หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

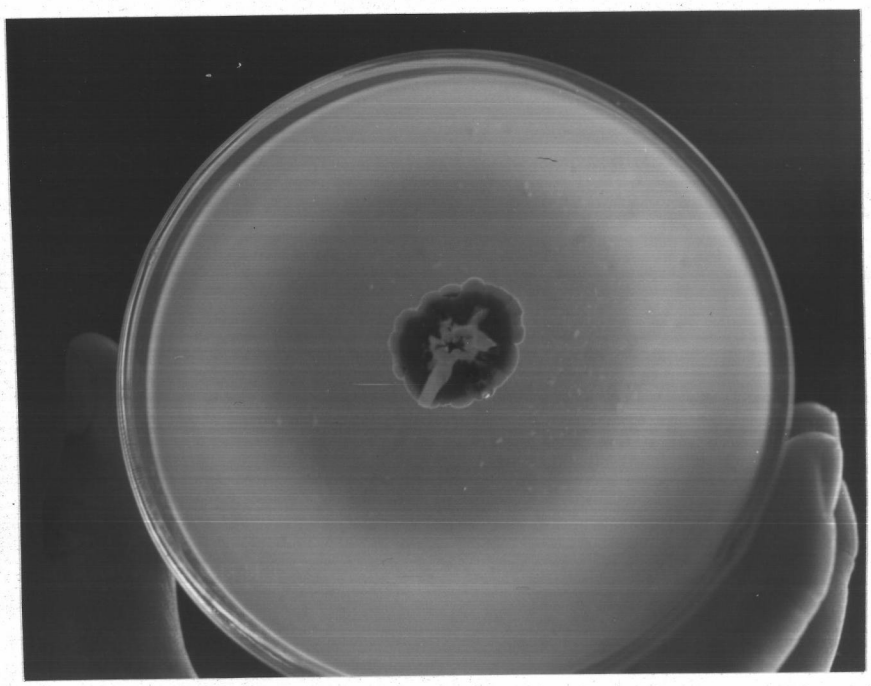
บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ผลการตรวจสอบเบื้องต้นถึงความสามารถในการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีสที่คัดเลือกได้

1.1 การเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

จากการคัดแยกสเตรพโตมัยซีสจากดินตัวอย่างในประเทศไทยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตามวิธีการดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 3.1 พบว่า สเตรพโตมัยซีส 169 สายพันธุ์ สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนี้ได้ และบางสายพันธุ์ให้บริเวณใสรอบโคโลนี (รูปที่ 1) แต่บางสายพันธุ์ไม่ให้บริเวณใสรอบโคโลนี อย่างไรก็ตามเนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้เจริญได้ในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจึงนำจุลินทรีย์ทั้ง 169 สายพันธุ์นี้มาตรวจสอบความสามารถในการผลิตไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวต่อไป



รูปที่ 1 ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนีของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9

1.2 การเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

จากสเตรพโตมัยซีสจำนวน 169 สายพันธุ์ พบว่ามี 10 สายพันธุ์ ที่ผลิตไซแลนเนสได้สูงคือ 0.17-0.12 หน่วยต่อ มล. ในสภาวะการตรวจสอบเบื้องต้นดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 3.2 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5 นอกจากนี้ พบว่า อีก 159 สายพันธุ์ของสเตรพโตมัยซีสมี 23 สายพันธุ์ ผลิตไซแลนเนสได้ 0.12-0.10 หน่วยต่อ มล. 116 สายพันธุ์ ผลิตไซแลนเนสได้ 0.09-0.05 หน่วยต่อ มล. และอีก 20 สายพันธุ์ ผลิตไซแลนเนสได้ 0.04-0.01 หน่วยต่อ มล.

ตารางที่ 5 สายพันธุ์ของสเตรพโตมัยซีสที่ผลิตไซแลนเนสได้สูงในสภาวะการตรวจสอบเบื้องต้นในอาหารเหลว

สายพันธุ์ของสเตรพโตมัยซีส	แหล่งที่มา (จังหวัด)	ปริมาณไซแลนเนส (หน่วยต่อ มล.)
42-9	นครราชสีมา	0.17
43-29	ระยอง	0.16
E-1	ปทุมธานี	0.15
43-28	ระยอง	0.15
G-29	กาญจนบุรี	0.14
A-6	เชียงราย	0.14
G-30	กาญจนบุรี	0.13
4.5.3	กรุงเทพฯ	0.13
8.3.7	จันทบุรี	0.13
Strep 0	กรุงเทพฯ	0.12

จากผลการทดลองในตารางที่ 5 พบว่า สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 สามารถผลิตไซแลนเนสได้สูงสุด และเนื่องจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 นี้ เจริญได้ดีและการสร้างไซแลนเนสมีความเสถียรมากกว่าสเตรพโตมัยซีสสายพันธุ์อื่น จึงเลือกสเตรพโตมัยซีสสายพันธุ์นี้ มาศึกษารายละเอียดในการผลิตไซแลนเนสในขั้นต่อไป

2. ชนิดของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในบทนำถึงรายงานต่าง ๆ (3,16,34,37-41) ที่ว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตไซแลนเนสได้ เมื่อเจริญในแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ เช่น ไซแลน ไซโลส รำข้าว อนุพันธ์ของไซโลส ไซโลไบโอส กลูโคส มอลโทส อินโนซิทอล ฟรักโทส และบีต้า-เมทิล-ดี-ไซโลไซด์ เป็นต้น ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงศึกษาเบื้องต้นถึงชนิดของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ ฟรักโทส อราบิโนส แมนนิทอล ไซโลส แรฟฟิโนส แรมโนส กลูโคส ซูโครส อินโนซิทอล เซลลูโลส บีต้า-เมทิล-ดี-ไซโลไซด์ ไซแลน กากรำข้าวและเปลือกเมล็ดฝ้ายต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลอง พบว่า สเตรพโตมัยซีสนี้ จะผลิตไซแลนเนสได้มากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน และรองลงมาคือกากรำข้าวและเปลือกเมล็ดฝ้ายและผลิตได้เล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่ผลิตเอนไซม์นี้เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอื่น ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6

ฉะนั้น ในการศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตไซแลนเนสของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 โดยขบวนการหมักในอาหารเหลวในขวดแก้วทรงกรวย จึงเลือกใช้กากรำข้าวและเปลือกเมล็ดฝ้าย ซึ่งหาได้ง่ายและราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับไซแลน

3. ผลการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของไซแลน หรือกากรำข้าวหรือเปลือกเมล็ดฝ้ายต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9

จากการผันแปรปริมาณไซแลน หรือกากรำข้าวหรือเปลือกเมล็ดฝ้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่า จุลินทรีย์นี้สามารถผลิตไซแลนเนสได้สูงสุดปริมาณ 0.4-0.45 หน่วยต่อ มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนความเข้มข้น 3-4% และผลิตไซแลนเนสได้สูงสุด 1.25 หน่วยต่อ มล. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีกากรำข้าว 5% เป็น

ตารางที่ 6 ผลของการเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	การทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส (หน่วย/มล.)
ฟรักโทส	0.00
อราบิโนส	0.01
แมนนิทอล	0.00
ไซโลส	0.00
แรฟฟิโนส	0.00
แรมโนส	0.01
กลูโคส	0.04
ซูโครส	0.01
อินโนซิทอล	0.00
เซลลูโลส	0.07
บีต้า-เมทิล-ดี-ไซโลไซด์	0.01
ไซแลน	0.16
กากรำข้าว	0.12
เปลือกเมล็ดฝ้าย	0.12

อาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน 1% ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.02% โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.02% เฟอรัสซัลเฟต 0.002% สารสกัดจากยีสต์ 0.01% ปรับระดับความเป็นกรดด่างที่ 7.0

สภาวะการเลี้ยงเชื้อ บุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน

เตรียมเอนไซม์ตามวิธีดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 6.1 และตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 8

แหล่งคาร์บอน แต่เมื่อเติมกากรำข้าวในปริมาณที่สูงกว่านี้ปริมาณไซแลนเนสจะลดลงอย่างรวดเร็ว และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปลือกเมล็ดฝ้ายบดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า จุลินทรีย์นี้สามารถผลิตไซแลนเนสได้สูงสุดประมาณ 0.2 หน่วยต่อ มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปลือกเมล็ดฝ้าย 3%

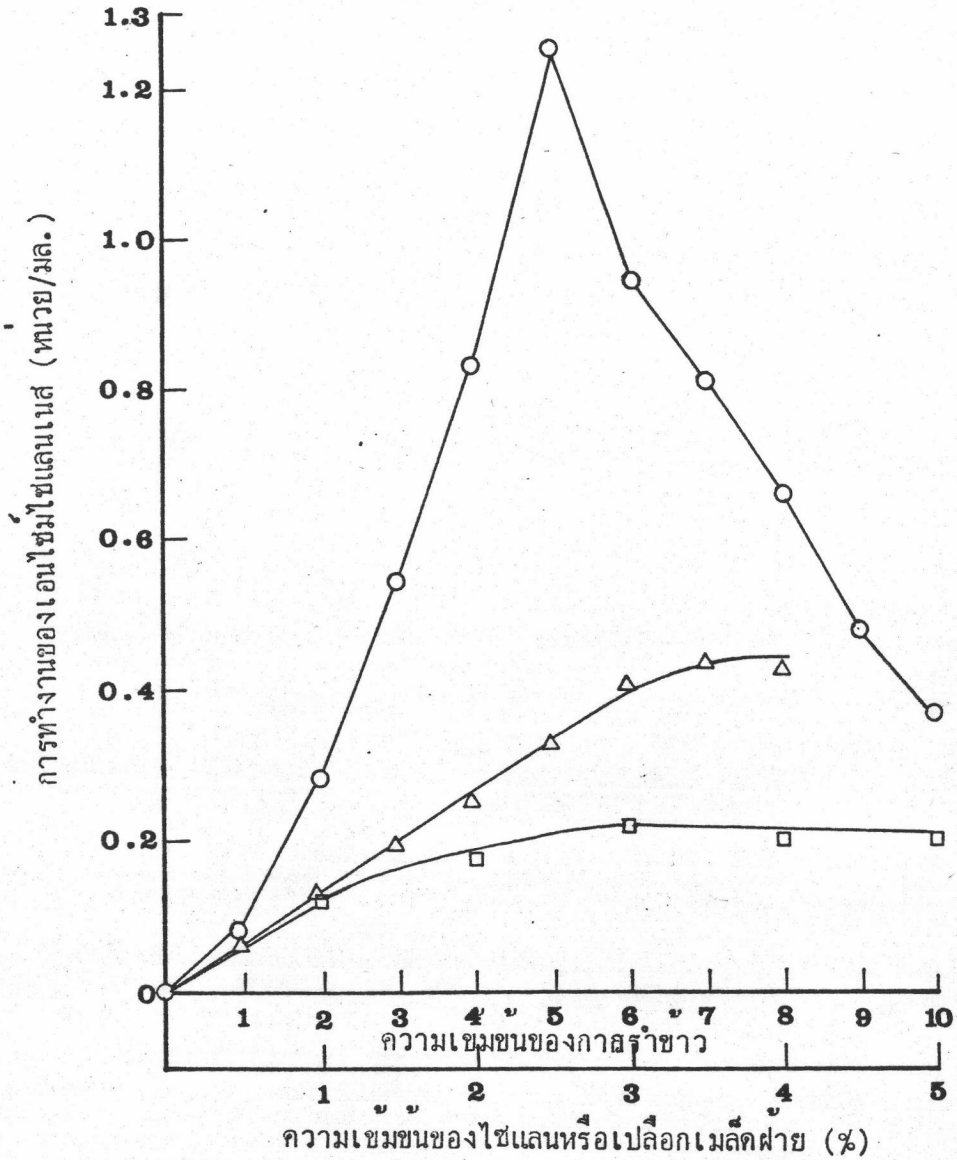
4. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไซแลนเนส

จากผลการทดลองในข้อ 2 และ 3 จึงเลือกใช้ไซแลน กากรำข้าวและเปลือกเมล็ดฝ้าย ในการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน

4.1 ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตไซแลนเนสเมื่อมีไซแลนหรือกากรำข้าวหรือเปลือกเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอน

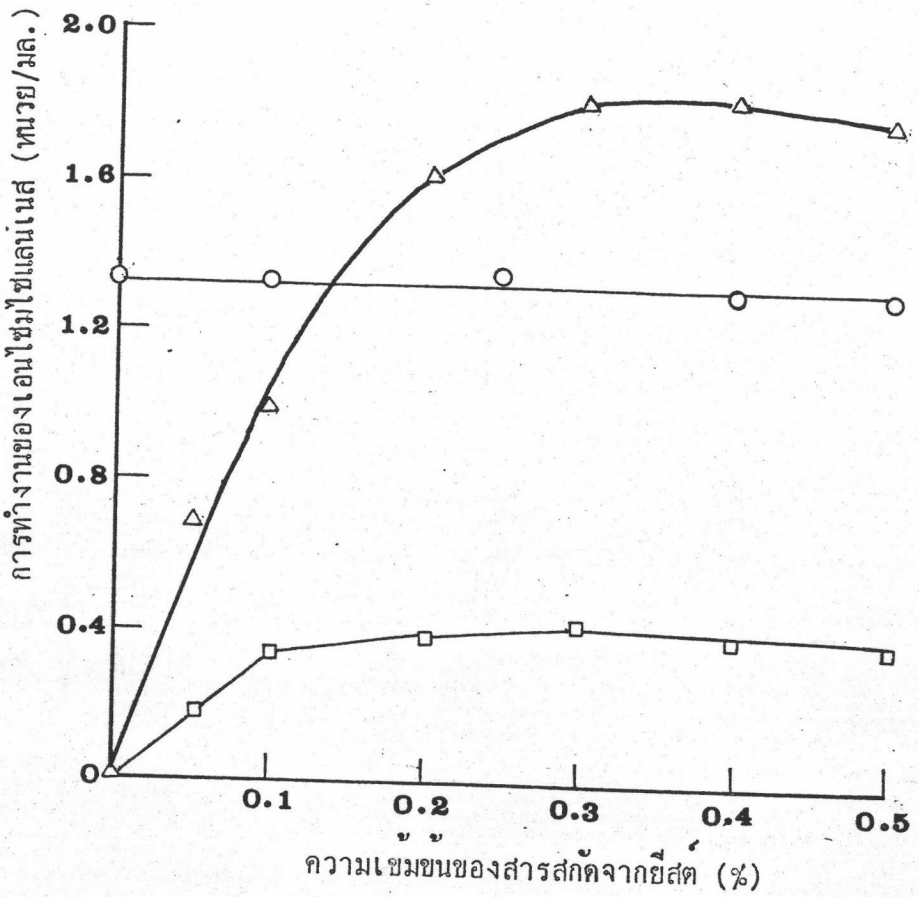
เนื่องจาก Nakajima และคณะ (13) รายงานว่า สารสกัดจากยีสต์มีผลในการเพิ่มการผลิตไซแลนเนสของ Streptomyces sp. KT-23 แต่อย่างไรก็ตาม Kawaminami และ Iizuka (29) รายงานว่าสารสกัดจากยีสต์ไม่มีผลต่อการผลิตไซแลนเนสของ Streptomyces xylophagus ดังนั้น ในการทดลองนี้ จึงศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตไซแลนเนสของ สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลน กากรำข้าว และเปลือกเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอน

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3 พบว่า ที่ความเข้มข้นของไซแลนเป็น 3% จุลินทรีย์จะสามารถผลิตไซแลนเนสได้สูงสุดประมาณ 1.8 หน่วยต่อ มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากยีสต์ 0.3-0.5% โดยที่ปริมาณไซแลนเนสเพิ่มขึ้น 4.5 เท่าของผลการทดลองในข้อ 3 แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าว 5% เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ในสภาวะที่ไม่มีหรือมีสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 0-0.5% ปริมาณไซแลนเนสที่จุลินทรีย์นี้ผลิตได้ไม่แตกต่างกันมาก และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปลือกเมล็ดฝ้าย 3% เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การเพิ่มปริมาณสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการเพิ่มการผลิตไซแลนเนสบ้างเล็กน้อย โดยที่ 0.2-0.5% ของสารสกัดจากยีสต์จะให้ปริมาณไซแลนเนสสูงสุดคือประมาณ 0.4 หน่วยต่อ มล.



รูปที่ 2 ผลของไซแลน กากรำข้าว หรือเปลือกเมล็ดฝ้ายต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 0.4% ไดโปแตสเซียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.02% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.02% โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.002% เฟอรัสซัลเฟต 0.01% สารสกัดจากยีสต์ และ 0-4% ไซแลน หรือ 0-10% กากรำข้าว (ขนาด 80 mesh) หรือ 0-5% เปลือกเมล็ดฝ้าย (ขนาด 100 mesh) ปรับระดับความเป็นกรดด่างที่ 7.0 ในขวดแก้วทรงกรวยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ภายใต้การเขย่า 250 รอบต่อนาที หาแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่เตรียมได้จากบทที่ 2 ข้อ 6.1 โดยวิธีการดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 8

△——△ คือ ปริมาณไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลน
○——○ คือ ปริมาณไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าว
□——□ คือ ปริมาณไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปลือกเมล็ดฝ้าย



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบและสภาวะดังกล่าวภายใต้รูปที่ 2 โดยมีไซแลน 3% หรือกากรำข้าว 5% หรือเปลือกเมล็ดฝ้าย 3% เป็นแหล่งคาร์บอนและผันแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ดังระบุในรูป หาแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวใต้รูปที่ 2

△——△ คือ ปริมาณไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลน

○——○ คือ ปริมาณไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าว

□——□ คือ ปริมาณไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปลือกเมล็ดฝ้าย

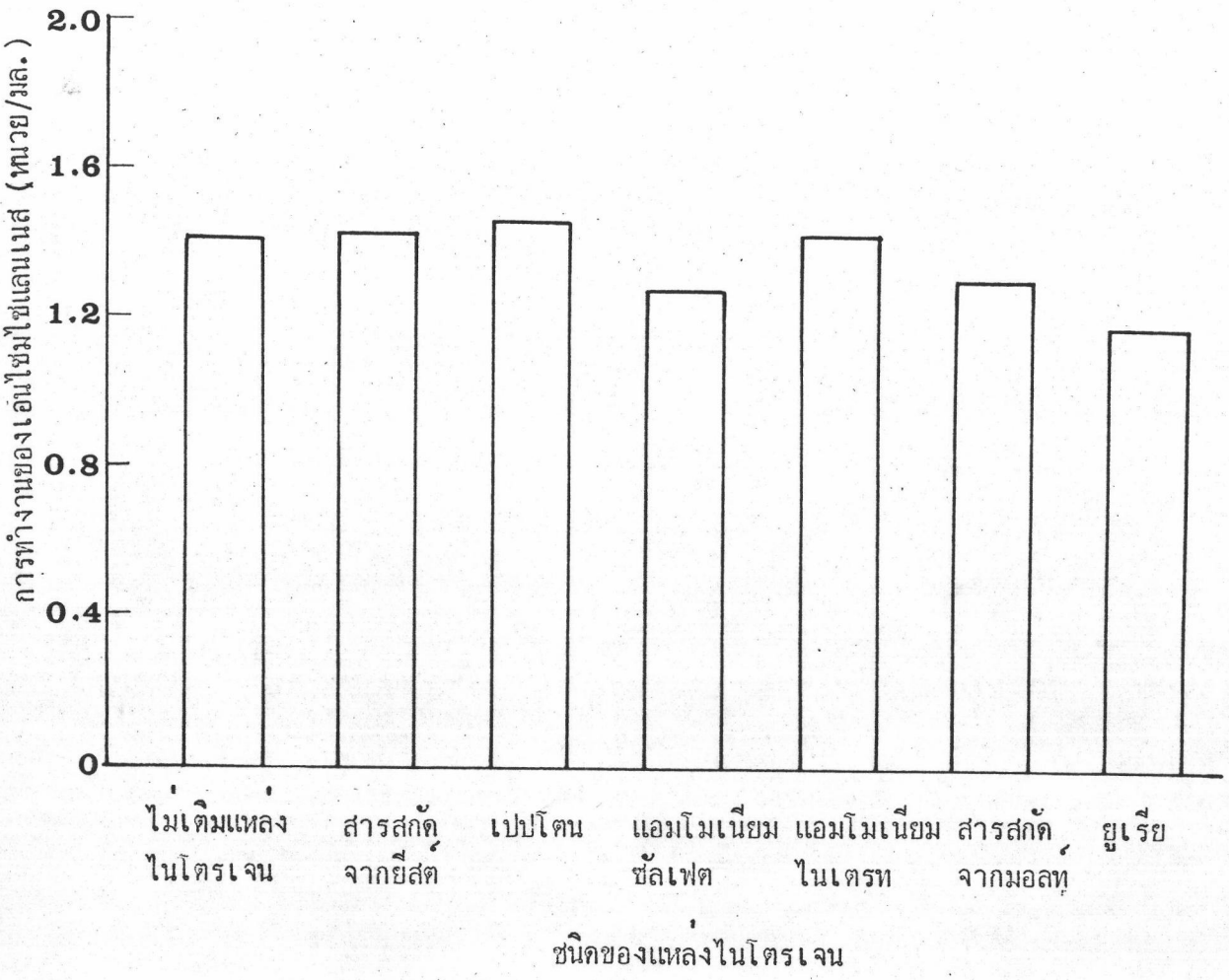
จากผลการทดลองในข้อ 4.1 สรุปได้ว่า สารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของไซแลนเนสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ในสภาวะที่มีไซแลนและเปลือกเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่มีผลต่อการผลิตไซแลนเนสในสภาวะที่มีกากรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนหรือเปลือกเมล็ดฝ้ายมีแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด ดังนั้น การเพิ่มสารสกัดจากยีสต์จึงมีผลเด่นชัดต่อการเพิ่มปริมาณไซแลนเนส ในขณะที่กากรำข้าวในปริมาณที่ใช้นี้เพียงพอต่อการเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน สำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์นี้ และเนื่องจากกากรำข้าวให้การผลิตไซแลนเนสในเกณฑ์สูงพอควรและมากกว่าเปลือกเมล็ดฝ้ายแม้จะต่ำกว่าเมื่อใช้ไซแลน แต่เนื่องจากกากรำข้าวเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรซึ่งหาได้ง่ายและมีราคาถูก ดังนั้น จึงจะเลือกใช้กากรำข้าวเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษารายละเอียดในการผลิตไซแลนเนสของ สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ต่อไป

4.2 <u>ผลของแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ต่อการผลิตไซแลนเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ</u>

พบว่า เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าว 5% เป็นแหล่งคาร์บอนและเติมหรือไม่เติม 0.1% ของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ คือ เปปโตน แอมโมเนียม-ไนเตรทและสารสกัดจากยีสต์ สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 นี้สามารถผลิตไซแลนเนสได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ในสภาวะที่เติม 0.1% ของแอมโมเนียมซัลเฟต สารสกัดจากมอลท์หรือยูเรีย ปริมาณเอนไซม์จะต่ำกว่าสภาวะที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 4 จากผลการทดลองนี้แสดงว่า นอกจากสารสกัดจากยีสต์จะไม่มีผลต่อการผลิตไซแลนเนสแล้ว แหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ก็ไม่มีผลด้วยเช่นกัน ดังนั้น ในการใช้กากรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งไนโตรเจนอื่นอีก

5. <u>ผลของการเสริมไซแลนในรูปต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบต่อการผลิตไซแลนเนส</u>

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่า จุลินทรีย์นี้ผลิตไซแลนเนสได้ดี เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนหรือสารที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้น จึงได้ทดลองเพิ่มการผลิตไซแลนเนสโดยเพิ่มปริมาณไซแลนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าว 5% เป็นองค์ประกอบ



รูปที่ 4 ผลของสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9

โดยเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบและสภาวะดังกล่าวใต้รูปที่ 2 แต่มีกากรำข้าว 5% เป็นแหล่งคาร์บอนและแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ดังรูป โดยใช้ความเข้มข้น 0.1% และหาแอคติวิตีของไซแลนเนสดังกล่าวใต้รูปที่ 2

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.1 การเสริมไซแลนในรูปไซแลนบริสุทธิ์

พบว่า การเติมไซแลนที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% กับสภาวะที่ไม่มีการเติมไซแลน ปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นนี้ไม่มีความแตกต่างกันนัก ดังแสดงในรูปที่ 5 แสดงว่า ปริมาณกากรำข้าวที่ใช้เพียงพอสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไซแลนเนสแล้ว

5.2 การเสริมไซแลนในรูปเปลือกเมล็ดฝ้าย

พบว่า การเสริมด้วยเปลือกเมล็ดฝ้าย มิได้เพิ่มการผลิตเอนไซม์ ยิ่งกว่านั้นการเติมเปลือกเมล็ดฝ้ายที่ความเข้มข้นสูงขึ้น จะมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 6

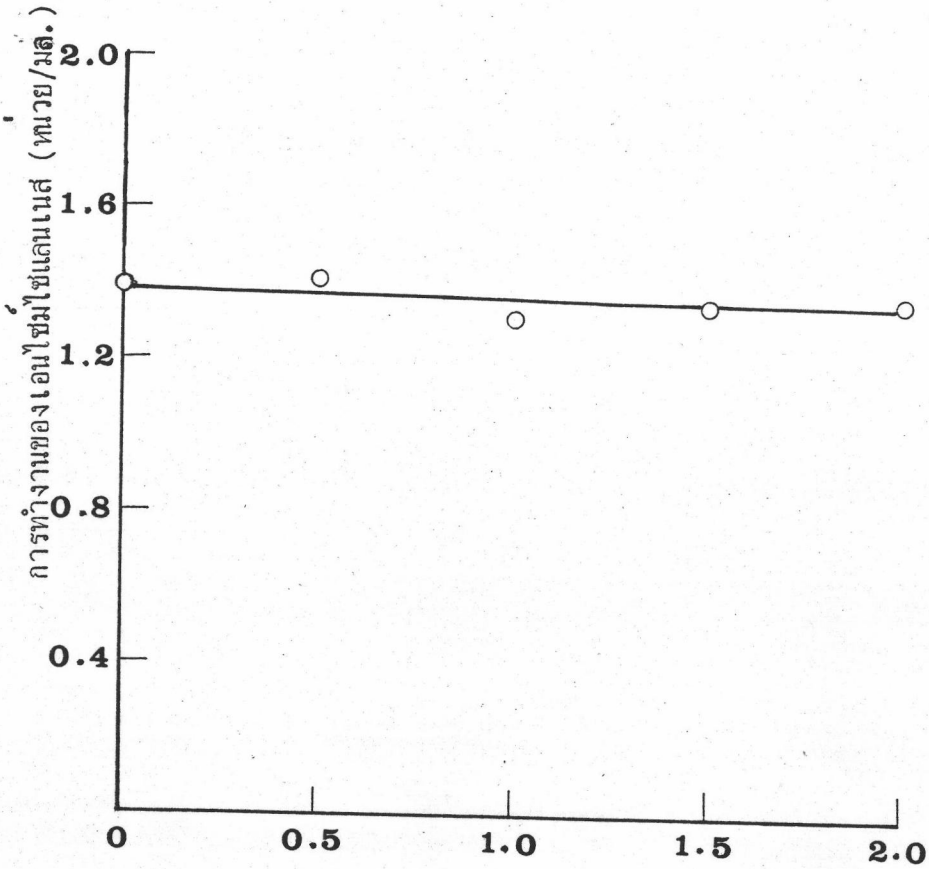
6. ผลของกลูโคสต่อการผลิตไซแลนเนส

จากการเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ พบว่าการเติมกลูโคสลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะกดดัน (repress) การผลิตไซแลนเนส ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งยืนยันว่า การผลิตไซแลนเนสเป็นลักษณะชักนำโดยมีไซแลนเป็นสารชักนำและมีกลูโคสเป็นสารกดดันการสร้างเอนไซม์

