บทที่ 3

ผลการวิจัย

ผลการตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายไซแลนโดย *Streptomyces* spp. ที่คัดแยกได้

1. การตรวจสอบความสามารถในการสร้างไซแลเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

จากการคัดแยก *Streptomyces* spp. จากตัวอย่างดินในประเทศไทย บนอิวมิค แอซิด วิตามิน อการ์ และนำมาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 190 สายพันธุ์ที่คัดแยกไว้ สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดนี้ โดยมีบางสายพันธุ์ที่ให้บริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนี (รูปที่ 5) แต่บางสายพันธุ์ก็ไม่ให้บริเวณใสรอบโคโลนี ซึ่งเมื่อนำมาเทียบเป็นอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี พบว่า 144 สายพันธุ์มีค่าอัตราส่วนนี้อยู่ระหว่าง 1-2 และอีก 46 สายพันธุ์ มีค่าอยู่ระหว่าง 2-5 อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์สามารถเจริญบนอาหารที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบได้ และบางสายพันธุ์ก็สามารถย่อยสลายไซแลนด้วยไซแลเนสที่ปล่อยออกมานอกเซลล์จนเกิดวงใสรอบโคโลนีแสดงให้เห็นได้ และเนื่องจากความสามารถในการสร้างบีตาไซโลซิเดสซึ่งอยู่ภายในเซลล์ อาจไม่สัมพันธ์กับปริมาณไซแลเนสที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ ดังนั้นจึงนำ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้ทั้ง 190 สายพันธุ์ มาตรวจสอบความสามารถในการสร้างบีตาไซโลซิเดส ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวต่อไป

2. การตรวจสอบความสามารถในการสร้างบีตาไซโลซิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

จากการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* spp. ที่แยกได้ทั้ง 190 สายพันธุ์ เพื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างบีตาไซโลซิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ตามวิธีการในข้อ 1. หน้า 30 พบว่ามี 5 สายพันธุ์ที่สร้างบีตาไซโลซิเดสได้ในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับรายงาน

ต่างๆ ที่อ้างถึงในบทที่ 4 ตารางที่ 10 และ 11 คือ 0.4-0.5 หน่วยต่อ มก.โปรตีน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สายพันธุ์ของ Streptomyces spp. ที่สร้างบีตาไซโลซิเดส ได้สูงในภาวะการตรวจสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

สายพันธุ์ Streptomyces spp.	แหล่งที่มา	แอคติวิตีจำเพาะของบีตา-ไซโลซิเดส(หน่วย/มก.โปรตีน)	ø วงใส / ø โคโลนี
26-1	สิงห์บุรี	0.40	2.9
34-7	นครปฐม	0.43	2.5
43-4	กรุงเทพ ฯ	0.50	2.8
45-5	กรุงเทพ ฯ	0.40	3.1
48-1	กรุงเทพ ฯ	0.45	1.2

ส่วนเชื้อ Streptomyces spp. อีก 185 สายพันธุ์ จาก 190 สายพันธุ์ เมื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้าง บีตาไซโลซิเดส ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพบว่า

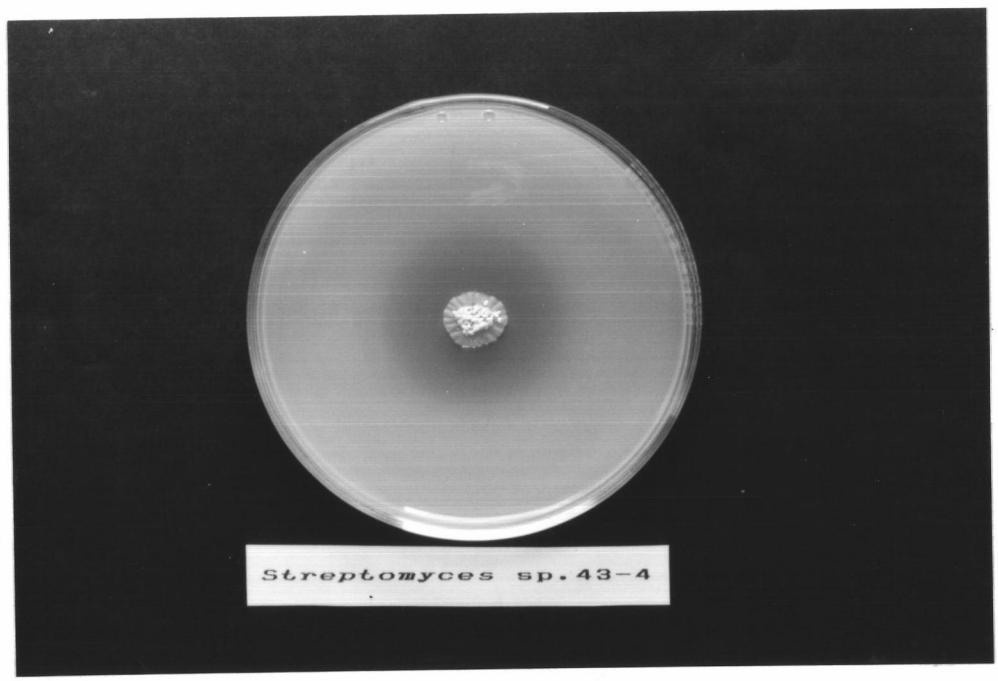
127 สายพันธุ์ ให้บีตาไซโลซิเดส ในช่วง 0-0.02 หน่วยต่อมก.โปรตีน

47 สายพันธุ์ ให้บีตาไซโลซิเดส ในช่วง 0.02-0.2 หน่วยต่อมก.โปรตีน

11 สายพันธุ์ ให้บีตาไซโลซิเดส ในช่วง 0.2-0.4 หน่วยต่อมก.โปรตีน

จากผลในตารางที่ 5 ซึ่งแสดงความสามารถในการสร้าง บีตาไซโลซิเดสในอาหารเหลวของ Streptomyces spp. 5 สายพันธุ์ ที่ให้บีตาไซโลซิเดส ได้สูงในช่วง 0.4-0.5 หน่วยต่อมก.โปรตีน พบว่า Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 สามารถสร้างบีตาไซโลซิเดสได้สูงที่สุด เป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดีอย่างรวดเร็ว และความสามารถในการสร้างเอนไซม์ภายใต้ภาวะทดสอบ ค่อนข้างคงที่กว่า Streptomyces spp. สายพันธุ์อื่น

เมื่อทำการทดสอบซ้ำหลายๆ ครั้ง ดังนั้นจึงเลือก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 มาศึกษารายละเอียดในการสร้างบีตาไซโลซิเดสในขั้นต่อไป



รูปที่ 5 ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนีของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

ชนิดของแหล่งคาร์บอนในการสร้างบีตาไซโลซิเดส

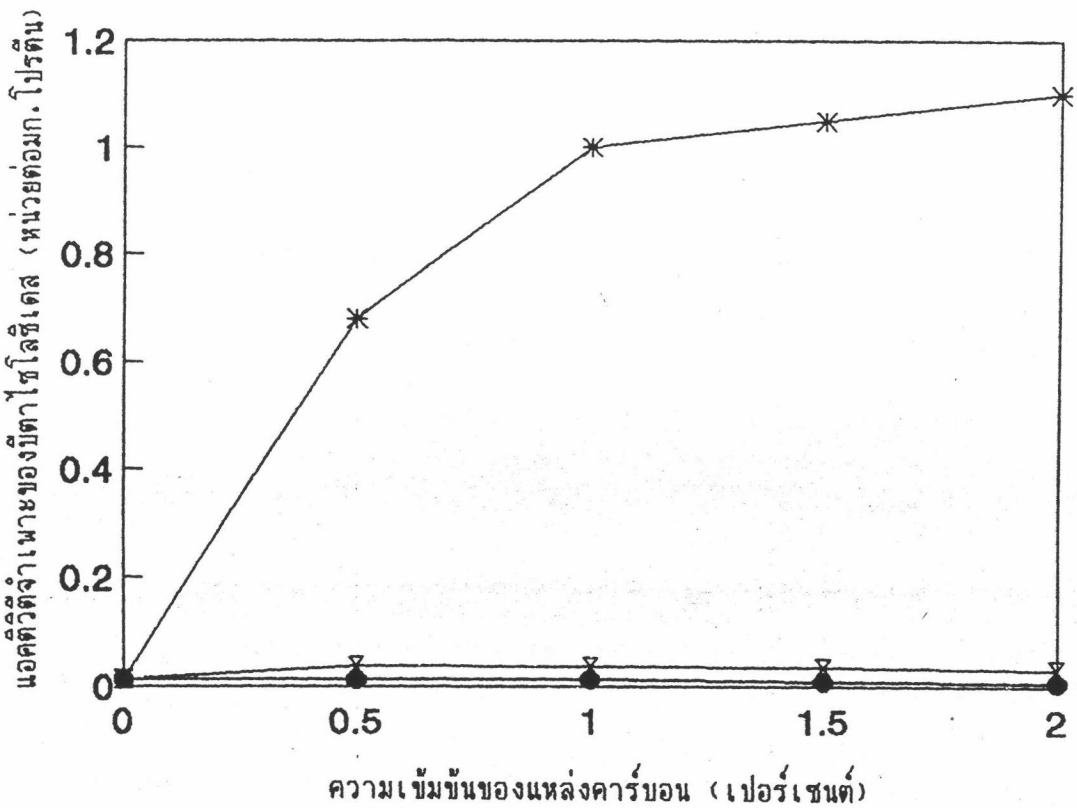
1. ผลของไซแลน ไซโลส และกลูโคสต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดส

จากรายงานต่าง ๆ (Nakanishi et al., 1987; Dobberstein and Emeis 1991; Lindner et al., 1994) พบว่า จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างบีตาไซโลซิเดสได้ โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ เป็นสารชักนำ ซึ่งส่วนใหญ่สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดีเมื่อมีแหล่งคาร์บอนเป็นไซแลน แต่บางสายพันธุ์พบว่าสามารถใช้ไซโลสชักนำการสร้างเอนไซม์ได้อย่างดี และมักพบว่ากลูโคสจะมีผลในการยับยั้งการสร้างบีตาไซโลซิเดส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของไซแลน ไซโลส และกลูโคสต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดสของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 โดยใช้สารเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่าไซแลนสามารถชักนำการสร้างเอนไซม์ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่ ไซโลส และกลูโคสเพียงปริมาณเล็กน้อย ก็มีผลกดดันการสร้างบีตาไซโลซิเดสของ Streptomyces sp. สายพันธุ์นี้ แต่เนื่องจากไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงต้องการหาแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้ไซแลน

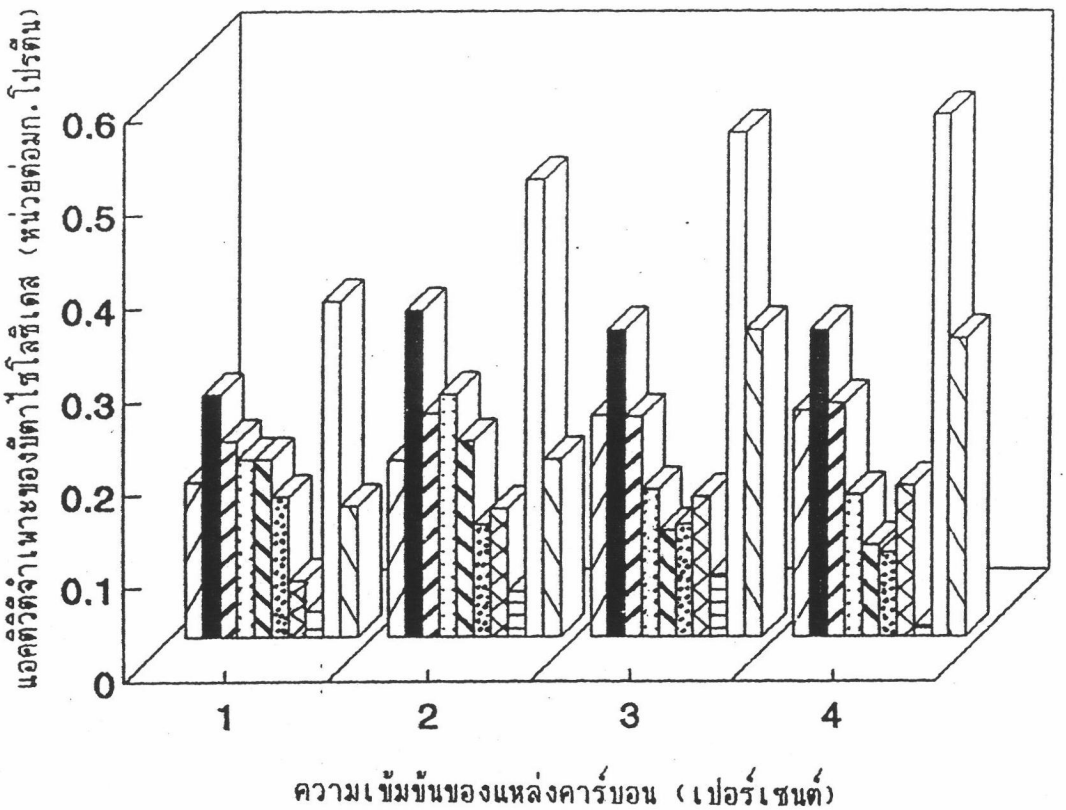
2. ผลการศึกษาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน ชนิดที่หาได้ง่ายและราคาถูกในการสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหลายชนิดมีไซแลนเป็นองค์ประกอบเช่น กากเมล็ดฝ้าย ฟางข้าว เปลือกข้าวโพด และแกลบ เป็นต้น ดังนั้นจึงได้ทดลองนำวัสดุเหล่านี้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้ไซแลนในการสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

จากการผันแปรปริมาณแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแสดงผลการทดลองในรูปที่ 7 พบว่า Streptomyces sp. สายพันธุ์นี้ สามารถสร้างบีตาไซโลซิเดสได้เท่ากับ 0.56 หน่วยต่อ มก. โปรตีน เมื่อใช้ 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเพื่อขจัดลิกนินเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็น % กากเมล็ดฝ้ายที่ให้ปริมาณเอนไซม์ได้สูงสุด แต่ถ้าเพิ่ม



รูปที่ 6 ผลของปริมาณไซแลน ไซโลส และกลูโคสเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างบีตาไซโลซิเดสโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 0.1 % สารสกัดจากยีสต์ 0.5 % คอร์นสตีพ ลิเคอร์ 0.5 % พอลิเพปโตน 0.4 % ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.02 % โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.1 % แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.002 % เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) แปรแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ คือ ไซแลน ไซโลส และกลูโคส ความเข้มข้น 0-4 % ปรับระดับความเป็นกรดด่างที่ 7.0 ในขวดแก้วทรงกรวย ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เตรียมและวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ตามวิธีการดังกล่าวในบทที่ 2



รูปที่ 7 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังกล่าวภายใต้รูปที่ 6 แต่แปรปริมาณแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1-4 % เลี้ยงและวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ตามวิธีการดังกล่าวในบทที่ 2

ฟางข้าว
เปลือกข้าวโพดบด
ชานอ้อย
แกลบ
กากเมล็ดฝ้าย
รำข้าว
กากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรด
รำข้าวที่ย่อยด้วยกรด
กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง
เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่าง

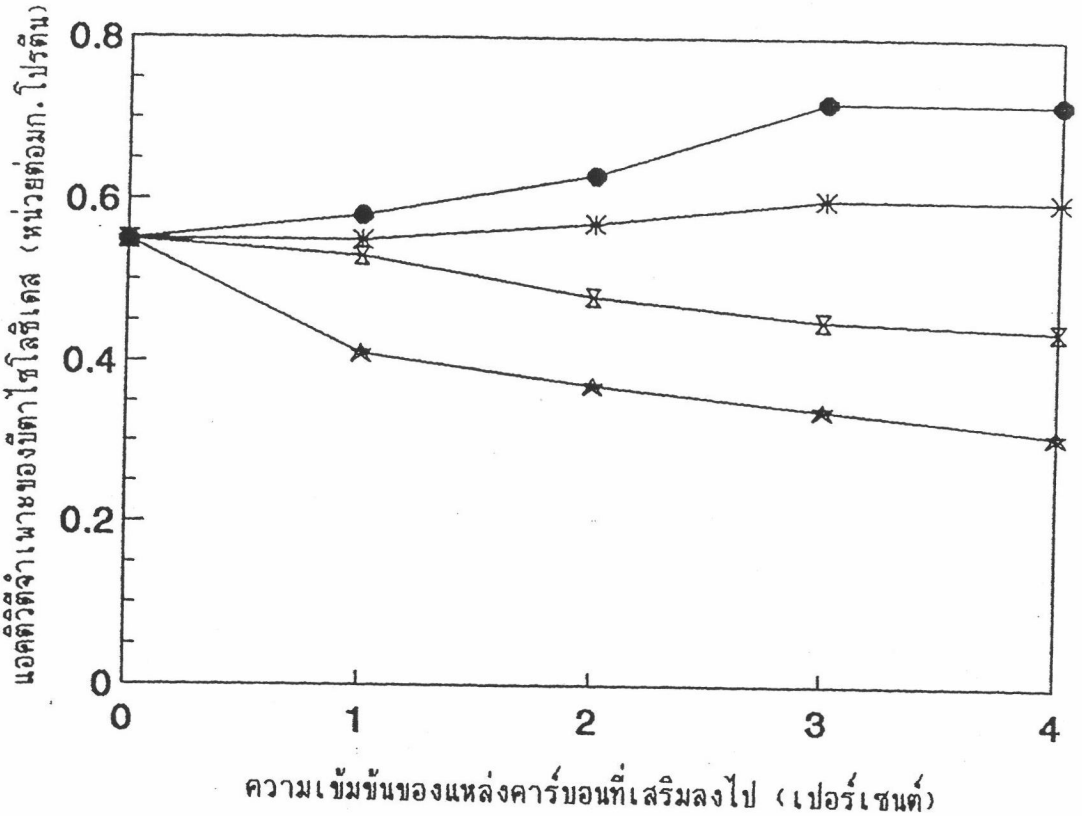
ปริมาณกากเมล็ดฝ้ายสูงกว่านี้ก็ไม่สามารถเพิ่มปริมาณเอนไซม์ได้ แต่กลับทำให้ลดลงประมาณ 11.68 % (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) ซึ่งอาจเป็นเพราะสารบางอย่างที่อยู่ในกากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างแล้วเช่น ลิกนินบางส่วนที่เหลืออยู่ หรือไซโลสที่เกิดจากการย่อยสลายกากเมล็ดฝ้ายของเอนไซม์ที่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณเอนไซม์ที่ได้ก็ยังไม่สูงเท่ากับการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นในขั้นต่อไปจึงใช้ 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก แล้วนำแหล่งคาร์บอนอื่นที่ให้ปริมาณเอนไซม์ในระดับรองลงมาเช่น เปลือกข้าวโพดบด ฟางข้าว แกลบ มาเสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังการทดลองในข้อ 3.

