biotechnol. Bioeng. 23: 2527-2535.

Dupont, U., Daigneault, N., Shareck, Fs., Morosoli, R., and Kluepfel, D. 1996. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans*. Bichem J. 319: 881-886.

Ferreira, L. M. A., Wood, T. M., Williamson, G., Faulds, C., Hazlewood, G. P., Black, G. W., and Gilbert, H. J. 1993. A modular esterase from *Pseudomonas fluoresens* subsp. cellulose contains a non-catalytic cellulose-binding domain. Biochem. J. 294: 349-355.

Halgasova, N., Kutejova, E., and Timko, J. 1994. Purification and some characteristics of the acetyl xylan esterase from *Schizophyllum commune*. Biochem. J. 298: 751-755.

Hespell, R. B., and O'Bryan-Shah, P. J. 1988. Esterase acivities in *Butyrivibrio fibrisolvens* strains. Appl. Environ. Microbiol. 54(8): 1917-1922.

Hon, D. N. S., and Shiraishi, N. 1990. Wood and Cellulosic Chemistry. New York: Marcel Dekker.

Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M., and Schrempf, H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces* : a laboratory manual. Norwich : The John Innes Foundation.

Johnson, K. G., Fontana, J. D., and Mackenzie. C. R. 1988. Measurement of acetyl xylan esterase in *Streptomyces*. Methods Enzymol. 160: 551-560.

Kanauchi, M., and Bamforth, C. W. 2003. Use of Xylose dehydrogenase from *Trichoderma viride* in an enzymic method for the measurement of pentosan in barley. J. Inst. Brew. 109(3): 203-207.

Kantelinen, A., Rantanen, T., Buchert, J. J., and Viikari, L. 1993. Enzymatic solubilization of fiber-bound and isolated birch xylans. J. Biotechnol. 28: 219-228.

Kirk, T. K. and Cullen, D. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi. In: Young, R.A. & Akhtar, M. (eds.): Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. New York: John Wiley & Sons.

Kormerlink, F. J. M., Lefebvre, B. Strozyk, F., and Voragen, A. G. J. 1993. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus niger*. J. Biotechnol. 27: 267-282.

Koseki, T., Miwa, Y., Fushinobu, S., and Hashizume, K. 2005. Bichemical characterization of recombinant acetyl xylan esterase from *Aspergillus awamori* expressed in *Pichia pastoris* : mutational analysis of catalytic residues. Biochim. Biophy. 28: 218-225.

Kusugi, A., Murashima, K., and Doi, R. H. 2002. Xylanase and acetyl xylan esterase activity of Xyn A, a key subunit of the *Clostridium cellulivorans* cellulosome for xylan degradation. Appl. Environ. Microbiol. 68(2): 6399-6402.

Lee, H., To, R. J. B., Latta, R. K., Biely, P., and Schneider, H. 1987. Some properties of extracellular acetyl xylan esterase produced by the yeast *Rhodotorula muciladinosa*. Appl. Environ Microbiol. 53(12): 2831-2834.

Leeuwen, M. J. F., Broek, L. A. M., Schols, H. A., Beldman, G., and Voragen., A. G. J. 1992. Rhamnogalacturonan acetyl esterase : a novel enzyme from *Aspergillus aculeatus*, specific for the deacetylation of hairy (ramified) regions of pectins. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 347-349.

Linden, J. C., Decker, S. R., and Samara, M. 1994. Role of acetyl esterase in biomass conversion. American Chemical Society. 453-467.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-272.

Luthi, E., Jasmat, N. B., and Bergquist, P. L. 1990. Overproduction of an acetyl xylan esterase from the extreme thermophile."*Caldocellum Saccharolyticum*" in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 214-219.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Maijala, P. 2000. Heterobasididion annosum and wood decay : Enzymology of cellulose, hemicellulose and lignin degradation. Helsinki: University of Helsinki.

Mcdermid, K. P., Forsberg, C. W., and Mackenzie, C. R. 1990. Purification and properties of an acetyl xylan esterase from *Fibrobacter Succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol. 56(12): 3805-3810.

Mcdermid, K. P., Mackenzie, C. R., and Forsberg, C. W. 1990. Esterase activity of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *Succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol. 56(1): 127-132.

Mukhopadhyay, A. Hazra, P. P., Sengupta, T., Ghosh, A. K., and Sengupta, S. 1997. Acetyl esterase production by *Termitomyces clypeatus*. Biotechnol. Lett. 19(2): 159-161.

Poutanen, K., Sunberg, M., Korte, H., and Puls, J. 1990. Deacetylation of xylans by acetyl esterase of *Trichoderma reesei*. Appl Microbiol Biotechnol. 33: 506-510.

Puls, J., Poutanen, K., and Korner, H. U. Viikari. 1985. Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. Appl. Microbiol. Biotecnol. 22: 416-423.

Saddler, J. N. 1993. Bioconversion of forest and agricultural residues. Wallington ford: C.A.B. Internationnal.

Samara, M. 1992. Master'. Thesis. Colorado State University. U.S.A.

Saraswat, V., and Bisaria, V. S. 1997. Biosynthesis of xylanolytic and xylan-debranching enzyme in *Melanocarpus albomyces* II S68. J. Ferment. Bioeng. 83(4): 352-357.

Shao, W., and Wiegel, J. 1995. Purification and characterization of two Thermostable acetyl xylan esterase from *Thermoanaerobacterium* sp. strain SW/SL-YS485. Appl. Environ. Microbiology. 61(2): 729-733.

Stayermark, A. L. 1951. Microdetermination of nitrogen by the Kjeldahl method. Quantitative Organic Microanalysis. New York: The Blakiston Com.

Tsao, G. T., and Chiang, L. 1983. Cellulose and hemicellulose technology in Berry, S.D.R., and Kristianiansen, B. (eds.). The Filamentus fungi : Fungal Technology. New York: John Wiley and Sons Inc.

Tsujibo, H., Ohtsuki, T., Iio T., Yamazaki, I., Miyamoto, K., Sugiyama, M., and Inomori, Y. 1997. Cloning and sequence analysis of genes encoding xylanases and acetyl xylan esterase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. Appl. Environ. Microbiol. 63(2): 661-664.

Uchida, H., Kusakabe, I., Kawabata, Y., Ono, T., and Murakami, K. 1992. Production of xylose from xylan with intracellular enzyme system of *Aspergillus niger* 5-16. J. Ferment. Bioeng. 3(74): 153-158.

Ungchaithum, S., and Pinphanichakarn, P. 1998. Optimization of xylanase production by *Streptomyces* sp. PC22 growing on agricultural residues. J. Sci. Res. Chula. Univ. 23(1): 45-50.

Voet, D., and Voet, J. D. 1995. Bichemistry. New York: John Wiey and Sons.

Walker, G. 1998. Yeast Physiology and Biotecnolology. Chichester: John Wiey and Sons.

Williams, A. G.,and Withers, S. E. 1981. Hemicellulose-degrading enzymes synthesized by rumen bacteria. J. Appl Bacteriol. 51: 375-385.

Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N. 1988. Multiplicity of β-1,4-xylanase in microorganisms functions and applications. Microbiol Rev. 52(3): 305-317.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptic soy broth (TSB)

Pancreatic digest of casein	17.0	กรัม
Enzymatic digest of soy bean meal	3.0	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Dipotassium Phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ	9.0	
อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน		

2. สูตรอาหารข้าวไรท์

วุ้นผง (Agar)	1.8	เปอร์เซ็นต์
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	0.3	เปอร์เซ็นต์
กลูโคส (glucose)	0.2	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.1	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	0.1	เปอร์เซ็นต์
ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ	9.0	
อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม (xylan complex medium)

ไซแลน (xylan)	0.5	เปอร์เซ็นต์
พอลิเพบโตน (polypeptone)	0.5	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.1	เปอร์เซ็นต์
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.4	เปอร์เซ็นต์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.02	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1	เปอร์เซ็นต์
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.002	เปอร์เซ็นต์
ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ	9.0	
อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารละลายพารา-ไนโตรเฟนิลอะซีเทต (ρ-nitrophenylacetate)
   เตรียมโดย ชั่งพารา-ไนโตรเฟนิลอะซีเทต 1.8 มิลลิกรัม ละลายใน 50 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.รีเอเจนท์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (1951)

2.1 สารละลาย Lowry A ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	20.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	4.0	กรัม
โซเดียมโปแทสเซียมตราเตรต (sodium potassium tatrate)	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

2.2 สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	0.5	ลิตร

2.3 สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย

สารละลาย Lowry A	50	ส่วน
สารละลาย Lowry B	1	ส่วน

2.4 สารละลายผสม D ประกอบด้วย

โฟลิน-ฟีนิล รีเอเจนท์ (Folin-Phenol Reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

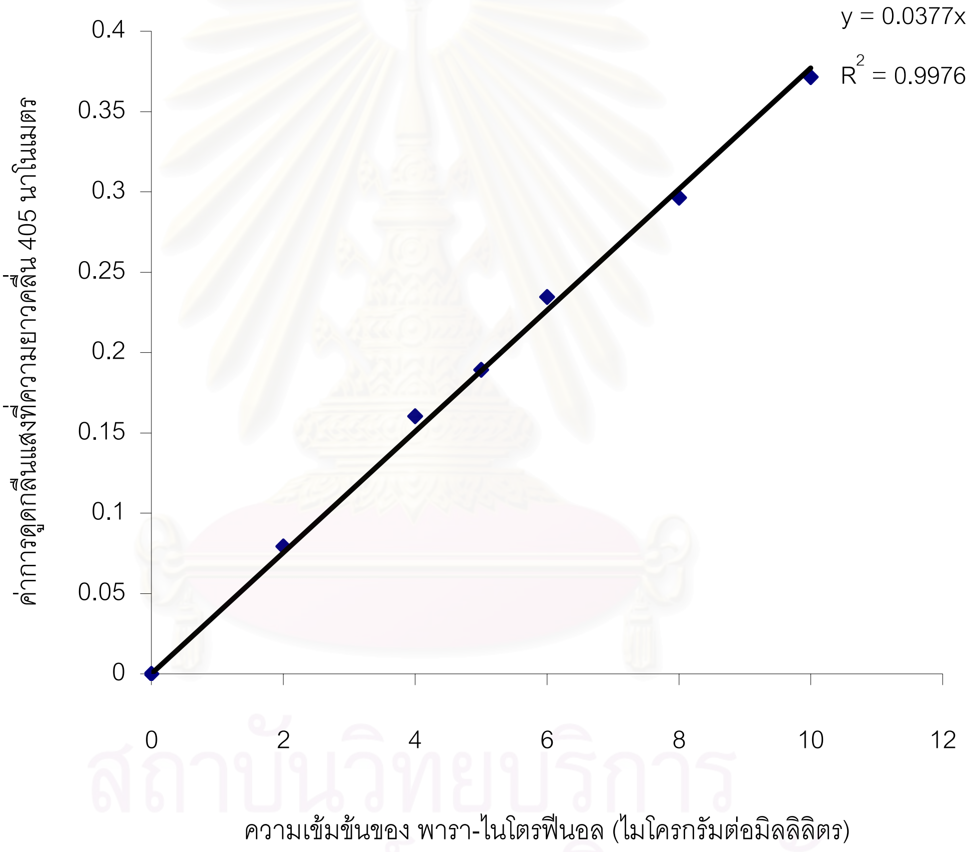
การนับสปอร์ด้วย Hemacytometer

1. ใช้ไมโครปิเปตที่ปราศจากเชื้อ ดูดสารละลายสปอร์ที่ผ่านการกรอง และอยู่ในกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงบนช่องของ hemacytometer ปิดด้วย cover slip ให้เต็มช่องหลังจากนั้นนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า
2. นับสปอร์ 9 ช่องตามแนวทแยง โดยให้จำนวนสปอร์ที่ได้จากค่าเฉลี่ย 9 ช่อง เป็น X
3. นำค่า X ที่ได้มาเข้าสูตร $(X/4) \times 10^6$ หรือ $(X) \times 2.5 \times 10^5$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

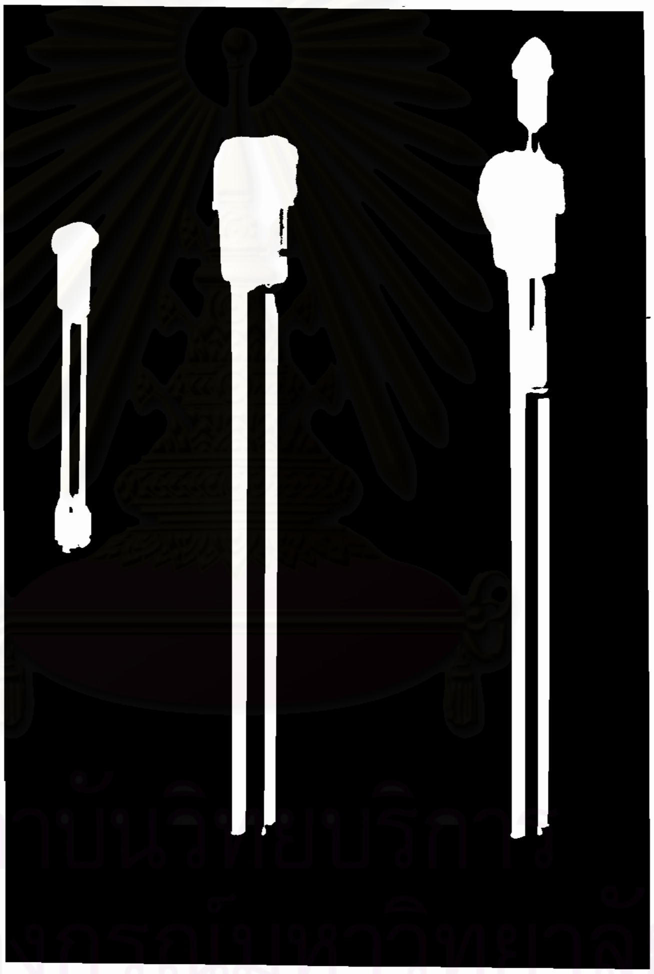
กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*- nitrophenol)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

1. ชุดกรองสปอร์ของ *Streptomyces* sp. PC22 (Hopwood และคณะ, 1985)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเวฬุรีย์ ทองคำ เกิดเมื่อวันพุธที่ 19 กันยายน พ.ศ. 2522 ที่กรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในปีการศึกษา 2543 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 516/65 หมู่ 4 ตำบลสำโรงเหนือ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ 10270

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย