

การผลิตใช้เล่นเนตจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9



นางสาวกาญจนา วรวิทย์วัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974-568-377-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

013042

Production of Xylanase from Streptomyces sp. (strain 42-9)

Miss Kanjana Worawitwattana

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-568-377-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์
โดย
ภาควิชา
อาจารย์ที่ปรึกษา

การผลิตไฮเลนเนสจากสเตรปโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9
นางสาวกาญจนา วรวิทย์คณะ
จุลชีววิทยา
รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปันพานิชการ



บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

..... *ไพเราะ ปันพานิชการ* คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปันพานิชการ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... *ประภัสร์ สีนันทน์* ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภัสร์ สีนันทน์)

..... *ไพเราะ ปันพานิชการ* กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปันพานิชการ)

..... *สุมาลี พิษณุางกูร* กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิษณุางกูร)

..... *สุเทพ ธีรย์วัน* กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุเทพ ธีรย์วัน)



กาญจนา วรวิทย์วัฒนะ : การผลิตไซแลนเนสจากสเตรปโตมัยซีส สายพันธุ์

42-9 (PRODUCTION OF XYLANASE FROM STREPTOMYCES SP.

(STRAIN 42-9) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ไพเราะ ปันพานิชการ, 97 หน้า.

จากการตรวจหาความสามารถในการผลิตไซแลนเนส จากสเตรปโตมัยซีส 169 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย พบว่า สเตรปโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ปริมาณสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน และสเตรปโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 สามารถผลิตไซแลนเนสได้เมื่อเจริญในวัตถุดิบอื่น ๆ ที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เช่น กากรำข้าวและเปลือกเมล็ดฝ้าย แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไซแลนเนส จากการศึกษ พบว่า สารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการเพิ่มการผลิตไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนหรือเปลือกเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่กากรำข้าวที่ความเข้มข้น 5% เหมาะสมที่จะเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญของเชื้อและการผลิตไซแลนเนส สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลนเนสเมื่อเลี้ยงสเตรปโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าว 5% เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนคือที่ความเป็นกรดค้างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0-7.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จะได้ปริมาณไซแลนเนสสูงสุด 1.6-1.8 หน่วยต่อ มล. ของน้ำเลี้ยงเชื้อ ภายใต้สภาวะดังกล่าว

จากการศึกษาสมบัติของไซแลนเนสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า แอคติวิตีของไซแลนเนสสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในอะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 6.0 เอนไซม์ไซแลนเนสมีค่า Km สำหรับไซแลนจากเปลือกต้นโอ๊ตเท่ากับ 0.61 มก. ต่อ มล. ไซแลนเนสจะเสถียรในช่วงความเป็นกรดค้าง ค่อนข้างกว้างคือ 5-9 และที่อุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส แต่จะสูญเสียแอกติวิตีโดยสิ้นเชิงที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 30 นาที

จากการศึกษาการจัดหมวดหมู่ของ สเตรปโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 พบว่า มีลักษณะใกล้เคียงกับ Streptomyces craterifer และ Streptomyces afghaniensis แต่มีสมบัติบางประการที่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงยังไม่สามารถจำแนกชนิดของสเตรปโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ว่าเป็นชนิดใด



2

KANJANA WORAWITWATTANA : PRODUCTION OF XYLANASE FROM
STREPTOMYCES SP. (STRAIN 42-9) . THESIS ADVISOR : ASSO.PROF.
PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 97 PP.

One hundred and sixty nine strains of Streptomyces were isolated from different soil samples in Thailand and screened for their abilities to produce xylanase. Of all the isolates, Streptomyces sp. strain 42-9 showed the highest xylanase activity when cultivated in the medium containing xylan. This organism could also produce xylanase when cultured in a medium having xylan-containing materials such as rice bran and cottonseed hulls. However, xylanase was not detected when grown the organism in the medium having monosaccharides or disaccharides as a carbon source. The addition of yeast extract to the medium containing xylan or cottonseed hulls as a carbon source remarkably increased the enzyme production whereas 5% of rice bran was found suitable to be both carbon and nitrogen sources for both growth and xylanase production. The optimal conditions for the xylanase production when Streptomyces sp. strain 42-9 was grown in a medium with 5% of rice bran as both carbon and nitrogen sources were at the initial pH between 6.0-7.5, at 30°C for 2-3 days. Under these conditions, the maximal enzyme activity of 1.6-1.8 units/ml. was obtained.

The properties of xylanase were determined from the crude enzyme preparation obtained from ammonium sulfate precipitation. The maximal activity was observed at 55°C in acetate buffer, pH 6.0.

The apparent Km value of the enzyme for oat spelt xylan was 0.61 mg/ml. The enzyme is stable at a broad pH range of 5-9 and temperature upto 55°C but at 65°C its activity was completely lost within 30 minutes.

Taxonomic studies of Streptomyces sp. strain 42-9 showed closely characteristic and biochemical to those of Streptomyces craterifer and Streptomyces afghaniensis. However, some differences were also observed. Therefore, the species of this organism could not yet established.



กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปั้นพานิชการ
ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ แนวความคิด ตลอดจนช่วยเหลือวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ สุวิมล กิรติพิบูล ที่ได้เอื้อเฟื้อจุลินทรีย์บาง
สายพันธุ์มาใช้ในงานวิจัยและขอขอบพระคุณอาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ให้กำลังใจ
ใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณคำพูน คุณนุกร ที่ได้เอื้อเฟื้อภากร้าขาวและเปลือกเมล็ดฝ้ายมาใช้ใน
การวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ คุณสุนันหา คเชตนะนนท์ ที่ได้ให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือ
บางอย่าง ตลอดจนให้คำแนะนำเกี่ยวกับการเขียนวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ
ทุกคนที่เื้อมีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนในการวิจัยนี้
ตลอดจนขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกต่าง ๆ

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องที่สนับสนุนและให้กำลังใจ
ใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ฅ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ค
คำย่อ	ด
บทที่	
1 บทนำ	1
2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	19
3 ผลการวิจัย	30
4 การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย	71
เอกสารอ้างอิง	78
ภาคผนวก	85
ประวัติ	97

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไโซแลนเนส	7
2	สภาวะในการเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เพื่อผลิตไโซแลนเนส	12
3	สมบัติของไโซแลนเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ	15
4	สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไโซแลนเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	16
5	สายพันธุ์ของสเตรปโตมัยซีส์ที่ผลิตไโซแลนเนสได้สูงในสภาวะการตรวจสอบ เบื้องต้น	31
6	ผลของการเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในการผลิตไโซแลนเนส โดยสเตรปโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 42-9	33
7	ผลของชนิดและปริมาณของเกลือแร่ต่อการทำงานของเอนไซม์ไโซแลนเนส จากสเตรปโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 42-9	63
8	ลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของ สเตรปโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 42-9	68
9	ลักษณะสรีรวิทยา (Physiological characteristics) ของ สเตรปโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 42-9	69
10	ลักษณะการเจริญ (Culture characteristics) ของสเตรปโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 42-9	70
11	สภาวะและปัจจัยต่าง ๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ไโซแลนเนส จาก สเตรปโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 42-9	74
12	เปรียบเทียบแอกติวิตีของไโซแลนเนส จากสเตรปโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 42-9 กับจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่สามารถผลิตไโซแลนเนสได้	75
13	เปรียบเทียบการผลิต บีตา-ไฮโลสึเคส จากสเตรปโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 42-9 กับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 1% ของไโซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน..	76

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1. ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนีของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9.....	30
2. ผลของไซแลนหรือกากรำข้าวหรือเปลือกเมล็ดฝ้ายต่อการผลิตไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9	35
3. ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนหรือกากรำข้าวหรือเปลือก เมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอน	36
4. ผลของการเสริมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กากรำข้าวเป็นองค์ประกอบต่อการผลิตไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9	38
5. ผลของการเติมไซแลนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าว 5% เป็นแหล่ง คาร์บอนต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9	40
6. ผลของการเสริมแหล่งคาร์บอนด้วยเปลือกเมล็ดฝ้ายต่อการผลิตไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9	41
7. ผลของการเติมกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9	42
8. ผลของการเติม ไทโปดัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ลงในอาหาร เลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9	43
9. ผลของการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9	45
10. ผลของการเติมเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการ ผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9	46
11. ผลของการเติมโปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการ ผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9	47
12. ผลของการเติมแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
13. ผลของการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 42-9	50
14. ผลของการเติมโคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 42-9	51
15. ผลของความเป็นกรดต่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 42-9	52
16. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 42-9	54
17. ผลของระยะเวลาต่อการเจริญและการผลิตไซแลนเนส โดยสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 42-9	55
18. ผลของระยะเวลาต่อการผลิตเอนไซม์ บีตา-ไฮโลลิเอสโดยสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 42-9	56
19. ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส	58
20. การหาค่า K_m โดยวิธีของไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk).....	59
21. ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส	60
22. ผลของความเป็นกรดต่างต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส	61
23. ผลของความเสถียรของเอนไซม์ไซแลนเนสต่ออุณหภูมิ	64
24. ความเสถียรของเอนไซม์ไซแลนเนสต่อสภาวะความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ ..	65
25. ลักษณะส่ายโยอากาศและสเปกตรัมของสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 42-9 โดยกล้องจุลทรรศน์	67
26. ลักษณะผิวสเปกตรัมของสเตรปโตมัยซิส สายพันธุ์ 42-9 โดยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแมมโบสแกน	67

คำย่อ

- มล. = มิลลิลิตร
- มก. = มิลลิกรัม
- ก. = กรัม