การผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส โดย *Streptomyces* sp. PC22

นางสาววิชุตา เหล่าเรืองธนา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN : 974-53-1476-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

α-L-ARABINOFURANOSIDASE PRODUCTION BY *Streptomyces* sp. PC22

Miss Vichuta Lauruengtana

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN : 974-53-1476-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส โดย Streptomyces sp. PC22
โดย	นางสาววิชุตา เหล่าเรืองธนา
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

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

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิชุตา เหล่าเรืองธนา : การผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส โดย *Streptomyces* sp. PC22 (α-L-ARABINOFURANOSIDASE PRODUCTION BY *Streptomyces* sp. PC22) อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ 101 หน้า. ISBN: 974-53-1476-5

งานวิจัยนี้ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโซ่กิ่งของไซแลน จาก *Streptomyces* sp. PC22 ผลการแปรชนิดของไซแลนที่มีขายทางการค้า ได้แก่ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ไซแลนจากไม้เบิร์ช และไซแลนจากไม้บีช พบว่าไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเมื่อใช้ร่วมกับแหล่งอินทรีย์หรืออนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ พอลิเพพโทน หรือ NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 0.21 และ 0.36 หน่วยต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน ที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 8 ผลการแปรวัสดุทางการเกษตรที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนไซแลน ได้แก่ รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า ฟางข้าว เปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด กากเมล็ดฝ้าย และขี้เลื่อย พบว่า รำข้าวสาลีที่ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เหมาะสมที่สุด โดยเมื่อใช้ร่วมกับแหล่งอินทรีย์หรืออนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ พอลิเพพโทน ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับไนโตรเจน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้แอคติวิตีดีกว่าเมื่อใช้ไซแลน โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.48 และ 0.84 หน่วยต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน ที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 10 จากการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส พบว่ามีอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือที่ 65 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส และสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่ 75 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที และมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 5.0 – 9.0

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4472408823 : **MAJOR** INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: α-L-ARABINOFURANOSIDASE / *Streptomyces* sp. PC22

VICHUTA LAURUENGTANA : α-L-ARABINOFURANOSIDASE PRODUCTION BY *Streptomyces* sp. PC22. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 101 pp. ISBN : 974-53-1476-5

Optimal production conditions for α-L-arabinofuranosidase, one of the xylan debranching enzymes, by *Streptomyces* sp. PC22 were investigated. Among various sources of commercial available xylan which were from oat spelts, birchwood, and beachwood, oat spelt xylan was the best carbon source. Oat-spelt xylan at the optimal concentration of 1.0% (w/v) with a suitable organic or inorganic nitrogen source which was polypeptone or NH_4NO_3 at the concentration equivalent to 0.05% nitrogen (w/v), the maximum enzyme activities of 0.21 and 0.36 $U.ml^{-1}$ were obtained, respectively, when cultivated for 2 days at the initial pH of 8. When xylan-containing agricultural materials including wheat bran, rice bran, rice straw, corn hulls, corn cobs, cotton seed hulls and saw dust were used as a carbon source in place of the commercial xylan, among them wheat bran was found to be the best. Wheat bran at the optimal concentration of 3.0% (w/v) along with suitable organic nitrogen, polypeptone, at the concentration equivalent to 0.05% nitrogen (w/v) or inorganic nitrogen, $(NH_4)_2SO_4$, at the concentration equivalent to 0.1% nitrogen (w/v), the activities obtained were higher than those by the commercial xylan with maximum values of 0.48 and 0.84 $U.ml^{-1}$, respectively, after 2 days of cultivation at initial pH of 10. Preliminary study on the enzyme properties revealed that it had temperature and pH optima of 65°C and 6.0, respectively. In addition it was found that the enzyme was stable to temperature up to 60°C for 30 min but completely lost its activity upon preincubation for 30 min at 75°C while it was stable to a wide range of pH from 5.0 – 9.0.

Department Microbiology Student's signature…….

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature…….

Academic year 2004 Co-advisor's signature……..

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นประธาน และคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ความรู้ คำปรึกษา และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนในงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่ใช้ชีวิตร่วมกันในแผนก ที่มีส่วนช่วยให้มีกำลังใจ และกำลังกาย ในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณพี่ทรรศนีย์ ตั้งสกุล พี่โตมร ทองน้ำวน ที่ช่วยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดมา และขอขอบคุณ คุณเวฬุรีย์ ทองคำ คุณวัชรี ชุณห์กุล คุณปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์ สำหรับความช่วยเหลือ และคำปรึกษาที่ดี และขอขอบคุณเพื่อนๆ ร่วมรุ่นที่น่ารักทุกคน ที่คอยเอาใจช่วย และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ คุณพ่อ คุณป้า คุณตา คุณยาย และคุณอิสริยะ ศิริจักรวาล ที่เป็นกำลังใจ และสนับสนุนมาโดยตลอด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ....ช

สารบัญตาราง ....ซ

สารบัญรูป .... ฌ

บทที่

1. บทนำ 1
2. ปริทัศน์วรรณกรรม 6
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง 27
4. ผลการทดลอง 39
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 78

รายการอ้างอิง 87

ภาคผนวก 95

ภาคผนวก ก 96

ภาคผนวก ข 97

ภาคผนวก ค 98

ภาคผนวก ง 100

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 101

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส...	13
2.2	ภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส.....	18
2.3	สมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	23
4.1	ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ไซแลน หรือรำข้าวสาลี เป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับอินทรีย์ไนโตรเจน หรืออนินทรีย์ไนโตรเจน.....	70
4.2	สมบัติของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Streptomyces* sp. PC22.....	77
5.1	การผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสจาก *Streptomyces* sp. PC22 เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม.....	81
5.2	สมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Streptomyces* sp. PC22 เปรียบเทียบกับจากจุลินทรีย์อื่นๆ.....	85

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ลักษณะโครงสร้างของอะราบิโน-(4-โอ-เมทธิลกลูคูโรโน)ไซแลน จากไม้เนื้ออ่อน....	2
1.2	ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยไซแลน.	5
2.1	การหมักไซโลสเป็นเอทานอลโดยยีสต์.....	10
2.2	การหมักอะราบิโนสเป็นเอทานอลโดยยีสต์.....	11
2.3	การหมักไซโลสเป็นเอทานอล โดยใช้ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase).....	12
4.1	รูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. PC22.....	40
4.2	ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และภายในเซลล์ของ *Streptomyces* sp. PC22.....	41
4.3	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส.....	43
4.4	ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส...	44
4.5	ผลของไซแลน และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการสร้าง แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส.....	46
4.6	ผลของความเข้มข้นของไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 วัน.....	47
4.7	ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสเมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน.....	48
4.8	ผลของวัสดุทางการเกษตรที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เปรียบเทียบกับไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร).....	51
4.9	ผลของความเข้มข้นของรำข้าวสาลีต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เปรียบเทียบกับไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 วัน.....	52
4.10	ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้รำข้าวสาลี 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน.....	53

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.11 ผลของอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนเท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และบ่มเป็นเวลา 2 วัน โดยเปรียบเทียบกับพอลิเพพโทน..... 55

4.12 ผลของอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน เท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้รำข้าวสาลี 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และบ่มเป็นเวลา 2 วัน โดยเปรียบเทียบกับพอลิเพพโทน..... 56

4.13 ผลของความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน ของแอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 วัน..... 58

4.14 ผลของความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน ของแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ต่อการสร้าง แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้รำข้าวสาลี 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 วัน..... 59

4.15 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน เท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน..... 61

4.16 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน เท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และใช้รำข้าวสาลี 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน..... 62

4.17 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน..... 64

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.18	ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน.....	65
4.19	ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเท่ากับ 8.....	67
4.20	ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเท่ากับ 10.....	68
4.21	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส.....	72
4.22	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส.....	73
4.23	ความเสถียรของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสต่ออุณหภูมิ.....	75
4.24	ความเสถียรของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสต่อความเป็นกรดด่าง.....	76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

เซลล์พืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในธรรมชาติ ประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิดคือ เซลลูโลส (cellulose) ซึ่งมีมากที่สุดคือ 40 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) มี 33 เปอร์เซ็นต์ และชนิดสุดท้ายคือลิกนิน (lignin) มี 23 เปอร์เซ็นต์ (Rahman, Kato และคณะ, 2003) เฮมิเซลลูโลส ประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์หลายชนิด เช่น ไซแลน (xylan), กลูแคน (glucan), แมนแนน (mannan), กาแลคแทน (galactan) และอะราบิแนน (arabinan) โดยมีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก (Hespell และ O'Bryan, 1992)

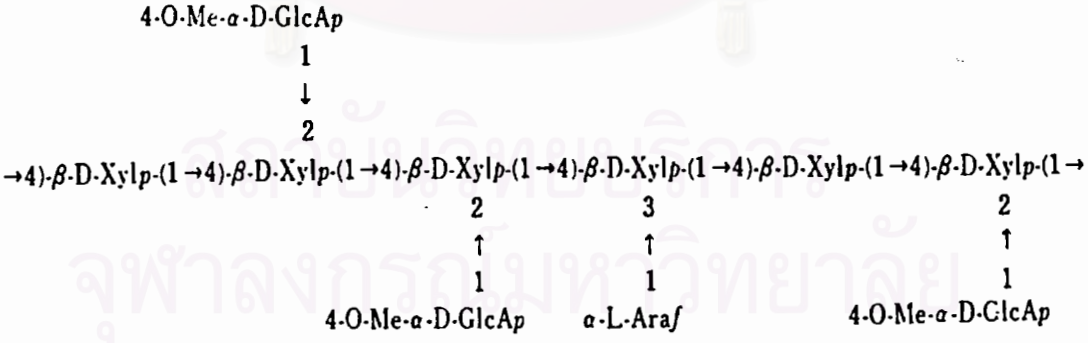
ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในเซลล์พืช พบได้ในธรรมชาติทั้งในไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง พืชล้มลุก ในผนังเซลล์ชั้นแรกของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว รวมทั้งในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว รำข้าว เปลือกไม้ กากเมล็ดฝ้าย ซังข้าวโพด เปลือกเมล็ดทานตะวัน (Magee และ Kosaric, 1985) และในเปลือกเมล็ดธัญพืชต่างๆ (Ericksson และคณะ, 1990) นอกจากนี้ยังสามารถพบไซแลนได้ในวัสดุเหลือทิ้งในระหว่างกระบวนการลอกเนื้อไม้เพื่อทำเยื่อกระดาษ (pulping) หรือจากโรงสีข้าว (Biely, 1985) ไซแลนที่พบจากแหล่งต่างกัน จะมีปริมาณและโครงสร้างแตกต่างกันไปตามแหล่งที่พบ เช่น ในไม้เนื้อแข็งพบว่ามีปริมาณไซแลนมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Wood และ McCrae, 1996) ในไม้เนื้ออ่อนจะมีไซแลนประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ในไม้ล้มลุกและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจะมีไซแลนประมาณ 20 - 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Saddler และคณะ, 1983)

ไซแลนจากแหล่งที่มาต่างๆ กัน เช่น หญ้า ธัญพืช ไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง ก็จะมีองค์ประกอบแตกต่างกันไป ดังนี้ ไซแลนจากไม้เบิร์ช ประกอบด้วย ไซโลส 89.3 เปอร์เซ็นต์, อะราบิโนส 1 เปอร์เซ็นต์ และ กลูโคส 1.4 เปอร์เซ็นต์ ไซแลนจากรำข้าว ประกอบด้วย ไซโลส 46 เปอร์เซ็นต์, อะราบิโนส 44.9 เปอร์เซ็นต์, กาแลคโตส 6.1 เปอร์เซ็นต์ และ กลูโคส 1.9 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น (Saha, 2000)

1.2 โครงสร้างของไซแลน

โครงสร้างของไซแลนเป็นพอลิเมอร์ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลสิดิก (β-1,4-xylosidic) เป็นสายหลัก และมีสารประกอบอื่นมาเชื่อมต่อเป็นหมู่ข้างเคียง เช่น อะราบิโนส ต่อที่ตำแหน่ง O-3 ของไซโลส เมททิลกลูคูโรเนท ต่อที่ตำแหน่ง O-4 ของไซโลส ส่วนกลูคูโรเนท หรืออะซิเทต ต่อที่ตำแหน่ง O-2 โดยที่หมู่ข้างเคียงข้างต้นจะกระจายอยู่ในสายหลักของไซแลนอย่างไม่สม่ำเสมอ (Hespell และ O'Bryan, 1992) อีกทั้งยังขึ้นกับแหล่งที่มาของไซแลนด้วย โดยไซแลนในไม้เนื้ออ่อน และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น พืชจำพวกหญ้า ได้แก่ ฟางข้าว และธัญพืช ได้แก่ เปลือกข้าวโอ๊ต รำข้าวสาลี จะมีอะราบิโนสเป็นหลัก (Schyns และคณะ, 1994) ส่วนไซแลนในไม้เนื้อแข็ง จะมีหมู่อะซิทิลเป็นหลัก (Degrassi และคณะ, 2003)

โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน คือ อะราบิโน-(4-โอ-เมทธิลกลูคูโรโน)ไซแลน (arabino-(4-O-methylglucurono)xylan) ซึ่งมีสายหลักเป็นไซโลส เชื่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4 และมี 4-โอ-เมทธิล-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด (4-O-methyl-D-glucuronic acid) เชื่อมต่อที่ตำแหน่ง โอ-2 และมีแอล-อะราบิโนส เชื่อมต่อที่ตำแหน่ง โอ-3 (Hon และ Shiraishi, 1990) ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 ลักษณะโครงสร้างของอะราบิโน-(4-โอ-เมทธิลกลูคูโรโน)ไซแลน จากไม้เนื้ออ่อน (Hon และ Shiraishi, 1990)

1.3 การย่อยสลายไซแลน

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

การย่อยสลายไซแลนโดยการใช้สารเคมีมักใช้ในการกำจัดลิกนินออกจากเนื้อไม้ ในกระบวนการเตรียมเยื่อกระดาษ เนื่องจากในเยื่อกระดาษที่ยังไม่ผ่านการฟอกสีนั้นจะมีสีน้ำตาล สันนิษฐานได้ว่ามาจากลิกนินที่เหลือ โดยทั่วไปเยื่อกระดาษจะผ่านการฟอกสีโดยใช้ ก๊าซคลอรีน และ คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide) ซึ่งทำให้เกิดสารประกอบไดออกซิน และสารประกอบคลอไรด์ที่เป็นพิษชนิดอื่นๆ ด้วย อีกทั้งสารประกอบเหล่านี้ไม่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และยังทำให้เกิดปัญหามลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมอย่างรุนแรง (Bezalel และคณะ, 1993)

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะกว่าการใช้สารเคมี และยังไม่ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษ ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนประกอบด้วยเอนไซม์สองกลุ่มใหญ่คือ

1. เอนโด-บีตา-1,4-ไซแลเนส (endo-β-1,4-xylanase; EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลสิดิก แบบสุ่ม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่ากลไกแบบภายใน (endo-mechanism) ได้ไซโลสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Gilbert และคณะ, 1993)

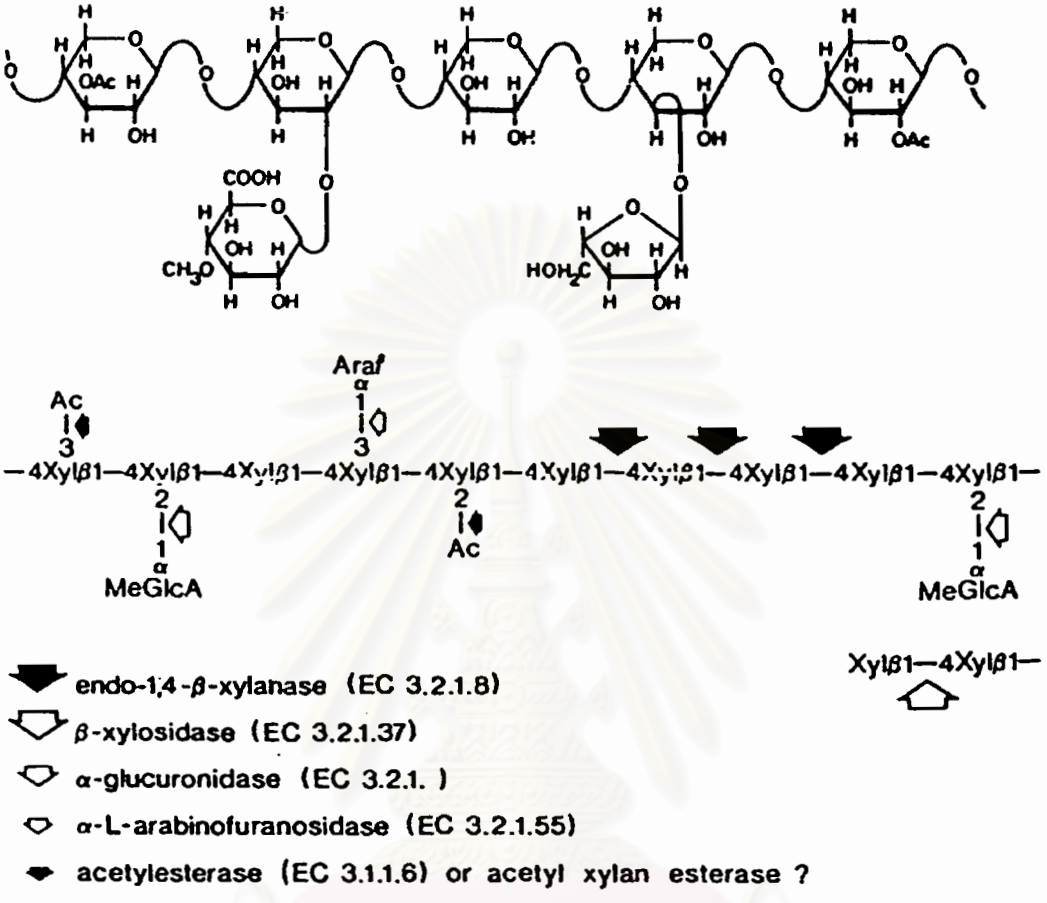
2. บีตา-ไซโลสิเดส (β-xylosidase; EC 3.2.1.37) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ทีละ 1 หน่วยจากปลายด้านนอนรีดิวซ์ (non-reducing end) เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่ากลไกแบบภายนอก (exo-mechanism) ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dekker และ Richards, 1976)

นอกจากนี้การย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์ต้องอาศัยเอนไซม์ที่สามารถย่อยหมู่ข้างเคียงร่วมด้วย ดังแสดงในรูปที่ 1.2 ได้แก่ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส (α-L-arabinofuranosidase; EC 3.2.1.55), แอลฟา-กลูคูโรนิเดส (α-glucuronidase; EC 3.2.1.139) และอะซีทิลไซแลนเอสเทอเรส (acetylxylan esterase; EC 3.1.1.6) (Filho และคณะ, 1996) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงอย่างละเอียดเฉพาะแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สนใจจะศึกษาต่อไป

แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายหมู่อะราบิโนสจากไซแลน อะราบิโนไซแลน และอะราบิแนน ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ในกลุ่มเฮมิเซลลูโลส เอนไซม์นี้จึงจัดเป็นเอนไซม์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในกลุ่มย่อยสลายไซแลน โดยมีบทบาทร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ ในกลุ่มนี้ การย่อยสลายไซแลน อะราบิโนไซแลน หรืออะราบิแนนให้สมบูรณ์จนได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้สารที่มีประโยชน์ชนิดต่างๆ

แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสพบในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น รา แบคทีเรีย ยีสต์ และแอคติโนมัยซีทีส จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษา *Streptomyces* spp. ที่เจริญได้ในภาวะค่าความเป็นกรดด่างสูงประมาณ 9 และที่อุณหภูมิสูงประมาณ 40 - 45 องศาเซลเซียส รวมทั้งศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนสายหลัก ได้แก่ ไซแลเนส และบีตา-ไซโลสิเดส งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะนำ *Streptomyces* sp. PC22 ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการสร้างไซแลเนส (Ungchaithum และ Pinphanichakarn, 1998) มาศึกษาความสามารถในการผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส รวมทั้งศึกษาสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์นี้ เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไซแลเนสต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.2 ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยไซแลน (Biely, 1985)

Ac	แทน	หมู่อะซีทิล
Araf	แทน	แอล-อะราบิโนฟิวราโนส
MeGlcA	แทน	กรด 4-โอ-เมธิล-ดี-กลูคูโรนิค
Xyl	แทน	ดี-ไซโลส

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ชนิดของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส ซึ่งตัดหมู่ แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิลจากโอลิโกแซคคาไรด์ และพอลิแซคคาไรด์ต่างๆ เอนไซม์กลุ่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของ glycosidase ซึ่งใช้ในการย่อยสลาย อะราบิแนน อะราบิโนไซแลน และพอลิแซคคาไรด์อื่นๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชอย่างสมบูรณ์ (Margolles และคณะ, 2003)

พอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยอะราบิโนส เช่น อะราบิแนน อะราบิโนกาแลคแทน และอะราบิโนไซแลน มีอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชแตกต่างกัน เช่น ใบไม้ ราก เมล็ด และดอกเป็นต้น (Luonteri และคณะ, 1998)

อะราบิแนนประกอบด้วยพันธะ แอลฟา-1,5 ของหมู่อะราบิโนฟิวราโนส เป็นสายหลัก และมีอะราบิโนฟิวราโนสมาต่อเป็นสายกิ่งด้วยพันธะ แอลฟา-1,2 และ แอลฟา-1,3 ในอะราบิโนกาแลคแทนนั้น สายหลักของกาแลคโตไพราโนสจะเชื่อมด้วยหมู่ข้างเคียงคืออะราบิโนฟิวราโนส ที่ตำแหน่ง O-3 และ O-6 (Luonteri และคณะ, 1998) ส่วนในอะราบิโนไซแลน มีไซโลสมาต่อเป็นสายหลักด้วยพันธะบีตา-1,4 และมีแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสต่อเป็นโซ่กิ่งที่ตำแหน่ง O-3 หรือในบางกรณีก็จะต่อทั้งตำแหน่ง O-2 และ O-3 เป็นต้น (Margolles และคณะ, 2003)

แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส (EC 3.2.1.55) เป็นเอนไซม์ชนิด exo-type ที่ย่อยพันธะแอลฟา-1,2 และแอลฟา-1,3 จากปลายสายด้านนอนรีดิวซ์ของหมู่ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสจากไซแลน อะราบิโนไซแลน และอะราบิโนกาแลคแทน (Manin และคณะ, 1994) ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายไซแลน และมีความจำเป็นในการย่อยอะราบิโนไซแลนอย่างสมบูรณ์ (Saha, 2000) และถ้าทำงานร่วมกับ เอนโด-1,5-แอลฟา-แอล-อะราบินาเนส (EC 3.2.1.99) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะ 1,5-แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิดิกภายในสายของแอลฟา-1,5-อะราบิแนนนั้น ก็ทำให้เกิดการย่อยสลายอะราบิแนนอย่างสมบูรณ์ (Margolles และคณะ, 2003)

อะราบิโนสซึ่งเป็นหมู่ข้างเคียงตัวหนึ่งของไซแลน ถูกพบเป็นปริมาณมากในรูปของอะราบิโนไซแลนในรำข้าวสาลี และฟาง ในปฏิกิริยาการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่สำคัญใช้เอนโด-บีตา-1,4-ไซแลเนส แสดงให้เห็นว่าการที่มีอะราบิโนสเป็นหมู่ข้างเคียงจะเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการทำปฏิกิริยาของไซแลเนส (Debeche และคณะ, 2000) ได้มีรายงานเกี่ยวกับการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนสายหลักเมื่อมีการทำงานร่วมกันกับแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ดังนี้

Lee และ Forsberg (1987) ศึกษาการทำงานร่วมกันของอะราบิโนฟิวราโนสิเดส กับไซแลเนสบี และไซโลสิเดส ในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต พบว่าให้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น 74 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการย่อยพันธะแอลฟา-1,3 ของอะราบิโนสที่เกาะกับไซแลนสายหลัก ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลน

Wood และ McCrae (1996) ศึกษาผลของการทำงานร่วมกันระหว่างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส กับ เอนโด-1,4-บีตา-ดี-ไซแลเนส จาก *Aspergillus awamori* พบว่าช่วยเพิ่มการปล่อยอะราบิโนส จากอะราบิโนไซแลนจากฟางข้าวโอ๊ต จาก 10.3 เปอร์เซ็นต์ เป็น 42.2 เปอร์เซ็นต์ และช่วยเพิ่มการปล่อยอะราบิโนส จากอะราบิโนไซแลนจากฟางข้าวสาลี ขึ้นจาก 10.2 เปอร์เซ็นต์ เป็น 69.8 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

Rahman, Sugitani และคณะ (2003) ศึกษาบทบาทของอะราบิโนฟิวราโนสิเดส กับไซแลเนส และไซโลสิเดส จาก *Penicillium* sp. AHT-1 ในการย่อยสลายไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต พบว่าจะช่วยเพิ่มปริมาณน้ำตาลไซโลสจาก 25 เปอร์เซ็นต์ เป็น 61 เปอร์เซ็นต์ และลำดับในการทำปฏิกิริยาในการย่อยสลายไซแลนจะเริ่มจากแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ต่อด้วยไซแลเนส และสุดท้ายคือบีตา-ไซโลสิเดส

Tuncer และ Ball (2003) ศึกษาการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยสลายไซแลนจาก *Thermomonospora fusca* BD25 ต่อการย่อยไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต พบว่าการใช้บีตา-ไซโลสิเดส และแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ร่วมกับไซแลเนส จะช่วยเพิ่มการย่อยสลายไซแลนเป็น 2 เท่า คือเพิ่มจาก 28 เปอร์เซ็นต์ เป็น 58 เปอร์เซ็นต์ของสับสเตรททั้งหมด โดยได้ไซโลส และอะราบิโนสเป็นผลิตผลหลัก

2.2 ประโยชน์ของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลน เป็นที่สนใจกันมากเพราะสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรมการเกษตรได้จริง เช่น การแปรสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเป็นเชื้อเพลิงและสารเคมี การกำจัดลิกนินจากเยื่อกระดาษ การเพิ่มความสามารถการย่อยของอาหารสัตว์ การทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้น และการช่วยเพิ่มกลิ่นรสในไวน์ได้ เป็นต้น (Saha, 2000)

การใช้ประโยชน์ของน้ำตาลจากเฮมิเซลลูโลส เป็นสิ่งสำคัญในการเปลี่ยนวัสดุทางการเกษตรให้เป็นเอทานอลและสารที่ใช้ประโยชน์ได้อื่นๆ อย่างมีประสิทธิภาพ การใช้กรดเจือจางที่อุณหภูมิสูง จะย่อยเฮมิเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Saha และ Bothast, 1999) อย่างไรก็ดีการใช้กรดในการย่อยก็จะสร้างผลิตผลข้างเคียงที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักด้วย ดังนั้น เอนไซม์ในกลุ่มที่ใช้ย่อยสลายไซแลน (Xylan-degrading enzyme) จึงมีความสำคัญมากในการย่อยสลายผลผลิตทางการเกษตร ไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สำหรับเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเชื้อเพลิงและสารเคมีที่มีประโยชน์

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

Bezalel และคณะ (1993) ได้ปรับปรุงประสิทธิภาพการฟอกสีเยื่อกระดาษของ T-6 ไซแลเนส ที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* สายพันธ์ T-6 โดยทดลองให้มีการทำงานร่วมกันกับเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลส พบว่าการใช้อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Bacillus stearothermophilus* สายพันธุ์ L1 ร่วมกับ T-6 ไซแลเนส สามารถเพิ่มปริมาณการปลดปล่อยลิกนิน ออกจากเยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ฟอกสีอย่างเห็นได้ชัด

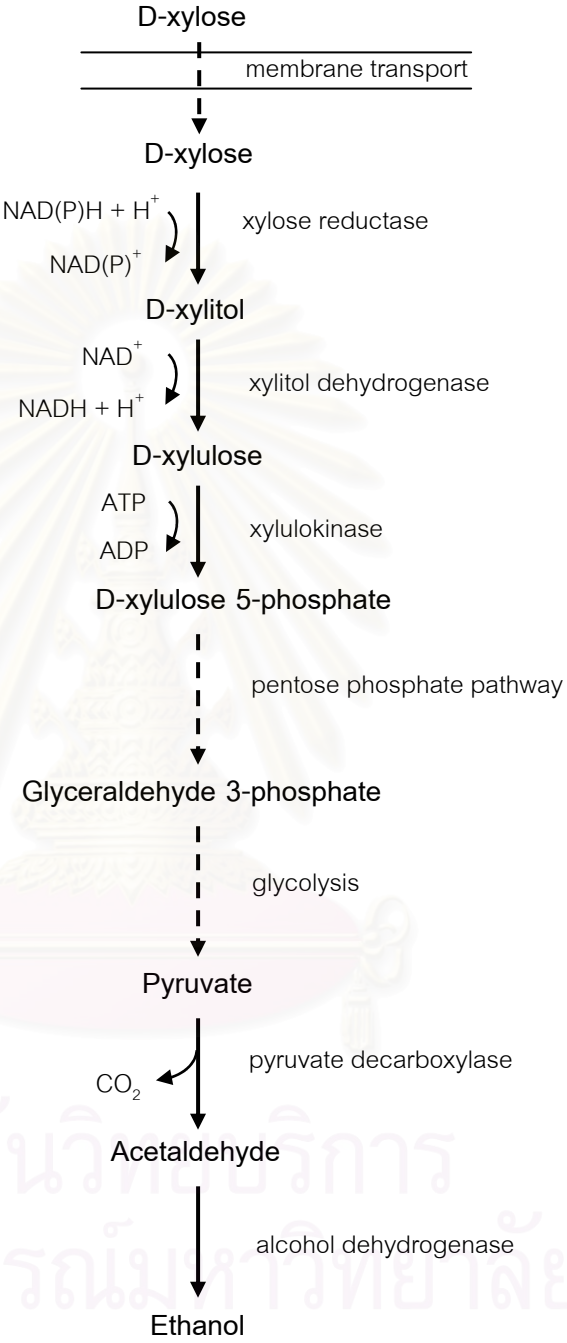
Yanai และคณะ (2000) ศึกษาผลของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Pichia capsulata* X91 ต่อการเพิ่มกลิ่นรสในไวน์องุ่นพันธุ์ muscat พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส สามารถปล่อย monoterpenol จาก monoterpenyl arabinofuranosylglucosides ทำให้ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบของกลิ่นรสในไวน์ได้ เช่น linalool citronellol และ geraniol จึงช่วยปรับปรุงกลิ่นรสด้วย

การย่อยสลายอะราบิโนไซแลนอย่างสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือไซโลส และอะราบิโนส ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ไซโลสใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไซลิทอล (Barbosa และคณะ, 1988) เอทานอล และบิวทานอล (Neale และคณะ, 1988) ส่วนอะราบิโนส เนื่องจากมีรสหวานและไม่ดูดซึมเข้าร่างกาย จึงใช้เป็นสารให้ความหวานได้ (Seri และคณะ, 1996) อีกทั้งยังสามารถป้องกันภาวะน้ำตาลในเลือดสูงในผู้ป่วยโรคเบาหวาน หลังจากรับประทานอาหารที่มีซูโครสเข้าไปได้ (Matsuo และคณะ, 2000)

ในปัจจุบันนี้ การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นที่สนใจอย่างมาก เนื่องจากมีประสิทธิภาพ และช่วยเพิ่มคุณค่าของวัสดุเหลือทิ้ง ในปี 2002 เอทานอลกว่า 2 ล้านแกลลอนถูกผลิตขึ้นจากการหมักแป้งเป็นหลัก และแนวโน้มการใช้เอทานอลในอนาคตประเมินกันว่าจะมีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเป็นสารที่มีความปลอดภัยกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้ methyl tertiary butyl ether (MTBE) ซึ่งเป็นสารผสมในน้ำมันเพื่อการเผาไหม้ที่สะอาด และใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุด แต่ MTBE นี้ถูกพบว่ามีการปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ (Saha, 2003)

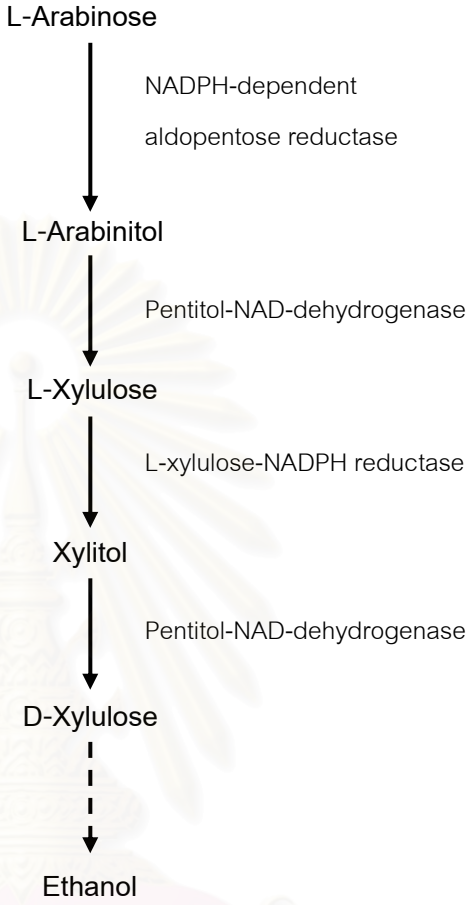
วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ยังไม่ได้ใช้ประโยชน์ สามารถใช้เป็นวัตถุดิบราคาถูกในการผลิตเอทานอลได้ การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์จะได้น้ำตาลต่างๆ ขึ้นกับแหล่งที่มา เช่น ไซโลส กาแลคโตส แมนโนส ฟรุกโตส แรมโนส กลูโคส และอะราบิโนส แม้ว่า *Saccharomyces cerevisiae* ทั่วๆ ไป จะเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว แต่ก็ไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลชนิดอื่นๆ เช่นไซโลส และอะราบิโนส ไปเป็นเอทานอลได้ (Saha, 2003)

Pachysolen tannophilus, Pichia stipitis และ *Candida shehate* เป็นยีสต์ที่สามารถเปลี่ยนไซโลส และอะราบิโนสไปเป็นเอทานอลได้ (Walker, 1998) ดังรูปที่ 2.1 และ 2.2 แต่ในเชิงพานิชย์การใช้ยีสต์เหล่านี้ในการหมักเอทานอลมีอยู่ไม่มาก เพราะมีความทนต่อเอทานอลได้ต่ำ กระบวนการหมักเป็นไปอย่างเชื่องช้า และการควบคุมออกซิเจนเพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมทำได้ยาก (Du Preez, 1994) แต่อย่างไรก็ตามไซโลสสามารถถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลส (xylulose) โดยใช้ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) และยีสต์ทั่วๆ ไปสามารถหมักไซลูโลสเป็นเอทานอลได้ (Gong และคณะ, 1981) จึงมีการใช้ recombinant DNA technology โดยการ transform xylose isomerase gene จากแบคทีเรีย เข้าสู่ *Saccharomyces cerevisiae* ทำให้สามารถหมักไซโลสเป็นเอทานอลได้ (Walker, 1998) ดังรูปที่ 2.3



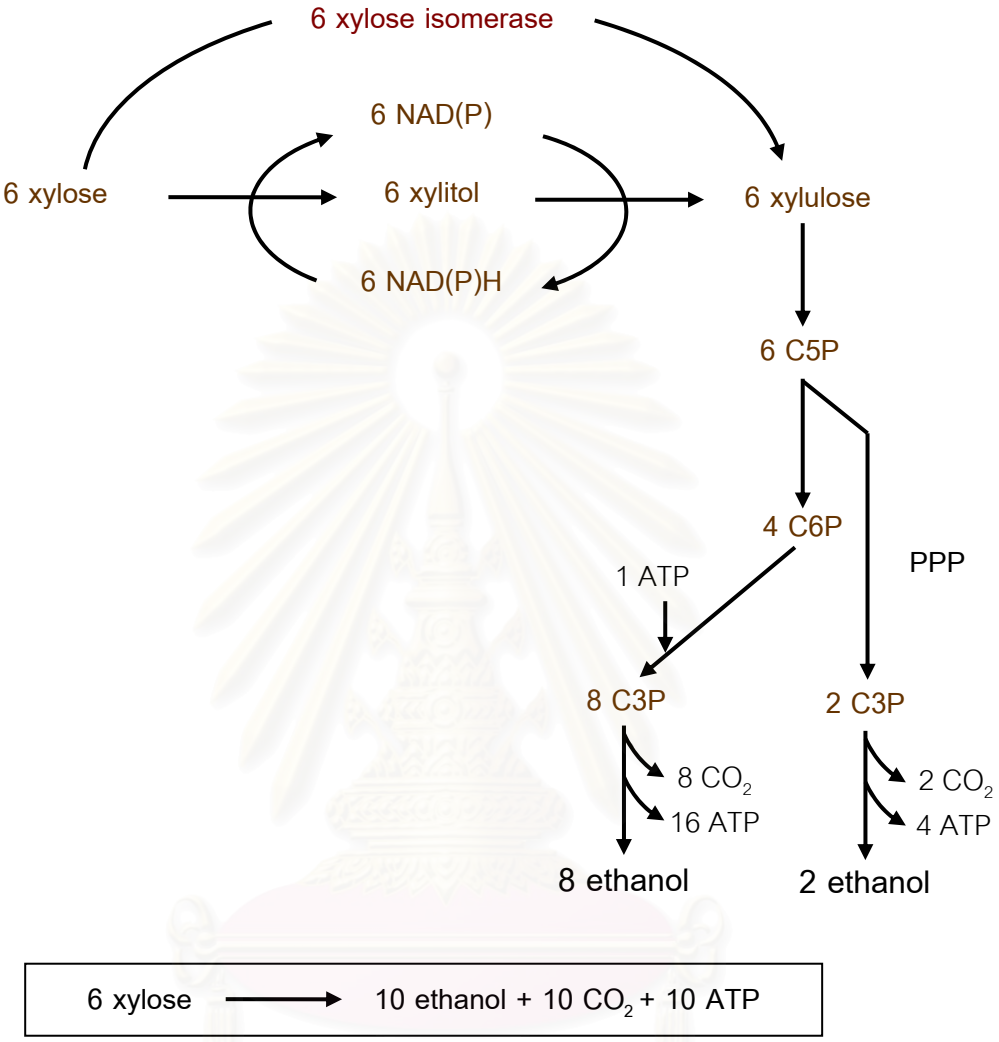
รูปที่ 2.1 การหมักไซโลสเป็นเอทานอลโดยยีสต์ (Walker, 1998)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.2 การหมักอะราบิโนสเป็นเอทานอลโดยยีสต์ (Walker, 1998)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.3 การหมักไซโลสเป็นเอทานอล โดยใช้ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) (Kuyper และคณะ, 2004)

C3P คือ triose-3-phosephate

C5P คือ pentose-5-phosphate

C6P คือ hexose-6-phosphate

PPP คือ pentose phosphate pathway

2.3 แหล่งของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสพบในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ และแอคติโนมัยสีท จุลินทรีย์บางสายพันธุ์จะสร้างและเก็บเอนไซม์ไว้ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) แต่บางสายพันธุ์จะสร้างและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori	Wood และ McCrae, 1996
Aspergillus awamori IFO 4033	Kaneko, Arimoto และคณะ, 1998
Aspergillus niger	Gunata และคณะ, 1990
Aspergillus niger 5-16	Kaneko และคณะ, 1993
Aspergillus sojae	Kimura และคณะ, 1995
Aspergillus terreus	Luonteri และคณะ, 1998
Aureobasidium pullulans	Saha และ Bothast, 1998a และ 1998b
Bacillus polymyxa	Morales และคณะ, 1995
Bacillus pumilus	Degrassi และคณะ, 2003
Bacillus stearothermophilus	Bezalel และคณะ, 1993
Bacillus stearothermophilus T-6	Gilead และ Shoham, 1995
Bacillus subtilis 3-6	Kaneko และ Kusakabe, 1995
Bacteroides xylanolyticus X5-1	Schyns และคณะ, 1994
Bifidobacterium longum B667	Margolles และ de los Reyes-Gavilan, 2003
Butyrivibrio fibrisolvens GS113	Hespell และ O'Bryan, 1992

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Clostridium acetobutylicum ATCC 824	Lee และ Forsberg, 1987
Cytophaga xylanolytica	Renner และ Breznak, 1998
Fusarium oxysporum	Panagiotou และคณะ, 2003
Penicillium capsulatum	Filho และคณะ, 1996
Penicillium chrysogenum	Sakamoto และ Kawasaki, 2003
Penicillium purpurogenum	De Ioannes และคณะ, 2000
Pichia capsulata X91	Yanai และ Sato, 2000
Rhizomucor pusillus HHT-1	Rahman และคณะ, 2001
Rhodotorula flava	Uesaka และคณะ, 1978
Rhodothermus marinus	Gomes และคณะ, 2000
Ruminococcus albus 8	Greve และคณะ, 1984
Streptomyces sp. No. 17-1	Kaji และคณะ, 1981
Streptomyces chartreusis GS901	Matsuo และคณะ, 2000
Streptomyces diastaticus	Tajana และคณะ, 1992
Streptomyces diastatochromogenes 065	Kaneko, Higashi และคณะ, 1998
Streptomyces lividans	Vincent และคณะ, 1997
Streptomyces purpurascens IFO 3389	Komae และคณะ, 1982
Thermobacillus xylanilyticus	Debeche และคณะ, 2000
Thermotoga thermarum	Sunna และ Antranikian, 1996
Trichoderma reesei	Kaneko, Kuno และคณะ, 1998

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

การผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสในจุลินทรีย์ ได้มีรายงานการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนหลากหลายชนิด รวมทั้งภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อก็แตกต่างกันตามความเหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด ดังนี้

Tajana และคณะ (1992) เลี้ยง *Streptomyces diastaticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรำข้าวสาลี 0.8 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ กลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.2 บ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสเท่ากับ 0.26 หน่วยต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Manin และคณะ (1994) ศึกษาแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Streptomyces lividans* 66 ซึ่งสร้างเอนไซม์ไว้ภายในเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (oat spelt xylan) 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.35 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มเชื้อที่ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้แอคติวิตีจำเพาะของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Saha และ Bothast (1998a) เลี้ยง *Aureobasidium pullulans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ อะราบิแนนจาก sugar beet, อะราบิโนไซแลนจากข้าวสาลี, แอล-อะราบิโนส, แอล-อะราบิทอล, ไซโลส, ไซลิทอล, ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต, ซังข้าวโพด และอะราบิโนกาแลคแทน ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มเชื้อที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่าแอล-อะราบิโนสให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงที่สุดคือ 0.498 หน่วยต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

De Ioannes และคณะ (2000) พบว่า *Penicillium purpurogenum* สร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสออกมาภายนอกเซลล์ และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ แอล-อะราบิทอล, sugar beet pulp, ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต, แอล-อะราบิโนส ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และฟางข้าวสาลีร่วมกับรำข้าวสาลี ที่ความเข้มข้นชนิดละ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีแหล่งไนโตรเจนคือ ยูเรีย 0.03 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียม

ซัลเฟต 0.14 เปอร์เซ็นต์ และนีโอเพพโทน 0.075 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่าได้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงสุดเท่ากับ 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้แอล-อะราบิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ขณะที่ sugar beet pulp, ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต และฟางข้าวสาลีร่วมกับรำข้าวสาลี ให้แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.85, 0.70 และ 0.55 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Gomes และคณะ (2000) ศึกษาแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Rhodothermus marinus* ซึ่งสร้างออกมาภายนอกเซลล์ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนคือไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 0.3 เปอร์เซ็นต์ และมีสารสกัดจากยีสต์ 0.6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 บ่มเชื้อที่ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่ามีแอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสเท่ากับ 65 nkat/ml และเมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าได้แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 48 nkat/ml ซึ่งน้อยกว่าไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต

Matsuo และคณะ (2000) เลี้ยง *Streptomyces chartreusis* GS901 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส โดยใช้อะราบิแนน 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) 23 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.2 และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ได้แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.117 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Yanai และ Sato (2000) เลี้ยง *Pichia capsulata* X91 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ซึ่งสร้างและเก็บไว้ภายในเซลล์ มีแหล่งไนโตรเจนเป็นเพพโทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และมีอะราบิโนส 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเป็น 4.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ได้แอคติวิตีจำเพาะของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสเท่ากับ 0.6 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Rahman และคณะ (2001) ศึกษาแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Rhizomucor pusillus* HHT-1 พบว่าเป็นเอนไซม์ที่สร้างออกมาภายนอกเซลล์ โดยใช้แอล-อะราบิทอล 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้พอลิเพพโทน 1.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 0.12 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่าความเป็นกรดด่างของ

อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 บ่มเชื้อที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ให้แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Panagiotou และคณะ (2003) ศึกษาแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างออกมาภายนอกเซลล์ และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้อะราบิโนไซแลนจากข้าวสาลีที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่าให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.037 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน

Rahman, Sugitani และคณะ (2003) ศึกษาแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Penicillium* sp. AHT-1 พบว่าเป็นเอนไซม์ที่สร้างออกมาภายนอกเซลล์ โดยใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้โซเดียมไนเตรท 0.2 เปอร์เซ็นต์ และพอลิเพพโทน 0.01 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่ามีแอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสเท่ากับ 0.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7

ตารางที่ 2.2 ได้แสดงตัวอย่างภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 ภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (°C)	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori IFO 4033	-	35	90 ชั่วโมง	Kaneko, Arimoto และคณะ, 1998
Aureobasidium pullulans	5.0	28	4 วัน	Saha และ Bothast, 1998b
Bacillus polymyxa	7.2	30	40 ชั่วโมง	Morales และคณะ, 1995
Bacillus pumilus	-	37	4 วัน	Degrassi และคณะ, 2003
Bacillus stearothermophilus T-6	7.0	55	1 วัน	Gilead และ Shoham, 1995
Fusarium oxysporum	6.0	30	4 วัน	Panagiotou และคณะ, 2003
Penicillium sp. AHT-1	7.0	30	7 วัน	Rahman, Sugitani และคณะ, 2003
Penicillium chrysogenum	5.0	30	12 วัน	Sakamoto และ Kawasaki, 2003
Penicillium purpurogenum	-	28	4 วัน	De Ioannes และคณะ, 2000
Pichia capsulata X91	4.0	28	2 วัน	Yanai และ Sato, 2000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (°C)	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง	เอกสารอ้างอิง
Rhizomucor pusillus HHT-1	5.5	40	5 วัน	Rahman และคณะ, 2001
Rhodothermus marinus	7.5-8.0	61	4 วัน	Gomes และคณะ, 2000
Streptomyces chartreusis GS901	7.2	30	4 วัน	Matsuo และคณะ, 2000
Streptomyces diastaticus	7.2	30	1 วัน	Tajana และคณะ, 1992
Streptomyces lividans 66	-	34	2 วัน	Manin และคณะ, 1994

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่ระบุ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 สมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

มีรายงานเกี่ยวกับสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ทั้งอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน ความเสถียรต่ออุณหภูมิ และความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่าง ดังนี้

Hespell และ O'Bryan (1992) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 6.0 - 6.5 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4.0 - 8.0

Kaneko และคณะ (1993) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Aspergillus niger* 5-16 มีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส และ 4.0 ตามลำดับ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิจนถึง 30 องศาเซลเซียส และสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่ 60 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0 - 7.0

Manin และคณะ (1994) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Streptomyces lividans* 66 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 6.0

Schwarz และคณะ (1995) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Clostridium stercorarium* (ArfB) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 5.5

Wood และ McCrae (1996) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Aspergillus awamori* มีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และ 4.6 ตามลำดับ และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิจนถึง 70 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 15 นาที

Renner และ Breznak (1998) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Cytophaga xylanolytica* มีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส และ 5.8 ตามลำดับ และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิจนถึง 45 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0 - 10.0

Saha และ Bothast (1998b) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Aureobasidium pullulans* มีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 75 องศาเซลเซียส และ 4.0 - 4.5 ตามลำดับ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิจนถึง 75 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที และเหลือแอคติวิตีอยู่ 50 เปอร์เซ็นต์ที่ 75 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0 - 5.5 และที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.0 และ 6.0 จะเหลือแอคติวิตีอยู่ 47 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

De Ioannes และคณะ (2000) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Penicillium purpurogenum* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 4.0

Debeche และคณะ (2000) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Thermobacillus xylanilyticus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 75 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 5.6 - 6.2 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิจนถึง 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยยังเหลือแอคติวิตีอยู่ 50 เปอร์เซ็นต์ และมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4.0 - 12.0

Gomes และคณะ (2000) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Rhodothermus marinus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 5.5 - 7.0 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8.3 ชั่วโมง และที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 นาที โดยยังคงเหลือแอคติวิตีอยู่ 50 เปอร์เซ็นต์ และมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 5.0 - 9.0

Yanai และ Sato (2000) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Pichia capsulata* X91 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 6.0 มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 6.0 - 8.0

Rahman และคณะ (2001) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Rhizomucor pusillus* HHT-1 มีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 65 องศาเซลเซียส และ 4.0 ตามลำดับ และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30 - 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และจะสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่ 80 องศาเซลเซียส มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 7.0 - 10.0

Degrassi และคณะ (2003) พบว่าอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Bacillus pumilus* เท่ากับ 55 องศาเซลเซียส และ 7.0 ตามลำดับ และมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 5.5 - 8.5 โดยสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 4.5 และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 135 นาที โดยยังคงเหลือแอคติวิตีอยู่ 80 เปอร์เซ็นต์ และยังคงเหลือแอคติวิตีอยู่ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ 75 องศาเซลเซียสในเวลาบ่มเท่ากัน

Margolles และ de los Reyes-Gavilan (2003) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Bifidobacterium longum* B667 มีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 40 - 50 องศาเซลเซียส และจะเหลือแอคติวิตีอยู่ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 5.5 - 7.5

Panagiotou และคณะ (2003) พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Fusarium oxysporum* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 50 - 60 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 6.0

ตารางที่ 2.3 ได้แสดงสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 สมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori	4.6	-	50	70 °C, 15 นาที	Wood และ McCrae, 1996
Aspergillus awamori IFO 4033	4.0	3.0-7.0	60	60 °C, 2 ชั่วโมง	Kaneko, Arimoto และคณะ, 1998
Aspergillus niger 5-16	4.0	4.0-7.0	60	30 °C, 2 ชั่วโมง	Kaneko และคณะ, 1993
Aureobasidium pullulans	4.0-4.5	4.0-5.5	75	75 °C, 30 นาที	Saha และ Bothast,1998b
Bacillus pumilus	7.0	5.5-8.5	55	65 °C, 135 นาที	Degrassi และคณะ, 2003
Bacillus stearothermophilus T-6	5.5-6.0	-	70	-	Gilead และ Shoham, 1995
Bacteroides xylanolyticus X5-1	5.5-6.0	5.5-9.0	50	50 °C, 20 นาที	Schyns และคณะ, 1994
Bifidobacterium longum B667	6.0	5.5-7.5	45	55 °C, 3 ชั่วโมง	Margolles และ de los Reyes-Gavilan, 2003

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	เอกสารอ้างอิง
Butyrivibrio fibrisolvens GS113	6.0-6.5	4.0-8.0	55	45 °C, 60 นาที	Hespell และ O'Bryan,1992
Clostridium stercorarium	5.0	-	70	-	Schwarz และคณะ, 1995
Fusarium oxysporum	6.0	-	50-60	-	Panagiotou และคณะ, 2003
Penicillium capsulatum (Ara I)	4.0	-	60	70 °C, 17.5 นาที	Filho และคณะ, 1996
(Ara II)	4.0	-	55	60 °C, 9 นาที	
Penicillium purpurogenum	4.0	-	50	-	De loannes และคณะ, 2000
Pichia capsulata X91	6.0	6.0-8.0	50	30 °C, 30 นาที	Yanai และ Sato, 2000
Rhizomucor pusillus HHT-1	4.0	7.0-10.0	65	70 °C, 1 ชั่วโมง	Rahman และคณะ, 2001
Rhodothermus marinus	5.5-7.0	5.0-9.0	85	85 °C, 8.3 ชั่วโมง 90 °C, 17 นาที	Gomes และคณะ, 2000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces chartreusis GS901(α-L-Afase I)	5.5	5.5-8.5	55	45°C, 5 ชั่วโมง	Matsuo และคณะ, 2000
(α-L-Afase II)	7.0	5.0-9.0	50	40°C, 5 ชั่วโมง	
Streptomyces diastaticus (C1)	5.0-6.5	3.5-7.5	-	25 °C, 8 ชั่วโมง	Tajana และคณะ, 1992
(C2)	5.0-6.5	3.5-7.5	-	50 °C, 3 ชั่วโมง	
Streptomyces lividans 66	6.0	-	60	-	Manin และคณะ, 1994
Thermoascus aurantiacus	4.0	2.5-10	70	50 °C, มากกว่า 2 วัน 75 °C, 3 ชั่วโมง	Roche และคณะ, 1994
Thermobacillus xylanilyticus	5.6-6.2	4.0-11.0	75	90 °C, 2 ชั่วโมง	Debeche และคณะ, 2000

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่ระบุ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Streptomyces sp. PC22 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 9 และมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตไซแลเนส (Ungchaithum และ Pinphanichakarn, 1998) และจากการศึกษาสมบัติของไซแลเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส และทนค่าความเป็นกรดด่างได้ในช่วงกว้าง (Wateewuthajarn และ Pinphanichakarn, 2000) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม

สำหรับงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส โดย *Streptomyces* sp. PC22 รวมทั้งศึกษาสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ดังกล่าว เพื่อเป็นข้อมูลในการนำมาใช้งานร่วมกันกับไซแลเนส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environmental incubator shaker) รุ่น GYROMAXIM 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., U.S.A.
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) รุ่น Avanti Centrifuge J-30I บริษัท Beckman, Germany
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของ Kubota, Japan
4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Digital pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 และ รุ่น Cyberscan 2000 บริษัท Eutech Cybernetics, สิงคโปร์, รุ่น Professional Meter PP-50 บริษัท Sartorius AG Göttingen, Germany
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic ® 401 ของ Milton Roy, U.S.A.
6. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-S และ รุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
7. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co., Ltd., Japan. และรุ่น HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan.
8. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น J2-21 บริษัท ISSCO, U.S.A.
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ของ Memmert, Germany.
10. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.
11. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, U.S.A
12. ฮีมาไซโทมิเตอร์ (Haemacytometer) Schott Duran, เยอรมันนี
13. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, ญี่ปุ่น

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ของ Sigma, U.S.A.
2. พารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside) ของ Sigma, U.S.A.
3. โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ของ Sigma, U.S.A.
4. อะลูมินา (Alumina) ของ Sigma, U.S.A.
5. ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelt xylan) ของ Sigma, U.S.A.
6. ไซแลนจากไม้เบิร์ช (Birchwood xylan) ของ Sigma, U.S.A.
7. ไซแลนจากไม้บีช (Beechwood xylan) ของ Sigma, U.S.A
8. ไซโลส (D-Xylose) ของ Sigma, U.S.A.
9. กลูโคส (D-Glucose Monohydrate) ของ Merck, Germany
10. อะราบิโนส (L-Arabinose) ของ Sigma, U.S.A.
11. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Unilab, สหรัฐอเมริกา
12. ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) บริษัท M & B
13. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท Unilab, สหรัฐอเมริกา
14. แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) บริษัท Fluka, เยอรมนี
15. โพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) บริษัท May & Baker, อังกฤษ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 และการเตรียมแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.1.1 การเตรียมสปอร์ *Streptomyces* sp. PC22

ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารแข็งเอียงข้าวไรท์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 - 15 วัน จึงนำมาขูดสปอร์ออกโดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวแขวนลอยดูดสปอร์แขวนลอยที่ได้ มากรองผ่านชุดกรองสปอร์ (ภาคผนวก ง หมายเลข 1) นำสปอร์แขวนลอยที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จึงเทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยใน 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง โดยเจือจางให้ได้ความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บเป็นปริมาตรน้อยๆ (aliquots) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.1.2 การศึกษารูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. PC22

ศึกษารูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. PC22 โดยถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. PC22 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.1.3 การตรวจสอบแหล่งสะสมแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสของ *Streptomyces* sp. PC22

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. PC22 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log ที่ได้จากข้อ 3.3.1.2 จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ (Xylan complex medium) (ภาคผนวก ก. หมายเลข 2) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (oat spelt xylan) ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (Manin และคณะ, 1994) บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ในช่วงเวลาตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 120 โดยเก็บตัวอย่างมาปั่นแยกเซลล์ และส่วนน้ำใส ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ส่วนเซลล์นำไปปั่นล้างเซลล์ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 จำนวน 3 รอบ ที่สภาวะเดิม นำเซลล์ที่ได้มาทำให้แตกโดยบดรวมกับผงอะลูมินาในโกร่ง ด้วยอัตราส่วนน้ำหนักเซลล์เปียกต่อผงอะลูมินาเท่ากับ 1 ต่อ 1 จากนั้นเติม 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ลงไปในปริมาตรน้อยที่สุดเพื่อเป็นตัวทำละลาย นำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส และปริมาณโปรตีน

3.3.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

วิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Manin และคณะ (1994) โดยสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside) ปริมาตร 0.025 มิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 และสารละลายแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.025

มิลลิลิตร นำส่วนผสมนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้ พาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ความเข้มข้นในช่วง 0 - 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

1 หน่วยของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสเท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย พารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ แล้วให้ พารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาตร 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะข้างต้น

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยนำสารละลายตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (Lowry C : ภาคผนวก ข หมายเลข 1) 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลาย D (Lowry D : ภาคผนวก ข หมายเลข 1) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

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

3.3.4 การศึกษาผลของไซแลนและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.4.1 ชนิดของไซแลนและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่อการเป็นแหล่งคาร์บอน

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. PC22 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยแปรชนิดของไซแลนและ

น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (oat spelt xylan) ไซแลนจากไม้เบิร์ช (birch wood xylan) ไซแลนจากไม้บีช (beech wood xylan) อะราบิโนส (arabinose) ไซโลส (xylose) และกลูโคส (glucose) ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 - 5 วัน เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.4.2 การหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. PC22 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.4.1 นำมาแปรความเข้มข้นที่ 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.4.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. PC22 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโน

เมตร ที่การเจริญในระยะmid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.4.1 และข้อ 3.3.4.2 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยแปรระยะเวลาบ่มเชื้อ 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.5 การศึกษาผลของวัสดุทางการเกษตรต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.5.1 การหาชนิดของวัสดุทางการเกษตรที่เหมาะสม

วัสดุทางการเกษตรที่ใช้แทนไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ มีดังนี้ ฟางข้าวเจ้า (rice straw), รำข้าวเจ้า (rice bran), รำข้าวสาลี (wheat bran), ซังข้าวโพด (corn cobs), เปลือกข้าวโพด (corn hulls), กากเมล็ดฝ้าย (cotton seed hulls) และขี้เลื่อย (saw dust) โดยวัสดุเหล่านี้ผ่านการอบแห้ง บด และร่อนด้วยตะแกรงขนาด 60 เมช

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. PC22 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่แปรแหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุทางการเกษตร ดังนี้ ฟางข้าวเจ้า, รำข้าวเจ้า, รำข้าวสาลี, ซังข้าวโพด, เปลือกข้าวโพด, กากเมล็ดฝ้าย และขี้เลื่อย โดยใช้ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ บ่มเป็นเวลา 1 - 5 วันบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.5.2 หาความเข้มข้นของวัสดุทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. PC22 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยนำแหล่งคาร์บอนทางการเกษตรที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 มาแปรความเข้มข้นที่ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.4 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.5.3 การศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุทางการเกษตร

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. PC22 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนทางการเกษตรที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.5.2 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยแปรระยะเวลาบ่มเชื้อ 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.6 ปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.6.1 การหาชนิดของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ คือ พอลิเพพโทน (polypeptone) ซึ่งเป็นอินทรีย์ไนโตรเจน และมีปริมาณไนโตรเจนจากการวิเคราะห์โดยวิธี Kjeldahl (โดยความอนุเคราะห์ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์) เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ ใช้พอลิเพพโทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนั้นจึงมีปริมาณไนโตรเจนจากพอลิเพพโทนอยู่ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นำมาใช้แทนพอลิเพพโทน มีดังนี้ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) และโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)

โดยถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. PC22 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.4 หรือ แหล่งคาร์บอนทางการเกษตรที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.5 นำแต่ละแหล่งคาร์บอนมาแปรอนินทรีย์ไนโตรเจน ดังนี้ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) และโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ให้มีความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนเท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเปรียบเทียบกับพอลิเพพโทน นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.6.2 การหาความเข้มข้นของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. PC22 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนและอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม หรือแหล่งคาร์บอนทางการเกษตรและอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.1 โดยนำอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมในแต่ละแหล่งคาร์บอนมาแปรความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนที่ 0.025, 0.05, 0.075, 0.10 และ 0.125 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.6.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้อนินทรีย์ไนโตรเจน

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของ *Streptomyces* sp. PC22 ความหนาแน่น 2 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่การเจริญในระยะ mid log จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ pH 9.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนและอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.6.2 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยแปรระยะเวลาบ่มเชื้อ 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.7 ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

แปรระดับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 6.0 - 11.0 โดยมีแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.4 - 3.3.6 โดย บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาบ่มเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.4.3, 3.3.5.3 และ 3.3.6.3 เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.8 อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในข้อ 3.3.7 แต่แปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อในช่วง 30 - 50 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.9 การเตรียมแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสเข้มข้น โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ที่ให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงที่สุด และเก็บตัวอย่างนำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสทั้งหมดมาตกตะกอน ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากน้ำใส ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ให้ปริมาตรน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์เดิม ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากน้ำใส ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

3.3.10 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Streptomyces* sp. PC22

3.3.9.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

นำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส มาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 35 - 70 องศาเซลเซียส

3.3.9.2 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

นำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส มาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.2 โดยบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.9.1 และแปรความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดด่างต่างๆดังนี้

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 4.0 - 6.5
100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 6.0 - 8.5
100 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 8.0 - 9.0

3.3.9.3 ความเสถียรของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสต่ออุณหภูมิ

บ่มเอนไซม์ใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วง 35 - 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสที่เหลือ ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 ภายใต้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม โดยมีแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.3.9.4 ความเสถียรของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0 - 9.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสที่เหลือตามวิธีการในข้อ 3.3.2 ภายใต้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม โดยมีแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

บทที่ 4

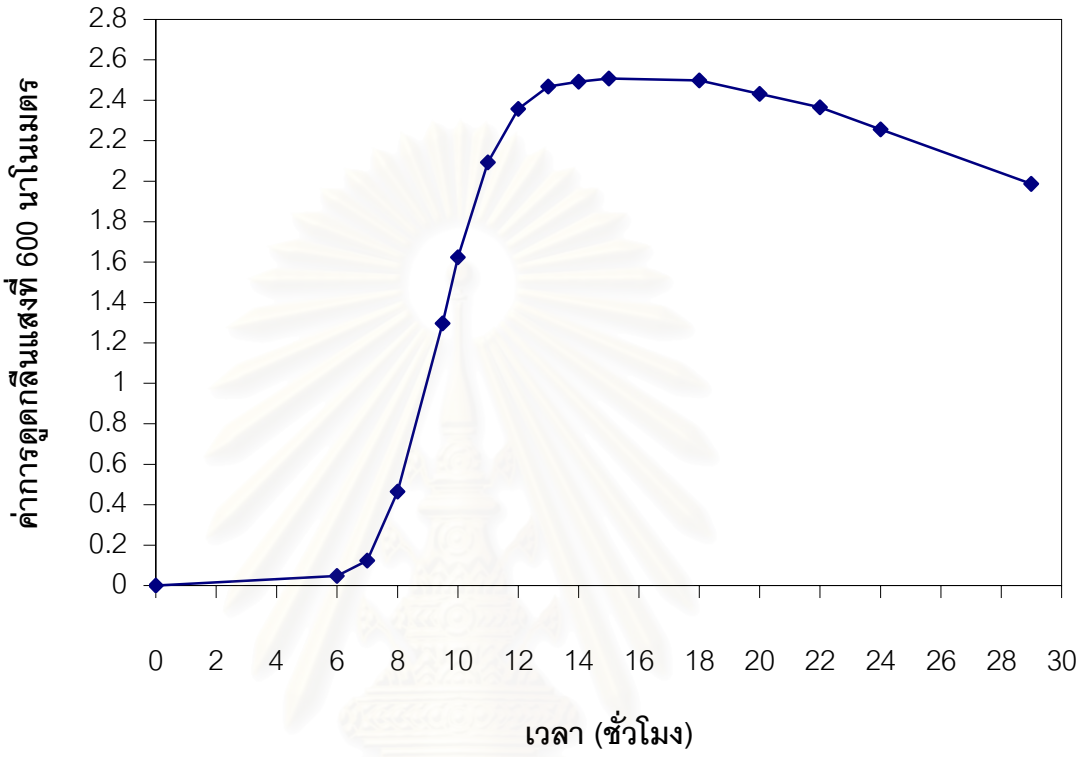
ผลการทดลอง

4.1 รูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. PC22

การทดลองนี้เพื่อหารูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. PC22 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) pH 9.0 ติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการเตรียมหัวเชื้อต่อไป และเนื่องจากลักษณะการเจริญของเชื้อเป็น pellet เล็กๆ ละเอียด และกระจายตัวอยู่ในอาหารอย่างสม่ำเสมอ จึงสามารถติดตามการเจริญของเชื้อโดยวัดความขุ่นได้ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.1 พบการเจริญของเชื้อในระยะทวีคูณ (log phase) อยู่ระหว่างชั่วโมงที่ 7 ถึง ชั่วโมงที่ 12 โดยระยะ mid log อยู่ที่ชั่วโมงที่ 9 มีค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.2 และ ระยะ late log อยู่ที่ชั่วโมงที่ 11 มีค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร เท่ากับ 2.1 หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าสู่ระยะ stationary และสุดท้ายเข้าสู่ dead phase ในชั่วโมงที่ 29

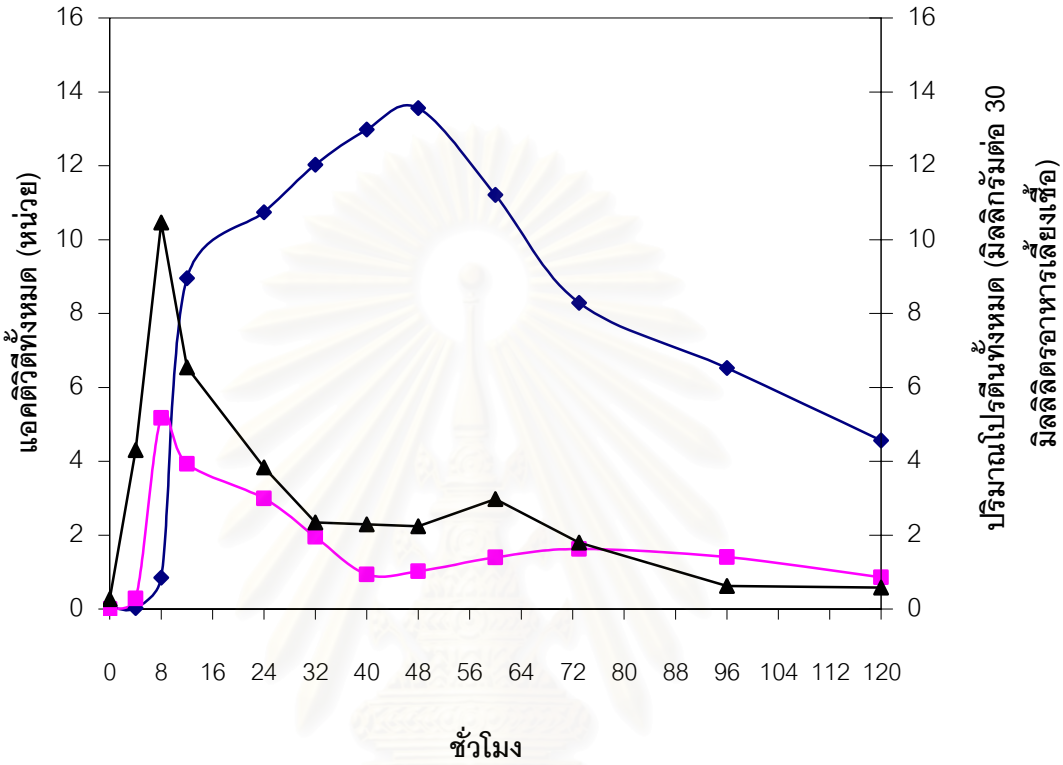
4.2 การตรวจสอบแหล่งสะสมแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสของ *Streptomyces* sp. PC22

การทดลองนี้เพื่อตรวจสอบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสที่ *Streptomyces* sp. PC22 สร้างขึ้นเป็นเอนไซม์ชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) หรือ เก็บไว้ในเซลล์ (intracellular enzyme) โดยใช้หัวเชื้อจากระยะ mid log เลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะตามวิธีการในบทที่ 3 ข้อ 3.3.1.3 จากนั้นเปรียบเทียบ แอคติวิตีทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ทั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อ และภายในเซลล์ และติดตามปริมาณโปรตีนของ *Streptomyces* sp. PC22 วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์โดยบ่มปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียส pH 6.0 ตามภาวะที่รายงานโดย Manin และคณะ (1994) ผลการทดลองในรูปที่ 4.2 พบว่าแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จัดเป็น extracellular enzyme โดยสร้างขึ้นภายในเซลล์ แล้วปลดปล่อยออกนอกเซลล์ และให้แอคติวิตีสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง แต่มีการเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 8 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อๆไปจะวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.1 รูปแบบการเจริญของ *Streptomyces* sp. PC22

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีน (—▲—) และแอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (—◆—) และภายในเซลล์ (—■—) ของ *Streptomyces* sp. PC22

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Streptomyces* sp. PC22

ในการทดลองที่ผ่านมาข้างต้นทำการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ โดยบ่มปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียส pH 6.0 ตามภาวะที่รายงานโดย Manin และคณะ (1994) ซึ่งศึกษาแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Streptomyces lividans* 66 ภาวะดังกล่าวอาจไม่ใช่ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์จากเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้น เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Streptomyces* sp. PC22 ในการทดลองต่อไป

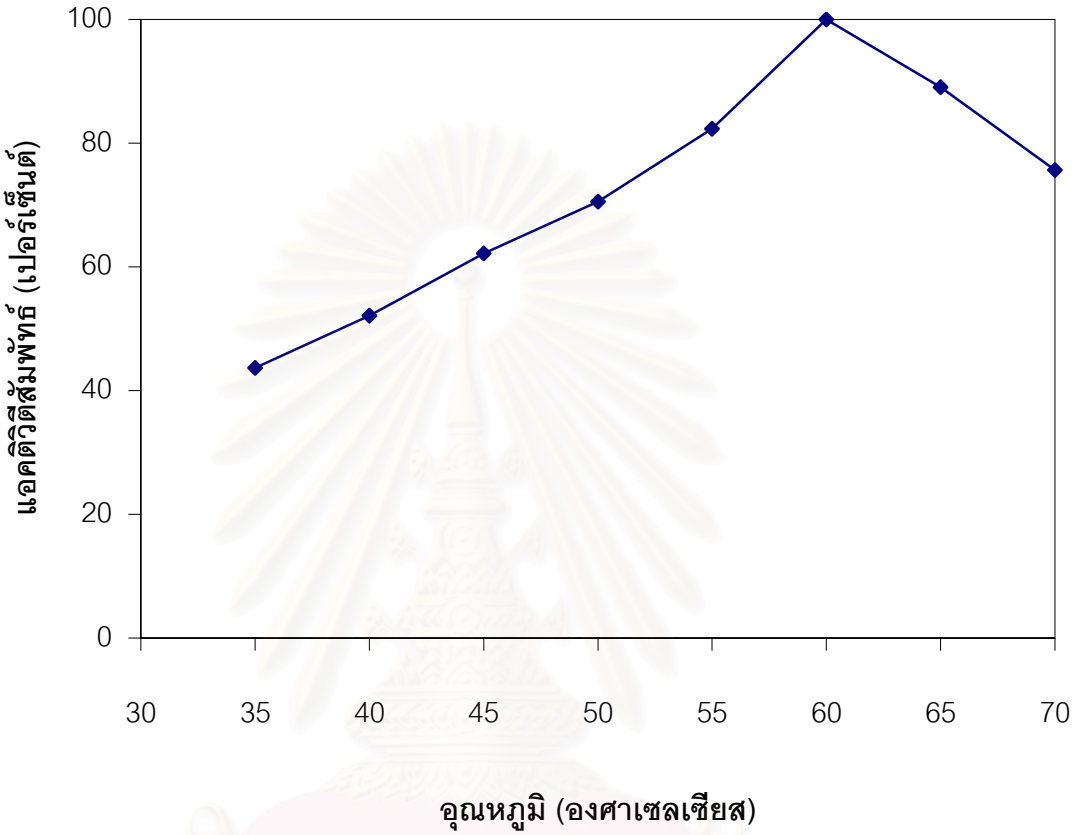
4.3.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตรเท่าๆ กันมาหาแอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส โดยการแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 35 - 70 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 60 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมินี้เอนไซม์ให้แอคติวิตีสูงสุด ดังรูปที่ 4.3

4.3.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสโดยการทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่แปรความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0 - 9.0 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.0 เมื่อใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

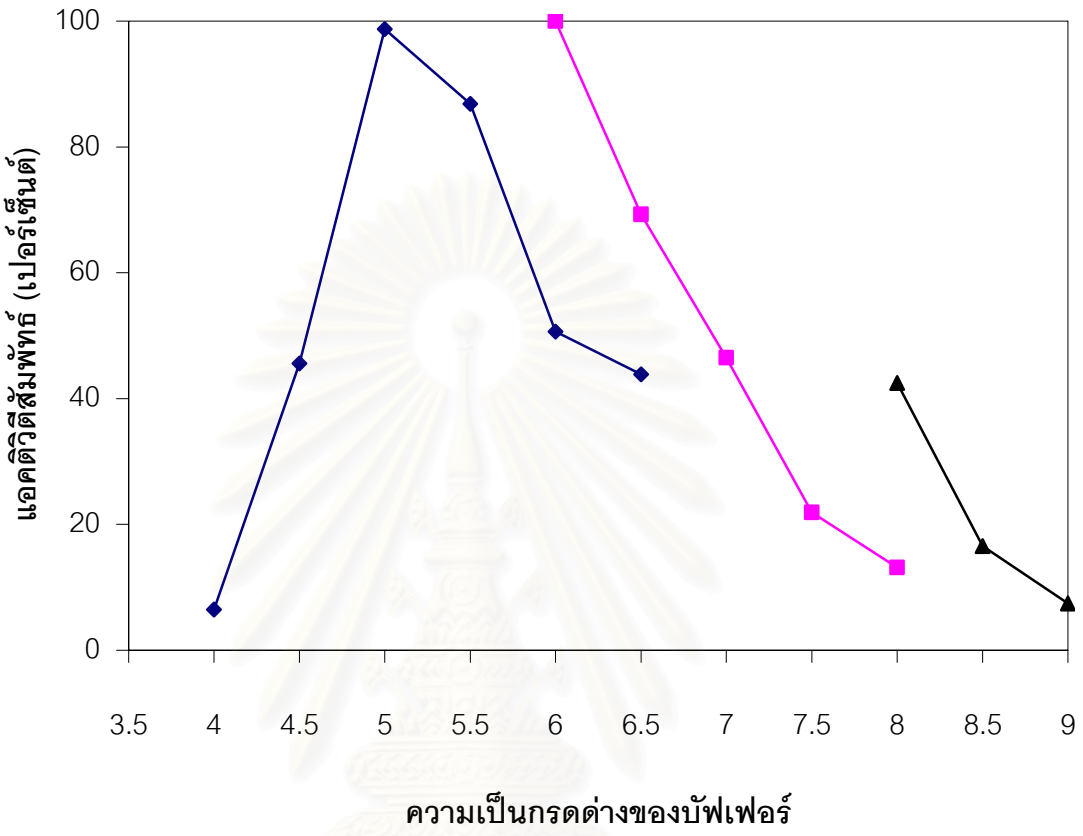
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นในการทดลองต่อๆไป จะวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 6.0 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์

4.4 ผลของไซแลนและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

4.4.1 ผลของไซแลนชนิดต่างๆ และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่อการเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการแปรชนิดของไซแลน และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (oat spelt xylan) ไซแลนจากไม้เบิร์ช (birch wood xylan) ไซแลนจากไม้บีช (beech wood xylan) อะราบิโนส (arabinose) ไซโลส (xylose) และกลูโคส (glucose) ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่าอะราบิโนส และไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงที่สุดในวันที่ 2 ประมาณ 0.30 และ 0.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ในการทดลองขั้นต่อไปจะเลือกใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากต้องการใช้เป็นตัวแทนของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับไซแลนจากวัสดุทางการเกษตรในการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

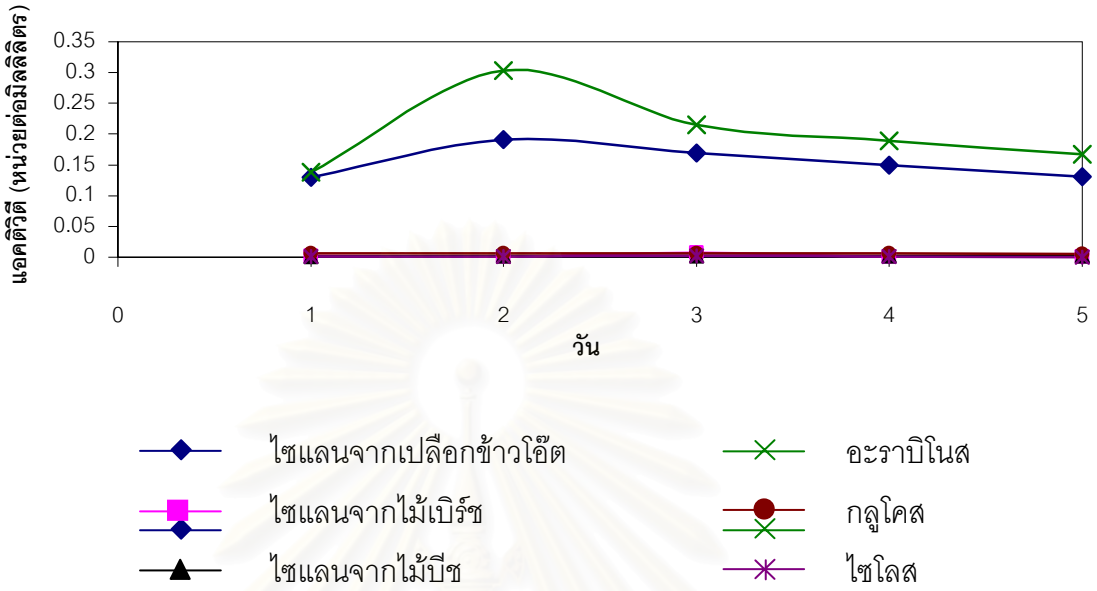
4.4.2 ผลของความเข้มข้นของไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

จากการแปรความเข้มข้นของไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตที่ 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงสุดประมาณ 0.19 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.6

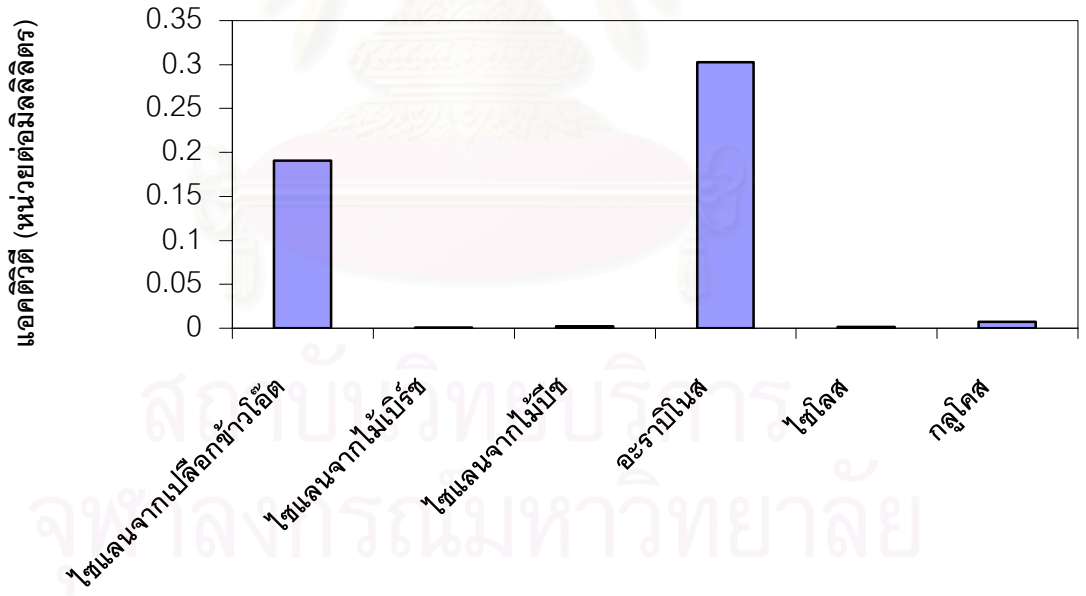
4.4.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน

การทดลองนี้ใช้ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ จากนั้นแปรระยะเวลาบ่มเชื้อที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 4.7 พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 ให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส สูงสุดประมาณ 0.19 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 2 วัน ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2 วัน และใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

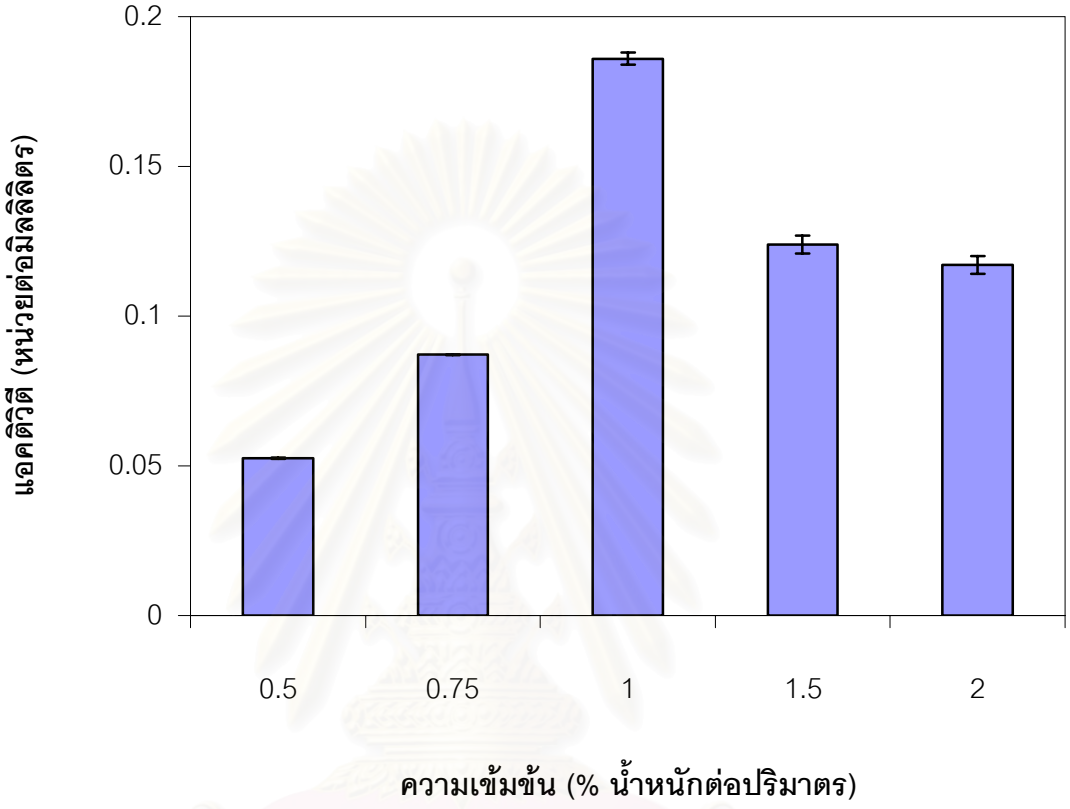
ก



ข

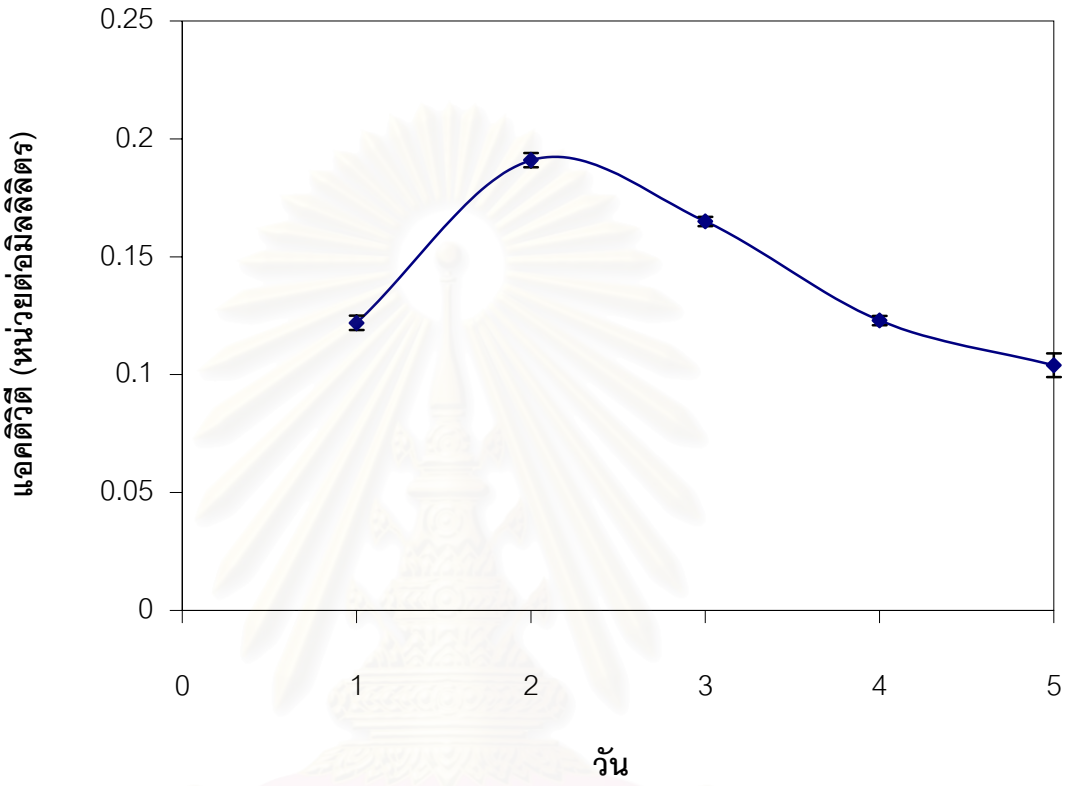


รูปที่ 4.5 ผลของไซแลน และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส (ก) เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 1 - 5 วัน, (ข) เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน



รูปที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นของไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.7 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ผลของวัสดุทางการเกษตรต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

4.5.1 ชนิดของวัสดุทางการเกษตร

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ ที่ใช้วัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต ชนิดของวัสดุทางการเกษตรที่ศึกษา ได้แก่ ฟางข้าวเจ้า (rice straw), รำข้าวเจ้า (rice bran), รำข้าวสาลี (wheat bran), ซังข้าวโพด (corn cobs), เปลือกข้าวโพด (corn hulls), กากเมล็ดฝ้าย (cotton seed hulls) และขี้เลื่อย (saw dust) เปรียบเทียบกับไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต โดยบ่มเชื้อเป็นเวลา 1 - 5 วัน ผลการทดลองดังรูปที่ 4.8 พบว่ารำข้าวสาลี เป็นแหล่งคาร์บอนทางการเกษตรที่ให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงสุด ประมาณ 0.13 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนมาศึกษาต่อไป

4.5.2 ผลของความเข้มข้นของรำข้าวสาลีต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ ที่ใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน แทนไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต โดยแปรความเข้มข้นที่ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยบ่มเป็นระยะเวลา 2 วัน เปรียบเทียบกับไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต พบว่าความเข้มข้นของรำข้าวสาลี ที่ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงสุดประมาณ 0.38 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.9 ดังนั้นจึงเลือกใช้รำข้าวสาลีที่ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

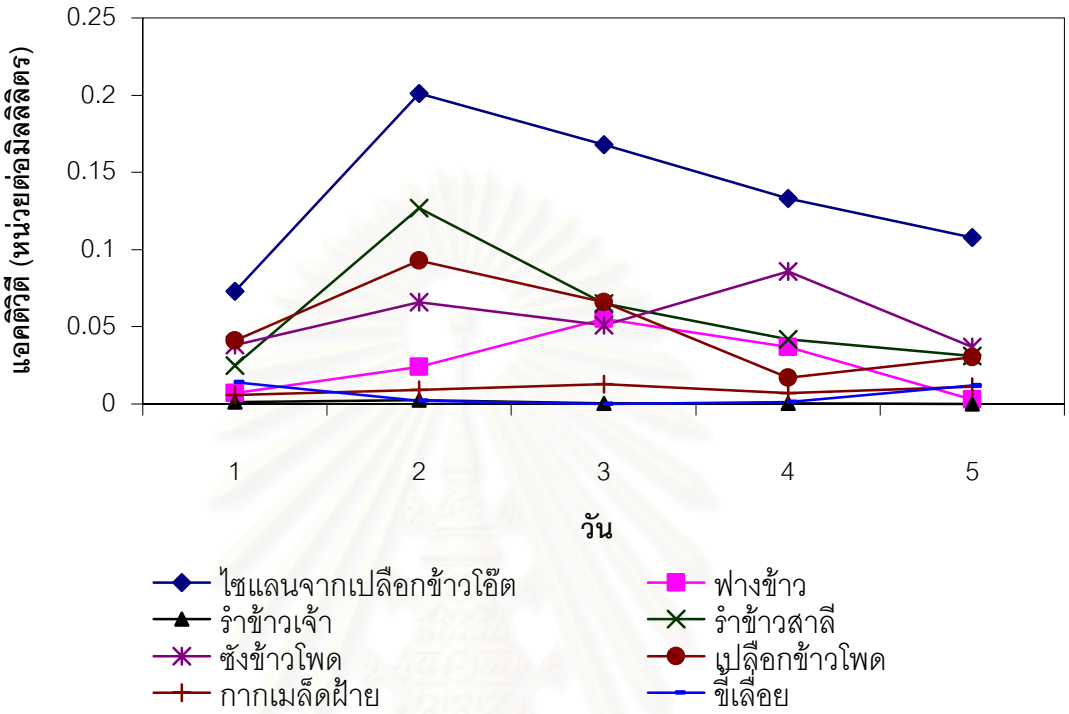
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้รำข้าวสาลีแหล่งคาร์บอน

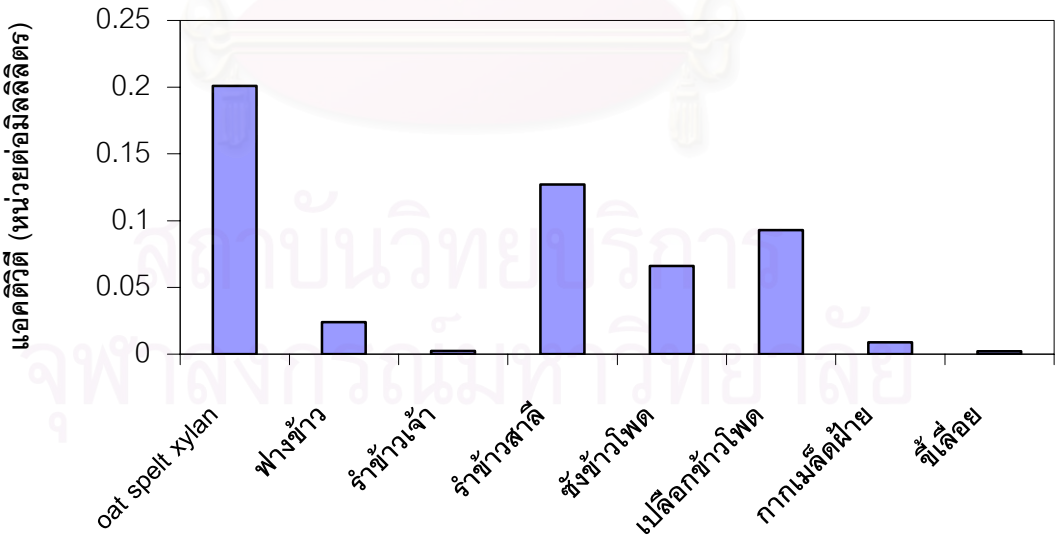
จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ ที่มีรำข้าวสาลี ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรระยะเวลาบ่มเชื้อที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 4.10 พบว่าให้ แอคติวิตีสูงสุดประมาณ 0.42 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 2 วัน ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2 วัน เมื่อใช้รำข้าวสาลีที่ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

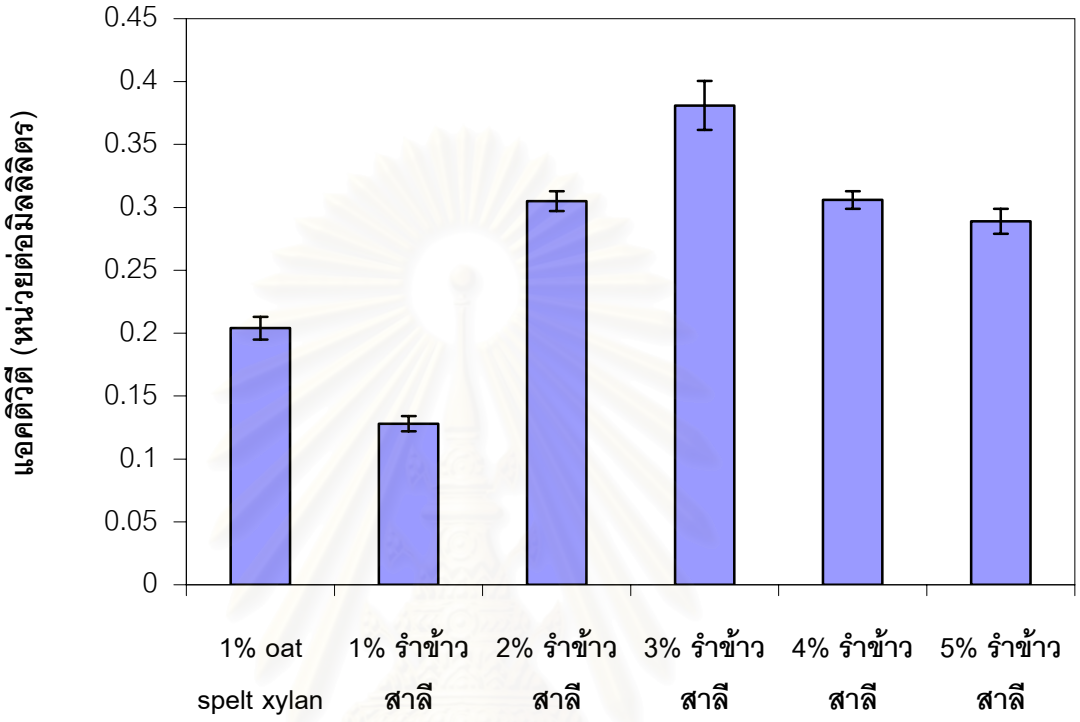
ก



ข

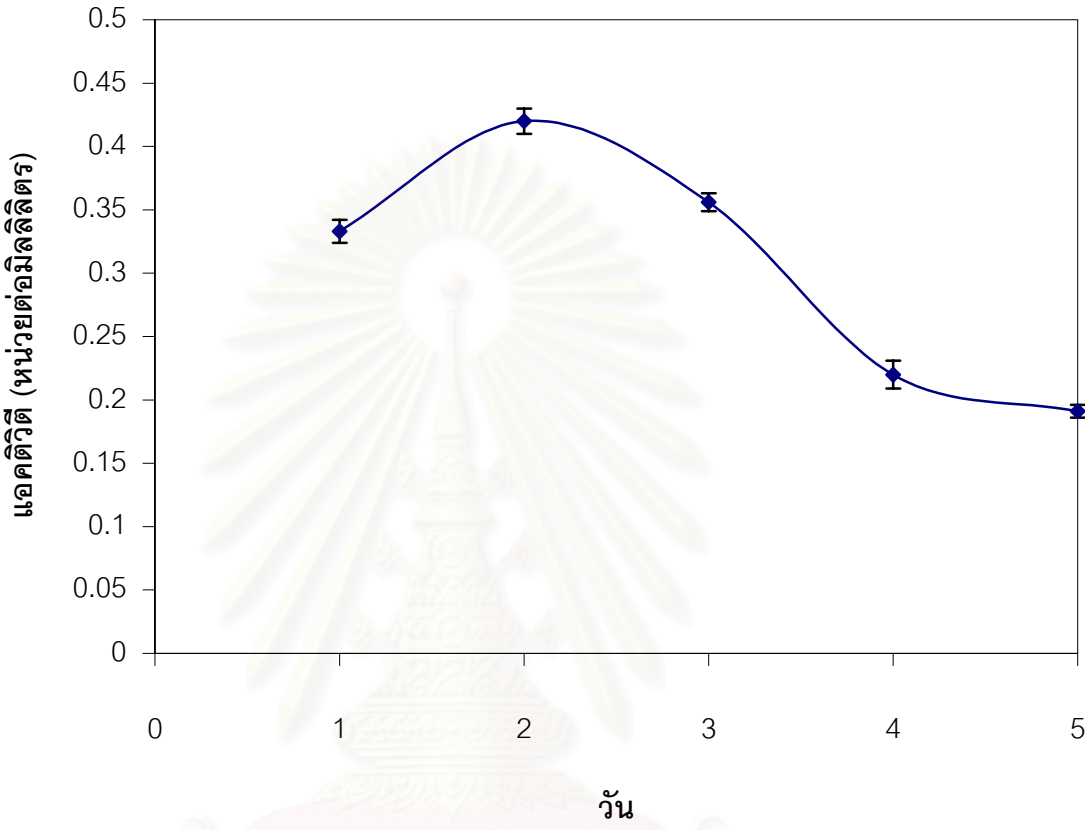


รูปที่ 4.8 ผลของวัสดุทางการเกษตรที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เปรียบเทียบกับไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ก) เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 1 - 5 วัน, (ข) เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน



รูปที่ 4.9 ผลของความเข้มข้นของรำข้าวสาลีต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เปรียบเทียบกับไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.10 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้รำข้าวสาลี 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

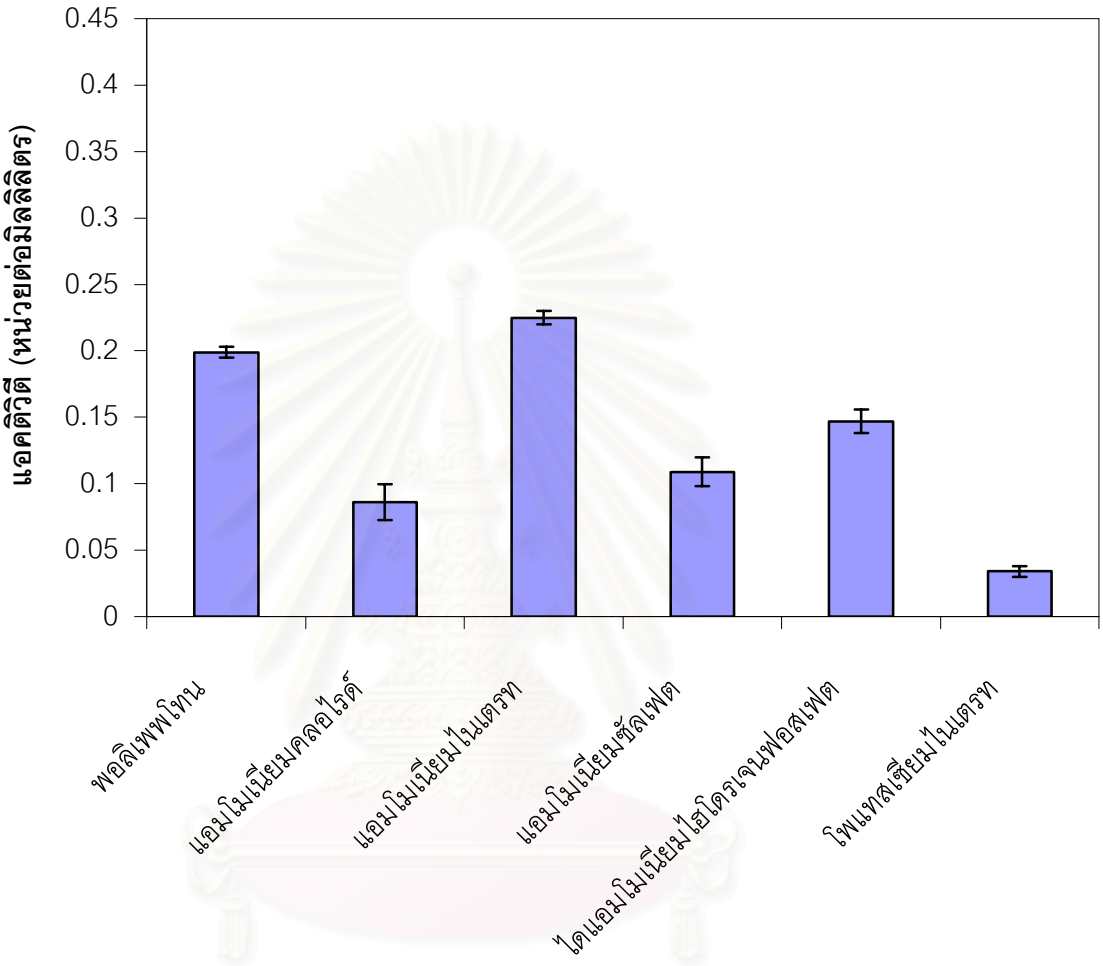
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 ผลของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

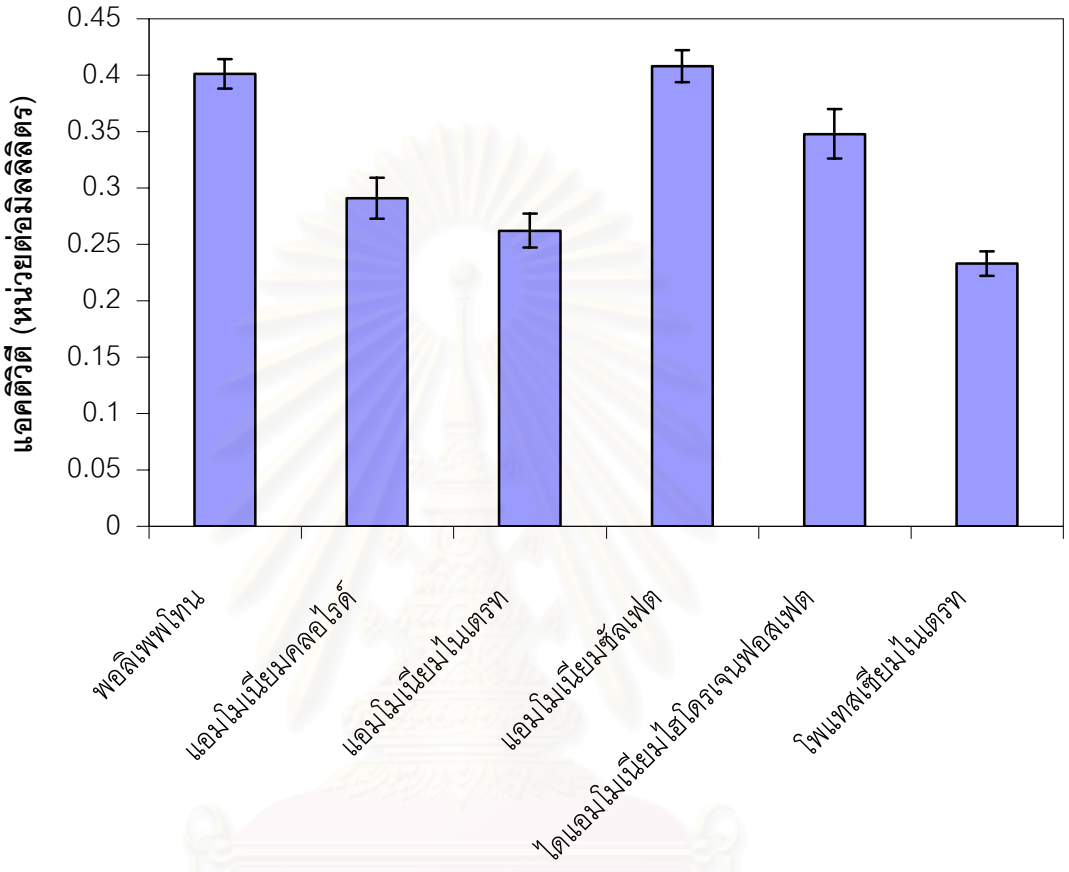
4.6.1 ชนิดของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ ที่ใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือ รำข้าวสาลี 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ นำแต่ละแหล่งคาร์บอนมาแปรชนิดของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ศึกษา และให้มีความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนเท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) และโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) เปรียบเทียบกับพอลิเพพโทน (polypeptone) โดยบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน พบว่า แอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงสุดประมาณ 0.23 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่ใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงสุดประมาณ 0.41 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่ใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ดังผลการทดลองรูปที่ 4.11 และ 4.12 ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกแอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่ง อนินทรีย์ไนโตรเจน เมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน และเลือกแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน เมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนมาศึกษาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.11 ผลของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน เท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และบ่มเป็นเวลา 2 วัน โดยเปรียบเทียบกับพอลิเพพโทน



รูปที่ 4.12 ผลของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน เท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้รำข้าวสาลี 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และบ่มเป็นเวลา 2 วัน โดยเปรียบเทียบกับพอลิเพพโทน

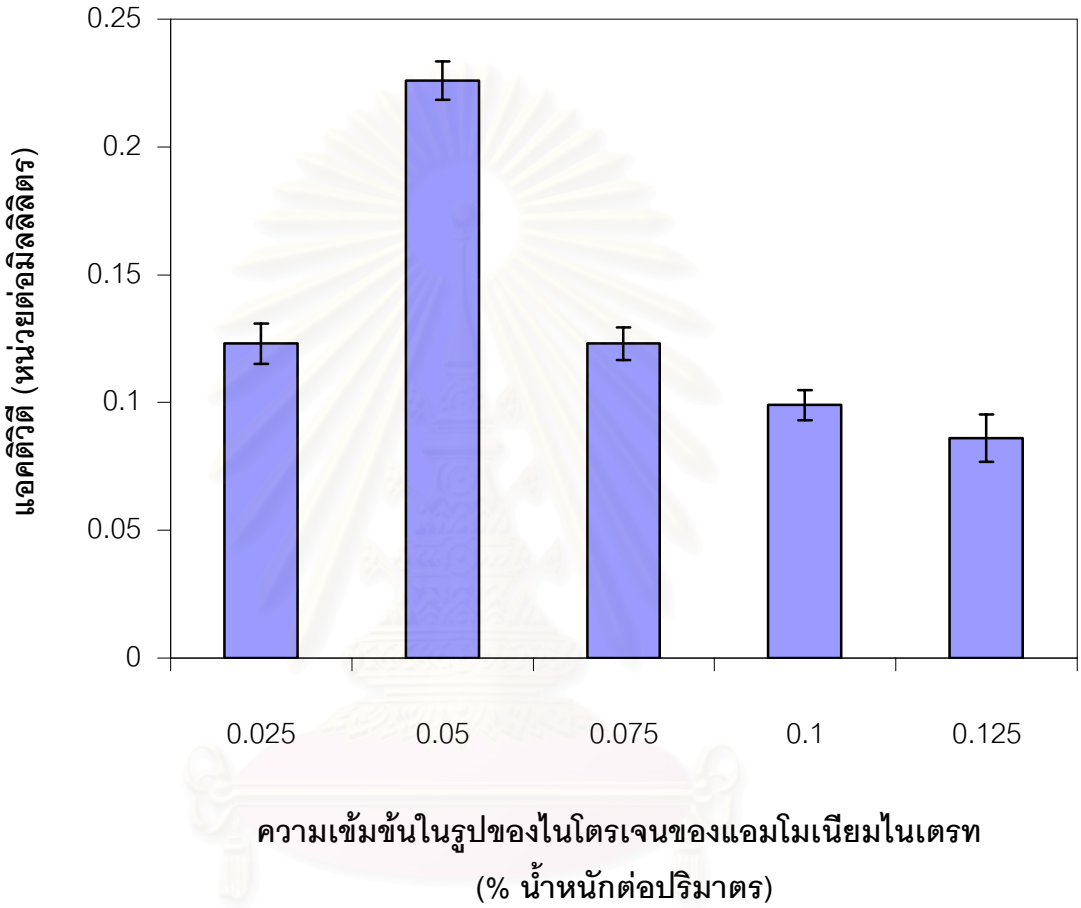
4.6.2 ผลของความเข้มข้นของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

4.6.2.1 ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน

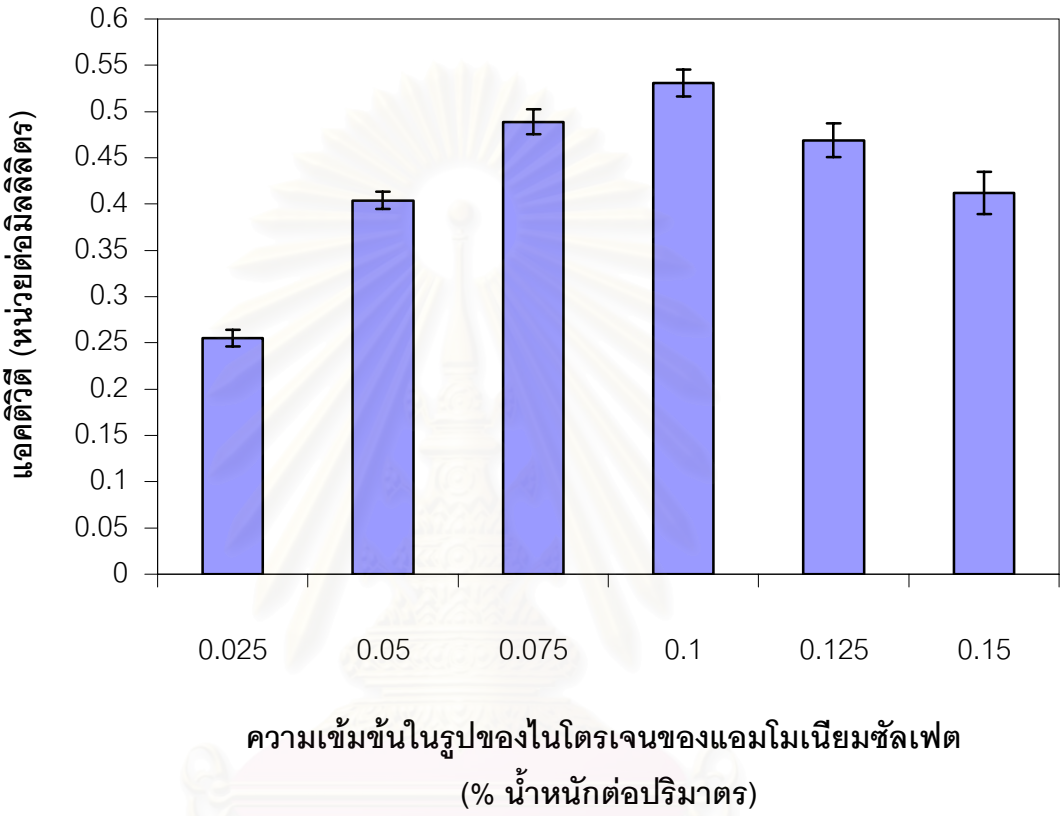
จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ ที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน แทนพอลิเพพโทน โดยแปรความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนที่ 0.025, 0.050, 0.075, 0.100 และ 0.125 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยบ่มเป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่า แอมโมเนียมไนเตรทที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนที่ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงสุดประมาณ 0.23 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.13 ดังนั้นจึงเลือกใช้แอมโมเนียมไนเตรทที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนที่ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4.6.2.2 ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ ที่มีรำข้าวสาลี 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน แทนพอลิเพพโทน โดยแปรความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนที่ 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125 และ 0.150 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยบ่มเป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงสุดประมาณ 0.53 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.14 ดังนั้นจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4.13 ผลของความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน ของแอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 วัน



รูปที่ 4.14 ผลของความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจนของแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้รำข้าวสาลี 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 วัน

4.6.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้อนินทรีย์ไนโตรเจน

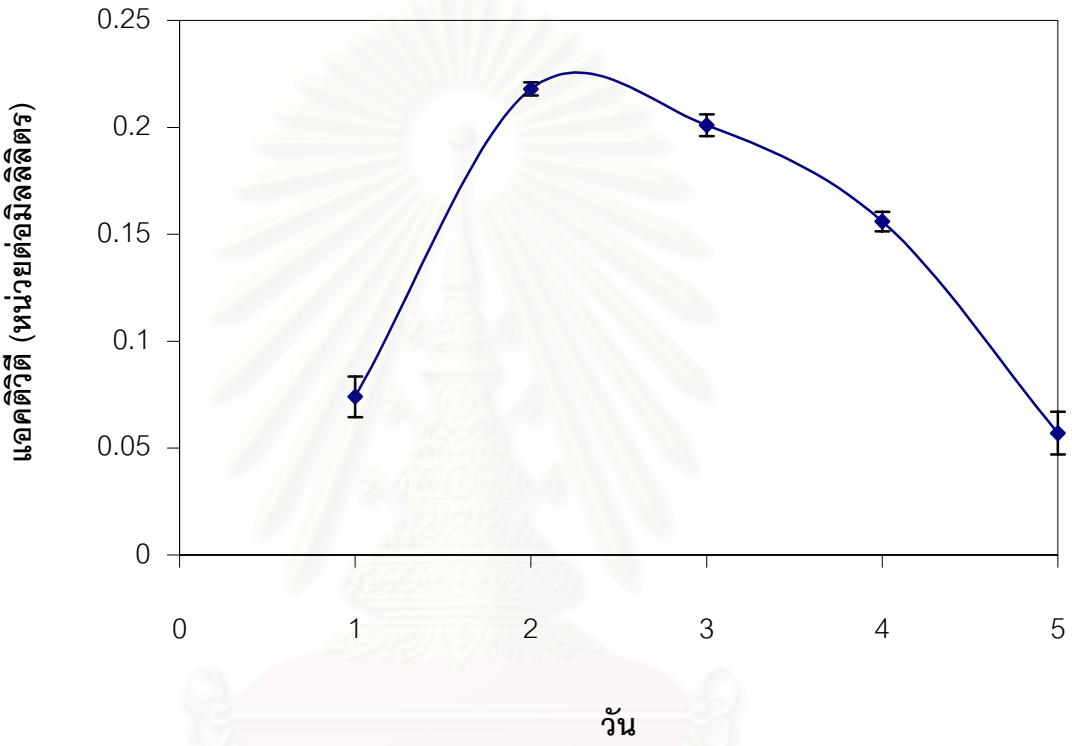
4.6.3.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ ที่มีแอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และมีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรระยะเวลาบ่มเชื้อที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 4.15 พบว่า ให้แอคติวิตีสูงสุดประมาณ 0.22 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 2 วัน ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2 วัน เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

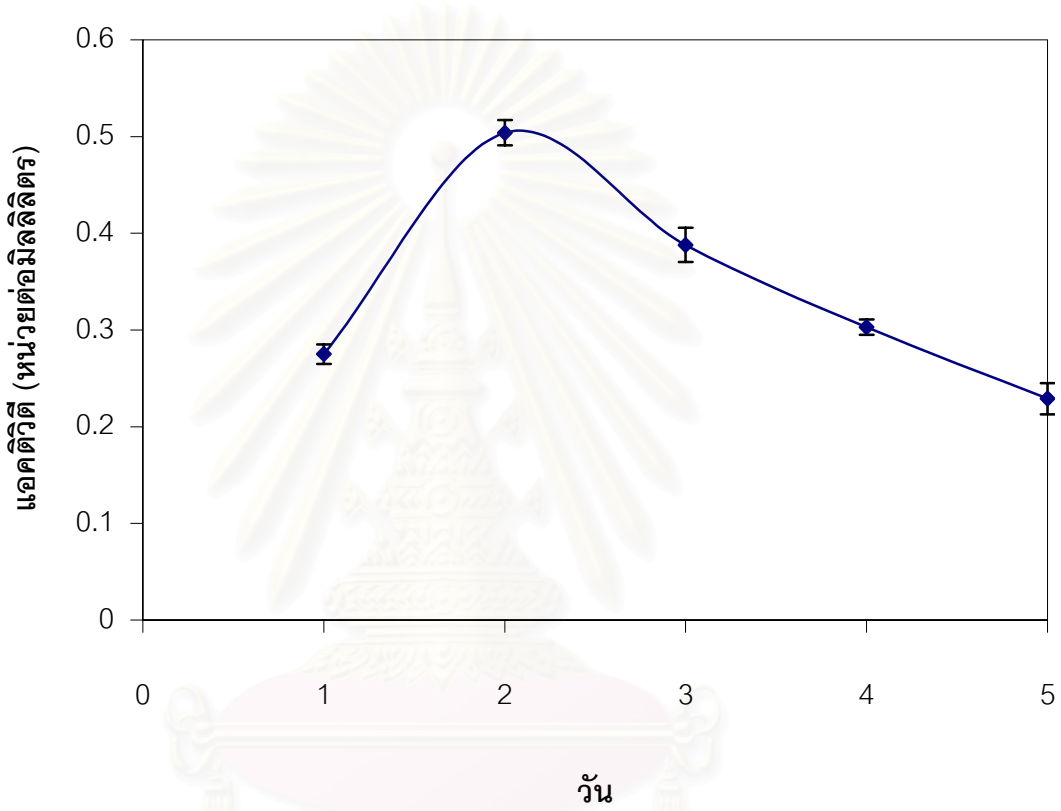
4.6.3.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และมีรำข้าวสาลีความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรระยะเวลาบ่มเชื้อที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน ผลการทดลองในรูปที่ 4.16 พบว่า ให้แอคติวิตีสูงสุดประมาณ 0.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 2 วัน ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2 วัน เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็น

แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และใช้รำข้าวสาลีความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.15 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.16 ผลของระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และใช้รำข้าวสาลี 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

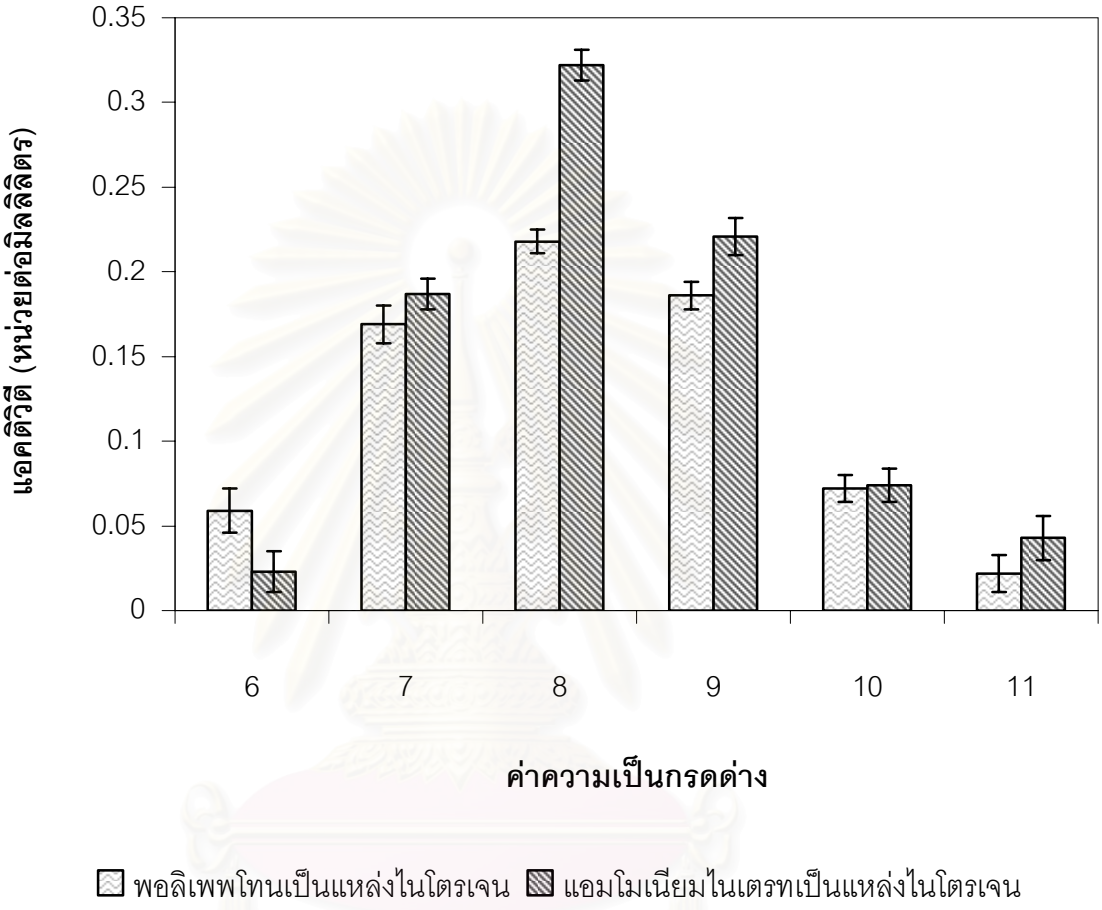
4.7 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.7.1 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการแปรความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ที่มีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และมีพอลิเพพโทน หรือ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ โดยแปรค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.0 - 11.0 และบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน พบว่า ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ที่มีพอลิเพพโทน และแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้แอคติวิตีสูงสุดประมาณ 0.22 และ 0.32 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.17 ดังนั้นจึงเลือกค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8 มาใช้ในการศึกษาต่อไป

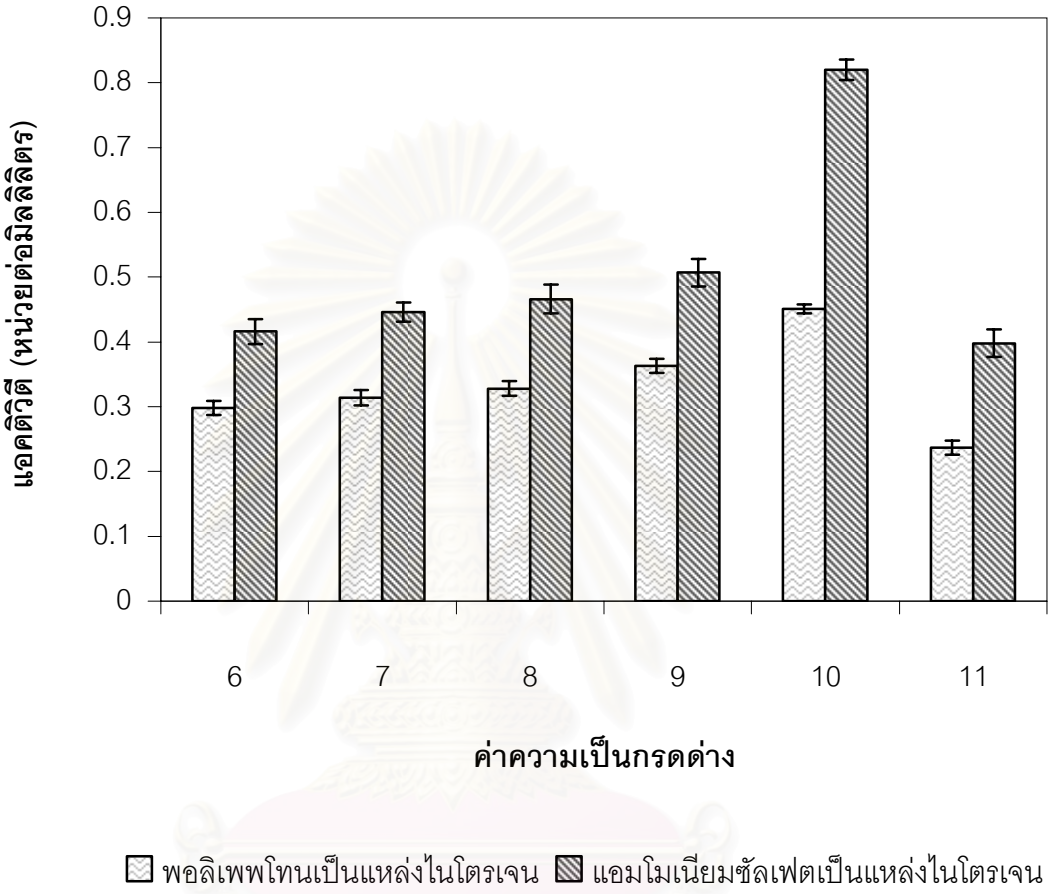
4.7.2 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการแปรความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ที่มีรำข้าวสาลี ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และมีพอลิเพพโทน ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.05 เปอร์เซ็นต์ หรือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ โดยแปรค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.0 - 11.0 บ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน พบว่า ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ ที่มีพอลิเพพโทน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้แอคติวิตีสูงสุดประมาณ 0.45 และ 0.82 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 10 ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.18 ดังนั้นจึงเลือกค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 10 มาใช้ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 4.17 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.18 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

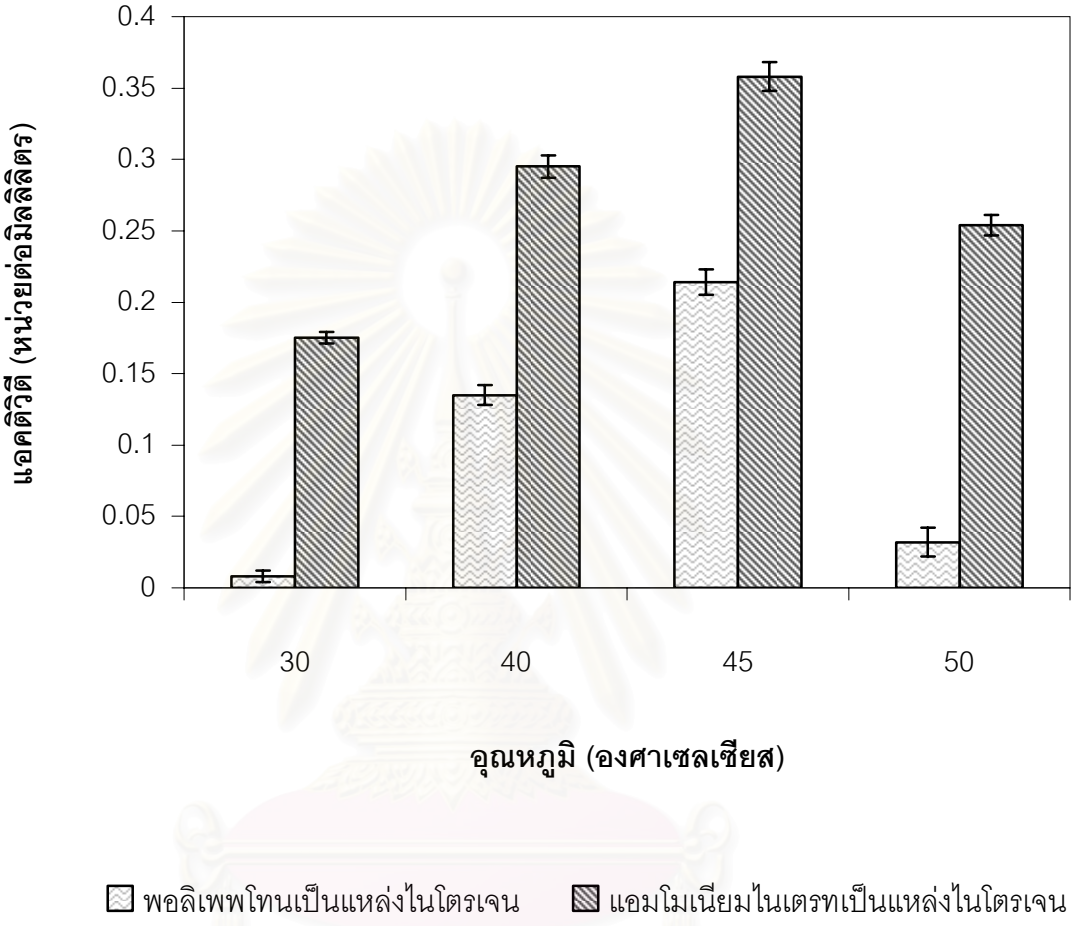
4.7.1 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 และมีไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน และมีพอลิเพพโทน หรือ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) เป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่ 30, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส บ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน พบว่า ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี พอลิเพพโทน และแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้แอคติวิตีสูงสุดประมาณ 0.21 และ 0.36 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับที่อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.19 ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ 45 องศาเซลเซียส

4.7.2 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน

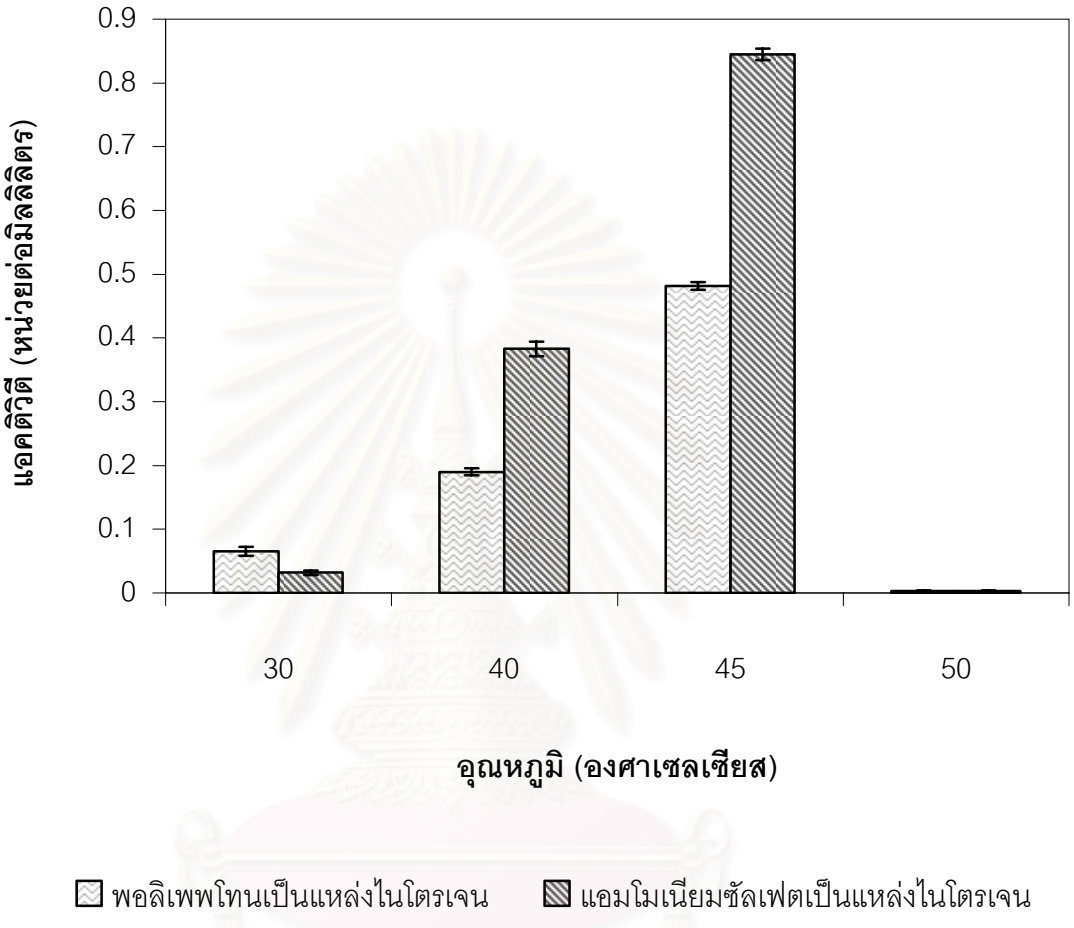
จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 10 และมีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และมีพอลิเพพโทน หรือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่ 30, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส บ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน พบว่า ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพอลิเพพโทน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้แอคติวิตีสูงสุดประมาณ 0.48 และ 0.84 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ที่อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.20 ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ 45 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.19 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเท่ากับ 8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.20 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเท่ากับ 10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการวิจัยข้างต้นเมื่อแปรแหล่งคาร์บอน และอนินทรีย์ไนโตรเจนรวมทั้งภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแล้ว พบว่าเมื่อเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 10 และมีรำข้าวสาลีที่ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จะให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงที่สุดประมาณ 0.84 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่าจากการใช้ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน และพอลิเพพโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน ภายใต้ภาวะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

จากผลการทดลองต่างๆ ข้างต้นได้สรุปภาวะเหมาะสมในการผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ไซแลนเปลือกข้าวโอ๊ต หรือรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับอินทรีย์ไนโตรเจน หรืออนินทรีย์ไนโตรเจน ดังแสดงในตารางที่ 4.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ไซแลน หรือรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับอินทรีย์ไนโตรเจน หรืออนินทรีย์ไนโตรเจน

แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	ภาวะบ่มเชื้อ			แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
		อุณหภูมิ (^{o}C)	ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น	ระยะเวลา (วัน)	
1.) 1% ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต	พอลิเพพโทน (0.05%ปริมาณไนโตรเจน)	45	8	2	0.21
2.) 1% ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต	NH_4NO_3 (0.05% ปริมาณไนโตรเจน)	45	8	2	0.36
3.) 3% รำข้าวสาลี	พอลิเพพโทน (0.05% ปริมาณไนโตรเจน)	45	10	2	0.48
4.) 3% รำข้าวสาลี	$(NH_4)_2SO_4$ (0.1% ปริมาณไนโตรเจน)	45	10	2	0.84

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.9 **การศึกษาสมบัติของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก** *Streptomyces* sp. PC22

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp. PC22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนคอมเพล็กซ์ ตามภาวะที่ให้แอคติวิตีสูงสุดข้างต้น มาทำให้เข้มข้นโดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0 - 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาศึกษาสมบัติต่างๆ ดังนี้

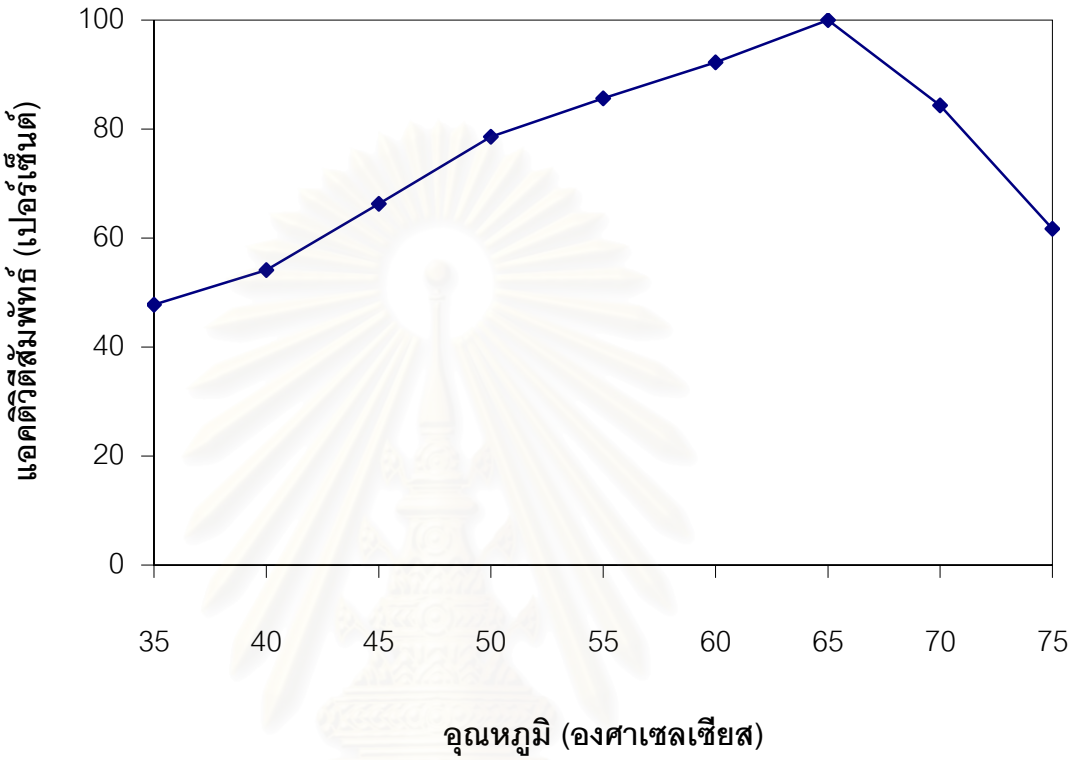
4.9.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

จากการนำเอนไซม์ที่เตรียมได้ปริมาตรเท่าๆ กันมาหาแอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส โดยการแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 35 - 75 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 65 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมินี้เอนไซม์ให้แอคติวิตีสูงสุด ดังรูปที่ 4.21

4.9.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส โดยการทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่แปรความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0 - 9.0 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.22 พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.0 เมื่อใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

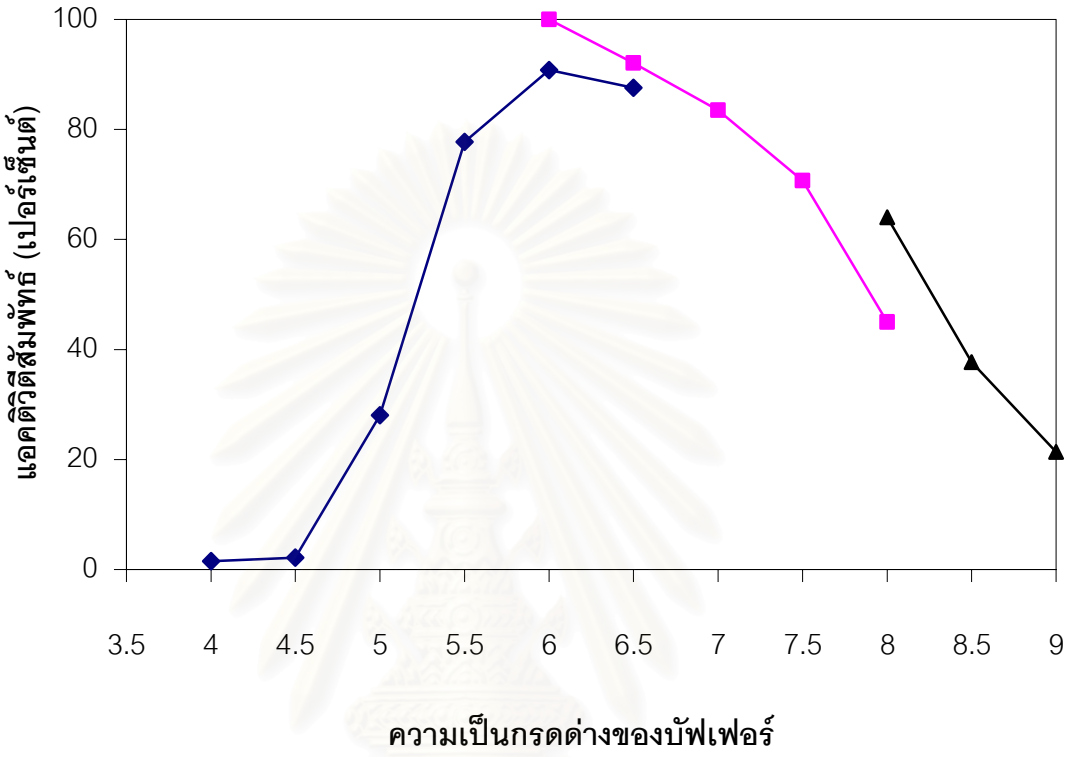
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.21 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.22 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส

กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

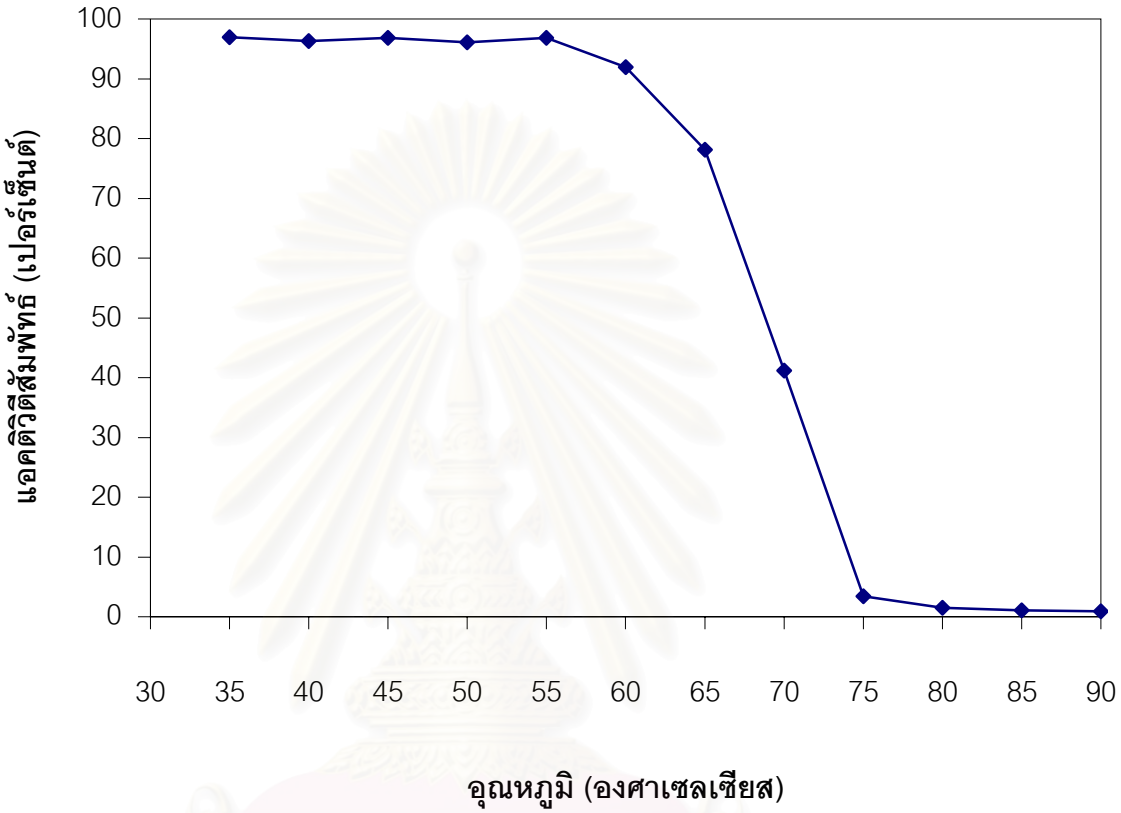
4.9.3 ผลของความเสถียรของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสต่ออุณหภูมิ

นำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยแปรอุณหภูมิในช่วง 35 - 90 องศาเซลเซียส บ่มนาน 30 นาที จากนั้นนำไปหาแอคติวิตีที่เหลือภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.23 พบว่า แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสมีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึงประมาณ 60 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่สูงถึงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว จนที่ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะเหลือแอคติวิตีอยู่ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ และสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสเป็นต้นไป

4.9.4 ผลของความเสถียรของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสต่อความเป็นกรดด่าง

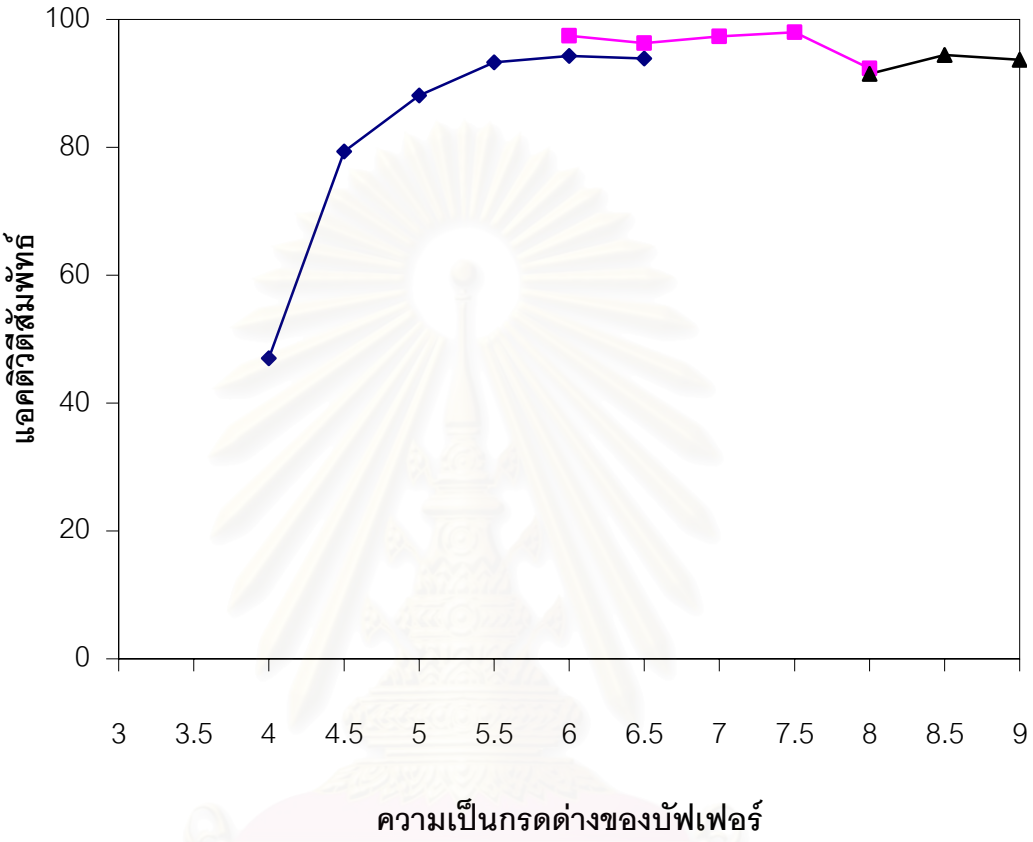
นำแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนแล้วมาบ่มในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่มีความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0 - 9.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปหาแอคติวิตีที่เหลือภายใต้ภาวะที่เหมาะสม พบว่า เอนไซม์มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างคือ ตั้งแต่ 5.0 - 9.0 และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ถึงประมาณ 93 - 98 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5.0 ลงมาเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีจนเหลือ 47 เปอร์เซ็นต์ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 ดังรูปที่ 4.24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.23 ความเสถียรของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสต่ออุณหภูมิ

กำหนดให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.24 ความเสถียรของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสต่อความเป็นกรดด่าง

กำหนดให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษาสมบัติของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Streptomyces* sp. PC22 ได้สรุปดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 สมบัติของ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Streptomyces* sp. PC22

สมบัติของเอนไซม์	แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Streptomyces* sp. PC22
1. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน	65 องศาเซลเซียส
2. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน	6.0
3. ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	สูงถึง 60 องศาเซลเซียส, 30 นาที
4. ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	5.0 – 9.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยหมู่ข้างเคียงของไซแลน จัดเป็นหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์ โดยทำหน้าที่ตัดหมู่ข้างเคียงจากไซแลนสายหลัก ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ซึ่งจัดเป็นหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ย่อยหมู่ข้างเคียงของไซแลน อะราบิโนไซแลน และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนสายหลัก ซึ่งจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ร่วมกับไซแลเนส ในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ อีกทั้งผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักเพื่อผลิตเชื้อเพลิงและสารเคมีที่มีประโยชน์ได้

แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส พบในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ และแอคติโนมัยซีท เช่น *Aspergillus niger* 5-16 (Kaneko และคณะ, 1993), *Bacteroides xylanolyticus* X5-1 (Schyns และคณะ, 1994), *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113 (Hespell และ O'Bryan, 1992), *Pichia capsulata* X91 (Yanai และ Sato, 2000), *Streptomyces lividans* 66 (Manin และคณะ, 1994) เป็นต้น ซึ่งพบว่าสร้างและเก็บเอนไซม์ไว้ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) ขณะที่ *Bacillus stearothermophilus* T-6 (Gilead และ Shoham, 1995), *Fusarium oxysporum* (Panagiotou และคณะ, 2003) *Rhizomucor pusillus* HHT-1 (Rahman และคณะ, 2001), *Streptomyces chartreusis* GS901 (Matsuo และคณะ, 2000), *Streptomyces diastaticus* (Tajana และคณะ, 1992) เป็นต้น เป็นจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์และปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ส่วนแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. PC22 จัดเป็น extracellular enzyme

การผลิต แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จากจุลินทรีย์ต่างๆที่มีผู้รายงานไว้ พบว่าสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น อะราบิโนส กลูโคส และสารประกอบคาร์บอนเชิงซ้อน เช่น อะราบิแนน อะราบิโนไซแลน เป็นต้น (Sakamoto และ Kawasaki, 2003; Rahman และคณะ, 2001; Gilead และ Shoham, 1995; Panagiotou และคณะ, 2003; Matsuo และคณะ, 2000) แต่แหล่งคาร์บอนที่ส่วนใหญ่ระบุว่ามีบทบาทชักนำการสร้างเอนไซม์นี้ได้ดี คือ สารประกอบเชิงซ้อนที่มีอะราบิโนสเป็นองค์ประกอบ เช่น ไซแลนจากไม้

เนื้ออ่อน หรือจากเปลือกเมล็ดธัญพืชบางชนิด เช่น ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Schyns และคณะ, 1994)

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ของ *Streptomyces* sp. PC22 โดยใช้ไซแลนชนิดต่างๆ และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า อะราบิโนส และไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยอะราบิโนสให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงที่สุด ซึ่งโดยปกติแล้วการที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน น่าจะไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์ แต่ในการทดลองนี้พบว่า อะราบิโนส กลับมีบทบาทต่อการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ซึ่งมีผู้ศึกษาเช่นเดียวกัน และพบว่า *Aureobasidium pullulans* ให้แอคติวิตีแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงสุด เมื่อใช้ อะราบิโนส 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (Saha และ Bothast, 1998a) และ *Pichia capsulata* X91 ใช้อะราบิโนสเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส (Yanai และ Sato, 2000) ส่วนไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตได้แอคติวิตีรองลงมา โดยไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า ซึ่งประกอบด้วยหมู่แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิล 1 โมเลกุล ต่ออยู่ที่ตำแหน่ง โอ-3 ของไซโลส บนสายหลัก ซึ่งจะพบในทุกๆ 8 – 10 โมเลกุลของไซโลส (Schwarz และคณะ, 1995) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเปรียบเทียบกับการใช้วัสดุทางการเกษตรที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ

จากการใช้วัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆ ได้แก่ รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า ฟางข้าว เปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด กากเมล็ดฝ้าย และขี้เลื่อย พบว่า รำข้าวสาลี ที่ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้แอคติวิตีของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสสูงที่สุด ซึ่งมีรายงานว่า รำข้าวสาลีเป็นอะราบิโนไซแลนที่ประกอบด้วย บีตา-ดี-ไซโลไพราโนส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1-4 เป็นสายหลัก และมี แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนส ปริมาณมากเป็นหมู่ข้างเคียง (Beaugrand และคณะ, 2004) และมีรายงานอีกว่า ไซแลนจากรำข้าว มีอะราบิโนสเป็นองค์ประกอบอยู่ 44.9 เปอร์เซ็นต์ (Shibuya และ Iwasaki, 1985)

ข้อมูลการทดลองที่ผ่านมาได้ใช้พอลิเพพโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีราคาค่อนข้างแพง ซึ่งถ้ามีการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องใช้ปริมาณมาก ซึ่งจะทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นอนินทรีย์ไนโตรเจนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าจะนำมาใช้ทดแทนได้ เนื่องจากอนินทรีย์ไนโตรเจนส่วนใหญ่ราคาไม่สูงนักและสามารถใช้ในปริมาณน้อยกว่า แต่ยังคง

ให้ปริมาณไนโตรเจนเทียบเท่ากับพอลิเพพโทน ซึ่งทำให้ลดค่าใช้จ่ายลงได้ จากการทดลองพบว่า แอมโมเนียมไนเตรท ($(NH_4)NO_3$) และ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) สามารถทดแทนพอลิเพพโทนได้

จากการหาผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในอาหารที่มีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเท่ากับ 10 และให้แอคติวิตีสูงขึ้นมาก อาจเนื่องมาจาก เมื่อนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิสูง ถึง 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันสูง ผลของอุณหภูมิสูง และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารสูง อาจทำให้เกิดการย่อยองค์ประกอบของไซแลนในรำข้าวสาลี และให้อะราบิโนสออกมา ซึ่งสามารถชักนำการสร้างแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสได้ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลในรูปที่ 4.5 ที่พบว่าอะราบิโนสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการสร้างเอนไซม์นี้

ตารางที่ 5.1 ได้แสดงปริมาณแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส ที่ผลิตภายใต้ภาวะที่เหมาะสม โดย *Streptomyces* sp. PC22 เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีรำข้าวสาลี ที่ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ความเข้มข้นในรูปของไนโตรเจน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีปริมาณเอนไซม์สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในภาวะที่ใช้ไซแลนร่วมกับพอลิเพพโทนถึง 4 เท่า อีกทั้งยังให้แอคติวิตีสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ และใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อสั้นกว่าด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 ผลผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดสจาก *Streptomyces* sp. PC22 เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ ภายใต้ภาวะที่เหมาะ

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	อุณหภูมิ (°C)	pH	วัน	แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp. PC22	1) 1.0% ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต	0.5% พอลิเพพโทน (0.05% N)	45	8	2	0.21	งานวิจัยนี้
	2) 1.0% ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต	NH_4NO_3 (0.05% N)	45	8	2	0.36	
	3) 3.0% รำข้าวสาลี	0.5% พอลิเพพโทน (0.05% N)	45	10	2	0.48	
	4) 3.0% รำข้าวสาลี	$(NH_4)_2SO_4$ (0.1% N)	45	10	2	0.84	
Aureobasidium pullulans	1.0% อะราบิโนส	-	28	5	4	0.498	Saha และ Bothast,1998a

ตารางที่ 5.1 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	อุณหภูมิ (°C)	pH	วัน	แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	เอกสารอ้างอิง
Bacillus pumilus	1.0 % oat meal	-	37	-	4	0.075	Degrassi และคณะ, 2003
Fusarium oxysporum	1.0 % อะราบิโนไซแลนจากข้าวสาลี	-	30	6	4	0.037	Panagiotou และคณะ, 2003
Penicillium chrysogenum	0.1% กลูโคส และ 2.0% sugar beet pulp	0.1% เพพโทน และ NH_4NO_3 (0.07% N)	30	5	12	0.067	Sakamoto และ Kawasaki, 2003
Penicillium purpurogenum	0.5% รำข้าวสาลี และ 0.5% ฟางข้าวสาลี	0.03% ยูเรีย และ 0.075% นีโอเพพโทน และ $(NH_4)_2SO_4$ (0.05% N)	28	-	4	0.55	De loannes และคณะ, 2000

ตารางที่ 5.1 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH	วัน	แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp. No. 17-1	1.0 % beet arabinan	0.5 % เพพโทน	-	-	4	0.048	Kaji และคณะ, 1981
Streptomyces chartreusis GS901	1.0 % อะราบิแนน	$(NH_4)_2HPO_4$ (0.07% N)	30	7.2	4	0.117	Matsuo และคณะ, 2000
Streptomyces diastaticus	0.8 % รำข้าวสาลี และ 0.5 % กลูโคส	$(NH_4)_2SO_4$ (0.007% N) และ NH_4Cl (0.03% N)	30	7.2	1	0.26	Tajana และคณะ, 1992

