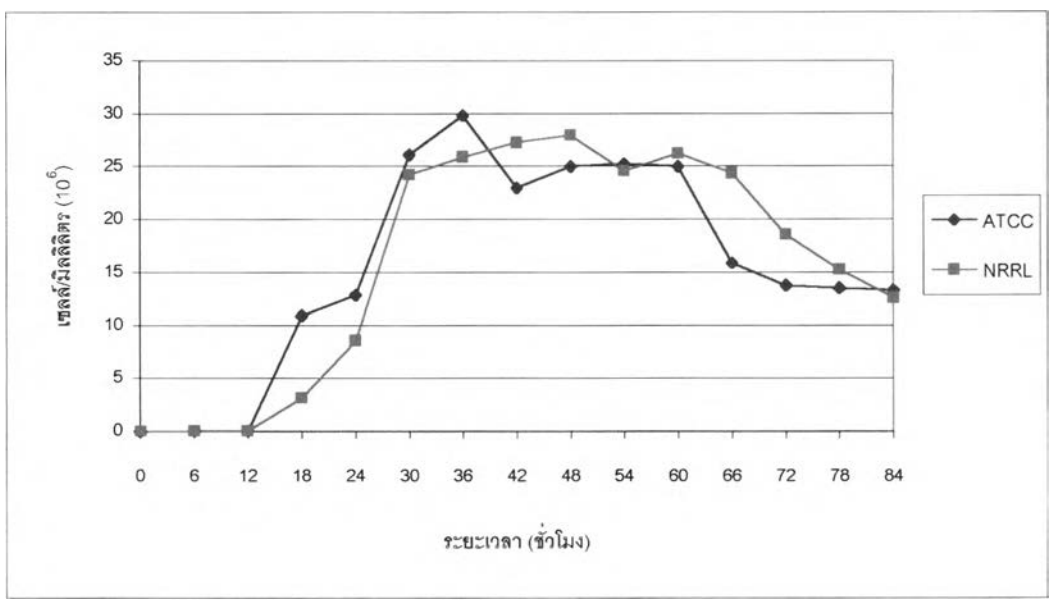
บทที่ 4

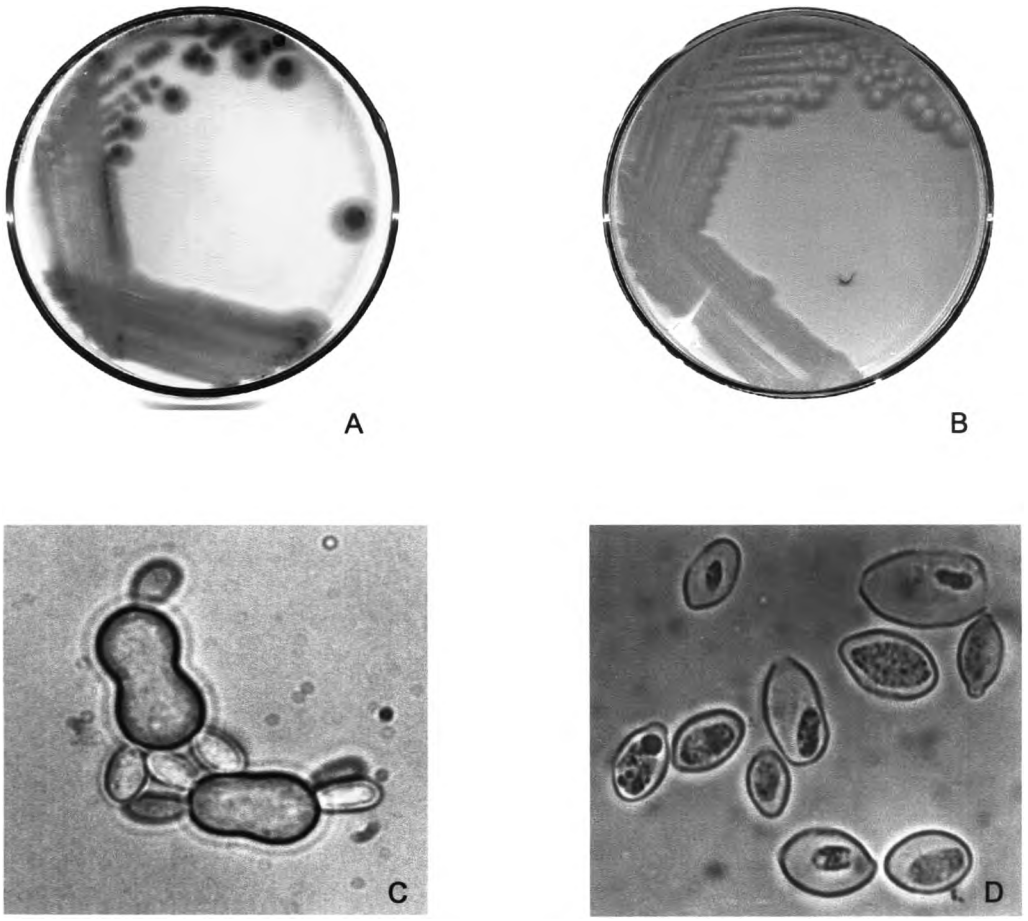
ผลการทดลอง

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. pullulans*

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* 2 สายพันธุ์ ในอาหารสูตรเพื่อการเจริญเป็นเวลา 84 ชั่วโมง เก็บผลโดยการนับจำนวนโคโลนีทุกๆ 6 ชั่วโมง พบว่า สายพันธุ์ ATCC ในระยะ 12 ชั่วโมงแรกเชื้อจะมีการเพิ่มจำนวนอย่างช้าๆ หลังจากชั่วโมงที่ 12 ก็เริ่มมีการเพิ่มจำนวน อย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 36 จำนวนเซลล์สูงสุดนับได้ 29.83 x 10^6 โคโลนี ต่อมิลลิลิตร และจำนวนเซลล์เริ่มคงที่ช่วงระยะชั่วโมงที่ 36 - 60 จากนั้นจำนวนโคโลนีเริ่มลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 84 ส่วนสายพันธุ์ NRRL จำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 12 มีจำนวนโคโลนีสูงสุดชั่วโมงที่ 48 มีจำนวนโคโลนี 28 x 10^6 โคโลนี ต่อมิลลิลิตร จำนวนโคโลนีคงที่ จนถึงชั่วโมงที่ 66 จากนั้นจึงเริ่มลดลง (ภาพที่ 7) จากผลที่ได้ ทำให้ทราบระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยง *A. pullulans* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ในอาหารสูตรเพื่อการเจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อใช้ในการเป็นหัวเชื้อในทุกๆการทดลองต่อมา



ภาพที่ 7 การเจริญเติบโตของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC และ NRRL



ภาพที่ 8 เชื้อ *Aureobasidium pullulans*

A) ลักษณะโคโลนี *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC

B) ลักษณะโคโลนี *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL

C) ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC (x420)

D) ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL (x420)

2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* เพื่อผลิตไซแลนเนส

2.1 การศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม

จากผลการทดลองเลี้ยง *A. pullulans* ในสูตรอาหาร Production ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก) เพื่อหาความสามารถในการผลิตไซแลนเนสในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารต่างกัน 3 ระดับ คือ 4.0 5.0 และ 6.0 พบว่า ค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดคือ 5.0 รองลงมาคือ 4.0 และ 6.0 ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดย สายพันธุ์ ATCC ให้ค่าหน่วยของเอนไซม์ (unit of enzyme)เท่ากับ 22.48 U/ml ส่วนสายพันธุ์ NRRL ให้ค่าหน่วยของเอนไซม์เท่ากับ 23.99 U/ml ซึ่งเป็นค่า หน่วยของเอนไซม์ที่สูงสุด ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อดังแสดงในตารางที่ 2 -3 และภาพที่ 9 –10

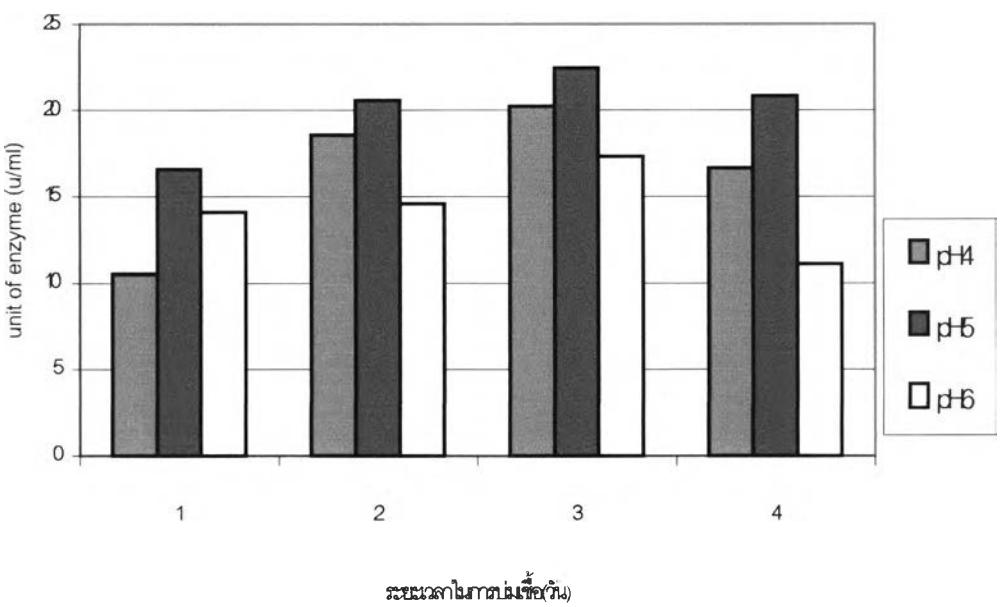
2.2. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมค่าเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จึงนำมาศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลนเนสใน *A. pullulans* ทั้ง2 สายพันธุ์ โดยบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิต่างกัน 4 ระดับ คือ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับทั้งสองสายพันธุ์ คือ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาเป็น 25 35 40 ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ ATCC ให้ค่าหน่วยของเอนไซม์เท่ากับ 22.47 14.10 6.97 และ 3.66 U/ml ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ NRRL ให้ค่าหน่วยของเอนไซม์เท่ากับ 23.99 11.91 3.51 และ 5.90 U/ml ดังแสดงในตารางที่ 4-5 และภาพที่ 11-12

ตารางที่ 2 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

pH เริ่มต้น	หน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนส (u/ml)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
4.0	10.53^{f}	18.61^{bc}	20.24^{ab}	16.66^{cde}
5.0	16.62^{cde}	20.60^{ab}	22.47^{a}	20.83^{ab}
6.0	14.09^{e}	14.60^{de}	17.32^{cd}	11.09^{f}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยหน่วยของเอนไซม์ของไซแลน-เนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

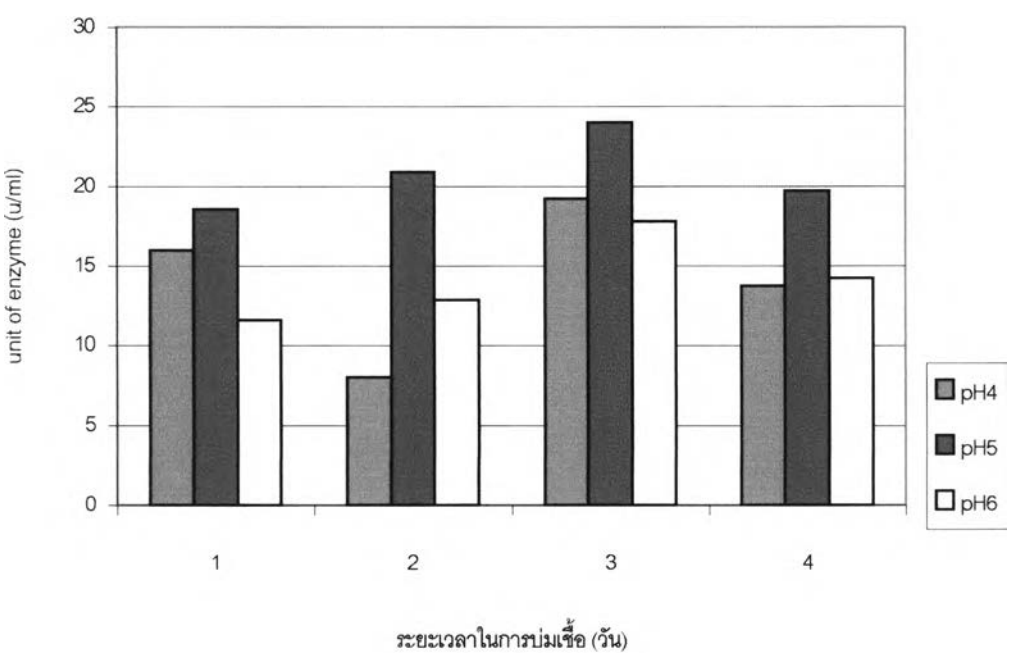


ภาพที่ 9 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

ตารางที่ 3 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

pH เริ่มต้น	หน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนส (u/ml)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
4.0	15.98^{e}	7.99^{h}	19.19^{bcd}	13.71^{f}
5.0	18.54^{cd}	20.88^{b}	23.99^{a}	19.68^{bc}
6.0	11.58^{g}	12.83^{fg}	17.77^{d}	14.23^{f}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยหน่วยของเอนไซม์ของไซแลน-เนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

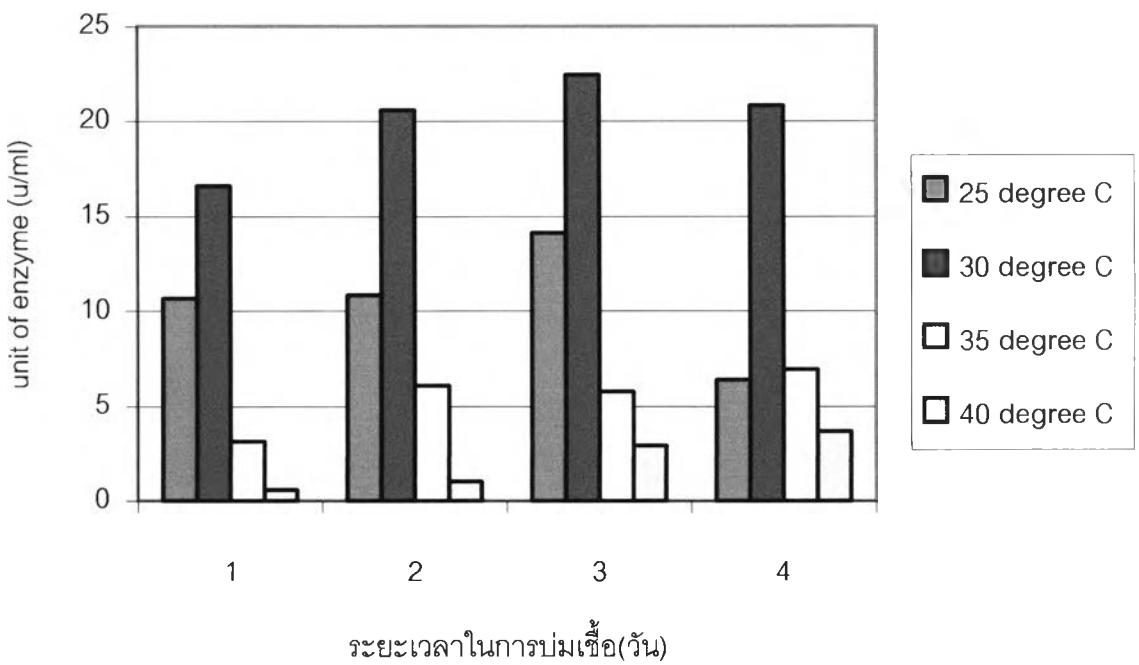


ภาพที่ 10 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

ตารางที่ 4 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิต่างๆกัน

อุณหภูมิ (°C)	หน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนส (u/ml)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
25	10.66^{e}	10.85^{e}	14.10^{d}	6.39^{f}
30	16.65^{c}	20.60^{b}	22.47^{a}	20.83^{b}
35	3.12^{g}	6.06^{f}	5.78^{f}	6.97^{f}
40	0.59^{h}	1.06^{h}	2.93^{g}	3.66^{g}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยหน่วยของเอนไซม์ของไซแลน-เนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

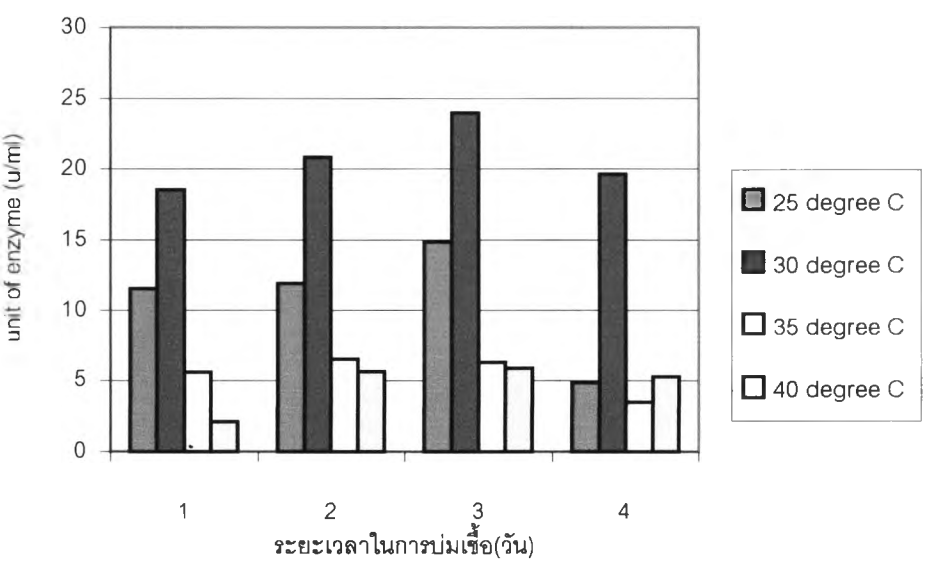


ภาพที่ 11 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิต่างๆกัน

ตารางที่ 5 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิต่างๆกัน

อุณหภูมิ (°C)	หน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนส (u/ml)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
25	11.58^{e}	11.94^{e}	14.91^{d}	4.91^{gh}
30	18.54^{c}	20.88^{b}	23.99^{a}	19.68^{bc}
35	5.62^{fg}	6.57^{f}	6.30^{fg}	3.51^{hi}
40	2.14^{i}	5.69^{fg}	5.90^{fg}	5.30^{fg}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยหน่วยของเอนไซม์ของไซแลน-เนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ



ภาพที่ 12 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิต่างๆกัน

2.3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

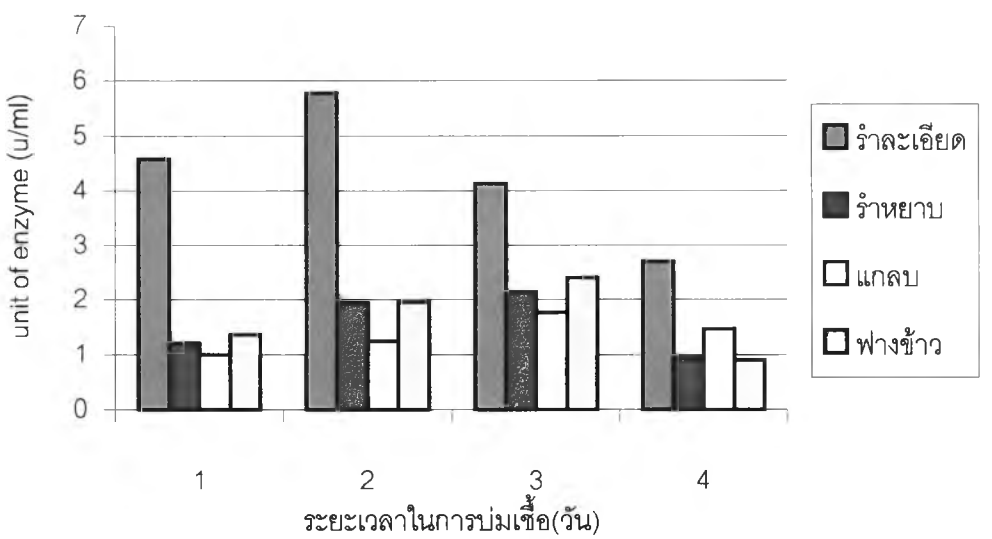
เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมของค่า pHเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิแล้วจึงนำมาศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลนเนส โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุทางการเกษตร 4 ชนิด คือ รำละเอียด รำหยาบ แกลบ และฟางข้าว พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ให้ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสมากที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีรำละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน โดยที่แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมรองลงมาเป็น ฟางข้าว รำหยาบ และแกลบ ค่าหน่วยของเอนไซม์เท่ากับ 5.79 2.42 2.15 และ 1.77 U/ml ตามลำดับ สำหรับสายพันธุ์ NRRL พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดคือ ฟางข้าว รองลงมาเป็นรำหยาบ รำละเอียด และแกลบ มีค่า หน่วยของเอนไซม์เท่ากับ 3.68 2.72 2.07 และ 1.67 U/ml ตามลำดับ ดังแสดง ในตารางที่ 6-7 และภาพที่ 13-14

จากผลการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจึงเลือกรำละเอียดและฟางข้าวมาหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลนเนสต่อไป โดยใช้ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สายพันธุ์ ATCC ให้ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในรำละเอียด 3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 2 4 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่าหน่วยของเอนไซม์เท่ากับ 6.97 5.79 4.91 4.06 และ 2.81 U/ml ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ NRRL พบว่าความเข้มข้นของฟางข้าวที่เหมาะสมที่สุดคือ 4 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น 5 3 2 และ 1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยให้ค่า หน่วยของเอนไซม์เท่ากับ 7.18 4.63 4.06 3.78 และ 3.68 U/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8-9 และภาพที่ 15-16 จากตารางที่ 10 เมื่อนำค่าหน่วยของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยง *A. pullulans* ทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะที่เหมาะสมข้างต้นมาเปรียบเทียบกันทางสถิติพบว่าค่าหน่วยของเอนไซม์สูงสุดที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 6 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ใน อาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ

แหล่งคาร์บอน	หน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนส (u/ml)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
รำละเอียด	4.59^{b}	5.79^{a}	4.13^{b}	2.71^{c}
รำหยาบ	1.22^{f}	1.95^{de}	2.15^{cd}	0.94^{f}
แกลบ	0.99^{f}	1.25^{f}	1.77^{de}	1.48^{ef}
ฟางข้าว	1.36^{f}	1.96^{de}	2.42^{cd}	0.91^{f}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยหน่วยของเอนไซม์ของไซแลน-เนส ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนต่างๆ แตก ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

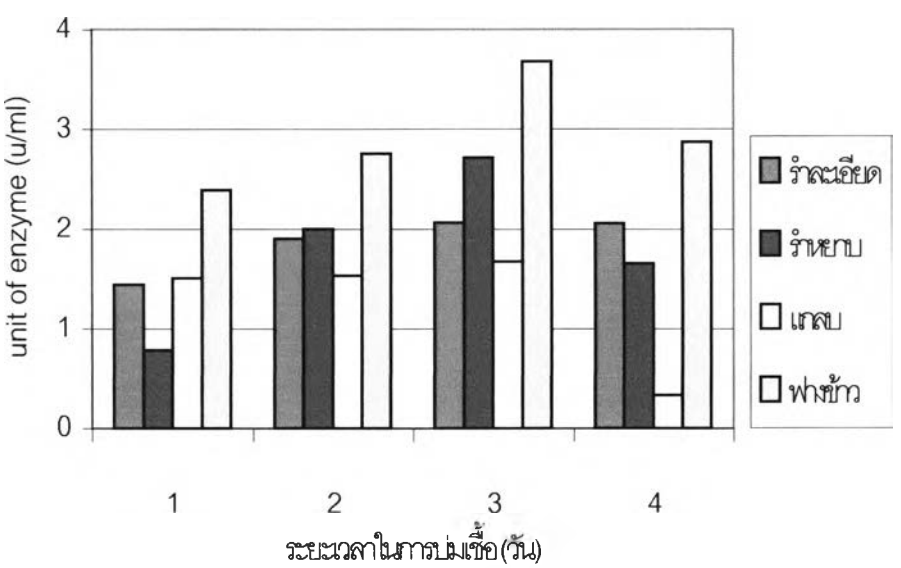


ภาพที่ 13 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ใน อาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ

ตารางที่ 7 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ

แหล่งคาร์บอน	หน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนส (u/ml)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
รำละเอียด	1.45^{f}	1.90^{de}	2.07^{d}	2.05^{d}
รำหยาบ	0.78^{g}	1.99^{d}	2.72^{b}	1.65^{ef}
แกลบ	1.50^{f}	1.53^{f}	1.67^{ef}	0.34^{h}
ฟางข้าว	2.39^{c}	2.75^{b}	3.68^{a}	2.88^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยหน่วยของเอนไซม์ของไซแลน-เนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

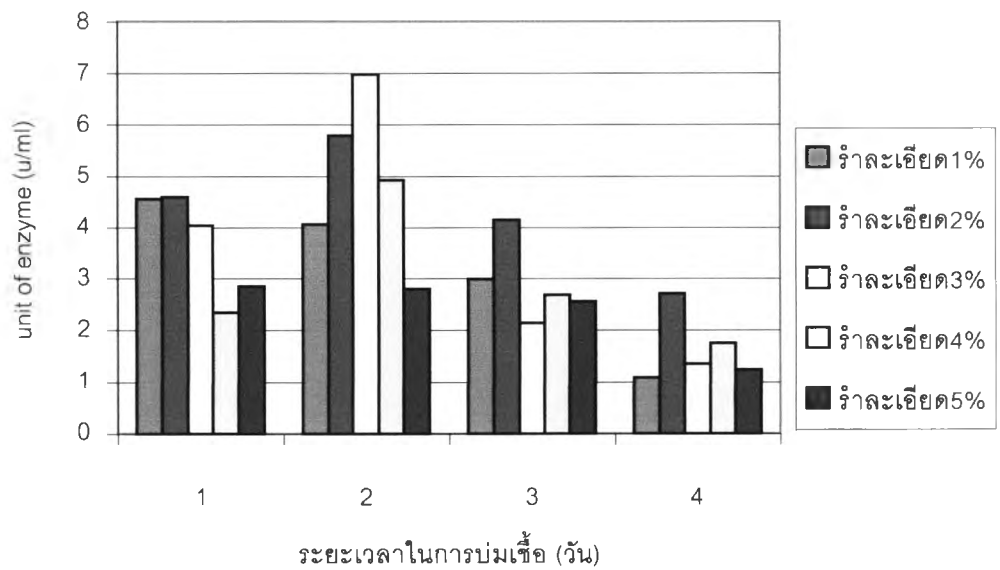


ภาพที่ 14 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ

ตารางที่ 8 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงโดยใช้รำละเอียดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

รำละเอียด (%)	หน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนส (u/ml)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
1	4.54^{b}	4.06^{b}	2.99^{c}	1.09^{f}
2	4.59^{b}	5.79^{ab}	4.13^{b}	2.71^{c}
3	4.03^{b}	6.97^{a}	2.15^{cde}	1.36^{ef}
4	2.34^{cd}	4.91^{b}	2.68^{c}	1.76^{def}
5	2.86^{c}	2.81^{c}	2.56^{cd}	1.23^{f}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยหน่วยของเอนไซม์ของไซแลน-เนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC โดยใช้รำละเอียดที่ความเข้มข้นต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

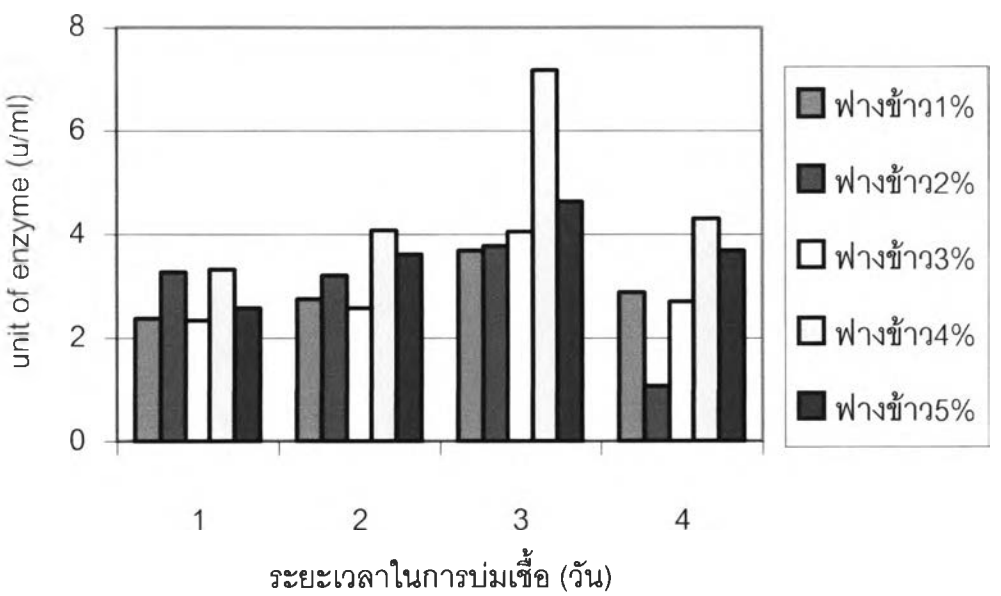


ภาพที่ 15 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงโดยใช้รำละเอียดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 9 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRLในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงโดยใช้ฟางข้าวที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน

ฟางข้าว (%)	หน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนส (u/ml)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
1	2.39^{k}	2.75^{jk}	3.68^{efg}	2.88^{ij}
2	3.28^{ghi}	3.21^{hi}	3.78^{def}	1.06^{l}
3	2.34^{j}	2.59^{jk}	4.06^{cde}	2.71^{jk}
4	3.32^{fgh}	4.09^{cd}	7.18^{a}	4.31^{bc}
5	2.59^{jk}	3.62^{fgh}	4.63^{b}	3.68^{d-g}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยหน่วยของเอนไซม์ของไซแลน-เนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL โดยใช้ฟางข้าวที่ความเข้มข้นต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ



ภาพที่ 16 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRLในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงโดยใช้ฟางข้าวที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC และ NRRLในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมความเข้มข้นต่างๆ

แหล่งของคาร์บอน (%)	หน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนส (u/ml)							
	สายพันธุ์ ATCC				สายพันธุ์ NRRL			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
1	4.54^{cd}	4.06^{de}	2.99^{j-l}	1.09^{o}	2.39^{klm}	2.75^{i-l}	3.68^{e-h}	2.88^{i-l}
2	4.59^{cd}	5.79^{b}	4.13^{de}	2.71^{i-l}	3.28^{g-j}	3.21^{g-j}	3.78^{efg}	1.06^{o}
3	4.03^{def}	6.97^{a}	2.15^{lm}	1.36^{no}	2.34^{klm}	2.59^{i-l}	4.06^{de}	2.71^{i-l}
4	2.34^{klm}	4.91^{c}	2.68^{i-l}	1.76^{mn}	3.32^{f-i}	4.09^{de}	7.18^{a}	4.31^{cde}
5	2.86^{i-l}	2.81^{i-l}	2.56^{jkl}	1.23^{no}	2.59^{i-l}	3.62^{e-h}	4.63^{cd}	3.68^{e-h}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยหน่วยของเอนไซม์ของไซแลน-เนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สองสายพันธุ์ โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมความเข้มข้นต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

3. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

เลี้ยง *A. pullulans* 2 สายพันธุ์ในภาวะที่เหมาะสมของค่า pHเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ในปริมาณมากขึ้นเพื่อผลิตไซแลนเนสให้มีปริมาณมาก จากการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนส พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยในสายพันธุ์ ATCC มีค่าหน่วยของเอนไซม์เท่ากับ 26.47 U/ml จากเริ่มต้น 5.62 U/ml สูงขึ้น 5.17 เท่า ส่วนในสายพันธุ์ NRRL หลังจากตกตะกอนแล้ว มีค่าหน่วยของเอนไซม์เท่ากับ 31.92 U/ml จากเริ่มต้น 6.98U/ml สูงขึ้น 4.86 เท่า (ตารางที่ 11)

I19938123

ตารางที่ 11 ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC และ NRRL ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

สายพันธุ์	หน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนส (u/ml)		purification
	Crude enzyme	$(NH_4)_2SO_4$ precipitation	(fold)
ATCC	5.62	26.47	5.17
NRRL	6.98	33.92	4.86

4 การฟอกเยื่อกระดาษด้วยไซแลนเนส

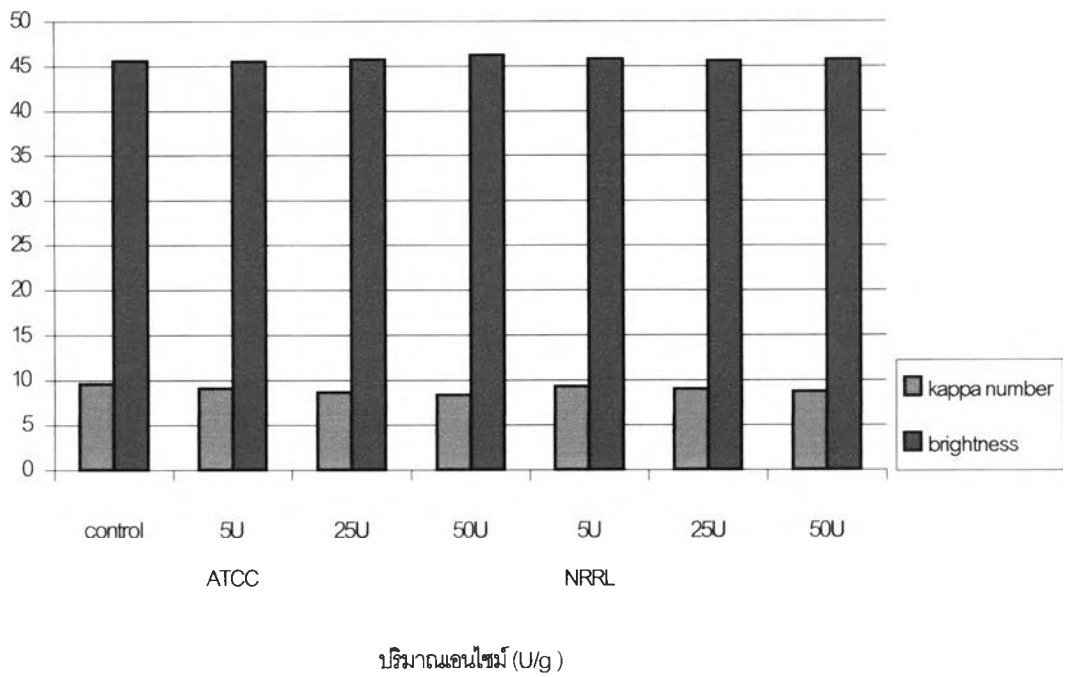
เมื่อนำเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนแล้วมาฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับคือ 5 25 และ 50 IUต่อน้ำหนักของเยื่อกระดาษ 1 กรัม จากนั้นนำเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์ไปวัดค่าความขาวสว่างและค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อ พบว่าในแต่ละการทดลองค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อกระดาษจะลดลงตามความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นทั้งเอนไซม์ที่มาจากสายพันธุ์ ATCC และสายพันธุ์ NRRL โดยค่าคัปปานัมเบอร์ที่ดีที่สุดคือ 8.33 ได้จากการใช้ไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ปริมาณ 50 IUต่อน้ำหนักของเยื่อกระดาษ 1 กรัม ขณะที่การทดลองที่ใช้ไซแลนเนสจากสายพันธุ์ NRRL ได้ค่าคัปปานัมเบอร์ 8.7333 เมื่อใช้เอนไซม์ปริมาณ 50 IUต่อน้ำหนักของเยื่อกระดาษ 1 กรัม เมื่อเทียบกับเยื่อที่ไม่ผ่านการฟอกมีค่าคัปปานัมเบอร์ 9.5614 (ตารางที่ 12)

จากการวัดค่าความขาวสว่างของแผ่นทดสอบด้วยเครื่องวัดค่าความขาวสว่างพบว่าทุกการทดลองมีค่าความขาวสว่างใกล้เคียงกับชุดควบคุมมากโดยการใช้ไซม์แลนเนสจากสายพันธุ์ ATCC ปริมาณ 50 IUต่อน้ำหนักของเยื่อกระดาษ 1 กรัม แผ่นทดสอบมีค่าความขาวสว่างเฉลี่ยสูงที่สุด 46.17 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ไซแลนเนสจากสายพันธุ์ NRRL ปริมาณ 5 IUต่อน้ำหนักของเยื่อกระดาษ 1 กรัม ให้ค่าความขาวสว่างรองลงมา คือ 45.76 เปอร์เซ็นต์(ตารางที่ 12) แผ่นทดสอบความขาวสว่างมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอ่อนดังภาพที่ 15-16

ตารางที่ 12 ค่าคัปปานัมเบอร์และค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษหลังจากการฟอกด้วยไซแลนเนส

สายพันธุ์	คัปปานัมเบอร์						ค่าความขาวสว่าง (%)					
	ปริมาณของเอนไซม์(IU/g)			ลดลง (%)			ปริมาณของเอนไซม์(IU/g)			เพิ่มขึ้น (%)		
	5	25	50				5	25	50			
ATCC	9.0135^{bc}	8.6421^{de}	8.3382^{e}	5.73	9.61	12.79	45.55^{c}	45.66^{bc}	46.17^{a}	-0.11	0.12	1.23
NRRL	9.2813^{ab}	8.9320^{cd}	8.7333^{cd}	2.92	6.58	8.66	45.76^{b}	45.60^{bc}	45.63^{bc}	0.33	-0.01	0.06
control	9.5614^{a}						45.60^{bc}					

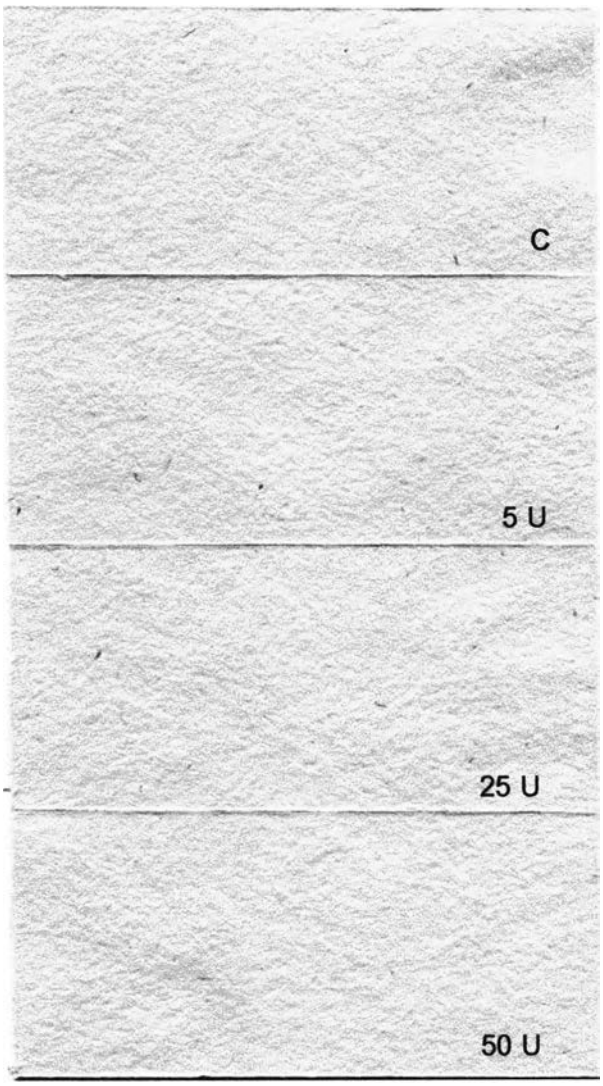
หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยค่าคัปปานัมเบอร์ และค่าความขาวสว่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ



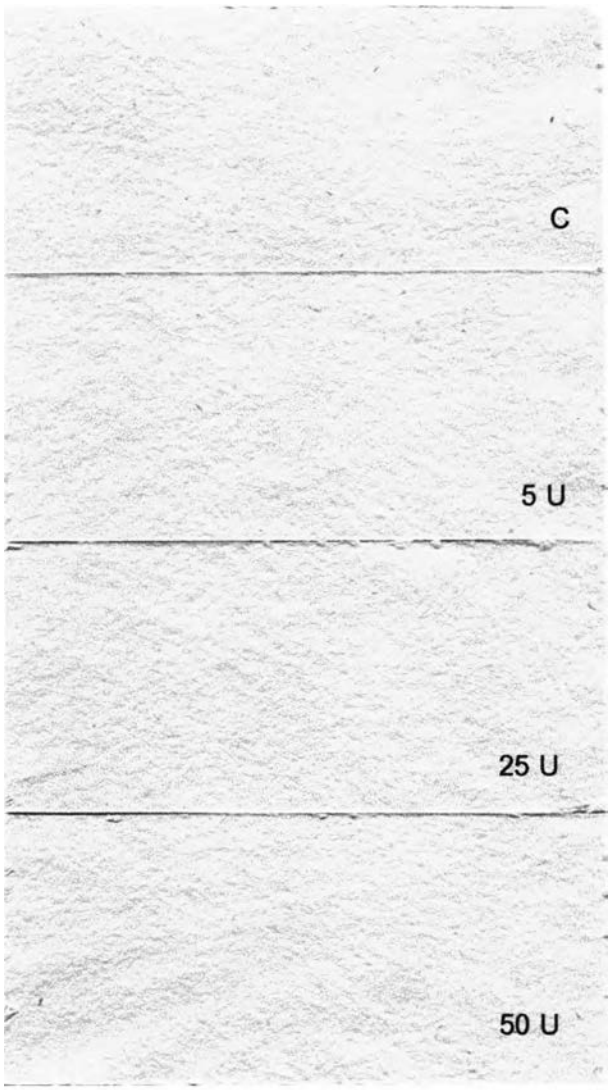
ภาพที่ 17 ค่าคัปปานัมเบอร์และค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษหลังจากการฟอกด้วยไซแลนเนส

5. การตรวจหาสารประเภทโครโมฟอร์

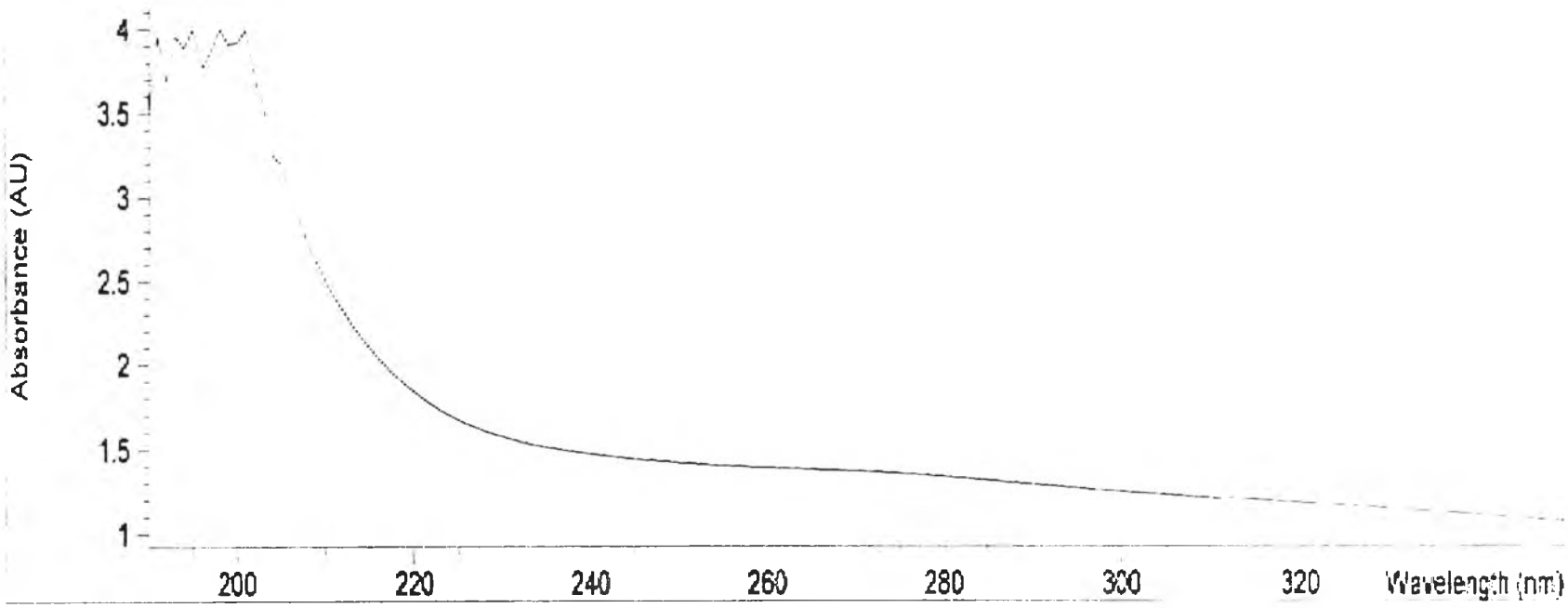
หลังจากการฟอกเยื่อกระดาษด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* ทั้ง 2 สายพันธุ์ นำส่วนของเหลวที่ได้จากการฟอกเยื่อไปตรวจหาสารประเภทโครโมฟอร์ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยการ scan ใช้ค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 190-350 นาโนเมตรซึ่งเป็นช่วง เทียบกับชุดควบคุม(ใช้ 50 มิลลิโมลาร์โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 แทนเอนไซม์) พบว่าของเหลวที่ได้จากชุดควบคุมเมื่อ scan แล้วไม่มีพีค(peak) ใดๆปรากฏ (ภาพที่ 20) ขณะที่การทดลองที่ใช้ไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ปริมาณ 5 U และ 25 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม จะปรากฏพีคที่ค่าการดูดกลืนแสง 202 และ 203 ตามลำดับ (ภาพที่ 23-24) ชุดการทดลองอื่นๆ คือ ไซแลนเนสจากสายพันธุ์ ATCC ปริมาณ 50 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม ไซแลนเนสจากสายพันธุ์ NRRL ปริมาณ 5 U 25 U และ 50 U ไม่มีพีคใดปรากฏเลย (ภาพที่ 25-28) ส่วนของเอนไซม์มาตรฐานมีพีคปรากฏที่การทดลองใช้เอนไซม์ปริมาณ 5 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม (ภาพที่ 21) ซึ่งให้เห็นว่าไซแลนเนสจากสายพันธุ์ ATCC ที่ปริมาณน้อยเมื่อนำไปฟอกเยื่อกระดาษจะมีสารประเภทโครโมฟอร์หลุดออกมาจากเยื่อกระดาษเช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์ปริมาณน้อย



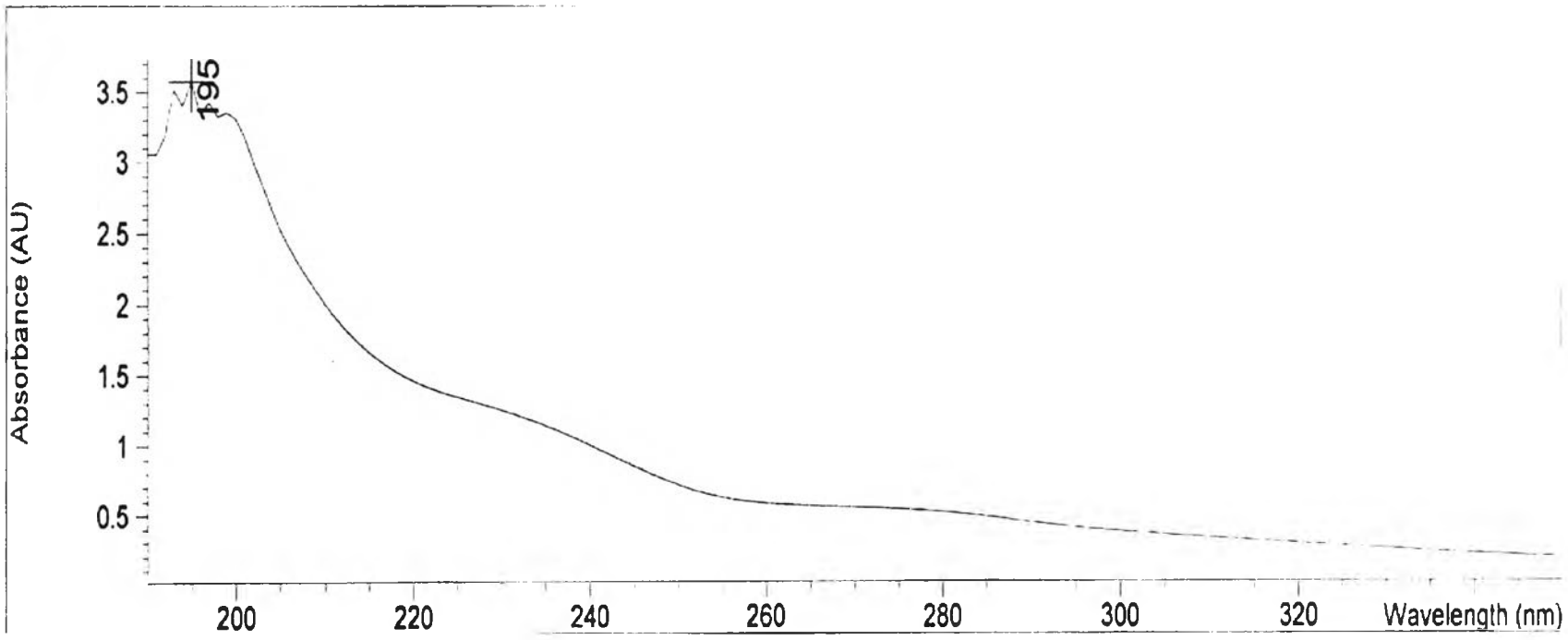
ภาพที่ 18 แผ่นทดสอบค่าความขาวสว่างจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ปริมาณ 5U 25U และ 50U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม (c) ชุดควบคุม



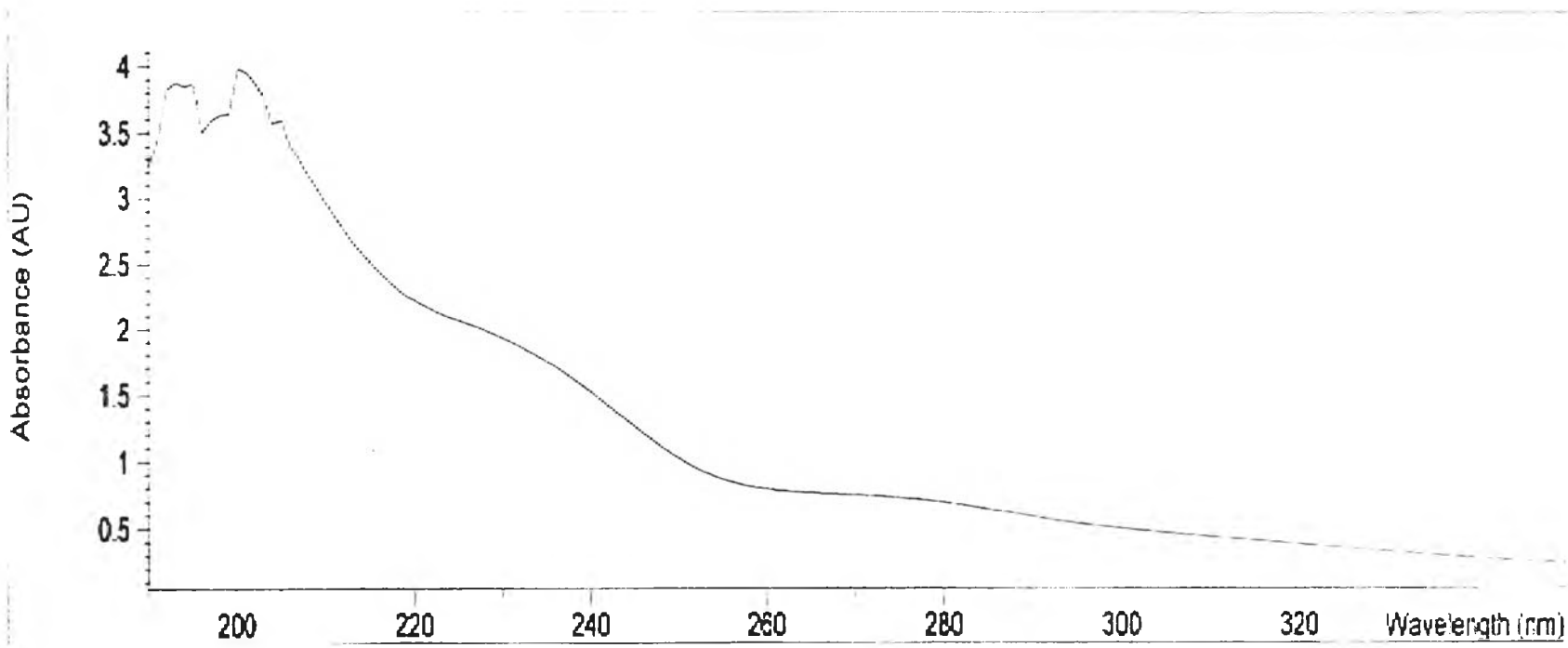
ภาพที่ 19 แผ่นทดสอบค่าความขาวสว่างจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ปริมาณ 5U 25U และ 50U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม (c) ชุดควบคุม



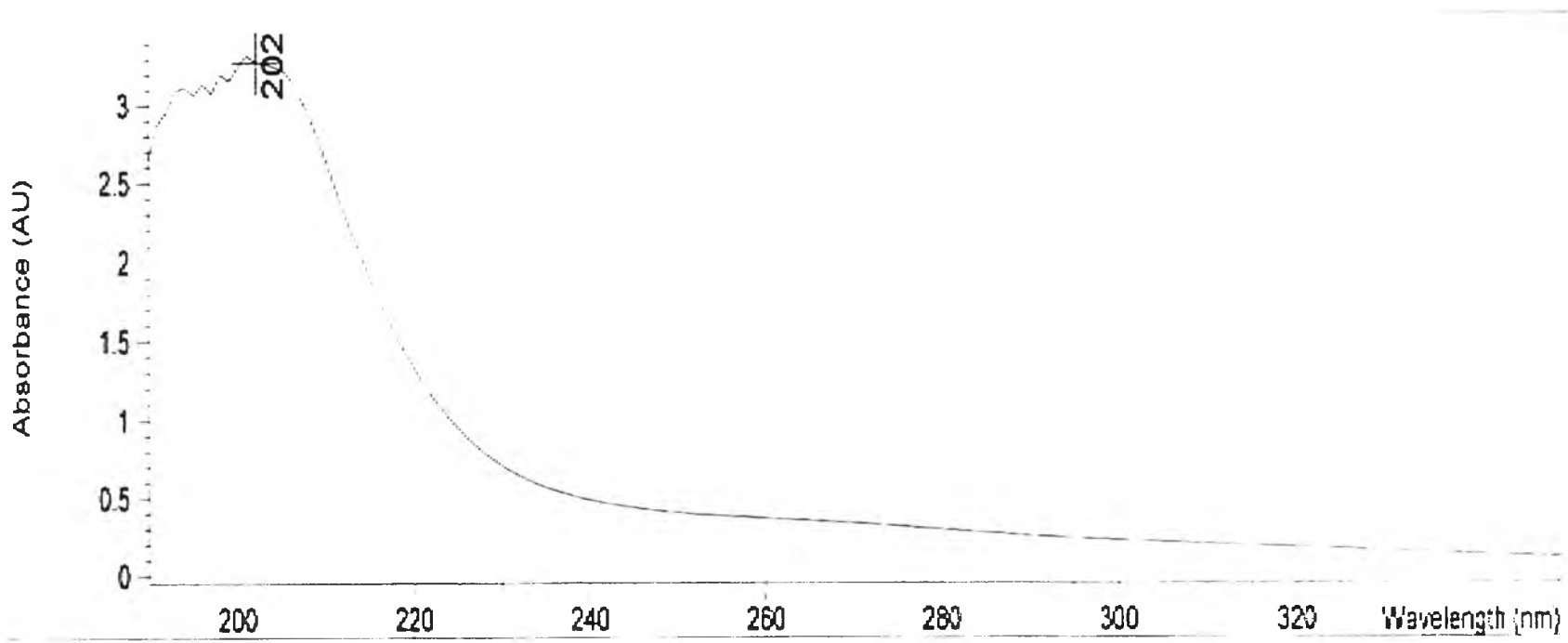
ภาพที่ 20 ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสของชุดควบคุม



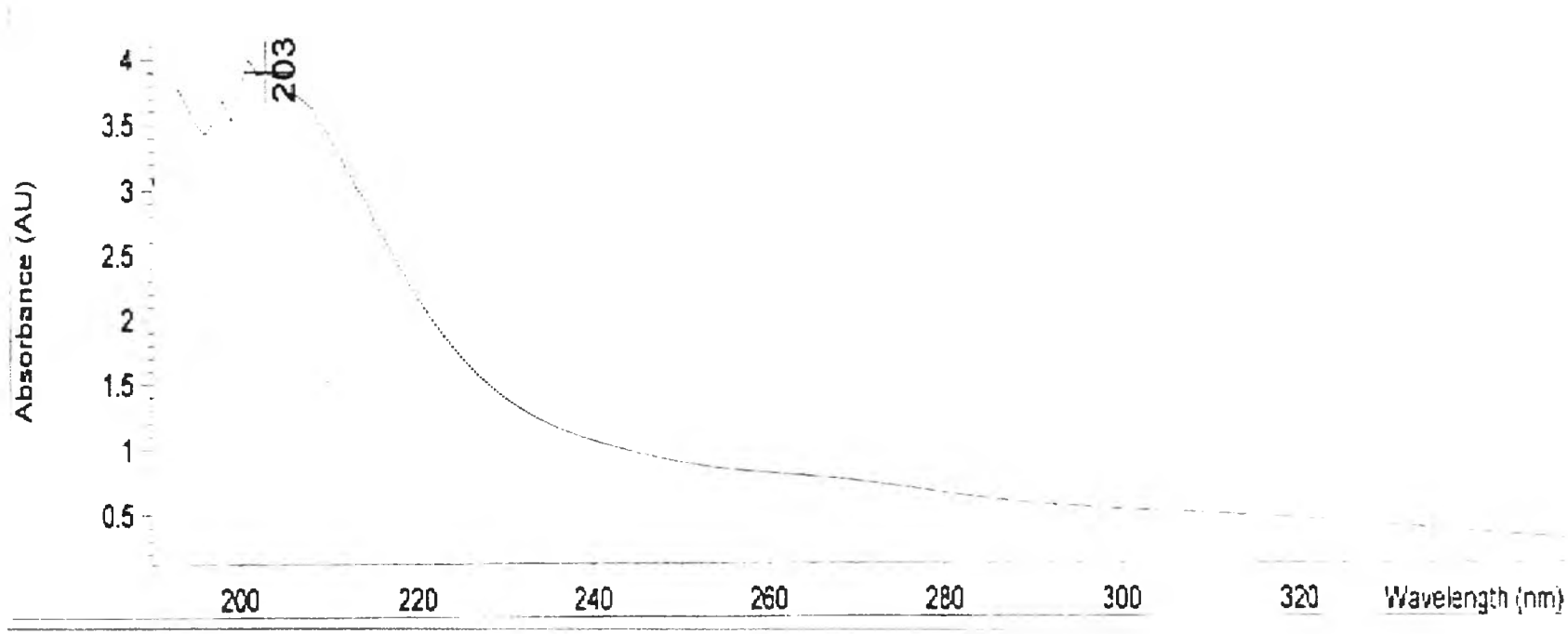
ภาพที่ 21 ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสมาตรฐาน ปริมาณ 5 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม



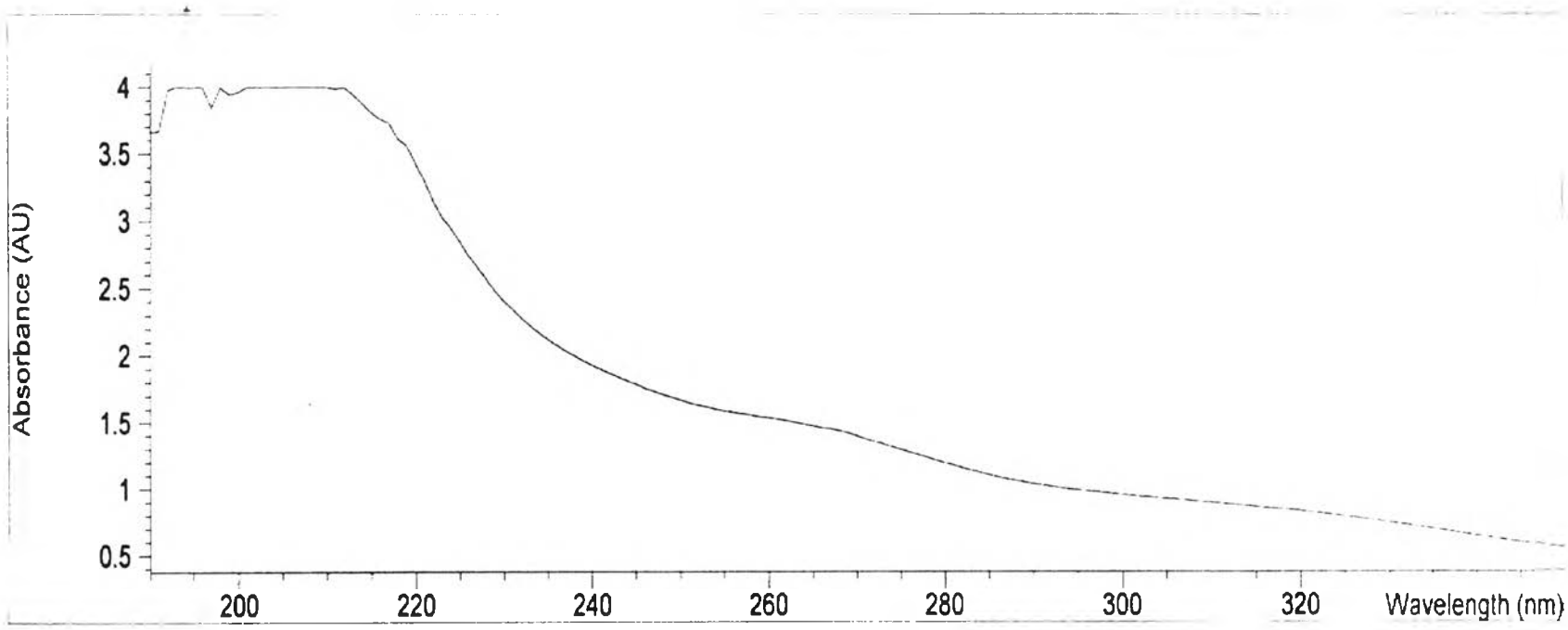
ภาพที่ 22 ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสมาตรฐาน ปริมาณ 25 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม



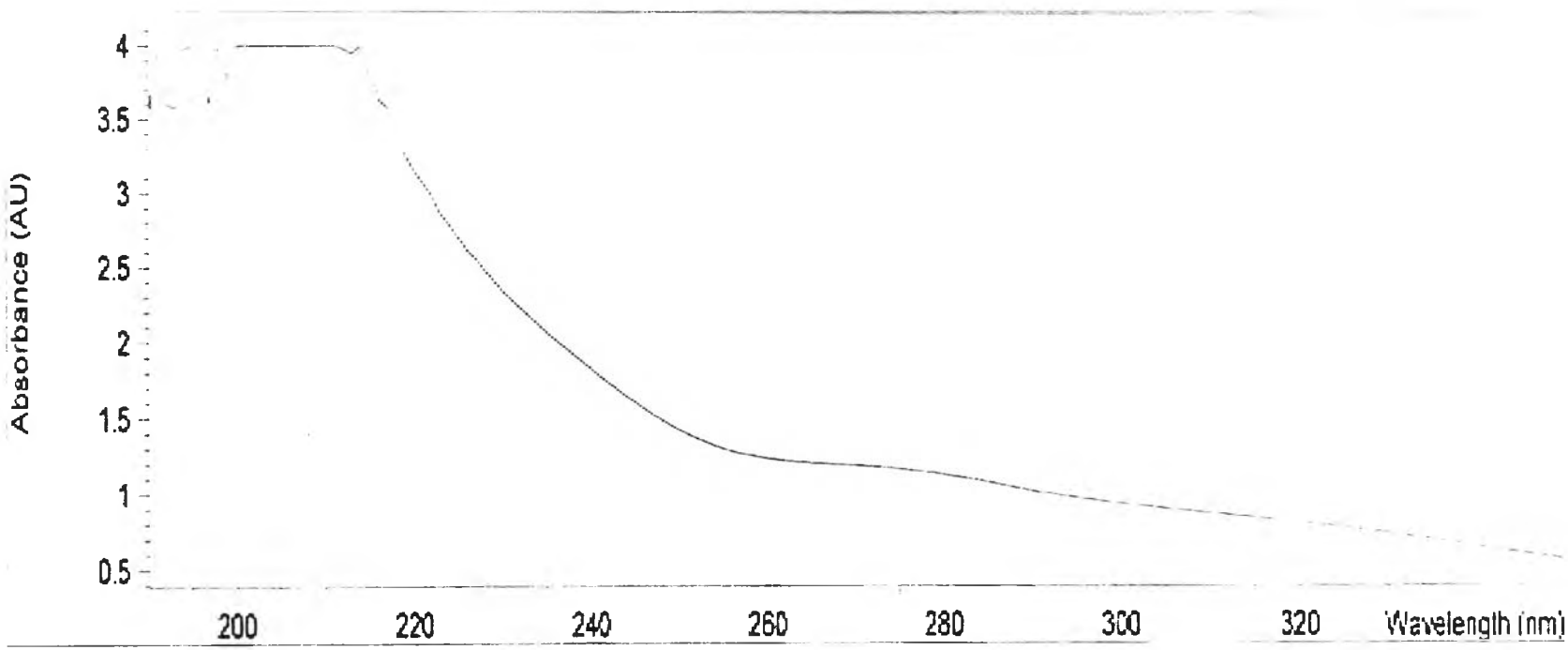
ภาพที่ 23 ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ปริมาณ 5 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม



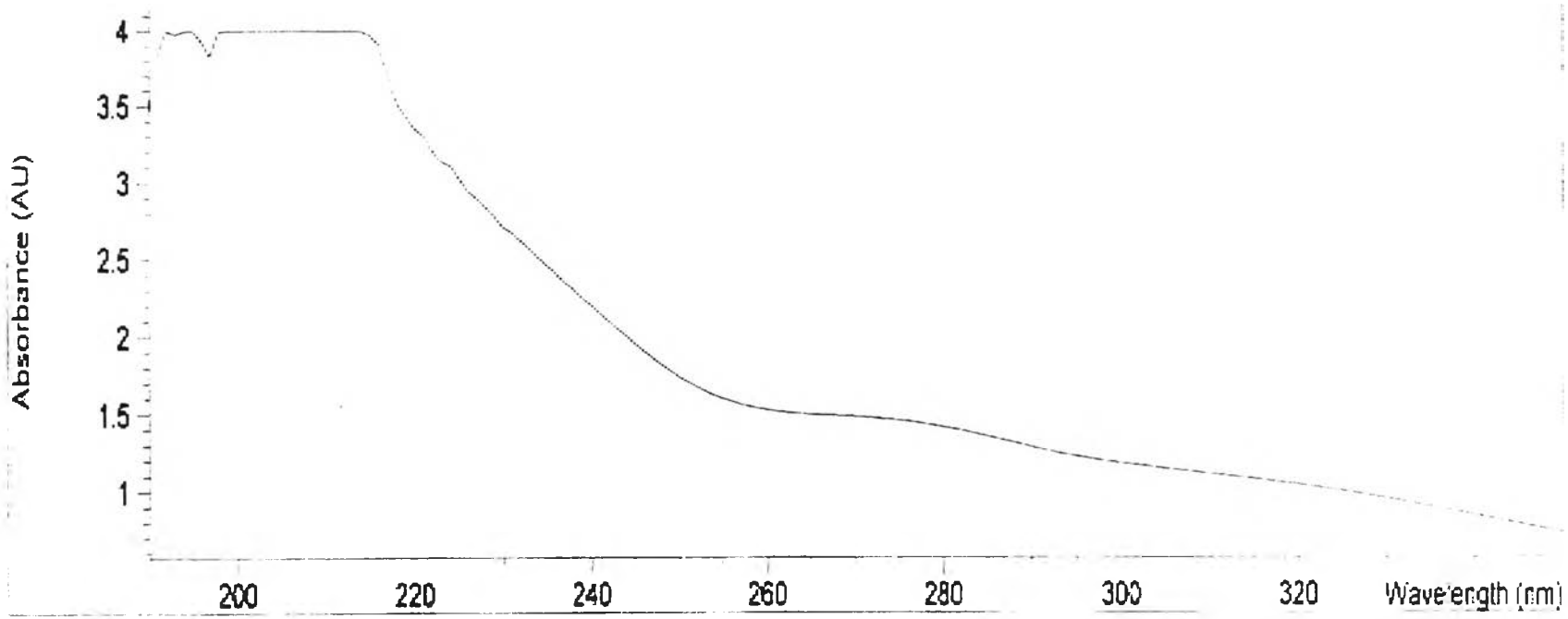
ภาพที่ 24 ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ปริมาณ 25 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม



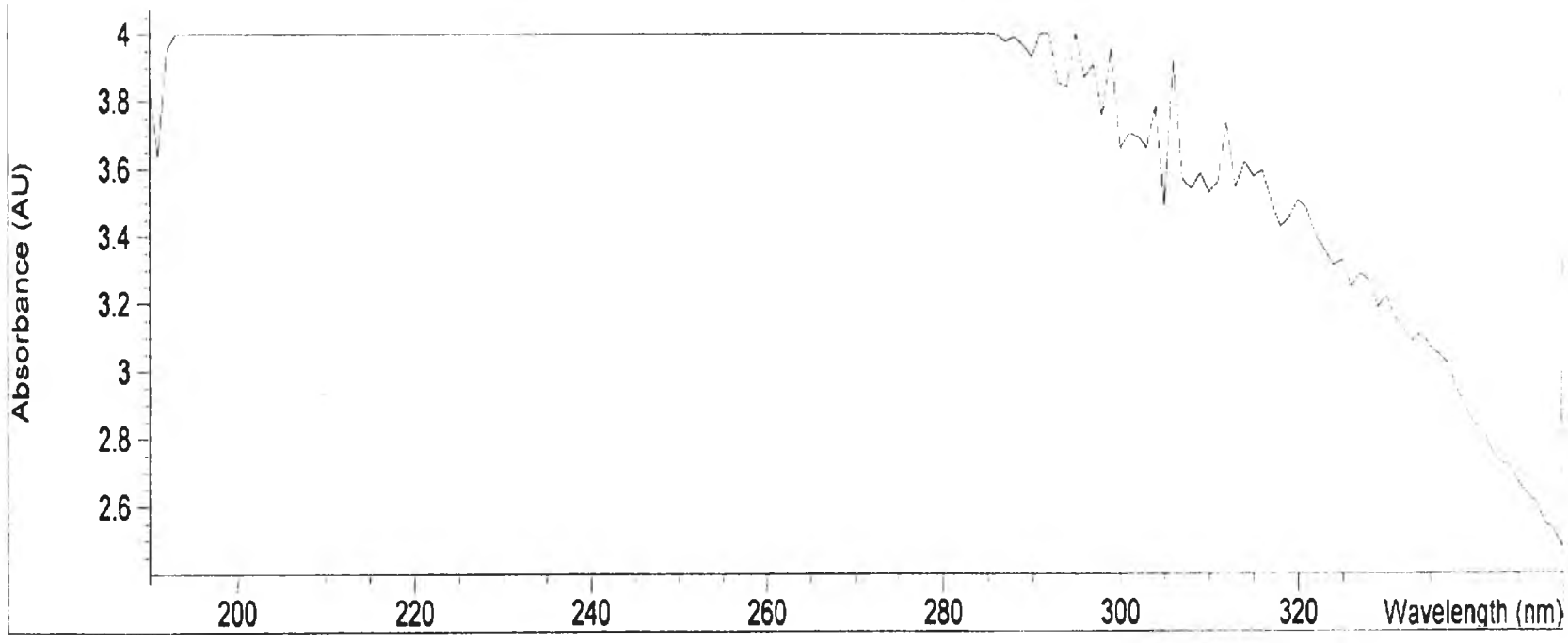
ภาพที่ 25 ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ปริมาณ 50 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม



ภาพที่ 26 ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ปริมาณ 5 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม



ภาพที่ 27 ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ปริมาณ 25 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม



ภาพที่ 28 ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ปริมาณ 50 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม