บทที่ 3

ผลการวิจัย

การแยก *Streptomyces* spp. จากตัวอย่างดินที่เจริญได้ที่อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างสูง

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะหา *Streptomyces* spp. ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างสูงและสามารถย่อยสลายไซแลนได้ โดยขั้นต้นได้ทำการคัดแยก *Streptomyces* spp. ที่ทนต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างสูงจากตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ยีวมิค แอซิด วิตามิน อการ์ ซึ่งเป็นอาหารจำเพาะสำหรับ *Streptomyces* (Hayakawa and Nonomura, 1987) ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9 อุณหภูมิที่เพาะเลี้ยงเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่5 พบว่า สามารถแยกได้ *Streptomyces* spp. ทั้งหมด 375 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 5.

ตารางที่ 5 สายพันธุ์ของ *Streptomyces* spp ที่คัดแยกได้

รหัสสายพันธุ์ *Streptomyces spp.*	แหล่งที่มา	จำนวนสายนธุ์ที่คัดแยกได้
N	กาญจนบุรี (นาข้าว)	8
CH	ชลบุรี	10
RB	ราชบุรี	14
SU	สุรินทร์	37
SC	บริษัท สยามคราฟ, ราชบุรี	40
KS	กาฬสินธุ์	33
KR	นครราชสีมา (โรงสีข้าว)	56
NR	นครราชสีมา(บริเวณต้นมะม่วง)	50
TI	กรุงเทพ (ธนบุรี) บริเวณกองไม้	50
BK	กรุงเทพ (ธนบุรี) บริเวณสวนผัก	55

ตารางที่ 5 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์ *Streptomyces* spp.	แหล่งที่มา	จำนวนสายพันธุ์ที่คัดแยกได้
SCI	กรุงเทพ (จุฬาลงกรณ์)	6
PC	ประจวบคีรีขันธ์	16
ผลรวมสุทธิ		375

<u>การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลเนสและบีตาไซโลสิเดสเพื่อย่อยสลายไซแลนโดย *Streptomyces* spp. ที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว</u>

นำ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้ 375 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างไซแลเนสและบีตาไซโลสิเดสตามวิธีการในข้อ 4 หน้า 26 ซึ่งบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน พบว่ามี 6 สายพันธุ์ที่สร้างไซแลเนสในปริมาณสูง คือ ตั้งแต่ 3.80-5.87 หน่วยต่อมล.ดังแสดงในตารางที่ 6 ส่วนเชื้อ *Streptomyces* spp. อีก 369 สายพันธุ์ เมื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างไซแลเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพบว่า

81 สายพันธุ์ให้ไซแลเนสในช่วง 0.35-1.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร

194 สายพันธุ์ให้ไซแลเนสในช่วง 1.50-2.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร

94 สายพันธุ์ให้ไซแลเนสในช่วง 2.50-3.60 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 6 สายพันธุ์ *Streptomyces* spp ที่สร้างไซแลเนสได้สูง เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9.0 และบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ *Streptomyces* spp.	แอคติวิตีของไซแลเนส (หน่วยต่อมล.)
N 8	5.76
PC 13	3.80
PC 17	4.48
PC 22	5.87

I17199402

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สายพันธุ์ *Streptomyces* spp.	แอคติวิตีของไซแลเนส (หน่วยต่อมล.)
BK 18	4.46
BK 44	5.76
CH 7	2.81

จากการตรวจสอบความสามารถในการสร้างบีตาไซโลสิเดส พบว่ามี 8 สายพันธุ์ ที่สร้างบีตาไซโลสิเดสในปริมาณสูง คือ ตั้งแต่ 0.10-0.50 หน่วยต่อมก.โปรตีน. ดังแสดงในตารางที่ 7 ส่วนเชื้อ *Streptomyces* spp. อีก 367 สายพันธุ์

ความสามารถในการสร้างบีตาไซโลสิเดสจัดแบ่งออกได้ดังนี้

132 สายพันธุ์ให้บีตาไซโลสิเดสในช่วง 0.00-0.01 หน่วยต่อมก.โปรตีน

202 สายพันธุ์ให้บีตาไซโลสิเดสในช่วง 0.01-0.05 หน่วยต่อมก.โปรตีน

33 สายพันธุ์ให้บีตาไซโลสิเดสในช่วง 0.05-0.10 หน่วยต่อมก.โปรตีน

ตารางที่ 7 สายพันธุ์ *Streptomyces* spp ที่สร้างบีตาไซโลสิเดสได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9.0 และบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ *Streptomyces spp.*	แอคติวิตีของบีตาไซโลสิเดส (หน่วยต่อ มก.โปรตีน)
N 3	0.13
BK 24	0.17
SC 2	0.10
TI 8	0.15
TI 27	0.15
TI 43	0.18
SC1-25	0.20
CH 7	0.50
PC 22	0.02

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 6 และ ตารางที่ 7 พบว่า *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 สร้างไซแลเนสได้สูงสุด และ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 สร้างบีตา-ไซโลสิเดสได้สูงสุด และ เมื่อวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้งเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ พบว่าเชื้อทั้ง 2 ให้ประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ค่อนข้างสม่ำเสมอ ดังนั้นจึงเลือก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 และ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 มาศึกษารายละเอียดในการสร้างไซแลเนสและบีตา-ไซโลสิเดส ตามลำดับต่อไป

<u>การสร้างไซแลเนสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22</u>

<u>ความสัมพันธ์ของระยะเวลาในการบ่มเชื้อและการสร้างไซแลเนสเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน</u>

เนื่องจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 เป็นเชื้อที่แยกได้ในงานวิจัยนี้จึงยังไม่ได้มีการศึกษาถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อเพื่อให้ได้การสร้างไซแลเนสสูงสุด ดังนั้นในขั้นตอนแรกจึงต้องหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการบ่มเชื้อ และการสร้างไซแลเนสเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองในรูปที่ 5 พบว่า เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วันจะมีการสร้างไซแลเนสสูงที่สุดดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงจะบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน

<u>ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังแสดงในภาคผนวก ก. ข้อ 3 โดยแปรระดับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 6.0-11.0 พบว่าระดับความเป็นกรดด่าง เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างไซแลเนสของ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 คือ pH 9.0 โดยให้ปริมาณไซแลเนสเท่ากับ 14.04 หน่วยต่อมล ดังแสดงในรูปที่ 6 และปริมาณเอนไซม์จะค่อยๆลดลงเมื่อปริมาณpH เพิ่มขึ้นจากภาวะที่เหมาะสมข้างต้น

ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการสร้างไซแลเนส

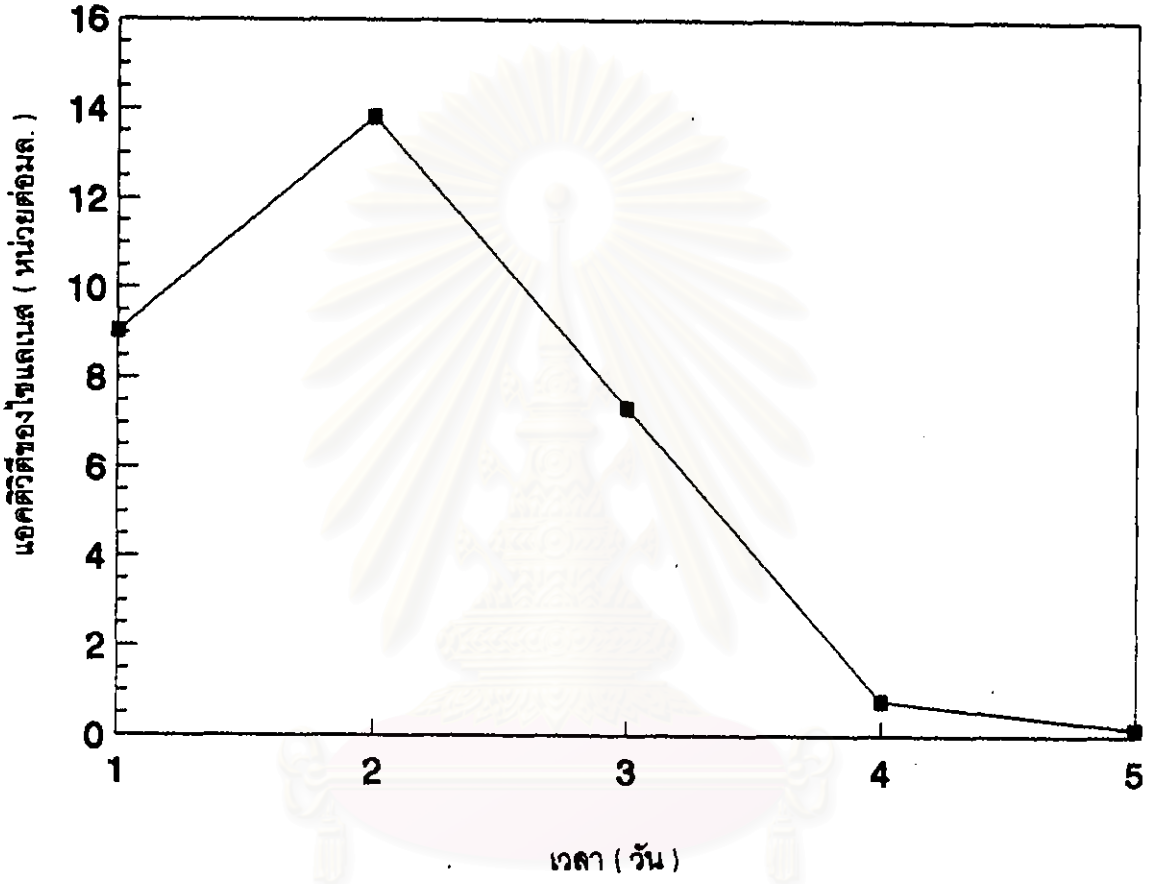
จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังแสดงในภาคผนวก ก. ข้อ 3 และมีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์คือ 9.0 แปรอุณหภูมิในการบ่มเชื้อในช่วง 30-60 องศาเซลเซียส พบว่า *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 สามารถสร้างไซแลเนสได้สูงสุดเท่ากับ 14.68 หน่วยต่อมล. ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 7 และความสามารถในการสร้างเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 เพื่อสร้างไซแลเนสเมื่อมีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน คือ ที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 9.0 และ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

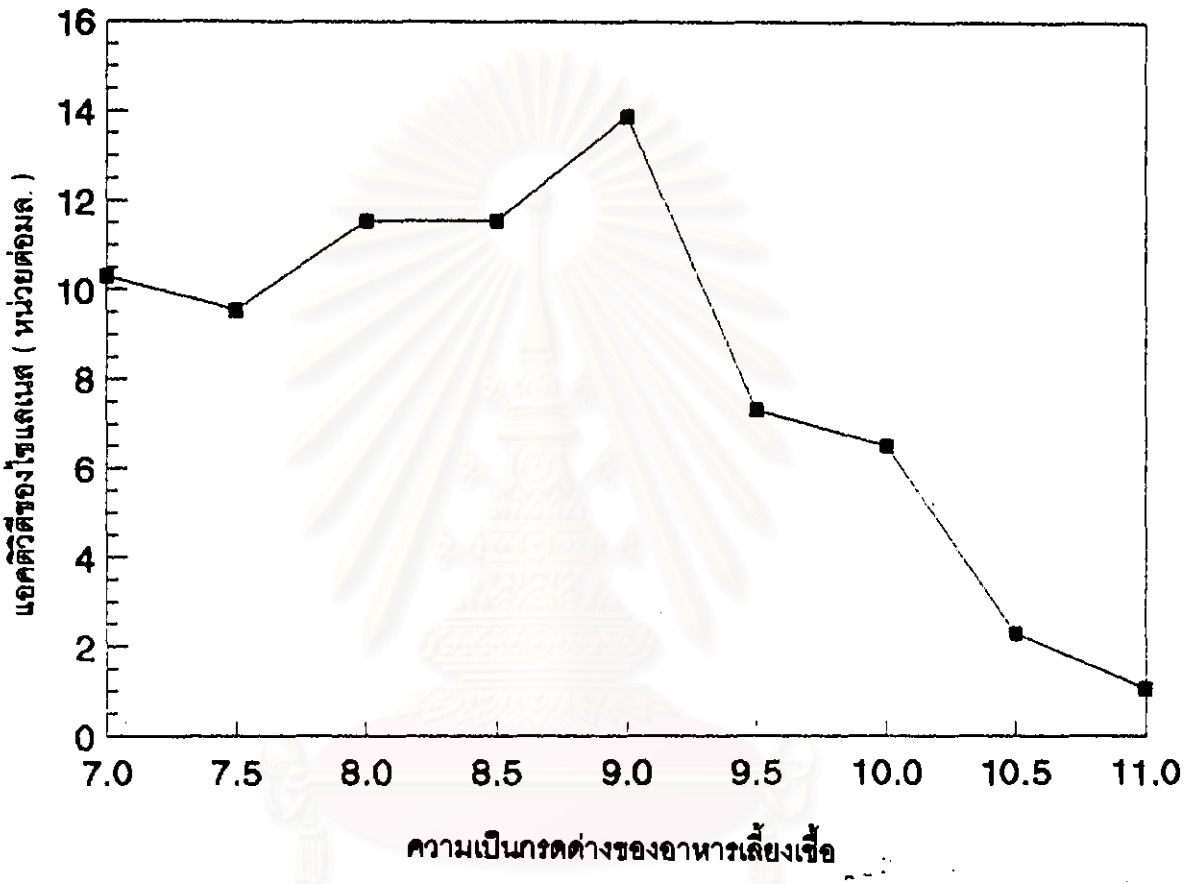
ผลของความเข้มข้นของไซแลนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างไซแลเนส

ไซแลนเป็นสับสเทรตของเอนไซม์ไซแลเนส และมีบทบาทชักนำการสร้างเอนไซม์นี้ ดังรายงานของ กรรณิการ์ ดวงมาลย์ (2538) ในการทดลองที่ผ่านมาได้ใช้ไซแลนเข้มข้น 1.0 % ตามวิธีการที่รายงานโดย กรรณิการ์ ดวงมาลย์ (2538) ซึ่งอาจจะยังไม่ใช่ความเข้นข้นที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ที่ศึกษานี้ สำหรับการทดลองนี้จึงได้แปรความเข้มข้นของไซแลน ตั้งแต่ 0-1.50 % เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสร้างไซแลเนสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 ผลการทดลองในรูปที่ 8พบว่าไซแลนเข้มข้นตั้งแต่ 0.75 % ขึ้นไปจนถึง 1.50 % ให้การสร้างไซแลเนสใกล้เคียงกันคือประมาณ 14.00 หน่วยต่อมล. ของน้ำเลี้ยงเชื้อ

อย่างไรก็ตามเนื่องจากไซแลนบริสุทธิ์มีราคาแพง จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 เพื่อสร้างไซแลเนส การทดลองขั้นต่อไปจึงจะหาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนไซแลน จากรายงานของ กรรณิการ์ ดวงมาลย์ (2538) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 4.0 % ของกากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการกำจัดลิกนินโดยแช่ล้างด้วย NaOH สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้างไซแลเนสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 43-4 ได้ดี ดังนั้นงานวิจัยนี้ในขั้นต่อไปจะศึกษาการนำกากเมล็ดฝ้ายมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไซแลเนส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 โดยในขั้นแรกจะทดลองใช้กากเมล็ดฝ้ายเข้มข้น 4.0 %



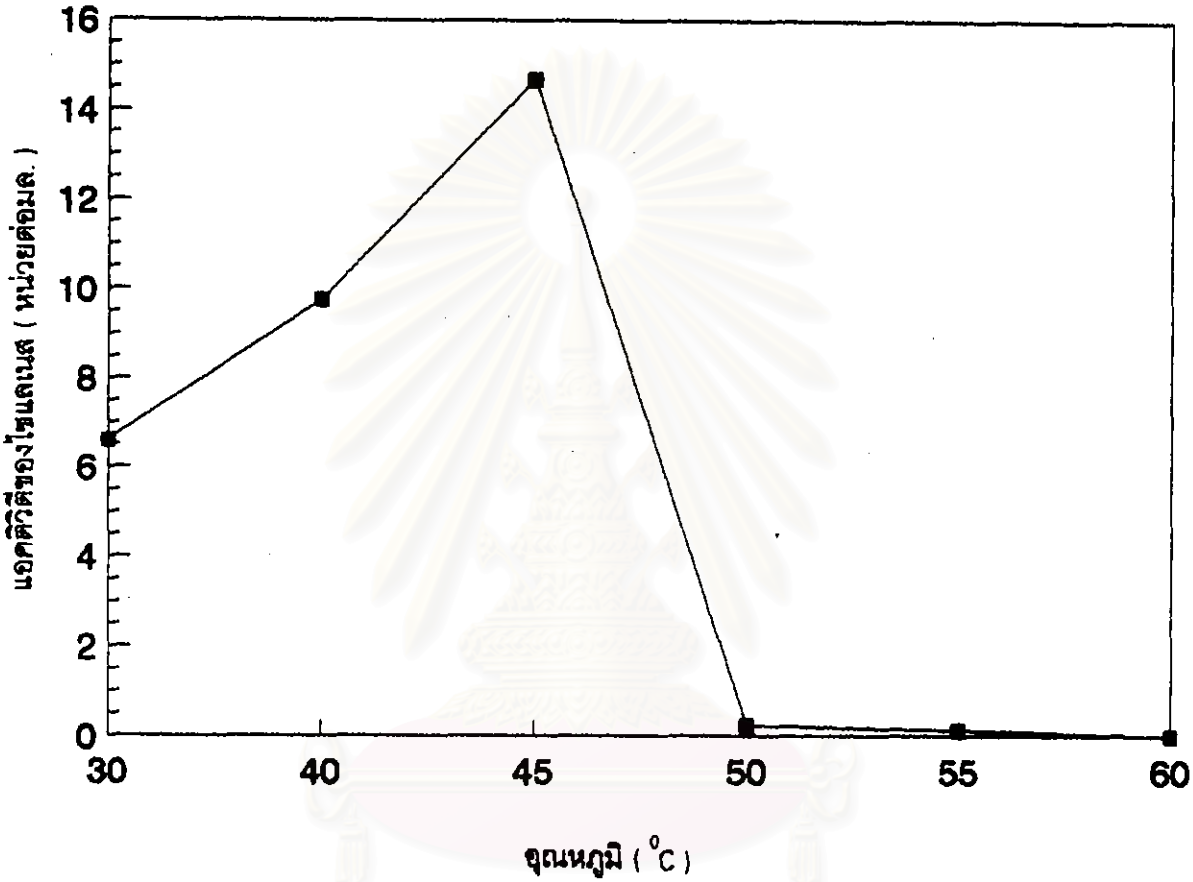
รูปที่ 5 ผลของระยะเวลาต่อการสร้างไซแลเนสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบดังต่อไปนี้ คือ 1 % ไซแลน 0.1 % สารสกัดจากยีสต์ 0.5 % คอร์นสตีพลิเคอร์ 0.5 % พอลิเพปโตน 0.4 % ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.02 % โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.1 % แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7\ H_2O$) 0.002 % เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ปรับความเป็นกรดด่างที่ 9.0 ในขวดแก้วทรงกรวย บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



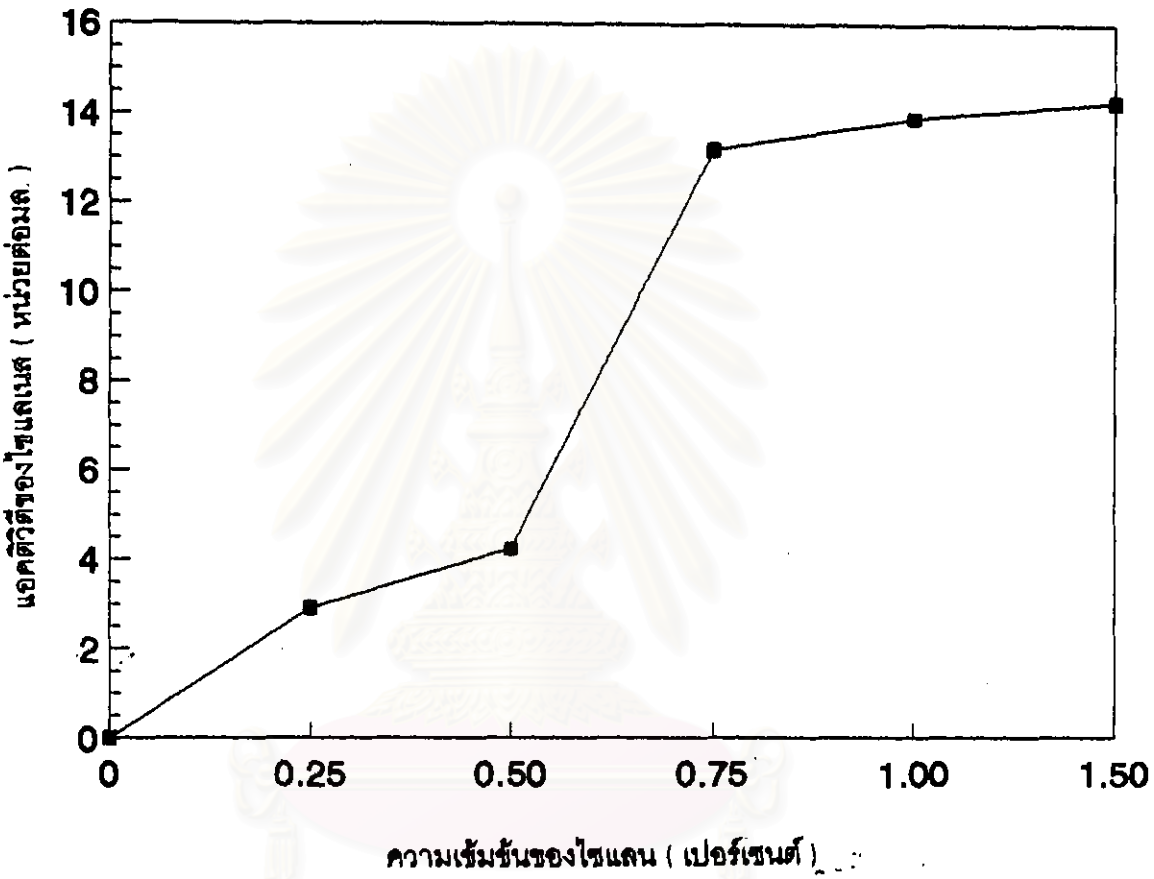
รูปที่ 6 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างไซแลไนสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวองค์ประกอบเช่นเดียวกับที่กล่าว ภายใต้รูปที่ 5 โดยบ่มเขย่าที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างไซแลเนสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวองค์ประกอบเช่นเดียวกับที่กล่าว ภายใต้รูปที่ 5 โดยบ่มเขย่าที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน



รูปที่ 8 ผลของปริมาณไซแลนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างไซแลเนสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปริมาณไซแลนในช่วงความเข้มข้น 0-1.5 % ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นเช่นเดียวกับที่กล่าวภายใต้รูปที่ 5 โดยบ่มเขย่าที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความสัมพันธ์ของระยะเวลาในการบ่มเชื้อและการสร้างไซแลเนสเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอน

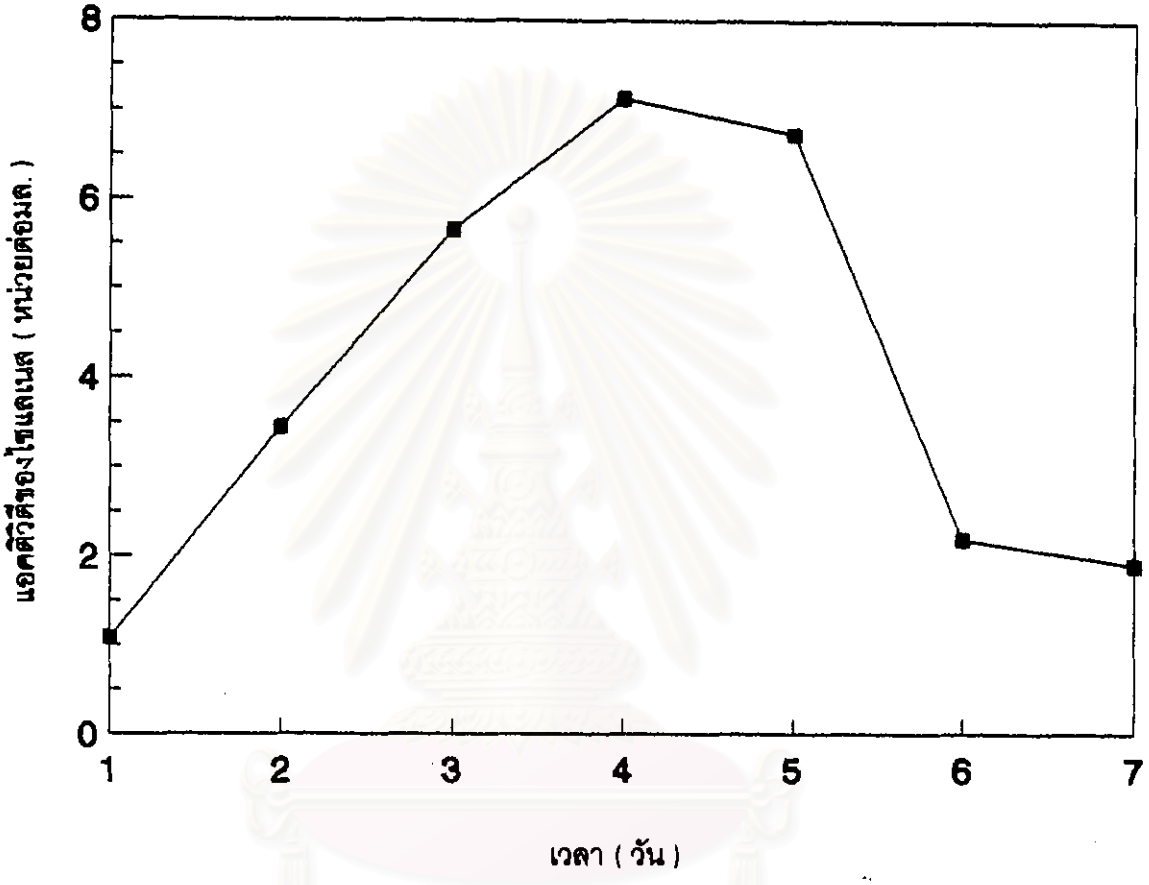
จากรายงานของกรรณิการ์ ดวงมาลย์ (2538) พบว่า การใช้กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์-บอนแทนไซแลนบริสุทธิ์ ต้องใช้ระยะเวลาบ่มเชื้อนานกว่าการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อให้ได้การสร้างเอนไซม์สูงสุด การทดลองนี้จึงต้องหาเวลาที่เหมาะสมในการสร้างไซแลเนสโดย*Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี 4.0 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองในรูปที่ 9 พบว่าเชื้อสามารถสร้างไซแลเนสได้สูงสุด 6.65 หน่วยต่อมล. เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ดังนั้นในการทดลองต่อไปที่ใช้กากเมล็ด-ฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอน จะบ่มเชื้อเป็นเวลา 4 วัน

ผลของความเข้มข้นของกากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างในการสร้างไซแลนเนส

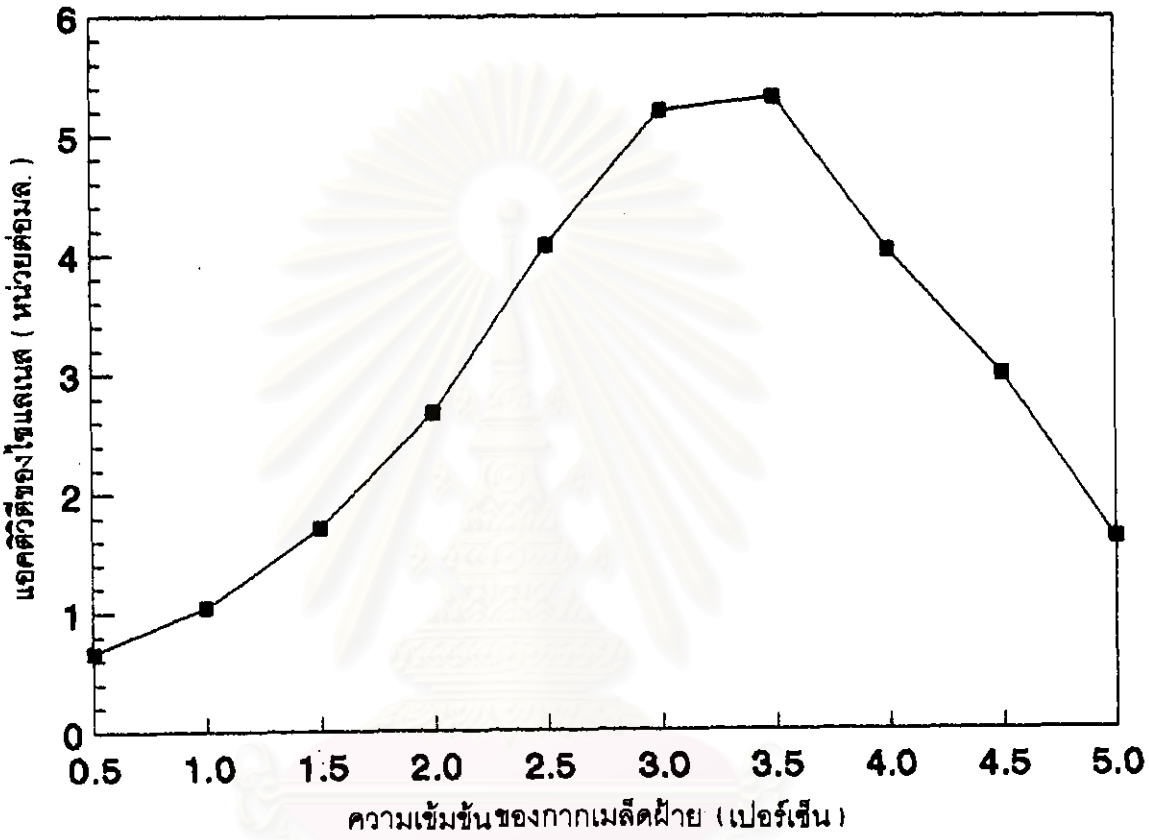
การทดลองนี้จะหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากเมล็ดฝ้ายเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างไซแลเนสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 โดยได้แปรความเข้มข้นของกากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 0.5-5.0 % ผลการทดลองในรูปที่ 10 พบว่ากากเมล็ดฝ้ายเข้มข้น 3.0-3.5 % ให้การผลิตเอนไซม์สูงสุดประมาณ 5.30 หน่วยต่อมล. ความเข้มข้นที่สูงกว่า 3.5 % จะให้ผลผลิตเอนไซม์ต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณกากเมล็ดฝ้ายที่สูงขึ้นจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อข้นมากขึ้นทำให้การถ่ายเทอากาศลดต่ำลง

ผลการเสริมไซแลนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างไซแลเนส

แม้ว่ากากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างไซแลเนสโดย *Streptomyces* sp .สายพันธุ์ PC 22 ได้ แต่ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ก็ยังไม่สูงทัดเทียมกับการใช้ไซแลนเข้มข้น 1.00 % เป็นแหล่งคาร์บอน การทดลองในขั้นนี้จึงจะเสริมไซแลนที่ความเข้มข้นต่างๆลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากเมล็ดฝ้าย โดยในขั้นแรกจะทดลองใช้ความเข้มข้นของกาก-เมล็ดฝ้าย 2.5 % ซึ่งไม่ทำให้อาหารเหลวข้นนัก ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 11 ซึ่งเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน พบว่าที่ความเข้มข้นของไซแลน 0.20 % จะให้แอคติวิตีของไซแลเนสสูงสุด



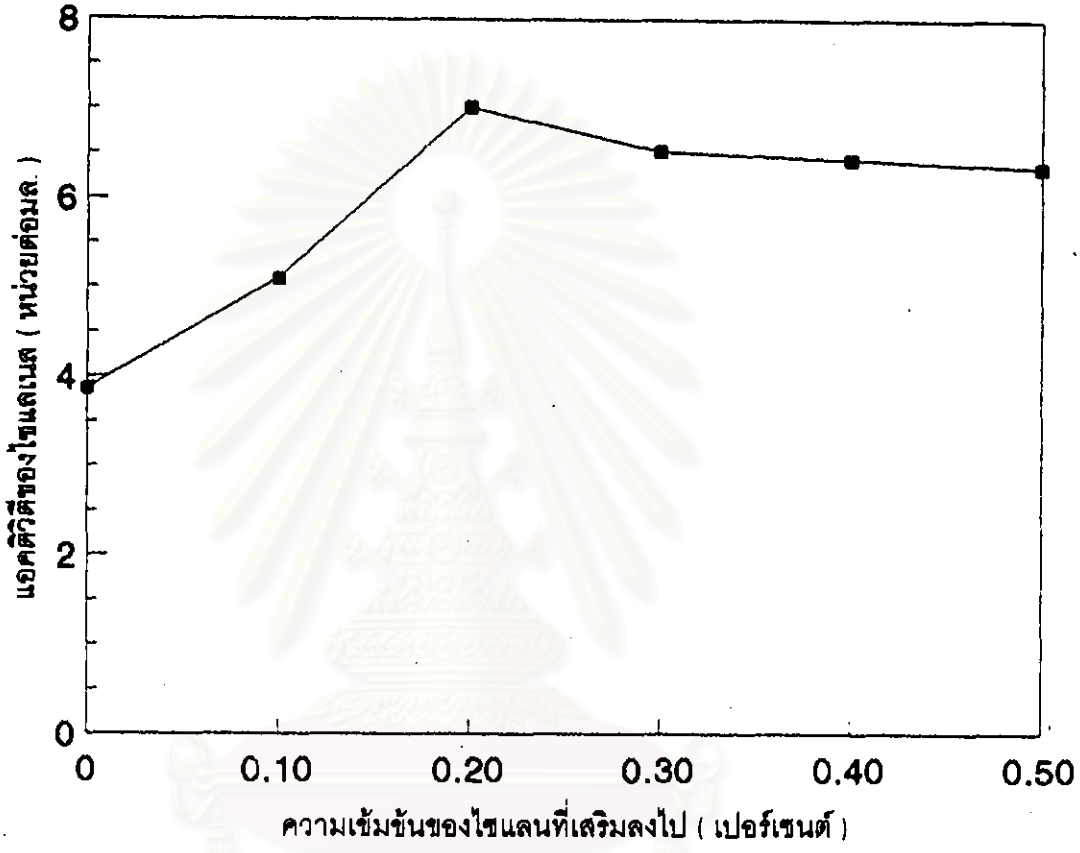
รูปที่ 9 ผลของระยะเวลาต่อการสร้างไซแลเนสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่มี 4.0 % กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นเช่นเดียวกับที่กล่าวภายใต้รูปที่6 บ่มเขย่าที่ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 10 ผลของปริมาณกากเมล็ดฝ้ายต่อการสร้างไซแลเนส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับที่กล่าว ภายใต้รูปที่ 5 แปรความเข้มข้นของกากเมล็ดฝ้าย 0.5-5.0 % บ่มแชย่าที่ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

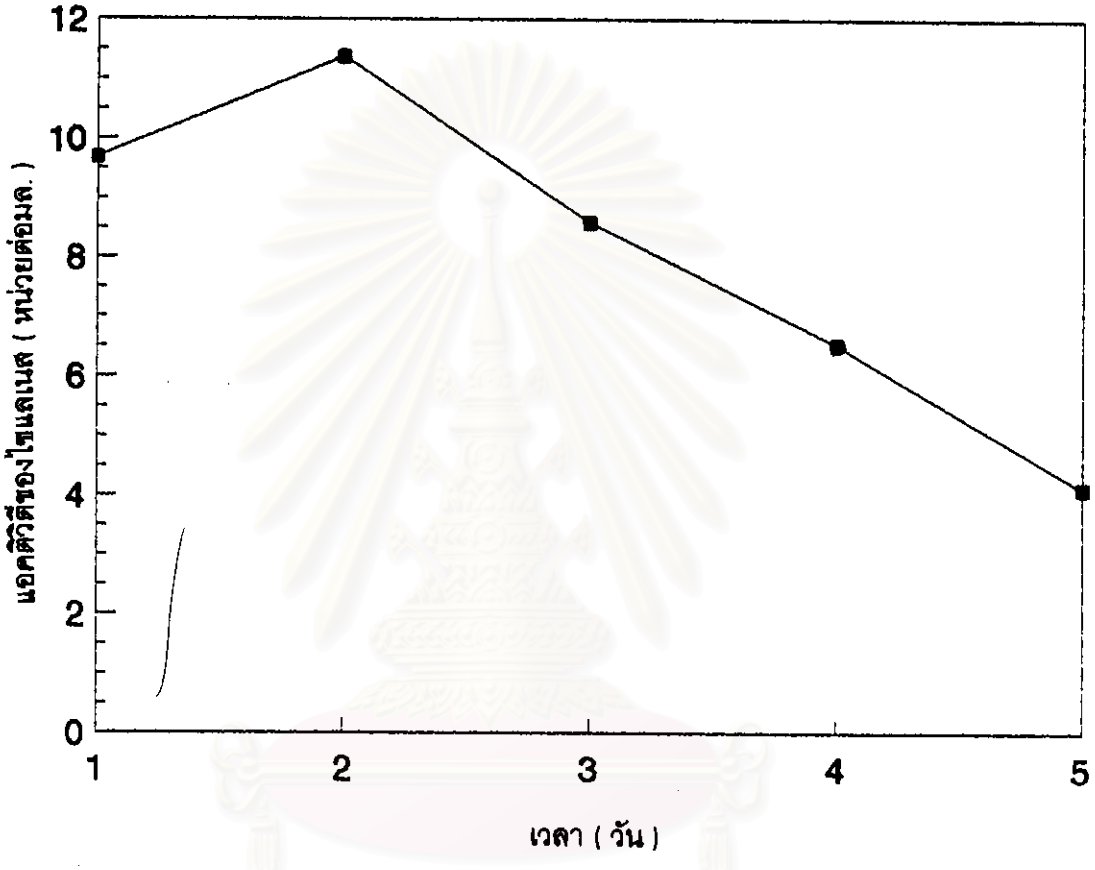
รูปที่ 11 ผลการเติมไซแลนเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2.5 % กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอน ในการสร้างไซแลเนส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นๆ และภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับที่กล่าวภายใต้รูปที่ 5 เป็นเวลา 4 วัน

ประมาณ 7.00 หน่วยต่อมล. แต่จากผลการทดลองที่ผ่านมาข้างต้นดังข้อมูลในรูปที่ 5 พบว่า การใช้ไขแลนเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้แอคติวิตีของไขแลเนสสูงสุดในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงทำการแปรเวลาในการบ่มเชื้อเมื่อเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกากเมล็ดฝ้าย 2.5 %และไขแลน0.20 % ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 12 พบว่า เชื้อสามารถสร้างไขแลเนสได้สูงสุดในวันที่ 2

แต่จากผลการทดลองในรูปที่ 10 พบว่า เมื่อใช้กากเมล็ดฝ้าย 3.0-3.5 % เป็นแหล่งคาร์บอน *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 สร้างไขแลเนสได้สูงสุด แต่จากการสังเกต พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อค่อนข้างข้นมาก ในการทดลองนี้จึงจะเปรียบเทียบการเสริมไขแลนที่ความเข้ม-ข้นต่างๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากเมล็ดฝ้ายที่ความเข้มข้นสองค่าคือ 2.5 % ซึ่งอาหารเหลวไม่ข้นนัก และ 3.0 % และทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 13 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากเมล็ดฝ้าย 2.5 % และไขแลน 0.20 % ให้แอคติวิตีของไขแลเนสสูงสุด 12.66 หน่วยต่อมล. ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากเมล็ดฝ้าย 3.00 % พบว่า เมื่อเสริมไขแลนความเข้มข้นระหว่าง 0.20-0.50 % สามารถสร้างไขแลเนสได้ใกล้เคียงกันประมาณ 10.00 หน่วยต่อมล. ซึ่งต่ำกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากเมล็ดฝ้าย 2.5 % ร่วมกับ ไขแลน 0.20 % ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความจำกัดของการถ่ายเทอากาศ ดังนั้นในการเลี้ยงเชื้อต่อไปจึงเลือกใช้กากเมล็ดฝ้าย 2.5 % ร่วมกับ ไขแลน 0.20 % เป็นแหล่งคาร์บอน และบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน

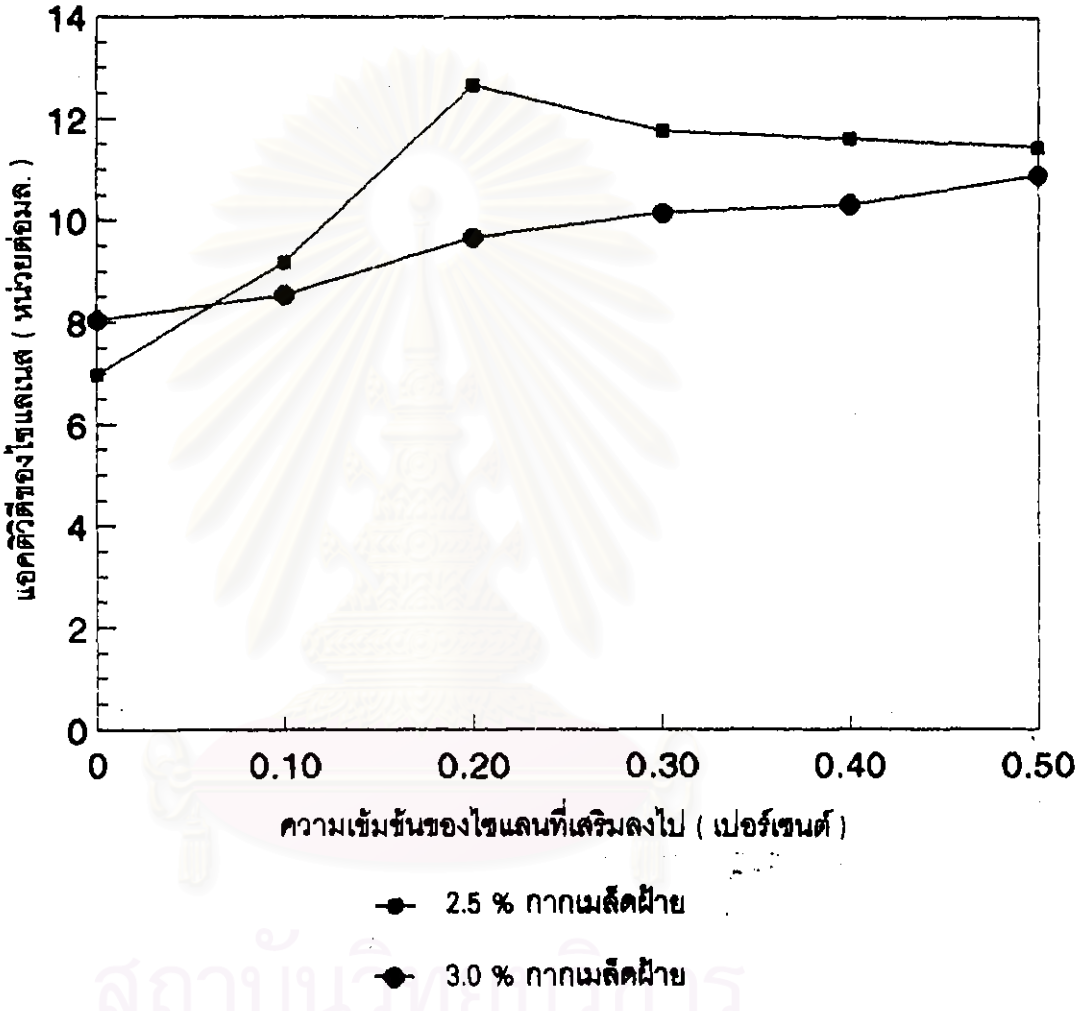
<u>ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างไขแลเนสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22</u>

ในการทดลองเบื้องต้นที่ผ่านมาได้ใช้ คอร์นสตีพ-ลิเคอร์ และ พอลิเพปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจนแต่เนื่องจากสารประกอบดังกล่าวมีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงจะหาแหล่งไนโตรเจนราคาถูกและหาได้ง่ายในประเทศไทย เพื่อทดแทนแหล่งไนโตรเจนดังกล่าวแต่ยังคงทำให้ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 สามารถสร้าง ไขแลเนสได้ในปริมาณสูง ใกล้เคียงกับเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเดิม ซึ่งงานวิจัยนี้จะใช้ soy bean hydrolysate (SBH) เป็นแหล่งไนโตรเจนทั้งนี้ จากงานวิจัยของกรรณิการ์ (2538) พบว่า SBH สามารถทดแทน คอร์นสตีพ ลิเคอร์ และ พอลิเพปโตน ได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนราคาถูกชนิดอื่น เช่น รำข้าว งานวิจัยนี้จึงนำ SBH ที่เตรียมได้ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 9.2 หน้า 30 ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.45 % (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) มาแปรความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 0-2.50 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผลการวิจัยดังแสดงในรูปที่ 14 พบว่า SBH ที่ความเข้มข้น 0.50 % (น้ำหนักต่อ



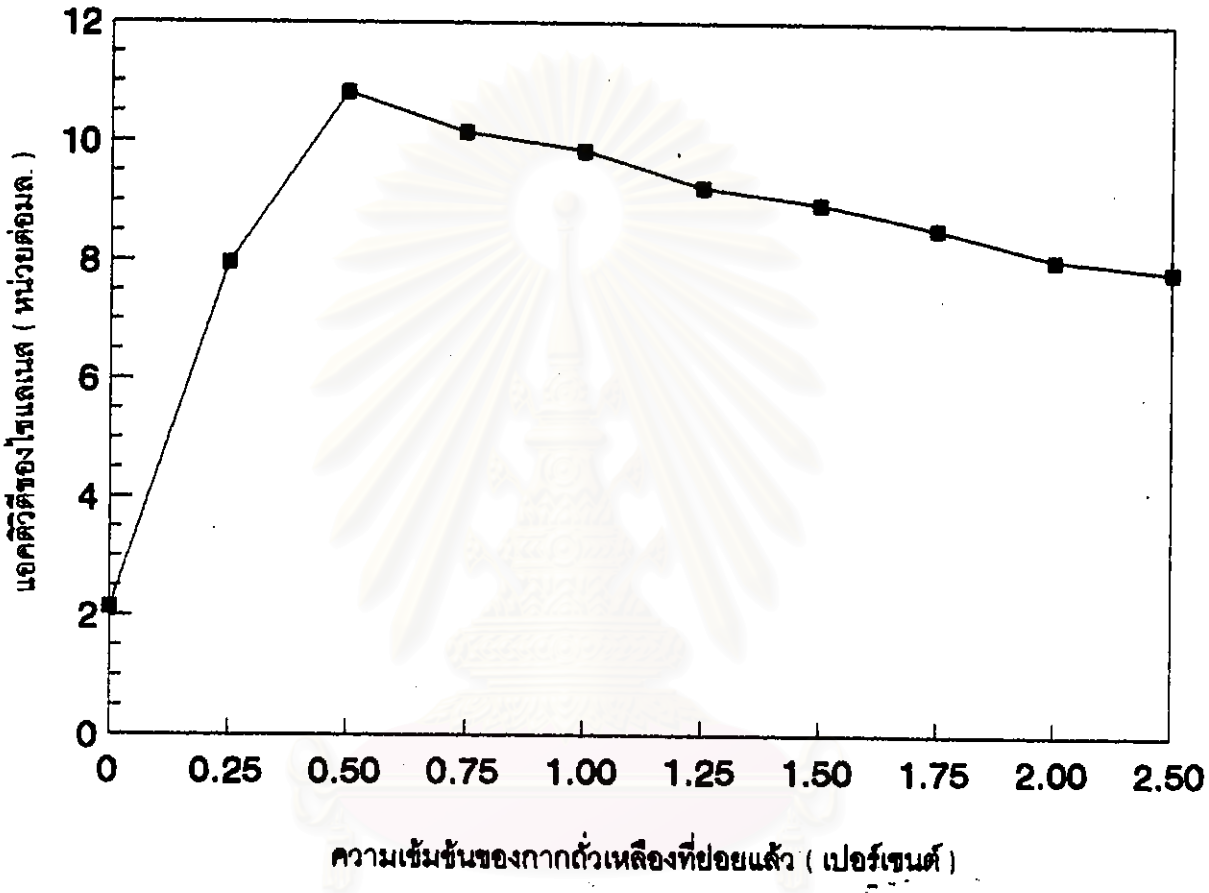
รูปที่ 12 ผลของระยะเวลาต่อการสร้างไซแลเนสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่มี 2.5 % กากเมล็ดฝ้าย และ 0.20 % ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน 0.5 % SBH เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับที่กล่าวภายใต้รูปที่ 5 บ่มเขย่าที่ 45 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 ผลการเติมไซแลนเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2.5 % และ 3.0 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างไซแลเนส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นๆ และภาวะการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 5 เป็นเวลา 2 วัน



รูปที่ 14 ผลการเติมกากถั่วเหลืองที่ย่อยแล้ว (soybean hydrolysate , SBH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อทดแทนการเติมคอร์นสตีพ ลิเคอร์ และ พอลิเพปโตนเพื่อสร้างไซแลเนส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี 2.5 % กากเมล็ดฝ้าย 0.2 % ไซแลน 0.1 % สารสกัดจากยีสต์ 0.4 % ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.02% โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.1 % แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7\ H_2O$) 0.002% เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ปรับความเป็นกรดด่างที่ 9.0 แปรปริมาณแหล่งไนโตรเจนในช่วงความเข้มข้น 0-2.5 % บ่มเขย่าเป็นเวลา 2 วัน

ปริมาตร) สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน คอร์นสตีพ ลิเคอร์ และพอลิเพปโตน ได้ค่อนข้างดีโดยให้ไซแลเนสสูงสุดเท่ากับ 10.82 หน่วยต่อมล. เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วันขณะที่เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเดิมจะได้ไซแลเนสสูงสุดเท่ากับ 12.68 หน่วยต่อมล.

ดังนั้นจากการวิจัยนี้พบว่าสูตรดัดแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างไซแลเนสคือ

กากเมล็ดฝ้าย	2.50	เปอร์เซนต์
ไซแลน	0.20	เปอร์เซนต์
กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรด (SBH)	0.50	เปอร์เซนต์
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.10	เปอร์เซนต์
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.40	เปอร์เซนต์
โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.02	เปอร์เซนต์
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	0.10	เปอร์เซนต์
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.002	เปอร์เซนต์

มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9.0 ภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อคือบ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

<u>การศึกษาสมบัติของไซแลเนส *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22</u>

นำไซแลเนสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมและทำให้เข้มข้นตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 5.1 มาศึกษาสมบัติเบื้องต้นดังนี้

1. <u>ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส</u>

1.1 <u>อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลเนส</u>

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไซแลเนสโดยการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิตั้งแต่ 45-80 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 15 พบว่า อุณหภูมิที่

เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ 50-70 องศาเซลเซียสโดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสมีแอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นในการวิเคราะห์แอคติวิตีครั้งต่อไปจะบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

1.2 ผลความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของไซแลเนส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของไซแลเนสโดยการทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4.0-9.5 พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลเนสอยู่ในช่วง 5.5-7.0 ดังแสดงในรูปที่ 16 ดังนั้นในการวิเคราะห์แอคติวิตีต่อไปจะใช้ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5

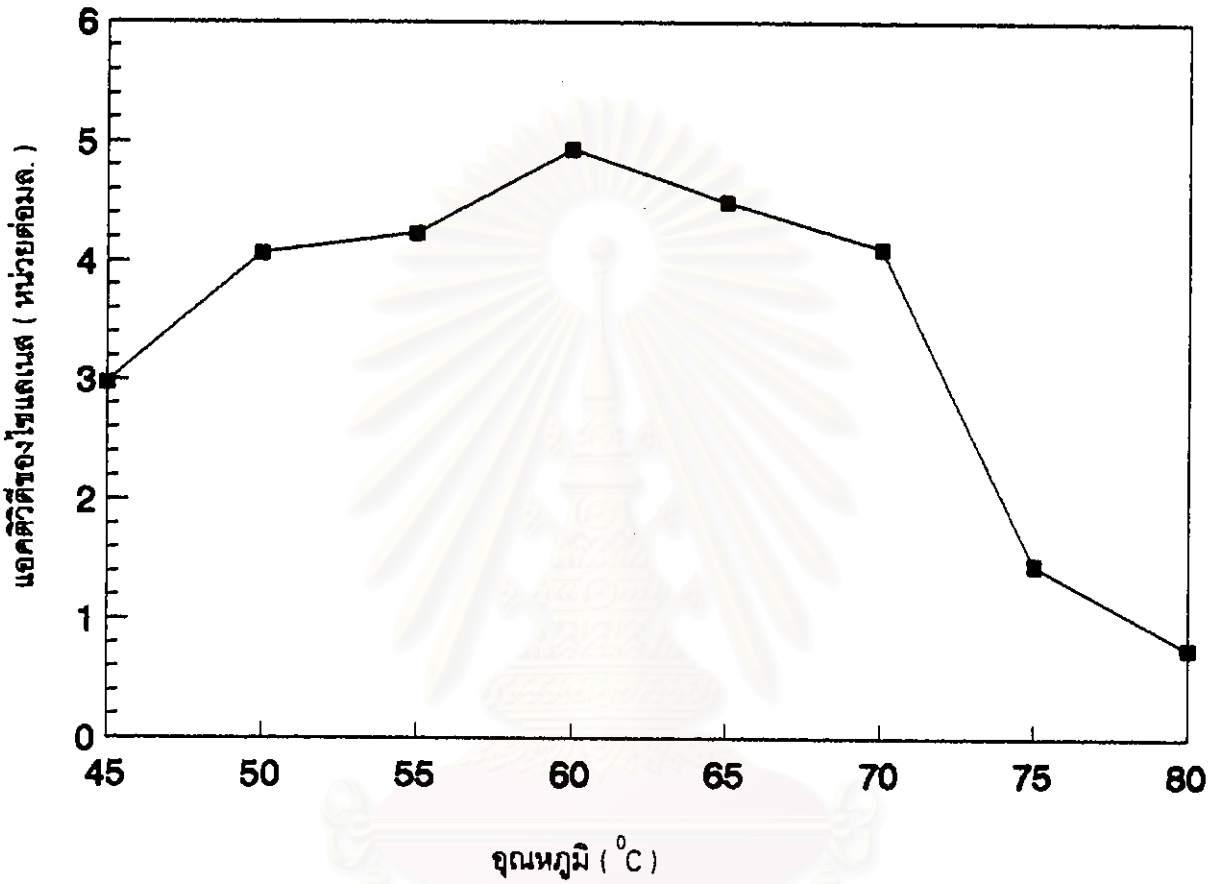
2 ความเสถียรของไซแลเนส

2.1 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

จากการตรวจสอบความเสถียรของไซแลเนสต่ออุณหภูมิโดยบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดแอคติวิตีที่เหลือ พบว่า ไซแลเนสจาก*Streptomyces* sp.สายพันธุ์ PC 22 ค่อนข้างเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 60 องศาเซลเซียส และ ยังคงเหลือแอคติวิตีถึง 50 % ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แต่จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 75-80 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 17

2.2 ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง

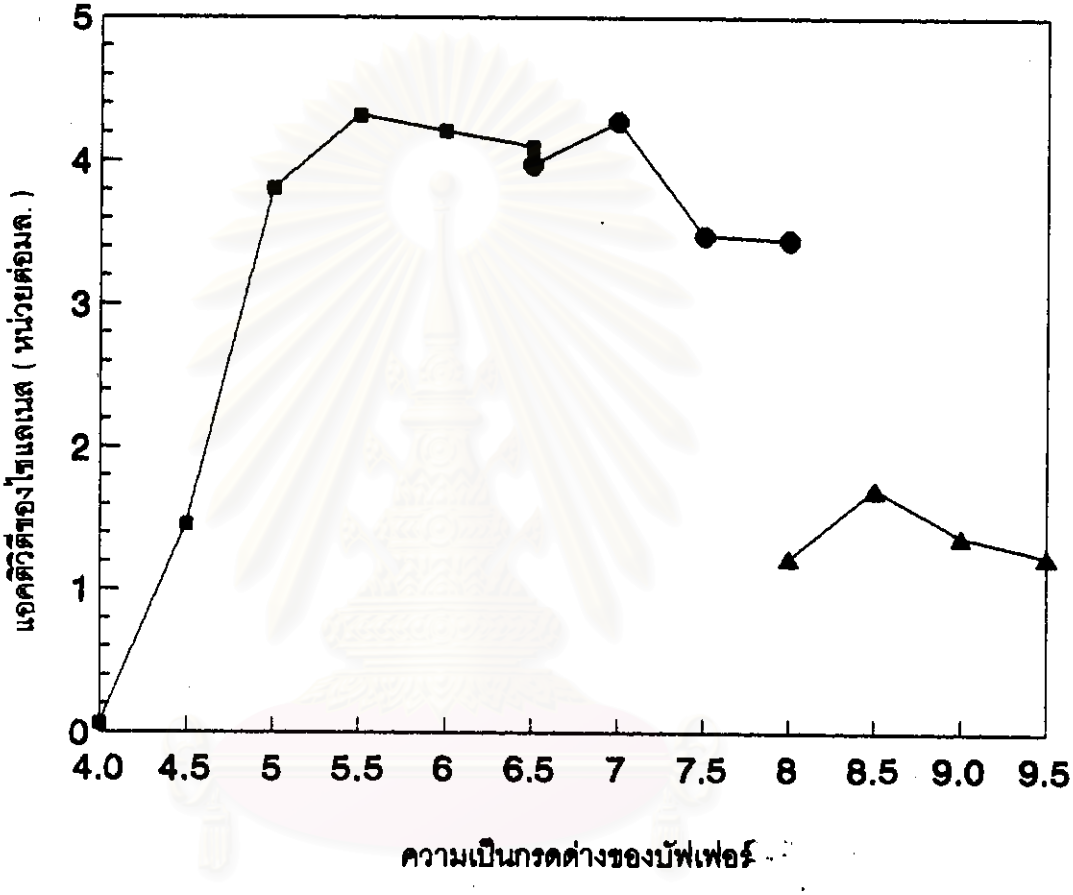
จากการตรวจสอบความเสถียรของไซแลเนสต่อความเป็นกรดด่าง ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 10.1.4 พบว่าไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC 22 มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างคือ pH 4.2- 9.3 ดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไขแลเนส ที่สร้างโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22

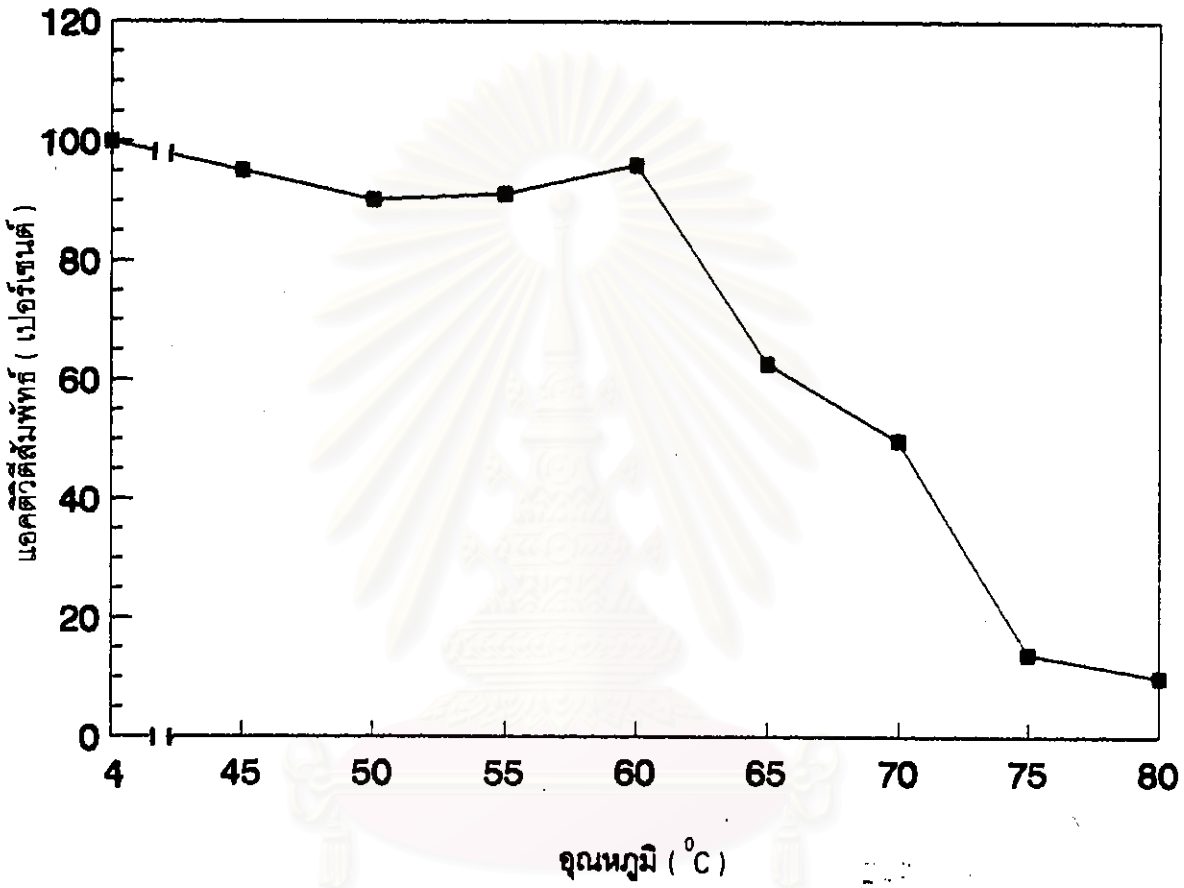
ตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 31 ยกเว้นบ่มเอนไซม์ 25.8 ไมโครกรัมโปรตีนที่อุณหภูมิต่างๆ ดังระบุในรูป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



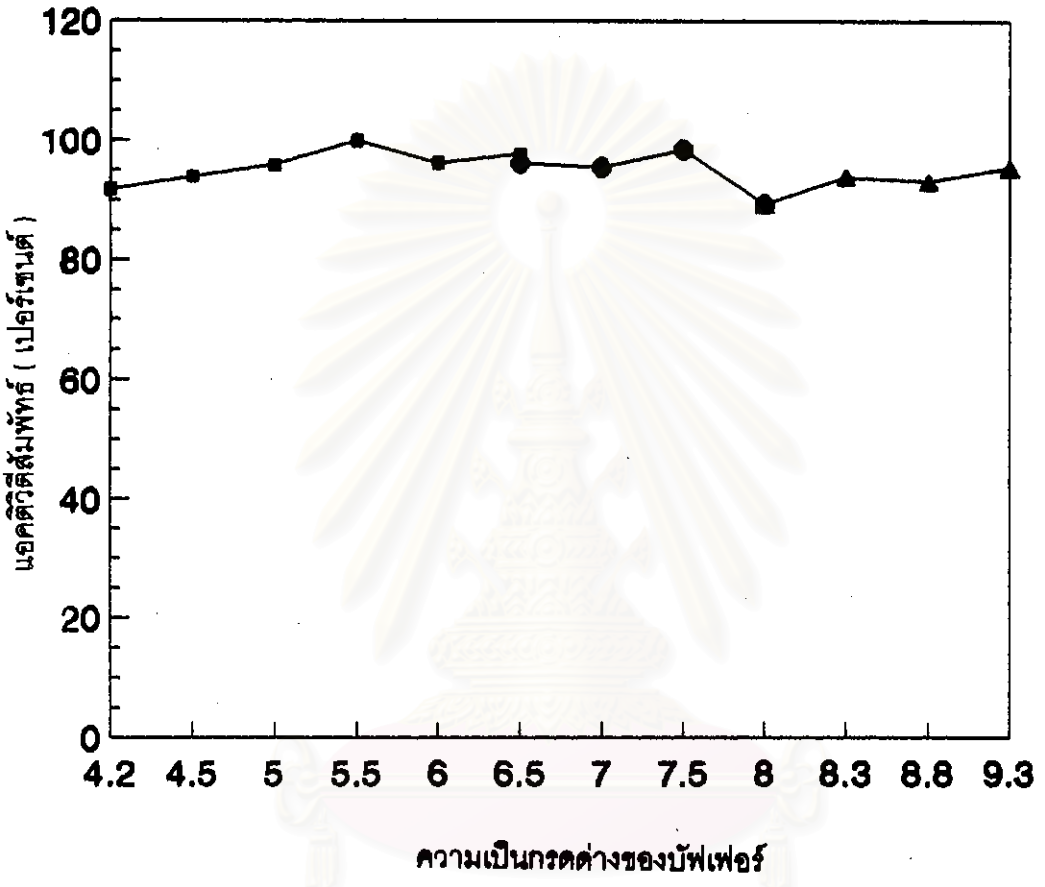
รูปที่ 16 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของไซแลเนสที่สร้างโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22
ตรวจหาแอคติวิตีโดยบ่มเอนไซม์ 25.8 ไมโครกรัมโปรตีน
ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 31 ยกเว้น 0.1 โมลาร์
ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ต่างๆ ดังระบุในรูป

- อะซิเทต บัฟเฟอร์
- ฟอสเฟต บัฟเฟอร์
- ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไขแลเนสที่สร้างโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 32 โดยเทียบให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่าน การบ่มเป็น 100 %



รูปที่ 18 ผลของความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ต่อความเสถียรของไขแลเนสที่สร้างโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22 ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 หน้า 32 โดยเทียบให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100 %

- อะซิเทต บัฟเฟอร์
- ฟอสเฟต บัฟเฟอร์
- ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์

จากผลการศึกษาสมบัติของไซแลเนสที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. PC 22 ข้างต้น พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ 50-70 องศาเซลเซียส และ มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 5.5-7.0 เอนไซม์ไซแลเนสนี้ค่อนข้าง เสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 60 องศาเซลเซียส และ มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงที่ ทำการศึกษาซึ่งอยู่ในช่วงกว้างคือ 4.2-9.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสร้างบีตาไซโลสิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7

ความสัมพันธ์ของระยะเวลาในการบ่มเชื้อและการสร้างบีตาไซโลสิเดสเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

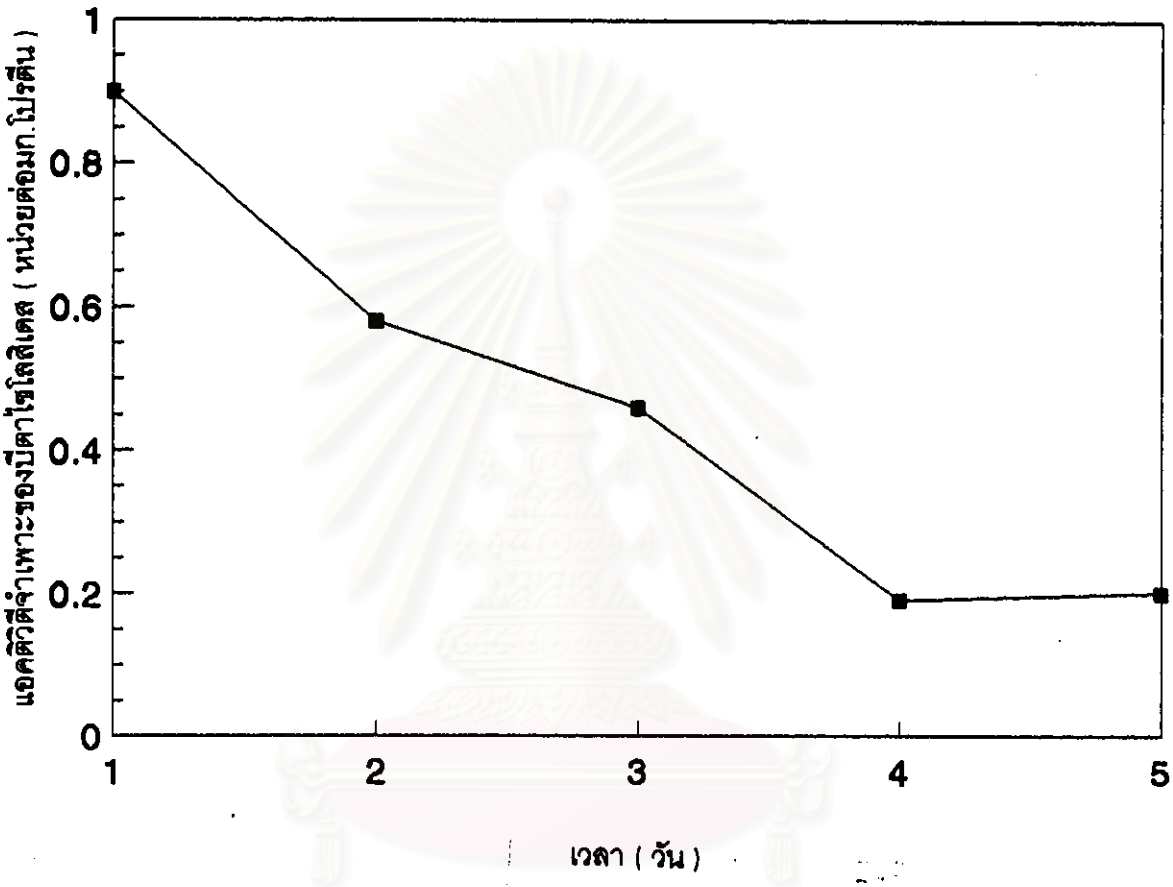
เนื่องจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 เป็นเชื้อที่แยกได้ในงานวิจัยนี้จึงยังไม่ได้มีการศึกษาถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อเพื่อให้ได้การสร้างบีตาไซโลสิเดสสูงสุดดังนั้นในขั้นตอนแรกจึงต้องหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการบ่มเชื้อ และการสร้างบีตาไซโลสิเดสเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนผลการทดลองในรูปที่19 พบว่าเมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 1 วัน จะมีการสร้างบีตาไซโลสิเดสสูงที่สุด ส่วนการบ่มเชื้อที่ระยะเวลาต่ำกว่า 1 วัน ไม่สามารถทำได้เนื่องจากการเจริญของเชื้อต่ำมาก การเก็บตัวอย่างไมซีเลียมให้เพียงพอต่อการวิเคราะห์จึงเป็นไปได้ยาก ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงบ่มเชื้อเป็นเวลา 1 วัน

ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

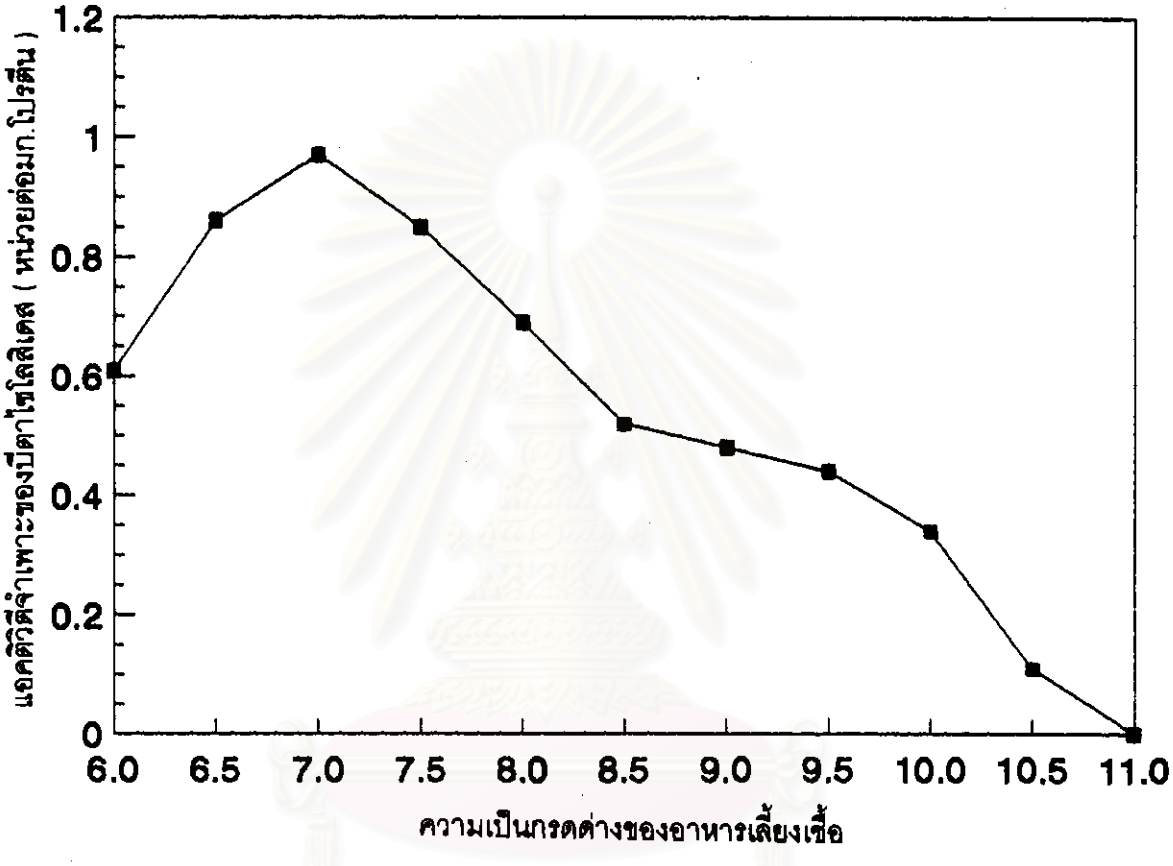
จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังแสดงในภาคผนวก ก. ข้อ 3 โดยแปรระดับความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-11.0 พบว่าระดับความเป็นกรดด่าง เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ของ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 อยู่ในช่วง pH 6.5-7.5 โดยให้ปริมาณบีตาไซโลสิเดสในช่วง 0.83-0.91 หน่วยต่อมก.โปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 20. และปริมาณเอนไซม์จะค่อยๆ ลดลงเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นจากภาวะที่เหมาะสมข้างต้น ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเลือกใช้ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการสร้างบีตาไซโลสิเดส

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังแสดงใน ภาคผนวก ก ข้อ 3 ที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ คือ pH 7.0 โดยแปรอุณหภูมิในการบ่มเชื้อระหว่าง 30-60 องศาเซลเซียส พบว่า *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 สามารถเจริญและสร้างบีตาไซโลสิเดสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 21 และ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจากภาวะ

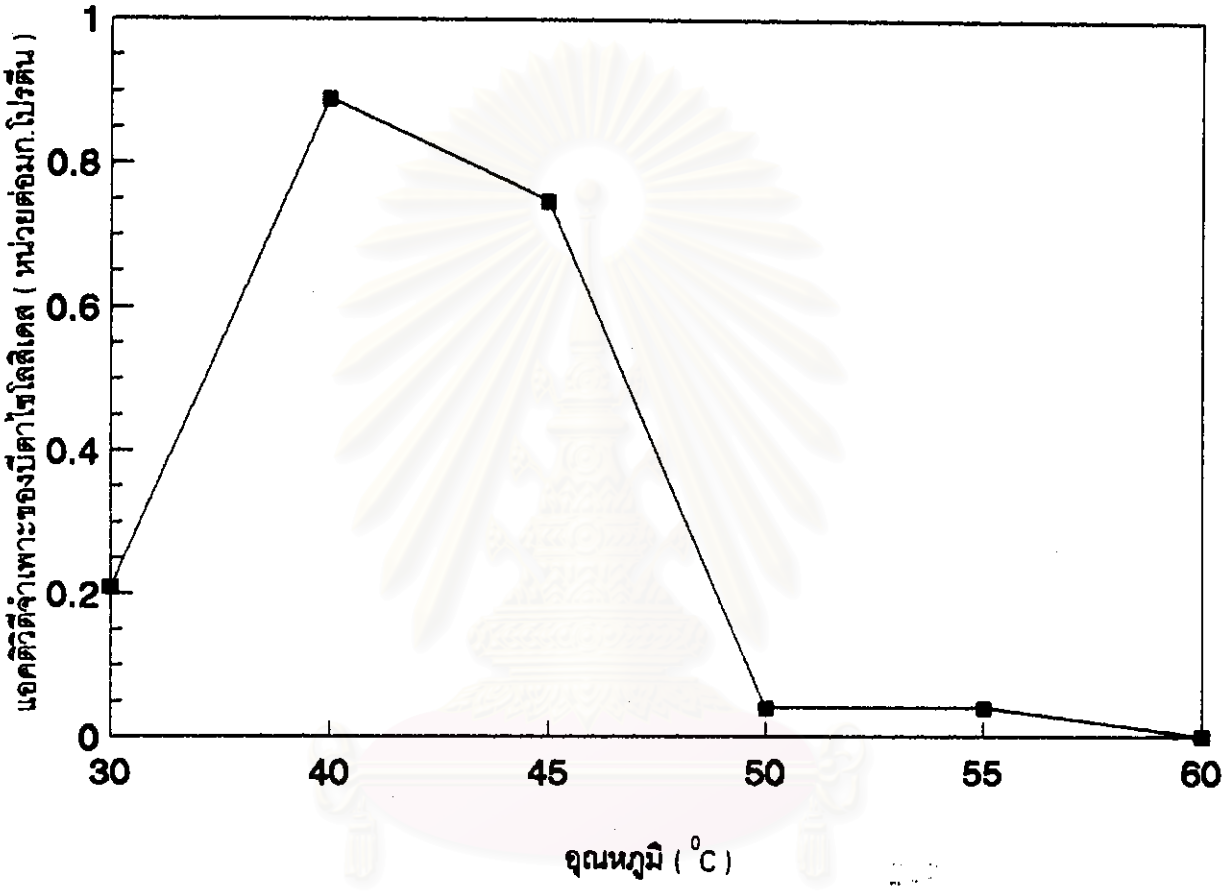


รูปที่ 19 ผลของระยะเวลาต่อการสร้างบีตาไซโลสิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี องค์ประกอบอาหารชนิดอื่นเช่นเดียวกับที่กล่าวภายใต้รูปที่ 5 ปั่มเขย่าที่ 40 องศาเซลเซียส pH 7.0



รูปที่ 20 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างบีตาไซโลสิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี องค์ประกอบอาหารชนิดอื่นเช่นเดียวกับที่กล่าวภายใต้รูปที่ 5 บ่มเขย่าที่ 40 องศาเซลเซียสเป็น เวลา 1 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างบีตาไซโลสิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปริมาณไซแลน 1% ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นเป็นไปตามดังกล่าวภายใต้รูปที่ 5 บ่มเขย่าเป็นเวลา 1 วัน

ที่เหมาะสม

ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 เพื่อสร้างบีตา-ไซโลสิเดส เมื่อมีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน คือ ที่ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และบ่มเชื้อเป็นเวลา 1 วัน

<u>ผลของความเข้มข้นของไซแลนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างบีตาไซโลสิเดส</u>

ในการทดลองนี้จะหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไซแลน ต่อการสร้างบีตาไซโลสิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 โดยแปรความเข้มข้นของไซแลนตั้งแต่ 0-1.50 % ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 22 พบว่า ไซแลนเข้มข้น 0.50 % ขึ้นไปจะให้การสร้างบีตาไซโลสิเดสใกล้เคียงกันคือ ประมาณ 0.8-0.9 หน่วยต่อมก.โปรตีนแต่เนื่องจากไซแลนบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาแพง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทดลองนำกากเมล็ดฝ้ายมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างบีตาไซโลสิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7

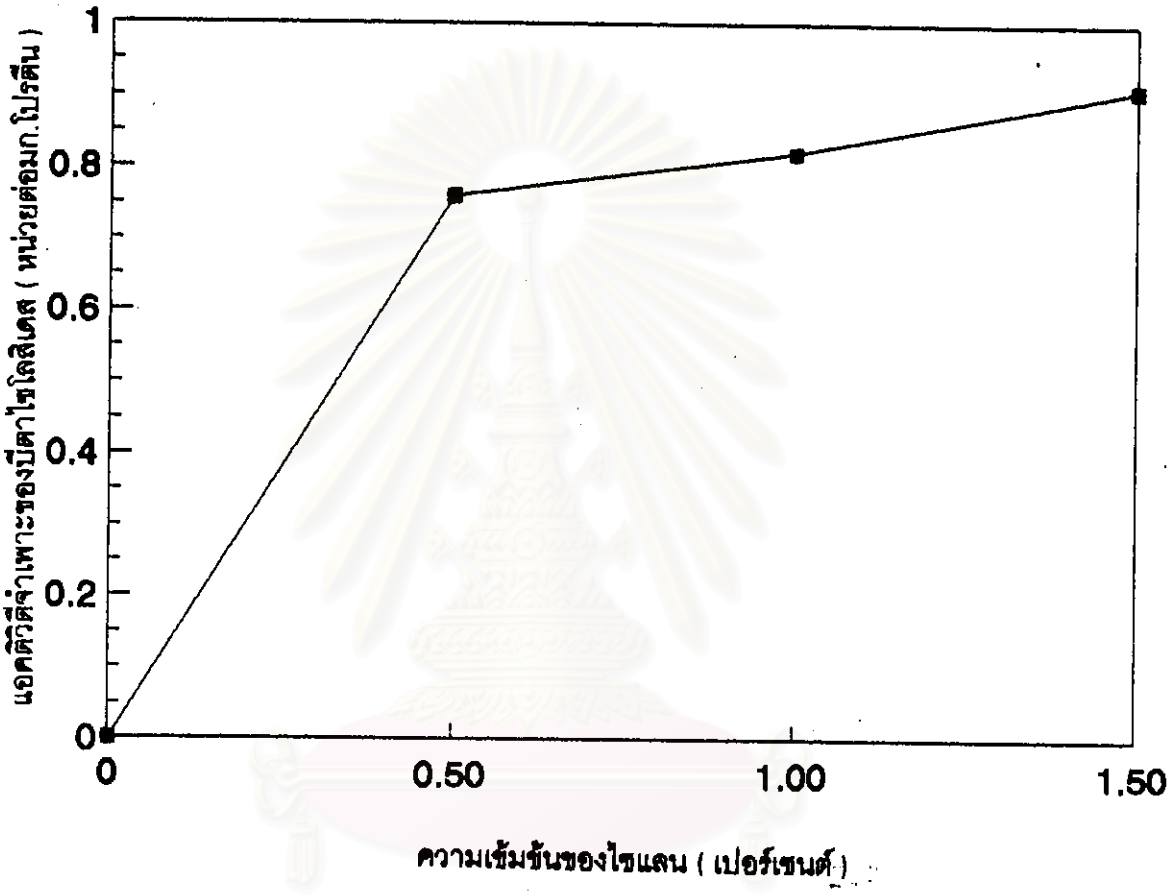
<u>ความสัมพันธ์ของระยะเวลาในการบ่มเชื้อและการสร้างบีตาไซโลสิเดสเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอน</u>

เนื่องจากกากเมล็ดฝ้ายเป็นวัตถุดิบที่ยังมีองค์ประกอบอื่นๆ ปะปนอยู่นอกเหนือจากไซแลน ดังนั้นในเบื้องต้นจึงต้องหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการบ่มเชื้อในอาหารที่มีกากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอนกับความสามารถในการสร้างบีตาไซโลสิเดส โดยในขั้นแรกจะใช้กากเมล็ดฝ้ายเข้มข้น 4.0 % เช่นเดียวกับการทดลองเบื้องต้นของการสร้างไซแลเนส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC 22

ผลการทดลองในรูปที่ 23 พบว่า *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 สามารถสร้างเอนไซม์บีตาไซโลสิเดสได้สูงสุด คือ 0.41 หน่วยต่อมก.โปรตีนที่ระยะเวลา 3 วัน ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปเมื่อใช้กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอนจะใช้เวลาในการบ่มเชื้อ 3 วัน

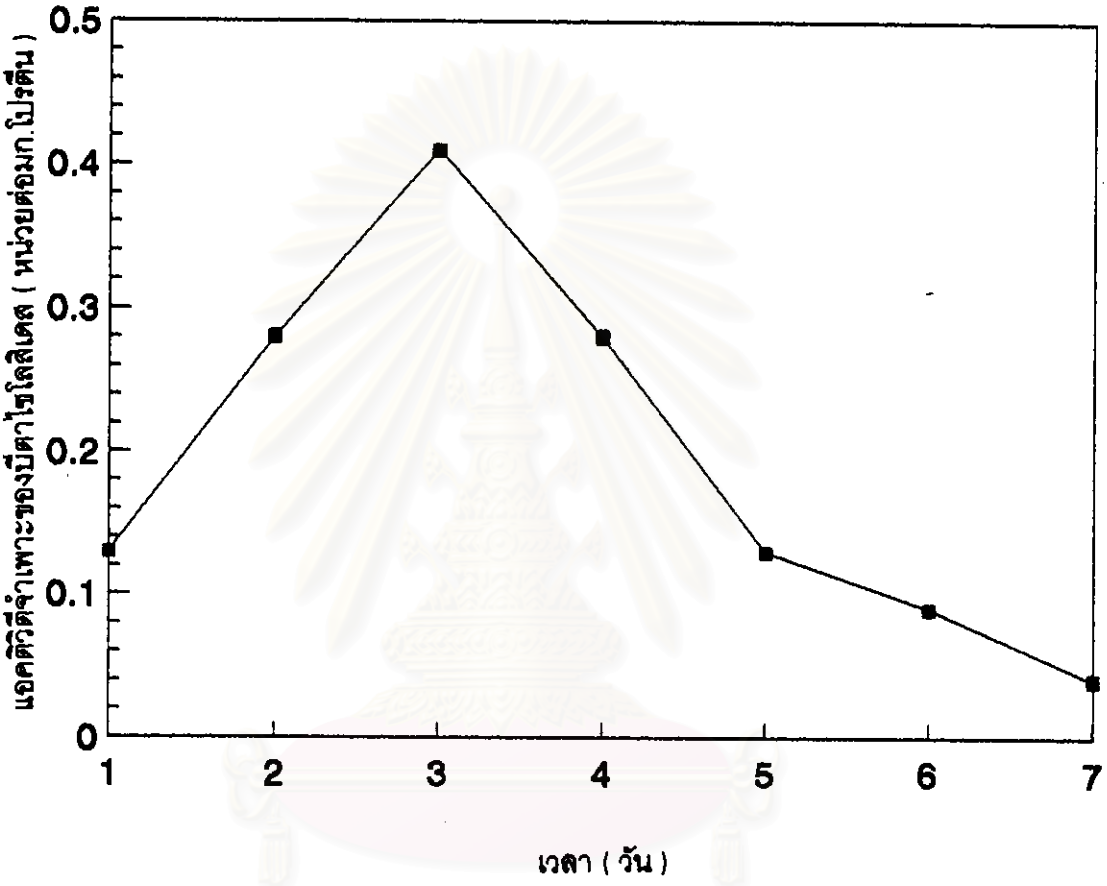
<u>ผลของความเข้มข้นของกากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างในการสร้างบีตาไซโลสิเดส</u>

ผลการแปรความเข้มข้นของกากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 0.5-



รูปที่ 22 ผลของปริมาณไซแลนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างบีตาไซโลสิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว มีปริมาณไซแลนในช่วงความเข้มข้น 0-1 % ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นเช่นเดียวกับที่กล่าวภายใต้รูปที่ 5 บ่มเขย่าที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 23 ผลของระยะเวลาต่อการสร้างบีตาไซโลสิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่มี 4.0 % กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นเช่นเดียวกับที่กล่าวภายใต้รูปที่ 5 บ่มเขย่าที่40 องศาเซลเซียล

5.0 % ดังแสดงในรูปที่ 24 พบว่า กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่าง 3.5-4.0 % ให้การผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดใกล้เคียงกัน คือ 0.48 หน่วยต่อมก.โปรตีน ขณะที่กากเมล็ดฝ้ายเข้มข้น 3.0 % ให้แอคติวิตีรองลงมาคือประมาณ 0.44 หน่วยต่อมก.โปรตีน แต่ที่ความเข้มข้นมากกว่า 4.0 % จะให้ผลการผลิตต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากการถ่ายเทอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดต่ำลงมากเมื่อปริมาณกากเมล็ดฝ้ายยิ่งสูงขึ้น

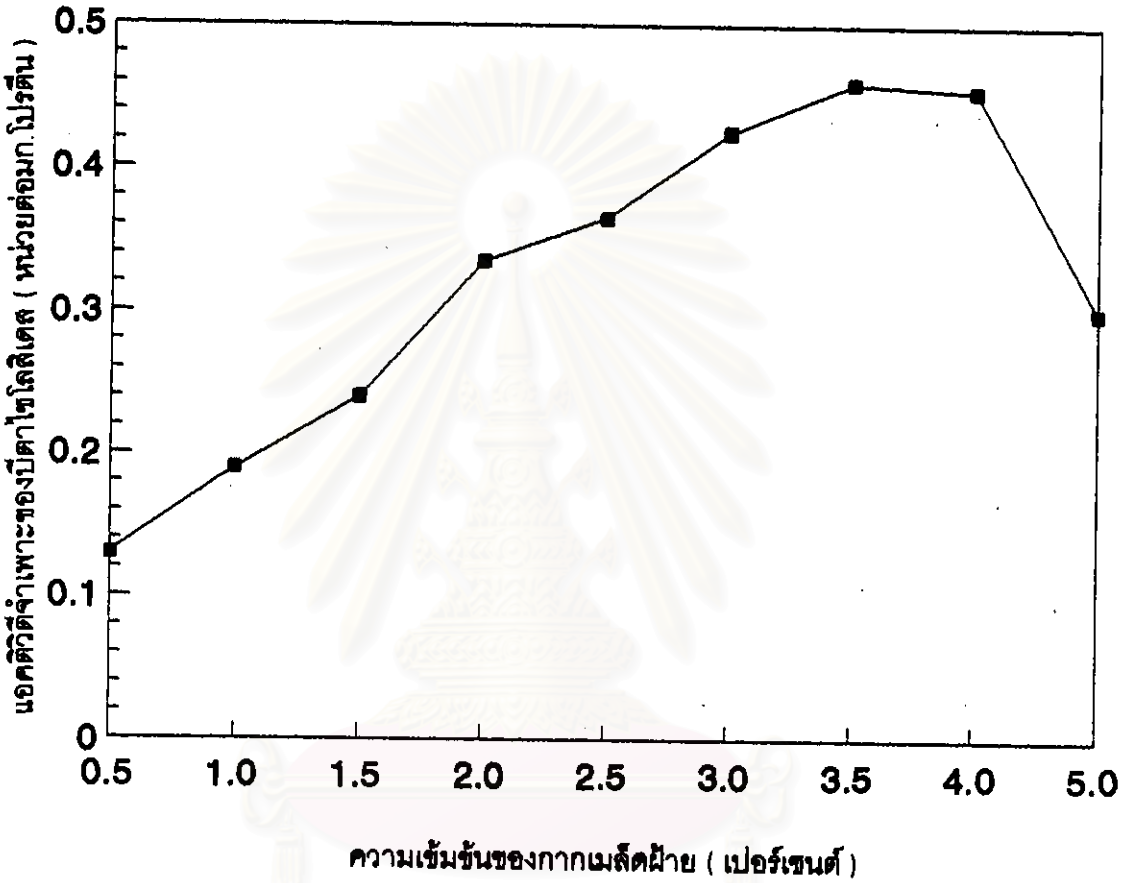
<u>ผลการเสริมไซแลนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี 3.0 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างบีตาไซโลสิเดส</u>

แม้ว่ากากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างบีตาไซโลสิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 ได้ แต่ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ก็ยังไม่สูงทัดเทียมกับการใช้ไซแลนเข้มข้น 1.00 % เป็นแหล่งคาร์บอน การทดลองในขั้นนี้จึงจะเสริมไซแลนที่ความเข้มข้นต่างๆลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเลือกใช้ความเข้มข้น 3.0 % ของกากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงรองลงมาจากการใช้กากเมล็ดฝ้ายเข้มข้น 3.5-4.0 % แต่พบว่าความข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่ามาก

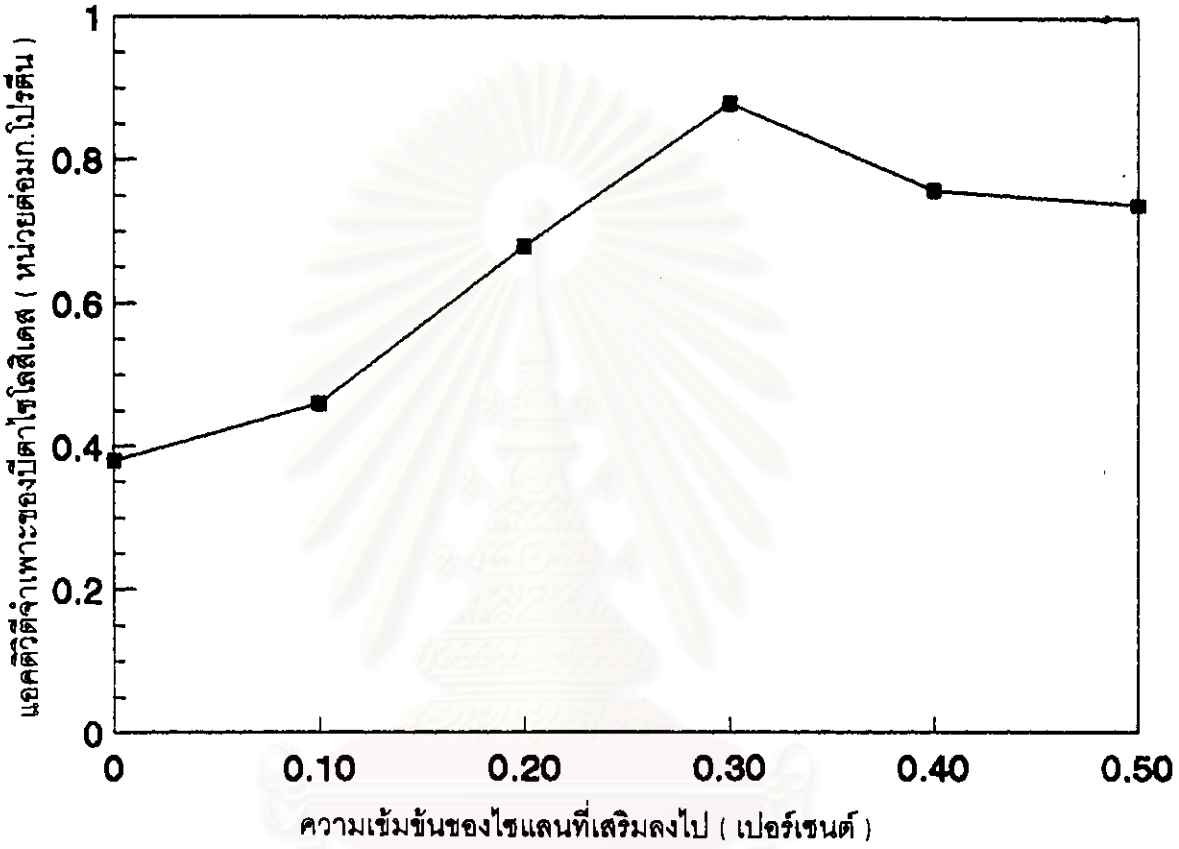
ผลการทดลองในรูปที่ 25 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากเมล็ดฝ้ายเข้มข้น 3.0 % และไซแลน 0.30 %ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดคือ 0.88 หน่วยต่อมก.โปรตีน

<u>ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างบีตาไซโลสิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7</u>

เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนเดิมที่ใช้คือ คอร์นสตีพ ลิเคอร์ และ พอลิเพปโตน มีราคาค่อนข้างแพง การทดลองนี้จึงจะใช้แหล่งไนโตรเจนราคาถูกหาได้ง่าย ได้แก่ กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรด (SBH) ผลการแปรความเข้มข้นของ SBH ในช่วง 0-3.00 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen content) เท่ากับ 0.45% เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน คอร์นสตีพ ลิเคอร์ และ พอลิเพปโตน ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 26 พบว่า 0.50 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) SBH ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน คอร์นสตีพ ลิเคอร์ และพอลิเพปโตน ได้ดีพอ คือ ให้บีตาไซโลสิเดสเพียง 0.37 หน่วยต่อมก.โปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่มี คอร์นสตีพ ลิเคอร์ และ พอลิเพปโตน เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะให้บีตาไซโลสิเดสสูงเท่ากับ 0.88 หน่วยต่อมก.โปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 25 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะเสริม

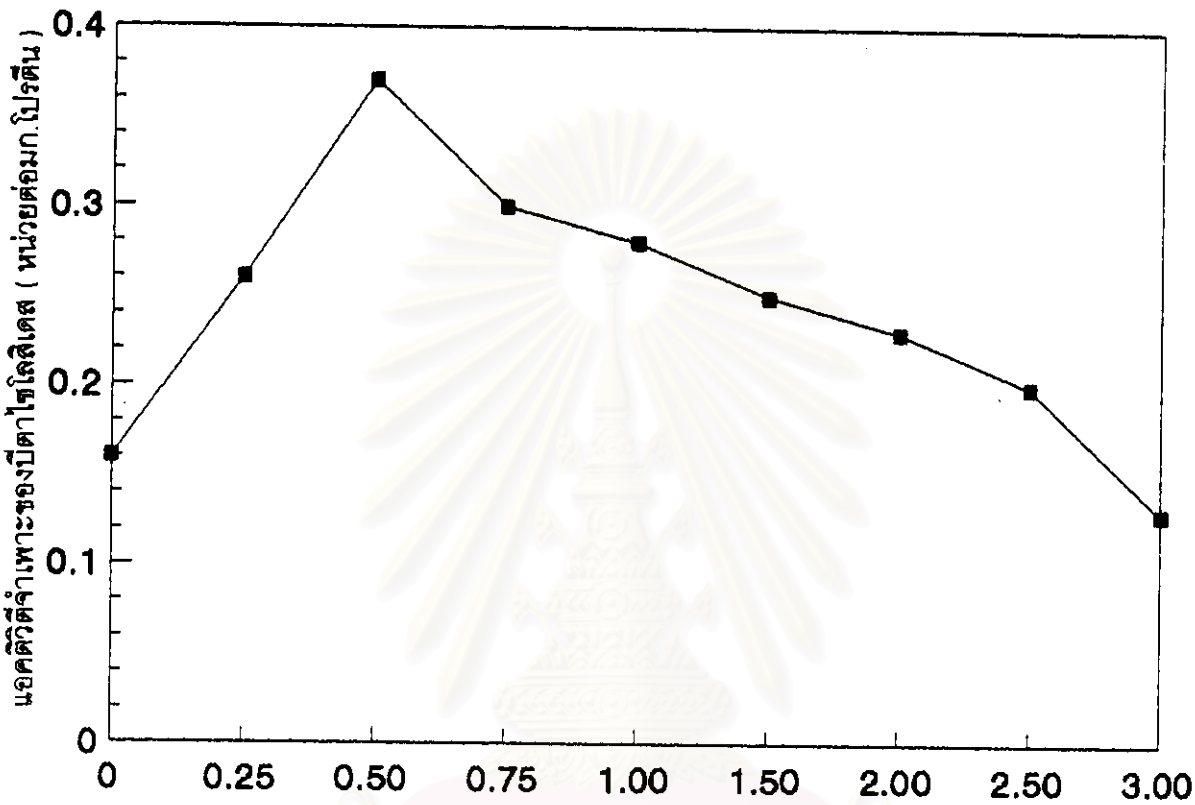


รูปที่ 24 ผลของปริมาณกากเมล็ดฝ้ายต่อการสร้างบีตาไซโลสิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 0.1 % สารกัดจากยีสต์ 0.5 % คอร์นสตีพลิเคอร์ 0.5 % พอลิเพปโตน 0.4 % ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจน-ฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.02 % โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.1 % แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7\ H_2O$) 0.002 % เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H\ O$)
แปรความเข้มข้นของกากเมล็ดฝ้าย 0.5-5.0 % ปรับความเป็นกรดด่างที่ 7.0 ที่อุณหภูมิ 40 เซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 25 ผลการเติมไซแลนเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 3.0 % กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างบีตาไซโลสิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นๆ และภาวะการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 24 เป็นเวลา 3 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 ผลการเติมกากถั่วเหลืองที่ย่อยแล้ว (soybean hydrolysate , SBH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อทดแทนการเติมคอร์นสตีพ ลิเคอร์ และ พอลิเพปโตน เพื่อสร้างบีตาไซโลสิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ 3.0 % กากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการแช่ด่างและ 0.3 % ไซแลนส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นๆ คือ 0.1 % สารกัดจากยีสต์ 0.4 % ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.02 % โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.1 % แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7\ H_2O$) 0.002 % เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ยกเว้นแปรปริมาณแหล่งไนโตรเจน ในช่วงความเข้มข้น 0-3.0 %
บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

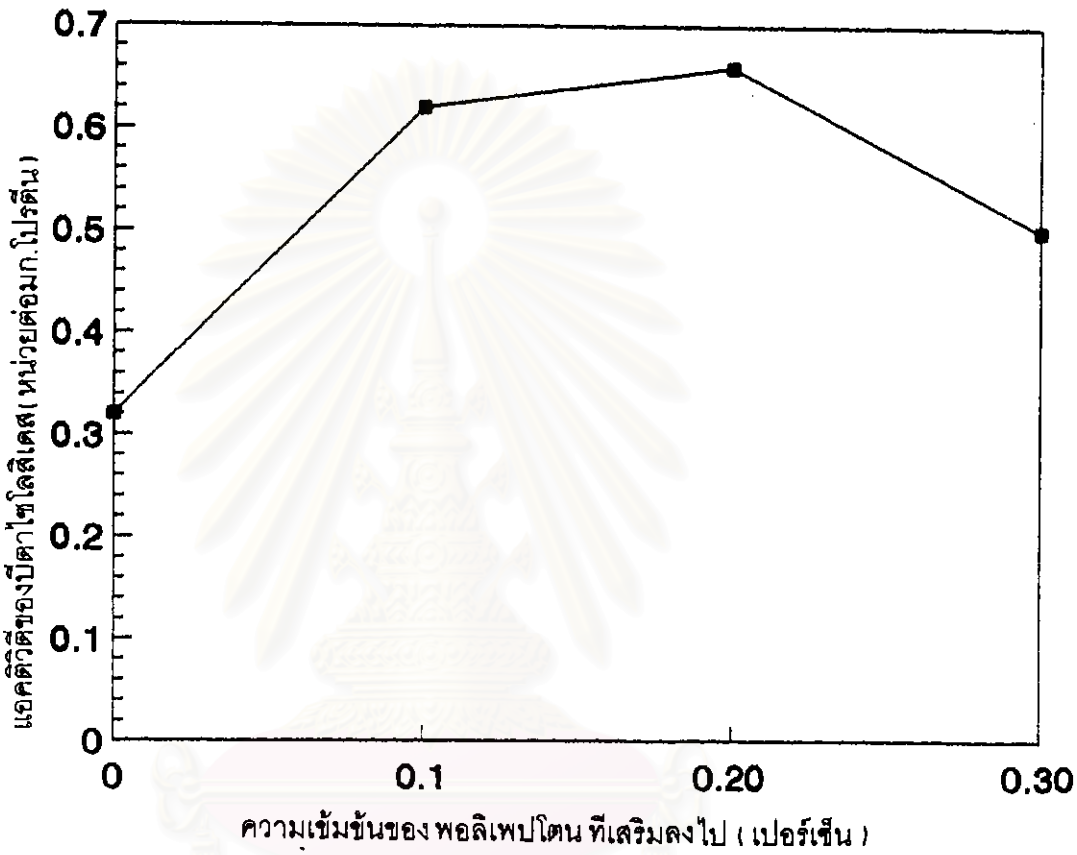
พอลิเพปโตน หรือ คอร์นสตีพ ลิเคอร์ อย่างใดอย่างหนึ่งที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารที่มี 3.0 % กากเมล็ดฝ้าย 0.30 % ไซแลน และ 0.50 % SBH ผลการทดลองในรูปที่ 27 พบว่า เมื่อเติมพอลิเพปโตนลงไป 0.1-0.2 % จะให้บีตาไซโลสิเดสสูงสุดประมาณ 0.64-0.66 หน่วยต่อมก. โปรตีน ขณะที่เมื่อเสริม คอร์นสตีพ ลิเคอร์ ลงไป 0.2 % จะได้บีตาไซโลสิเดสสูงสุดประมาณ 0.55 หน่วยต่อมก.โปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 28

นอกจากนั้นเมื่อได้ทำการทดลองเสริมแหล่งไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิดนี้ ร่วมกันโดยเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 3.0 % กากเมล็ดฝ้าย 0.10 % พอลิเพปโตน ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ ดังกล่าวในภาคผนวก ก ข้อ 3 จากนั้นแปรความเข้มข้นของ คอร์นสตีพ ลิเคอร์ ระหว่าง 0-0.3 % ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 29 พบว่าที่ความเข้มข้นคอร์นสตีพ ลิเคอร์ 0.2 % จะได้แอคติวิตีบีตาไซโลสิเดสสูงสุด คือ 0.80 หน่วยต่อ-มก. โปรตีน .

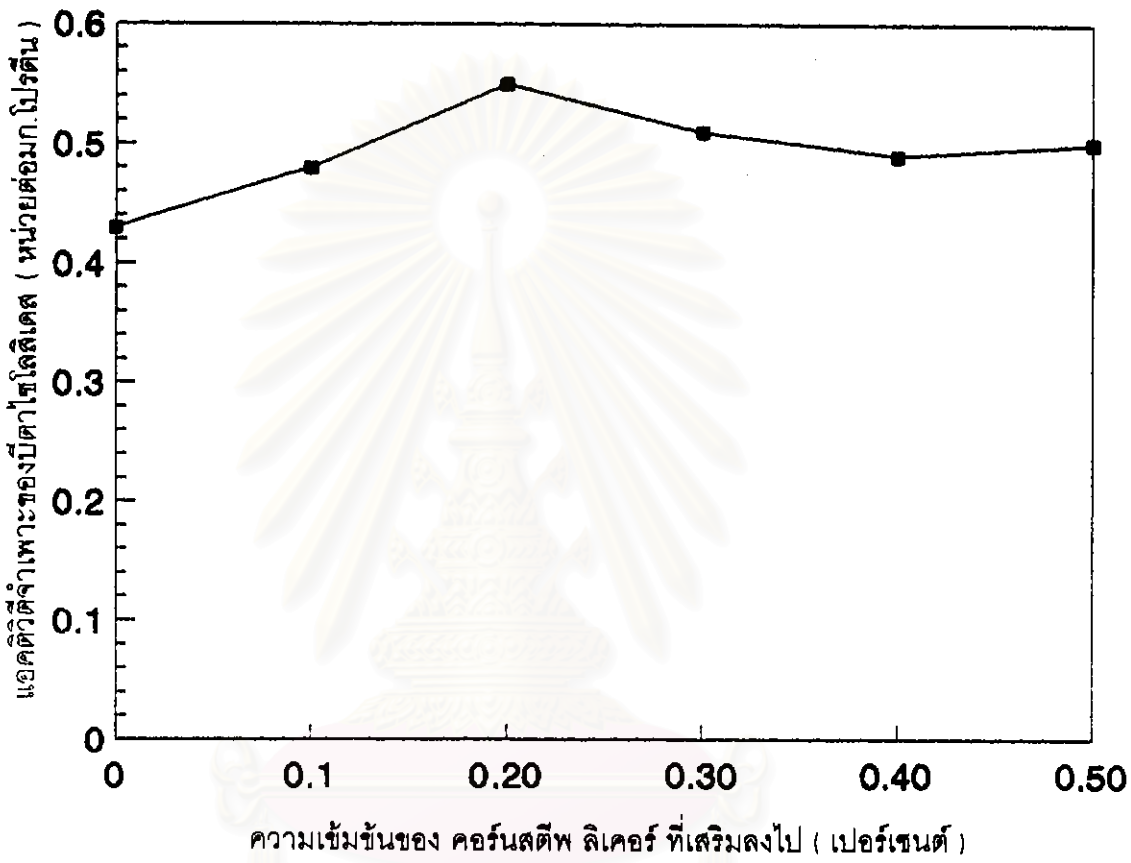
ดังนั้นงานวิจัยนี้พบว่าสูตรดัดแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างบีตาไซโลสิเดสคือ

กากเมล็ดฝ้าย	3.00	เปอร์เซนต์
ไซแลน	0.30	เปอร์เซนต์
กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรด (SBH)	0.50	เปอร์เซนต์
พอลิเพปโตน	0.10	เปอร์เซนต์
คอร์นสตีพ ลิเคอร์	0.20	เปอร์เซนต์
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.10	เปอร์เซนต์
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.40	เปอร์เซนต์
โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.02	เปอร์เซนต์
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	0.10	เปอร์เซนต์
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.002	เปอร์เซนต์

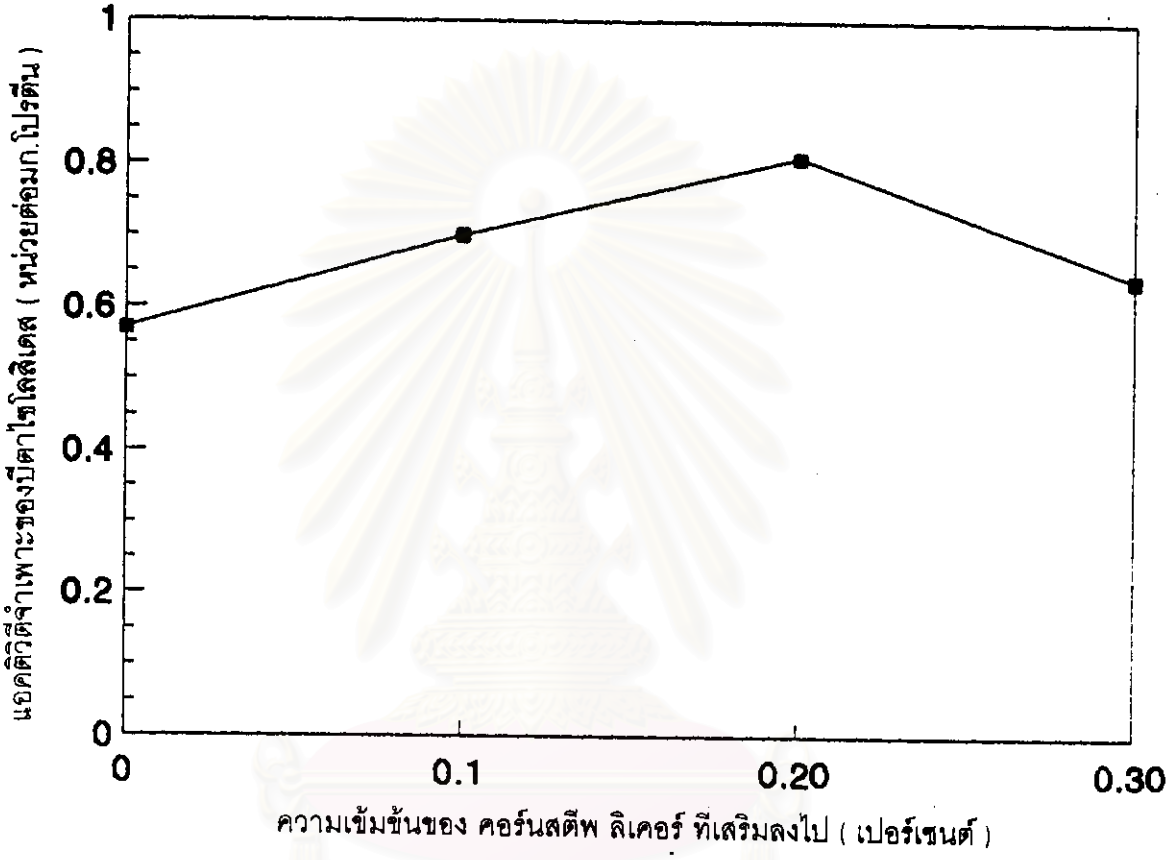
มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อคือบ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 27 ผลการเติมพอลิเพปโตนเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 3.0 % กากเมล็ดฝ้าย และ 0.3 % ไขแลนเป็นแหล่งคาร์บอน 0.5 % SBH เป็นแหล่งไนโตรเจนในการสร้างบีตาไซโลสิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นๆ และภาวะการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26 เป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 28 ผลการเติม คอร์นสตีพ ลิเคอร์ เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 3.0 % กากเมล็ดฝ้าย และ 0.3 % ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน 0.5 % SBH เป็นแหล่งไนโตรเจนในการสร้างบีตา-ไซโลสิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นๆ และภาวะการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26 เป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 29 ผลการแปรคอร์นสตีพ ลิเคอร์ เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 3.0 % กากเมล็ดฝ้าย 0.3 % ไซแลน และ 0.1 % พอลิเพปโตนเป็นแหล่งคาร์บอน 0.5 % SBH เป็นแหล่งไนโตรเจน ในการสร้างบีตาไซโลสิเดส โดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นๆ และภาวะการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26 เป็นเวลา 3 วัน

การศึกษาสมบัติของบีตาไซโลสิเดสโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7

นำบีตาไซโลสิเดสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมและเตรียมให้เข้มข้นตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 5.2 มาศึกษาสมบัติเบื้องต้นดังนี้

1. ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตาไซโลสิเดส

1.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตาไซโลสิเดส

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของบีตาไซโลสิเดส โดยทำการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิตั้งแต่ 35-70 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ 55 องศาเซลเซียสดังแสดงในรูปที่ 30 ดังนั้นในการวิเคราะห์แอคติวิตีครั้งต่อไปจะบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

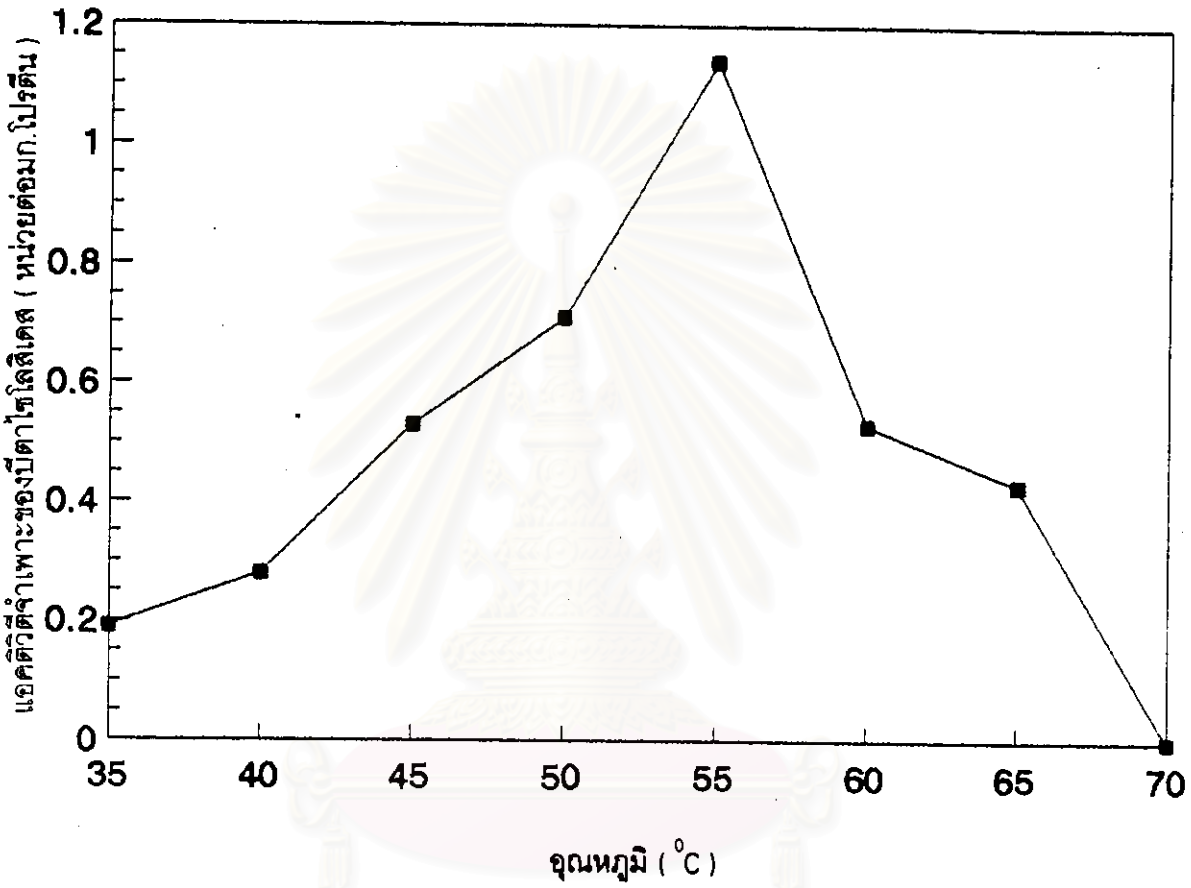
1.2 ผลความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของบีตาไซโลสิเดส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของ บีตาไซโลสิเดสโดยการทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4.0-9.5 พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตาไซโลสิเดสอยู่ที่ 6.5 ดังแสดงในรูปที่ 31 ดังนั้นในการวิเคราะห์แอคติวิตีครั้งต่อไปจะใช้ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5

2. ความเสถียรของบีตาไซโลสิเดส

2.1 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

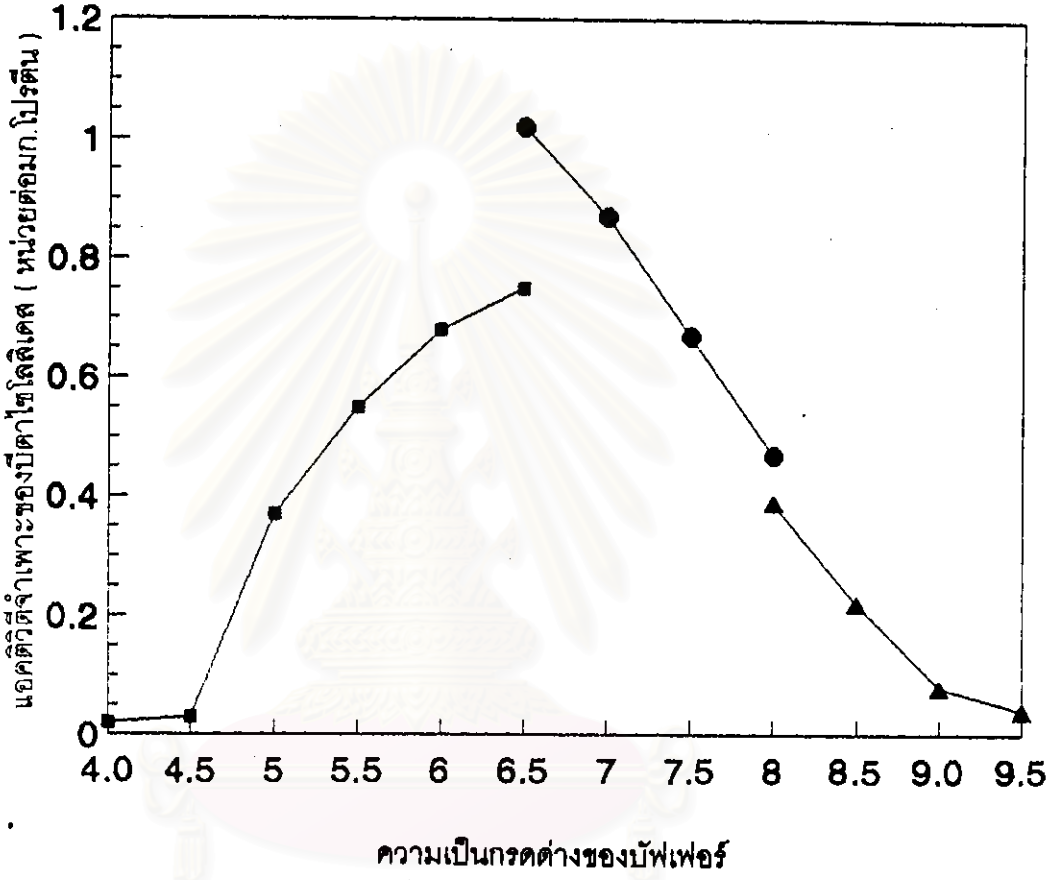
จากการตรวจสอบความเสถียรของบีตาไซโลสิเดสต่ออุณหภูมิ พบว่าบีตาไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH 7 เสถียรต่ออุณหภูมิได้ถึง 55 องศาเซลเซียส แต่แอคติวิตีของเอนไซม์ค่อยๆลดลง โดยลดลงเหลือประมาณ 50 % เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ สูญเสียแอคติวิตีเกือบสมบูรณ์เมื่ออุณหภูมิเพิ่มเป็น 65 องศาเซลเซียส



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 30 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของบีตาไซโลสิเดส ที่สร้างโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7

ตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 33 ยกเว้นบ่มเอนไซม์ 10.0 ไมโครกรัมโปรตีนที่อุณหภูมิต่างๆ ดังระบุในรูป



รูปที่ 31 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของบีตาไซโลสิเดส ที่สร้างโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 ตรวจหาแอคติวิตีโดยบ่มเอนไซม์ 10.0 ไมโครกรัมโปรตีนที่ภาวะดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 33 ยกเว้น 0.1 โมลาร์ ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ต่างๆ ดังระบุในรูป

- อะซิเทต บัฟเฟอร์
- ฟอสเฟต บัฟเฟอร์
- ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์

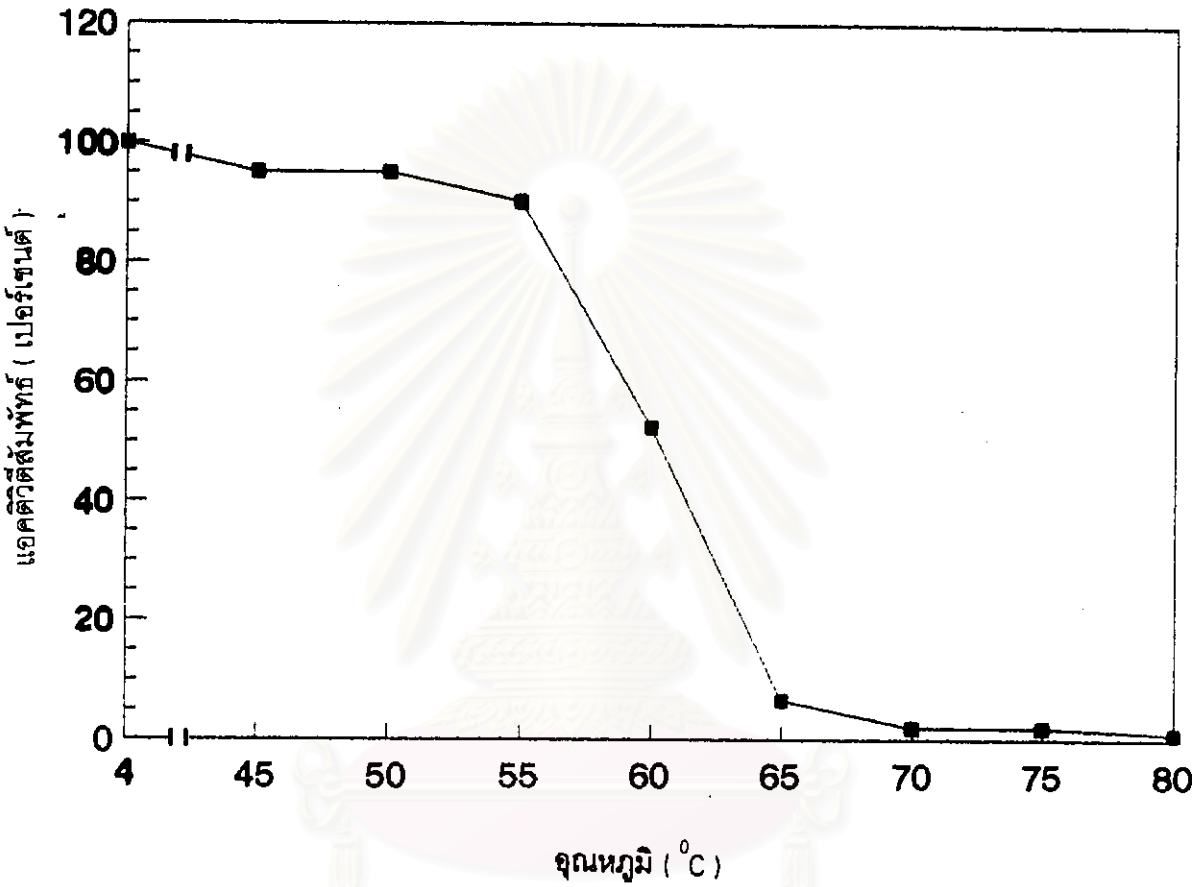
ดังแสดงในรูปที่ 32

2.2 ความเสถียรของบีตาไซโลสิเดสต่อความเป็นกรดด่าง

จากการตรวจสอบความเสถียรของบีตาไซโลสิเดสต่อความเป็นกรดด่าง พบว่า บีตาไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH 7 มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง pH 4.5-9.5 และถ้าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0 จะทำให้แอคติวิตีลดลงอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในรูปที่ 33

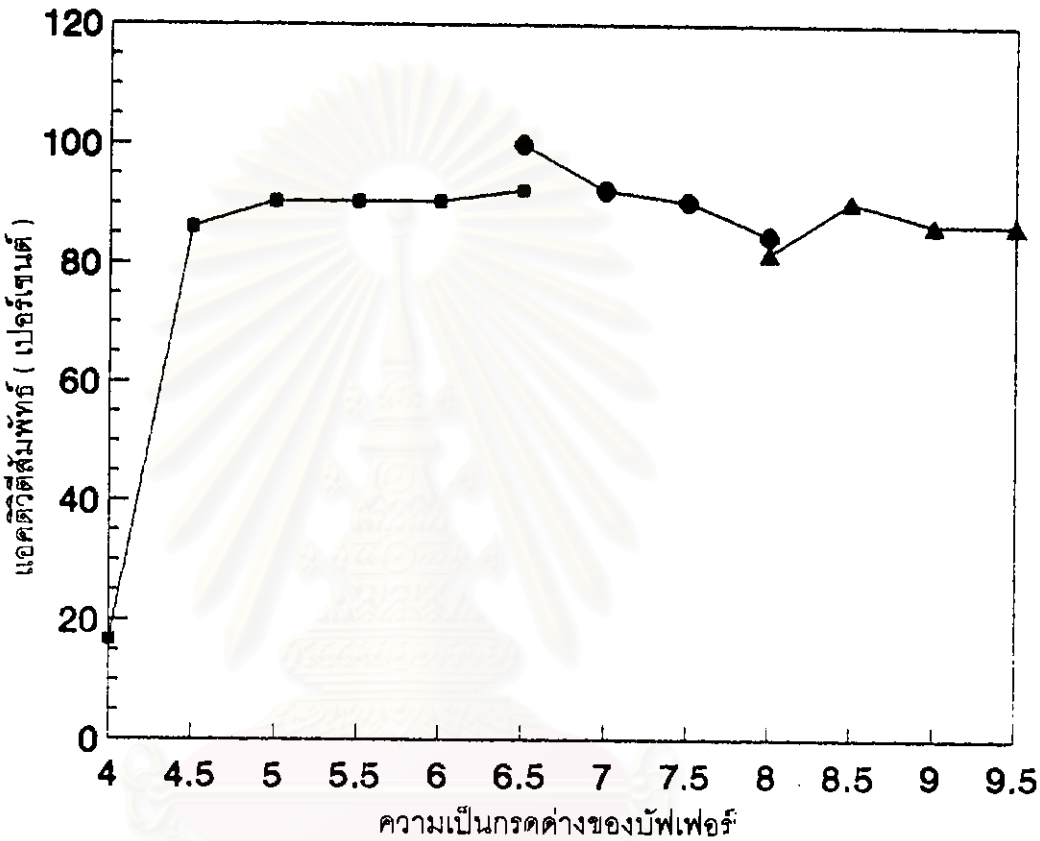
จากผลการศึกษาสมบัติของบีตาไซโลสิเดสที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. CH 7 ข้างต้น พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ 55 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 6.5 เอนไซม์บีตาไซโลสิเดสนี้ค่อนข้างเสถียรต่ออุณหภูมิไม่เกิน 55 องศาเซลเซียส และ มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงที่ศึกษาค่อนข้างกว้างคือ 4.5-9.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 32 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของบีตาไซโลสิเดสที่สร้างโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 ตรวจหาแอคติวิตีโดยบ่มเอนไซม์ที่ภาวะดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 33 โดยเทียบให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 33 ผลของความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ต่อความเสถียรของบีตาไซโลสิเดส ที่สร้างโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CH 7 ที่ภาวะดังกล่าวในบทที่ 2 หน้า 33 โดยเทียบให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100 %

ภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างไซแลเนสและบีตาไซโลสิเดสของ *Streptomyces* PC 22 และ*Streptomyces* CH 7 ในอาหารที่มี 1 % ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 8 และผลการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ทั้งสอง สามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 9 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 ภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างไซแลเนสและบีตาไซโลสิเดสของ *Streptomyces* PC 22 และ *Streptomyces* CH 7 ในอาหารที่มี 1 % ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

ภาวะในการเลี้ยงเชื้อ	*Streptomyces* spp.	
	Streptomyces PC 22	*Streptomyces* CH 7
1. ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	8.0-9.0	6.0-7.0
2. อุณหภูมิที่เหมาะสม	45 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส
3. เวลาที่เหมาะสม	2 วัน	1 วัน

ตารางที่ 9 ผลการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ไซแลเนสและบีตาไซโลสิเดส

สมบัติของเอนไซม์	ชนิดของเอนไซม์	
	ไซแลเนส	บีตาไซโลสิเดส
1. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน	55-70 องศาเซลเซียส	55 องศาเซลเซียส
2. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน	5.5-7.0	6.5
3. ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	60 องศาเซลเซียส มากกว่า 30 นาที	55 องศาเซลเซียส มากกว่า 30 นาที
4. ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	4.2-9.3	4.5-9.5