หมายเหตุ : - คือ ไม่ระบุ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาสมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Streptomyces* sp. PC22 เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ สามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 5.2 พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *Streptomyces* sp. PC22 มีสมบัติอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างดีกว่าจากจุลินทรีย์อื่นๆ หลายชนิด เพราะสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง และค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่าของสายพันธุ์อื่นๆ นอกจากนี้ ที่ 75 องศาเซลเซียส ยังสามารถทำงานได้ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับที่ค่าอุณหภูมิเหมาะสม (รูปที่ 4.21) เช่นเดียวกับที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ก็ยังสามารถทำงานได้ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ของที่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม (รูปที่ 4.22)

งานวิจัยนี้สามารถหาภาวะที่เหมาะสม รวมทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนราคาถูกในการผลิตแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส โดย *Streptomyces* sp. PC22 โดยใช้แหล่งคาร์บอนทางการเกษตร และอนินทรีย์ไนโตรเจน แทนไซแลน และพอลิเพพโทน คือ รำข้าวสาลี และ $(NH_4)_2SO_4$ โดยที่ภาวะเหมาะสมจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นถึง 4 เท่าของการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน และพอลิเพพโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน จึงทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ และรำข้าวสาลียังเป็นวัสดุทางการเกษตรที่หาได้ง่าย และมีปริมาณมากอีกด้วย นอกจากนั้นเอนไซม์นี้ยังมีสมบัติอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างดี เมื่อเทียบกับที่รายงานจากจุลินทรีย์อื่นๆหลายชนิด จึงเป็นเอนไซม์ที่จะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ร่วมกับไซแลเนส ในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ เพื่อลดการใช้สารเคมี และลดสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.2 สมบัติของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนสิเดส จาก *Streptomyces* sp. PC22 เปรียบเทียบกับจากจุลินทรีย์อื่นๆ

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp. PC22	6.0	5.0-9.0	65	60 °C, 30 นาที	งานวิจัยนี้
Aspergillus awamori IFO 4033	4.0	3.0-7.0	60	60 °C, 2 ชั่วโมง	Kaneko และคณะ, 1998
Aspergillus niger 5-16	4.0	4.0-7.0	60	30 °C, 2 ชั่วโมง	Kaneko และคณะ, 1993
Aureobasidium pullulans	4.0-4.5	4.0-5.5	75	75 °C, 30 นาที	Saha และ Bothast,1998b
Bacillus pumilus	7.0	5.5-8.5	55	65 °C, 135 นาที	Degrassi และคณะ, 2003
Bacteroides xylanolyticus X5-1	5.5-6.0	5.5-9.0	50	50 °C, 20 นาที	Schyns และคณะ, 1994
Bifidobacterium longum B667	6.0	5.5-7.5	45	55 °C, 3 ชั่วโมง	Margolles และ de los Reyes-Gavilan, 2003
Butyrivibrio fibrisolvens GS113	6.0-6.5	4.0-8.0	55	45 °C, 60 นาที	Hespell และ O'Bryan,1992
Pichia capsulata X91	6.0	6.0-8.0	50	30 °C, 30 นาที	Yanai และ Sato, 2000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.2 (ต่อ)

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	เอกสารอ้างอิง
Rhizomucor pusillus HHT-1	4.0	7.0-10.0	65	70 °C, 1 ชั่วโมง	Rahman และคณะ, 2001
Rhodothermus marinus	5.5-7.0	5.0-9.0	85	85 °C, 8.3 ชั่วโมง 90 °C, 17 นาที	Gomes และคณะ, 2000
Streptomyces chartreusis GS901 (α-L-Afase I)	5.5	5.5-8.5	55	45°C, 5 ชั่วโมง	Matsuo และคณะ (2000)
(α-L-Afase II)	7.0	5.0-9.0	50	40°C, 5 ชั่วโมง	
Streptomyces diastaticus (C 1)	5.0-6.5	3.5-7.5	-	25 °C, 8 ชั่วโมง	Tajana และคณะ, 1992
(C 2)	5.0-6.5	3.5-7.5	-	50 °C, 3 ชั่วโมง	
Streptomyces lividans 66	6.0	-	60	-	Manin และคณะ, 1994

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่ระบุ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

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.

Beaugrand, J., Cronier, D., Debeire, P., and Chabbert, B. 2004. Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility. Journal of Cereal Science. 40: 223-230.

Bezalel, L., Shoham, Y., and Rosenberg, E. 1993. Characterization and delignification activity of a thermostable α-L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 57-62.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic system. Trend in Biotechnol. 3(11): 286-290.

De Ioannes, P., Peirano, A., Steiner, J., and Eyzaguirre, J. 2000. An α-L-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: production, purification and properties. J. Biotechnol. 76: 253-258.

Debeche, T., Cummings, N., Connerton, I., Debeire, P., and O'Donohue, M. J. 2000. Genetic and biochemical characterization of a highly thermostable α-L-arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*. Appl. Environ. Microbiol. 66(4): 1734-1736.

Degrassi, G., Vindigni, A., and Venturi, V. 2003. A thermostable α-L-arabinofuranosidase from xylanolytic *Bacillus pumilus*: purification and characterisation. J. Biotechnol. 101: 69-79.

Dekker, R. F. H., and Richards, G. N. 1976. Hemicellulase: their occurrence, purification, properties and mode of action. Adv. Carbohydr. Biochem. 32: 277-352.

Du Preez, J. C. 1994. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. Enzyme. Microb. Technoj. 16: 944-956.

Ericksson, K. E. L., Blanchette, R. A., and Ander, P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin, Germany: Ozach GmbH and Co. p. 181-222.

Filho, E. X. F., Puls, J., and Coughlan, M. P. 1996. Purification and characterization of two α-L-arabinofuranosidase from solid-state cultures of the fungus *Penicillium capsulatum*. Appl. Environ. Microbiol. 62(1): 168-173.

Gilbert, M., Yaguchi, M., Watson, D. C., Wong, K. K. Y., Breuil, C., and Saddler, J. N. 1993. A comparison of 2 xylanases from the thermophilic fungi *Thielavia terrestris* and *Thermoascus crustaceus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40(4): 508-514.

Gilead, S., and Shoham, Y. 1995. Purification and characterization of α-L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. Appl. Environ. Microbiol. 61(1): 170-174.

Gomes, J., Gomes, I., Terler, K., Gubala, N., Ditzelmuller, G., and Steiner, W. 2000. Optimisation of culture medium and conditions for α-L-arabinofuranosidase production by the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. Enzyme. Microb. Technol. 27: 414-422.

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. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier. pp. 535-538.

Greve, L. C., Labavitch, J. M., and Hungate, R. E. 1984. α-L-Arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: purification and possible roles in hydrolysis of alfalfa cell wall. Appl. Environ. Microbiol. 47: 1135-1140.

Gunata, Z., Brillouet, J-M., Voirin, S., Baumes, R., and Cordonnier, R. 1990. Purification and some properties of an α-L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpenyl arabinofuranosylglucosides. J. Agric. Food Chem. 38: 772-776.

Hespell, R. B., and O'Bryan, P. J. 1992. Purification and characterization of an α-L-arabinofuranosidase from *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113. Appl. Environ. Microbiol. 58(4): 1082-1088.

Hon, D. N. S., and Shiraishi, N. 1990. Wood and Cellulosic Chemistry. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 197.

Kaji, A., Sato, M., and Tsutsui, Y. 1981. An α-L-arabinofuranosidase produced by wild-type *Streptomyces* sp. No. 17-1. Agric. Biol. Chem. 45(4): 925-931.

Komae, K., Kaji, A., and Sato, M. 1982. An α-L-arabinofuranosidase from *Streptomyces purpurascens* IFO 3389. Agric. Biol. Chem. 46(7): 1899-1905.

Kaneko, S., Arimoto, M., Ohba, M., Kobayashi, H., Ishii, T., and Kusakabe, I. 1998. Purification and substrate specificities of two α-L-arabinofuranosidases from *Aspergillus awamori* IFO 4033. Appl. Environ. Microbiol. 64(10): 4021-4027.

Kaneko, S., Higashi, K., Yasui, T., and Kusakabe, I. 1998. Substrate specificity of α-L-arabinofuranosidase from *Streptomyces diastatochromogenes* 065 toward arabinose-containing oligosaccharides. J. Ferment. and Bioeng. 85(5): 518-520.

Kaneko, S., Kuno, A., Matsuo, N., Ishii, T., Kobayashi, H., Hayashi, K., and Kusakabe, I. 1998. Substrate specificity of the α-L-arabinofuranosidase from *Trichoderma reesei*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(11): 2205-2210.

Kaneko, S., and Kusakabe, I. 1995. Substrate specificity of α-L-arabinofuranosidase from *Bacillus subtilis* 3-6 toward arabinofurano-oligosaccharides. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59(11): 2132-2133.

Kaneko, S., Shimasaki, T., and Kusakabe, I. 1993. Purification and some properties of intracellular α-L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* 5-16. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57(7): 1161-1165.

Kimura, I., Sasahara, H., and Tajima, S. 1995. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. J. Ferment. and Bioeng. 80(4): 334-339.

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 α-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.

Luonteri, E., Beldman, G., and Tenkanen, M. 1998. Substrate specificities of *Aspergillus terreus* α-arabinofuranosidases. Carbohydr. Polym. 37: 131-141.

Magee, R. J., and Kosaric, N. 1985. Bioconversion of hemicellulosic. Adv. Biochem. Bioeng. 32: 64-93.

Manin, C., Shareek, F., Morosoli, R., and Kluepfel, D. 1994. Purification and characterization of an α-L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abf*A). Biochem. J. 302: 443-449.

Margolles, A., and de los Reyes-Gavilan, C. G. 2003. Purification and functional characterization of a novel α-L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. Appl. Environ. Microbiol. 69(9): 5096-5103.

Matsuo, N., Kaneko, S., Kuno, A., Kobayashi, H., and Kusakabe, I. 2000. Purification, characterization and gene cloning of two α-L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreusis* 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*. Enzyme and Microbial Technology. 17: 424-429.

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.

Panagiotou, G., Topakas, E., Economou, L., Kekos, D., Macris, B. J., Christakopoulos, P. 2003. Induction, purification, and characterization of two extracellular α-L-arabinofuranosidases from *Fusarium oxysporum*. Can. J. Microbiol. 49: 639-644.

Rahman, A. K. M. S., Kato, K., Kawai, S., and Takamizawa, K. 2003. Substrate specificity of the α-L-arabinofuranosidase from *Rhizomucor pusillus* HHT-1. Carbohydr. Res. xxx: 1-8.

Rahman, A. K. M. S., Kawamura, S., Hatsu, M., Hoq, M. M., and Takamizawa, K. 2001. Physicochemical properties of a novel α-L-arabinofuranosidase from *Rhizomucor pusillus* HHT-1. Can. J. Microbiol. 47: 767-772.

Rahman, A. K. M. S., Sugitani, N., Hatsu, M., and Takamizawa, K. 2003. A role of xylanase, α-L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. Can. J. Microbiol. 49: 58-64.

Renner, M. J., and Breznak, J. A. 1998. Purification and properties of ArfI, an α-L-arabinofuranosidase from *Cytophaga xylanolytica.* Appl. Environ. Microbiol. 64(1): 43-52.

Roche, N., Desgranges, C., and Durand, A. 1994. Stydy on the solid-state production of a thermostable α-L-arabinofuranosidase of *Thermoascus aurantiacus* on sugar beet pulp. J. Biotechnol. 38: 43-50.

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 fules. Appl. Environ. Microbiol. 45(1): 153-160.

Saha, B. C. 2000. α-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: 279-291.

Saha, B. C., and Bothast, R. J. 1998a. Effect of carbon source on production of α-L-arabinofuranosidase by *Aureobasidium pullulans*. Current Microbiology. 37: 337-340.

Saha, B. C., and Bothast, R. J. 1998b. Purification and characterization of a novel thermostable α-L-arabinofuranosidase from a color-variant strain of *Aureobasidium pullulans*. Appl. Environ. Microbiol. 64(1): 216-220.

Sakamoto, T., and Kawasaki, H. 2003. Purification and properties of two type-B α-L-arabinofuranosidases produced by *Penicillium chrysogenum*. Biochim. Biophys. Acta. 1621: 204-210.

Schwarz, W. H., Bronnenmeier, K., Krause, B., Lottspeich, F., and Staudenbauer, W. L. 1995. Debranching of arabinoxylan: properties of the thermoactive recombinant α-L-arabinofuranosidase from *Clostridium stercorarium* (ArfB). Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 856-860.

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 α-L-arabinofuranosidases 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.

Shibuya, N., and Iwasaki, T. 1985. Structural features of rice bran hemicellulose. Phytochemistry. 24: 285-289.

Sunna, A., and Antranikian, G. 1996. Growth and production of xylanolytic enzymes by the extreme thermophilic anaerobic bacterium *Thermotoga thermarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 671-676.

Tajana, E., Fiechter, A., and Zimmermann, W. 1992. Purification and characterization of two α-L-arabinofuranosidases from *Streptomyces diastaticus*. Appl. Environ. Microbiol. 58(5): 1447-1450.

Tsao, G. T., and Chiang, L. 1983. Cellulose and hemicellulose technology in Berry, S. D. R., and Kristianiansen, B. (eds.). The Filamentus Fungi : Fungal Technology. New York: John Wiley and Sons Inc. p. 296-362.

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.

Uesaka, E., Sato, M., Raiju, M., and Kaji, A. 1978. α-L-Arabinofuranosidase from *Rhodotorula flava*. J. Bacteriology. 133(3): 1073-1077.

Ungchaithum, S., and Pinphanichakarn, P. 1998. Optimization of xylanase production by *Streptomyces* sp. PC22 growing on agricultural residues. J. Sci. Res. CU. 23(1): 45-50.

Vincent, P., Shareck, F., Dupont, C., Morosoli, R., and Kluepfel, D. 1997. New α-L-arabinofuranosidase produced by *Streptomyces lividans*: cloning and DNA sequence of the *abfB* gene and characterization of the enzyme. Biochem. J. 322: 845-852.

Walker, G. M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. New York: John Wiey and Sons. p. 228-231.

Wateewuthajarn, K., and Pinphanichakarn, P. 2000. Purification and characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. PC22. J. Sci. Res. CU. 25(2): 245-256.

Wood, T. M., and McCrae, S. I. 1996. Arabinoxylan-degrading enzyme system of the fungus *Aspergillus awamori*: purification and properties of an α-L-arabinofuranosidase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 538-545.

Yanai, T., and Sato, M. 2000. Purification and characterization of a novel α-L-arabinofuranosidase from *Pichia capsulata* X91. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64(6): 1181-1188.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งข้าวไรท์

ข้าวไรท์บด	1.0	เปอร์เซ็นต์
วุ้นผง (agar)	1.8	เปอร์เซ็นต์
แคลเซียมคาร์บอเนต	0.3	เปอร์เซ็นต์
กลูโคส	0.2	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.1	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	0.1	เปอร์เซ็นต์
น้ำกลั่น		
ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ	9.0	
อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน		

2. ไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม (xylan complex medium)

ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (oat spelt xylan)	1.0	เปอร์เซ็นต์
พอลิเพพโทน (polypeptone)	0.5	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.1	เปอร์เซ็นต์
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.4	เปอร์เซ็นต์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.02	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1	เปอร์เซ็นต์
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.002	เปอร์เซ็นต์
น้ำกลั่น (distill water)		
ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ	9.0	
อบฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน		

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1951)

Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
น้ำกลั่น	3.0	ลิตร

Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

Lowry C

Lowry A	50	ส่วน
Lowry B	1	ส่วน

Lowry D

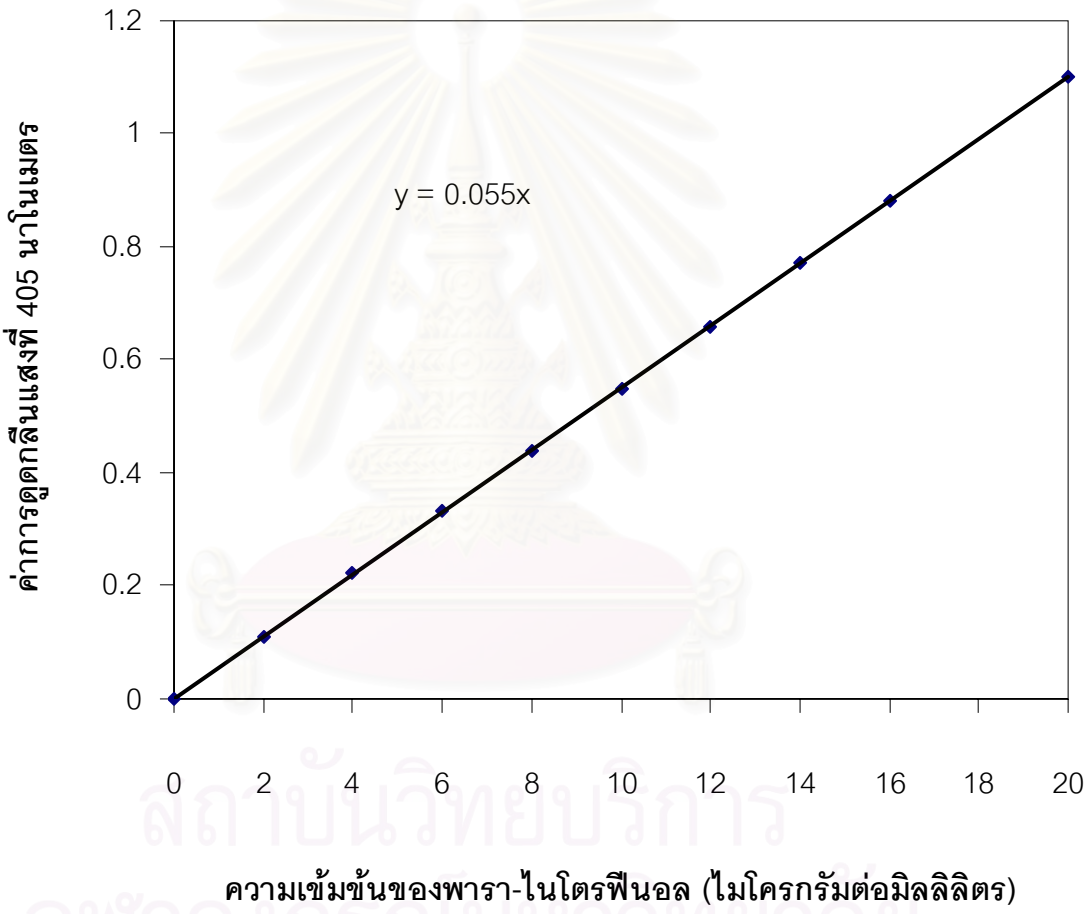
สารละลายโฟลินฟีนอล (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

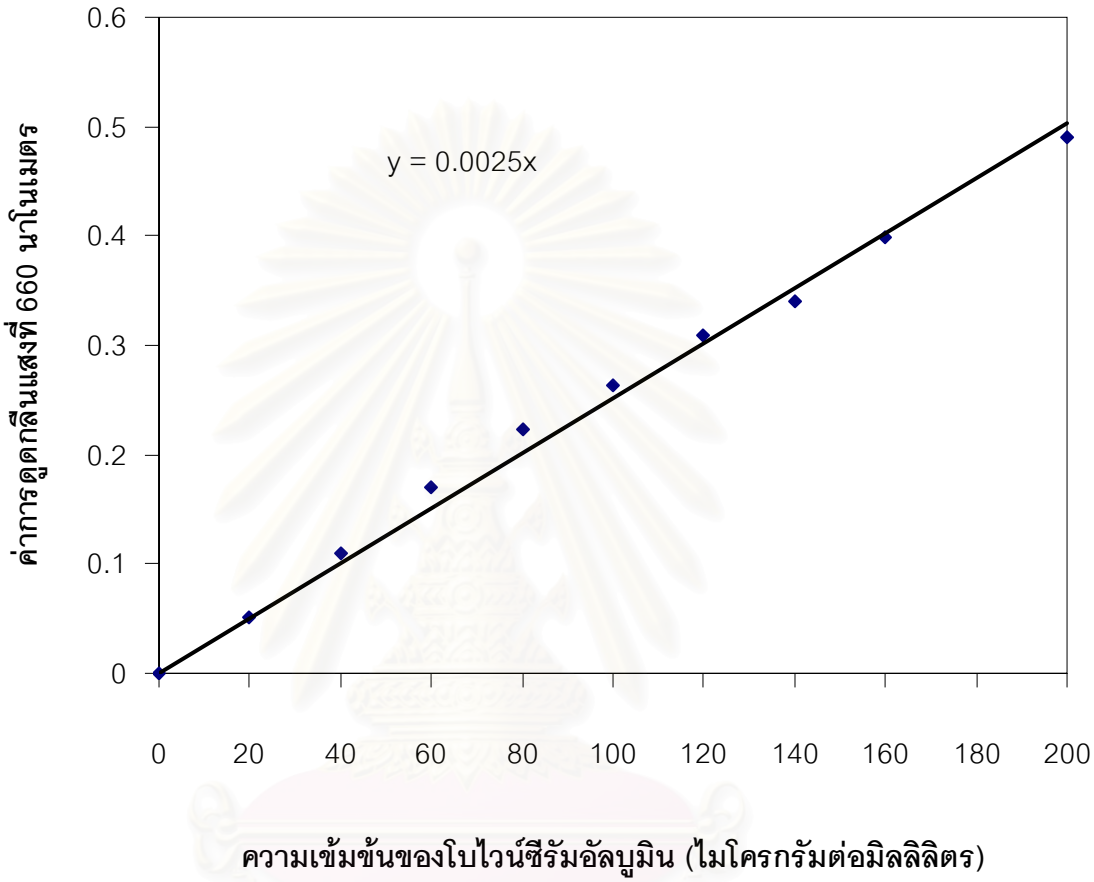
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. กราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

อุปกรณ์อื่น ๆ

1. ชุดกรองสปอร์ของ *Streptomyces* sp. PC22

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิชุตา เหล่าเรืองธนา เกิดเมื่อวันจันทร์ที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2521 ที่กรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544 ปัจจุบันอาศัยอยู่ที่บ้านเลขที่ 126 ซอย ม. อนันต์สุขสันต์ รุ่นที่ 12 ถนนพหลโยธิน(48) แขวงอนุสาวรีย์ เขตบางเขน กรุงเทพมหานคร 10220

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย