235

# การผลิตบีตาไซโลซิเดสโดย Streptomyces sp. ในขวดเขย่า

นางสาว กรรณิการ์ ดวงมาลย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-138-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16759187

# Production of β-xylosidase by *Streptomyces* sp. in shaking flask

Miss Kannika Duangmal

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-632-138-2

**หัวข้อวิทยานิพนธ์** การผลิตบีตาไซโลซิเดสโดย Streptomyces sp. ในขวดเขย่า

**โดย** นางสาวกรรณิการ์ ดวงมาลย์

**ภาควิชา** จุลชีววิทยา

**อาจารย์ที่ปรึกษา** รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ชวนิชย์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

กรรณิการ์ ดวงมาลย์ : การผลิตบีตาไซโลซิเดสโดย Streptomyces sp. ในขวดเขย่า (PRODUCTION OF β- XYLOSIDASE BY Streptomyces sp. IN SHAKING FLASK) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 141 หน้า. ISBN 974-632-138-2

จากการตรวจหาความสามารถในการสร้างบีตาไซโลซิเดสโดย Streptomyces spp. 190 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่า Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 สามารถสร้างบีตาไซโลซิเดสได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถสร้างบีตาไซโลซิเดสได้เมื่อมี กากเมล็ดฝ้าย หรือเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน แต่พบว่ากลูโคสและไซโลสกดการสร้างบีตาไซโลซิเดส จากการศึกษาพบว่าการใช้กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับเปลือกข้าวโพดบด 3% (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถทดแทนไซแลนได้ ส่วนแหล่งไนโตรเจนพบว่า 1% ไฮโดรไลเสทของกากถั่วเหลือง (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่มี % ไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 0.4 สามารถทดแทนคอร์นสตีพ ลิเคอร์ และพอลิเพปโตนได้ ซึ่งจากการเลี้ยง Streptomyces sp. 43-4 โดยมีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เชื้อสามารถสร้างบีตาไซโลซิเดสได้ 1.53 หน่วยต่อ มก.โปรตีน แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส 1.58 หน่วยต่อ มก.โปรตีน ส่วนไซแลเนสจะสร้างได้สูงสุดเท่ากับ 9.4 หน่วยต่อ มล.ของน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน

จากการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของบีตาไซโลซิเดส และไซแลเนสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของบีตาไซโลซิเดสเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส และ 6.5-7.0 ตามลำดับ สำหรับไซแลเนสเท่ากับ 60-65 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ ค่า Km ของบีตาไซโลซิเดสสำหรับพาราไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ เท่ากับ 7.14 มิลลิโมลาร์ ส่วนค่า Km ของไซแลเนสต่อไซแลนจากเปลือกต้นโอ๊ตมีค่าเท่ากับ 2.5 มก.ต่อมล. บีตาไซโลซิเดสมีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 5.5-8.0 และจะเสียแอคติวิตีเกือบสมบูรณ์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในขณะที่ไซแลเนสจะเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 4.5-9.0 และจะเสียแอคติวิตีเกือบสมบูรณ์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

การศึกษาอนุกรมวิธานของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 พบว่าลักษณะการจัดเรียงตัวของสปอร์ และผิวสปอร์แตกต่างจากที่จำแนกไว้ใน Bergey's Manual Systematic of Bacteriology

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต กรรณิการ์ ดวงมาลย์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

##C526108 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEYWORD : Streptomyces sp. / β-XYLOSIDASE / XYLANASE
KANNIKA DUANGMAL : PRODUCTION OF β-XYLOSIDASE BY Streptomyces sp. IN SHAKING FLASK. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 141 pp. ISBN 974-632-138-2

Streptomyces spp. were isolated from Thai soil and screened for ability to produce β-xylosidase. Among 190 isolates, Streptomyces sp. 43-4 showed highest β-xylosidase production when cultivated in xylan-containing medium. Cottonseed hulls or corn hulls could used as carbon source but repression by glucose and xylose were observed. Xylan could be replaced by the mixture of 4% (w/v) NaOH treated cottonseed hulls and 3% (w/v) of ground corn hulls. One percent (w/v) of soybean hydrolysate containing 0.4% nitrogen content was able to replace cornsteep liquor and polypeptone for a nitrogen source. Cultivation of Streptomyces sp. 43-4 in a medium with suitable carbon and nitrogen sources as above at pH 7.0, 25°C for three days, maximum production of β-xylosidase and α-L-arabinofuranosidase were 1.53 and 1.58 units/mg of protein, respectively, while xylanase of 9.4 units/ml of broth were obtained on day 4 of growth.

Preliminary study on properties of β-xylosidase and xylanase from the crude enzyme preparations by ammonium sulfate precipitation revealed that optimum temperature and pH for β-xylosidase were 45°C and 6.5-7.0 respectively while those of xylanase were 60-65°C and 6.0. The apparent Km values of β-xylosidase for p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside was 7.14 mM and of xylanase for oat spelt xylan was 2.5 mg/ml. Activity of β-xylosidase was found stable to pH in the range of 5.5-8.0, while that of xylanase was between 4.5-9.0. β-Xylosidase was almost completely lost its activity when preincubated at 50°C for 30 minutes, while that of xylanase was at 75°C.

Taxonomic studies of Streptomyces sp. 43-4 showed differences in spore chain arrangement and spore surface from all groups classified in Bergey's Manual Systematic of Bacteriology.

ภาควิชา จุลยีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต กรรณิการ์ ดวงมาลย์

สาขาวิชา จุลยีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ชวนิชย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพินิพนธ์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบ ให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณยุวดี ตาลาวนิช ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษาในการทำวิจัย ตลอดจนคำแนะนำเกี่ยวกับการเขียนวิทยานิพนธ์นี้

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกๆ ท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนในการวิจัยนี้ ตลอดจนขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป..... ฌ

สัญลักษณ์และคำย่อ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย..... 27

3. ผลการวิจัย..... 45

4. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย..... 96

รายการอ้างอิง..... 108

ภาคผนวก..... 124

ประวัติผู้เขียน..... 141

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า


1 ชนิดจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างบีตาไซโลซิเดสได้..... 9

2 ภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส 18

3 สมบัติของบีตาไซโลซิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ..... 22

4 สมบัติของไซแลนเนสจากจุลินทรีย์ต่างๆ..... 24

5 สายพันธุ์ของ Streptomyces spp. ที่สร้างบีตาไซโลซิเดสได้สูง ในภาวะการตรวจสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว..... 46

6 ลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics) ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4..... 91

7 ลักษณะการเจริญ (Cultural Characteristics) ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4..... 92

8 ลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiological Characteristics) ของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4..... 93

9 สมบัติของบีตาไซโลซิเดส และไซแลนเนส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4..... 100

10 แอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสจาก Streptomyces sp.สายพันธุ์ 43-4 กับจุลินทรีย์อื่นๆ ที่สามารถสร้างบีตาไซโลซิเดสได้ในหน่วย "หน่วยต่อมก.โปรตีน"..... 101

11 แอคติวิตีของบีตาไซโลซิเดสจาก Streptomyces sp.สายพันธุ์ 43-4 กับจุลินทรีย์อื่นๆ ที่สามารถสร้างบีตาไซโลซิเดสได้ในหน่วย "หน่วยต่อมล."..... 103

12 แอคติวิตีของไซแลนเนสจาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 กับจุลินทรีย์อื่นๆ ที่สามารถสร้างไซแลเนสได้ในหน่วย "หน่วยต่อมล."..... 104

13 แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดสจาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 กับจุลินทรีย์อื่นๆ ที่สามารถสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดสได้ในหน่วย "หน่วยต่อมก.โปรตีน"..... 105

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน ..... | 2 |
| 2 | ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง ..... | 3 |
| 3 | การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน ..... | 6 |
| 4 | ลักษณะการย่อยสลายไซแลนของ *Cryptococcus albidus* ..... | 7 |
| 5 | ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนีของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... | 47 |
| 6 | ผลของปริมาณไซแลน ไซโลส และกลูโคส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... | 49 |
| 7 | ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... | 50 |
| 8 | ผลการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นเสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 4% กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างบีตาไซโลซิเดสโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... | 52 |
| 9 | ผลการเติมไซแลนเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 4 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างและ 3 % เปลือกข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... | 54 |
| 10 | ผลการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรียสารลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อทดแทนการเติมคอร์นสตีพ ลิเคอร์ และพอลิเพปโตน เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... | 56 |
| 11 | ผลการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดอนินทรียสารลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อทดแทนการเติมคอร์นสตีพ ลิเคอร์ และพอลิเพปโตน เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... | 57 |
| 12 | ผลการเติมไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดสโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... | 59 |

# สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

13 ผลการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยง เชื้อเพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 60
14 ผลการเติมโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 61
15 ผลการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 63
16 ผลการเติมโปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อสร้าง บีตา-ไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 64
17 ผลการเติมเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อสร้างบีตา-ไซโลซิเดส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 65
18 ผลการเติมแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อสร้างบีตาไซโลซิเดสโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 66
19 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดสโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 68
20 ผลของอุณหภูมิ ต่อการสร้างบีตาไซโลซิเดสโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 70
21 ผลของความเข้มข้นของซับสเทรต ต่อการทำงานของบีตาไซโลซิเดส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 71
22 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของบีตาไซโลซิเดส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 73
23 ผลของความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ ต่อการทำงานของบีตาไซโลซิเดสที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 74
24 การหาค่า Km ของบีตาไซโลซิเดส ที่สร้างโดย Streptomyces sp.สายพันธุ์ 43-4 ต่อพาราไนโตรฟีนิล-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ..... 75

# สารบัญรูป (ต่อ)


รูปที่ หน้า

25 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของบีตาไซโลซิเดสที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 77

26 ผลของความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ต่อความเสถียรของบีตาไซโลซิเดสที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 78

27 ผลของระยะเวลาต่อการเจริญ และการสร้างไซแลเนสโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 79

28 ผลของความเข้มข้นของซับสเทรต ต่อการทำงานของไซแลเนส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 81

29 ผลของอุณหภูมิ ต่อการทำงานของไซแลเนส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 82

30 ผลของความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ ต่อการทำงานของไซแลเนส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 84

31 การหาค่า Km ของไซแลเนส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ต่อไซแลนจากเปลือกต้นโอ๊ต ..... 85

32 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไซแลเนส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 86

33 ผลของความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ ต่อความเสถียรของไซแลเนส ที่สร้างโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 87

34 ผลของระยะเวลาต่อการเจริญ การสร้างบีตาไซโลซิเดส และ ไซแลเนส โดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4ในภาวะการเลี้ยงและการวิเคราะห์แอคติวิตีที่เหมาะสม ..... 89

35 แสดงลักษณะสายใยอากาศและสายสปอร์ของ Streptomyces sp.สายพันธุ์ 43-4 90

36 แสดงลักษณะผิวสปอร์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนของ Streptomyces sp. สายพันธุ์ 43-4 ..... 90

# สัญลักษณ์และคำย่อ

| | | |
|---|---|---|
| มก. | = | มิลลิกรัม |
| มล. | = | มิลลิลิตร |
| ชม. | = | ชั่วโมง |
| % | = | เปอร์เซ็นต์ |
| $^{\circ}C$ | = | องศาเซลเซียส |