3. ผลการศึกษาชนิด และปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนที่เสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอน ในการสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4

จากการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4 ในสูตรอาหารตามภาคผนวก ก. หมายเลข 4 โดยใช้ 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก และแปรปริมาณเปลือกข้าวโพดบด ฟางข้าว แกลบ และรำข้าว ลงไปเสริม ซึ่งได้ผลดังแสดงในรูปที่ 8 พบว่าเปลือกข้าวโพดบดที่เสริมลงไปช่วยให้ความสามารถในการสร้าง บีตาไซโลซิเดสเพิ่มขึ้นได้ โดยถ้าใช้ 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง ร่วมกับการใช้ 3 % เปลือกข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้ บีตาไซโลซิเดสเพิ่มขึ้นเป็น 0.72 หน่วยต่อ มก. โปรตีน ส่วนฟางข้าวที่เสริมลงไปพบว่ามีผลต่อการเพิ่มแอคติวิตีเพียงเล็กน้อย ในขณะที่แกลบและรำมีผลไปลดความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ตามลำดับ

4. ผลการเสริมไซแลนโดยตรงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มี 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง และ 3 % เปลือกข้าวโพดบด เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4

จากการเสริมไซแลนบริสุทธิ์ (จาก Sigma) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1, 0.3 และ 0.5 % เปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่มีการเสริมไซแลนลงในสูตรอาหารที่มี 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง และ 3 % เปลือกข้าวโพดบด เป็นแหล่ง



รูปที่ 8 ผลการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นเสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มี 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างบีตาไซโลซิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นๆ ในภาวะการเลี้ยงและการหาแอคติวิตีดังกล่าวภายใต้รูปที่ 6 ยกเว้นปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เสริมลงไปให้แปรความเข้มข้น 0-4 %

แกลบ — เปลือกข้าวโพดบด

รำข้าว — ฟางข้าว

คาร์บอนอยู่แล้ว โดยเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาบีตาไซโลซิเดสทุกวัน พบว่าภาวะที่มีและไม่มีไซแลนในรูปบริสุทธิ์ให้ปริมาณบีตาไซโลซิเดสไม่แตกต่างกันมากนัก ดังแสดงในรูปที่ 9 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวันที่ให้บีตาไซโลซิเดสสูงสุด พบว่าการเสริมไซแลน 0.5 % จะให้บีตาไซโลซิเดสเท่ากับ 0.83 หน่วยต่อมก.โปรตีน ซึ่งสูงกว่าการไม่เสริมไซแลนบริสุทธิ์ (0.77 หน่วยต่อมก.โปรตีน) เพียง 7.8 % แต่ถ้าเทียบกับราคาไซแลนบริสุทธิ์ที่มีราคาสูง ในขณะที่กากเมล็ดฝ้ายและเปลือกข้าวโพดก็เป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีราคาถูกกว่าไซแลน ดังนั้นจึงไม่จำเป็นที่จะต้องเสริมไซแลนในรูปบริสุทธิ์อีก

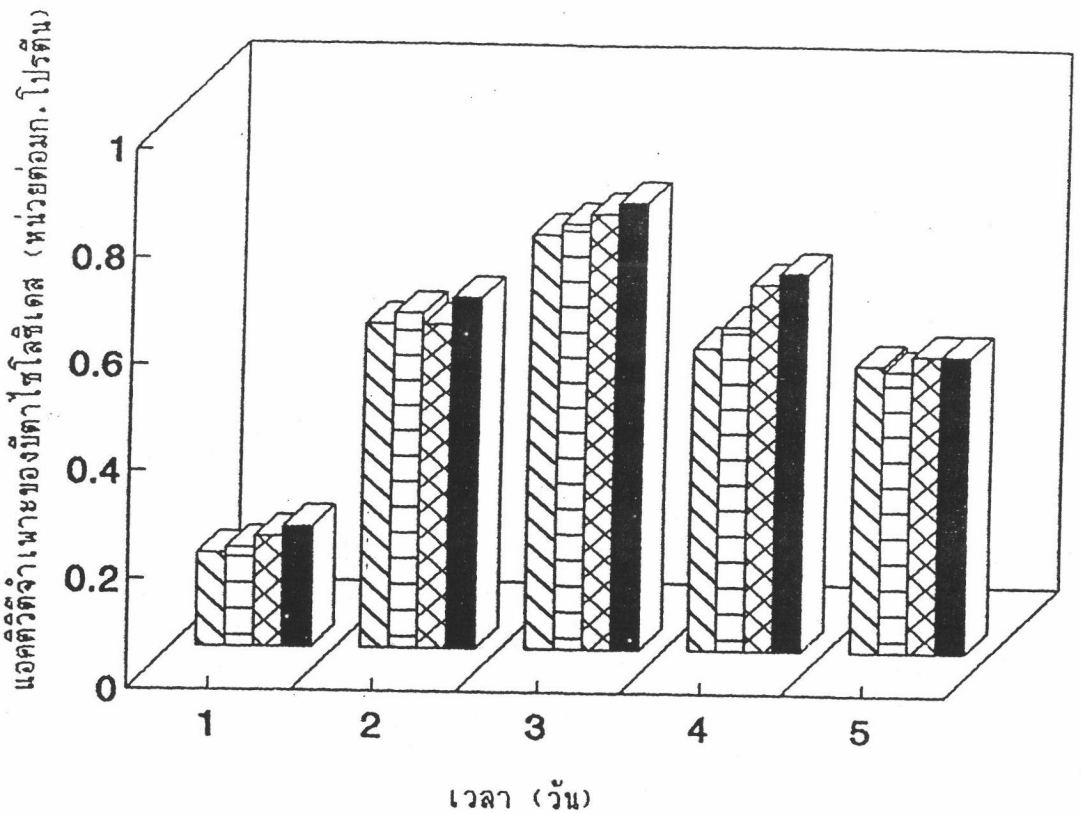
จากผลการทดลองในข้อ 4. พบว่าการเพาะเลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง และ 3 % เปลือกข้าวโพดบดจะให้ปริมาณเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปถึงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดสโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 จะทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน

<u>ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดสโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4</u>

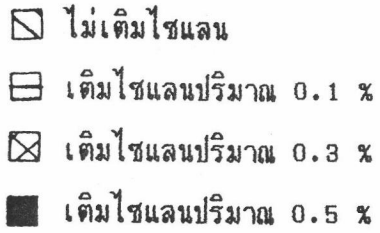
เนื่องจากในการทดลองที่ผ่านมา แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 คือ คอร์นสตีพ ลิเคอร์และ พอลิเพปโตน ซึ่งจัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นงานวิจัยนี้จะหาแหล่งไนโตรเจนราคาถูกและหาได้ง่ายภายในประเทศ ที่ยังคงให้การเจริญและการสร้างบีตาไซโลซิเดสของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 อยู่ในเกณฑ์สูง

1. <u>ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรียสาร (organic nitrogen) ต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดส</u>

จากการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรียสาร ลงไปในอาหารเหลวที่มี 4 % กากเมล็ดฝ้ายแช่ด่างและ 3 %เปลือกข้าวโพดบด เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อทดแทน คอร์นสตีพ ลิเคอร์และพอลิเพปโตน โดยแปรความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนตั้งแต่ 0-3 % ดังแสดงในรูปที่ 10 พบ



รูปที่ 9 ผลการเติมไซแลน เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง และ 3 % เปลือกข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นๆ และภาวะการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 6 เก็บตัวอย่างทุกวันนาน 5 วัน เพื่อนำมาเตรียมและวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ตามวิธีการดังกล่าวในบทที่ 2

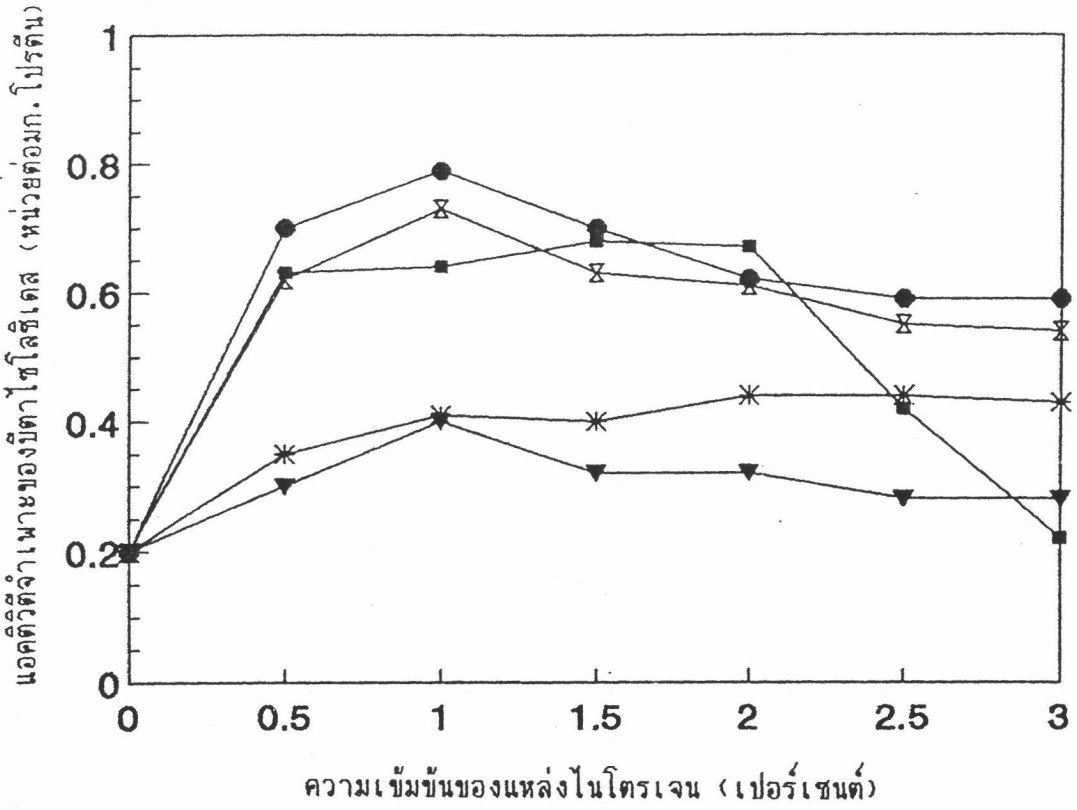


ว่าการใช้ soy bean hydrolysate(SBH) 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen content) เท่ากับ 0.4 % สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้เป็นอย่างดี คือให้บีตาไซโลซิเดส เท่ากับ 0.79 หน่วยต่อ มก.โปรตีน ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้ คอร์นสตีพ ลิเคอร์ และ พอลิเพปโตนชนิดละ 0.5 % เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SBH ให้สูงขึ้น พบว่าจะมีผลทำให้การสร้างเอนไซม์ลดลงเช่นเดียวกับการใช้เพปโตน และสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งถ้าให้ในปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้ปริมาณเอนไซม์ที่สร้างขึ้นลดลง แต่ถึงแม้จะให้ในปริมาณที่เหมาะสม คือความเข้มข้น 0.5-2.0 % ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ก็ยังไม่สูงเท่ากับการใช้ SBH 1 % เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนการใช้ rice bran hydrolysate (RBH) และ สารสกัดจากมอลท์ (malt extract) เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าให้ผลการสร้างเอนไซม์ในปริมาณต่ำ

2. <u>ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดอนินทรียสาร (inorganic nitrogen) ต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดส</u>

จากการแปรแหล่งไนโตรเจนชนิดอนินทรียสารได้แก่ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต เติมลงในสูตรอาหารเพื่อทดแทน คอร์นสตีพ ลิเคอร์ และพอลิเพปโตน ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 11 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้สารเหล่านี้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดสได้ โดยการใช้ยูเรียในช่วงความเข้มข้น 0.05-0.15 % จะให้ผลดีที่สุด โดยให้แอคติวิตี 0.62-0.67 หน่วยต่อ มก.โปรตีน ในขณะที่แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต จะให้ปริมาณเอนไซม์ในระดับที่รองลงมาตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณบีตาไซโลซิเดสที่เกิดขึ้นก็ยังไม่สูงเท่ากับการใช้ คอร์นสตีพ ลิเคอร์ และพอลิเพปโตน หรือการใช้ SBH 1% เป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะทดลองในขั้นต่อไปเพื่อศึกษาชนิด และปริมาณเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดสของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 จึงประกอบด้วย

กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง	4.0	%
เปลือกข้าวโพดบด	3.0	%
สารสกัดจากยีสต์	0.1	%

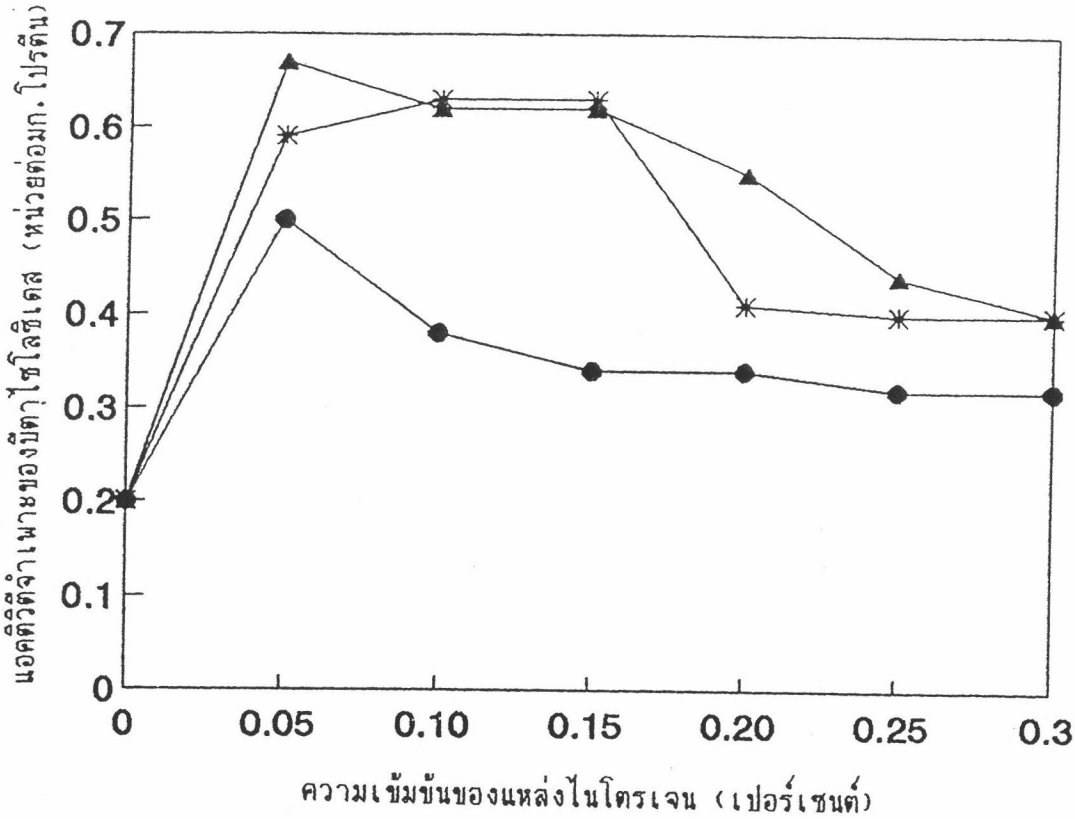


รูปที่ 10 ผลการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรียสารลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อทดแทนการเติมคอร์นสตีพ ลิเคอร์ และพอลิเพปโตนเพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง และ 3 % เปลือกข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นเป็นไปตามดังกล่าวภายใต้รูปที่ 6 ยกเว้นแปรปริมาณแหล่งไนโตรเจนในช่วงความเข้มข้น 0-3 % บ่มเขย่าเป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ตามวิธีการดังกล่าวในบทที่ 2

- เพปโตน
- สารสกัดจากยีสต์
- SBH
- RBH
- สารสกัดจากมอลท์

* แอคติวิตีจำเพาะของบีตาไซโลซิเดสเมื่อมีแหล่งไนโตรเจนชนิดเดิม (คอร์นสตีน ลิเคอร์และพอลิเพปโตน) มีค่าเท่ากับ 0.8 หน่วยต่อมก.โปรตีน



รูปที่ 11 ผลการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดอนินทรียสารลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อทดแทนการเติมคอร์นสตีพ ลิเคอร์ และพอลิเพปโตนเพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง และ 3 % เปลือกข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นเป็นไปตามดังกล่าวภายใต้รูปที่ 6 ยกเว้นแปรปริมาณแหล่งไนโตรเจนในช่วงความเข้มข้น 0-0.3 % บ่มเขย่าเป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ตามวิธีการดังกล่าวในบทที่ 2

✳ แอมโมเนียมซัลเฟต ● แอมโมเนียมไนเตรต

▲ ยูเรีย

* แอคติวิตีจำเพาะของบีตาไซโลซิเดส เมื่อมีแหล่งไนโตรเจนชนิดเดิม (คอร์นสตีพ ลิเคอร์และพอลิเพปโตน) มีค่าเท่ากับ 0.8 หน่วยต่อมก.โปรตีน

SBH (มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.4%)	1.0	%
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.4	%
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.1	%
โปแทสเซียมคลอไรด์	0.02	%
เฟอรัสซัลเฟต	0.002	%
ปรับภาวะความเป็นกรดด่างเท่ากับ	7.0	

ผลของเกลือแร่ต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดสของ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4

1. ผลการเติมไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

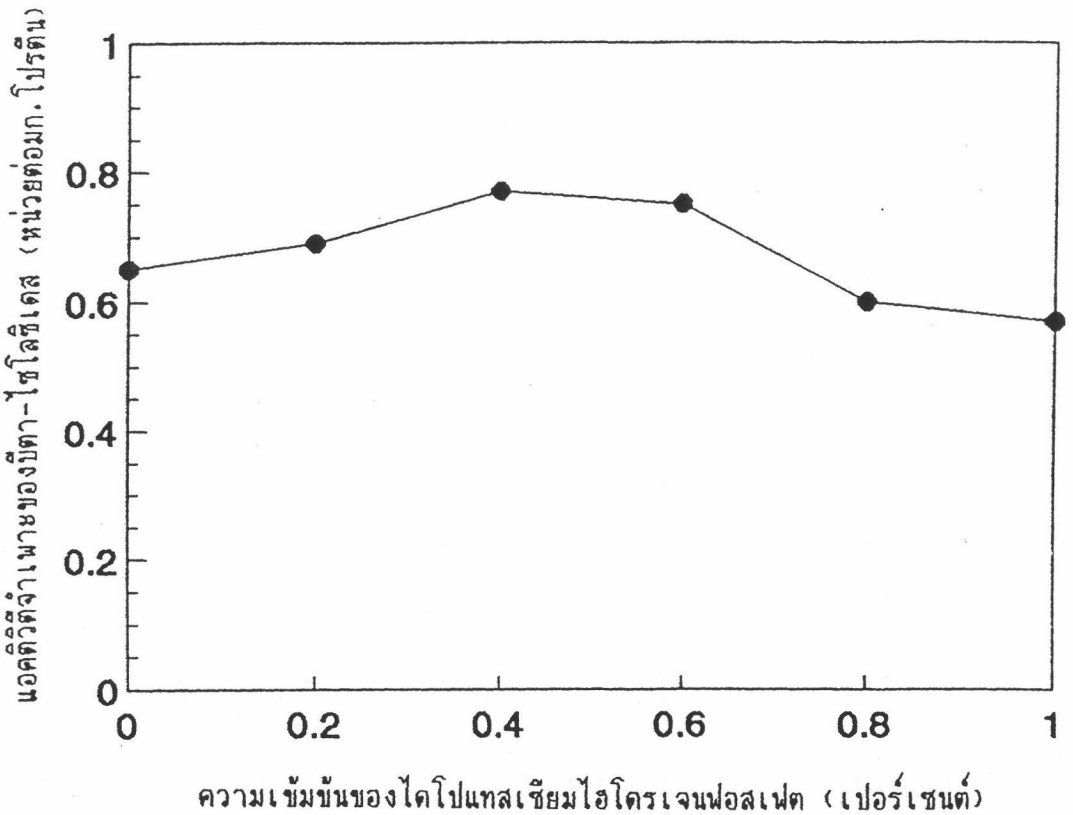
พบว่าการเติมไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 0.4-0.6 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้มีการสร้างบีตาไซโลซิเดสได้สูงที่สุด ในขณะที่ถ้าไม่เติมสารนี้เลย หรือเติมมากกว่า 0.6 % จะมีผลทำให้การสร้างเอนไซม์ลดลงดังแสดงในรูปที่ 12

2. ผลการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

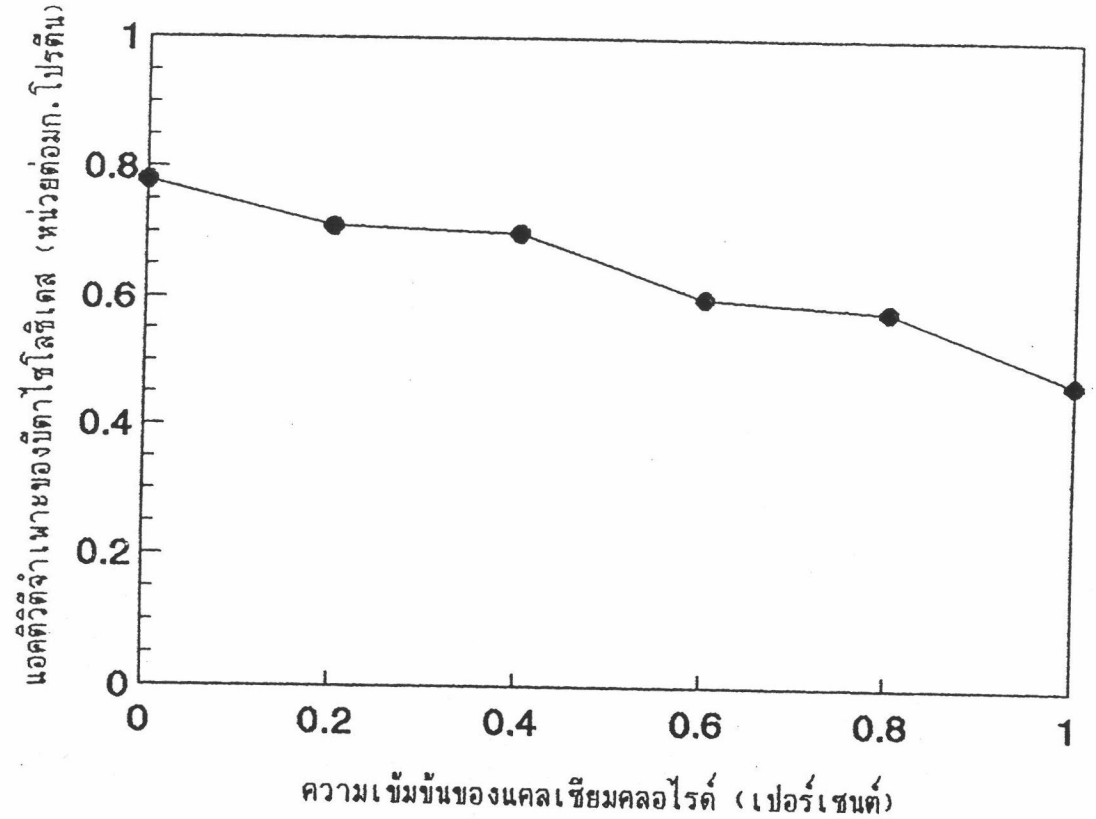
พบว่าการเติมแคลเซียมคลอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลทำให้ความสามารถในการสร้างบีตาไซโลซิเดสลดลง โดยเมื่อปริมาณแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ก็จะทำให้ปริมาณเอนไซม์ลดลงตามไปด้วย ดังแสดงในรูปที่ 13

3. ผลการเติมโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

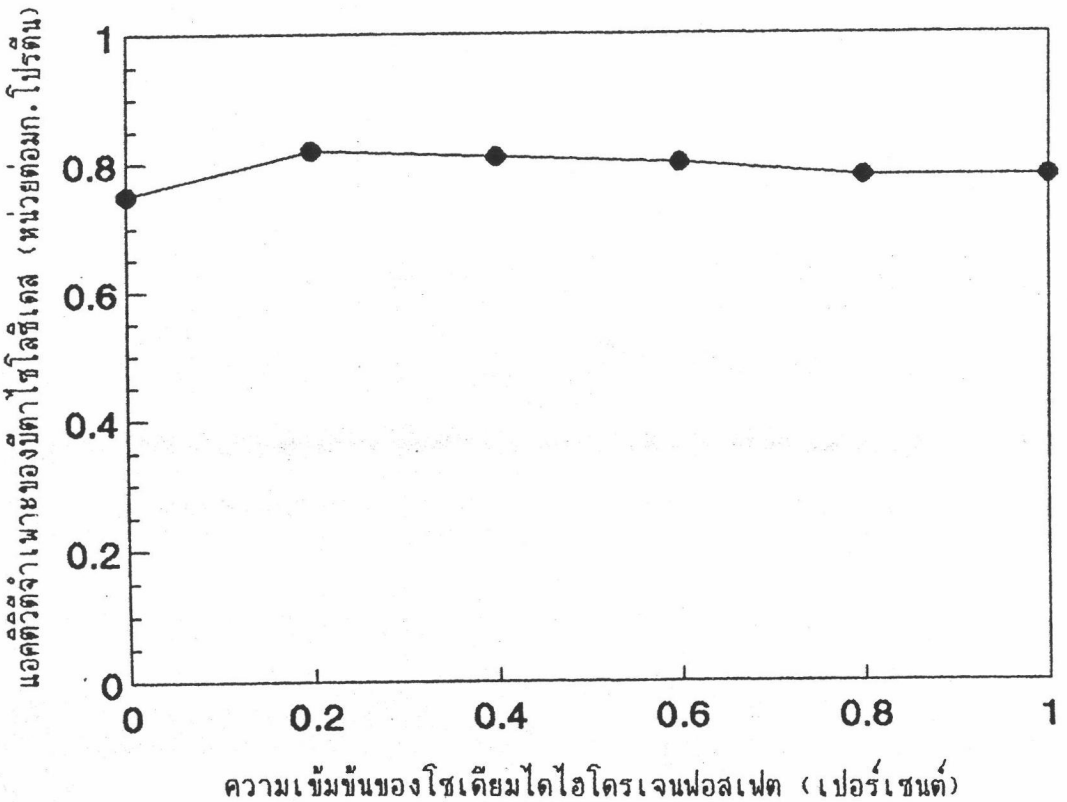
พบว่าโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมีผลต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดส โดยพบว่าเมื่อเติมสารชนิดนี้ในความเข้มข้น 0.2 % มีผลทำให้การสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นได้เล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 12 ผลการเติมไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4
เลี้ยงจุลินทรีย์โดยผันแปรปริมาณไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้นดังระบุในรูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างและ 3 % เปลือกข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอน มี 1 % SBH เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่น ภาวะในการเลี้ยง การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ทำตามวิธีดังระบุใต้รูปที่ 6



รูปที่ 13 ผลการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4
เลี้ยงจุลินทรีย์ในสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวภายใต้รูปที่ 12 ยกเว้นใช้ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4 % และผันแปรปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นดังระบุในรูป บ่มเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นภาวะในการเลี้ยง การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ทำตามวิธีดังระบุใต้รูปที่ 6



รูปที่ 14 ผลการเติมโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4 เลี้ยงจุลินทรีย์ในสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าวภายใต้รูปที่ 13 ยกเว้นไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์ และผันแปรปริมาณโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้นดังระบุในรูป บ่มเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่น ภาวะในการเลี้ยง การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 6

4. ผลการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

พบว่าปริมาณบีตาไซโลซิเดสที่สร้างขึ้น มีปริมาณสูงสุดเมื่อเติมแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.04 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อเพิ่มปริมาณมากขึ้นกว่านี้พบว่าไม่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์มากนัก ในขณะที่การเติมสารนี้น้อยกว่า 0.04 % จะทำให้การสร้างเอนไซม์เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยลง ดังแสดงในรูปที่ 15

5. ผลการเติมโปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

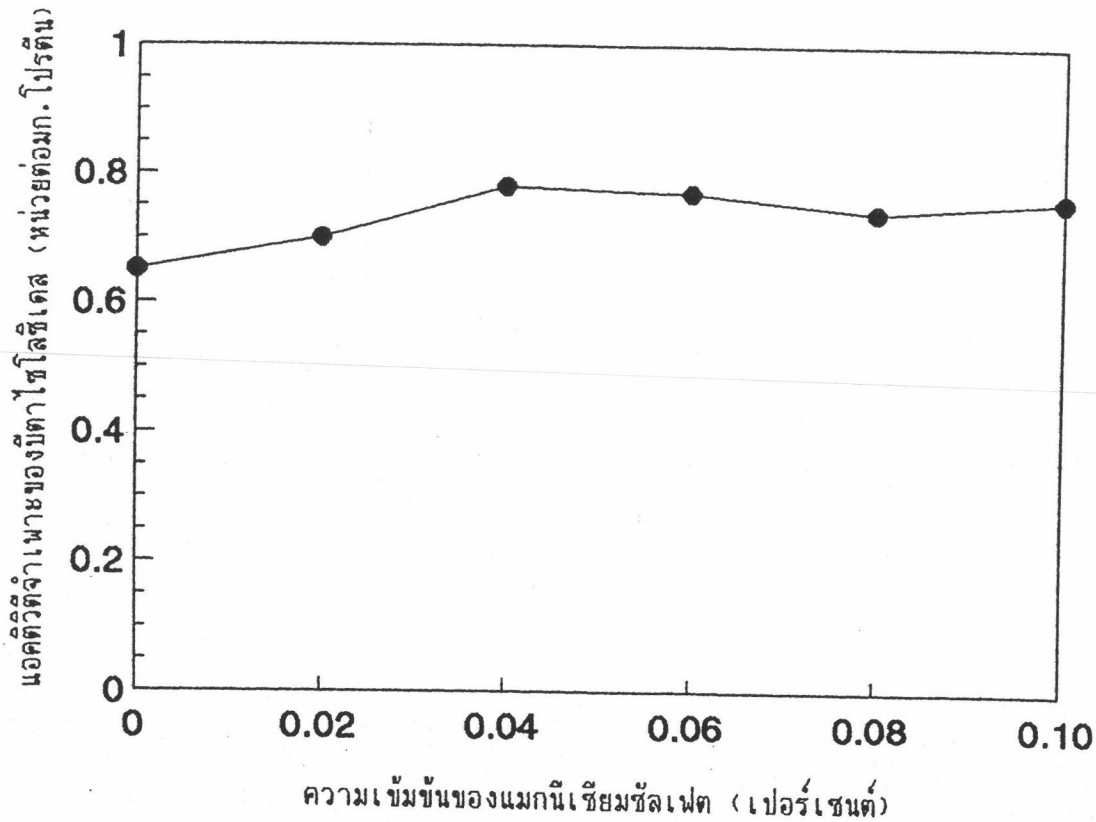
พบว่าที่ความเข้มข้นของโปแทสเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.04 % จะให้ปริมาณบีตาไซโลซิเดสดีที่สุด แต่ที่ความเข้มข้นมากหรือน้อยกว่านี้จะทำให้การสร้างเอนไซม์ลดลงเล็กน้อยตามความเข้มข้นของโปแทสเซียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง ดังแสดงในรูปที่ 16

6. ผลการเติมเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

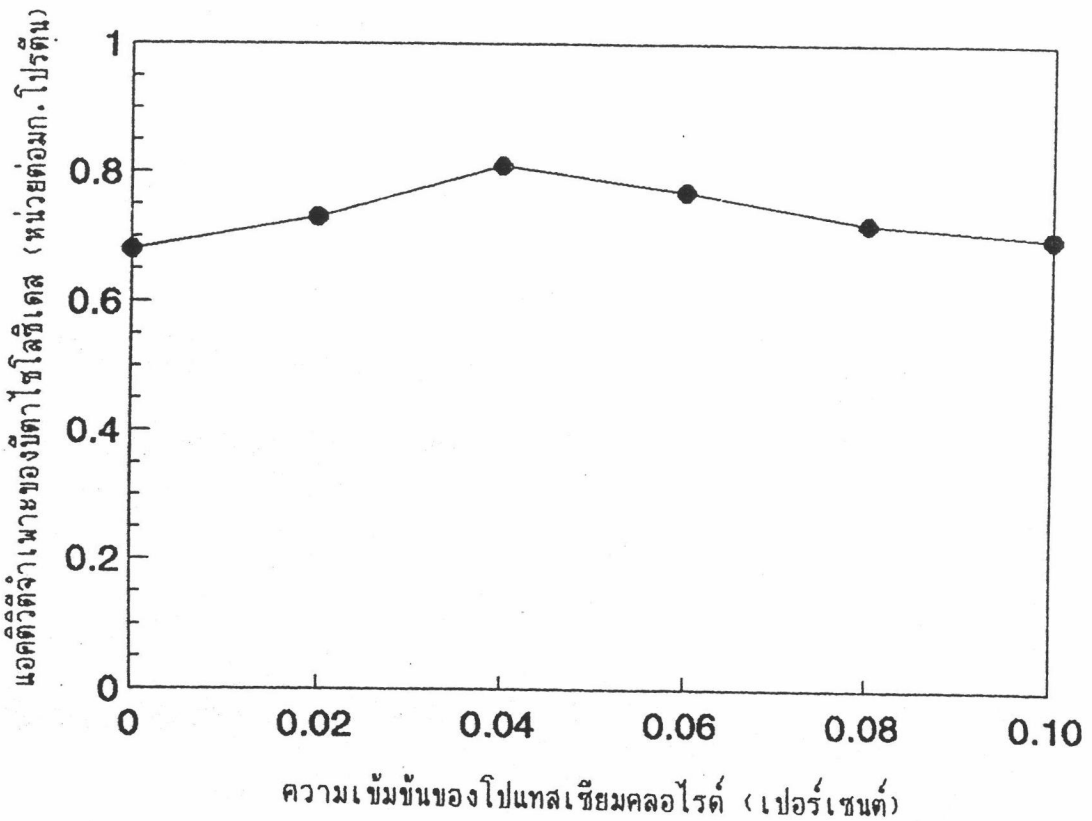
พบว่าการเติมเฟอรัสซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.002 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากถ้าไม่เติมสารนี้เลยจะทำให้การสร้างบีตาไซโลซิเดสลดลง แต่ถ้าเติมมากกว่า 0.002 % ก็จะทำให้ปริมาณเอนไซม์ค่อย ๆ ลดลงตามปริมาณของเฟอรัสซัลเฟตที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 17

7. ผลการเติมแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

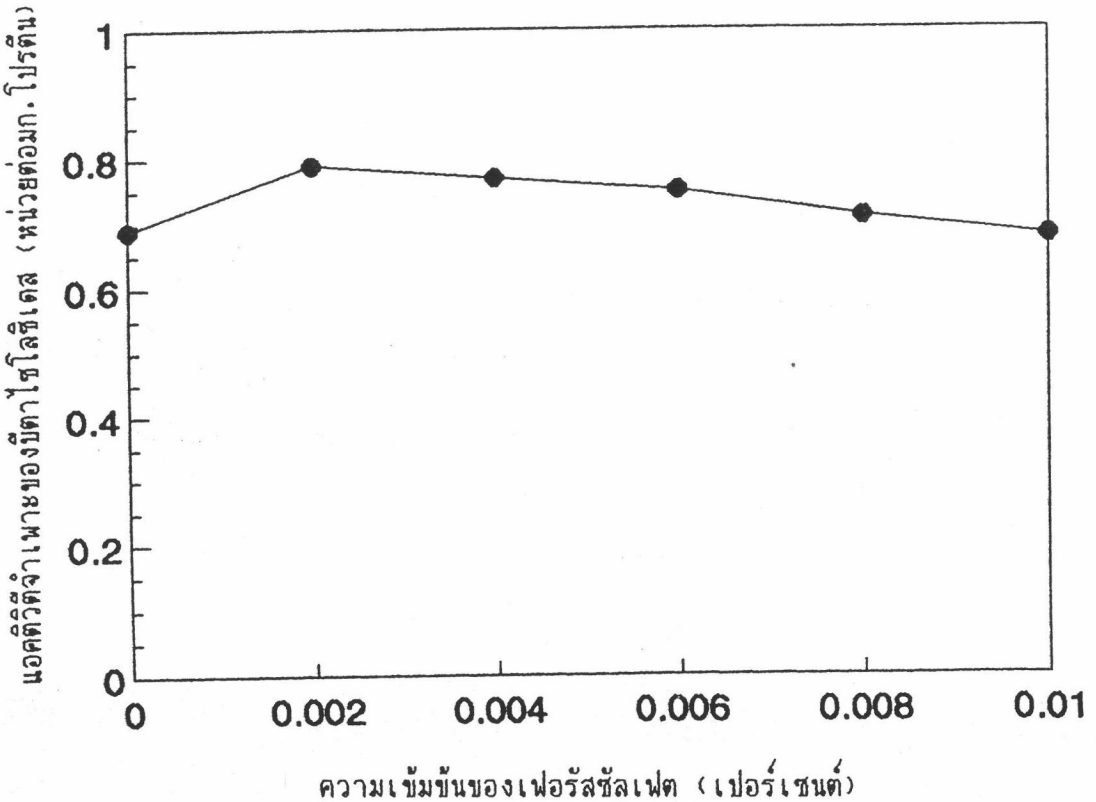
พบว่าแมงกานีสซัลเฟตที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้การสร้างเอนไซม์ลดลง โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเพิ่มขึ้น ปริมาณบีตาไซโลซิเดส ก็จะลดลงตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 18



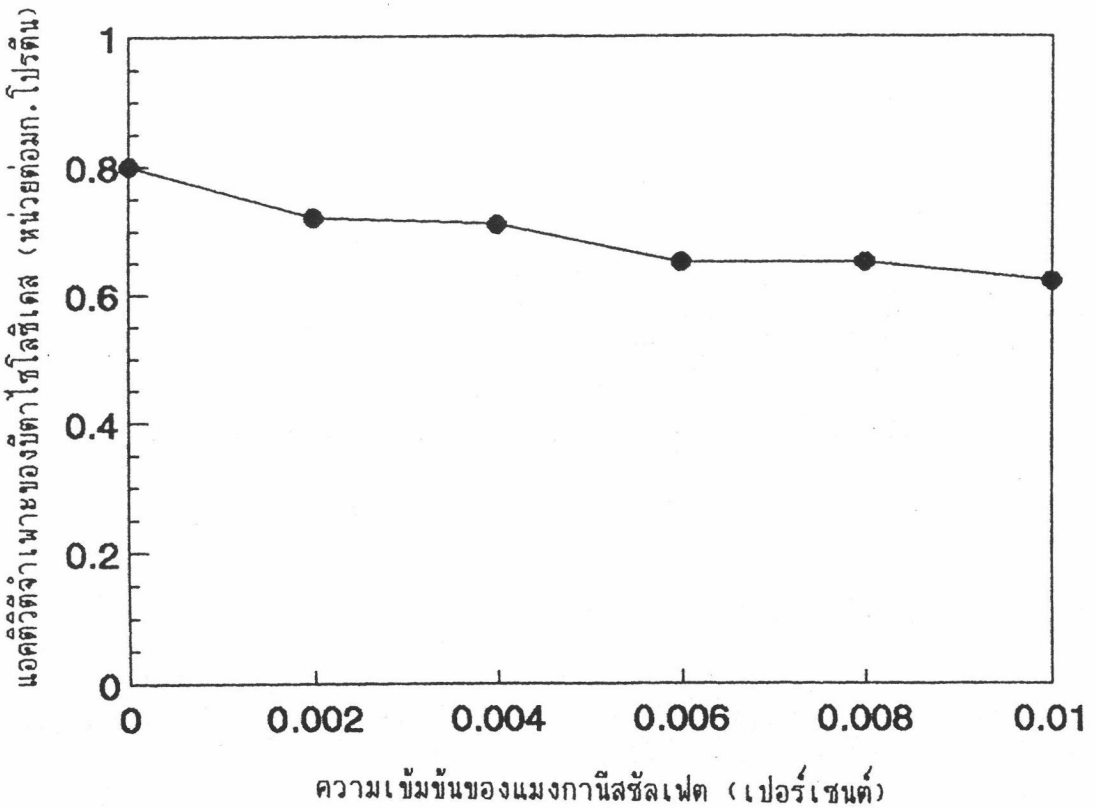
รูปที่ 15 ผลการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4
เลี้ยงจุลินทรีย์ในสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าว ภายใต้รูปที่ 14 ยกเว้นเติมโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 % และผันแปรบริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นดังระบุในรูป บ่มเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นภาวะในการเลี้ยง การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 6



รูปที่ 16 ผลการเติมโปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อสร้าง บีตา-ไซโลซิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4
เลี้ยงจุลินทรีย์ในสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าว ภายใต้รูปที่ 15 ยกเว้นเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.04 % และผันแปรปริมาณ โปแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นดังระบุในรูป บ่มเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่น ภาวะในการเลี้ยง การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 6



รูปที่ 17 ผลการเติมเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อสร้างบีตา-ไซโลซิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4
เลี้ยงจุลินทรีย์ในสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าว ภายใต้รูปที่ 16 ยกเว้นเติมโปแทสเซียมเซียมคลอไรด์ 0.04 % และ ผันแปรปริมาณเฟอรัสซัลเฟตความเข้มข้นดังระบุในรูป บ่มเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่น ภาวะในการเลี้ยง การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 6



รูปที่ 18 ผลการเติมแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4
เลี้ยงจุลินทรีย์ในสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าว ภายใต้รูปที่ 17 ยกเว้นเติมเฟอรัสซัลเฟต 0.002 % และ ผันแปรปริมาณแมงกานีสซัลเฟต ความเข้มข้นดังระบุในรูป บ่มเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่น ภาวะในการเลี้ยง การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 6

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าองค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส มีองค์ประกอบดังนี้

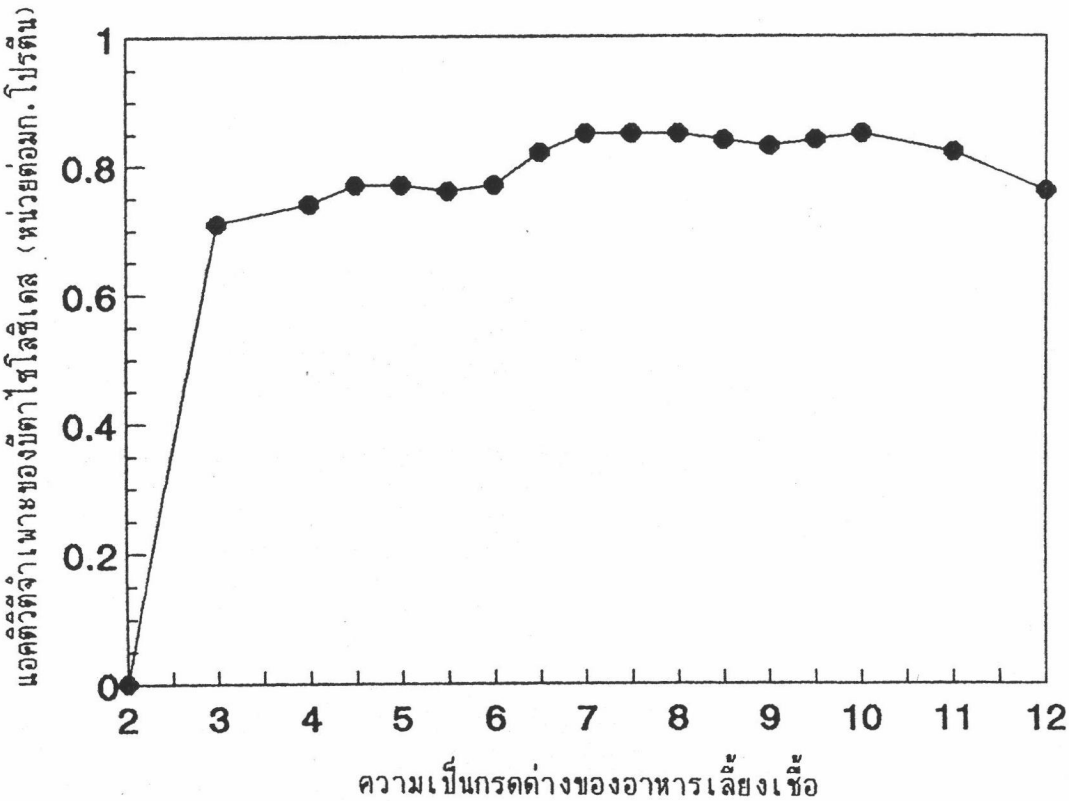
กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง	4.0	%
เปลือกข้าวโพดบด	3.0	%
สารสกัดจากยีสต์	0.1	%
SBH (มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.4%)	1.0	%
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.4	%
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.2	%
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.04	%
โปแทสเซียมคลอไรด์	0.04	%
เฟอรัสซัลเฟต	0.002	%
ปรับภาวะความเป็นกรดด่างเท่ากับ	7.0	

ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงใช้สูตรอาหารดังกล่าว โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน

ภาวะในการเลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส

1. ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมดังกล่าวไว้ข้างต้น โดยแปรระดับความเป็นกรดด่างในช่วง 2.0-12.0 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 19 พบว่าระดับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างเอนไซม์ ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์นี้ อยู่ในช่วงกว้างคือ ช่วง pH 6.5-11.0 โดยให้ปริมาณบีตาไซโลซิเดสในช่วง 0.81-0.85 หน่วยต่อมก.โปรตีน และความสามารถในการสร้างเอนไซม์จะค่อย ๆ ลดลงเล็กน้อย เมื่อความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดจาก 6.5 เป็น 3.0 หรือ เพิ่มจาก 11 เป็น 12.0 แต่เชื้อจะไม่สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0



รูปที่ 19 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้าง บีตาไซโลซิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง 3 % เปลือกข้าวโพดบด 1 % SBH 0.1 % สารสกัดจากยีสต์ 0.4 % ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 % โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.04 % โปแทสเซียมคลอไรด์ 0.04 % แมกนีเซียมซัลเฟต และ 0.002 % เฟอรัสซัลเฟต ปรับภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 2.0-12.0 ด้วย 1 นอร์มอลไฮโดรคลอริค และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ส่วนการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 6

2. ผลของอุณหภูมิต่อการเพาะเลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิในช่วง 20-50 องศาเซลเซียส พบว่า Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และจะลดลงตามลำดับเมื่ออุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงสูงขึ้น จนไม่สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้เมื่ออุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงมากกว่าหรือเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 20

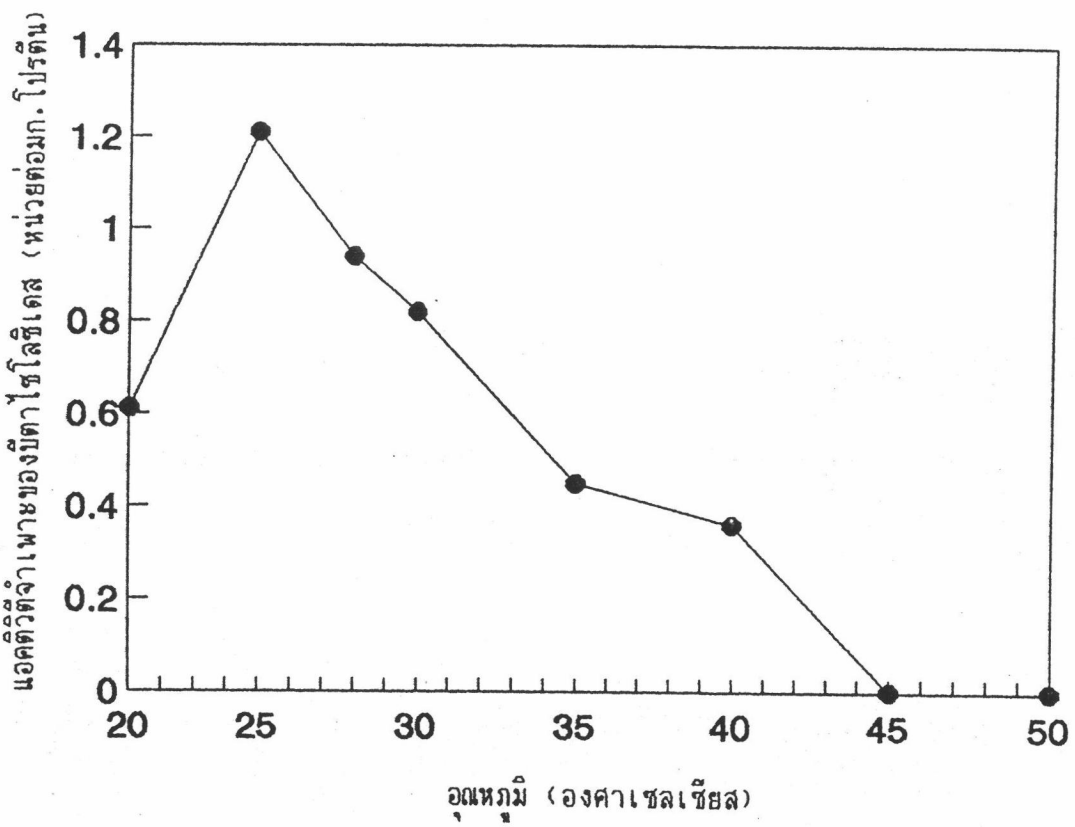
จากผลการทดลองข้างต้น ภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส คือ ที่ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การศึกษาสมบัติของบีตาไซโลซิเดสจาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

1. ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

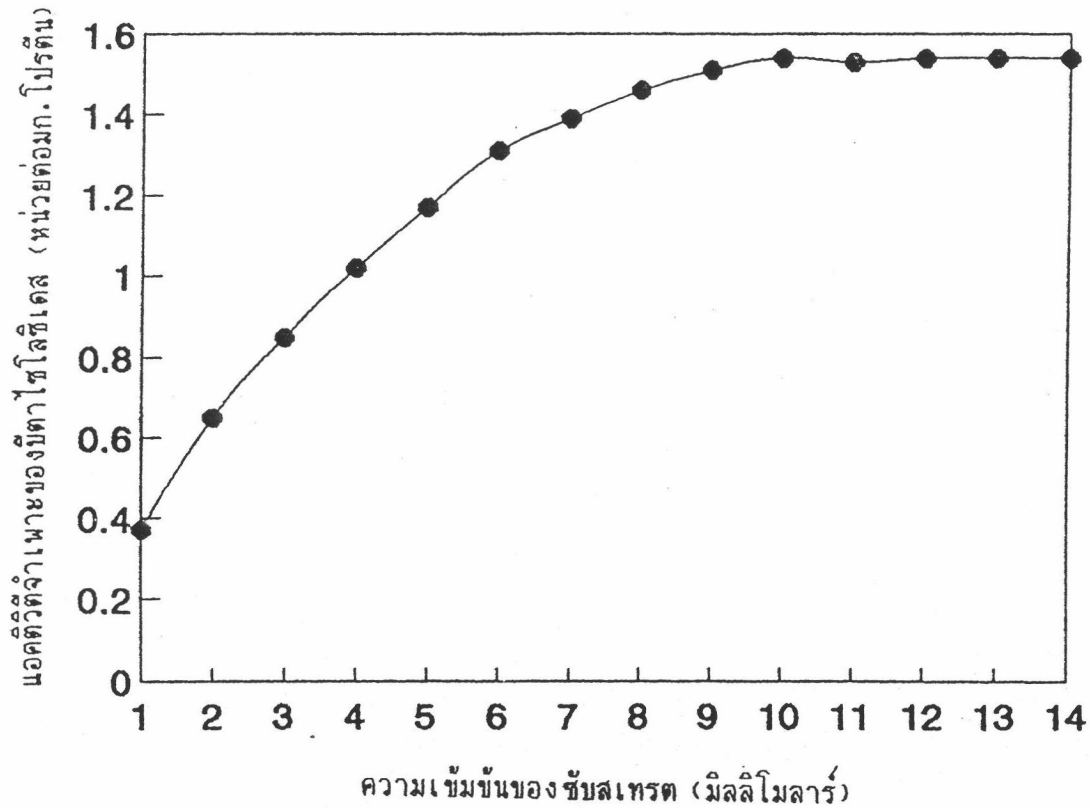
1.1 ผลความเข้มข้นของ พาราไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ต่อการทำงานของเอนไซม์

เมื่อใช้บีตาไซโลซิเดส ปริมาณ 6.75 ไมโครกรัมโปรตีน ทำปฏิกิริยากับซับสเทรต ตามวิธีการดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 1. หน้า 40 พบว่าบีตาไซโลซิเดสจะมีแอคติวิตีสูงสุด ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ พาราไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ขณะทำปฏิกิริยาเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ขึ้นไป ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ซับสเทรตที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 21



รูปที่ 20 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้าง บีตาไซโลซิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังกล่าวภายใต้รูปที่ 15 ยกเว้นปรับภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 และผันแปรอุณหภูมิในการเลี้ยงดังระบุในรูป ส่วนภาวะในการเลี้ยงและการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 6



รูปที่ 21 ผลของความเข้มข้นของซับสเทรตต่อการทำงานของ บีตาไซโลซิเดส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

ตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 32 ยกเว้นบ่มเอนไซม์ 6.75 ไมโครกรัมโปรตีน กับซับสเทรตความเข้มข้นต่างๆ ดังระบุในรูป

1.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการแปรอุณหภูมิในการบ่มส่วนผสม เพื่อหาแอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดส โดยใช้สารละลายซับสเทรตความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งจะให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของบีตาไซโลซิเดส อยู่ที่ 45-50 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 22

1.3 ผลความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ ต่อการทำงานของบีตาไซโลซิเดส

จากการทดลองใช้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับซับสเทรตในบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-9.5 พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีตาไซโลซิเดสมีค่าอยู่ในช่วง 6.5-7.0 และจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนไปจากนี้ โดยเมื่อค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5.5 หรือสูงกว่า 8.0 จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในรูปที่ 23

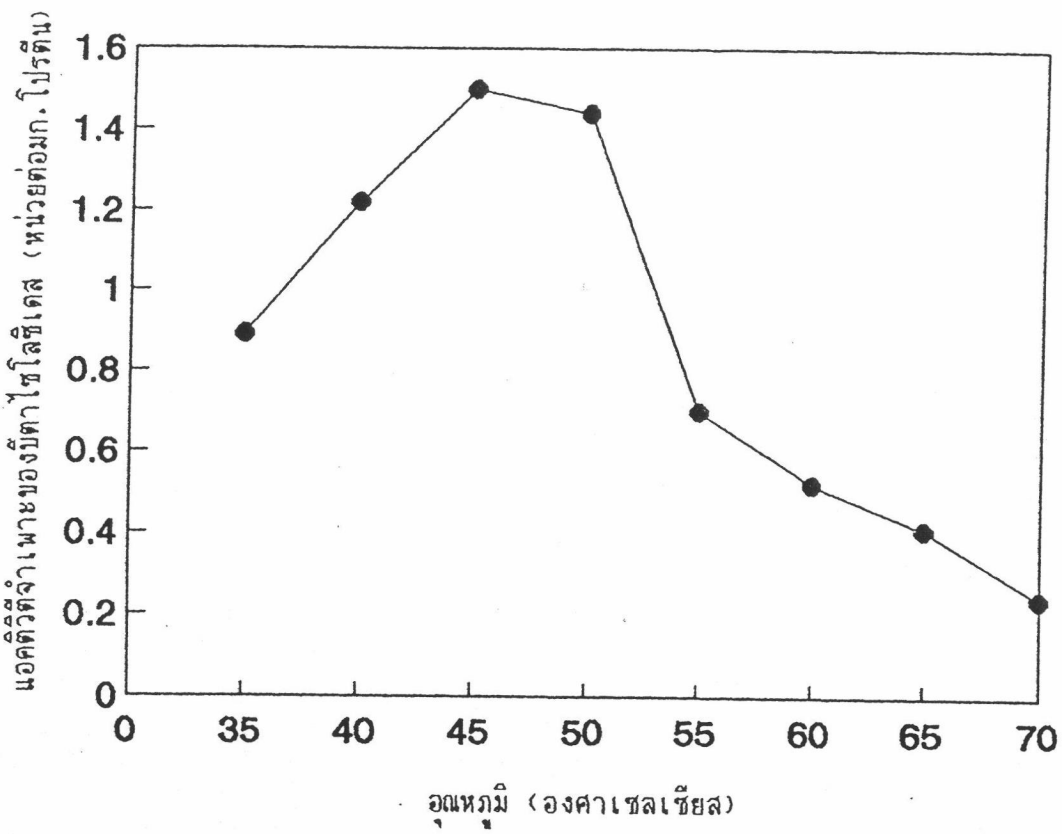
1.4 การหาค่า Km ของบีตาไซโลซิเดส สำหรับพาราไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์

จากการนำผลการทดลองในข้อ 1.1 หน้า 71 มาเขียนกราฟแบบไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) จะได้กราฟเส้นตรงดังรูปที่ 24 ซึ่งคำนวณค่า Km ของบีตาไซโลซิเดส จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4 สำหรับ พาราไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ได้เท่ากับ 7.14 มิลลิโมลาร์

2. <u>ความเสถียรของบีตาไซโลซิเดส</u>

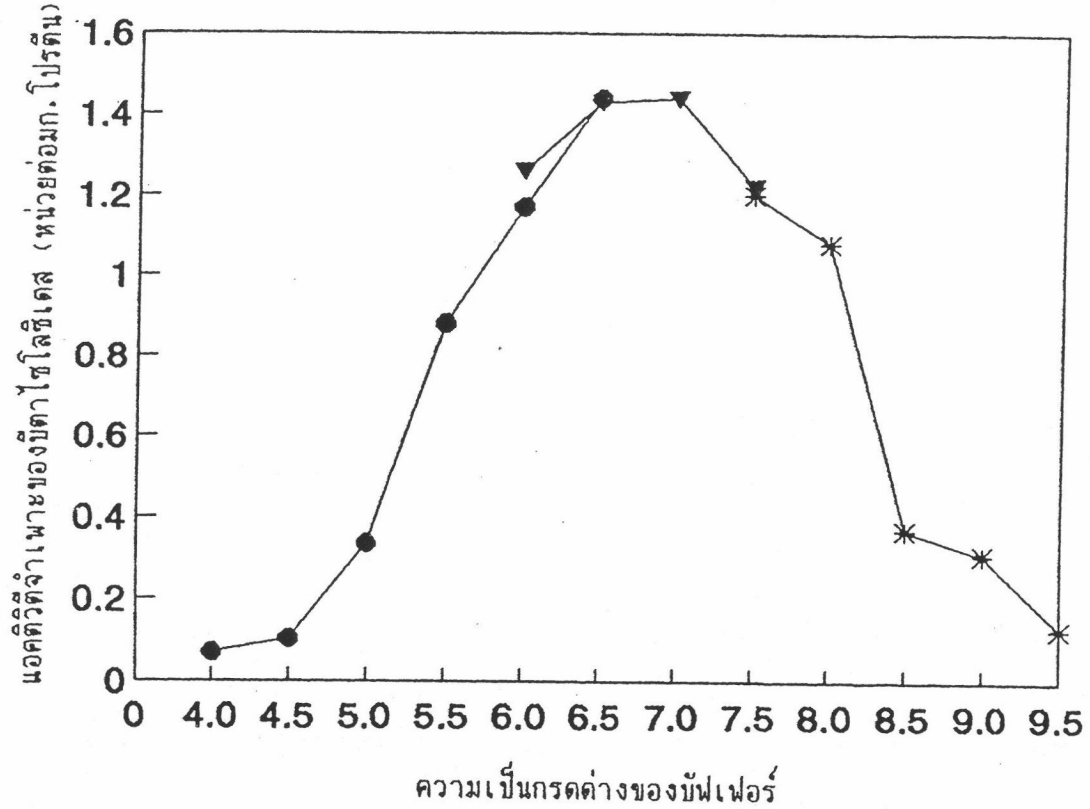
2.1 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

จากการตรวจสอบความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ พบว่าบีตาไซโลซิเดสของ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4 ไม่เสถียรต่ออุณหภูมิสูง โดยพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูง

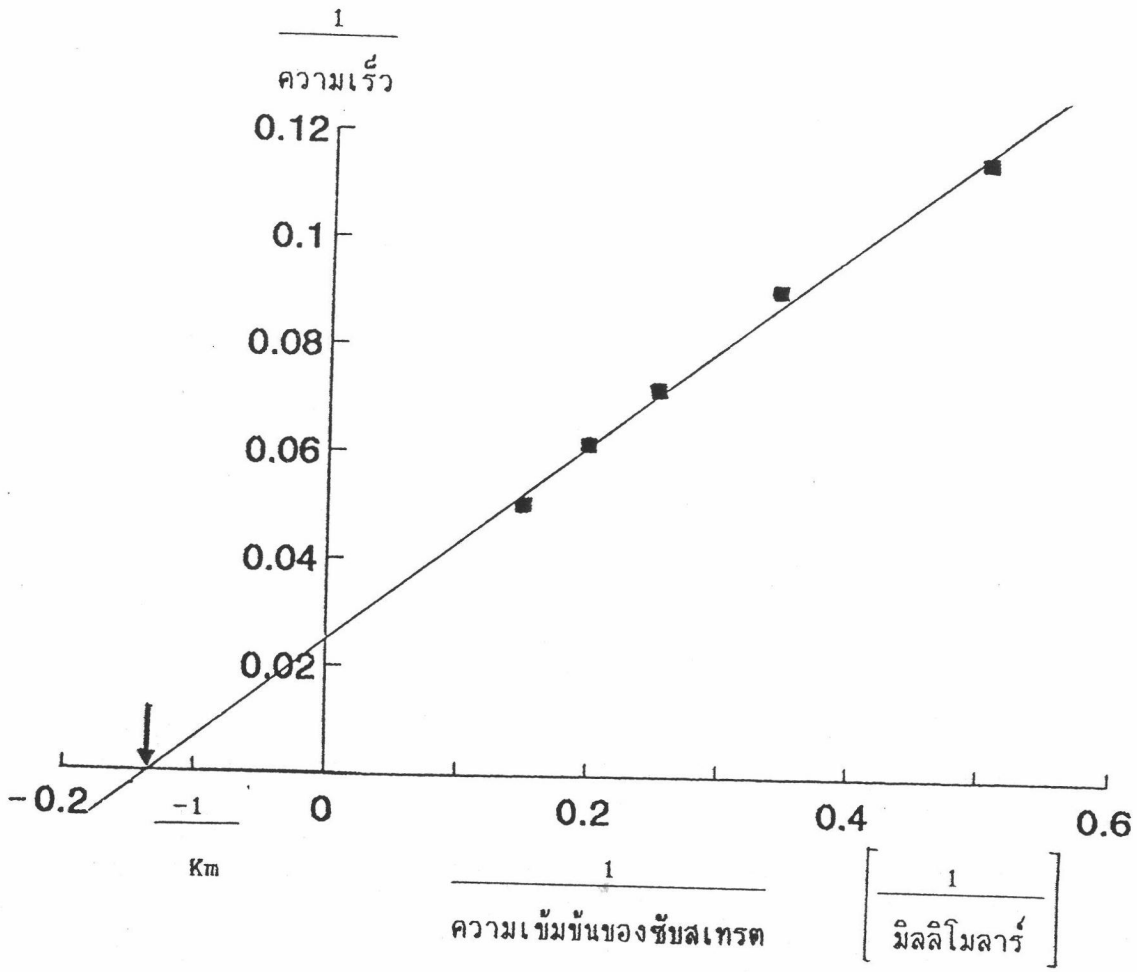


รูปที่ 22 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของบีตาไซโลซิเดส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

ตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 32 ยกเว้นบ่มเอนไซม์ 6.75 ไมโครกรัมโปรตีน กับซับสเทรตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังระบุในรูป



รูปที่ 23 ผลของความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของบีตาไซโลซิเดส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4
ตรวจหาแอคติวิตีโดยบ่มเอนไซม์ 6.75 ไมโครกรัมโปรตีนกับซับสเทรตความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ที่ภาวะดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 32 ยกเว้น 0.1 โมลาร์ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ต่างๆ ดังระบุ



รูปที่ 24 การหาค่า Km ของบีตาไซโลซิเดสที่สร้างโดย Streptomyces sp.สายพันธุ์ 43-4 ต่อพาราไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์

นำผลการทดลองจากรูปที่ 21 หาค่า Km โดยการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk

หน่วยของความเร็วคือ ไมโครโมลของพาราไนโตรฟีนอลต่อนาที

เกิน 35 องศาเซลเซียส จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ค่อย ๆ ลดลง โดยลดลงเหลือ 61.5 % เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และสูญเสียแอคติวิตีเกือบสมบูรณ์เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 25

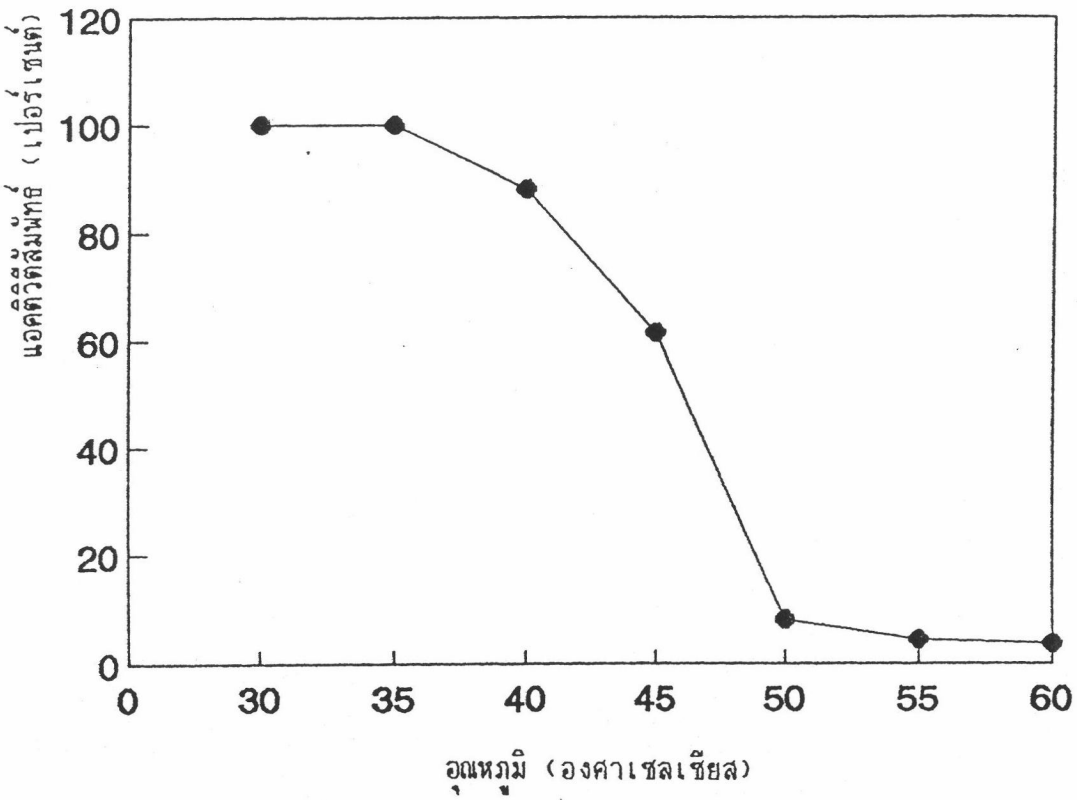
2.2 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

จากการตรวจสอบความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง พบว่าบีตาไซโลซิเดสของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 5.5-8.0 โดยถ้าความเป็นด่างสูงกว่านี้ จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในรูปที่ 26

เนื่องจาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 เจริญได้ดีในไซแลนและวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นนอกจากบีตาไซโลซิเดสแล้ว จุลินทรีย์นี้น่าจะมีความสามารถในการสร้างไซแลเนสได้เช่นกัน การทดลองต่อไปจึงจะศึกษาไซแลเนสจาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

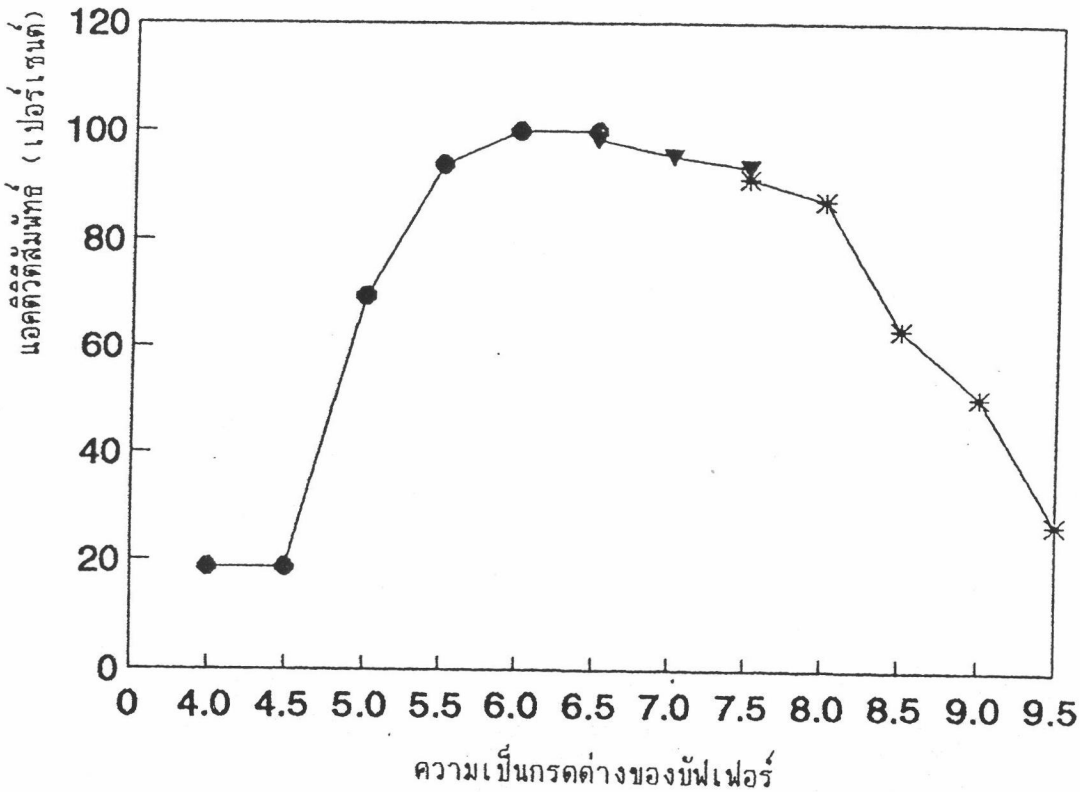
<u>การตรวจหาแอคติวิตีของไซแลเนสของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4</u>

จากการตรวจสอบความสามารถในการสร้างไซแลเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง พบว่า Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 สามารถย่อยสลายไซแลนจนเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีได้ ดังนั้นจึงนำมาตรวจสอบความสามารถในการสร้างไซแลเนสในอาหารเหลว โดยเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมกับการสร้างบีตาไซโลซิเดส และติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาต่าง ๆ เป็นเวลา 5 วัน พบว่า Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 สามารถสร้างไซแลเนสได้ในระดับที่ค่อนข้างสูงเช่นกัน โดยได้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 7.18 หน่วยต่อ มล. ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 27 และเนื่องจากเวลาที่จุลินทรีย์สร้างบีตาไซโลซิเดสสูงที่สุดคือวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงเอาส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลเนส ซึ่งเหลือจากการกรองเอาเซลล์ไปสกัดแยกเพื่อศึกษาบีตาไซโลซิเดสแล้ว มาตกตะกอนด้วย 80 % แอมโมเนียมซัลเฟต ตามวิธีการในบทที่ 2 ซึ่ง



รูปที่ 25 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของบีตาไซโลซิเดส ที่สร้างโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4

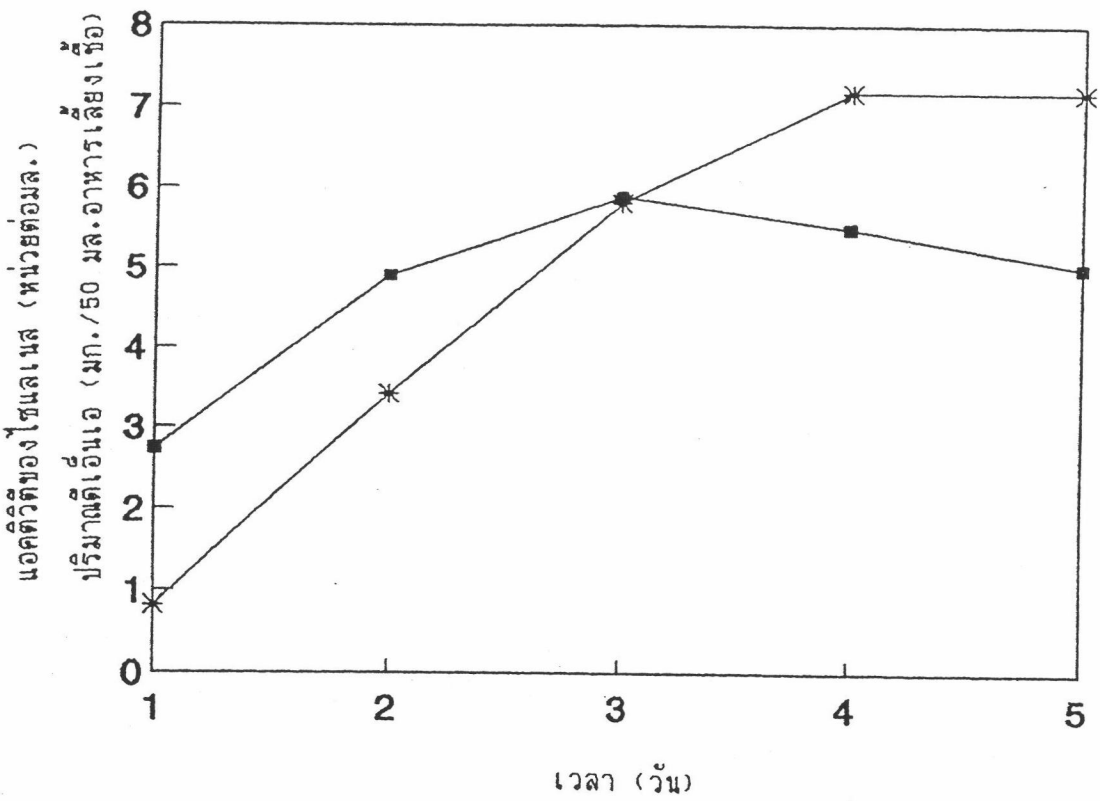
ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 4. หน้า 40 โดยเทียบให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100 %



รูปที่ 26 ผลของความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ต่อความเสถียรของบีตาไซโลซิเดส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 5. หน้า 41 โดยเทียบให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100 %

● อะซิเทต บัฟเฟอร์
▼ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์
✳ ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์



รูปที่ 27 ผลของระยะเวลาต่อการเจริญ และการสร้างไซแลเนสโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบ ภาวะการเลี้ยงเชื้อ ดังกล่าวภายใต้รูปที่ 19 ยกเว้นปรับภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ดังวิธีการดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 33 เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ ดังระบุในรูป

✳ ปริมาณไซแลเนส

■ ปริมาณดีเอนเอ

ให้แอคติวิตีของไซแลเนสหลังตกตะกอนแล้ว มีค่าเท่ากับ 30 หน่วยต่อมล. แล้วนำมาหาสมบัติของไซแลเนส ซึ่งได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

1. ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลเนส

1.1 ผลของความเข้มข้นของไซแลนต่อการทำงานของเอนไซม์

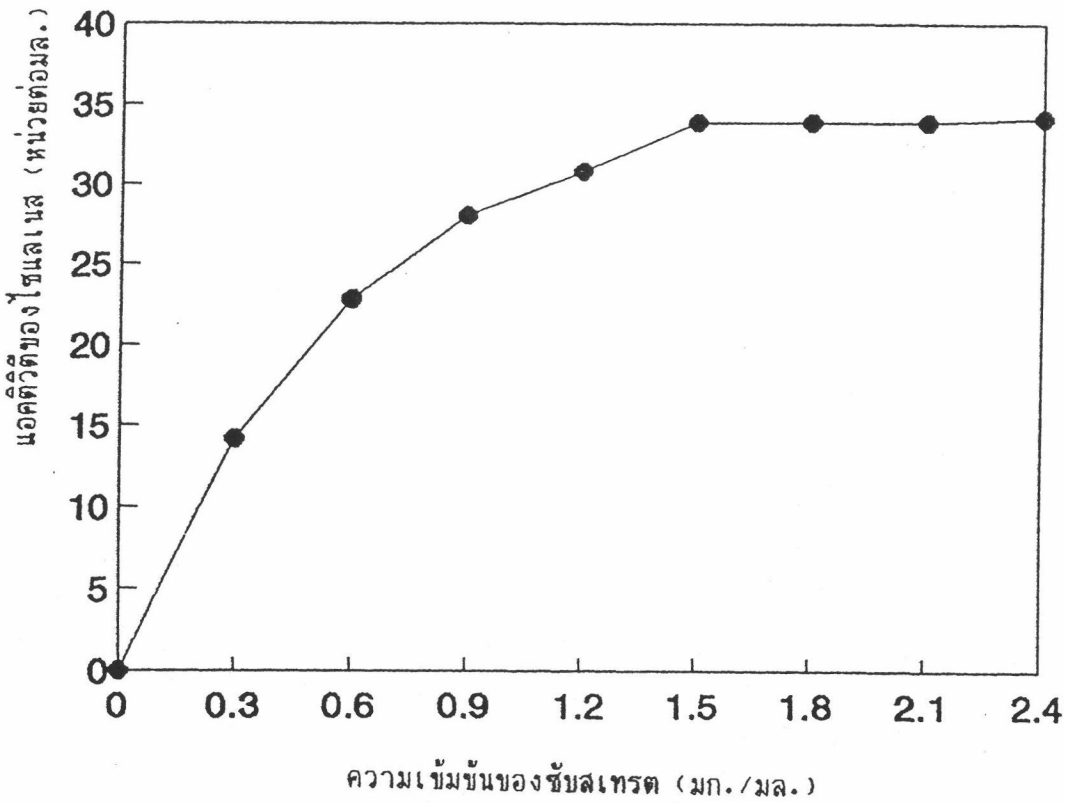
เมื่อใช้เอนไซม์ปริมาณ 28.5 ไมโครกรัมโปรตีน ทำปฏิกิริยากับไซแลนตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 1. หน้า 41 พบว่าไซแลเนสจะมีแอคติวิตีสูงสุดที่ความเข้มข้นสุดท้ายของไซแลนขณะทำปฏิกิริยาเท่ากับหรือมากกว่า 1.5 มก.ต่อมล. ดังแสดงในรูปที่ 28 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ซับสเทรตที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.5 มก.ต่อมล. ในการทำปฏิริยา

1.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการผันแปรอุณหภูมิในการบ่มส่วนผสม เพื่อหาแอคติวิตีของไซแลเนสโดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของซับสเทรตเท่ากับ 1.5 มก.ต่อมล. ในการทำปฏิกิริยา พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ อยู่ในช่วง 60-65 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 29 ดังนั้นในการวิเคราะห์แอคติวิตีครั้งต่อไปจะใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

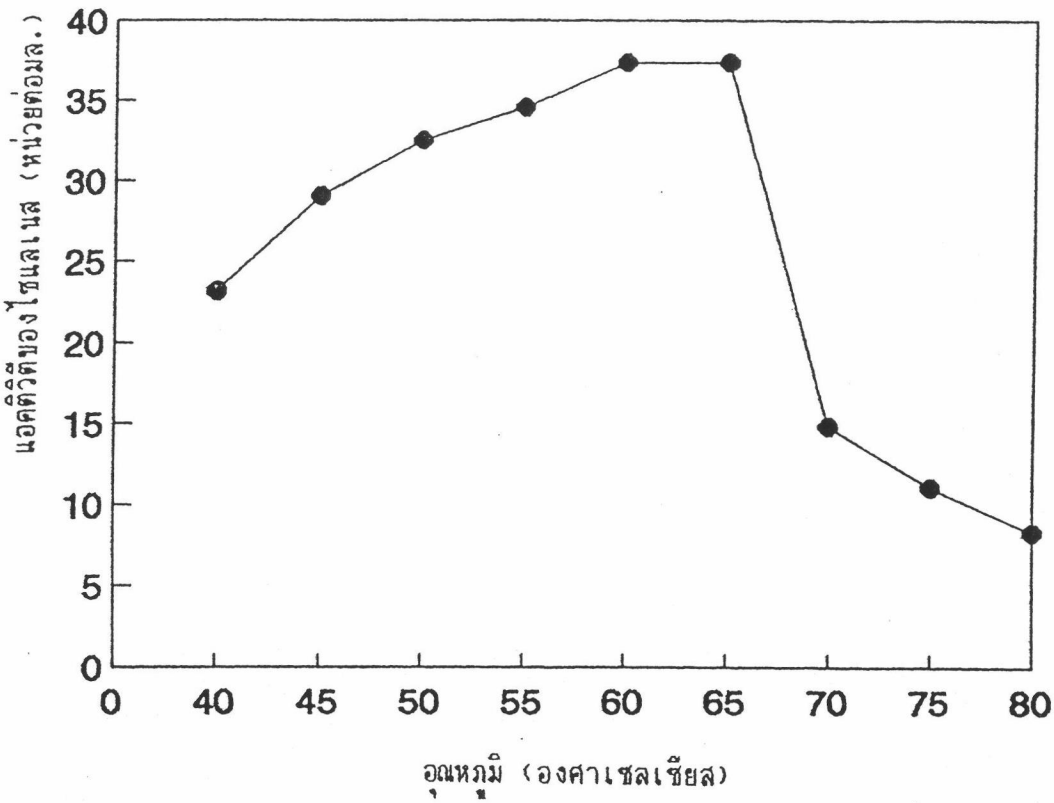
1.3 ผลความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ ต่อการทำงานของไซแลเนส

