

การทำงานร่วมกันของกลุ่มเอ็นไซม์สลายไซแลนจาก *Streptomyces* spp. PC22 และ CH7



นางสาวปาริฉัตร ราวีศรี

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COOPERATIVE ACTION OF XYLANOLYTIC ENZYMES FROM *Streptomyces* spp. PC22 AND CH7



Miss Parichat Raweesri

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การทำงานร่วมกันของกลุ่มเอนไซม์สลายไซแลนจาก *Streptomyces*  
spp. PC22 และ CH7

โดย

นางสาวปาริฉัตร ราวีศรี


สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม


อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปั่นพานิชการ

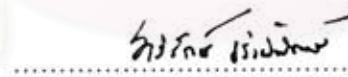
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

  
..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ นารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปั่นพานิชการ)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

ปาริฉัตร ราวีสวี : การทำงานร่วมกันของกลุ่มเอนไซม์สลายไซแลนจาก *Streptomyces* spp. PC22 และ CH7. (COOPERATIVE ACTION OF XYLANOLYTIC ENZYMES FROM *Streptomyces* spp. PC22 AND CH7) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชกร, 91 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนในการย่อยไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ช และไม้บีช และวัสดุทางการเกษตร เอนไซม์ดังกล่าวได้แก่ ไซแลเนส II แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนซิเดส และแอสซีติลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว และมีตาไลโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 โดยบ่มปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 ซึ่งเป็นภาวะเหมาะสมที่สุดสำหรับการทำงานร่วมกันของทุกเอนไซม์ พบว่าเมื่อใช้สับสเตรตเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นของแต่ละเอนไซม์ที่ 0.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยา และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ช และไม้บีช ให้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น 1.24 1.26 และ 1.23 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลรวมของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์เดี่ยว ส่วนชนิดของวัสดุทางการเกษตรที่ถูกย่อยอย่างมีประสิทธิภาพโดยให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงได้แก่ เปลือกข้าวโพดและขังข้าวโพด ซึ่งให้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น 1.21 และ 1.31 เท่า ตามลำดับ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าเอนไซม์เหล่านี้ส่งเสริมการทำงานซึ่งกันและกัน (synergistic action)

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาลำดับการทำงานของเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสลายหลักคือ ไซแลเนส II และบีตา-ไซโลซิเดส กับเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสลายกิ่งคือ แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนซิเดสและแอสซีติลเอสเทอเรส พบว่าทุกสับสเตรตที่ใช้ให้ข้อมูลสอดคล้องกันคือ การย่อยแบบเติมเอนไซม์เป็นลำดับ (sequential) ให้ประสิทธิภาพสูงกว่าการย่อยแบบมีเอนไซม์ทุกชนิดอยู่ร่วมกันในขั้นตอนเดียวกัน (simultaneous) และยังพบว่าปฏิกิริยาที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดคือ ปฏิกิริยาที่กำหนดให้เอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสลายกิ่งทำงานในขั้นตอนแรก โดยสามารถย่อยสลายไซแลนทุกชนิดได้สูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโพดและขังข้าวโพดได้เกือบ 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เมื่อเทียบกับปริมาณไซแลนในสับสเตรต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....ปาริฉัตร ราวีสวี  
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
 ปีการศึกษา.....2550.....

## 4772370823 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: XYLANASE II /  $\beta$ -XYLOSIDASE /  $\alpha$ -L-ARABINOFURANOSIDASE / ACETYL ESTERASE / AGRICULTURAL RESIDUES / *Streptomyces* spp.

PARICHAT RAWESRI : COOPERATIVE ACTION OF XYLANOLYTIC ENZYMES FROM *Streptomyces* spp. PC22 AND CH7. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D., 91 pp.

Cooperative action of xylanase II,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and acetyl esterase purified from *Streptomyces* sp. PC22 and  $\beta$ -xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 in the degradation of xylan from oat-spelt, birchwood and beechwood and agricultural residues was studied. Reaction mixture containing substrate at 10 mg·ml<sup>-1</sup> and 0.5 U·ml<sup>-1</sup> of individual enzymes was incubated for 24 h at 60°C, pH 6.0 which was the most suitable condition for all enzymes acting simultaneously. Under this condition, the amounts of reducing sugar released from oat-spelt xylan, birchwood xylan and beechwood xylan were increased by 1.24, 1.26 and 1.23-fold, respectively, compared to the expected amounts for the individual enzymes acting alone. For agricultural residues, high degradation efficiency was obtained from corn husk and corn cob with the increase in reducing sugar by 1.21 and 1.31-fold, respectively. These results indicated synergistic action among these enzymes.

In addition, sequential reactions between the mixtures of xylan-backbone degrading enzymes, xylanase/ $\beta$ -xylosidase, and debranching enzymes,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase/acetyl esterase, on the degradation of xylan and corn husk and corn cob were also determined. With all substrates used, higher amounts of reducing sugar release were obtained from the sequential reactions when compared to those of the simultaneous reactions. Moreover, the highest degrees of synergy were obtained from a sequential reaction with the mixture of debranching enzymes being added in the first reaction. Under these conditions, xylans from all sources were degraded to more than 50% (w/w) whereas corn husk and corn cob were degraded to almost 50% (w/w) with respect to the xylan content in the substrate.

Department.....Microbiology.....Student's signature..... Parichat Raweesri...  
Field of study.....Industrial Microbiology....Advisor's signature..... Piroh Pinphanichakarn.....  
Academic year.....2007.....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา-คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น รวมถึงกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ฐนียวัน ที่กรุณาได้รับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช ที่กรุณาได้รับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำปรึกษา-คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณคุณพิทยาธร ตันทวนิชที่ร่วมทุกข์ร่วมสุข อยู่เคียงข้างและเป็นกำลังใจให้ตลอดมาและตลอดไป

ขอขอบคุณพี่ชูตา เหล่าเรืองธนา พี่เวฬุรีย์ ทองคำ พี่วัชร ชุณหกุล พี่ปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์ พี่มลิน ศิริพัฒนานนท์ คุณอภิญา เตชะสวัสดิ์บุญ คุณนิสา วงศ์ทางประเสริฐ และคุณชัชวาล อุดมโชคมงคล ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา-คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดมา และขอบคุณน้องๆที่ห้อง 407 ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณยาย คุณป้า พี่น้องและญาติๆ ทุกคนที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ	
1.1 ประวัติความเป็นมา.....	1
1.2 โครงสร้างของไซแลน.....	2
1.3 การย่อยสลายไซแลน.....	4
2. ปรีทศน์วรรณกรรม	
2.1 เอนไซม์ย่อยสลายสายหลักของไซแลน.....	8
2.2 เอนไซม์ย่อยสลายกิ่งของไซแลน.....	8
2.3 ประโยชน์ของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน.....	9
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง	
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	19
3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	20
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.3.1 การเตรียมไซแลนจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22.....	22
3.3.2 การเตรียมปีตา-ไฮโดลิดีสจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7.....	26
3.3.3 การเตรียมแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิดีสจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22.....	28
3.3.4 การเตรียมแอสซิติลเอสเทอร์จาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22.....	32
3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน.....	35
3.3.6 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละ ชนิดต่อการย่อยสลายไซแลน.....	35

3.3.7 การทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิดีส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิดีส และแอสีติลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลน และวัสดุทางการเกษตร.....	36
3.3.8 ศึกษาลำดับการทำงานของเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสลายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสลายกิ่ง.....	37
4. ผลการทดลอง	
4.1 เตรียมไซแลเนส II แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิดีส และแอสีติลเอสเทอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 และบีตา-ไซโลลิดีสจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7.....	39
4.2 สมบัติของไซแลเนส II แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิดีส และแอสีติลเอสเทอเรสจาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 และบีตา-ไซโลลิดีสจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7.....	40
4.3 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อการย่อยสลายไซแลน.....	42
4.4 ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิดีส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิดีส และแอสีติลเอสเทอเรสในการย่อยสับสเตรต.....	47
4.5 ผลของลำดับการทำงานของเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสลายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสลายกิ่ง.....	59
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	65
รายการอ้างอิง.....	72
ภาคผนวก.....	80
ภาคผนวก ก.....	81
ภาคผนวก ข.....	83
ภาคผนวก ค.....	86
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	91



## สารบัญญัตราสาร

ตาราง		หน้า
4.1	แอดคิตีวตีจำพะวะของเอนไซม์แต่ละชนิด.....	39
4.2	ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิตีเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิตีเดส และแอสซีติลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ้ต....	49
4.3	ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิตีเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิตีเดส และแอสซีติลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลนจากไม้เบิร์ช.....	50
4.4	ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิตีเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิตีเดส และแอสซีติลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลนจากไม้ปีช.....	51
4.5	ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิตีเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิตีเดส และแอสซีติลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโพด....	52
4.6	ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิตีเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิตีเดส และแอสซีติลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลนจากซังข้าวโพด.....	53
4.7	ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิตีเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิตีเดส และแอสซีติลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลนจากรำข้าวเจ้า.....	54
4.8	ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิตีเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิตีเดส และแอสซีติลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลนจากฟางข้าวเจ้า.....	55
4.9	ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิตีเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิตีเดส และแอสซีติลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลนจากขี้เฝือย.....	56
4.10	ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิตีเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิตีเดส และแอสซีติลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลนจากขุยมะพร้าว.....	57
4.11	ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิตีเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิตีเดส และแอสซีติลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลนจากชานอ้อย.....	58
4.12	เปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยา simultaneous และ sequential ของเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสลายสายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสลายกิ่งในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ้ต.....	60
4.13	เปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยา simultaneous และ sequential ของเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสลายสายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสลายกิ่งในการย่อยสลายไซแลนจากไม้เบิร์ช.....	61

ตาราง	หน้า
4.14 เปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยา simultaneous และ sequential ของเอนไซม์ผสม กลุ่มย่อยสลายสายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่งในการย่อยสลายไซแลน จากไม้ปืช.....	62
4.15 เปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยา simultaneous และ sequential ของเอนไซม์ผสม กลุ่มย่อยสลายสายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่งในการย่อยสลายไซแลน จากเปลือกข้าวโพด.....	63
4.16 เปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยา simultaneous และ sequential ของเอนไซม์ผสม กลุ่มย่อยสลายสายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่ง ในการย่อยสลายไซแลน จากซังข้าวโพด.....	64
5.1 สรุปคุณสมบัติและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อย สลายไซแลนแต่ละชนิด.....	67
5.2 องค์ประกอบของวัสดุทางการเกษตร.....	68
5.3 สรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายไซแลนจากสับสเตรตต่างๆ ด้วยปฏิกิริยา simultaneous และ sequential.....	69

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 ลักษณะโครงสร้างของโอ-แอซีติล-4-โอ-เมธิลกลูคูโรโนไซแลน จากไม้เนื้อแข็ง.....	2
1.2 ลักษณะโครงสร้างของอะราบิโน-(4-โอ-เมธิลกลูคูโรโน) ไซแลน จากไม้เนื้ออ่อน.....	3
1.3 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในเปลือกเมล็ดธัญพืชต่างๆ.....	4
1.4 ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยไซแลน.	6
2.1 การเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอล.....	10
2.2 การหมักไซโลสเป็นเอทานอลโดย <i>Candida shehate</i> .....	12
2.3 การหมักอะราบิโนสเป็นเอทานอลโดยยีสต์.....	13
2.4 การหมักไซโลสเป็นเอทานอล โดย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase).....	14
4.1 คุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลเนส II แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส และแอซีติลเอสเทอเรส จาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 และปีตา-ไซโลสิเดส จาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7.....	40
4.2 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลเนส II แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส และแอซีติลเอสเทอเรส จาก <i>Streptomyces</i> sp. PC22 และปีตา-ไซโลสิเดส จาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7.....	41
4.3 ผลของความเข้มข้นของไซแลเนส II ต่อการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ช.....	43
4.4 ผลของความเข้มข้นของปีตา-ไซโลสิเดสต่อการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ช.....	43
4.5 ผลของความเข้มข้นของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสต่อการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ช.....	44
4.6 ผลของความเข้มข้นของแอซีติลเอสเทอเรสต่อการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ช.....	44
4.7 ผลของระยะเวลาบ่มปฏิริยาต่อการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ชของไซแลเนส II.....	45
4.8 ผลของระยะเวลาบ่มปฏิริยาต่อการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ชของปีตา-ไซโลสิเดส.....	46

รูปที่	หน้า
4.9 ผลของระยะเวลาบ่มปฏิริยาต่อการย่อยสลายไฮแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้ เบิร์ชของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์.....	46
4.10 ผลของระยะเวลาบ่มปฏิริยาต่อการย่อยสลายไฮแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้ เบิร์ชของแอสีติลเอสเทอร์.....	47



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ประวัติความเป็นมา

เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใหญ่ที่สุดในธรรมชาติ ประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิดคือ เซลลูโลส (cellulose) เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไกลโคซิดิก ( $\beta$ -1,4-glycosidic) มีสูตรทั่วไปคือ  $(C_6H_{10}O_5)_n$  พบมากที่สุดในปริมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) มี 20-35 เปอร์เซ็นต์ เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโทสและ/หรือน้ำตาลเฮกโซสได้แก่ ไซแลน (xylan) กลูแคน (glucan) และแมนแนน (mannan) โดยไซแลนจัดเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส (Ebringerova และ Heinze, 2000) ชนิดสุดท้ายคือ ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทพอลิฟีนอลิก (polyphenolic) เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ ซึ่งมักห่อหุ้มชั้นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเอาไว้ (Wong และคณะ, 1988)

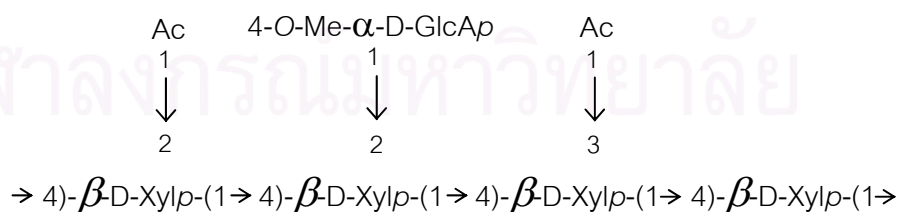
ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในเซลลูโลส โดยยึดเกาะกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน ยึดเกาะกับลิกนินด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent) และยึดเกาะกับพอลิแซคคาไรด์ชนิดอื่นด้วยพันธะนอนโควาเลนต์ (non covalent) ทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลสในธรรมชาติเป็นไปได้ยาก (Beg และคณะ, 2001) สามารถพบไซแลนได้ในธรรมชาติทั้งในไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง พืชล้มลุก หญ้า มอส เฟิร์น ในผนังเซลล์ชั้นแรกของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว รวมทั้งในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเช่น กากเมล็ดฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว ชังข้าวโพด เปลือกเมล็ดทานตะวัน (Magee และ Kosaric, 1985) และในเปลือกเมล็ดธัญพืชต่างๆ เป็นต้น (Ericksson และคณะ, 1990) นอกจากนั้นยังสามารถพบได้ในวัสดุเหลือทิ้งในระหว่างกระบวนการลอกเนื้อไม้เพื่อทำเยื่อกระดาษ (pulping) (Biely, 1985) พืชแต่ละชนิดจะมีไซแลนในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยในไม้เนื้อแข็งจะมีปริมาณไซแลนมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Wood และ McCrae, 1996) ในไม้เนื้ออ่อนมีประมาณ 7-12 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Haltrich และคณะ, 1996) ส่วนในไม้ล้มลุกและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจะมีไซแลนอยู่ประมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ (Saddler และคณะ, 1983)

## 1.2 โครงสร้างของไซแลน

โครงสร้างของไซแลนเป็นพอลิเมอร์ประกอบด้วยไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลซิดิก ( $\beta$ -1,4-xylosidic) เป็นสายหลัก (Ebringerova และ Heinze, 2000) และมีสารประกอบอื่นมาเชื่อมต่อเป็นหมู่ข้างเคียงเช่น หมู่อะราบินอสต่อที่ตำแหน่ง O-3 ของไซโลส หมู่กลูคูโรนิลต่อที่ตำแหน่ง O-2 ของไซโลส และหมู่แอสิติลต่อที่ตำแหน่ง O-2 และ O-3 ของไซโลส (Puls และ Schuseil, 1993) โดยไซแลนจากพืชแต่ละชนิดมีหมู่ข้างเคียงชนิดต่างๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยไซแลนในไม้เนื้ออ่อน และพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่น พืชจำพวกหญ้าได้แก่ ฟางข้าว ธัญพืชจำพวกเปลือกข้าวโอ๊ต รำข้าวสาลี จะมีอะราบินอสเป็นหลัก (Schyns และคณะ, 1994) ส่วนไซแลนในไม้เนื้อแข็งจะมีหมู่แอสิติลเป็นหลัก (Degrassi และคณะ, 2003) ตัวอย่างเช่น ไซแลนจากไม้เบิร์ชซึ่งจัดเป็นไม้เนื้อแข็งประกอบด้วยไซโลส 89.3 เปอร์เซ็นต์ อะราบินอส 1 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1.4 เปอร์เซ็นต์ และแอนไฮดรูโรนิก แอซิด (Kormelink และ Voragen, 1993) ส่วนอะราบินอไซแลนจากข้าวสาลี ประกอบด้วย ไซโลส 65.8 เปอร์เซ็นต์ อะราบินอส 33.5 เปอร์เซ็นต์ กาแลคโทส 0.1 เปอร์เซ็นต์ แมนโนส 0.1 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 0.3 เปอร์เซ็นต์ (Gruppen และคณะ, 1992)

### 1.2.1 โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง

โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็งคือ โอ-แอสิติล-4-โอ-เมธิลกลูคูโรนไซแลน (O-acetyl-4-O-methylglucuronoxylan) ซึ่งมีสายหลักเป็นไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลซิดิก ( $\beta$ -1,4-xylosidic) และมี 4-โอ-เมธิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิด (4-O-methyl-D-glucuronic acid) เชื่อมต่อที่ตำแหน่ง O-2 และมีหมู่แอสิติล (acetyl) ต่อที่ตำแหน่ง O-3 และ O-2 ของไซโลส (Hon และ Shiraishi, 1990) ดังแสดงในรูปที่ 1.1

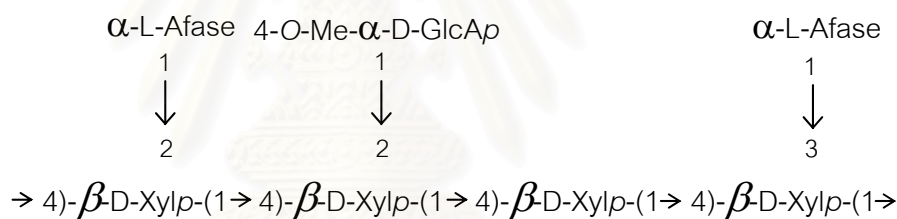


**รูปที่ 1.1** ลักษณะโครงสร้างของโอ-แอสิติล-4-โอ-เมธิลกลูคูโรนไซแลน จากไม้เนื้อแข็ง (Hon และ Shiraishi, 1990)

ในไม้เนื้อแข็งจะพบหมู่แอสีติลเป็นหมู่ข้างเคียงในปริมาณที่แตกต่างกันตามชนิดของพืช โดยมักมีอัตราส่วนของไซโลสและหมู่แอสีติลเป็น 10 ต่อ 7 (Kantelinen และคณะ, 1993) ส่วนไซแลนในไม้เนื้ออ่อนบางชนิดพบว่ามีหมู่แอสีติลเป็นหมู่ข้างเคียงประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ (Maijala, 2000) บางชนิดก็ไม่พบหมู่แอสีติลเป็นหมู่ข้างเคียงเลย (Basaran และ Hang, 2000) โดยหมู่แอสีติลเหล่านี้ช่วยให้ไซแลนละลายน้ำได้ดีขึ้น

### 1.2.2 โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน

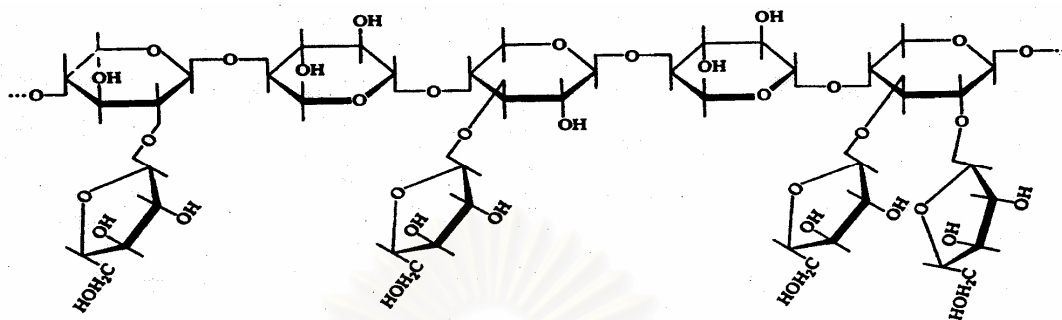
โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน คือ อะราบิโน-(4-โอ-เมธิลกลูคูโรโน) ไซแลน (arabino-(4-O-methylglucurono) xylan) ซึ่งมีสายหลักเป็นไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะปีตา-1,4 ไซโลซิดิก ( $\beta$ -1,4-xylosidic) และมี 4-โอ-เมธิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิด (4-O-methyl-D-glucuronic acid) เชื่อมต่อที่ตำแหน่ง O-2 และมีหมู่แอล-อะราบิโนส (L-arabinose) เชื่อมต่อที่ตำแหน่ง O-3 ของไซโลส (Hon และ Shiraishi, 1990) ดังแสดงในรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 ลักษณะโครงสร้างของอะราบิโน-(4-โอ-เมธิลกลูคูโรโน) ไซแลน จากไม้เนื้ออ่อน (Hon และ Shiraishi, 1990)

ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนบางชนิดพบว่ามีหมู่แอสีติลเป็นหมู่ข้างเคียงประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ (Maijala, 2000)

1.2.3 ไซแลนที่พบในเปลือกเมล็ดธัญพืชจะเป็นอะราบินโนไซแลน (arabinoxylan) จะมีหมู่ข้างเคียงเป็นหมู่อะราบินโนซิล (arabinosyl) เพียงหมู่เดียว ดังรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในเปลือกเมล็ดธัญพืชต่างๆ (Pul และ Schuseil, 1993)

### 1.3 การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถย่อยสลายได้โดยการใช้สารเคมี (chemical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือใช้ทั้งสองอย่างร่วมกัน (Tsao และ Chiang, 1983)

#### 1.3.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยสารเคมี สามารถทำได้ 2 วิธี

##### 1.3.1.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด

การย่อยสลายไซแลนด้วยกรดเพื่อให้ได้ไซโลสเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรุนแรงและไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษ เช่น ฟอฟูรัล (furfural) ซึ่งเป็นสารที่มีผลต่อการนำไปเลี้ยงจุลินทรีย์ (Paturan, 1989) และยังคงต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ทนต่อความเป็นกรดและอุณหภูมิสูงได้

##### 1.3.1.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง

การย่อยสลายไซแลนด้วยด่างมักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทำกระดาษ ซึ่งมักจะนำขึ้นของเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เพื่อให้เปลือกไม้ยุ่ยและเป็นการกำจัดลิกนินออกจากชั้นลิกโนเซลลูโลสบางส่วนด้วย หลังจากนั้นนำไปผ่านกระบวนการฟอกสี



เยื่อกระดาษโดยใช้สารเคมีที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบเช่น คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide) ก๊าซคลอรีน ( $Cl_2$ ) เป็นต้น ที่อุณหภูมิสูงไม่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียสและความเป็นกรดต่างไม่ต่ำกว่า 10 แต่ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษพวกไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบอะโรมาติกคลอรีนที่เป็นพิษอื่นๆ ด้วยเช่น คลอโรฟีนอล (chlorophenol) คลอโรไบฟีนิล (chlorobiphenyl) และอนุพันธ์คลอโรลิกนิน (chlorolignin) อื่นๆ สารประกอบเหล่านี้เป็นสารพิษก่อมะเร็ง ซึ่งมักจะถูกปลดปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อม ยากต่อการย่อยสลายและมักจะสะสมเป็นปริมาณมาก (Visser และคณะ, 1992)

### 1.3.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูงกว่าการใช้สารเคมี และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างอีกทั้งยังได้ไซโลสในปริมาณที่สูง ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายพันธะบีตา-1,4-ไซโลสิดิกของสายหลัก ให้ได้ไซโลส (xylose) หรือไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนประกอบด้วยเอนไซม์ 2 กลุ่มใหญ่คือ

1. เอนโดไซแลเนส (endoxylanase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4- $\beta$ -D-xylan-xylohydrolase: EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลสิดิกแบบสุม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่ากลไกแบบภายใน (endo-mechanism) ได้ไซโลสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Gilbert และคณะ, 1993)

2. บีตา-ไซโลสิดเอส ( $\beta$ -xylosidase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4- $\beta$ -D-xylan-xylohydrolase: EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลไฟรานโนไซด์ในโอลิโกแซคคาไรด์สั้นๆ ที่ละหน่วยจากปลายสายด้านนอนรีดิวซ์ (non-reducing end) เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่ากลไกแบบภายนอก (exo-mechanism) ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dekker และ Richards, 1976)

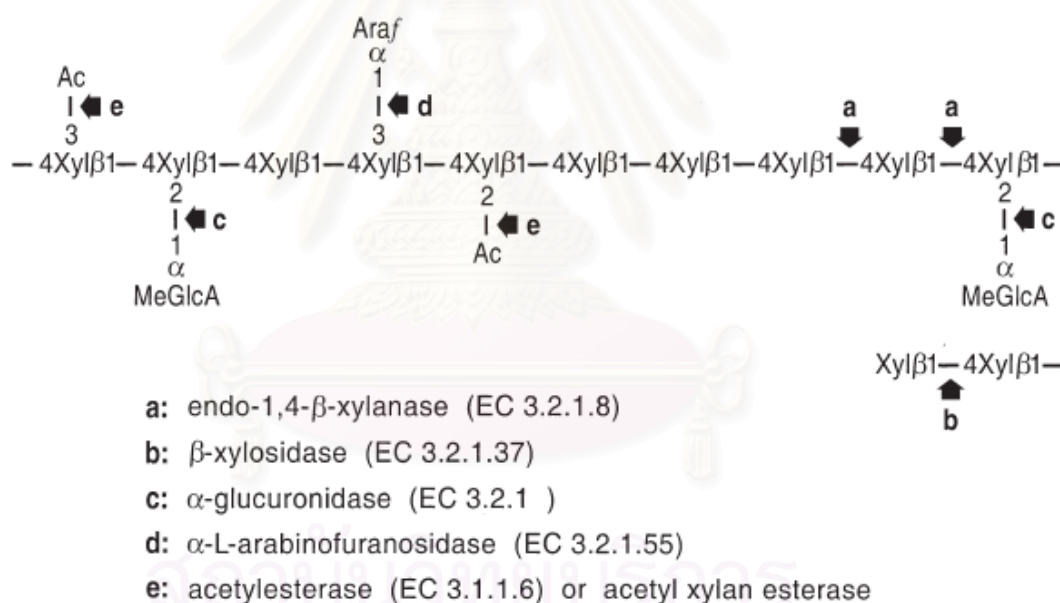
เนื่องจากไซแลนมีโครงสร้างซับซ้อน หมู่ข้างเคียงมีส่วนร่วมบดบังการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายสายหลัก ดังนั้นการย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์จึงต้องอาศัยเอนไซม์ที่สามารถย่อยหมู่ข้างเคียงร่วมด้วยได้แก่

- แอซีติล (ไซแลน) เอสเทอเรส (acetyl (xylan) esterase: EC 3.1.1.6) ย่อยสลายพันธะ บีตา-1,2 หรือ บีตา-1,3 ที่เชื่อมระหว่างหมู่แอซีติลกับสายหลัก ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแอซีติก (Johnson และคณะ, 1988)

- แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนซิเดส ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidase: EC 3.2.1.55) ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,3 ของหมู่บนอนรีดิวิธ แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนซิล ได้อะราบินโนสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Kormelink และคณะ, 1991)

- แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส ( $\alpha$ -D-glucuronidase: EC 3.2.1.139) ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ใน 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิด จากโมเลกุลของไซแลน แต่หมู่แอลฟา-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิดพบว่ามีอยู่ในปริมาณน้อยคือ ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษขั้นต้นด้วยด่างจะมี 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิดเหลืออยู่เพียง 0.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณไซโลสทั้งหมดในไซแลน (Teleman และคณะ, 2001) ดังนั้นแอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส จึงจัดว่ามีบทบาทสำคัญน้อยกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นในกลุ่มย่อยสลายไซแลน

จากเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนทั้งหมดที่กล่าวมาแล้ว สามารถแสดงแผนภาพรวมการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้เพื่อย่อยสลายโครงสร้างของไซแลนได้ดังแสดงในรูปนี้



**รูปที่ 1.4** ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยไซแลน (Biely, 1985)

Ac	แทน	หมู่แอซีติล
Araf	แทน	แอล-อะราบินอฟิวราโนส
MeGlcA	แทน	กรด 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิก
Xyl	แทน	ดี-ไซโลส

ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์ดังกล่าวมาย่อยไซแลนให้เป็นไซโลส อะราบิโนส กรดแอสติก และกรดกลูโคนิก ไซโลสที่ได้สามารถนำไปผลิตสารที่มีประโยชน์โดยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ ยาปฏิชีวนะ สารเชื้อเพลิงอื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ไซโลสเป็นสารเหนียวนำไปใช้ในการสร้างกลูโคสไอโซเมอเรสโดยจุลินทรีย์ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื่อมฟรุกโทส (high fructose syrup) (Chen, 1980) ส่วนอะราบิโนสใช้เป็นสารให้ความหวานได้เช่นกัน เนื่องจากมีรสหวานและร่างกายไม่ดูดซึม (Seri และคณะ, 1996) และยังสามารถป้องกันการเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงในผู้ป่วยโรคเบาหวานหลังการรับประทานซูโครส (Matsuo และคณะ, 2000) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนไปใช้ในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษ (Bajpai, 1999) เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างเมื่อเทียบกับการใช้สารเคมี และยังสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการทำน้ำผลไม้ อุตสาหกรรมขนมปัง เพื่อปรับปรุงคุณภาพ (Maat และคณะ, 1992) รวมถึงอุตสาหกรรมอาหารสัตว์โดยช่วยย่อยไซแลนซึ่งปนอยู่ในอาหาร ทำให้ง่ายต่อการดูดซึมอาหาร (Gilbert และ Hazlewood, 1993)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรม

#### 2.1 เอนไซม์ย่อยสลายสายหลักของไซแลน

##### 2.1.1 ไซแลเนส (EC 3.2.1.8)

เอนโดไซแลเนส หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4- $\beta$ -D-xylan-xylanohydrolase: EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลสิติกแบบสุม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่ากลไกแบบภายใน ได้ไซโลสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Gilbert และคณะ, 1993)

##### 2.1.2 บีตา-ไซโลสิเตส (EC 3.2.1.37)

บีตา-ไซโลสิเตส หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4- $\beta$ -D-xylan-xylohydrolase: EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ในโอลิโกแซคคาไรด์สั้นๆ ที่ละหน่วยจากปลายสายด้านนอนรีดิวซ์ (non-reducing end) เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่ากลไกแบบภายนอก ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dekker และ Richards, 1976)

#### 2.2 เอนไซม์ย่อยสายกิ่งของไซแลน

##### 2.2.1 แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิเตส (EC 3.2.1.55)

แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิเตส (EC 3.2.1.55) เป็นเอนไซม์ชนิด exo-type ที่ย่อยพันธะแอลฟา-1,2 และแอลฟา-1,3 จากปลายสายด้านนอนรีดิวซ์ของหมู่ แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสจากไซแลน อะราบินอไซแลน และอะราบินกาแลคแทน (Manin และคณะ, 1994) ได้อะราบินอสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Kormelink และคณะ, 1991)

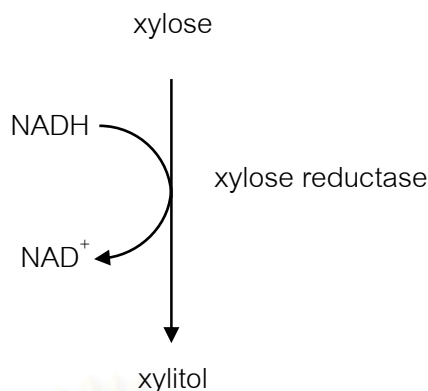
## 2.2.2 แอซีติลเอสเทอร์เอส (EC 3.1.1.6)

แอซีติล (ไซแลน) เอสเทอร์เอส (acetyl (xylan) esterase: EC 3.1.1.6) ย่อยสลายพันธะบีตา-1,2 หรือบีตา-1,3 ที่เชื่อมระหว่างหมู่แอซีติลกับสายหลักของไซแลน ส่งผลให้เอนไซม์ย่อยสลายสายหลักเข้าย่อยสลายไซแลนได้ดีขึ้น โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายคือ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ไซโลส และกรดแอซีติก (Johnson และคณะ, 1988)

## 2.3 ประโยชน์ของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน

เอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนมีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลายชนิด และเป็นที่น่าสนใจมากเพราะสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้จริงเช่น การแปรรูปวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเป็นเชื้อเพลิงและสารเคมี (Screenath และ Jeffries, 2000) อุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ (Bajpai, 1999) อุตสาหกรรมทำน้ำผลไม้ให้ใสขึ้น (Polizeli และคณะ, 2005) อุตสาหกรรมขนมปัง เพื่อปรับปรุงคุณภาพ (Maat และคณะ, 1992) อุตสาหกรรมการทำไวน์เพื่อเพิ่มกลิ่นรสในไวน์ (Saha, 2000) และใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพื่อลดความเหนียวของอาหารสัตว์ลงทำให้ย่อยง่ายขึ้นและเพิ่มการดูดซึม (Gilbert และ Hazlewood, 1993) เป็นต้น

การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ย่อยสลายกึ่งกับเอนไซม์ย่อยสลายหลักจะช่วยให้เกิดการย่อยสลายไซแลนได้อย่างสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือ ไซโลสและอะราบิโนส ซึ่งสามารถนำไปใช้ผลิตสารหรือผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูงได้มากมาย เช่น ไซโลสเป็นสารชักนำในการสร้างไซโลสไอโซเมอเรส หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่ากลูโคสไอโซเมอเรส เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุกโตสซึ่งใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมฟรุกโตส (high fructose syrup) และถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมหวานและลูกกวาด (Chen, 1980) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ไซโลสเป็นสารอาหารให้กับจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไซลิทอล (Barbosa และคณะ, 1996) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ทางการแพทย์ทดแทนน้ำตาลให้กับผู้ป่วยโรคเบาหวาน หรือใช้เพื่อให้ความหวานในลูกอม ยาสีฟัน หมากฝรั่ง โดยไม่ทำให้ฟันผุ (Parajo และคณะ, 1998) โดยมีกระบวนการเปลี่ยนรูปดังรูปที่ 2.1 นอกจากนั้นยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลและบิวทานอล (Neale และคณะ, 1988) นอกจากไซโลสแล้วอะราบิโนสยังสามารถใช้เป็นสารให้ความหวานได้เช่นกัน เนื่องจากมีรสหวานและร่างกายไม่ดูดซึม (Seri และคณะ, 1996) และยังสามารถป้องกันการเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงในผู้ป่วยเบาหวานหลังการรับประทานซูโครสเข้าไปได้อีกด้วย (Matsuo และคณะ, 2000)



**รูปที่ 2.1** การเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิตอล (Walker, 1998)

การใช้ประโยชน์ของน้ำตาลจากเฮมิเซลลูโลส มีความสำคัญในการนำวัสดุทางการเกษตร กลับคืนมาใช้ใหม่ โดยเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีมูลค่าสูงขึ้นด้วยกระบวนการหมักเช่น เอทานอล และสารประกอบอื่นๆ ดังกล่าวข้างต้น การใช้กรดเจือจางที่อุณหภูมิสูงสามารถย่อยเฮมิเซลลูโลส ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ (Saha และ Bothast, 1998) อย่างไรก็ตามวิธีการนี้จะให้ผลผลิตข้างเคียงที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักด้วย ดังนั้นเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน (xylan-degrading enzyme) จึงมีความสำคัญมากในการย่อยสลายผลผลิตทางการเกษตรไปเป็น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสำหรับเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก ทั้งนี้เพราะเป็นปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง มีความจำเพาะเจาะจง ไม่ก่อให้เกิดสารข้างเคียงที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์

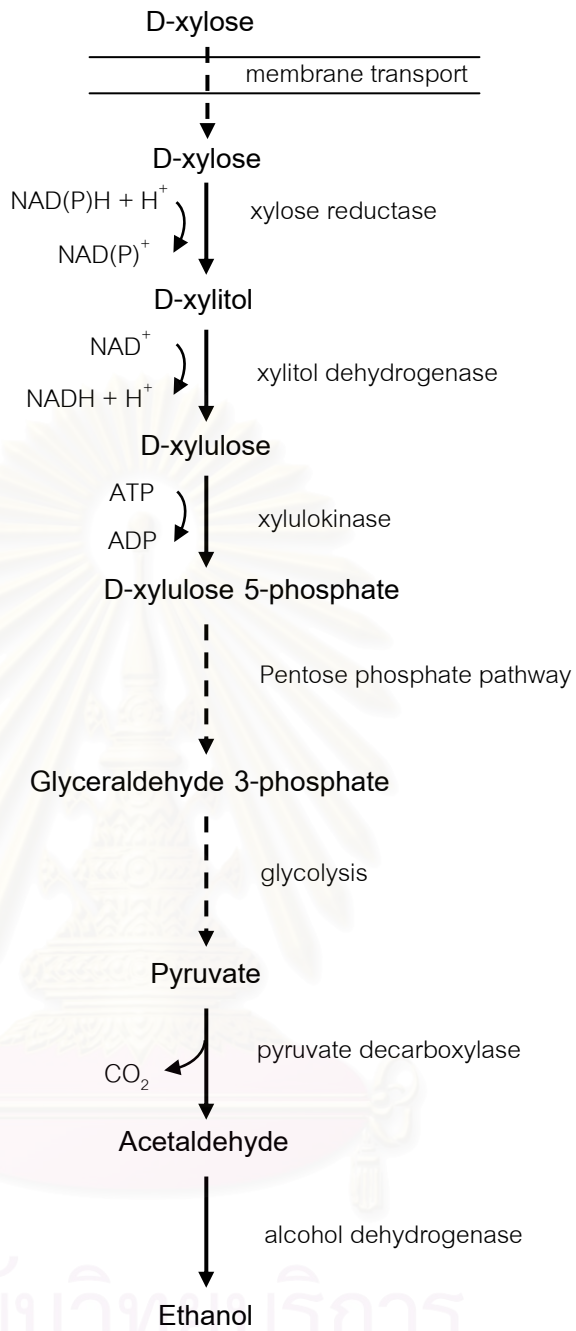
ในปัจจุบันนี้การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นที่สนใจอย่างมาก เนื่องจากช่วยเพิ่มคุณค่าของวัสดุเหลือทิ้งและลดการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) ในปี 2002 เอทานอลกว่า 2 ล้านแกลลอนถูกผลิตขึ้นจากการหมักแบ่งเป็นหลัก และแนวโน้มการใช้เอทานอล ในอนาคตประเมินกันว่าจะมีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเป็นสารที่มีความปลอดภัยกับ สิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้ methyl tertiary butyl ether (MTBE) ซึ่งเป็นสารผสมในน้ำมันเพื่อการ เผาไหม้ที่สะอาด และใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุด นอกจากนี้พบว่า MTBE มีการปนเปื้อนในแหล่ง น้ำธรรมชาติ (Saha, 2003)

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ยังไม่ได้ใช้ประโยชน์ สามารถใช้เป็นวัตถุดิบราคาถูกในการ ผลิตเอทานอลได้ การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์จะได้น้ำตาลต่างๆ ขึ้นกับแหล่งที่มา เช่น ไซโลส กาแลคโตส แมนโนส ฟรุคโตส แรมโนส กลูโคส และอะราบิโนส แม้ว่า *Saccharomyces cerevisiae* ทั่วไป จะเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว แต่ก็ไม่สามารถเปลี่ยน น้ำตาลชนิดอื่นๆ เช่น ไซโลสไปเป็นเอทานอลได้ (Saha, 2003)

*Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* และ *Candida shehate* เป็นยีสต์ที่สามารถเปลี่ยนไซโลสและอะราบิโนสไปเป็นเอทานอลได้ (Walker, 1998) ดังรูปที่ 2.2 และ 2.3 แต่ในเชิงพาณิชย์การใช้ยีสต์เหล่านี้ในการหมักเอทานอลมีอยู่ไม่มากเพราะมีความทนต่อเอทานอลได้ต่ำ กระบวนการหมักเป็นไปอย่างเชื่องช้า และการควบคุมออกซิเจนเพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมทำได้ยาก (Du Preez, 1994) แต่อย่างไรก็ตามไซโลสสามารถถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสโดยใช้ไซโลสไอโซเมอเรส และยีสต์ต่างๆ ไปสามารถหมักไซลูโลสเป็นเอทานอลได้ (Gong และคณะ, 1981) จึงมีการใช้เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอโดยทรานสฟอร์มยีนประมวลรหัสไซโลสไอโซเมอเรสจากยีสต์เข้าสู่ *Saccharomyces cerevisiae* ทำให้สามารถหมักไซโลสเป็นเอทานอลได้ (Walker, 1998) ดังรูปที่ 2.4

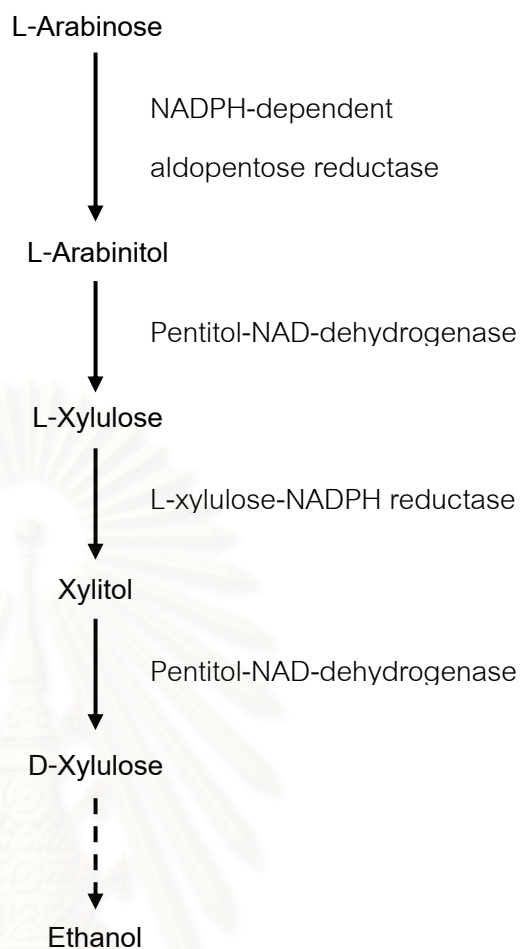


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



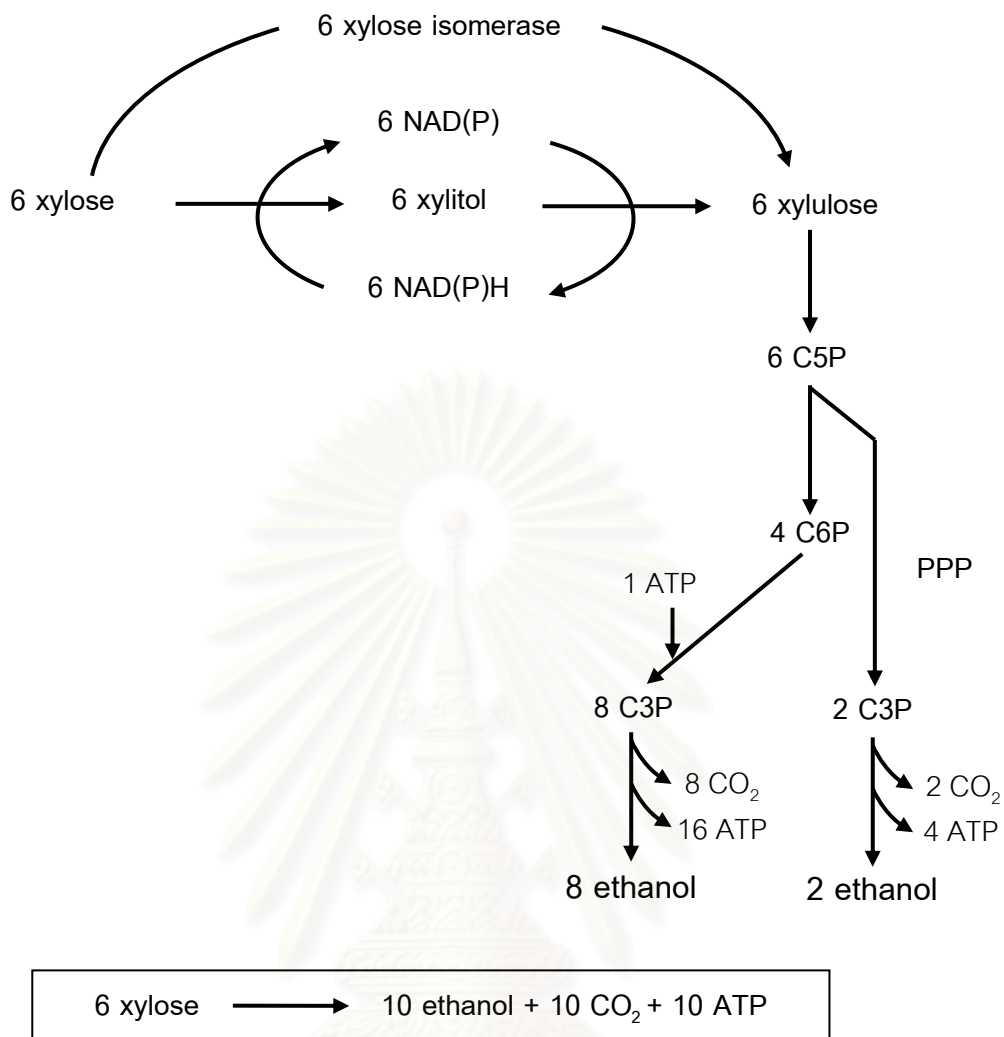
รูปที่ 2.2 การหมักไซโตสเป็นเอทานอลโดย *Candida shehate* (Walker, 1998)





รูปที่ 2.3 การหมักอะราบินอสเป็นเอทานอลโดยยีสต์ (Walker, 1998)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**รูปที่ 2.4** การหมักไซโลสเป็นเอทานอล โดย *Saccharomyces cerevisiae* ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) (Kuyper และคณะ, 2004)

C3P คือ triose-3-phosphate

C5P คือ pentose-5-phosphate

C6P คือ hexose-6-phosphate

PPP คือ pentose phosphate pathway

เนื่องจากไซแลนมีโครงสร้างซับซ้อนโดยมีหมู่ข้างเคียงหลายชนิดดังกล่าวข้างต้น จึงทำให้การย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยสลายสายหลักเพียงอย่างเดียวไม่มีประสิทธิภาพดีเท่าที่ควร จึงมีการศึกษาการทำงานร่วมกันกับเอนไซม์ที่ย่อยหมู่ข้างเคียงของไซแลน ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายสายหลักได้

ได้มีรายงานเกี่ยวกับการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิเดสร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนสายหลักในการย่อยสลายไซแลน และเฮมิเซลลูโลสที่อยู่ในวัสดุทางเกษตรดังนี้

Bachmann และ McCarthy (1991) ศึกษาการทำงานของเอนโดไซแลเนส บีตา-ไซโลสิเดส และแอลฟา-อะราบินอฟิวราโนสิเดสจาก *Thermomonospora fusca* พบว่าเมื่อใช้เอนโดไซแลเนสและบีตา-ไซโลสิเดสร่วมกันในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เพิ่มขึ้นจากการใช้เอนโดไซแลเนสเพียงอย่างเดียว แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้สับสเตรตเป็นฟางข้าวสาลี และเมื่อใช้เอนโดไซแลเนสและแอลฟา-อะราบินอฟิวราโนสิเดสร่วมกันในการย่อยสลายไซแลนจากฟางข้าวสาลี พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เพิ่มขึ้น 1.8 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้เอนโดไซแลเนสเพียงอย่างเดียว

Lee และ Forsberg (1987) ศึกษาการทำงานร่วมกันของไซแลเนส บีตา-ไซโลสิเดส และแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิเดส ในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต พบว่าให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น 74 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,3 ของอะราบินอสที่เกาะกับไซแลนสายหลัก ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลน

Bezalel และคณะ (1993) ได้ทำการปรับปรุงประสิทธิภาพการฟอกเยื่อกระดาษของไซแลเนส T6 ที่ผลิตจาก *Bacillus stearothermophilus* L1 โดยทดลองให้มีการทำงานร่วมกันกับเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) อื่นๆ พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิเดสจาก *Bacillus stearothermophilus* L1 สามารถทำงานร่วมกับไซแลเนส T6 ได้ โดยสามารถปลดปล่อยลิกนินออกจากเยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ฟอกสีได้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน

Morales และคณะ (1995) ศึกษาการทำงานร่วมกันระหว่างไซแลเนส และแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิเดสที่ได้จาก *Bacillus polymyxa* พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิเดสสามารถย่อยสลายพันธะ แอลฟา-1,5 ของอะราบินโนไซแลนได้อะราบินโนส เมื่อมีไซแลเนสทำงานร่วมด้วย

Wood และ McCrae (1996) ศึกษาผลของการทำงานร่วมกันระหว่างเอนโด-1,4-บีตา-ดี-ไซแลเนสกับแอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิเดสจาก *Aspergillus awamori* พบว่าช่วยเพิ่มการปลดปล่อยอะราบินโนสของอะราบินโนไซแลนจากฟางข้าวโอ๊ตจาก 10.3 เป็น 42.2 เปอร์เซ็นต์ และช่วยเพิ่มการปลดปล่อยอะราบินโนสของอะราบินโนไซแลนจากฟางข้าวสาลีขึ้นจาก 10.2 เป็น 69.8 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

de Vries และคณะ (2000) ศึกษาการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน จาก *Aspergillus* ในการย่อยสลายเพนโตซานที่ไม่ละลายน้ำ (water insoluble pentosan) จากแป้งข้าวสาลี พบว่าเมื่อใช้เอนโดไซแลเนสร่วมกับแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส และอะราบิโนไซแลน อะราบิโนฟิวราโนไฮโดรเลส จะช่วยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น 2.5 และ 2 เท่า ตามลำดับ

Hashimoto และ Nakata (2003) ศึกษาการย่อยสลายอะราบิโนไซแลนด้วยเอนไซม์ผสม ซึ่งประกอบด้วยไซแลเนส บีตา-ไซโลซิเดส และแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดสที่ได้จาก *Aspergillus oryzae* HL15 ในภาวะที่เหมือนกับในถังหมักซีอิ้ว (soy sauce moromi mash) ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.0 และความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นอะราบิโนสและไซโลส

Rahman และคณะ (2003) ศึกษาบทบาทของไซแลเนส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดสและบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Penicillium* sp. AHT-1 ในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต พบว่าช่วยเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จาก 25 เป็น 61 เปอร์เซ็นต์ และลำดับในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการย่อยสลายไซแลนจะเริ่มจากแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส ตามด้วยไซแลเนส และสุดท้ายคือบีตา-ไซโลซิเดส

Tuncer และ Ball (2003) ศึกษาการทำงานร่วมกันของเอนโดไซแลเนส บีตา-ไซโลซิเดส และแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดสจาก *Thermomonospora fusca* BD25 ในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ เพิ่มขึ้นจากการใช้เอนโดไซแลเนสเพียงอย่างเดียวจาก 28.1 เป็น 58.1 เปอร์เซ็นต์ของสารตั้งต้น โดยได้ไซโลสและอะราบิโนสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

Koukiekolo และคณะ (2005) ศึกษาการทำงานร่วมกันของเฮมิเซลลูเลสคือ อะราบิโนฟิวราโนซิเดส A และไซแลเนส A จาก *Clostridium cellulovorans* ในการย่อยสลายไซแลนจากเซลลูโลส/อะราบิโนไซแลนและเส้นใยของข้าวโพด พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เพิ่มขึ้น 2.6 และ 2.3 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลรวมของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากแต่ละปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียว

Kambourova และคณะ (2006) ศึกษาการทำงานร่วมกันของไซแลเนสจาก *Anoxybacillus flavithermus* BC และบีตา-ไซโลซิเดส/แอลฟา-อะราบิโนซิเดสจาก *Sulfolobus solfataricus* Oα ในการย่อยสลายไซแลนจากไม้เบิร์ช ไม้บีช และเปลือกข้าวโอ๊ต พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ดังกล่าวร่วมกัน จะช่วยเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งในการย่อยสลายไซแลนจากไม้บีช จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด โดยสามารถย่อยสลายไซแลนได้ 32.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้

ไซแลเนสเพียงอย่างเดียว และเพิ่มขึ้นเป็น 63.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ปีตา-ไซโลสดีเอส/แอลฟา-อะราบิโนสดีเอสร่วมด้วย

เอนไซม์ที่ตัดพันธะแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดิก สามารถทำปฏิกิริยาร่วมกันกับไซแลเนส ในการย่อยสลายอะราบิโนไซแลน (Greve และคณะ, 1984) การทำงานร่วมกันระหว่างเอนโด-ไซแลเนส กับอะราบิโนฟิวราโนสดีเอส สามารถช่วยย่อยสลายอะราบิโนไซแลนในหญ้าได้ ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มความสามารถในการย่อยอาหารของสัตว์ (Graham และ Inborr, 1992)

และได้มีรายงานว่าแอสติลเอสเทอเรสมีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มประสิทธิภาพเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนสายหลักเช่น Biely และคณะ (1986) รายงานว่าการย่อยสลายไซแลนเกิดขึ้นรวดเร็วเมื่อปฏิกิริยาในแอสติลเอสเทอเรสและไซแลเนสที่ผลิตจาก *Schizophyllum commune* ให้ผลิตภัณฑ์คือ ไซโลส ไซโลโอลิโกเมอร์ และกรดแอสติค

Poutanen และคณะ (1990) ศึกษาถึงการทำงานของไซแลเนสร่วมกับแอสติลเอสเทอเรสจาก *Trichoderma reesei* พบว่าทั้งสองเอนไซม์ส่งเสริมซึ่งกันและกันในการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก โดยแอสติลเอสเทอเรสทำหน้าที่ดึงหมู่แอสติลออกจากไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นก่อนทำให้ไซแลเนสสามารถเข้าย่อยสลายไซแลนได้อย่างสมบูรณ์ และเมื่อใช้ไซแลเนส ปีตาไซโลสดีเอส และแอสติลเอสเทอเรสทำงานร่วมกันจะได้ปริมาณไซโลสมากที่สุด

Puls และคณะ (1991) ศึกษาลำดับการย่อยแอสติล-4-โอ-เมธิลกลูคูโรโนไซแลนจากไม้ปืชด้วยเอนไซม์ต่างๆ โดยเมื่อนำมาย่อยด้วยแอสติลเอสเทอเรสร่วมกับไซแลเนส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็น กรดแอสติค ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส เป็นส่วนใหญ่ และเมื่อปมด้วยแอสติลเอสเทอเรสก่อนแล้วตามด้วยไซแลเนส ได้ไซโลไบโอสเป็นส่วนใหญ่ และได้ไซโลสเพิ่มขึ้น แต่เมื่อนำไซแลนมาปมด้วยไซแลเนสก่อนก็สามารถช่วยให้แอสติลเอสเทอเรสทำงานได้ดีเช่นกัน แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดใหญ่ คือ ไซโลไตรโอส และไซโลโอลิโกเมอร์สายยาวที่ยังคงมีหมู่ข้างเคียงบางส่วนอยู่

Kormelink และคณะ (1993) รายงานว่าเมื่อนำไซแลนจากไม้เบิร์ชมาปมกับแอสติลเอสเทอเรสจาก *Aspergillus niger* เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีความสามารถสูงในการย่อยหมู่แอสติล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแอสติค 62 เปอร์เซ็นต์ (กำหนดให้ปริมาณหมู่แอสติลทั้งหมดในสับสเตรทเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นปมต่อด้วยเอนโดไซแลเนส I จาก *Aspergillus awamori* นาน 1 ชั่วโมง พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ คือ ไซโลโอลิโกเมอร์ต่างๆ เพิ่มขึ้น 5 เท่า และเมื่อปมต่อเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง พบว่าให้ไซโลโอลิโกเมอร์และไซโลสเพิ่มขึ้นเป็น 66 และ 4 เท่า ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับปมปฏิกิริยาในเอนโดไซแลเนส I เพียงชนิดเดียวนาน 1 ชั่วโมง และเมื่อนำไซแลนจากไม้เบิร์ชที่ถูกดึงหมู่แอสติลออกแล้วโดยแอสติลเอสเทอเรสมาปมกับปีตา-ไซโลสดีเอส นาน 24 ชั่วโมง ได้ไซโลสเพิ่มขึ้น 1.7 เท่า

Dupont และคณะ (1996) ศึกษาการทำงานร่วมกันของแอสีติลเอสเทอร์สกับไซแลเนส A และไซแลเนส B จาก *Streptomyces lividans* ในการย่อยสลายไซแลนจากไม้เบิร์ชที่มีการนำมาสังเคราะห์โดยเพิ่มหมู่แอสีติล พบว่าเมื่อนำไซแลนไปย่อยด้วยแอสีติลเอสเทอร์สก่อนเพื่อดึงหมู่แอสีติลออก แล้วตามด้วยไซแลเนสทำให้ไซแลนถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ แอสีติลเอสเทอร์สมีความจำเพาะกับ O-acetylated polysaccharide ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยเฮมิเซลลูโลสโดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนี้มีความสำคัญต่อการเจริญและการอยู่รอดในธรรมชาติของจุลินทรีย์

เฮมิเซลลูโลสในพืชมักมีหมู่แอสีติลเป็นองค์ประกอบปริมาณมาก โดยแอสีติลของไซแลนสามารถขัดขวางการย่อยสลายของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ และเป็นปัจจัยสำคัญต่อการย่อยลิกโนเซลลูโลสในลำไส้ของสัตว์ ดังนั้นการย่อยสลายหมู่แอสีติลออกจากสายไซแลนด้วยแอสีติลเอสเทอร์สจึงเป็นการเพิ่มความสามารถในการย่อยอาหารของสัตว์ได้ (Puls และคณะ, 1991)

แอสีติลเอสเทอร์สสามารถทำงานร่วมกับไซแลเนสในการฟอกสีเยื่อกระดาษ เนื่องจาก การย่อยสลายไซแลนในเยื่อกระดาษจะทำให้ลิกนินซึ่งเกาะกับไซแลนหลุดออกไปบางส่วน และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบนเส้นใยที่ทำให้ง่ายต่อการกำจัดลิกนินโดยสารฟอกขาว จึงช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีได้เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ และคลอรีน ส่งผลให้กระดาษมีความขาวและสว่างมากขึ้น (Paice และคณะ, 1992)

งานวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนที่ดำเนินมาอย่างต่อเนื่องในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รายงานถึงการผลิตไซแลเนส การทำให้บริสุทธิ์ และสมบัติของเอนไซม์จาก *Streptomyces* sp. PC22 (Ungchaitham และ Pinphanichakarn, 1998; Wateewuthajarn และ Pinphanichakarn, 2000) การผลิตปีตา-ไซโลสดีเดส การทำให้บริสุทธิ์ และสมบัติของเอนไซม์จาก *Streptomyces* sp. CH7 (Pinphanichakarn และคณะ, 2004) การผลิตแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนสดีเดส การทำให้บริสุทธิ์ และสมบัติของเอนไซม์จาก *Streptomyces* sp. PC22 (วิชุดา เหล่าเรืองธนา, 2547; ปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์, 2549) รวมถึงการผลิตแอสีติลเอสเทอร์ส การทำให้บริสุทธิ์ และสมบัติของเอนไซม์จาก *Streptomyces* sp. PC22 (เวฬุรีย์ ทองคำ, 2547; วัชรวิ ชุณหกุล, 2548)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เหล่านี้ในการย่อยสลายไซแลน รวมทั้งเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำวัสดุทางการเกษตรกลับคืนมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ด้วยกระบวนการหมักต่อไป (Chen, 1980)

## บทที่ 3

### อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

#### 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I บริษัท Beckman Coulter, Germany
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น Kubota 1920 บริษัท Kubota, Japan
4. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (Digital pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA และรุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer บริษัท PerkinElmer, Inc., USA
6. เครื่องชั่งรุ่น PG 2002-S, รุ่น PB 3002 และรุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
7. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25, บริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
8. ตู้เขี่ยเชื้อ Clean รุ่น V3-4 และรุ่น V6 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand
9. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส Mitsubishi Electric รุ่น MR-F56R-SL บริษัทกันยงอีเลคทริก จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W 200 และรุ่น WB 22 บริษัท Memmert, Germany
11. อ่างน้ำเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น GFL 1086 บริษัท Gesellschaft für Labortechnik Co., Ltd., Germany
12. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA

13. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 502-P บริษัท PMC, USA และรุ่น HS10-2 บริษัท Torrey Pines Scientific, Inc. USA
14. เครื่องโครมาโทกราฟี รุ่น Bio-Logic LP บริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
15. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง รุ่น Soronex RK 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
16. เครื่องดูดอากาศ รุ่น A-3S บริษัท Eyela, Japan
17. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
18. ตู้อบความร้อน รุ่น UL 80 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
19. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
20. สีมาไซโทมิเตอร์ บริษัท Schott Duran, Germany

### 3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (oat spelt xylan) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
2. ไซแลนจากไม้เบิร์ช (xylan from birchwood) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
3. ไซแลนจากไม้บีช (xylan from beechwood) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
4. พารา-ไนโตรฟีนิล แอซีเตต (*p*-nitrophenyl acetate) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
5. พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-xylopyranoside) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
6. พารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl  $\alpha$ -L-arabinofuranoside) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
7. พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
8. แมคโคร-เพรพ ดีอีเออี (Macro-Prep DEAE) บริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
9. ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite) บริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
10. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) บริษัท Merck, Germany
11. อะลูมินา (Alumina) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
12. โบวินซีรัมอัลบูมิน บริษัท Sigma Chemical Co., USA
13. ทริปติกซอยบรอต (Tryptic Soy Broth) บริษัท Difco Laboratories, USA
14. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland
15. สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland



16. พอลิเพปไทด์ (Polypeptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
17. แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) บริษัท Merck, Germany
18. กลูโคส (Glucose) บริษัท Merck, Germany
19. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) บริษัท Merck, Germany
20. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
21. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany
22. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany
23. กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท Merck, Germany
24. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Carlo Erba Reagenti, Italy
25. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, Germany
26. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
27. โซเดียมแอสซิเตต ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) บริษัท Merck, Germany
28. กรดแอสซิติค ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) บริษัท Merck, Germany
29. ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
30. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) บริษัท Merck, Germany
31. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคาไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany
32. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรตเตตระไฮเดรต ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany
33. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany
34. โซเดียมซัลเฟต ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) บริษัท Merck, Germany
35. แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany
36. กรดซัลฟูริก ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) บริษัท Merck, Germany
37. โซเดียมอาร์ซีเนต ( $\text{NaHAsO}_4$ ) บริษัท Ajax Chemicals, Australia
38. โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) บริษัท Merck, Germany
39. สารละลายโฟลีน ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin phenol reagent) บริษัท Merck, Germany

### 3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.3.1 การเตรียมไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC22

3.3.1.1 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 เพื่อผลิตไซแลเนส (Wateewuthajarn และ Pinphanichakarn, 2000)

*Streptomyces* sp. PC22 ผลิตไซแลเนส 2 ชนิด คือ ไซแลเนส I ซึ่งสร้างในปริมาณต่ำ และไซแลเนส II ซึ่งสร้างปริมาณสูง (Wateewuthajarn และ Pinphanichakarn, 2000) งานวิจัยนี้จะใช้ไซแลเนส II ในการศึกษาการทำงานร่วมกับเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนชนิดอื่นๆ

##### 3.3.1.1.1 การเตรียมสปอร์ *Streptomyces* sp. PC22

ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารแข็งเอียงข้าวไรย์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จนสายใยเจริญเต็มที่ และนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 วัน จนสปอร์แก่เป็นสีเทา จึงนำมาชุดสปอร์ออกโดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวแขวนลอย ชุดสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองผ่านชุดกรองสปอร์ นำสปอร์แขวนลอยที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างสปอร์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บเป็นปริมาตรน้อย ๆ (aliquots) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

##### 3.3.1.1.2 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22

1. ถ่ายสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ความเข้มข้น  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริพติกซอยบรอต (Tryptic soy broth, TSB) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

2. ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม (Xylan complex medium) สำหรับผลิตไซแลเนส (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดดัดสปริงอยู่ใน บ่ม เชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

3. นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกไม่ซีเลียมและกากอาหารที่เหลือออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอกติวิตี และปริมาณโปรตีนของไซแลเนสเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

**3.3.1.2 การทำไซแลเนส II ให้บริสุทธิ์** (Ungchaitham และ Pinphanichakarn, 1998; Wateewuthajarn และ Pinphanichakarn, 2000)

3.3.1.2.1 การทำไซแลเนส II ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1.1.2 มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งกวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) กวนสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกตะกอนออกจากส่วนน้ำใสด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบ โดยใช้ปริมาตรน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด โดอะไลต์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ครั้งสุดท้ายโดอะไลต์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก วัดปริมาณ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอกติวิตีของไซแลเนส

3.3.1.2.2 การทำไซแลเนส II ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรป ดีอีเออี (Macro-Prep DEAE)

ล้างสารแขวนลอยแมคโคร-เพรป ดีอีเออี ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆ แล้วปล่อยให้เจลอนอนกัน เทส่วนน้ำใสซึ่งพร้อมกับเจลละเอียดที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลายๆครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ แต่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5

นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยการดูดเอาอากาศออกประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 28 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 50 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆ ใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์จากข้อ 3.3.1.2.1 ลงบนผิวหน้าเจล ชะโปรตีนที่ไม่ถูกจับกับแมคโคร-เพรบ ดีอีเออี ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิมซึ่งไซแลเนส I ไม่สามารถจับกับแมคโคร-เพרב ดีอีเออี จึงถูกแยกออกจากไซแลเนส II ในขั้นตอนนี้ (Wateewuthajarn และ Pinphanichakarn, 2000) ติดตามโปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลออกโดยใช้ 0-1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรดเยนทีน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 2.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของไซแลเนสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมเอาลำดับส่วนที่พบแอกติวิตีของไซแลเนส II เข้าด้วยกัน ซึ่งจะถูกระบายออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 150 ถึง 300 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube ซึ่งมีเมมเบรนที่มีการตัดขนาดโมเลกุล (Molecular weight cut off) 10,000 ดาลตัน แล้วนำตัวอย่างไปไดอะไลซิสใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 เป็นเวลาข้ามคืน สุดท้ายนำไปไดอะไลซิสใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ละลายใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอกติวิตีของไซแลเนส

### 3.3.1.3 การวิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนส

การตรวจวิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนสดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakajima และคณะ (1984) โดยการวัดปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เกิดจากการย่อยสลายไซแลน ซึ่งสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย

0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมแอสซิเตต บัฟเฟอร์ pH 6.5

0.8 มิลลิลิตร ของ 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมแอสซิเตต บัฟเฟอร์ pH 6.5

0.2 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi (1952) และ Nelson (1944)

### 3.3.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi (1952) และ Nelson (1944)

นำสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วต้มในอ่างน้ำเดือด 15 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นทันที จากนั้นเติมสารละลายเนลสัน (Nelson's reagent) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของไซโลสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในภาคผนวก ค หมายเลข 1.1)

1 หน่วยของไซแลเนส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดลอง

### 3.3.1.5 การศึกษาสมบัติของไซแลเนส II จาก *Streptomyces* sp. PC22

#### 3.3.1.5.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลเนส II

วิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนส II ในปริมาณที่เท่าๆ กัน ตามวิธีการในข้อ 3.3.1.3 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มในช่วง 35-80 องศาเซลเซียส

#### 3.3.1.5.2 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลเนส II

วิเคราะห์แอกติวิตีของไซแลเนส II ในปริมาณที่เท่าๆ กัน ตามวิธีการในข้อ 3.3.1.3 โดยแปรผันความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ในปฏิกิริยาให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดต่างต่างๆ ดังนี้

ไซเดียมแอสซิเตต บัฟเฟอร์ในช่วง 4.0-6.0

ไซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ในช่วง 6.0-8.0

ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ในช่วง 8.0-9.0

### 3.3.2 การเตรียมปีตา-ไซโลสิดีสจาก *Streptomyces* sp. CH7

3.3.2.1 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. CH7 เพื่อผลิตปีตา-ไซโลสิดีสภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ตามรายงานของ Pinphanichakarn และคณะ (2004)

#### 3.3.2.1.1 การเตรียมสปอร์ *Streptomyces* sp. CH7

ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. CH7 ในอาหารแข็งเอียงข้าวไรย์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จนสายใยเจริญเต็มที่ และนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 วัน จนสปอร์แก่เป็นสีเทา จึงนำมาขูดสปอร์ออกโดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวแขวนลอย ดูดสปอร์แขวนลอยที่ได้มากรองผ่านชุดกรองสปอร์ นำสปอร์แขวนลอยที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างสปอร์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บเป็นปริมาตรน้อยๆ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

#### 3.3.2.1.2 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. CH7 เพื่อผลิตปีตา-ไซโลสิดีส

1. ถ่ายสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *Streptomyces* sp. CH7 ความเข้มข้น  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริพิติกชอยบรอก pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดดัดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง
2. ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม pH 7.0 สำหรับผลิตปีตา-ไซโลสิดีส (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดดัดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. กรองเซลล์ *Streptomyces* sp. CH7 ที่เลี้ยงได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ล้างเซลล์ด้วยน้ำหลายๆครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาเตรียมปีตา-ไซโลสิดีส ตามวิธีที่

ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Nakanishi และคณะ (1987) โดยนำเซลล์ที่ได้มาทำให้แตกโดยบดรวมกับผงอะลูมินาในโถรงด้วยอัตราส่วนน้ำหนักเซลล์เปียกต่อผงอะลูมินาเท่ากับ 1 ต่อ 1 จากนั้นเติม 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมแอสซิเตต บัฟเฟอร์ pH 6.5 เพื่อเป็นตัวทำละลาย นำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอกติวิตีของปีตา-ไซโลลิเดส และปริมาณโปรตีนเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

### 3.3.2.2 การวิเคราะห์แอกติวิตีของปีตา-ไซโลลิเดส

การตรวจวิเคราะห์แอกติวิตีของปีตา-ไซโลลิเดสเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Nakanishi และคณะ (1987) โดยสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย

25 ไมโครลิตร ของสารละลายพารา-ไนโตรฟีนอล ปีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-xylopyranoside) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายอยู่ใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมแอสซิเตต บัฟเฟอร์ pH 6.5

100 ไมโครลิตร ของ 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมแอสซิเตต บัฟเฟอร์ pH 6.5

125 ไมโครลิตร ของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 1.25 มิลลิลิตร ของ 0.5 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม นำไปวัดปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอลที่ถูกปล่อยออกมาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้พารา-ไนโตรฟีนอลความเข้มข้นในช่วง 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.2)

1 หน่วยของปีตา-ไซโลลิเดส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายพารา-ไนโตรฟีนอล ปีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ แล้วให้พารา-ไนโตรฟีนอล 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดลอง

### 3.3.2.3 การศึกษาสมบัติของปีตา-ไซโลลิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7

#### 3.3.2.3.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของปีตา-ไซโลลิเดส

วิเคราะห์แอกติวิตีของปีตา-ไซโลลิเดส ในปริมาณที่เท่าๆ กัน ตามวิธีการในข้อ 3.3.2.2 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มในช่วง 35-70 องศาเซลเซียส

### 3.3.2.3.2. ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไฮโดลิตเดส

วิเคราะห์แอกติวิตีของบีตา-ไฮโดลิตเดส ในปริมาณที่เท่าๆ กัน ตามวิธีการในข้อ 3.3.2.2 โดยแปรผันความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ในปฏิกิริยาให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดต่างต่างๆ ดังนี้

โซเดียมแอสซิเตต บัฟเฟอร์ในช่วง 4.0-6.0

โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ในช่วง 6.0-8.0

ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ในช่วง 8.0-9.0

### 3.3.3 การเตรียมแอลฟา-แอล-อะราบินโนสิเตสจาก *Streptomyces* sp. PC22

3.3.3.1 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 เพื่อผลิตแอลฟา-แอล-อะราบินโนสิเตส ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ตามรายงานของวิซุตา เหล่าเรื่องธนา (2547)

เตรียมหัวเชื้อโดยถ่ายสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ความเข้มข้น  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริพิติก ซอยบรอก pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดสดสปริงอยู่ใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ มีเดียม สำหรับผลิตแอลฟา-แอล-อะราบินโนสิเตส (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดสดสปริงอยู่ใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำตัวอย่างที่ได้มาปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมและกากอาหารที่เหลือออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอกติวิตีและปริมาณโปรตีนแอลฟา-แอล-อะราบินโนสิเตสเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



### 3.3.3.2 การทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেসให้บริสุทธิ์ ตามรายงานของ ปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์ (2548)

#### 3.3.3.2.1 การทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেসให้บริสุทธิ์โดยการ ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.3.1 มาตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-90 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งกวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก กวนสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกตะกอนออกจากส่วนน้ำใสด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ แลกเปลี่ยนไอออนลบ โดยใช้ปริมาณน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลซิสข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ครึ่งสุดท้ายไดอะไลซิสใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก วัดปริมาณ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেস

#### 3.3.3.2.2 การทำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেসให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนแมคโคร-เพรบบ ดีอีเออี

บรรจุแมคโคร-เพรบบ ดีอีเออีที่แขวนลอยใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 28 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 50 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆ ใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-90 เปอร์เซ็นต์จากข้อ 3.3.3.2.1 ลงบนผิวหน้าเจล ชะโปรตีนที่ไม่ถูกจับกับแมคโคร-เพรบบ ดีอีเออี ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจล ออกโดยใช้ 0-1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรดเดียนทีใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 2.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেসและไซแลเนสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมเอาลำดับส่วนที่พบแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดেসเข้าด้วยกัน ทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้นโดยวิธี concentrating centrifugation

ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube ซึ่งมีเมมเบรนที่มีการคัดขนาดโมเลกุล 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำตัวอย่างไปไดอะไลซิสใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเวลาข้ามคืน สุดท้ายนำไปไดอะไลซิสใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ละลายใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนซิเดส

### 3.3.3.2.3 การทำแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนซิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์ (Hydroxyapatite)

แช่ไฮดรอกซีอะปาไทด์ใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชั่วโมง เทส่วนน้ำใส่พร้อมเจลละเอียดทิ้ง ทำเช่นนี้หลายๆ ครั้ง จนไม่มีเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยการดูดเอาอากาศออกประมาณ 20-30 นาที บรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร สูง 9.5 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 3.7 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์แมคโคร-เพป ดีอีเออี ในข้อ 3.3.3.2.2 มาผ่านลงคอลัมน์ ซะโปรตีนที่ไม่จับคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม จากนั้นจึงชะโปรตีนที่ถูกจับด้วยไฮดรอกซีอะปาไทด์ออกจากคอลัมน์โดยการเพิ่มความเข้มข้นจาก 20-500 มิลลิโมลาร์ ของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนซิเดสในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่พบแอกติวิตีของเอนไซม์เข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที วัดปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของเอนไซม์

### 3.3.3.3 การวิเคราะห์แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนซิเดส

การตรวจวิเคราะห์แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนซิเดสเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Manin และคณะ (1994) โดยสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย

25 ไมโครลิตร ของสารละลายพารา-ไนโตรฟีนิล-แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายอยู่ใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0

200 ไมโครลิตร ของ 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0

25 ไมโครลิตร ของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 มิลลิลิตร ของ 500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม นำไปวัดปริมาณพารา-ไนโตรฟินอล ที่ถูกปล่อยออกมาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้พารา-ไนโตรฟินอล ความเข้มข้นในช่วง 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.3)

1 หน่วยของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย พารา-ไนโตรฟินิล แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ แล้วให้พารา-ไนโตรฟินอลปริมาตร 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดลอง

### 3.3.3.4 การศึกษาสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์จาก *Streptomyces* sp. PC22

3.3.3.4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

วิเคราะห์แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ ในปริมาณที่เท่าๆ กัน ตามวิธีการในข้อ 3.3.3.3 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มในช่วง 35-80 องศาเซลเซียส

3.3.3.4.2. ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์

วิเคราะห์แอกติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนไซด์ในปริมาณที่เท่าๆ กัน ตามวิธีการในข้อ 3.3.3.3 โดยแปรผันความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ในปฏิกิริยาให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดต่างๆ ดังนี้

โซเดียมแอสซีเตต บัฟเฟอร์ในช่วง 4.0-6.0

โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ในช่วง 6.0-8.0

ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ในช่วง 8.0-9.0

### 3.3.4 การเตรียมแอสซีติลเอสเทอร์จาก *Streptomyces* sp. PC22

3.3.4.1 การเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 เพื่อผลิตแอสซีติลเอสเทอร์ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ตามรายงานของเวฟุริย์ ทองคำ (2547)

เตรียมหัวเชื้อโดยถ่ายสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ความเข้มข้น  $2 \times 10^8$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริพิติก ซอยบรอก pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดดัดสปริงอยู่ใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ มีเดียม สำหรับผลิตแอสซีติลเอสเทอร์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขวดดัดสปริงอยู่ใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำตัวอย่างที่ได้มาปั่นเหวี่ยงแยกไมซีเลียมและกากอาหารที่เหลือออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอสซีติลเอสเทอร์และปริมาณโปรตีนของแอสซีติลเอสเทอร์ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.4.2 การทำแอสซีติลเอสเทอร์ให้บริสุทธิ์ ตามรายงานของวัชรีย์ ชุณหกุล (2548)

3.3.4.2.1 การทำแอสซีติลเอสเทอร์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.4.1 มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-90 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งกวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก กวนสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกตะกอนออกจากส่วนน้ำใสด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบ โดยใช้ปริมาณน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมดไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ครั้งสุดท้ายไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส

บัฟเฟอร์ pH 7.5 เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก วัดปริมาณ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอกติวิตีของแอสติลเอสเทอเรส

3.3.4.2.2 การทำแอสติลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน แมคโคร-เพรบบ ดีอีเออี

บรรจุแมคโคร-เพรบบ ดีอีเออีที่แขวนลอยใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 28 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 50 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 2-3 เท่า ของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆ ใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการ ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-90 เปอร์เซ็นต์จากข้อ 3.3.4.2.1 ลงบนผิวหน้าเจล ชะ โปรตีนที่ไม่ถูกจับกับแมคโคร-เพรบบ ดีอีเออี ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ติดตามโปรตีนโดย การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จากนั้นจึงชะโปรตีนที่ จับอยู่กับเจล ออกโดยใช้ 0-1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรดเคมิกัลใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 2.0 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของแอสติลเอสเทอเรสและไซแลเนส ในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมเอาลำดับส่วนที่พบแอกติวิตีของแอสติลเอสเทอเรสเข้าด้วยกัน ทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้นโดยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube ซึ่งมีเมมเบรนที่มีการคัดขนาดโมเลกุล 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำตัวอย่างไป ไดอะไลส์ใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเวลาข้ามคืน สุดท้ายนำไป ไดอะไลส์ใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่ละลายใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง วัดปริมาณของสารละลายที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอกติวิตี ของแอสติลเอสเทอเรส

3.3.4.2.3 การทำแอสติลเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์

บรรจุไฮดรอกซีอะปาไทด์ที่แขวนลอยใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร สูง 9.5 เซนติเมตร ปริมาตร เจล 3.7 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ด้วยอัตรา การไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์แมคโคร-เพรบบ ดีอีเออีจากข้อ 3.3.4.2.2 มาผ่านลงคอลัมน์ ชะโปรตีนที่ไม่จับคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม จากนั้นจึงชะโปรตีนที่

ถูกจับด้วยไฮดรอกซีอะปาไทด์ออกจากคอลัมน์โดยการเพิ่มความเข้มข้นจาก 20-500 มิลลิโมลาร์ของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลำดับส่วนละ 1.0 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของแอสีติลเอสเทอร์ในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่พบแอกติวิตีของเอนไซม์เข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที วัดปริมาณ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของเอนไซม์

### 3.3.4.3 การวิเคราะห์แอกติวิตีของแอสีติลเอสเทอร์

การตรวจวิเคราะห์แอกติวิตีของแอสีติลเอสเทอร์เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Kormelink และคณะ (1993) โดยสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย

0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายพารา-ไนโตรฟินิล แอสีเตต (*p*-nitrophenyl acetate) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายใน 50 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล

0.1 มิลลิลิตร ของ 0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5

0.3 มิลลิลิตร ของน้ำกลั่น

0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที นำไปวัดปริมาณพารา-ไนโตรฟินอลที่ถูกปล่อยออกมาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้ พารา-ไนโตรฟินอล ความเข้มข้นในช่วง 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1.4)

1 หน่วยของแอสีติลเอสเทอร์ เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายพารา-ไนโตรฟินิล แอสีเตต แล้วให้พารา-ไนโตรฟินอล 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดลอง

### 3.3.4.4 การศึกษาสมบัติของแอสีติลเอสเทอร์จาก *Streptomyces* sp. PC22

#### 3.3.4.4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอสีติลเอสเทอร์

วิเคราะห์แอกติวิตีของแอสีติลเอสเทอร์ ในปริมาณที่เท่าๆ กัน ตามวิธีการในข้อ 3.3.4.3 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการปฏิกิริยาในช่วง 35-75 องศาเซลเซียส

#### 3.3.4.4.2 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอสีติลเอสเทอเรส

วิเคราะห์แอสีติลเอสเทอเรส ในปริมาณที่เท่าๆ กัน ตามวิธีการในข้อ 3.3.4.3 โดยแปรผันความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ในปฏิกิริยาให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดต่างต่างๆดังนี้

โซเดียมแอสีเตต บัฟเฟอร์ในช่วง 4.0-6.0

โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ในช่วง 6.0-8.0

ทริส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ในช่วง 8.0-9.0

#### 3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยนำสารละลายตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.3) 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วเติมสารละลาย D (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.4) 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

#### 3.3.6 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อการย่อยสลายไซแลน

##### 3.3.6.1 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิด

แปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.3 ให้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและจากไม้เบิร์ชความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสับสเตรต

บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่ทุกเอนไซม์ทำงานได้ในเกณฑ์ที่มีประสิทธิภาพสูง (Wateewuthajarn และ Pinphanichakarn, 2000; Pinphanichakarn และคณะ, 2004; วชิรี ชูณห์กุล, 2548; ปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์, 2549)

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของไซโลสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในภาคผนวก ค หมายเลข 1.1)

### 3.3.6.2 ผลของระยะเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด

แปรผันเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.3 ให้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและจากไม้เบิร์ชความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นสับสเตรต และใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.3.6.1

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในไซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่ทุกเอนไซม์ทำงานได้ในเกณฑ์ที่มีประสิทธิภาพสูง (Wateewuthajarn และ Pinphanichakarn, 2000; Pinphanichakarn และคณะ, 2004; วัชรวิฑูรย์กุล, 2548; ปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์, 2549)

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของไซโลสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในภาคผนวก ค หมายเลข 1.1)

### 3.3.7 การทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลสิดีส แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีส และแอสติลเอสเทอร์สในการย่อยสลายไซแลน และวัสดุทางการเกษตร

วัสดุทางการเกษตรที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้ เปลือกข้าวโพด ชังข้าวโพด รำข้าวเจ้า ฟางข้าวเจ้า ขี้เลื่อย ชุยมะพร้าว และชานอ้อย โดยวัสดุเหล่านี้ผ่านการอบแห้ง บด และร่อนด้วยตะแกรงขนาด 60 เมช

ทำการทดลองโดยให้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ช ไม้ปืช และวัสดุทางการเกษตรความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นสับสเตรต และใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.3.6.1 และ 3.3.6.2 ซึ่งใน 1 มิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยามีส่วนประกอบดังนี้

0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายไซแลนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0

0.8 มิลลิลิตร ของ 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0

0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ (เอนไซม์เดี่ยวหรือเอนไซม์รวมที่ความเข้มข้น 0.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร)



นำส่วนผสมนี้ไปป่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนน้ำใสไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของไซโลส ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในภาคผนวก ค หมายเลข 1.1)

### 3.3.8 ศึกษาลำดับการทำงานของเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่ง

โดยเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายหลักคือ ไซแลเนส II และบีตา-ไซโลสิเดส และเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่งคือ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสและแอกซีติลเอสเทอเรส

ทำการทดลองตามวิธีการของ Murashima และคณะ (2003) โดยใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ช ไม้บีช และวัสดุทางการเกษตรคือ เปลือกข้าวโพดและขังข้าวโพด ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสับสเตรต และใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.3.6.1 และ 3.3.6.2 จากนั้นเปรียบเทียบการย่อยสลายไซแลนโดยปฏิกิริยา simultaneous หรือ sequential ดังแสดงผังขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้

ปฏิกิริยา simultaneous		ปฏิกิริยา sequential	
ปฏิกิริยาที่ 1	ปฏิกิริยาที่ 2	ปฏิกิริยาที่ 1	ปฏิกิริยาที่ 2
XII+Xyl+AFase+AE	-	XII+Xyl	AFase+AE
ปฏิกิริยาควบคุมของ simultaneous		AFase+AE	XII+Xyl
XII	-	ปฏิกิริยาควบคุมของ sequential	
Xyl	-	XII+Xyl	-
AFase	-	-	XII+Xyl
AE	-	AFase+AE	-
-	-	-	AFase+AE
กำหนดให้	XII	แทน	ไซแลเนส II
	Xyl	แทน	บีตา-ไซโลสิเดส
	AFase	แทน	แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส
	AE	แทน	แอกซีติลเอสเทอเรส
	-	แทน	ไม่เติมเอนไซม์

ใน 1 มิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยามีส่วนประกอบดังนี้

0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายสับสเตอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0

0.8 มิลลิลิตร ของ 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0

0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ (เอนไซม์เดี่ยวหรือเอนไซม์รวมที่ความเข้มข้น 0.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

นำส่วนผสมที่เติมเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่ 1 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่ 2 บ่มต่อที่ภาวะเดียวกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของไซโลสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในภาคผนวก ค หมายเลข 1.1)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 เตรียมไซแลเนส II แอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนไซด์ และแอสซิติลเอสเทอร์สจาก *Streptomyces* sp. PC22 และปีตา-ไซโลไซด์จาก *Streptomyces* sp. CH7

งานวิจัยนี้ศึกษาการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนโดยใช้ไซแลเนส II แอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนไซด์ และแอสซิติลเอสเทอร์สจาก *Streptomyces* sp. PC22 ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 อยู่ในกลุ่มที่สร้างและถูกปล่อยออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ดังนั้นจึงต้องทำเอนไซม์ดังกล่าวให้บริสุทธิ์ก่อน โดยไซแลเนส II ทำตามรายงานของ Watewuthajarn และ Pinphanichakarn (2000) แอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนไซด์ทำตามรายงานของ ปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์ (2549) และแอสซิติลเอสเทอร์สทำตามรายงานของ วัชรวิ ชุณหกุล (2548) ส่วนปีตา-ไซโลไซด์เป็นเอนไซม์จาก *Streptomyces* sp. CH7 ซึ่งสร้างและถูกเก็บไว้ในเซลล์ (intracellular) จึงเตรียมเอนไซม์นี้ในระดับ cell free extract ตามรายงานของ Pinphanichakarn และคณะ (2004) แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดที่เตรียมได้สรุปในตารางที่ 4.1

#### ตารางที่ 4.1 แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิด

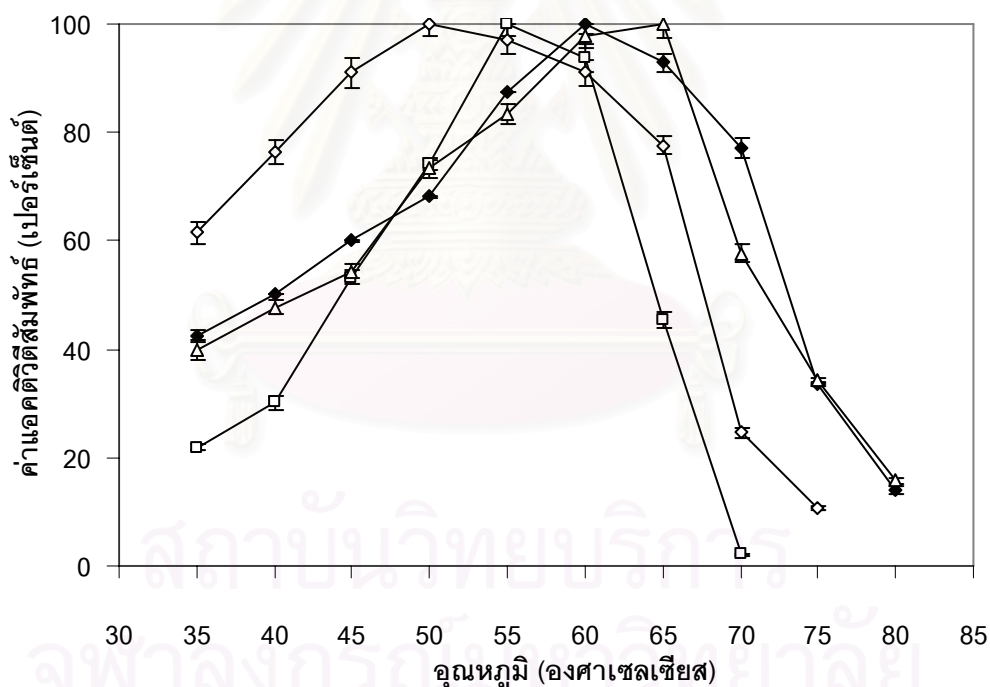
ชนิดของเอนไซม์	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
ไซแลเนส II	7.06
ปีตา-ไซโลไซด์	1.24
แอลฟา-แอล-อะราบีโนพิวราโนไซด์	12.97
แอสซิติลเอสเทอร์ส	9.03

## 4.2 สมบัติของไซแลเนส II แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ และแอสีติลเอสเทอร์ จาก *Streptomyces* sp. PC22 และบีตา-ไซโลไซด์จาก *Streptomyces* sp. CH7

ในการทำงานร่วมกันของเอนไซม์นั้น ถ้าจะให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดทุกเอนไซม์ควรทำงาน อยู่ภายใต้ภาวะเหมาะสม ดังนั้นการทดลองนี้จึงนำเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตรวจยืนยันภาวะ เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด เพื่อเลือกภาวะที่ดีที่สุดที่ทุกเอนไซม์สามารถ ทำงานร่วมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### 4.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ทุกชนิดที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 มาทำปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่แปร อุณหภูมิปฏิกิริยาต่างๆ กัน ในช่วงประมาณ 35 ถึง 80 องศาเซลเซียส ได้ผลการทดลองแสดง ดังรูปที่ 4.1



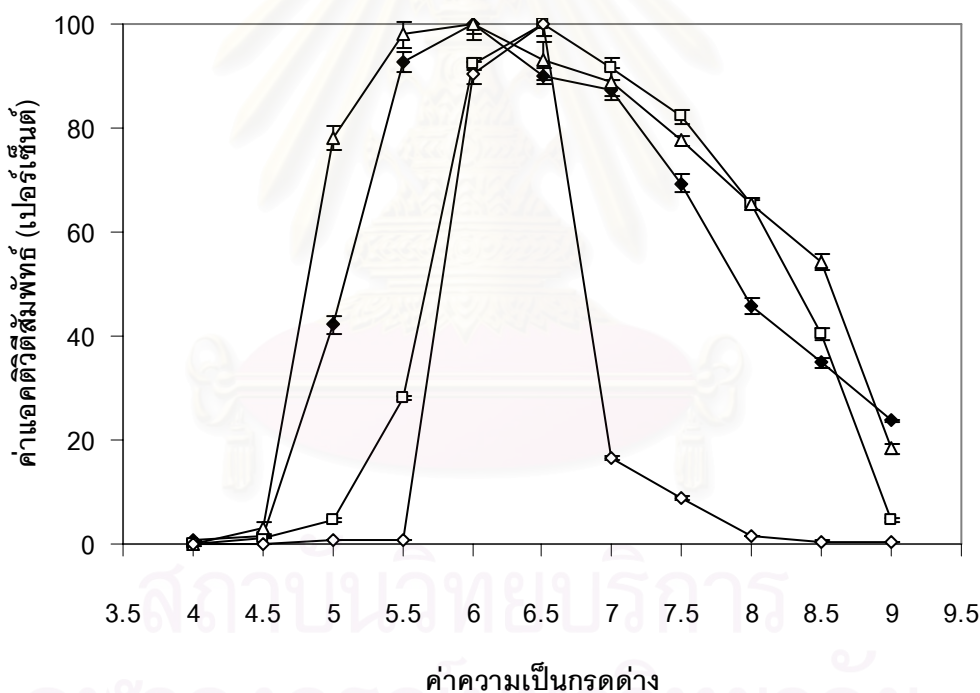
รูปที่ 4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลเนส II (◆) แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ (△) และแอสีติลเอสเทอร์ (◇) จาก *Streptomyces* sp. PC22 และบีตา-ไซโลไซด์ (□) จาก *Streptomyces* sp. CH7

กำหนดให้แอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

จากรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าทุกเอนไซม์มีช่วงอุณหภูมิเหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงคาบเกี่ยวกันโดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าเป็นอุณหภูมิที่ไซแลเนส II ให้แอกติวิตีสูงสุด ขณะที่ปีตา-ไซโลลิดีส แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนลิดีส และแอสีติลเอสเทอเรส สามารถทำงานได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการศึกษาการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เหล่านี้จึงจะเลือกใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในการบ่มปฏิกิริยา

#### 4.2.2 ผลของความเป็นกรดต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 มาหาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน โดยการทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่แปรความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0-9.0 และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลเนส II (◆) แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนลิดีส (Δ) และแอสีติลเอสเทอเรส (◇) จาก *Streptomyces* sp. PC22 และปีตา-ไซโลลิดีส (□) จาก *Streptomyces* sp. CH7

กำหนดให้แอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

จากรูปที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 ของโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ เป็นค่าที่ไซแลเนส II และแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟิวราโนลิดีสให้แอกติวิตีสูงสุด อย่างไรก็ตามปีตา-

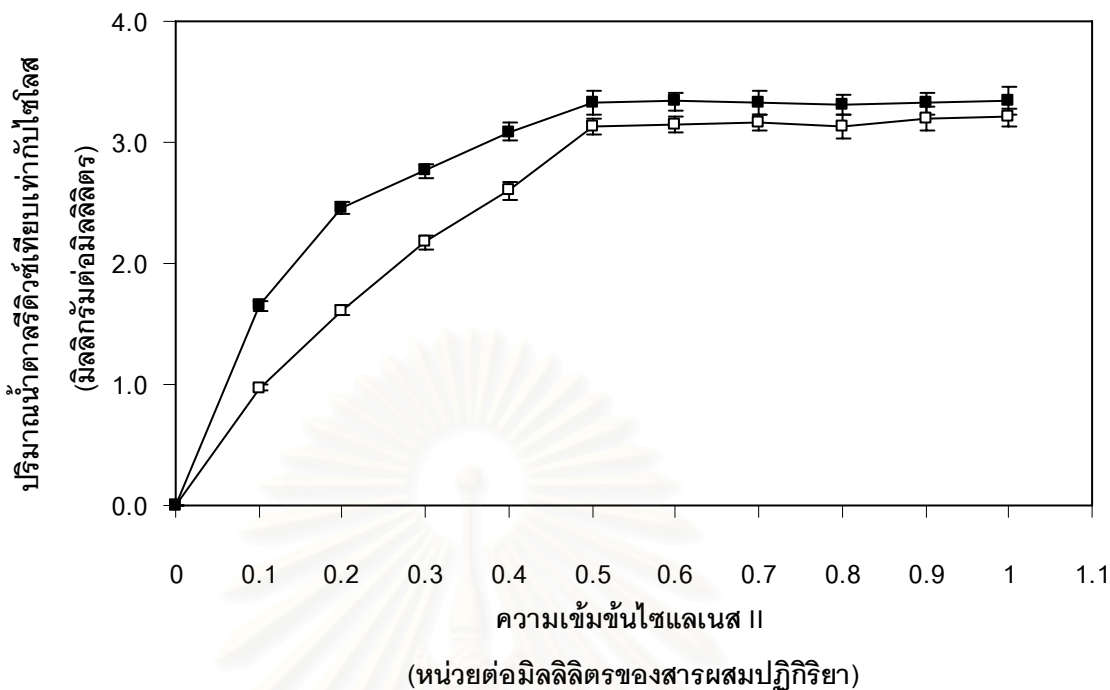
ไฮโดลิตีเดสและแอสซีติลเอสเทอเรสสามารถทำงานได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการศึกษาการทำงานร่วมกันของเอนไซม์จึงใช้โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0

#### 4.3 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อการย่อยสลายไซแลน

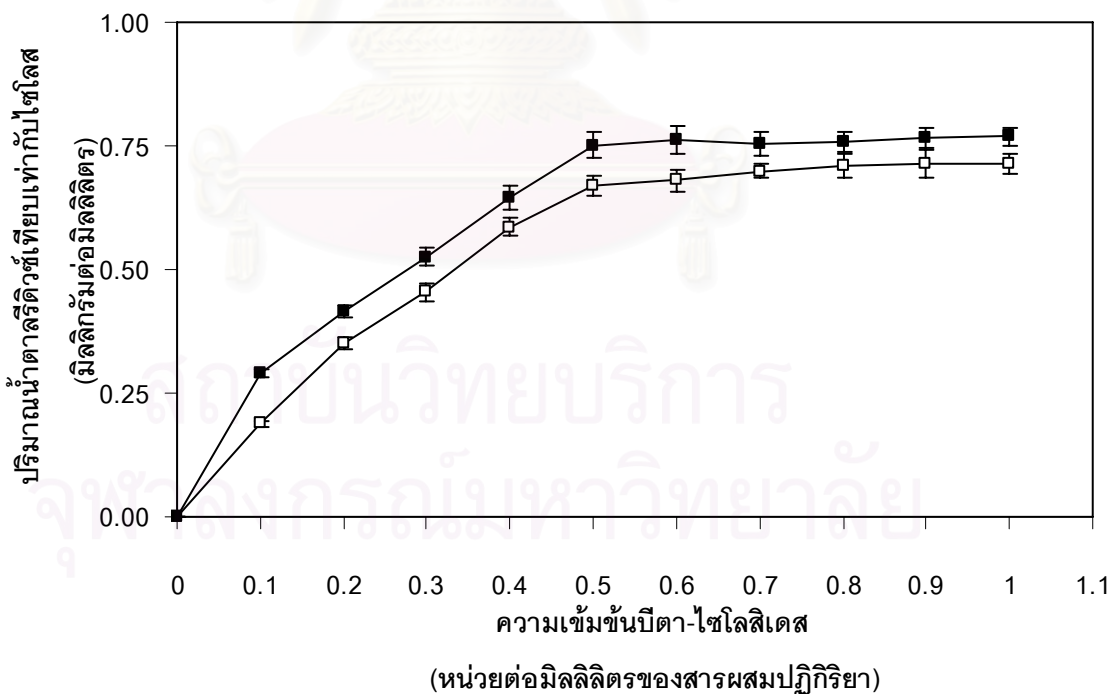
ในการทดลองนี้จะหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิด และระยะเวลาบ่มปฏิกิริยาเมื่อใช้สับสเตรตเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยา โดยสับสเตรตที่ใช้คือ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตใช้เป็นตัวแทนไซแลนในกลุ่มไม้เนื้ออ่อนรวมทั้งจากเปลือกถั่วพีช และไซแลนจากไม้เบิร์ชใช้เป็นตัวแทนไซแลนในกลุ่มไม้เนื้อแข็ง

##### 4.3.1 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อการย่อยสลายไซแลน

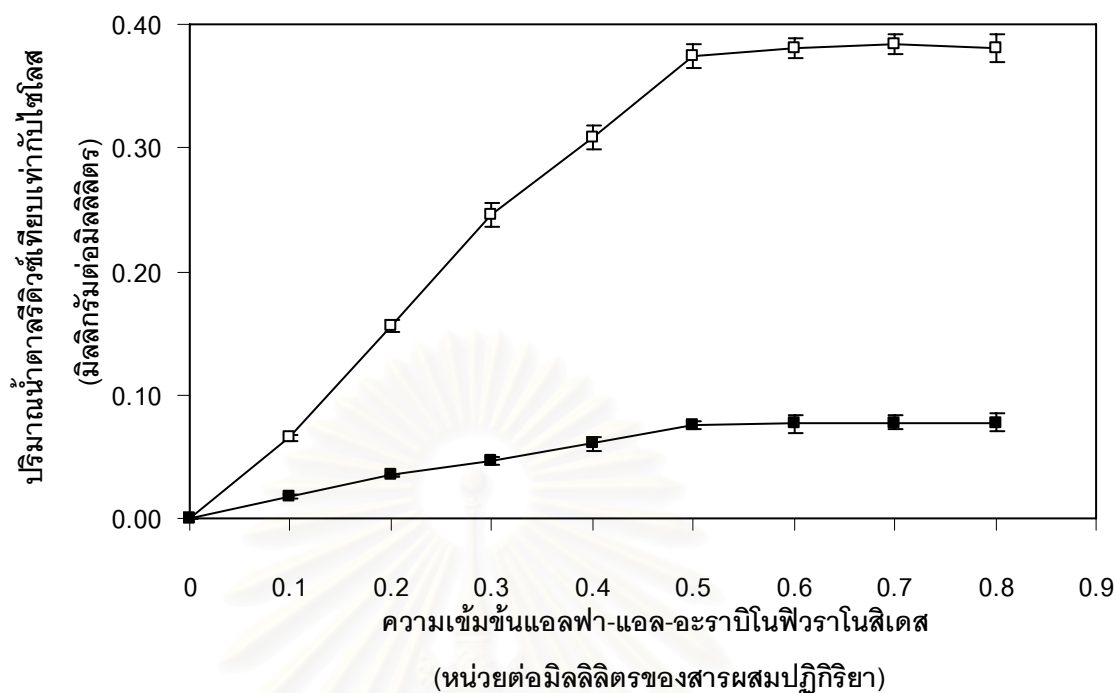
นำเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 มาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำงานของแต่ละเอนไซม์ โดยแปรผันความเข้มข้นในช่วง 0-1 หน่วยต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยา ในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ชที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยา ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมคือบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่ทุกเอนไซม์ทำงานได้ในเกณฑ์ที่มีประสิทธิภาพสูง บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.3-4.6



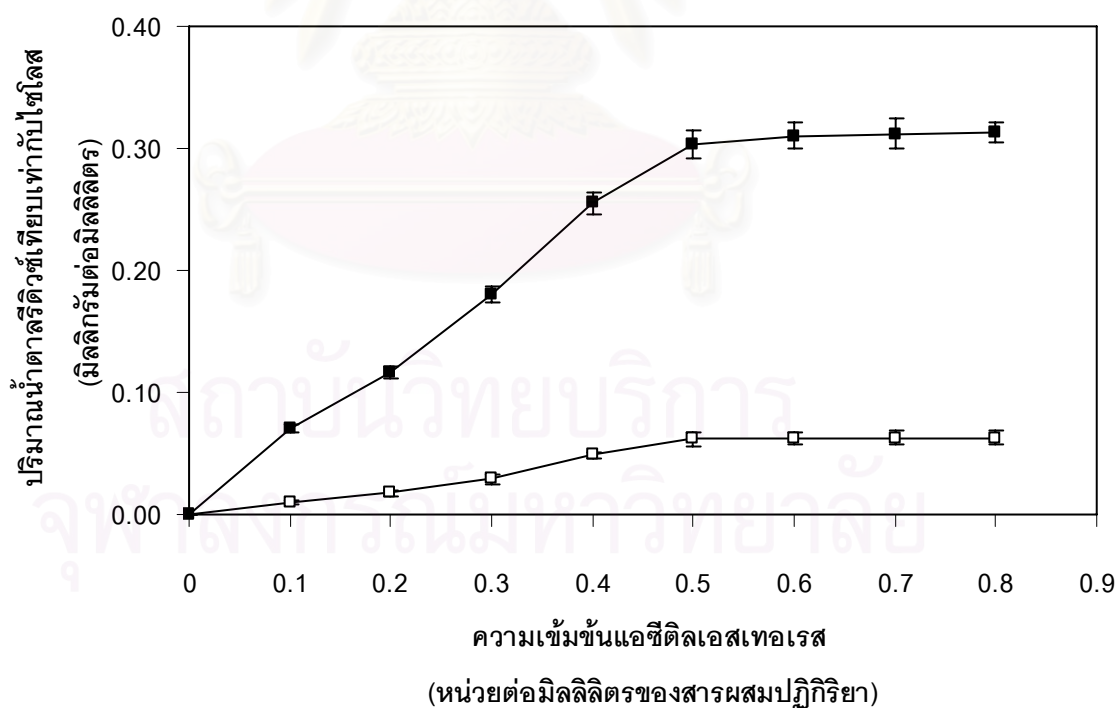
รูปที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นของไซแลเนส II ต่อการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (□) และไม้เบิร์ช (■)



รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของปีตา-ไซโลสิดีสต่อการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต(□) และไม้เบิร์ช (■)



รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของแอลฟา-แอลอะราบิโนฟิวราโนไซด์ต่อการย่อยสลายไซลันจากเปลือกข้าวโอ๊ต (□) และไม้เบิร์ช (■)



รูปที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นของแอซีติลเอสเทอร์ต่อการย่อยสลายไซลันจากเปลือกข้าวโอ๊ต (□) และไม้เบิร์ช (■)

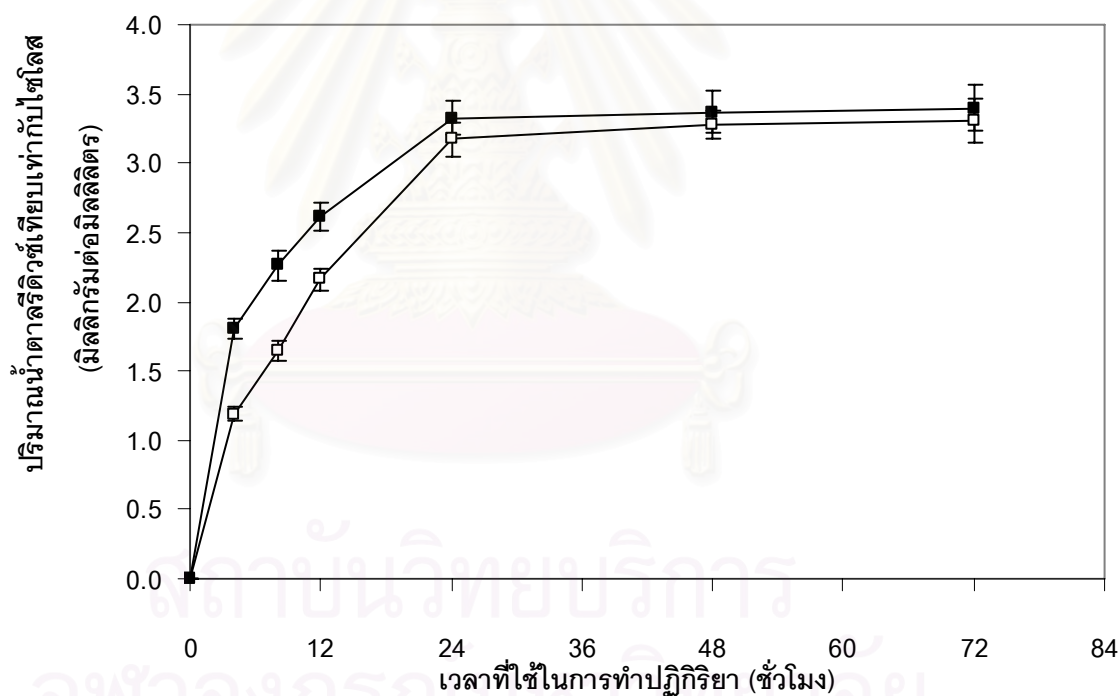


จากรูปที่ 4.3-4.6 พบว่าทุกเอนไซม์มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ 0.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยาในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ชที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยา ภายใต้ภาวะดังกล่าว

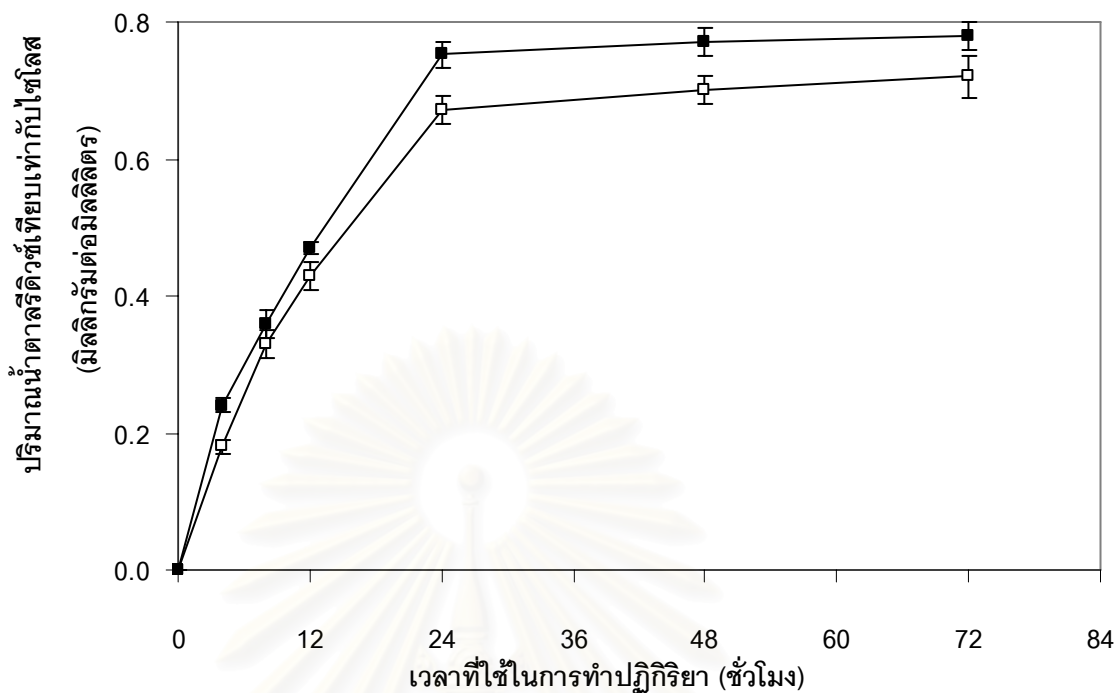
ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้เอนไซม์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยา

#### 4.3.2 ผลของระยะเวลาบ่มปฏิกิริยาต่อการย่อยสลายไซแลนของเอนไซม์แต่ละชนิด

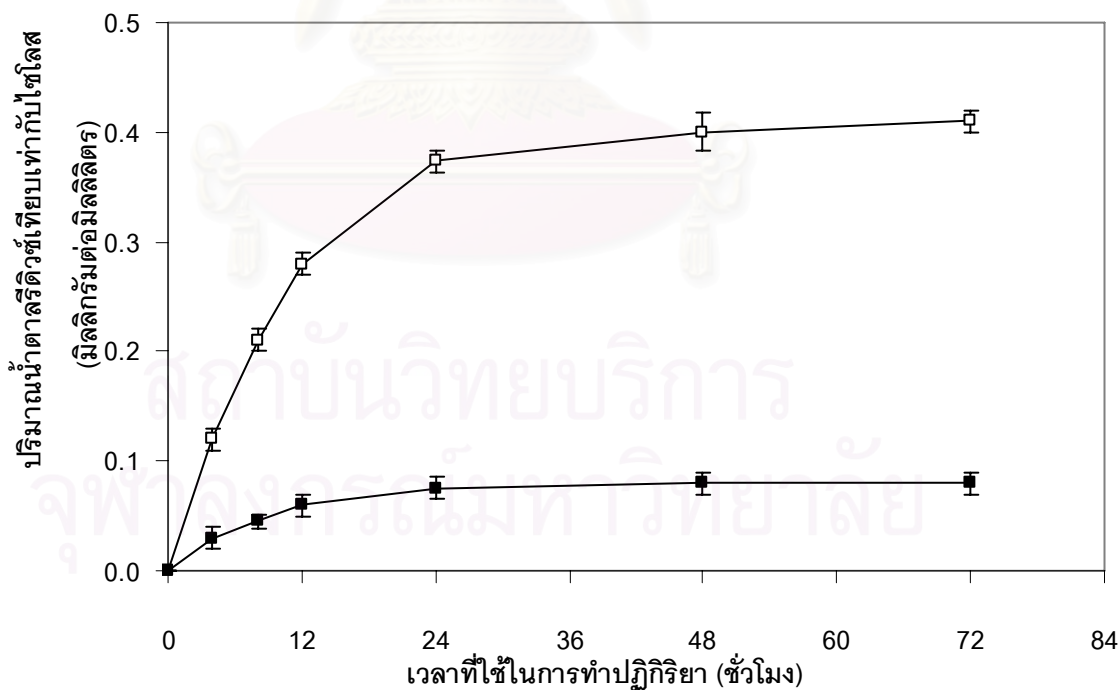
นำเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 มาหาระยะเวลาบ่มปฏิกิริยาที่เหมาะสม โดยแปรผันระยะเวลาบ่มปฏิกิริยาในช่วง 0-72 นาที ในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ชที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยา ภายใต้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.7-4.10



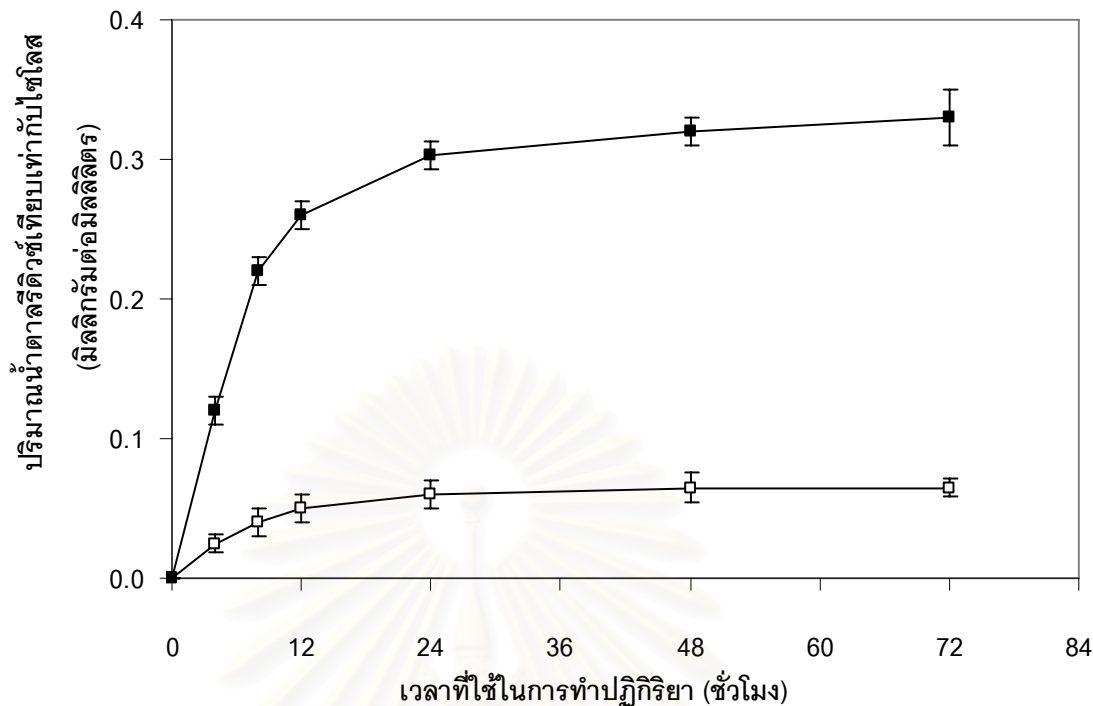
รูปที่ 4.7 ผลของระยะเวลาบ่มปฏิกิริยาต่อการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (□) และไม้เบิร์ช (■) ของไซแลเนส II



รูปที่ 4.8 ผลของระยะเวลาบ่มปฏิกิริยาต่อการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (□) และไม้เบิร์ช (■) ของป๊ตา-ไซโลสเดส



รูปที่ 4.9 ผลของระยะเวลาบ่มปฏิกิริยาต่อการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (□) และไม้เบิร์ช (■) ของแอลฟา-แอลอะราบินอฟิวราโนสเดส



รูปที่ 4.10 ผลของระยะเวลาบ่มปฏิกิริยาต่อการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ( □ ) และไม้เบิร์ช ( ■ ) ของแอสซีติลเอสเทอร์

จากรูปที่ 4.7-4.10 พบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตและไม้เบิร์ชที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยา ได้สูงสุดเมื่อบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะดังกล่าว

ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้เอนไซม์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยา และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### 4.4 ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II ปีตา-ไซโลสิเดส แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิเดส และแอสซีติลเอสเทอร์ในการย่อยสับสเตรต

จากข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองข้างต้น จึงได้นำเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้นแต่ละชนิดเท่ากับ 0.5 หน่วยต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยา มาทำงานร่วมกันในการย่อยสับสเตรตชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยา ได้แก่ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ช ไม้บีช และวัสดุทางการเกษตร ได้แก่ เปลือกข้าวโพด ชังข้าวโพด รำข้าวเจ้า ฟางข้าวเจ้า ขี้เลื่อย ขุยมะพร้าว และขานอ้อย โดยบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งเป็นภาวะเหมาะสมร่วมกันของทุกเอนไซม์

ผลการทดลองในตารางที่ 4.2-4.11 พบว่าทุกสับสเตรตให้ผลสอดคล้องกันคือ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสับสเตรตในปฏิกิริยาที่มีทุกเอนไซม์อยู่ร่วมกันมีค่าสูงกว่าผลรวมของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เพียงชนิดเดียว ซึ่งได้แสดงไว้ในรูปของจำนวนเท่าของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น ข้อมูลนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์กลุ่มนี้ทำงานร่วมกันแบบ synergistic action

เมื่อพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุทางการเกษตรซึ่งได้แก่ รำข้าวเจ้า ฟางข้าวเจ้า ชี้อ้อย ชูยมะพร้าว และชานอ้อย พบว่ามีปริมาณต่ำกว่าที่ได้จากเปลือกข้าวโพดและชังข้าวโพดค่อนข้างมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวัสดุเหล่านี้มีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในปริมาณค่อนข้างต่ำ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปถึงลำดับการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายหลัก และเอนไซม์ย่อยสลายกิ่ง จึงเลือกเฉพาะไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ช ไม้บีช และวัสดุทางการเกษตรคือ เปลือกข้าวโพดและชังข้าวโพดมาใช้เป็นสับสเตรตต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิดีส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิดีส และแอสซีติลเอสเทอร์สในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต

ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับ ไซโลส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		*น้ำตาลรีดิวซ์ ที่เพิ่มขึ้น
	ค่าที่ได้	ค่าที่คาดว่าจะได้	(เท่า)
XII	3.132±0.124	-	-
Xyl	0.671±0.039	-	-
AFase	0.374±0.012	-	-
AE	0.062±0.003	-	-
XII+Xyl	4.162±0.121	3.803	1.09
XII+AFase	3.621±0.130	3.506	1.03
XII+AE	3.288±0.109	3.194	1.03
XII+Xyl+AFase	4.878±0.173	4.177	1.17
XII+Xyl+AE	4.530±0.145	3.865	1.17
XII+Xyl+AFase+AE	5.272±0.191	4.239	1.24
Xyl+AFase	1.066±0.030	-	-
Xyl+AE	0.754±0.021	-	-
AFase+AE	0.426±0.013	-	-
Xyl+AFase+AE	1.104±0.042	-	-
XII+AFase+AE	3.728±0.138	3.568	1.04

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้ XII แทน ไซแลเนส II  
 Xyl แทน บีตา-ไซโลลิดีส  
 AFase แทน แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนลิดีส  
 AE แทน แอสซีติลเอสเทอร์ส

ตารางที่ 4.3 ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลลิเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส และแอสซีติลเอสเทอร์สในการย่อยสลายไซแลนจากไม้เบิร์ช

ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับ ไซโลส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		*น้ำตาลรีดิวซ์ ที่เพิ่มขึ้น
	ค่าที่ได้	ค่าที่คาดว่าจะได้	(เท่า)
XII	3.325±0.141	-	-
Xyl	0.752±0.035	-	-
AFase	0.076±0.004	-	-
AE	0.303±0.020	-	-
XII+Xyl	4.213±0.147	4.077	1.03
XII+AFase	3.433±0.135	3.401	1.01
XII+AE	3.852±0.179	3.628	1.06
XII+Xyl+AFase	4.737±0.173	4.153	1.14
XII+Xyl+AE	5.072±0.134	4.380	1.16
XII+Xyl+AFase+AE	5.597±0.150	4.456	1.26
Xyl+AFase	0.831±0.027	-	-
Xyl+AE	1.304±0.052	-	-
AFase+AE	0.481±0.017	-	-
Xyl+AFase+AE	1.152±0.053	-	-
XII+AFase+AE	3.851±0.105	3.695	1.04

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้ XII แทน ไซแลเนส II  
 Xyl แทน บีตา-ไซโลลิเดส  
 AFase แทน แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส  
 AE แทน แอสซีติลเอสเทอร์ส

ตารางที่ 4.4 ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลสดีเอส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส และแอสซีติลเอสเทอร์เอสในการย่อยสลายไซแลนจากไม้ปืช

ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับ ไซโลส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		*น้ำตาลรีดิวซ์ ที่เพิ่มขึ้น
	ค่าที่ได้	ค่าที่คาดว่าจะได้	(เท่า)
XII	3.293±0.152	-	-
Xyl	0.733±0.034	-	-
AFase	0.170±0.009	-	-
AE	0.351±0.013	-	-
XII+Xyl	4.462±0.190	4.026	1.11
XII+AFase	3.732±0.174	3.463	1.08
XII+AE	3.960±0.164	3.644	1.09
XII+Xyl+AFase	4.616±0.215	4.196	1.10
XII+Xyl+AE	4.894±0.197	4.377	1.12
XII+Xyl+AFase+AE	5.592±0.251	4.547	1.23
Xyl+AFase	0.950±0.022	-	-
Xyl+AE	1.173±0.042	-	-
AFase+AE	0.681±0.012	-	-
Xyl+AFase+AE	1.351±0.060	-	-
XII+AFase+AE	4.061±0.183	3.814	1.06

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้ XII แทน ไซแลเนส II  
 Xyl แทน บีตา-ไซโลสดีเอส  
 AFase แทน แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส  
 AE แทน แอสซีติลเอสเทอร์เอส

ตารางที่ 4.5 ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลสดีเอส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส และแอสซีติลเอสเทอร์เอสในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโพด

ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับ ไซโลส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		*น้ำตาลรีดิวซ์ ที่เพิ่มขึ้น
	ค่าที่ได้	ค่าที่คาดว่าจะได้	(เท่า)
XII	1.274±0.036	-	-
Xyl	0.213±0.010	-	-
AFase	0.102±0.004	-	-
AE	0.115±0.003	-	-
XII+Xyl	1.636±0.049	1.487	1.10
XII+AFase	1.428±0.050	1.376	1.04
XII+AE	1.478±0.062	1.389	1.06
XII+Xyl+AFase	1.726±0.046	1.589	1.09
XII+Xyl+AE	1.824±0.055	1.602	1.14
XII+Xyl+AFase+AE	2.048±0.072	1.704	1.21
Xyl+AFase	0.552±0.028	-	-
Xyl+AE	0.575±0.017	-	-
AFase+AE	0.258±0.013	-	-
Xyl+AFase+AE	0.622±0.022	-	-
XII+AFase+AE	1.579±0.052	1.491	1.06

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้	XII	แทน	ไซแลเนส II
	Xyl	แทน	บีตา-ไซโลสดีเอส
	AFase	แทน	แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส
	AE	แทน	แอสซีติลเอสเทอร์เอส



ตารางที่ 4.6 ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลสดีเอส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส และแอสซีติลเอสเทอร์สในการย่อยสลายไซแลนจากชั่งข้าวโพด

ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับ ไซโลส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		*น้ำตาลรีดิวซ์ ที่เพิ่มขึ้น
	ค่าที่ได้	ค่าที่คาดว่าจะได้	(เท่า)
XII	0.612±0.019	-	-
Xyl	0.173±0.008	-	-
AFase	0.074±0.002	-	-
AE	0.082±0.002	-	-
XII+Xyl	0.864±0.020	0.785	1.10
XII+AFase	0.705±0.019	0.686	1.03
XII+AE	0.738±0.021	0.694	1.06
XII+Xyl+AFase	0.981±0.043	0.859	1.14
XII+Xyl+AE	1.103±0.050	0.867	1.27
XII+Xyl+AFase+AE	1.234±0.035	0.941	1.31
Xyl+AFase	0.175±0.004	-	-
Xyl+AE	0.182±0.005	-	-
AFase+AE	0.150±0.007	-	-
Xyl+AFase+AE	0.263±0.010	-	-
XII+AFase+AE	0.839±0.032	0.768	1.09

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้ XII แทน ไซแลเนส II  
 Xyl แทน บีตา-ไซโลสดีเอส  
 AFase แทน แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส  
 AE แทน แอสซีติลเอสเทอร์ส

ตารางที่ 4.7 ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลสิดีส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส และแอสซีติลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลนจากรำข้าวเจ้า

ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับไซโลส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		*น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
	ค่าที่ได้	ค่าที่คาดว่าจะได้	
XII	30±0.81	-	-
Xyl	8±0.40	-	-
AFase	2±0.19	-	-
AE	3±0.12	-	-
XII+Xyl	44±1.20	38	1.16
XII+AFase	34±1.54	32	1.06
XII+AE	35±1.22	33	1.06
XII+Xyl+AFase	51±1.55	40	1.28
XII+Xyl+AE	54±1.78	41	1.32
XII+Xyl+AFase+AE	61±1.95	43	1.42

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้ XII แทน ไซแลเนส II  
 Xyl แทน บีตา-ไซโลสิดีส  
 AFase แทน แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส  
 AE แทน แอสซีติลเอสเทอเรส

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.8 ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลสดีเอส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส และแอสซีดีลเอสเทอร์สในการย่อยสลายไซแลนจากฟางข้าวเจ้า

ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับไซโลส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		*น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
	ค่าที่ได้	ค่าที่คาดว่าจะได้	
XII	44±1.82	-	-
Xyl	10±0.26	-	-
AFase	6±0.21	-	-
AE	8±0.35	-	-
XII+Xyl	62±1.95	54	1.15
XII+AFase	52±1.78	50	1.04
XII+AE	55±1.59	52	1.06
XII+Xyl+AFase	67±2.35	60	1.12
XII+Xyl+AE	71±2.55	62	1.15
XII+Xyl+AFase+AE	85±3.01	68	1.25

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้ XII แทน ไซแลเนส II  
 Xyl แทน บีตา-ไซโลสดีเอส  
 AFase แทน แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส  
 AE แทน แอสซีดีลเอสเทอร์ส

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.9 ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลสดีเอส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส และแอสซีดีลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลนจากซี่เลื้อย

ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับ ไซโลส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		*น้ำตาลรีดิวซ์ ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
	ค่าที่ได้	ค่าที่คาดว่าจะได้	
XII	32±1.46	-	-
Xyl	7±0.25	-	-
AFase	3±0.07	-	-
AE	5±0.14	-	-
XII+Xyl	43±1.15	39	1.10
XII+AFase	40±1.28	36	1.11
XII+AE	42±1.12	37	1.14
XII+Xyl+AFase	48±1.04	42	1.14
XII+Xyl+AE	52±1.64	44	1.18
XII+Xyl+AFase+AE	63±2.15	47	1.34

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้ XII แทน ไซแลเนส II  
 Xyl แทน บีตา-ไซโลสดีเอส  
 AFase แทน แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส  
 AE แทน แอสซีดีลเอสเทอเรส

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.10 ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลสดีเอส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส และแอสซีติลเอสเทอเรสในการย่อยสลายไซแลนจากขุยมะพร้าว

ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับไซโลส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		*น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
	ค่าที่ได้	ค่าที่คาดว่าจะได้	
XII	35±1.25	-	-
Xyl	21±0.95	-	-
AFase	12±0.54	-	-
AE	15±0.57	-	-
XII+Xyl	70±2.51	56	1.25
XII+AFase	54±1.70	47	1.15
XII+AE	58±1.91	50	1.16
XII+Xyl+AFase	80±2.01	68	1.18
XII+Xyl+AE	87±2.35	71	1.23
XII+Xyl+AFase+AE	104±2.24	83	1.25

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้ XII แทน ไซแลเนส II  
 Xyl แทน บีตา-ไซโลสดีเอส  
 AFase แทน แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส  
 AE แทน แอสซีติลเอสเทอเรส

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.11 ผลของการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II บีตา-ไซโลสดีเอส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส และแอสซีติลเอสเทอร์สในการย่อยสลายไซแลนจากชานอ้อย

ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับไซโลส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		*น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
	ค่าที่ได้	ค่าที่คาดว่าจะได้	
XII	23±1.05	-	-
Xyl	9±0.35	-	-
AFase	5±0.15	-	-
AE	6±0.18	-	-
XII+Xyl	37±1.74	32	1.16
XII+AFase	31±1.26	28	1.11
XII+AE	33±0.85	29	1.14
XII+Xyl+AFase	42±1.10	37	1.14
XII+Xyl+AE	46±1.92	38	1.21
XII+Xyl+AFase+AE	54±1.78	43	1.26

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้ XII แทน ไซแลเนส II  
 Xyl แทน บีตา-ไซโลสดีเอส  
 AFase แทน แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสดีเอส  
 AE แทน แอสซีติลเอสเทอร์ส

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.5 ผลของลำดับการทำงานของเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสลายสายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่ง

การทดลองนี้ศึกษาลำดับการทำงานของเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายหลักคือ ไสแลเนส II และปีตา-ไซโลลิดีส กับเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่งคือ แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิดีสและ แอซีติลเอสเทอเรส สำหรับสับสเตรตที่ใช้ในการทดลองคือ ไสแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ช และไม้บีช และวัสดุทางการเกษตรคือ เปลือกข้าวโพดและซังข้าวโพด

ได้ทำการทดลองเป็นปฏิกิริยา sequential ซึ่งประกอบด้วยปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน โดยเติมเอนไซม์ผสมทั้ง 2 กลุ่ม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.12-4.16 พร้อมกันนี้ได้เปรียบเทียบกับ การทำปฏิกิริยา simultaneous ซึ่งมีเอนไซม์ทั้ง 2 กลุ่ม รวม 4 ชนิด อยู่ร่วมกัน จากผลการทดลอง ที่ได้พบว่าทุกสับสเตรตให้ข้อมูลสอดคล้องกันคือ ปฏิกิริยา sequential ทั้ง 2 กรณี ได้แก่ เอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายหลักหรือกลุ่มย่อยสายกิ่งที่ถูกกำหนดให้อยู่ในปฏิกิริยาแรก สามารถย่อยสลายสับสเตรตแล้วให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าปฏิกิริยา simultaneous ซึ่งได้แสดงเป็นจำนวนเท่าของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยา sequential/simultaneous นอกจากนี้ยังพบว่าปฏิกิริยาที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดคือ ปฏิกิริยาที่กำหนดให้กลุ่มเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่งอยู่ในขั้นตอนแรก

หนึ่งเมื่อพิจารณาจากจำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว ทั้งจากปฏิกิริยา simultaneous และ sequential กับทุกสับสเตรตยืนยันว่าเอนไซม์เหล่านี้มีการทำงานแบบ synergistic action

ตารางที่ 4.12 เปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยา simultaneous และ sequential ของเอนไซม์ผสม กลุ่มย่อยสลายสายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่งในการย่อยสลายไซแลนจาก เปลือกข้าวโอ๊ต

เอนไซม์		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เทียบกับไซโลส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	*น้ำตาลรีดิวซ์ ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจาก ปฏิกิริยา sequential/ simultaneous (เท่า)
ปฏิกิริยาที่ 1	ปฏิกิริยาที่ 2			
ปฏิกิริยา simultaneous				
XII+Xyl+AFase+AE	-	5.290±0.156	1.23	
ปฏิกิริยาควบคุมสำหรับ simultaneous				
XII	-	3.158±0.073		
Xyl	-	0.718±0.015		
AFase	-	0.345±0.009		
AE	-	0.068±0.005		
ปฏิกิริยา sequential				
XII+Xyl	AFase+AE	6.127±0.157	1.27	1.16
AFase+AE	XII+Xyl	6.418±0.171	1.34	1.21
ปฏิกิริยาควบคุมสำหรับ sequential				
XII+Xyl	-	4.381±0.093		
-	XII+Xyl	4.292±0.103		
AFase+AE	-	0.482±0.018		
-	AFase+AE	0.445±0.015		
-	-	0		

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้	XII	แทน	ไซแลเนส II
	Xyl	แทน	บีตา-ไซโลสิดีส
	AFase	แทน	แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิดีส
	AE	แทน	แอสีดีลเอสเทอเรส
	-	แทน	ไม่เติมเอนไซม์



ตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยา simultaneous และ sequential ของเอนไซม์ผสม กลุ่มย่อยสลายสายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่งในการย่อยสลายไซแลนจากไม้เบิร์ช

เอนไซม์		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เทียบกับไซโลส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	*น้ำตาลรีดิวซ์ ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจาก ปฏิกิริยา sequential/ simultaneous (เท่า)
ปฏิกิริยาที่ 1	ปฏิกิริยาที่ 2			
ปฏิกิริยา simultaneous				
XII+Xyl+AFase+AE	-	5.749±0.176	1.21	
ปฏิกิริยาควบคุมสำหรับ simultaneous				
XII	-	3.363±0.152		
Xyl	-	0.733±0.014		
AFase	-	0.079±0.004		
AE	-	0.318±0.009		
ปฏิกิริยา sequential				
XII+Xyl	AFase+AE	6.245±0.159	1.26	1.09
AFase+AE	XII+Xyl	6.389±0.175	1.33	1.11
ปฏิกิริยาควบคุมสำหรับ sequential				
XII+Xyl	-	4.482±0.104		
-	XII+Xyl	4.336±0.099		
AFase+AE	-	0.455±0.017		
-	AFase+AE	0.455±0.029		
-	-	0		

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้ XII แทน ไซแลเนส II  
Xyl แทน บีตา-ไซโลสิดีส  
AFase แทน แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิดีส  
AE แทน แอซีติลเอสเทอเรส  
- แทน ไม่เติมเอนไซม์

ตารางที่ 4.14 เปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยา simultaneous และ sequential ของเอนไซม์ผสม กลุ่มย่อยสลายสายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่งในการย่อยสลายไซแลนจากไม้ปืช

เอนไซม์		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เทียบกับไซโลส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	*น้ำตาลรีดิวซ์ ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจาก ปฏิกิริยา sequential/ simultaneous (เท่า)
ปฏิกิริยาที่ 1	ปฏิกิริยาที่ 2			
ปฏิกิริยา simultaneous				
XII+Xyl+AFase+AE	-	5.746±0.182	1.21	
ปฏิกิริยาควบคุมสำหรับ simultaneous				
XII	-	3.345±0.087		
Xyl	-	0.767±0.026		
AFase	-	0.164±0.014		
AE	-	0.377±0.018		
ปฏิกิริยา sequential				
XII+Xyl	AFase+AE	6.073±0.201	1.27	1.08
AFase+AE	XII+Xyl	6.300±0.197	1.32	1.12
ปฏิกิริยาควบคุมสำหรับ sequential				
XII+Xyl	-	4.264±0.123		
-	XII+Xyl	4.255±0.103		
AFase+AE	-	0.527±0.021		
-	AFase+AE	0.519±0.019		
-	-	0		

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้ XII แทน ไซแลเนส II  
Xyl แทน บีตา-ไซโลสิดีส  
AFase แทน แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส  
AE แทน แอซีติลเอสเทอเรส  
- แทน ไม่เติมเอนไซม์

ตารางที่ 4.15 เปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยา simultaneous และ sequential ของเอนไซม์ผสม กลุ่มย่อยสลายสายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่งในการย่อยสลายไซแลนจาก เปลือกข้าวโพด

เอนไซม์		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เทียบกับไซโลส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	*น้ำตาลรีดิวซ์ ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจาก ปฏิกิริยา sequential/ simultaneous (เท่า)
ปฏิกิริยาที่ 1	ปฏิกิริยาที่ 2			
ปฏิกิริยา simultaneous				
XII+Xyl+AFase+AE	-	2.051±0.046	1.21	
ปฏิกิริยาควบคุมสำหรับ simultaneous				
XII	-	1.243±0.036		
Xyl	-	0.226±0.013		
AFase	-	0.104±0.004		
AE	-	0.116±0.002		
ปฏิกิริยา sequential				
XII+Xyl	AFase+AE	2.155±0.049	1.23	1.05
AFase+AE	XII+Xyl	2.218±0.054	1.26	1.08
ปฏิกิริยาควบคุมสำหรับ sequential				
XII+Xyl	-	1.541±0.045		
-	XII+Xyl	1.527±0.038		
AFase+AE	-	0.227±0.009		
-	AFase+AE	0.209±0.005		
-	-	0.047±0.001		

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้	XII	แทน	ไซแลเนส II
	Xyl	แทน	บีตา-ไซโลสิเดส
	AFase	แทน	แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสิเดส
	AE	แทน	แอสีติลเอสเทอเรส
	-	แทน	ไม่เติมเอนไซม์

ตารางที่ 4.16 เปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยา simultaneous และ sequential ของเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสลายสายหลักและเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่ง ในการย่อยสลายไซแลนจากชั่งข้าวโพด

เอนไซม์		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เทียบกับไซโลส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	*น้ำตาลรีดิวซ์ ที่เพิ่มขึ้น (เท่า)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นจาก ปฏิกิริยา sequential/ simultaneous (เท่า)
ปฏิกิริยาที่ 1	ปฏิกิริยาที่ 2			
Simultaneous reaction				
XII+Xyl+AFase+AE	-	1.264±0.031	1.33	
ปฏิกิริยาควบคุมสำหรับ simultaneous				
XII	-	0.592±0.013		
Xyl	-	0.174±0.012		
AFase	-	0.088±0.001		
AE	-	0.093±0.003		
ปฏิกิริยา sequential				
XII+Xyl	AFase+AE	1.682±0.045	1.48	1.33
AFase+AE	XII+Xyl	1.727±0.056	1.51	1.36
ปฏิกิริยาควบคุมสำหรับ sequential				
XII+Xyl	-	0.905±0.022		
-	XII+Xyl	0.898±0.019		
AFase+AE	-	0.245±0.008		
-	AFase+AE	0.227±0.005		
-	-	0.011±0.002		

\* น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับค่าที่คาดว่าจะได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว

กำหนดให้ XII แทน ไซแลเนส II  
Xyl แทน บีตา-ไซโลสดีเอส  
AFase แทน แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสดีเอส  
AE แทน แอซีติลเอสเทอเรส  
- แทน ไม่เติมเอนไซม์

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

*Streptomyces* sp. PC22 และ *Streptomyces* sp. CH7 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทยที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซลแลนได้ (Ungchaithum และ Pinphanichakarn, 1998) พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สามารถเจริญได้ดีที่ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 และผลิตไซลแลนสได้สูงคือ 14.68 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และต่อมา Wateewuthajarn และ Pinphanichakarn (2000) ได้ทำไซลแลนจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถแยกเอนไซม์ได้ 2 ชนิดคือ ไซลแลเนส I และไซลแลเนส II โดยไซลแลเนส I เป็นเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นเป็นส่วนใหญ่ มีคุณสมบัติและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียส และ 5.5-ตามลำดับ ส่วนไซลแลเนส II เป็นเอนไซม์หลัก มีคุณสมบัติและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียส และ 5.5-6.0 ตามลำดับ สำหรับ *Streptomyces* sp. CH7 สามารถเจริญได้ดีที่ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 และมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตบีตา-ไซโลลิเดส ซึ่งมีแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.9 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเอนไซม์นี้มีคุณสมบัติและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 55 องศาเซลเซียส และ 6.5 ตามลำดับ (Pinphanichakarn และคณะ, 2004)

นอกจากนี้ยังพบว่า *Streptomyces* sp. PC22 สร้างเอนไซม์ย่อยสลายกิ่งของไซลแลนที่มีแอกติวิตีสูงได้แก่ แอซีติลเอสเทอเรส (เวฟุรีย์ ทองคำ, 2547 และวัชรีย์ ชุณห์กุล, 2548) และแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิเดส (วิชุดา เหล่าเรืองธนา, 2547 และปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์, 2549) โดยวัชรีย์ ชุณห์กุล (2548) ได้ทำแอซีติลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้สามารถแยกออกจากไซลแลเนส II ได้ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์ และมีคุณสมบัติและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 50 องศาเซลเซียส และ 6.5 ตามลำดับ

และต่อมาปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์ (2549) ได้ทำแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิเดสจาก *Streptomyces* sp. PC22 ให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้สามารถแยกออกจากไซลแลเนส II ได้ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ไฮดรอกซีอะปาไทด์เช่นเดียวกับแอซีติลเอสเทอเรส และมีคุณสมบัติและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 65 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ

งานวิจัยนี้ศึกษาการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนในการย่อยไซแลนบริสุทธิ์ซึ่งได้มาจากทางการค้าได้แก่ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ช และไม้พีช (Sigma, USA) และวัสดุทางการเกษตรที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ

ในการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนนั้นภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญที่จะทำให้การย่อยไซแลนหรือวัสดุทางการเกษตรที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบมีประสิทธิภาพสูงสุด และจากผลการเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างต่อการทำงานของแต่ละเอนไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และ 4.3 พบว่ามีค่าคาบเกี่ยวกัน ซึ่งได้สรุปอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดไว้ในตารางที่ 5.1 พบว่าที่ 60 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่างที่ 6.0 น่าจะเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำงานร่วมกันของทุกเอนไซม์เพราะที่ภาวะนี้ไซแลเนส II ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสายหลักของไซแลนทำงานได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เอนไซม์อื่นๆ ยังคงทำงานได้สูงถึงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ และที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีสทำงานได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน ขณะที่เอนไซม์ที่เหลืออีก 2 ชนิด ทำงานได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกภาวะดังกล่าวเป็นภาวะเดียวสำหรับการบ่มปฏิบัติการย่อยสลายไซแลนหรือวัสดุทางการเกษตร เมื่อให้เอนไซม์เหล่านี้ทำงานร่วมกัน ทั้งนี้ Sørensen และคณะ (2007) รายงานการย่อยอะราบิโนไซแลนจากข้าวสาลีโดยปฏิบัติการ sequential โดยใช้เอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิดคือ Ultraflo L และ Celluclast 1.5 L ซึ่งทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วย แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส ไซแลเนส และบีตา-ไซโลสิดีส แต่ที่ความเข้มข้นของแต่ละเอนไซม์แตกต่างกัน นอกจากนั้นแต่ละเอนไซม์มีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการทำงานแตกต่างกันเล็กน้อย ผู้วิจัยพบว่าการทำปฏิบัติการภายใต้ภาวะเดียวกันของทุกเอนไซม์ให้ประสิทธิภาพการย่อยดีกว่าการแปรภาวะให้เหมาะสมสำหรับแต่ละเอนไซม์ที่เติมลงไปตามลำดับ (sequential)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 สรุปคุณสมบัติและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนแต่ละชนิด

เอนไซม์	แหล่งของเอนไซม์	ภาวะที่เหมาะสม	
		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าความเป็น กรดต่าง
ไซแลเนส II	<i>Streptomyces</i> sp. PC22	60	6.0
ปีตา-ไซโลลิเดส	<i>Streptomyces</i> sp. CH7	55	6.5
แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิเดส	<i>Streptomyces</i> sp. PC22	65	6.0
แอสซีติลเอสเทอเรส	<i>Streptomyces</i> sp. PC22	50	6.5

ในการทดลองนี้ศึกษาการทำงานร่วมกันของไซแลเนส II แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนสิเดสและแอสซีติลเอสเทอเรสจาก *Streptomyces* sp. PC22 และปีตา-ไซโลลิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ในการย่อยไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ช ไม้บีช และวัสดุทางการเกษตร (เปลือกข้าวโพด ชังข้าวโพด รำข้าวเจ้า ฟางข้าวเจ้า ชี้อ้อย ชูยมะพร้าว และขานอ้อย)

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ทำงานร่วมกันจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ช และไม้บีช ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น 1.24, 1.26 และ 1.23 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากผลรวมเมื่อใช้แต่ละเอนไซม์เดี่ยว และในการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตร (เปลือกข้าวโพด ชังข้าวโพด รำข้าวเจ้า ฟางข้าวเจ้า ชี้อ้อย ชูยมะพร้าว และขานอ้อย) ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น 1.21, 1.31, 1.42, 1.25, 1.34, 1.25 และ 1.26 เท่า ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดได้ผลดีกว่าการใช้เอนไซม์ชนิดเดียว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Poutanen และคณะ (1990) ที่ศึกษาการทำงานร่วมกันของไซแลเนสกับแอสซีติลเอสเทอเรสจาก *Trichoderma reesei* และ Kormelink และคณะ (1993) ที่รายงานว่าเมื่อนำไซแลนจากไม้เบิร์ชมาบ่มกับแอสซีติลเอสเทอเรสจาก *Aspergillus niger* เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีความสามารถสูงในการย่อยหมู่แอสซีติล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแอสติก 62 เปอร์เซ็นต์ (กำหนดให้ปริมาณหมู่แอสซีติลทั้งหมดในสับสเตรทเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นบ่มต่อด้วยเอนโดไซแลเนส I จาก *Aspergillus awamori* นาน 1 ชั่วโมง พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ คือ ไซโลโอลลิโกเมอร์ต่างๆ เพิ่มขึ้น 5 เท่า และเมื่อบ่มต่อเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง พบว่าให้ไซโลโอลลิโกเมอร์และไซโลสเพิ่มขึ้นเป็น 66 และ 4 เท่า ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับบ่มปฏิกิริยาในเอนโดไซแลเนส I เพียงชนิดเดียวนาน 1 ชั่วโมง และเมื่อนำไซแลนจากไม้เบิร์ชที่ถูกตั้ง

หมู่อะซีติลออกแล้วโดยอะซีติลเอสเทอร์ผสมมาบ่มกับบีตา-ไซโลสดีเอส นาน 24 ชั่วโมง ได้ไซโลสเพิ่มขึ้น 1.7 เท่า

อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้พบว่าการย่อยสลายไซแลนจากรำข้าวเจ้า ฟางข้าวเจ้า ชี้อ้อย ขุยมะพร้าว และชานอ้อยได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวัสดุเหล่านี้มีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับเปลือกข้าวโพดและซังข้าวโพด ดังแสดงในตารางที่ 5.2 ส่วนไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ชและไม้บีชนั้น เป็นไซแลนที่ผ่านกรรมวิธีให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว

ตารางที่ 5.2 องค์ประกอบของวัสดุทางการเกษตร

วัสดุทางการเกษตร	องค์ประกอบ (เปอร์เซ็นต์)			เอกสารอ้างอิง
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	
เปลือกข้าวโพด (corn husk)	38.2	44.5	6.6	Barl และคณะ (1991)
ซังข้าวโพด (corn cob)	35	34.8	12.8	Yang และคณะ (2005)
รำข้าวเจ้า (rice bran)	8.3	17.58	2.38	เนริสา คุณประทุม (2543)
ฟางข้าวเจ้า (rice straw)	35	25	12	Saha (2003)
ชานอ้อย (bagasse)	44	23	20	Dueñas และคณะ (1995)

งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาลำดับการทำงาน (sequential) ของเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายหลัก และกลุ่มย่อยสายกิ่งในการย่อยสลายไซแลนเมื่อใช้สับสเตรตต่างๆ ดังนี้ ไซแลนบริสุทธิ์จากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ช และไม้บีช วัสดุทางการเกษตรได้แก่ เปลือกข้าวโพดและซังข้าวโพด โดยเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายหลักคือ ไซแลเนส II และบีตา-ไซโลสดีเอส และเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่งคือ แอลฟา-แอล-อะราบินอฟิวราโนสดีเอสและอะซีติลเอสเทอร์ส เปรียบเทียบกับการทำงานร่วมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน (simultaneous) ซึ่งสรุปผลของประสิทธิภาพการย่อยสับสเตรตในตารางที่ 5.3



**ตารางที่ 5.3** สรุปรประสิทธิภาพการย่อยสลายไซแลนจากสับสเตรตต่างๆ ด้วยปฏิกิริยา simultaneous และ sequential

สับสเตรต <sup>(1)</sup> (เปอร์เซ็นต์ของไซแลน)	ปฏิกิริยา	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	การย่อยสลายไซแลน <sup>(2)</sup> (เปอร์เซ็นต์)
ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (100%)	<b>Simultaneous</b>		
	XII+Xyl+AFase+AE	5.290±0.156	52.90
	<b>Sequential</b>		
	XII+Xyl/AFase+AE	6.127±0.157	61.27
	AFase+AE/XII+Xyl	6.418±0.171	64.18
ไซแลนจากไม้เบิร์ช (100%)	<b>Simultaneous</b>		
	XII+Xyl+AFase+AE	5.749±0.176	57.49
	<b>Sequential</b>		
	XII+Xyl/AFase+AE	6.245±0.159	62.45
	AFase+AE/XII+Xyl	6.389±0.175	63.89
ไซแลนจากไม้บีช (100%)	<b>Simultaneous</b>		
	XII+Xyl+AFase+AE	5.746±0.182	57.46
	<b>Sequential</b>		
	XII+Xyl/AFase+AE	6.073±0.201	60.73
	AFase+AE/XII+Xyl	6.300±0.197	63.00
เปลือกข้าวโพด (44.5%)	<b>Simultaneous</b>		
	XII+Xyl+AFase+AE	2.051±0.046	46.09
	<b>Sequential</b>		
	XII+Xyl/AFase+AE	2.155±0.049	48.43
	AFase+AE/XII+Xyl	2.218±0.054	49.84
ซังข้าวโพด (34.8%)	<b>Simultaneous</b>		
	XII+Xyl+AFase+AE	1.264±0.031	36.32
	<b>Sequential</b>		
	XII+Xyl/AFase+AE	1.682±0.045	48.33
	AFase+AE/XII+Xyl	1.727±0.056	49.63

กำหนดให้	XII	แทน	ไซแลเนส II
	Xyl	แทน	บีตา-ไซโลลิเดส
	AFase	แทน	แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส
	AE	แทน	แอสติลเอสเทอเรส

- (1) ความเข้มข้นของสับสเตรตเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารผสมปฏิกิริยา
- (2) เทียบกับปริมาณไซแลนในสับสเตรต (Kambourova และคณะ, 2006)

XII+Xyl+AFase+AE	คือปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดทำงานร่วมกัน (Simultaneous)
XII+Xyl/AFase+AE	คือปฏิกิริยาที่ทำงานตามลำดับโดยใช้เอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายหลัก แล้วตามด้วยเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่ง (Sequential)
AFase+AE/XII+Xyl	คือปฏิกิริยาที่ทำงานตามลำดับโดยใช้เอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่งแล้วตามด้วยเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายหลัก (Sequential)

จากตารางที่ 5.3 จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยา sequential ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าปฏิกิริยา simultaneous ของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดในการย่อยสับสเตรตดังกล่าว โดยสามารถย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไม้เบิร์ช และไม้บีช ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโพดและซังข้าวโพดได้เกือบ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในการย่อยสลายสับสเตรตทุกชนิดพบว่าเมื่อให้เอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายกิ่งทำงานก่อนเป็นลำดับแรกแล้วตามด้วยเอนไซม์ผสมกลุ่มย่อยสายหลักจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rahman และคณะ (2003) ที่ศึกษาบทบาทของไซแลเนส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสและบีตา-ไซโลลิเดสจาก *Penicillium* sp. AHT-1 ในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต พบว่าลำดับในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการย่อยสลายไซแลนจะเริ่มจากแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสตามด้วยไซแลเนส และสุดท้ายคือบีตา-ไซโลลิเดส และ Puls และคณะ (1991) ที่ศึกษาลำดับการย่อยแอสติล-4-โอ-เมธิลกลูคูโรโนไซแลนจากไม้บีชด้วยเอนไซม์ต่างๆ โดยเมื่อนำมาย่อยด้วยแอสติลเอสเทอเรสร่วมกับไซแลเนส พบว่าเมื่อบ่มแอสติลเอสเทอเรสก่อนแล้วตามด้วยไซแลเนส จะได้ปริมาณไซโลสมากที่สุด เมื่อเทียบกับการบ่มด้วยไซแลเนสก่อนแล้วตามด้วยแอสติลเอสเทอเรสหรือใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดทำงานพร้อมกัน

สำหรับการย่อยเฮมิเซลลูโลสจากวัสดุทางการเกษตรนั้นมีรายงานจาก Gattinger และคณะ (1990) ว่าไม่สามารถย่อยสลายซังข้าวโพดได้ เมื่อใช้ไซแลเนสจาก *Trichoderma reesei* ขณะที่มีการรายงานอื่นๆ ถึงการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจากซังข้าวโพดได้ (corn residue หรือ corn fiber) แต่วัสดุทางการเกษตรนี้ต้องผ่านขั้นตอนทางเคมีหรือกายภาพที่ค่อนข้างรุนแรงก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ เช่น สกัดด้วยด่าง (alkaline extraction) (Yoon และคณะ, 2006) สกัดด้วยน้ำ หรือ

น้ำร้อน (Yang และคณะ, 2005 และ Dien และคณะ, 2006) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานแรกที่แสดงให้เห็นว่าสามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสในเปลือกข้าวโพดหรือชังข้าวโพดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการเตรียมวัสดุตั้งต้นเพียงการบดและร่อนให้ได้ขนาดเหมาะสมโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนทางเคมีหรือกายภาพอื่น ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและมีต้นทุนต่ำซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำวัสดุทางการเกษตรกลับคืนมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ ยาปฏิชีวนะ สารเชื้อเพลิงอื่นๆ ด้วยกระบวนการหมักต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- เนริสา คุณประทุม. 2543. การผลิตไซแลนเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้วัสดุเหลือใช้จาก การเกษตร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์. 2549. การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส จาก *Streptomyces* sp. PC22. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิชุดา เหล่าเรืองธนา. 2547. การผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดีส โดย *Streptomyces* sp. PC22. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วัชรวิ ชุณหกุล. 2548. การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของอะซีทิลเอสเทอร์เอสจาก *Streptomyces* sp. PC22. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เวฬุรีย์ ทองคำ. 2547. การผลิตอะซีทิลเอสเทอร์เอส โดย *Streptomyces* sp. PC22. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

- Bachmann, S. L., and McCarthy, A. J. 1991. Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*. Appl. Environ. Microbiol. 57(8): 2121-2130.
- Bajpai, P. 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. Biotechnol. Prog. 15: 147-157.
- Barbosa, M. F. S., Medicers, M. B., Mancillha, I. M., and Schneider, H. 1988. Screening of yeast for production of xylitol yield in *Candida guilliermondii*. J. Ind. Microbiol. 3(4): 241-252.
- Barl, B., Biliaderis, G. C., Murray, E. D., and Macgregor, A. W. 1991. Combined chemical and enzymic treatments of corn husk lignocellulosics. J. Sci. Food Agric. 56(2): 195-214.

- Basaran, P., and Hang, Y. D. 2000. Purification and characterization of acetyl esterase from *Candida guilliermondii*. Lett. Appl. Microbiol. 30: 167-171.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoodal, G. S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 326-338.
- Bezalel, L., Shoham, Y., and Rosenberg, E. 1993. Characterization and delignification activity of a thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 57-62.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol. 3(11): 286-290.
- Biely, P., MacKenzie, C. R., Puls, J., and Schneider, H. 1986. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. Biotechnology. 4: 731-733.
- Chen, W. P. 1980. Glucose isomerase (a review); part one. Process Biochem. 6/7: 30-35.
- Degrassi, G., Vindigni, A., and Venturi, V. 2003. A thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from xylanolytic *Bacillus pumilus*: purification and characterization. J. Biotechnol. 101: 69-79.
- Dien, B. S., Li, X.-L., Iten, L. B., Jordan, D. B., Nichols, N. N., O'Bryan, P. J., and Cotta, M. A. 2006. Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides. Enz. Microb. Technol. 39: 1137-1144.
- Dekker, R. F. H., and Richards, G. N. 1976. Hemicellulase: their occurrence, purification, properties and mode of action. Adv. Carbohydr. Biochem. 32: 277-352.
- de Vries, R. P., Kester, H. C. M., Poulsen, C. H., Benen, J. A. E., and Visser, J. 2000. Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. Carbohydr. Res. 327: 401-410.
- Du Preez, J. C. 1994. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. Enz. Microb. Technol. 16: 944-956.
- Dueñas, R., Tengerdy, R. P., and Gutierrez-Correa, M. 1995. Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. World J. Microbiol. Biotechnol. 11: 333-337.

- Dupont, C., Shareck, F., Daigneault, N., Morosoli, R., and Kluepfel, D. 1996. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans*. Biochem. J. 319: 881-886.
- Ebringerova, A., and Heinze, T. 2000. Xylan and xylan derivatives biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. Macromol. Rapid Commun. 21: 542-556.
- Ericksson, K. E. L., Blanchette, R. A., and Ander, P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. pp. 181-222. Ozach GmbH and Co., Berlin, Germany.
- Gattinger, L. D., Duvnjak, Z., and Khan, A. W. 1990. The use of canola meal as a substrate for xylanase production by *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33(1): 21-25.
- Gilbert, H. J. and Hazlewood, G. P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. J. Gen. Microbiol. 139: 187-194.
- Gong, C. S., Chen, L. F., Flickinger, M. C., Chiang, L. C., and Tsao, G. T. 1981. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 41: 430-436.
- Graham, H., and Inborr, J. 1992. Application of xylanase-based enzymes in commercial pig and poultry production. pp. 535-538. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Greve, L. C., Labavitch, J. M., and Hungate, R. E. 1984.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: purification and possible roles in hydrolysis of alfalfa cell wall. Appl. Environ. Microbiol. 47: 1135-1140.
- Gruppen, H., Hamer, R. J., and Voragen, A. G. J. 1982. Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 2. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans. J. Cereal. Sci. 2; 16: 53-67.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W., and Zupancic, S. 1996. Production of fungal xylanases. Bioresour. Technol. 58: 137-161.
- Hashimoto, T., and Nakata, Y. 2003. Synergistic degradation of arabinoxylan with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, xylanase and  $\beta$ -xylosidase from soy sauce koji mold, *Aspergillus oryzae*, in high salt condition. J. Biosci. Bioeng. 95: 164-169.

- Hon, D. N. S., and Shiraishi, N. 1990. Wood and Cellulosic Chemistry. pp. 197. New York: Marcel Dekker.
- Johnson, K. G., Fontana, J. D., and MacKenzie, C. R. 1988. Measurement of acetyl xylan esterase in *Streptomyces*. Methods Enzymol. 160: 551-560.
- Kambourova, M., Mandeva, R., Fiume, I., Maurelli, L., Rossi, M., and Morana, A. 2006. Hydrolysis of xylan at high temperature by co-action of the xylanase from *Anoxybacillus flavithermus* BC and the  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -arabinosidase from *Sulfolobus solfataricus* O $\alpha$ . J. Appl. Microbiol. 102: 1586-1593.
- Kantelinen, A., Rantanen, T., Buchert, J. J., and Viikari, L. 1993. Enzymatic solubilization of fiber bound and isolated birch xylans. J. Biotechnol. 28: 219-228.
- Kormelink, F. J. M., Lefebvre, B., Strozyk, F., and Voragen, A. G. J. 1993. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus niger*. J. Biotechnol. 27: 267-282.
- Koukiekolo, R., Cho, H.-Y., Kosugi, A., Inui, M., Yukawa, H., and Doi, R. H. 2005. Degradation of corn fiber by *Clostridium cellulovorans* cellulases and hemicellulases and contribution of scaffolding protein CbpA. Appl. Environ. Microbiol. 71(7): 3504-3511.
- Kuyper, M., Winkler, A. A., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T. 2004. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. FEMS. Yeast. Res. 4: 655-664.
- Lee, S. F., and Forsberg, C. W. 1987. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Can. J. Microbiol. 33: 1011-1016.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 267-275.
- Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., da Silra M. J. S., Egmond, M. R., Hagemans, M. L. D., van Garcom, R. F. M., Hessing, J. G. M., van Derhondel, C. A. M. J. J., and van Rotterdam, C. 1992. Xylanses and their application in bakery. In: Visser, J., Beldman, G., van Someren, M. A. K., and Voragen, A.G.J. (eds) Xylans and xylanases. pp: 349-360. Amsterdam: Elsevier.
- Magee, R. J., and Kosaric, N. 1985. Bioconversion of hemicellulose. Adv. Biochem.

Bioeng. 32: 64-93.

- Maijala, P. 2000. *Heterobasidium annosum* and wood decay : Enzymology of cellulose, hemicellulose and lignin degradation. Helsinki: University of Helsinki.
- Manin, C., Shareek, F., Morosoli, R., and Kluepfel, D. 1994. Purification of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abfA*). Biochem. J. 302: 443-449.
- Matsuo, N., Kaneko, S., Kuno, A., Kobayashi, H., and Kusakabe, I. 2000. Purification, characterization and gene cloning of two  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces chartreuses* GS901. Biochem. J. 346: 9-15.
- Morales, P., Madarro, A., Flors, A., Sendra, J. M., and Perez-Gonzalez, J. A. 1995. Purification and characterization of a xylanase and an arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa*. Enz. Microb. Technol. 17: 424-429.
- Murashima, K., Kosugi, A., Doi, R. H., 2003. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. J. Bacteriol. 185(5): 1518-1524.
- Nakajima, T., Tsukamoto, K., Watanabe, T., Kainuma, K., and Matsuda, K. 1984. Purification and some properties of an endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase from *Streptomyces* sp. J. Ferment. Technol. 62(3): 269-276.
- Nakanishi, K., Yokotsuka, K., and Yasui, T. 1987. Induction of membrane bound xylosidase in a *Streptomyces* sp. J. Ferment. Technol. 65: 1-6.
- Neale, A. D., Scopes, R. K., and Kelly, J. M. 1988. Alcohol production from glucose and xylose using *Escherichia coli* containing *Zymomonas mobilis* genes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 162-167.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-380.
- Paice, M. G., Gurnagul, N., Page, D. H., and Jurasek, L. 1992. Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. Enz. Mibrob. Technol. 14: 272-276.



- Parajo, J. C., Domingues, H., and Domingues, J. M. 1998. Biotechnological production of xylitol. Part I, interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. Bioresour. Technol. 65: 191-201.
- Paturan, J. M. 1989. "Bagasse" By-Products of the cane sugar industry. Vol 11. New York: Elsevier Science.
- Pinphanichakarn, P., Tangsakul, T., Thongnumwon, T., Talawanich, Y., and Thamchaipenet, A. 2004. Purification and characterization of  $\beta$ -xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 and its gene sequence analysis. World J. Microbiol. Biotechnol. 20: 727-733.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., and Amorim, D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67: 577-591.
- Poutanen, K., Sundberg, M., Korte, H., and Puls, J. 1990. Deacetylation of xylans by acetyl esterases of *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 506-510.
- Puls, J., Tenkanen, M., Korte, H. E., and Poutanen, K. 1991. Products of hydrolysis of beechwood acetyl-4-O-methylglucuronoxylan by a xylanase and an acetyl xylan esterase. Enz. Microb. Technol. 13: 483-486.
- Puls, J., and Schuseil, J. 1993. Chemistry of hemicellulose: relationship between hemicellulose structure and hemicellulase. pp. 1-27. London: Portland.
- Rahman, A. K. M. S., Sugitani, N., Hatsu, M., Takamizawa, K. 2003. A role of xylanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. Can. J. Microbiol. 49(1): 58-64.
- Saha, B. C. 2000.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. Biotechnol. Adv. 18:403-423.
- Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30(5): 279-291.
- Saha, B. C., and Bothast, R. J. 1998. Purification of a novel thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from a color-variant strain of *Aureobasidium pullulans*. 64:216-220.

- Saddler, J. N., Yu, E. K. C., Mesh-Hartree, M., Levitin, N., and Brownell, H. H. 1983. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicellulose by microorganisms for production of liquid fuels. Appl. Environ. Microbiol. 45(1): 153-160.
- Screenath, H. K., and Jeffries, T. W. 2000. Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts. Bioresour. Technol. 72: 253-260.
- Schyns, P. J. Y. M. J., de Frankrijker, J., Zehnder, A. J. B., and Stams, A. J. M. 1994. Production, purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bacteroides xylanolyticus* X5-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 548-554.
- Seri, K., Sanai, K., Matsuo, N., Kawakubo, K., Xue, C. Y., and Inoue, S. 1996. L-arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in an uncompetitive manner and suppresses glycemic response after sucrose ingestion in animals Metab. Clin. Exp. 45: 1368-1374.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23.
- Sørensen, H. R., Pedersen, S., and Meyer, A. S. 2007. Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. Enz. Microb. Technol. 40(4): 908-918.
- Teleman, A., Larsson, P. T., and Iversen, T. 2001. On the accessibility and structure of xylan in birch kraft pulp. Cellulose. 8(3): 209-215.
- Tsao, G. T., and Chaing, L. 1983. Cellulose and hemicellulose technology. In Berry, S. D. R., and Kristiansen, B. (eds.). The filamentous fungi: Fungal Technology. pp. 296-326. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Tuncer, M., and Ball, A. S. 2003. Co-operative actions and degradation analysis of purified xylan-degrading enzymes from *Thermomonospora fusca* BD25 on oat-spelt xylan. J. Appl. Microbiol. 94: 1030-1035.
- Ungchaithum, S., and Pinphanichakarn, P. 1998. Optimization of xylanase production by *Streptomyces* sp. PC22 growing on agricultural residues. J. Sci. Res. Chula. Univ. 23(1): 45-50.
- Visser, J., Beldman, G., Someren, M. A. K. V., and Voragen, A. G. J. 1992. Xylan and xylanase. Netherlands: Elsevier Science.
- Walker, G. M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. pp. 228-231. New York: John Wiley and Sons Inc.

- Wateewuthajarn, K., and Pinphanichakarn, P. 2000. Purification and characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. PC22. J. Sci. Res. Chula. Univ. 25(2): 245-256.
- Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N. 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiol. Rev. 52(3): 305-317.
- Wood, T. M., and McCrae, S. I. 1996. Arabinoxylan-degrading enzyme system of the fungus *Aspergillus awamori*: purification and properties of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 538-545.
- Yang, R., Xu, S., Wang, Z., and Yang, W. 2005. Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 38: 677-682.
- Yoon, K. Y., Woodams, E. E., and Hang, Y. D. 2006. Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose fraction of corn residues. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 39: 387-391.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งข้าวไรย์ (Rye Agar Medium)

เกล็ดข้าวไรย์บด (Rye)	10.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ )	30.0	กรัม
กลูโคส (Glucose)	20.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	18.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดต่างสำหรับ *Streptomyces* sp. CH 7 เท่ากับ 7.0

ปรับระดับความเป็นกรดต่างสำหรับ *Streptomyces* sp. PC22 เท่ากับ 9.0

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

## 2. ไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม (Xylan complex medium) สำหรับผลิตไซแลเนส บีตา-ไซโลลิเดส และแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนลิเดส

ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelt xylan)	0.75	เปอร์เซ็นต์
พอลิเพปโตน (Polypeptone)	0.5	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.1	เปอร์เซ็นต์
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0.4	เปอร์เซ็นต์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.02	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.1	เปอร์เซ็นต์
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.002	เปอร์เซ็นต์

ปรับระดับความเป็นกรดต่างสำหรับ *Streptomyces* sp. CH 7 เท่ากับ 7.0

ปรับระดับความเป็นกรดต่างสำหรับ *Streptomyces* sp. PC22 เท่ากับ 9.0

อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

3. ไชแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม (Xylan complex medium) สำหรับผลิตแอสิติลเอสเทอร์

ไชแลนจากไม้เบิร์ช (Birchwood xylan)	0.75	เปอร์เซ็นต์
พอลิเพปไทด์ (Polypeptone)	0.5	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.1	เปอร์เซ็นต์
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.4	เปอร์เซ็นต์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.02	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.1	เปอร์เซ็นต์
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.002	เปอร์เซ็นต์
ปรับระดับความเป็นกรดต่างเท่ากับ	9.0	
อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที		

## ภาคผนวก ข

### สารเคมี

#### 1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

##### 1.1 สารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์ (alkaline copper reagent)

สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคาไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 71 กรัม และเกลือของโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรตเตรไฮเดรต ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล 100 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ปริมาณ 180 กรัม ละลายให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

##### 1.2 สารละลายเนลสัน (Nelson's reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดตเตรไฮเดรต ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 53.2 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร กรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมอาร์ซีเนต ( $\text{NaHAsO}_4$ ) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1952)

### 2.1 Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	3.0	ลิตร

### 2.2 Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	5.0	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1.0	ลิตร

### 2.3 Lowry C

Lowry A	50	ส่วน
Lowry B	1	ส่วน

### 2.4 Lowry D

สารละลายฟอลินฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน



3. สารละลายโซเดียมแอสซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ

เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายโซเดียมแอสซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ ได้แก่ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 โดยละลายโซเดียมแอสซีเตต 1.21 2.91 5.07 6.94 และ 7.76 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างตามต้องการด้วยกรดแอสซีติก และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายโซเดียมแอสซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ แต่ละค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 0.1 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ

เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 โดยละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.87 4.60 8.55 11.74 และ 13.34 กรัม และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10.42 8.11 4.77 2.46 และ 0.85 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างตามต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ แต่ละค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 0.1 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

5. สารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ

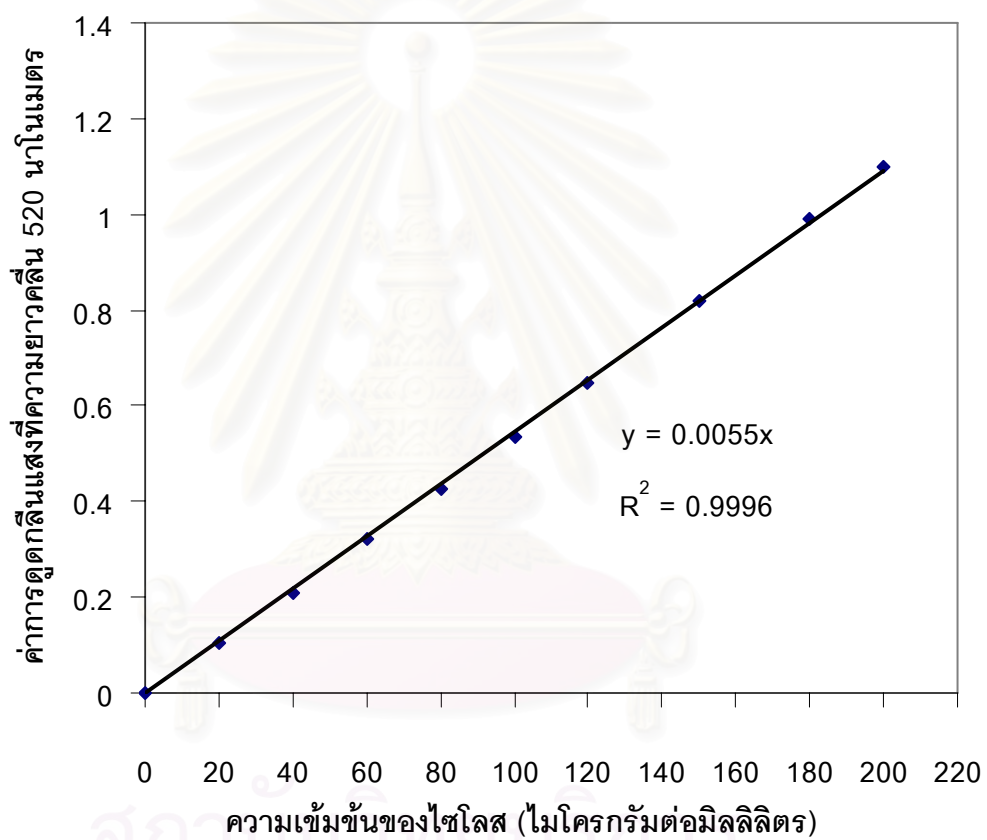
เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0 8.5 และ 9.0 โดยละลายทริส-เบส 12.1 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างตามต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ แต่ละค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 0.1 โมลาร์ ด้วยน้ำกลั่น

## ภาคผนวก ค

## กราฟมาตรฐาน

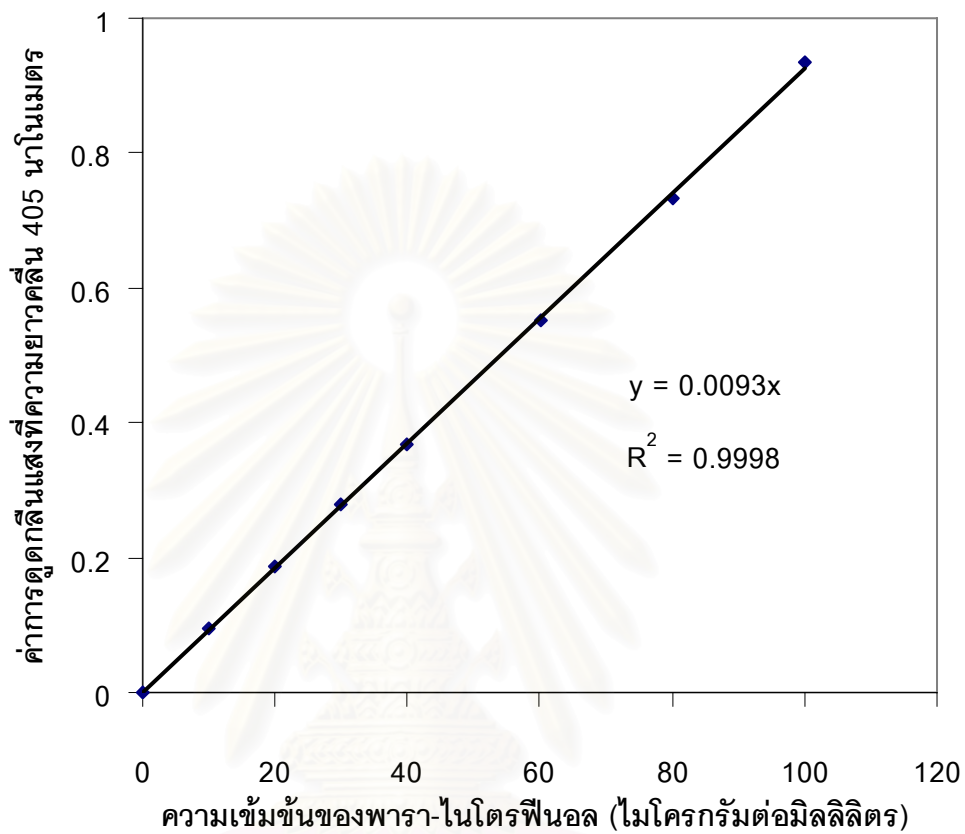
## 1. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

## 1.1 กราฟมาตรฐานไซโลสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



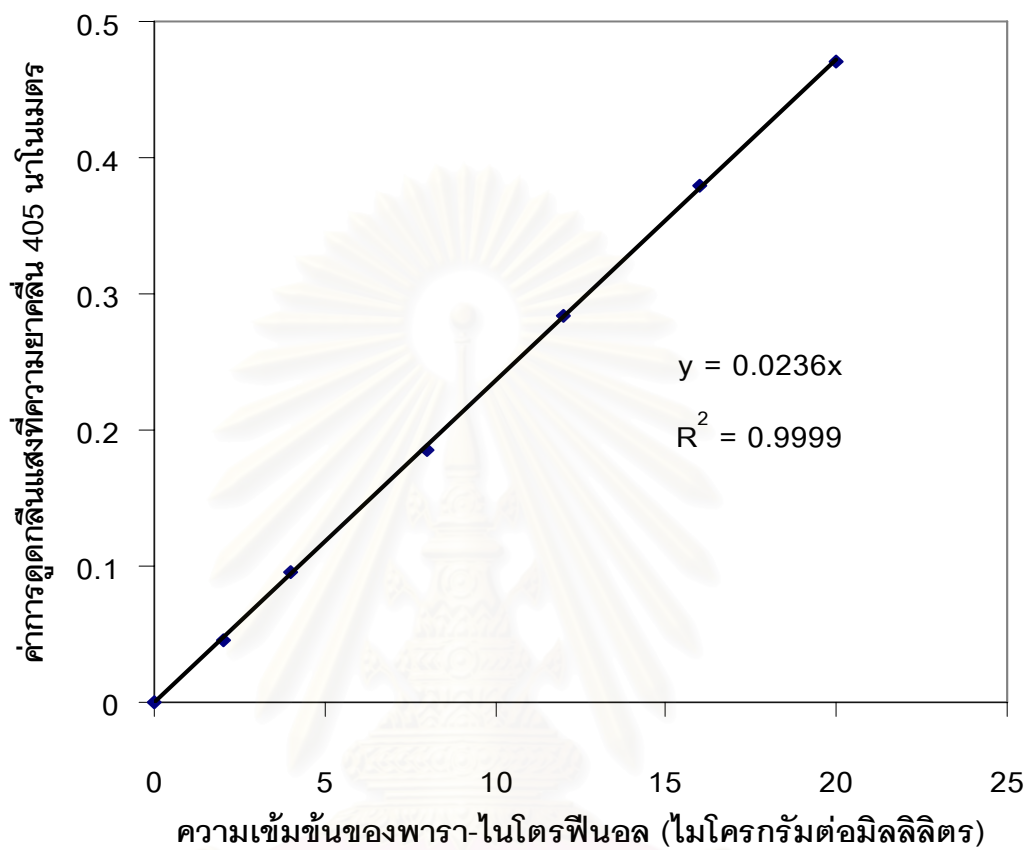
สถาบันวิจัยปศุสัตว์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน  
การวิเคราะห์แอสซีทีของปีตา-ไซโลไซด์



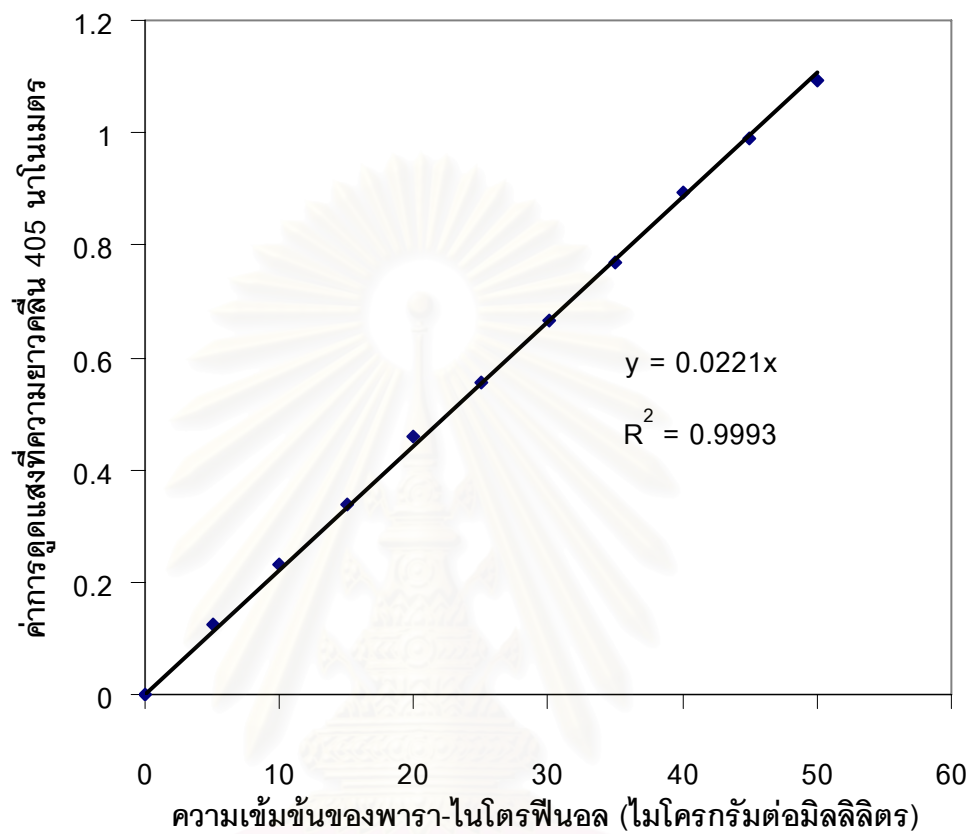
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล ความเข้มข้น 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์แอดดิวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

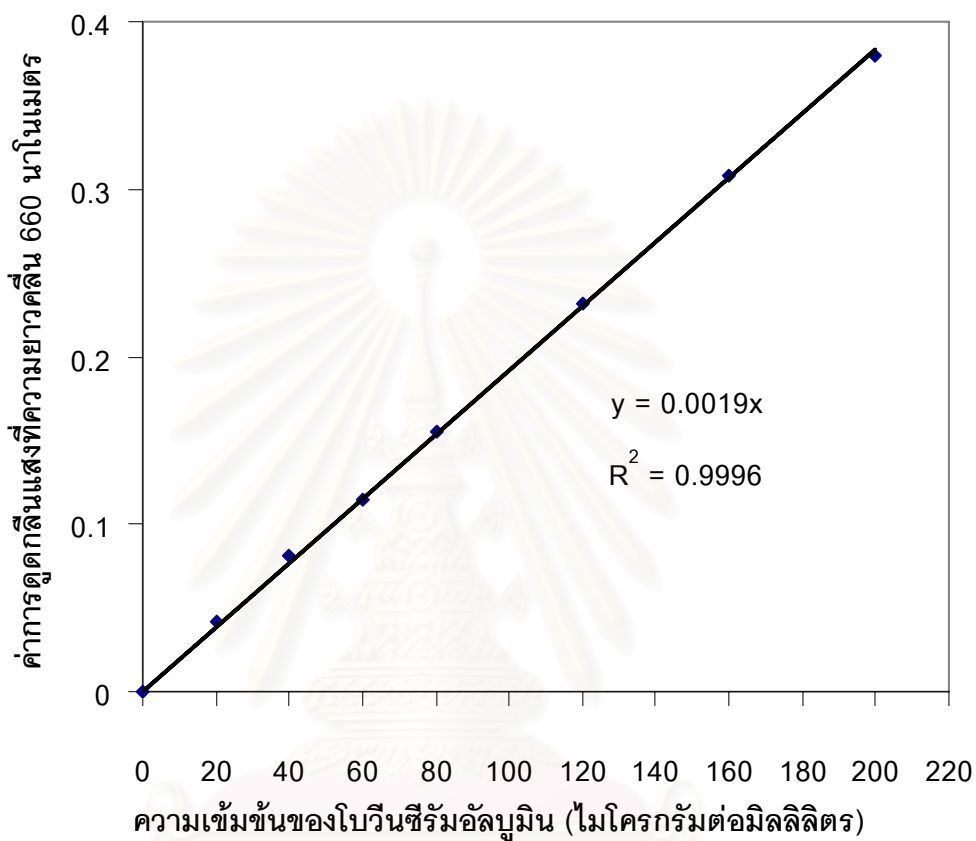
1.4 กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์แอกติวิตีของแอสซีติลเอสเทอร์



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 2. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปาริฉัตร ราวีศรี เกิดเมื่อวันอังคารที่ 24 สิงหาคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 ปัจจุบันอาศัยอยู่ที่ บ้านเลขที่ 4/838 ซอย 33 หมู่บ้านสหกรณ์ ถนนเสรีไทย แขวงคลองกุ่ม เขตบึงกุ่ม กรุงเทพมหานคร 10240

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

1. ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับชาติ “TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness” ระหว่างวันที่ 9-12 ตุลาคม 2550 ณ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ในหัวข้อเรื่อง “Cooperative action of xylanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and acetyl esterase from *Streptomyces* sp. PC22 and  $\beta$ -xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 on the degradation of hemicellulosic residues.” ร่วมกับรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปั้นพานิชการ
2. Riangrunrojana, P., Raweesri, P., Chungool, W., and Pinphanichakarn, P. 2005.  $\alpha$ -L Arabinofuranosidase and Acetyl esterase from *Streptomyces* sp. PC22 and Their synergistic Actions with Xylanase and  $\beta$ -xylosidase. pp. 192-199. in The Proceedings of The International Conference and TSB Annual Meeting on: Innovative Biotechnology; The Era of Biotechnology, 2-3 Nov. 2005, Bangkok, Thailand.
3. Chungool, W., Thongkam, W., Raweesri, P., Thamchaipenet, A., and Pinphanichakarn, P. 2008. Production, purification, and characterization of acetyl esterase from *Streptomyces* sp. PC22 and its action in cooperation with xylanolytic enzymes on xylan degradation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 549-556.
4. Raweesri, P., and Pinphanichakarn, P. 2007. Cooperative action of xylanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and acetyl esterase from *Streptomyces* sp. PC22 and  $\beta$ -xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 on the degradation of hemicellulosic residues. pp. 122-127. The Proceedings of The 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness”, 9-12 Oct. 2007, Bangkok, Thailand.