จากการทดลองใช้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับซับสเทรตในบัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-9.5 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลเนสมีค่าเท่ากับ 6.0 และจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อค่าความเป็นด่างเพิ่มขึ้นจากนี้ แต่แอคติวิตีของไซแลเนสจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนจาก 5.0 เป็น 4.5 ดังแสดงในรูปที่ 30 ดังนั้นในการวิเคราะห์แอคติวิตีครั้งต่อไปจะใช้ความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ เท่ากับ 6.0



รูปที่ 28 ผลของความเข้มข้นของซับสเทรตต่อการทำงานของ ไซแลเนส ที่สร้างโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4

ตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 33 ยกเว้นบ่มเอนไซม์ 28.5 ไมโครกรัมโปรตีน กับ ซับสเทรตความเข้มข้นต่างๆ ดังระบุในรูป



รูปที่ 29 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ ไซแลเนส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

ตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 33 ยกเว้นบ่มเอนไซม์ 28.5 ไมโครกรัมโปรตีน กับซับสเทรตความเข้มข้น 15 มก. ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังระบุในรูป

1.4 การหาค่า Km ของไซแลเนสสำหรับไซแลน

จากการนำผลการทดลองข้อ 1.1 หน้า 81 มาเขียนกราฟแบบไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk plot) จะได้กราฟเส้นตรง ดังรูปที่ 31 คำนวณค่า Km ของไซแลเนสจาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 สำหรับไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตได้เท่ากับ 2.5 มก.ต่อมล.

2. ความเสถียรของไซแลเนส

2.1 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

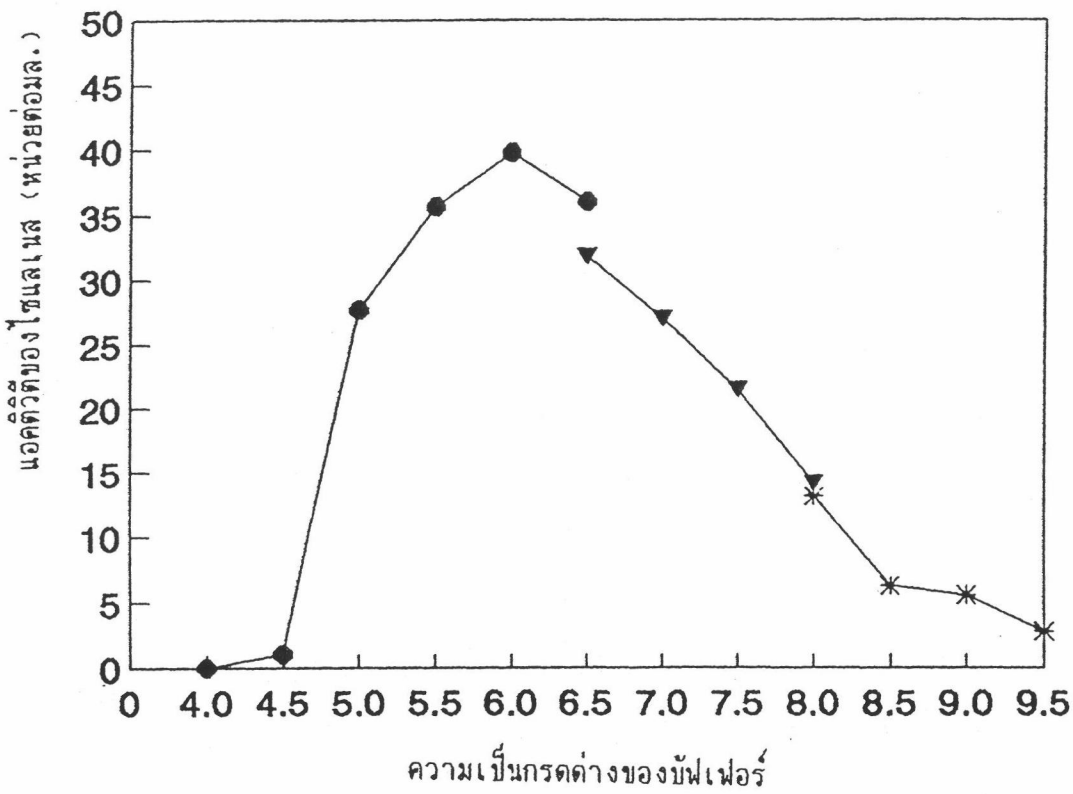
จากการตรวจสอบความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ พบว่าไซแลเนสของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ค่อนข้างเสถียรต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 55 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินกว่านี้ จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ค่อย ๆลดลงและจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 70 เป็น 75 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 32

2.2 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

จากการตรวจสอบความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง พบว่าไซแลเนส จาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงค่อนข้างกว้าง คือช่วง pH 4.5-9.0 โดยพบว่าแอคติวิตีจะสูญเสียไปบางส่วนที่ pH 4.0 และ 9.5 ดังแสดงในรูปที่ 33

การเพาะเลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม และการตรวจวิเคราะห์บีตาไซโลซิเดส และไซแลเนสภายใต้ภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา

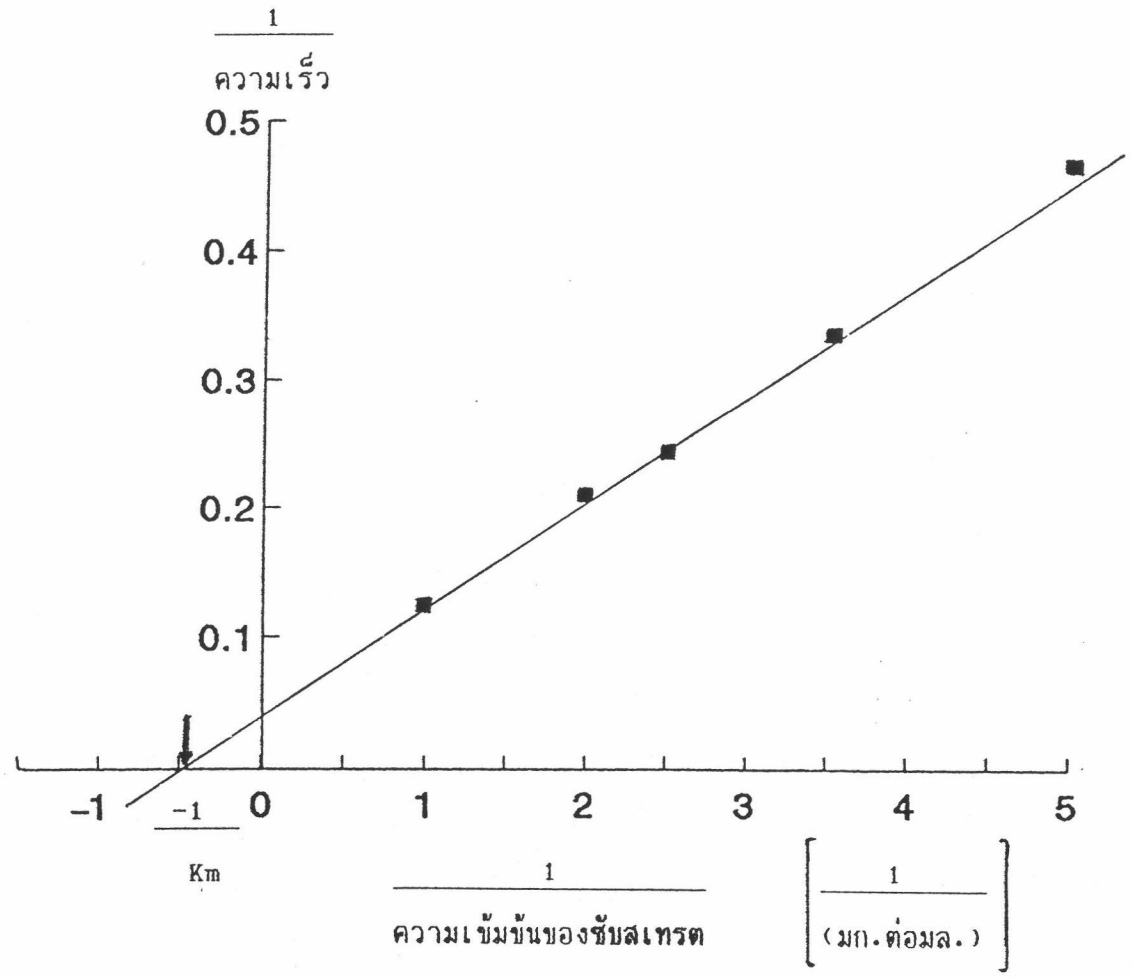
จากการที่ทราบองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส และทราบสมบัติของ



รูปที่ 30 ผลของความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ ต่อการทำงานของ ไซแลเนส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

ตรวจหาแอคติวิตีโดยบ่มเอนไซม์ 28.5 ไมโครกรัมโปรตีน กับซับสเทรตความเข้มข้น 15 มก. ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนภาวะอื่นๆ ทำตามวิธีดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 33 ยกเว้น 0.1โมลาร์ ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ต่างๆ ดังระบุ

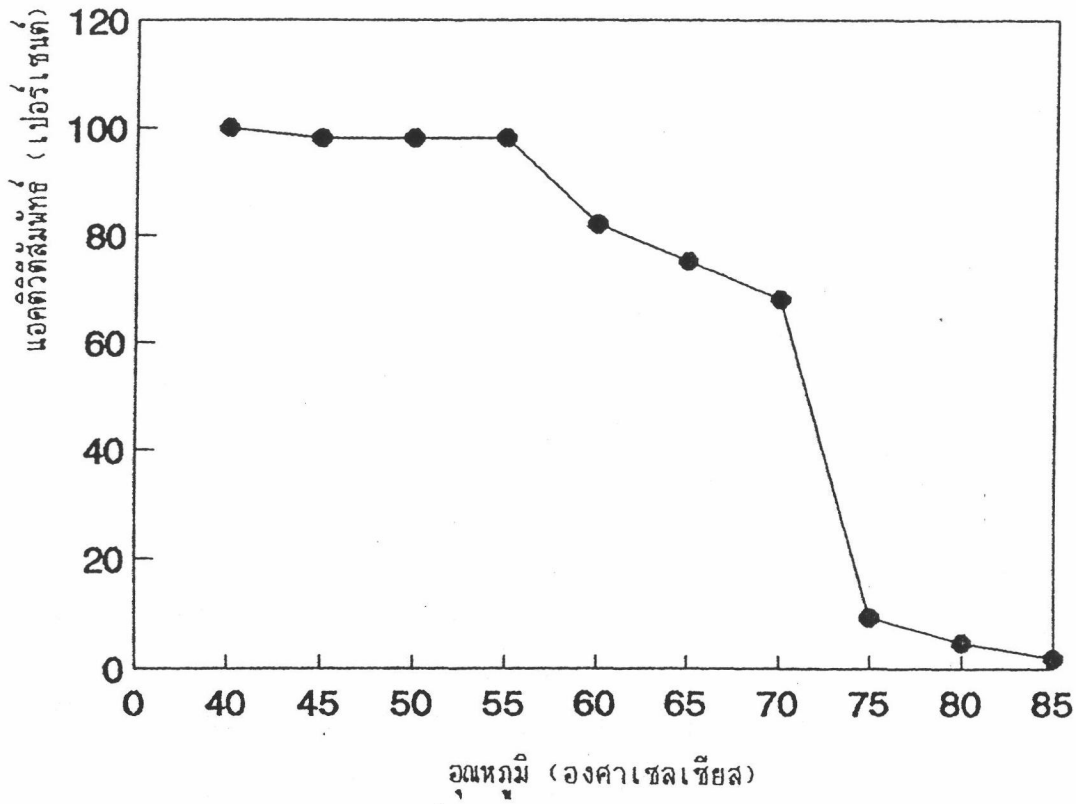
- อะซิเทท บัฟเฟอร์
- ฟอสเฟต บัฟเฟอร์
- ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์



รูปที่ 31 การหาค่า Km ของไซแลเนสที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ต่อไซแลนจากเปลือกต้นโอ๊ต

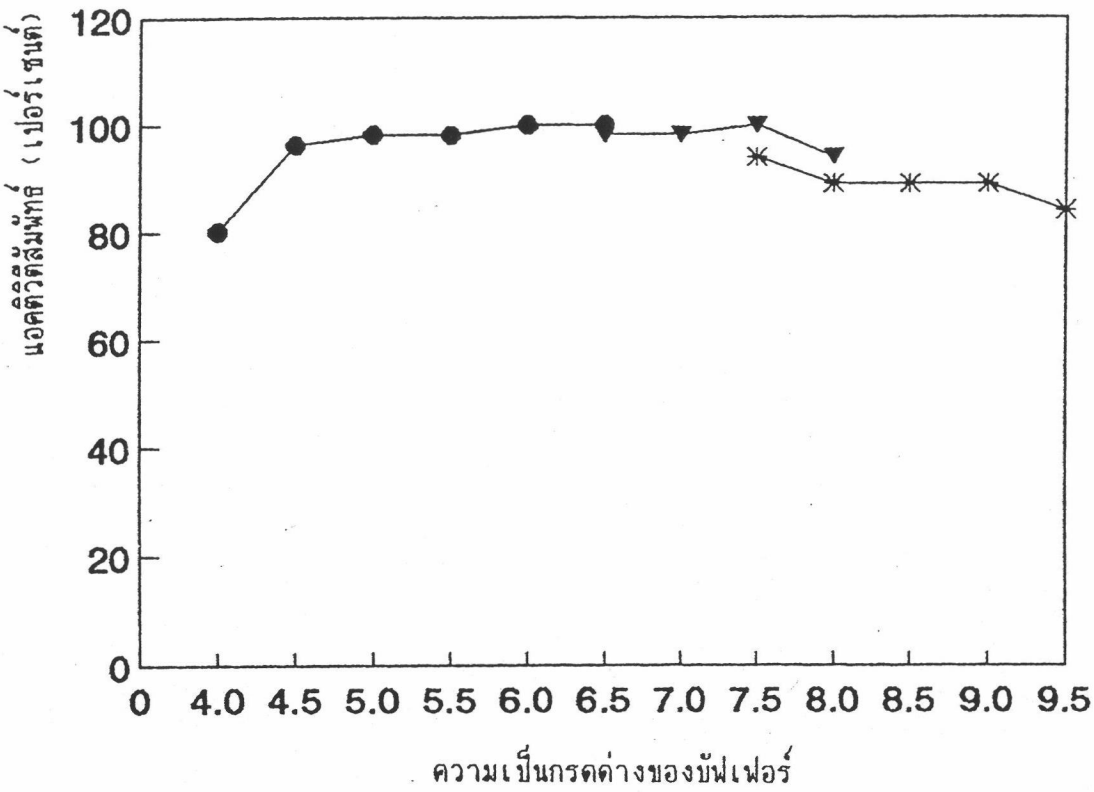
นำผลการทดลองจากรูปที่ 29 มาหาค่า Km โดยการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk

หน่วยของความเร็วคือ มก.ของไซโลสต่อนาที



รูปที่ 32 ผลของอุณหภูมิ ต่อความเสถียรของไซแลเนส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 4. หน้า 42 โดยเทียบให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100 %



รูปที่ 33 ผลของความเป็นกรดด่าง ของบัฟเฟอร์ ต่อความเสถียรของไซแลเนส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

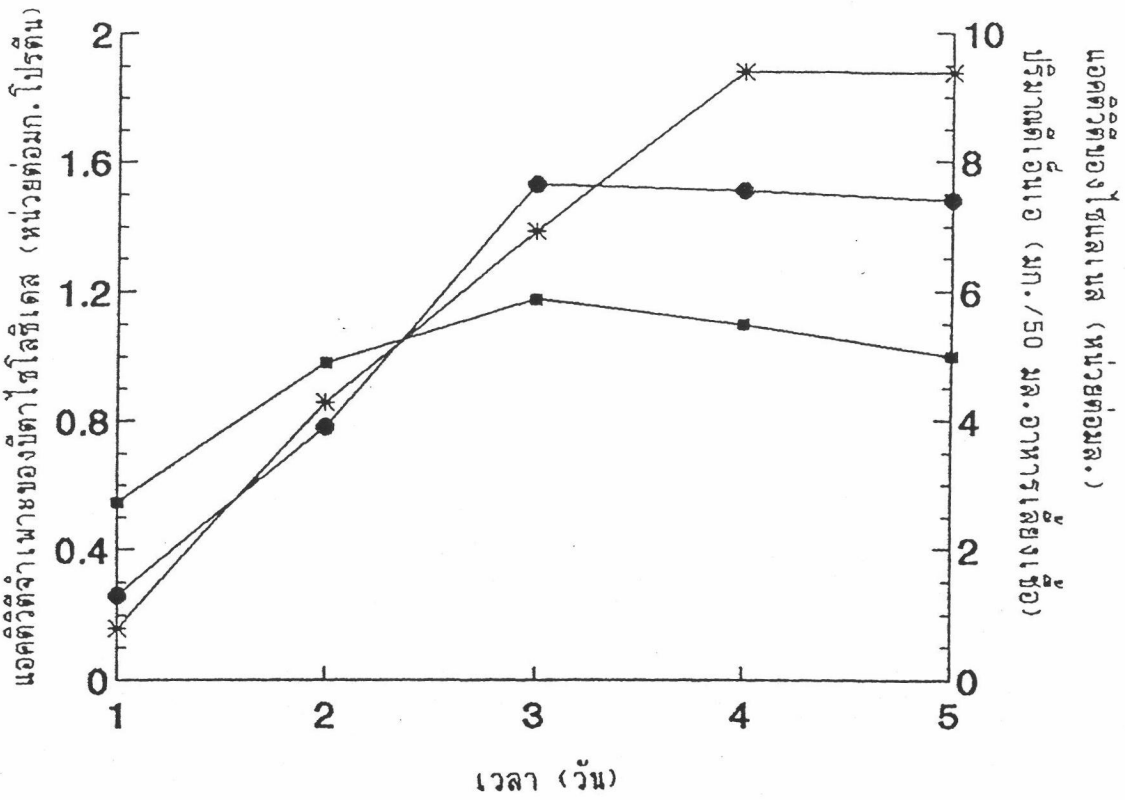
ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 5. หน้า 42 โดยเทียบให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100 %

- อะซิเทต บัฟเฟอร์
- ฟอสเฟต บัฟเฟอร์
- ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์

บีตาไซโลซิเดสและไซแลเนสที่สร้างขึ้น ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อติดตามการเจริญพร้อมกับการสร้างเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ กันเป็นเวลา 5 วัน โดยการวิเคราะห์แอคติวิตีใช้ภาวะที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด พบว่า Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 สามารถสร้างบีตาไซโลซิเดสได้ สูงสุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยง เท่ากับ 1.53 หน่วยต่อมก.โปรตีน และเมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณ แอลฟา-แอล-อราบิโนฟิวราโนซิเดส (α-L- arabinofurano sidase) ในเอนไซม์ส่วนที่ให้บีตาไซโลซิเดสสูงที่สุดพบว่ามีแอคติวิตีเท่ากับ 1.58 หน่วยต่อมก. โปรตีน ส่วนการสร้างไซแลเนส พบว่าจุลินทรีย์สามารถสร้างเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 9.40 หน่วย ต่อมล. และยังอยู่ในระดับคงที่ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 34

<u>ผลการจัดหมวดหมู่ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4</u>

จากการศึกษาสมบัติของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ดังวิธีการดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 43 โดยเมื่อศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ พบว่าเมื่อจุลินทรีย์เจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์สีเทา หรือสีเทาอมเขียว และการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดพบว่าจะสร้างรงควัตถุละลายน้ำสีน้ำตาลอมเหลือง (yellow-brown) ซึ่งสังเกตได้จากด้านหลังของโคโลนี เมื่อศึกษาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) มีลักษณะแตกแขนงค่อนข้างยาว และตรงปลายสายใยอากาศที่เจริญเต็มที่จะกลายเป็นเกลียวสปอร์ (spirales) โดยเกลียวสปอร์มีจำนวนมากกว่า 10 สปอร์ต่อสาย ดังแสดงในรูปที่ 35 และจากการศึกษาดูผิวสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าลักษณะสปอร์ที่เห็นแตกต่างไปจากลักษณะสปอร์ของ Streptomyces spp. ที่จำแนกไว้ใน Bergey's Manual Systematic of Bacteriology (Locci, 1989) ดังแสดงในรูปที่ 36 ส่วนลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้ในการจัดหมวดหมู่ คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญบนอาหารชนิดต่าง ๆ และลักษณะทางสรีรวิทยา ได้แสดงไว้ในตารางที่ 6, 7 และ 8 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากข้อมูลเบื้องต้นที่ได้ยังไม่สามารถจัดจำแนกและระบุสายพันธุ์ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์นี้ได้



รูปที่ 34 ผลของระยะเวลาต่อการเจริญ การสร้างบีตาไซโลซิเดส และ ไซแลเนส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ในภาวะการเลี้ยง และการวิเคราะห์แอคติวิตีที่เหมาะสม

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบ ภาวะการเลี้ยงเชื้อ ดังกล่าวภายใต้รูปที่ 19 ยกเว้นปรับภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ดังระบุในรูป

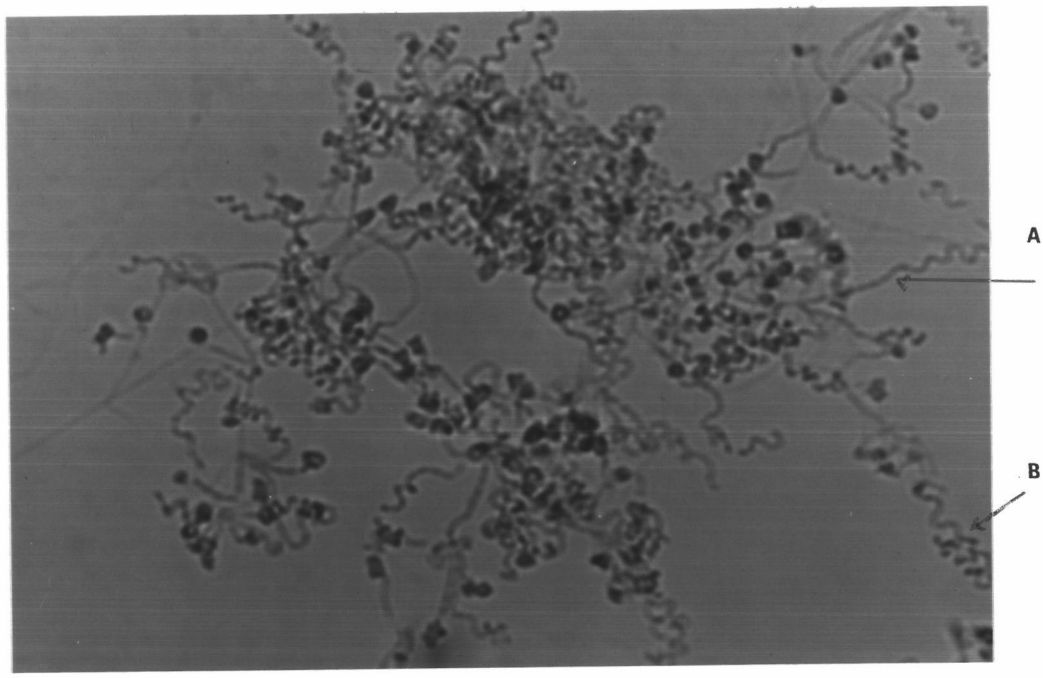
วิเคราะห์หาแอคติวิตีของ บีตาไซโลซิเดสตามวิธีดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 32 ยกเว้นใช้ซับสเทรตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

วิเคราะห์หาแอคติวิตีของไซแลเนส ตามวิธีการดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 33 ยกเว้นใช้ซับสเทรตเข้มข้น 15 มก.ต่อมล. ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

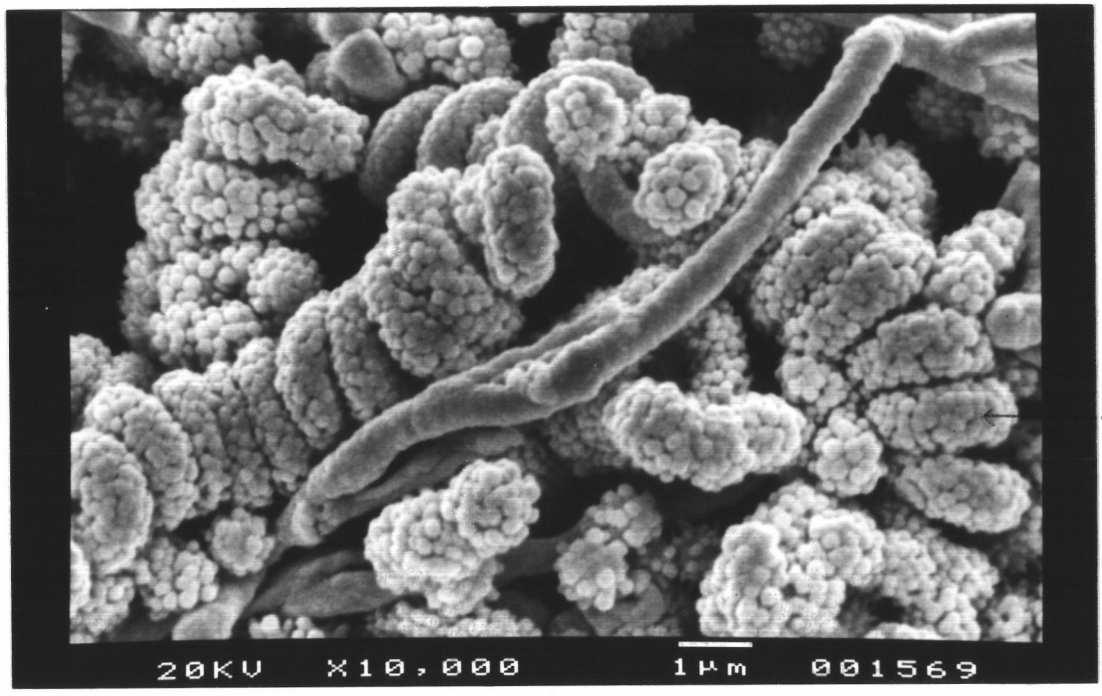
● ปริมาณบีตาไซโลซิเดส

✳ ปริมาณไซแลเนส

▬ ปริมาณดีเอนเอ



รูปที่ 35 แสดงลักษณะสายใยอากาศ (A) และสายสปอร์ (B) ของ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4 โดยกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100 x 40 เท่า)



รูปที่ 36 แสดงลักษณะผิวสปอร์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน ของ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4 (กำลังขยาย 10000 เท่า)

ตารางที่ 6 ลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics) ของ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะที่สังเกตุเห็น
1. แบบของสายสปอร์	สไปราเลส (spirales)
2. สัณฐานวิทยาของสปอร์และผิวสปอร์	กลม ผิวเรียบ เรียงอัดแน่นเป็นเกลียวของสายสปอร์*
3. สีของสายใยอากาศ	เทา (grey)
4. สีของสายใยซับสเทรต	น้ำตาลอมเหลือง (yellow-brown)
5. ปฏิกิริยาต่อการเปลี่ยนระดับความเป็นกรดด่าง	
กรด (0.05 นอร์มอล HCl)	ไม่เปลี่ยนสี
ด่าง (0.05 นอร์มอล NaOH)	ไม่เปลี่ยนสี

* ไม่อยู่ในกลุ่มที่จัดแบ่งใน Bergey's Manual Systematic of Bacteriology (Locci, 1989.)

ตารางที่ 7 ลักษณะการเจริญ (Cultural Characteristics) ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญ	สีของสายใยอากาศ
1. เบซอล มิเนอรอล ซอลท์ สตาร์ช อการ์	ดี	เทา
2. เบนเนท อการ์	ดี	เทา
3. คอลลอย ไคติน อการ์	ดี	เทา
4. ซาเพค อการ์	ดี	เทาอมเขียว
5. เอ๊กโย้ค อการ์	ดี	เทาอมเขียว
6. กลีเซอรอล แอสพาราจีน อการ์	ไม่ดี	เทาอมเขียว
7. อินออแกนิค ซอลท์ สตาร์ช อการ์	ดี	เทาอมเขียว
8. แมนนิทอล ซอยบีน อการ์	ดี	เทาอมเขียว
9. นิวเตรียน อการ์	ไม่ดี	ไม่สร้างสายใยอากาศ
10. เพปโตน ยีสต์ เอกแทรกซ์ ไอรอน อการ์	ไม่ดี	ไม่สร้างสายใยอากาศ
11. สตาร์ช อการ์	ไม่ดี	เทา
12. ไทโรซีน อการ์	ดี	เทา
13. ไซแลน อการ์	ดี	เทา
14. ยีสต์ เอกแทรกซ์ มอลท์ เอกแทรกซ์ อการ์	ดี	เทา

หมายเหตุ

การเจริญบนอาหารทุกชนิดที่ทดสอบ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์สามารถสร้างรงควัตถุละลายน้ำ สีน้ำตาลอมเหลืองได้

ตารางที่ 8 ลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiological Characteristics) ของ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะทางสรีรวิทยา
1. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ	28-30 องศาเซลเซียส
2. ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ	
4 องศาเซลเซียส	ไม่เจริญ
10 องศาเซลเซียส	ไม่เจริญ
37 องศาเซลเซียส	เจริญได้
45 องศาเซลเซียส	ไม่เจริญ
3. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเจริญ	6-9
4. ความสามารถในการเจริญที่ pH 4.3	เจริญได้
5. การสร้างรงควัตถุเมลานิน (melanin pigment)	บน peptone yeast extract iron agar และ tyrosine agar
6. การเจริญในอาหารที่มีสารเคมี	
คริสตอล ไวโอเลต 0.0001 % (crystal violet)	เจริญได้
ฟีนอล (phenol) 0.1 %	ไม่เจริญ
โซเดียม เอไซด์ (sodium azide) 0.001 %	ไม่เจริญ
7. การทนเค็ม (salt tolerance)	มากกว่า 13 % NaCl
8. การสร้างรงควัตถุละลายน้ำ (diffusion pigment)	บน glycerol asparagine agar
9. การรีดิวส์ไนเตรต (nitrate reduction)	เกิดได้
10. การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S production)	ไม่สร้าง

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะทางสรีรวิทยา
11. ความสามารถในการย่อยสลาย (degradation activity)	
อะดีนีน (adenine)	ย่อยไม่ได้
ไทโรซีน (tyrosine)	ย่อยได้
แซนทีน (xanthine)	ย่อยได้
ไซแลน (xylan)	ย่อยได้
เคซีน (casein)	ย่อยไม่ได้
เจลาติน (gelatin)	ย่อยได้
แป้ง (starch)	ย่อยได้
เอสคูลิน (esculin)	ย่อยไม่ได้
12. การใช้แหล่งไนโตรเจน	
อาร์จินีน (arginine)	++
ซีสทีน (cystein)	+
ฮิสติดีน (histidine)	++
โพรลีน (proline)	+++
ซีรีน (serine)	+++
ทรีโอนีน (threonine)	+++
13. การใช้แหล่งคาร์บอน	
ดี-กลูโคส (D-glucose)	+++
แอล-อราบิโนส (L-arabinose)	+
เซลโลไบโอส (cellobiose)	+
เดกแทรน (dextran)	+++

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะทางสรีรวิทยา
การใช้แหล่งคาร์บอน (ต่อ)	
ดี-ฟรุกโตส (D-fructose)	++
ดี-กาแลคโตส (D-galactose)	++
มายโอ-ไอโนซิทอล (myo-inositol)	+
ดี-แลคโตส (D-lactose)	+++
แมนนิทอล (manitol)	+++
ดี-แมนโนส (D-mannose)	+
ดี-มีลิไบโอส (D-melibiose)	+
แรฟฟิโนส (raffinose)	++
ซาลิซิน (salicin)	+
ซูโครส (sucrose)	+++
ทรีฮาโลส (trehalose)	+
ดี-ไซโลส (D-xylose)	+++
โซเดียมอะซิเทต (sodium acetate)	+++
โซเดียมซิเตรต (sodium citrate)	+++
ไม่มีแหล่งคาร์บอน	+

หมายเหตุ

+ = การเจริญของเชื้อน้อย

++ = การเจริญของเชื้อปานกลาง

+++ = การเจริญของเชื้อดี