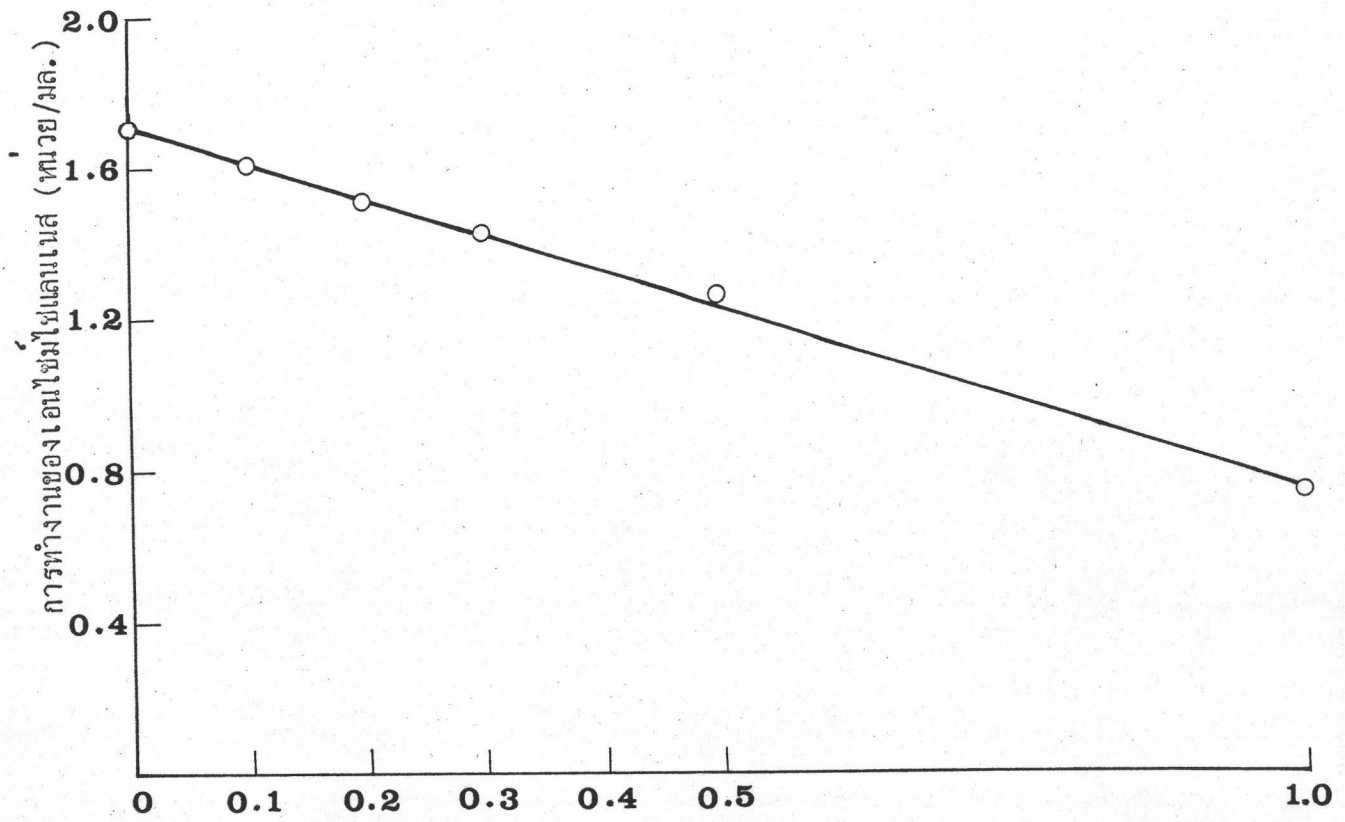
7. ผลของเกลือแร่ต่อการผลิตไซแลนเนส

7.1 ผลของการเติมไดโปแตสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (K_2HPO_4) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

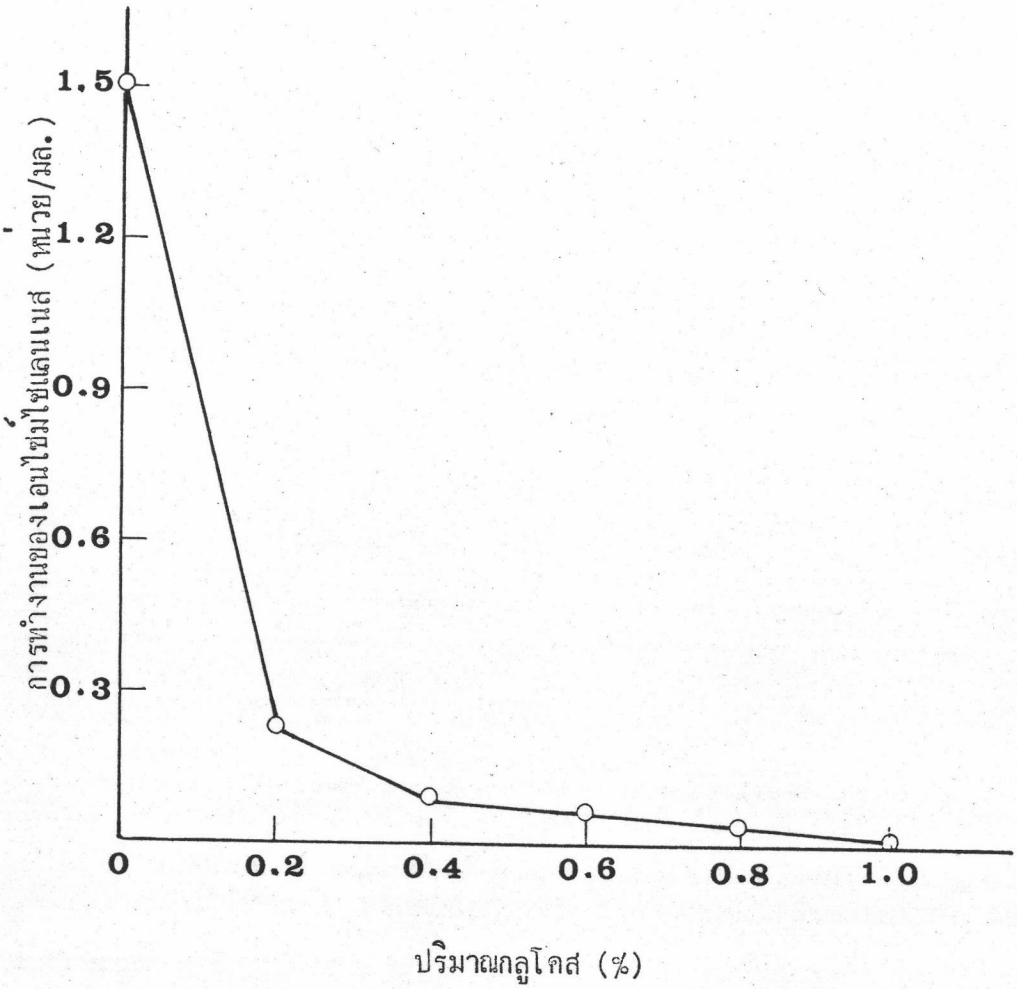
พบว่า การผลิตเอนไซม์ไซแลนแนสของสเตรพโตมัยซีสนี้จะสูงสุดที่ความเข้มข้นของไดโปตัสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต 0.3% คือ 1.28 หน่วยต่อ มล. และคงที่จนถึงความเข้มข้น 0.5% แต่ที่ความเข้มข้นของไดโปตัสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต มากกว่านี้ ปริมาณเอนไซม์จะลดลงเล็กน้อย และในกรณีที่ไม่เติมไดโปตัสเซียม ไฮโดรเจน-ฟอสเฟต การผลิตเอนไซม์จะต่ำมาก คือ 0.15 หน่วยต่อ มล. ดังแสดงในรูปที่ 8



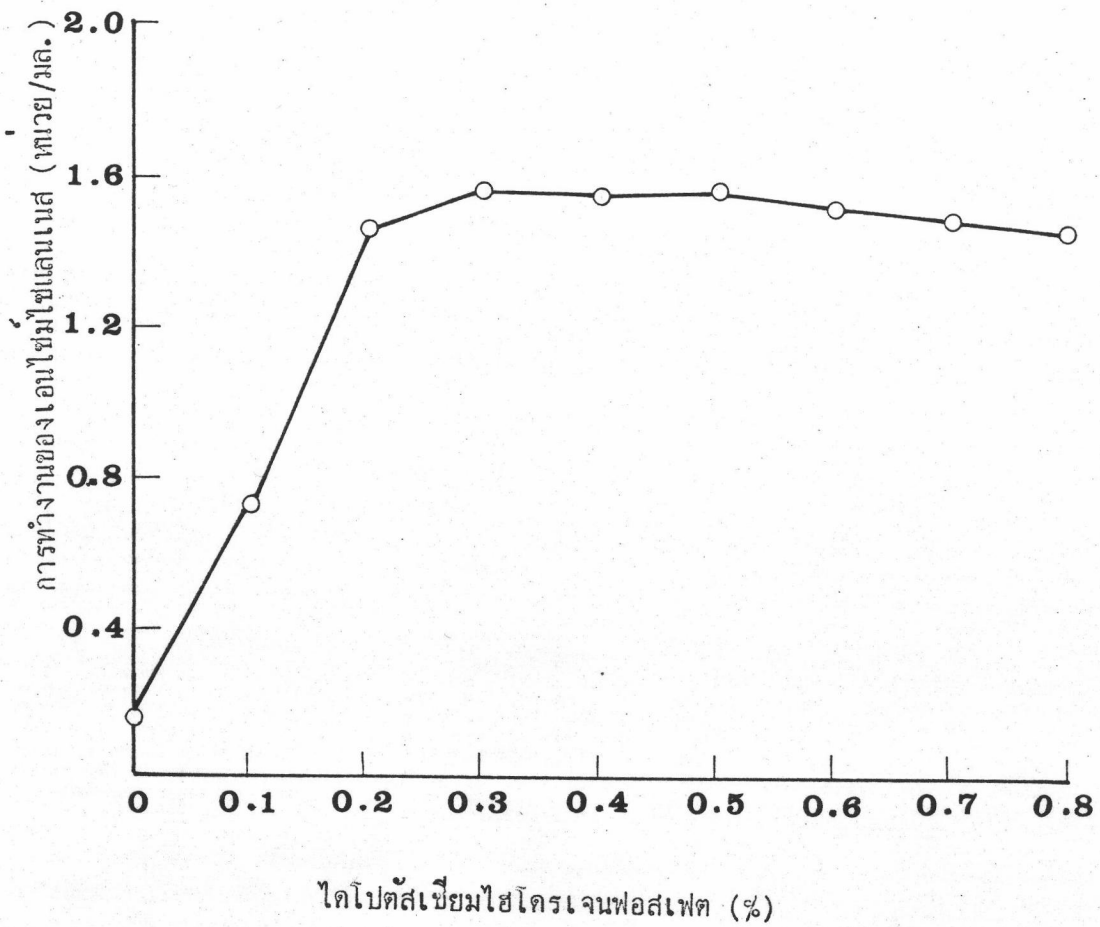
รูปที่ 5 ผลของการเติมไซแลนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าว 5% เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากรำข้าว 5% เป็นแหล่งคาร์บอน องค์ประกอบอื่น ๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะดังกล่าวใต้รูปที่ 2 แต่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ และผันแปรปริมาณของไซแลนดังรูป วิธีการหาแอคติวิตีของไซแลนเนสได้กล่าวภายใต้รูปที่ 2



รูปที่ 6 ผลของการเสริมแหล่งคาร์บอนด้วยเปลือกเมล็ดฝ้ายต่อการผลิตไซแลนเนส โดย สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบและสภาวะดังกล่าวใต้รูปที่ 2 ยกเว้น ใช้กากรำข้าว 5% เป็นแหล่งคาร์บอนและผันแปรปริมาณของเปลือกเมล็ดฝ้าย (ขนาด 100 mesh) ดังรูป หาแอคติวิตีของไซแลนเนสดังกล่าวใต้รูปที่ 2



รูปที่ 7 ผลของการเติมกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซแลนเนส โดย สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบและสภาวะดังกล่าวใต้รูปที่ 2 โดยมีกาก รำข้าว 5% เป็นแหล่งคาร์บอน ไม่มีสารสกัดจากยีสต์ และผันแปรปริมาณกลูโคสที่เติมลงไปดังรูป หาแอคติวิตีของไซแลนเนสดังกล่าวใต้รูปที่ 2



รูปที่ 8 ผลของการเติมไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซแลนเนสโดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9
เติมไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากรำข้าว 5% เป็นแหล่งคาร์บอน 0.02% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.02% โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.002% เฟอรัสซัลเฟต และผันแปรปริมาณไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ดังระบุในรูปปรับสภาวะความเป็นกรดด่างที่ 7.0 สภาวะการเลี้ยงเชื้อและการหาแอคติวิตีของไซแลนเนสได้กล่าวภายใต้รูปที่ 2

7.2 ผลของการเติมแมกนีเซียม ซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

พบว่า ในสภาวะที่ไม่มีและมีแมกนีเซียม ซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.01 ถึง 0.1% ปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตโดย สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ไม่มีความแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 9 แสดงว่าแมกนีเซียม ซัลเฟต ที่เสริมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์

7.3 ผลของการเติมเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

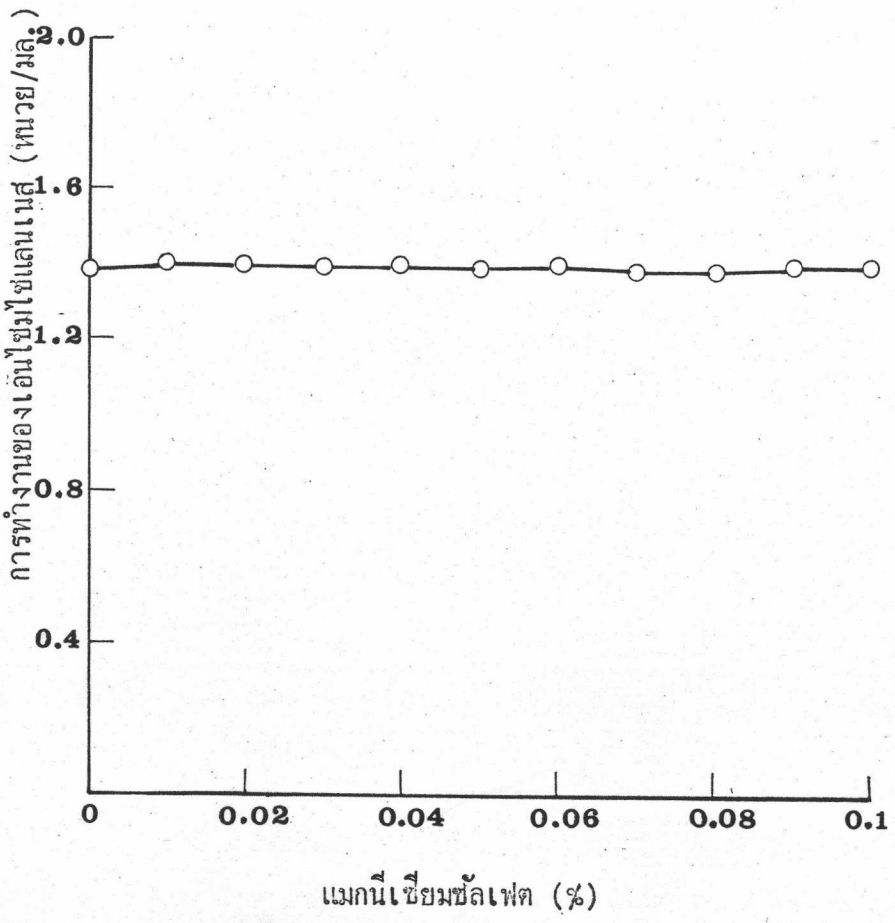
พบว่า ที่ความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต 0.002% การผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 นี้จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ที่ความเข้มข้นมากกว่านี้ การผลิตเอนไซม์จะค่อย ๆ ลดลงเล็กน้อยตามความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตที่เพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 10

7.4 ผลของการเติมโปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

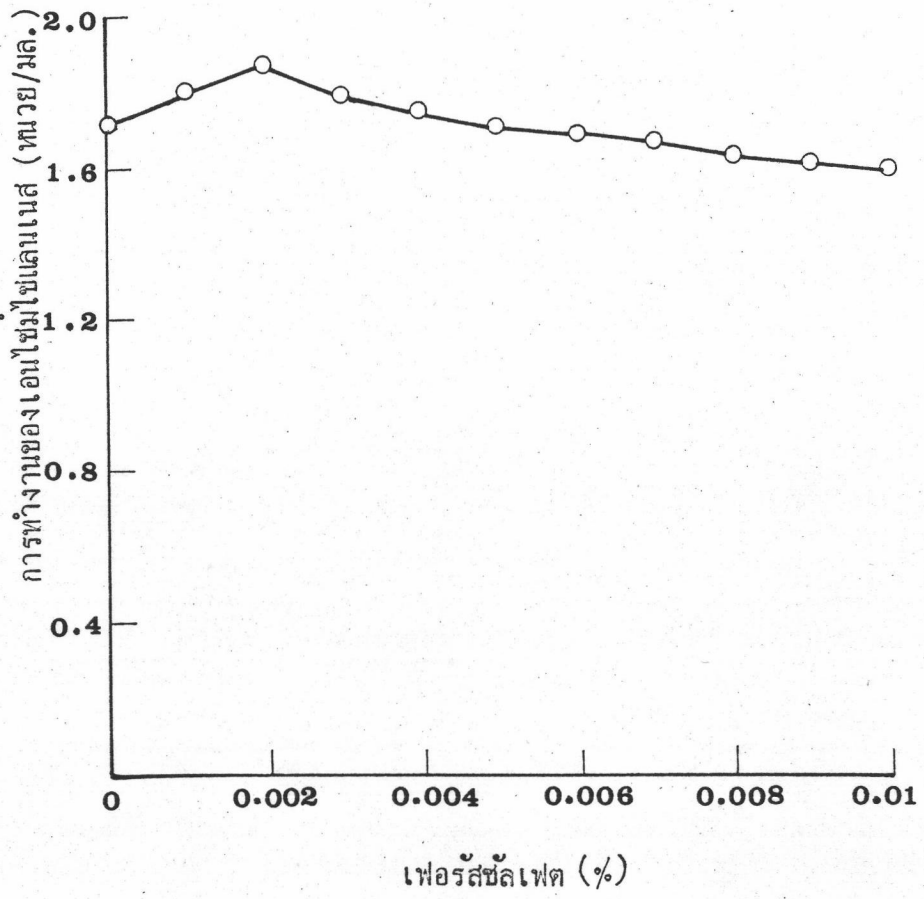
พบว่า โปตัสเซียมคลอไรด์ ที่เติมลงไปมีผลเล็กน้อยต่อการผลิตเอนไซม์ โดยที่ความเข้มข้นของโปตัสเซียมคลอไรด์ 0.03% การผลิตไซแลนเนสจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 11

7.5 ผลของการเติมแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

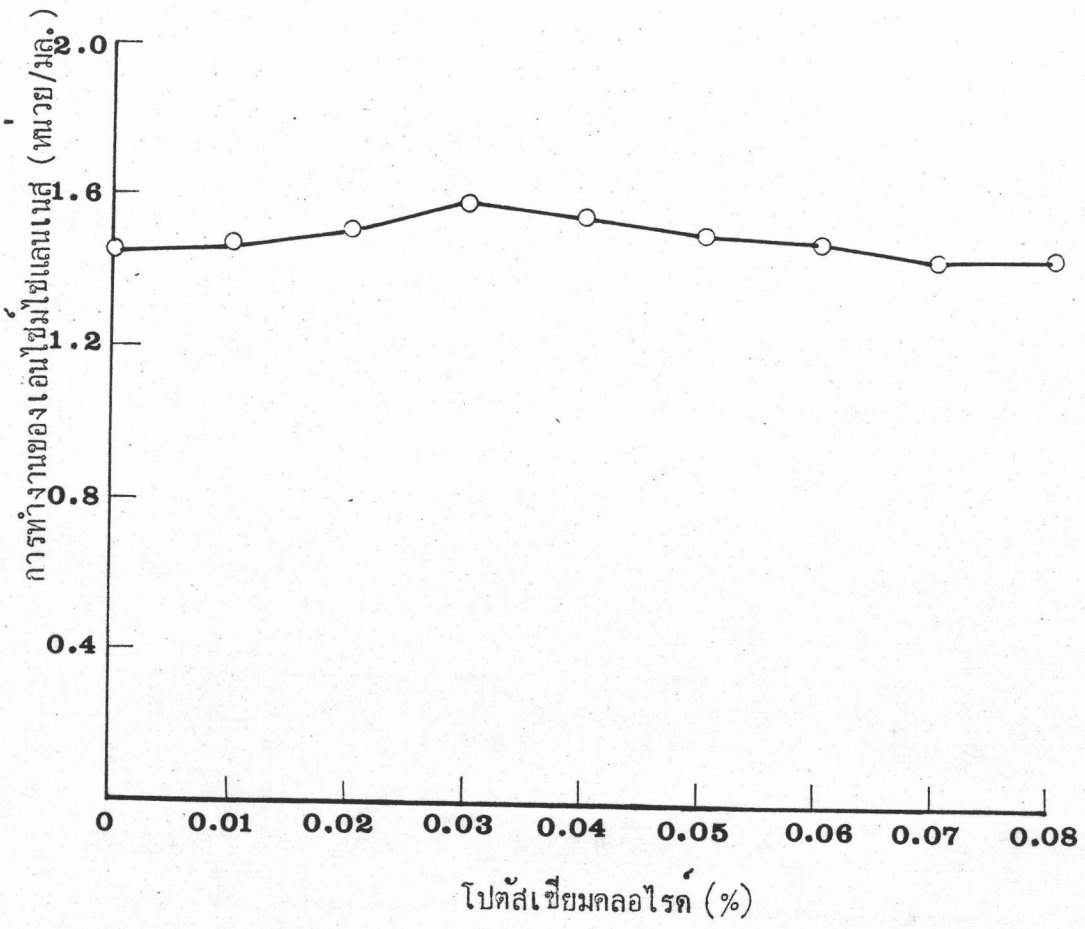
พบว่า แมงกานีสซัลเฟตที่เสริมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น 0.001-0.005% ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส ดังแสดงในรูปที่ 12



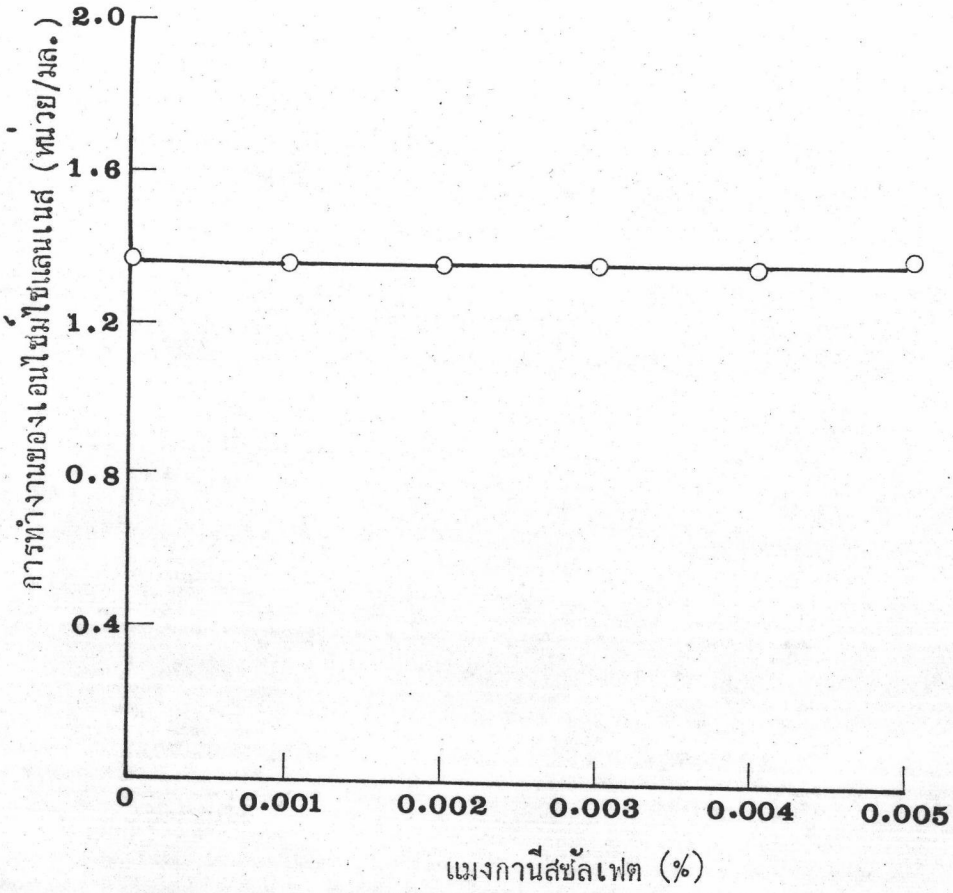
รูปที่ 9 ผลของการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9
เติมแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังกล่าวใต้รูปที่ 8 ยกเว้นใช้ 0.3% ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และผันแปรปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต ดังระบุในรูป สภาวะการเลี้ยงเชื้อและการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้กล่าวภายใต้รูปที่ 2



รูปที่ 10 ผลของการเติมเฟอรัสซัลเฟต ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 เติมเฟอรัสซัลเฟต ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังกล่าวใต้รูปที่ 9 ยกเว้น ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต และผันแปรปริมาณเฟอรัสซัลเฟต ดังระบุในรูป สภาวะการเลี้ยงเชื้อและการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวใต้รูปที่ 2



รูปที่ 11 ผลของการเติมโปตัสเซียมคลอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 เติมโปตัสเซียมคลอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังกล่าวภายใต้รูปที่ 10 ยกเว้นเติมเฟอรัสซัลเฟต 0.002% และผันแปรปริมาณโปตัสเซียมคลอไรด์ ดังระบุในรูป สภาวะการเลี้ยงเชื้อและการหาแอคติวิตีของไซแลนเนสได้กล่าวภายใต้รูปที่ 2



รูปที่ 12 ผลของการเติมแมงกานีสซัลเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 เติมแมงกานีสซัลเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 5% กากรำข้าว 0.3% ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.092% เฟอรัสซัลเฟต 0.03% โปตัสเซียมคลอไรด์ ปรับสภาวะความเป็นกรดด่างที่ 7.0 และผันแปรปริมาณแมงกานีสซัลเฟต ดังระบุในรูป สภาวะการเลี้ยงเชื้อและการหาแอคติวิตีของไซแลนเนสได้กล่าวภายใต้รูปที่ 2

7.6 ผลของการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

พบว่า แคลเซียมคลอไรด์ ที่เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส ยิ่งกว่านั้น ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.01% จะยับยั้งการผลิตเอนไซม์นี้อย่างเด่นชัด การยับยั้งจะเพิ่มตามความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ดังแสดงในรูปที่ 13

7.7 ผลของการเติมโคบอลท์ คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

พบว่า โคบอลท์ คลอไรด์ ที่ความเข้มข้นสูงถึง 0.01% ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส แต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้ จะเริ่มมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์นี้บ้างเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 14

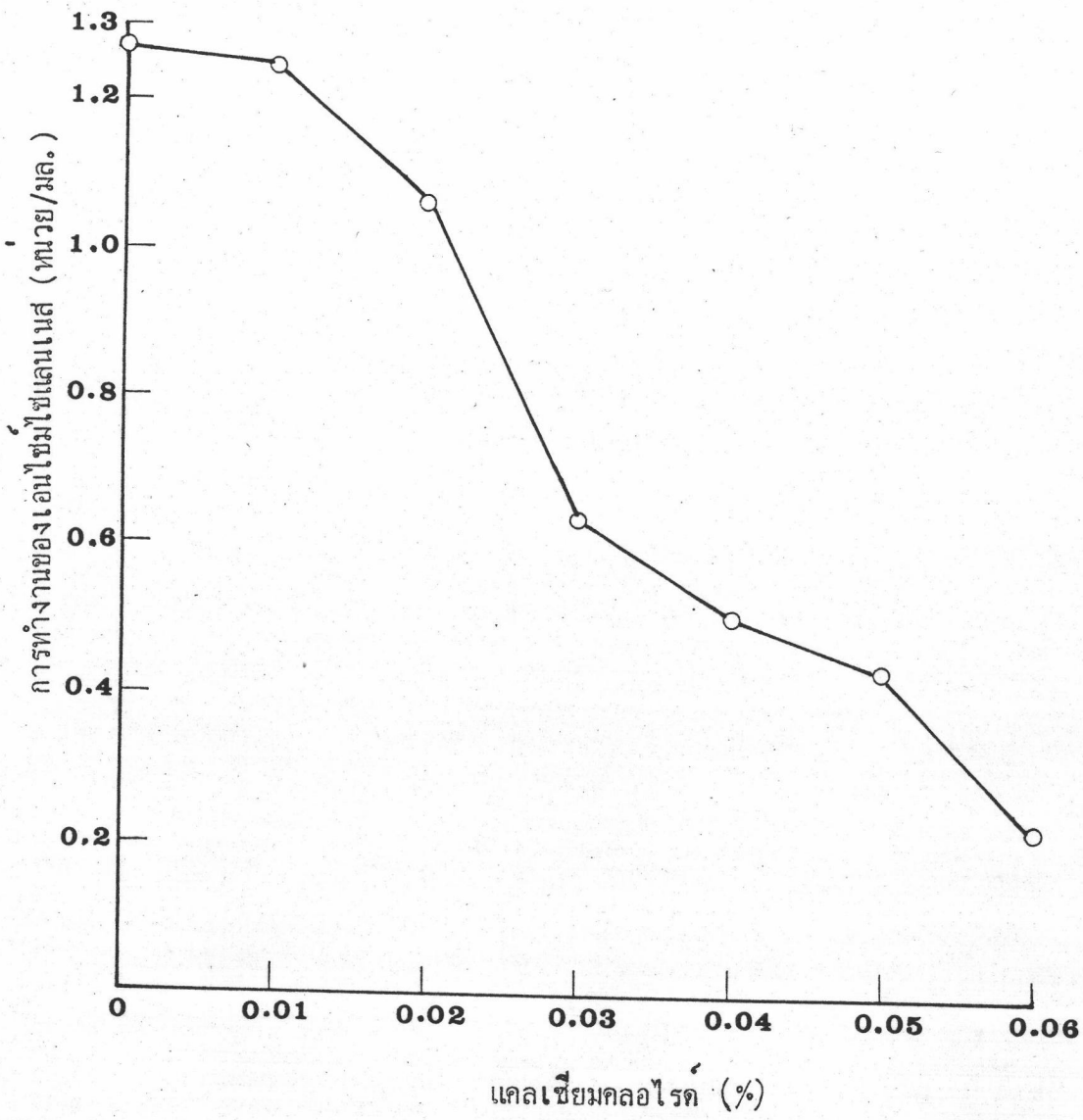
เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นลักษณะเชิงซ้อน (Complex medium) โดยมีกากรำข้าวเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ซึ่งกากรำข้าวที่ใช้นี้อาจมีเกลือแร่บางชนิดที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเจือปนอยู่ ดังนั้นการเสริมเกลือแร่ดังการทดลองข้างต้น จึงไม่ปรากฏผลเด่นชัด

จากผลการศึกษาข้างต้นนี้ทำให้ได้องค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ในการผลิตไซแลนเนส ดังนี้คือ 5% กากรำข้าว 0.3% ไดโปตัสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต 0.002% เฟอรัส ซัลเฟต. และ 0.03% โปตัสเซียมคลอไรด์ ปรับสภาวะความเป็นกรดด่างที่ 7.0

8. สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ

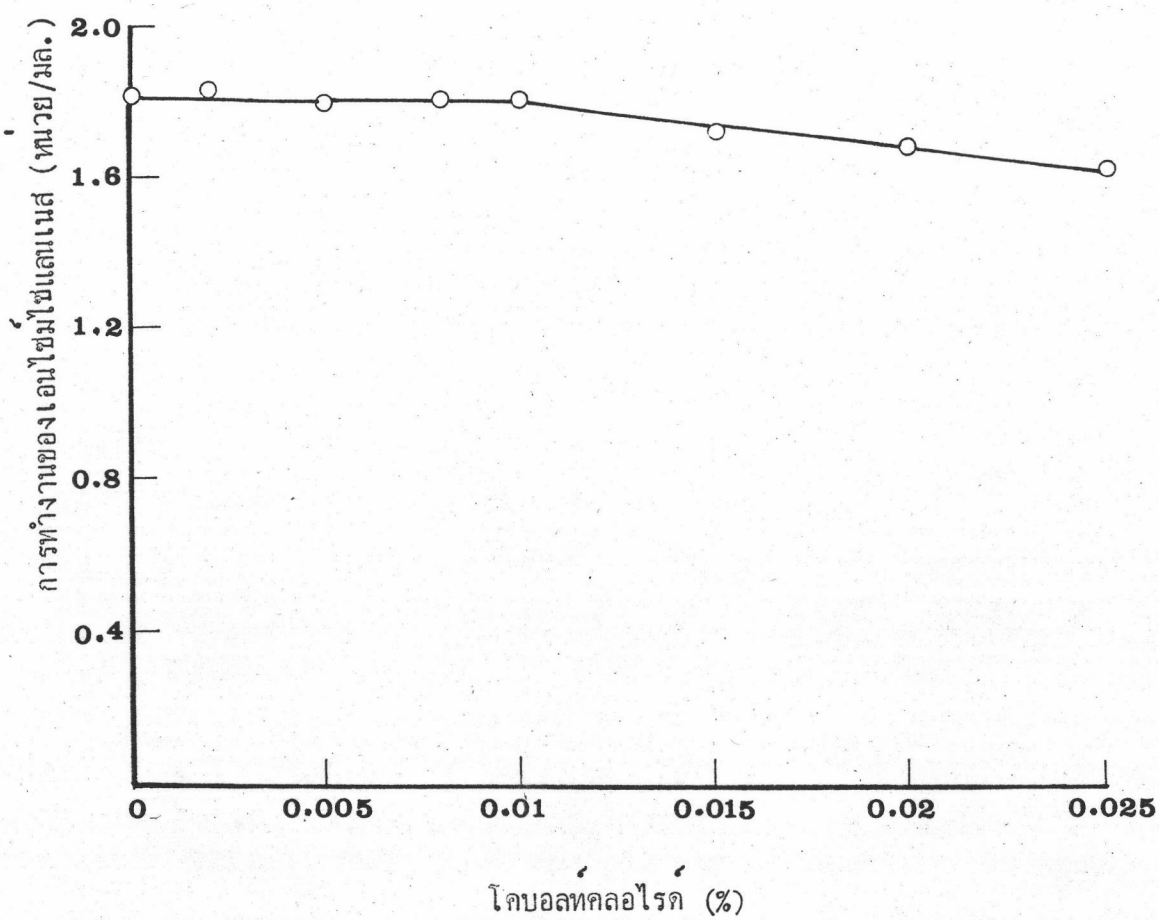
8.1 ผลการศึกษาความเป็นกรดด่าง (pH) เริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ

พบว่า ระดับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมอยู่ในช่วงที่กว้างคือ 6-7.5 โดยปริมาณไซแลนเนสที่สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ผลิตได้จะสูงสุดและใกล้เคียงกันที่ระดับความเป็นกรดด่างในช่วงนี้ คือประมาณ 1.25 หน่วยต่อ มล. ดังแสดงในรูปที่ 15

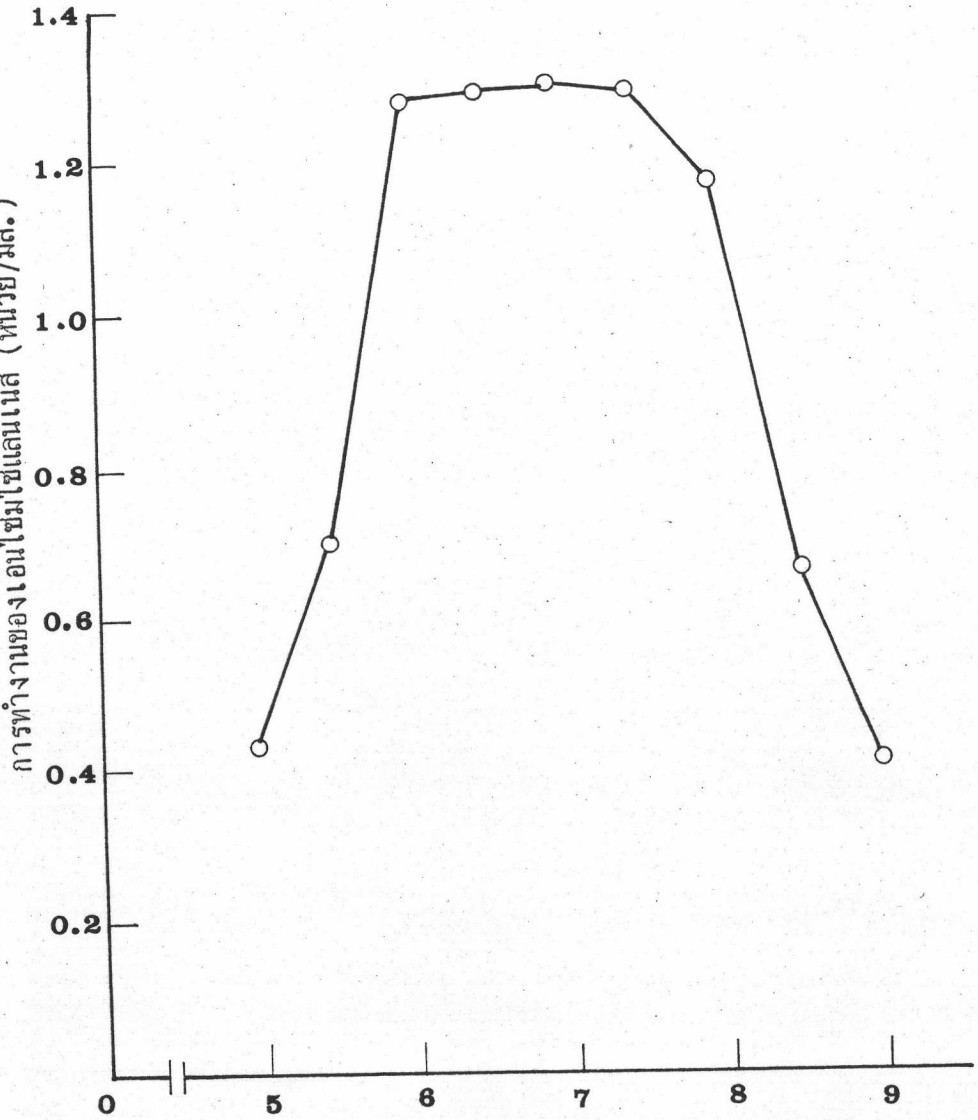


รูปที่ 13 ผลของการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9
เติมแคลเซียมคลอไรด์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังกล่าวใต้รูปที่ 12 แต่ผันแปรปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์ ดังระบุในรูป สภาวะการเลี้ยงเชื้อและการหาแอคติวิตีของไซแลนเนสดังกล่าวใต้รูปที่ 2

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 ผลของการเติมโคบอลท์คลอไรด์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9
เติมโคบอลท์คลอไรด์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังกล่าวใต้รูปที่ 13 แต่ไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์ และผันแปรปริมาณโคบอลท์คลอไรด์ดังระบุในรูปสภาวะการเลี้ยงเชื้อและการหาแอคติวิตีของไซแลนเนสดังกล่าวใต้รูปที่ 2



รูปที่ 15 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 5% กากรำข้าว 0.3% ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.002% เฟอรัสซัลเฟต 0.03% โปตัสเซียมคลอไรด์ ปรับสภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 5 ถึง 9 โดยใช้ 1 นอร์มัล 6 นอร์มัล กรดไฮโดรคลอริค และ 1 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ และการหาแอคติวิตีของไซแลนเนส ได้กล่าวภายใต้รูปที่ 2

8.2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

จากการเลี้ยงสเตรพโตมัยซีส สายพันธ์ 42-9 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 25-45 องศาเซลเซียส พบว่า จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 16

8.3 ผลของระยะเวลาต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9

พบว่า ปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนสที่สร้างขึ้นจะเพิ่มตามการเจริญของจุลินทรีย์ (growth associated) โดยที่การเจริญ (ซึ่งติดตามจากปริมาณของ DNA) และปริมาณไซแลนเนสสูงสุดในวันที่ 3 ของการบ่มเชื้อ ต่อจากนั้นจะคงที่ระยะหนึ่งและลดลงเล็กน้อยในวันที่ 7 ของการเจริญของเชื้อ เมื่อเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการตาย (death phase) ดังแสดงในรูปที่ 17

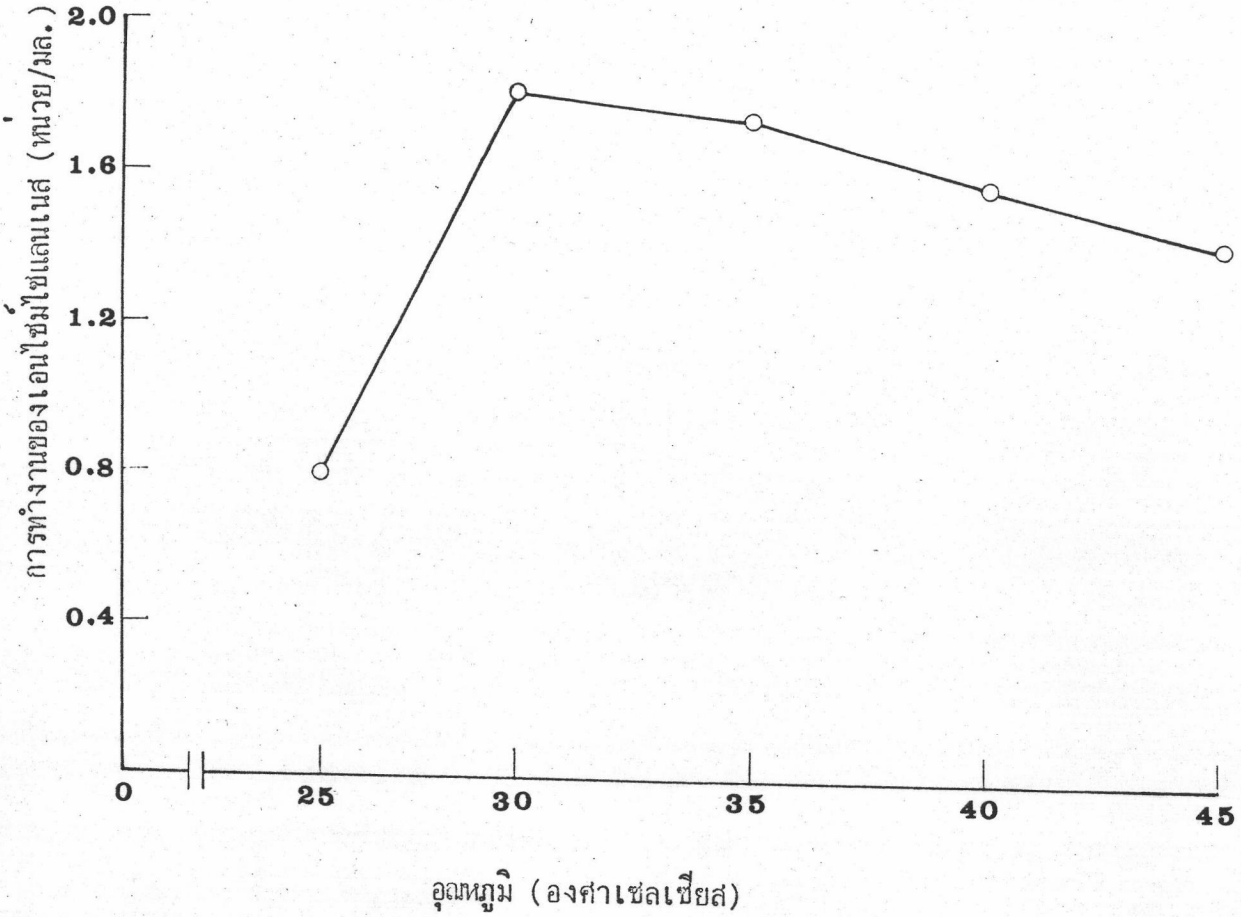
การตรวจหาแอคติวิตีของบีต้า-ไซโลสิเดส

มีรายงานหลายฉบับ กล่าวว่า จุลินทรีย์ที่ผลิตไซแลนเนสได้ สามารถผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลสิเดสได้เช่นกัน (4,6,13,14) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ตรวจสอบความสามารถในการผลิต บีต้า-ไซโลสิเดสของสเตรพโตมัยซีส สายพันธ์ 42-9 โดยติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์นี้เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน พบว่า สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 สามารถผลิตบีต้า-ไซโลสิเดสได้เช่นกัน โดยพบว่ามีปริมาณสูงสุดประมาณ 0.07 หน่วยต่อ มล. ในวันที่ 3 ของการเจริญของเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 18

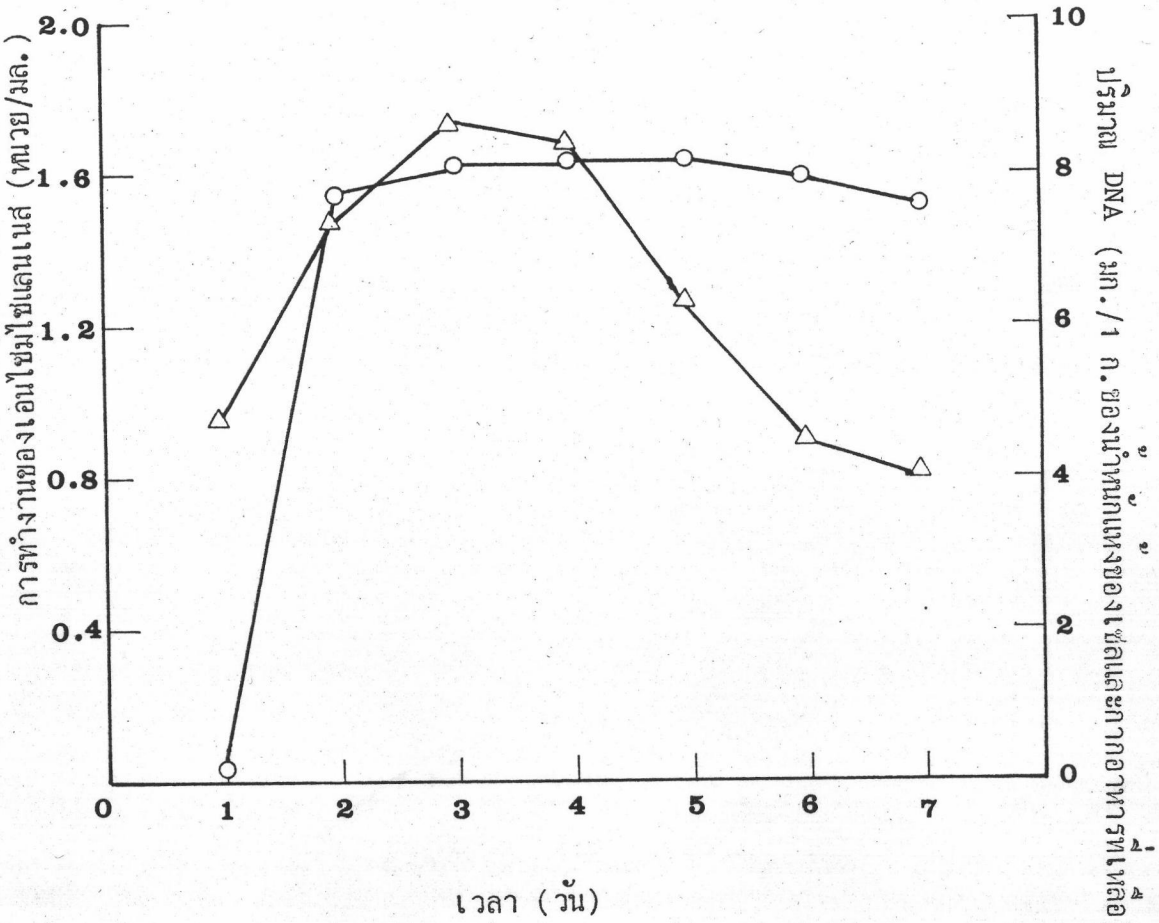
9. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไซแลนเนส

9.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส

ไซแลนเนสที่นำมาศึกษาสมบัติ เตรียมได้ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 6.2



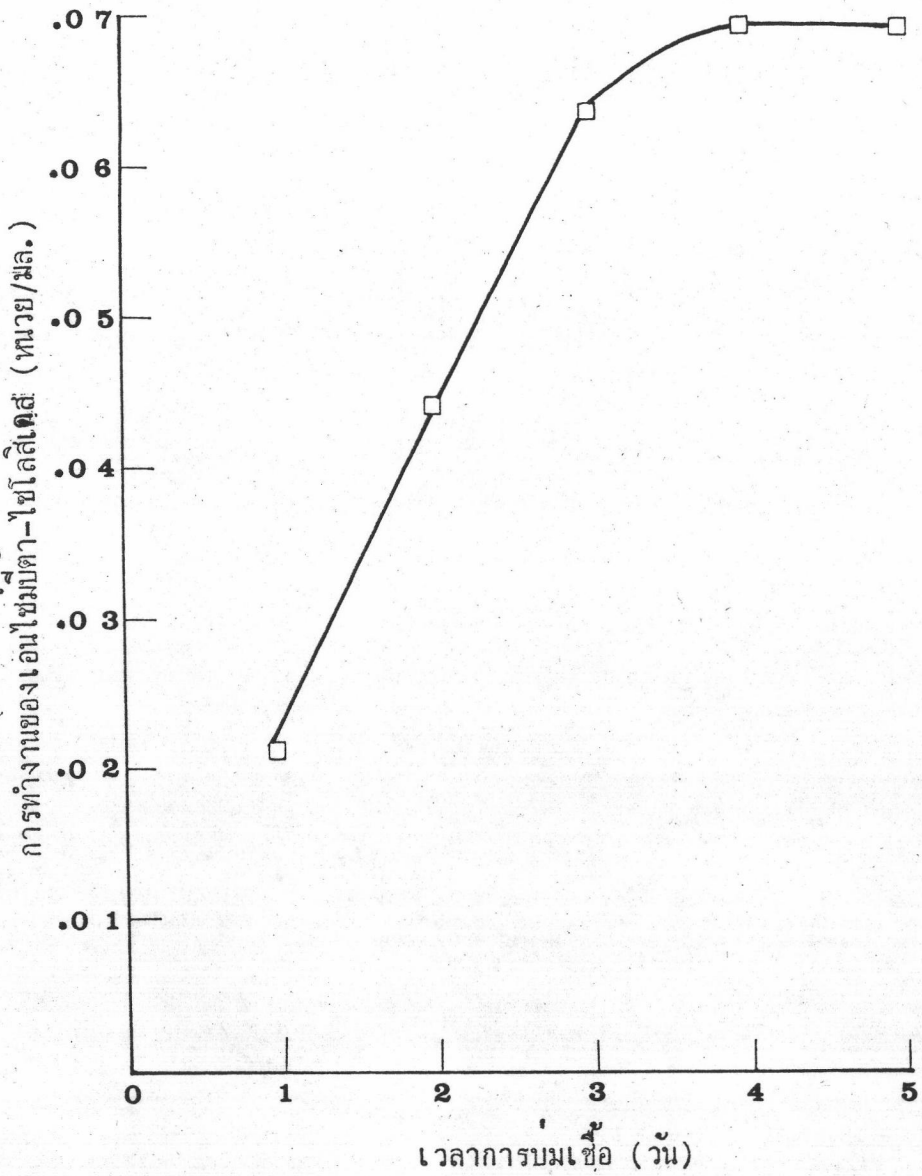
รูปที่ 16 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไซแลนเนสของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังกล่าวใต้รูปที่ 15 ยกเว้นปรับสภาวะความเป็นกรดด่างเบื้
สภาวะการเลี้ยงเชื้อและการหาแอคติวิตีของไซแลนเนสเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวใต้รูปที่ 2 ยกเว้นผันแปรอุณหภูมิที่บ่มเป็น 25-45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 17 ผลของระยะเวลาต่อการเจริญและการผลิตไซแลนเนส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบ สภาวะการเลี้ยงเชื้อ และการหาแอคติวิตีของไซแลนเนสดังกล่าวใต้รูปที่ 12 ยกเว้นไม่เติมแมงกานีสซัลเฟต และเก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ดังระบุในรูป

○——○ คือ การทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส

△——△ คือ ปริมาณ DNA



รูปที่ 18 ผลของระยะเวลาต่อการผลิตเอนไซม์บีต้า-ไซโลสิเดส โดยสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบและสภาวะดังกล่าวใต้รูปที่ 2 โดยเติม 1% ไซแลน เป็นแหล่งคาร์บอนและ 0.1% สารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ดังรูป และหาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 7 โดยวิธีการหาแอคติวิตีในข้อ 9

9.1.1 ผลของความเข้มข้นของไซแลนต่อการทำงานของไซแลนเนส

พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ที่เตรียมได้ปริมาณ 40 ไมโครกรัมของโปรตีนในปฏิกิริยาดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 8 เอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุดที่ความเข้มข้นของไซแลนตั้งแต่ 1,200 ไมโครกรัมต่อ มล.ขึ้นไป ดังแสดงในรูปที่ 19

9.1.2 การหาค่า Km ของเอนไซม์ไซแลนเนสสำหรับไซแลน

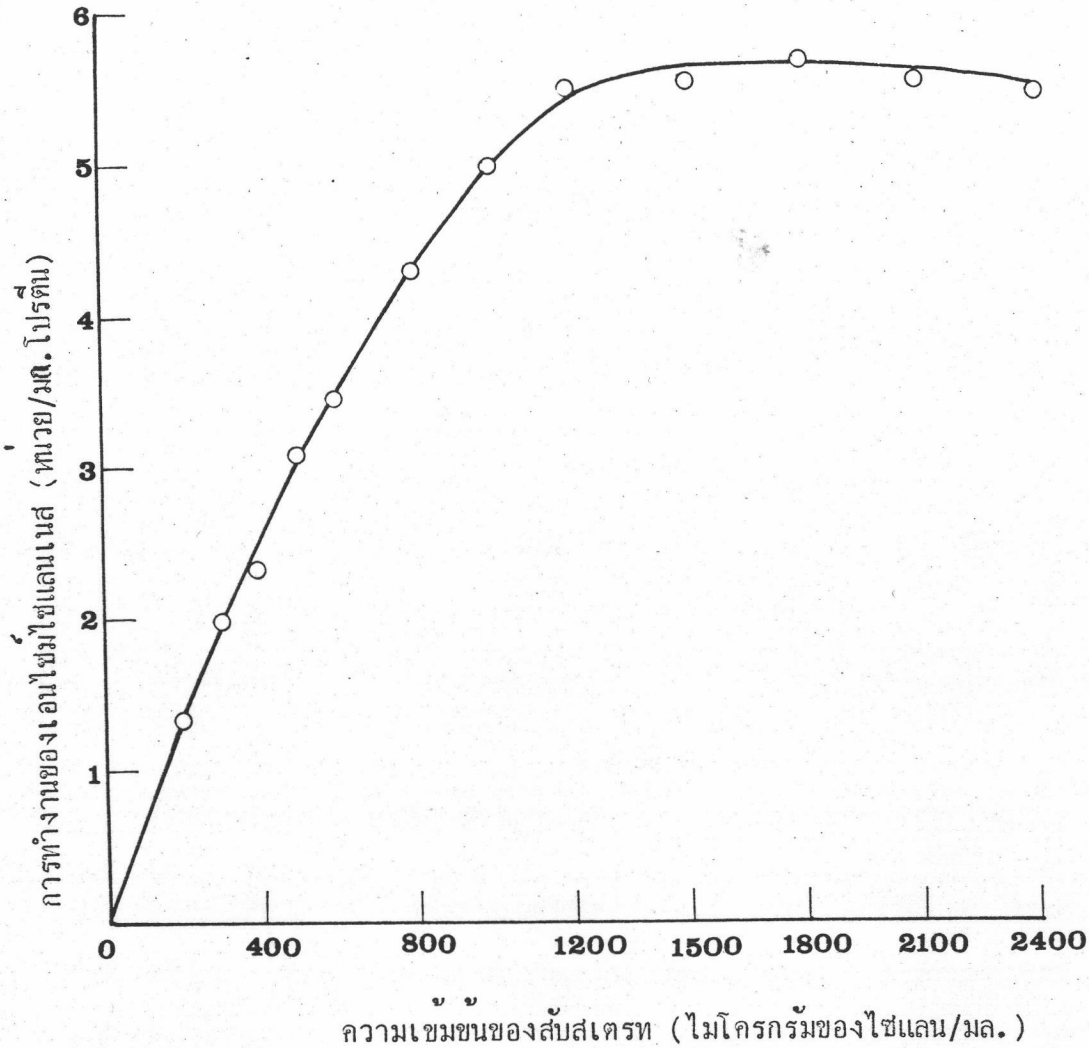
จากการนำผลการทดลองในข้อ 9.1.1 มาเขียนกราฟแบบไลน์วีเวอร์-เบิร์ด (Lineweaver-Burk plot) จะได้กราฟเส้นตรงดังรูปที่ 20 ซึ่งให้ค่า Km ของไซแลนเนสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 สำหรับไซแลนเท่ากับ 0.61 มก.ต่อ มล. ซึ่งจากรายงานของ Dekker และ Richards (10) กล่าวว่าค่า Km ของเอนไซม์ไซแลนเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ อยู่ในช่วง 0.27-14.0 มก. ของเฮมิเซลลูโลสต่อ มล. และ Nakajima และคณะ (13) พบว่าค่า Km ของไซแลนเนสของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ KT-23 มีค่าเท่ากับ 0.2 มก. ของไซแลนต่อ มล. อย่างไรก็ตามค่า Km ของไซแลนเนสที่ได้จากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 อยู่ในช่วงที่ไม่แตกต่างจากรายงานข้างต้น และอยู่ในเกณฑ์ต่ำจึงจัดว่ามีความจำเพาะต่อไซแลนค่อนข้างสูง

9.1.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส

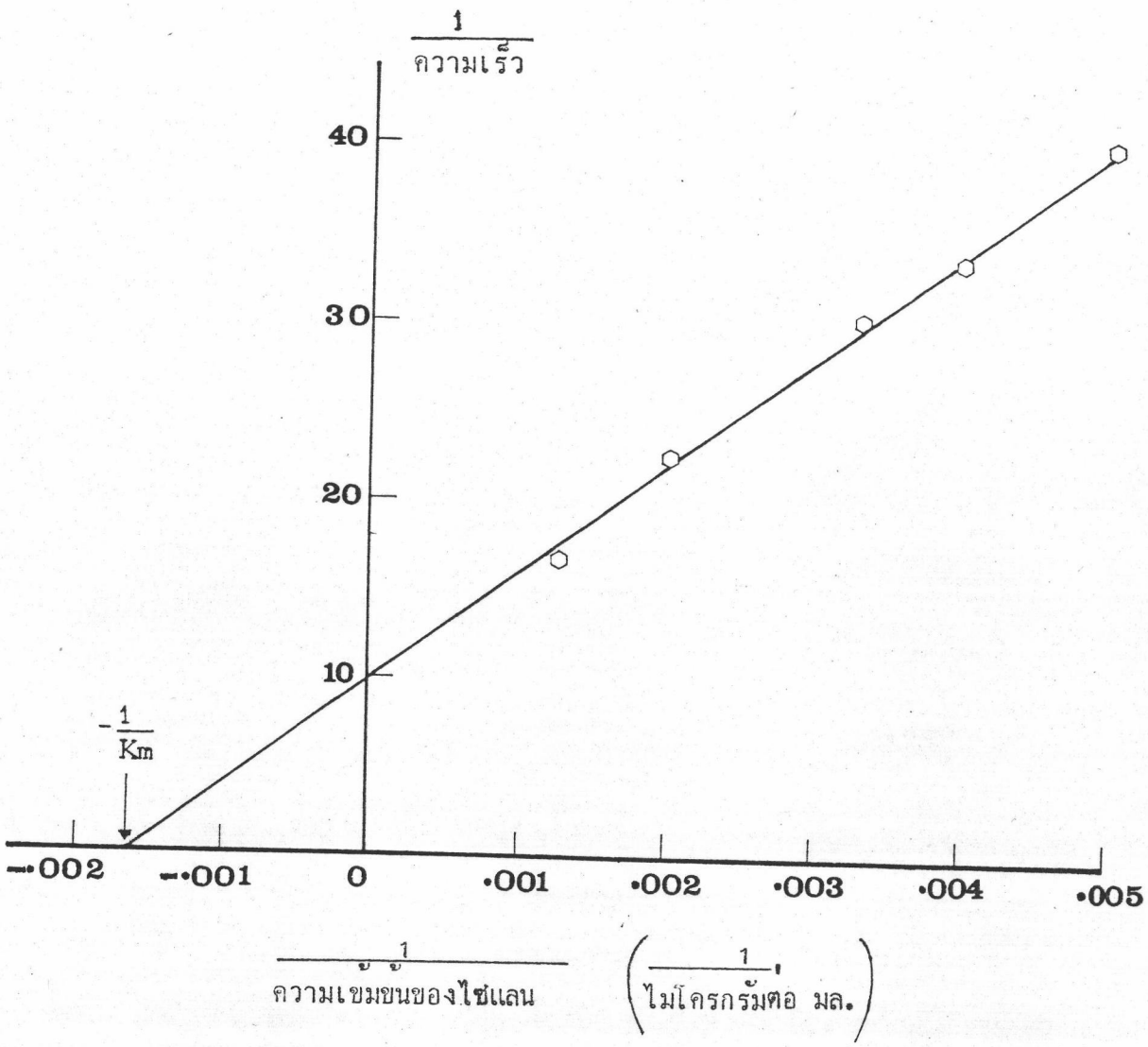
จากการผันแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มสารผสมของปฏิกิริยา พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทอยู่ในช่วงที่ค่อนข้างกว้างคือ 55-60 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 21

9.1.4 ผลของความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส

จากผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 22 พบว่า ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นี้คือ 6.0 แต่ที่ความเป็นกรดด่างต่ำกว่าหรือสูงกว่านี้จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว



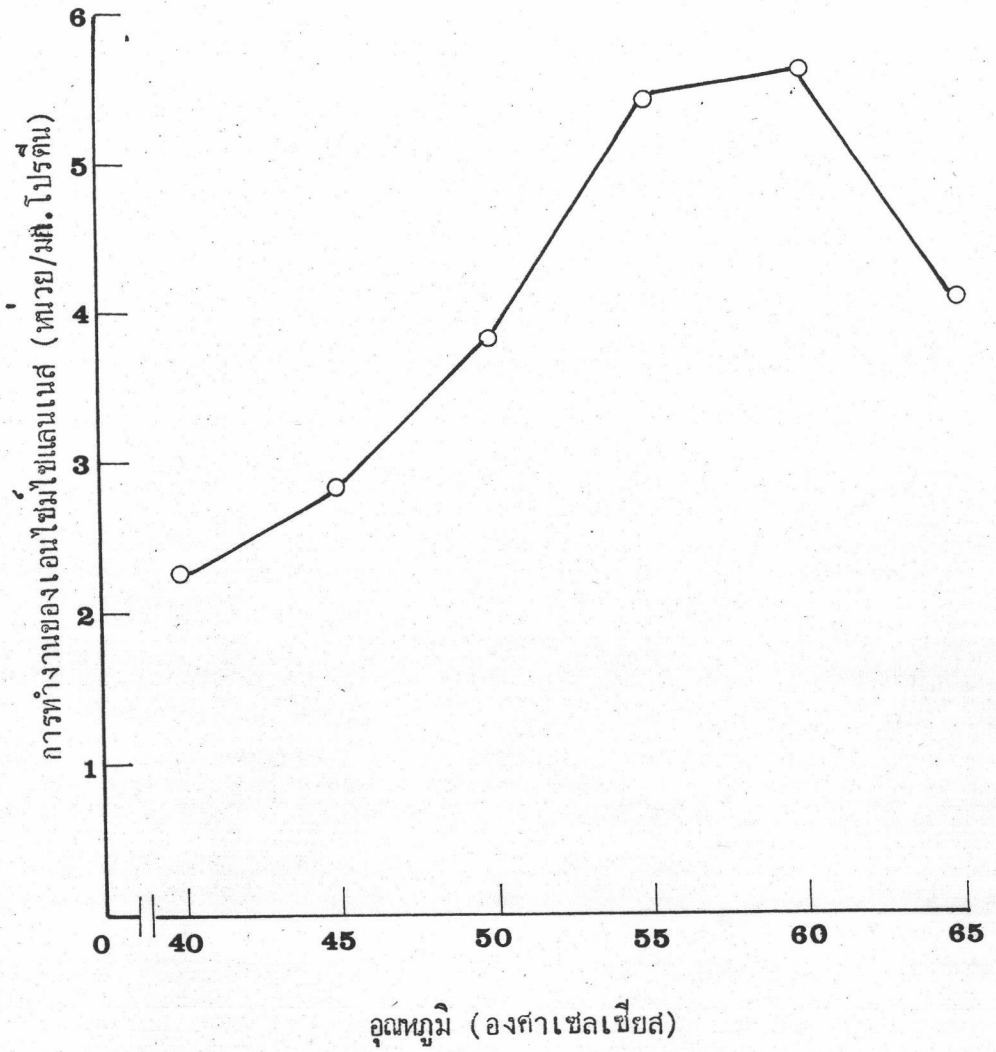
รูปที่ 19 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส ตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 8 ยกเว้นบมเอนไซม์ 40 ไมโครกรัมโปรตีนกับไซแลนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังระบุในรูป



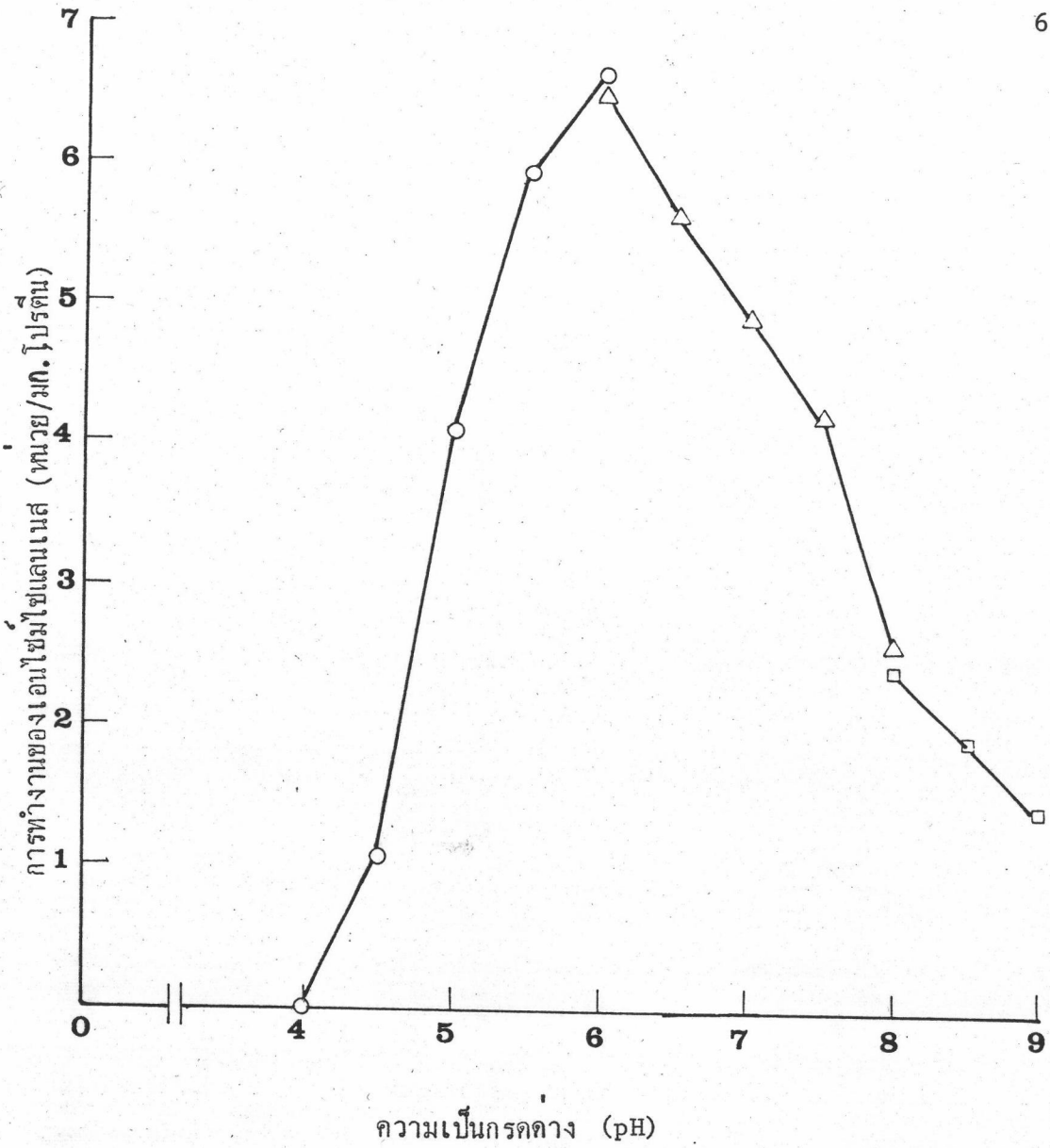
รูปที่ 20 การหาค่า Km โดยวิธีของ Lineweaver-Burk

นำผลการทดลองจากรูปที่ 19 มาหาค่า Km โดยการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk

หน่วยของความเร็ว คือ ไมโครกรัมของน้ำตาลรีดิวส์ต่อนาที



รูปที่ 21 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส. ตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 8 ยกเว้นบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็น 40 ไมโครกรัมโปรตีน กับไซแลน 1500 ไมโครกรัมต่อ มล. ของสารผสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังระบุในรูป



รูปที่ 22 ผลของความเป็นกรดด่าง (pH) ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส บัมเอนไซม์ 40 ไมโครกรัมโปรตีนกับไซแลน 1,500 ไมโครกรัมต่อ มล. ของสารผสมของปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 8 ยกเว้นใน 0.1 โมลาร์ของบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ดังระบุ

○——○ คือ อะซีเตท บัฟเฟอร์

△——△ คือ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์

□——□ คือ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์

9.2 ผลของชนิดและปริมาณของเกลือแร่ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส

จากการศึกษาผลของเมอคิวริคคลอไรด์ เฟอรัสซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ แมงกานีสซัลเฟต และโคบอลท์คลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส ดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่า เมอคิวริคคลอไรด์เป็นสารที่มีผลรุนแรงที่สุดต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส การทำงานของเอนไซม์จะลดลงตามความเข้มข้นของเมอคิวริคคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น สารที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์รองลงมาคือ เฟอรัสซัลเฟต ส่วนแมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต และโคบอลท์คลอไรด์ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า $1x10^{-3}$ โมลาร์ มีผลต่ำมากต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส ส่วนแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น $1x10^{-2}$-$1x10^{-4}$ โมลาร์ ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์นี้

9.3 ความเสถียรของเอนไซม์ไซแลนเนส

9.3.1 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

จากการตรวจสอบความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ พบว่าเอนไซม์นี้ค่อนข้างเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 55 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วและพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์จะลดลงถึง 63% และเอนไซม์จะสูญเสียความสามารถในการทำงานอย่างสิ้นเชิง ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 23

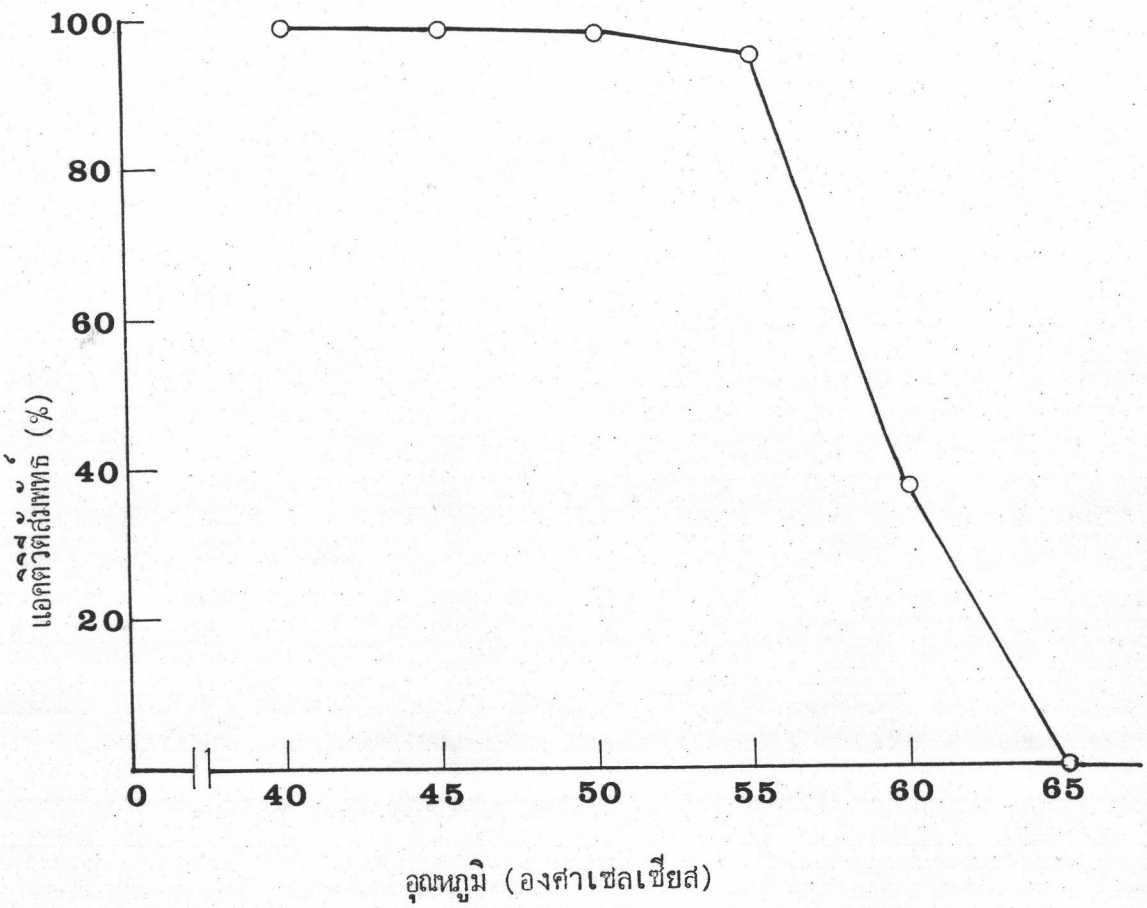
9.3.2 ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อความเสถียรของเอนไซม์ไซแลนเนส ดังแสดงในรูปที่ 24 พบว่า เอนไซม์นี้จะเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงที่ค่อนข้างกว้าง คือ ในระหว่างค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0-9.0 แต่ที่ความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5.0 เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว

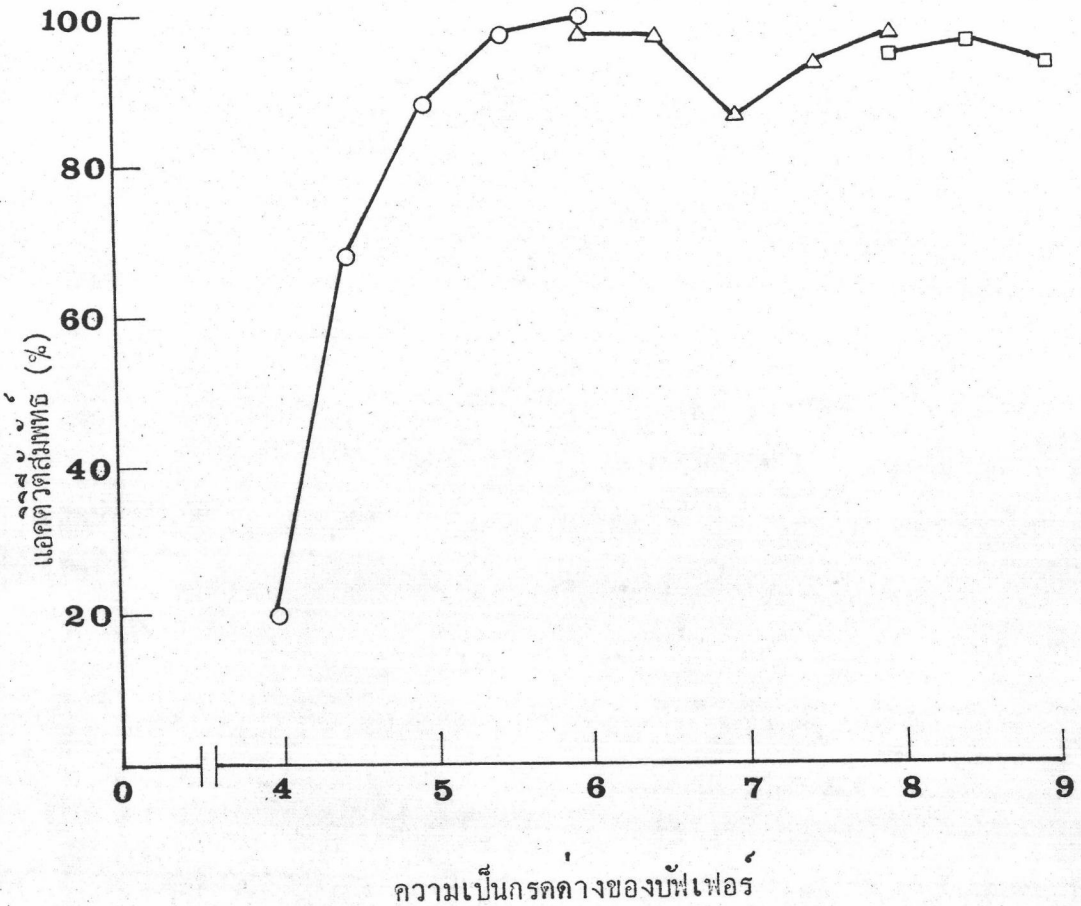
ตารางที่ 7 ผลของชนิดและปริมาณของเกลือแร่ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนส

ชนิดของเกลือแร่	ความเข้มข้น (โมลาร์)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%) *
เมอคิวริคคลอไรด์	$1x10^{-6}$	91
	$5x10^{-6}$	84
	$1x10^{-5}$	78
	$5x10^{-5}$	68
เฟอรัส ซัลเฟต	$1x10^{-4}$	85
	$1x10^{-3}$	60
	$1x10^{-2}$	33
แมกนีเซียม ซัลเฟต	$1x10^{-4}$	100
	$5x10^{-4}$	100
	$1x10^{-3}$	98
	$5x10^{-3}$	97
	$1x10^{-2}$	94
แคลเซียม คลอไรด์	$1x10^{-4}$	100
	$1x10^{-3}$	97
	$1x10^{-2}$	99
แมงกานีส ซัลเฟต	$1x10^{-4}$	98
	$1x10^{-3}$	96
	$1x10^{-2}$	91
โคบอลท์ คลอไรด์	$1x10^{-4}$	100
	$5x10^{-4}$	98
	$1x10^{-3}$	94
	$5x10^{-3}$	92
	$1x10^{-2}$	82

*แอคติวิตีสัมพัทธ์ คำนวณโดยให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ปราศจากเกลือแร่ที่จะทดสอบเป็น 100% การตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ทำเช่นเดียวกับที่บรรยายใต้รูปที่ 22 ยกเว้นใน 0.1 โมลาร์ ของอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 และไม่มีหรือมีเกลือแร่ต่าง ๆ ที่จะทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันดังระบุในตาราง



รูปที่ 23 ผลของความเสถียรของเอนไซม์ไซแลนเนสต่ออุณหภูมิ วิธีการทดลอง ทำดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 16.1 โดยเทียบให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100%



รูปที่ 24 ความเสถียรของเอนไซม์ไซแลนเนสต่อสภาวะความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ วิธีการทดลองทำดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 16.2 โดยเทียบให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100%

○——○ คือ อะซีเตท บัฟเฟอร์

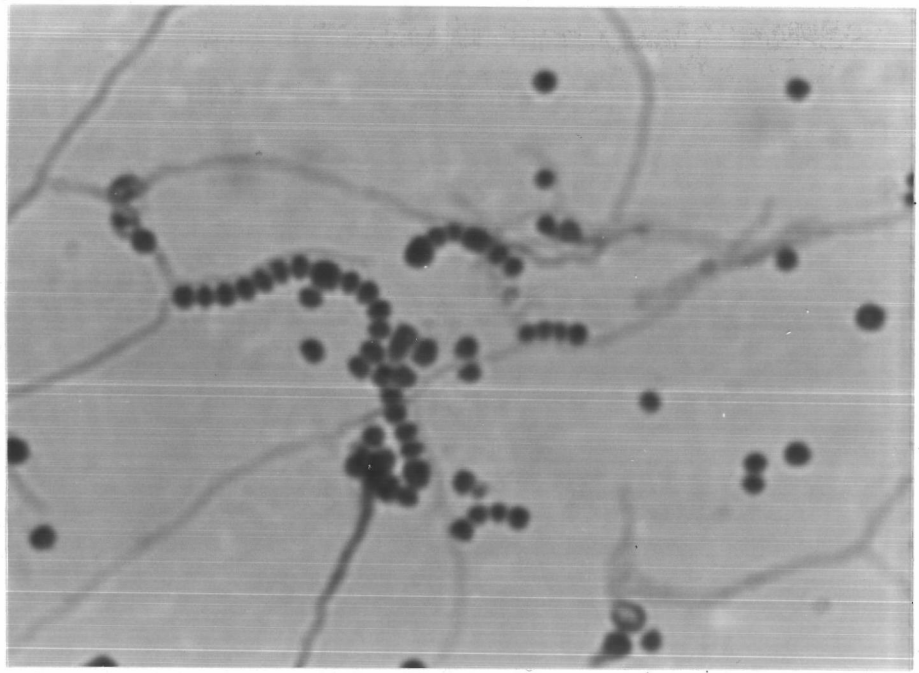
△——△ คือ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์

□——□ คือ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์

10. ผลการจัดหมวดหมู่ของ สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9

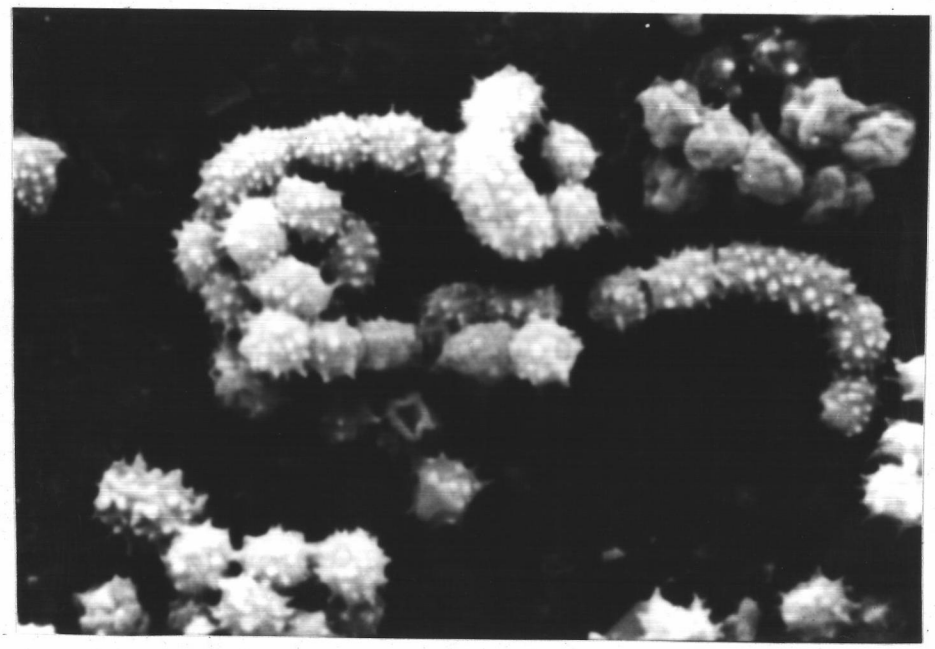
จากการศึกษาสมบัติของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 พบว่า สายใยอากาศ (aerial mycelium) มีลักษณะแตกแขนงค่อนข้างยาวและตรงที่ปลายของสายใยอากาศที่เจริญเต็มที่จะมีสปอร์สีเทา ด้านหลังของโคโลนีมีสีน้ำตาลอมเหลือง (yellow-brown) ซึ่งจากการศึกษาลักษณะของสายสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า สายสปอร์ยาวมีจำนวนสปอร์มากกว่า 10 สปอร์ต่อสาย ดังในรูปที่ 25 และจากการดูผิวสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่า ผิวสปอร์มีลักษณะเป็นหนาม (spiny) ดังในรูปที่ 26 สายใยอากาศที่เจริญเต็มที่มีสีขาวอมเทาเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด (ภาคผนวก ก. หมายเลข 1,4,10,11,12,13) ที่ใช้ในการศึกษาการจัดหมวดหมู่ มีการสร้างเมลานอยด์พิกเมนท์ในอาหารชนิด นิวเตรียนท์ เจลาติน บรอท (ภาคผนวก ก. หมายเลข 18) สามารถใช้น้ำตาล ดี-กลูโคส แอล-อราบิโนส ดี-ฟรักโทส ดี-ไซโลส เซลโลไบโอส มอลโทส กาแลคโทส และแมนโนสได้ดี และใช้ ดี-แมนนิทอล ซูโครส แรมโนส แรฟฟิโนส ได้บ้างเล็กน้อย แต่ไม่สามารถใช้แอล-อินโนซิทอลและซัลลิซินเป็นแหล่งการ์บอนไม่สามารถย่อยเจลาตินที่อุณหภูมิห้อง ไม่ตกตะกอนนมและไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรทได้ ลักษณะการเจริญ สัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 8,9 และ 10

จากผลการศึกษาลักษณะของเชื้อดังกล่าว พบว่า สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 มีลักษณะใกล้เคียงกับ Streptomyces craterifer ตามคำบรรยายของ Nonomura (52) แต่มีข้อแตกต่างคือ S.craterifer ไม่สร้างเมลานอยด์พิกเมนท์และสีที่ละลายน้ำได้ และใกล้เคียงกับ S.afghaniensis ตามหลักของ Bergey (45) แต่ S.afghaniensis มีสายใยอากาศสีเทา สายสปอร์เป็นเกลียว และไม่สร้างสีที่คล้ายเมลานินเสมอไป ดังนั้น อาจเป็นได้ว่า สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9 เป็น สเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่ได้จัดจำแนกไว้



รูปที่ 25 แสดงลักษณะของสายใยอากาศและสปอร์โดยกล้องจุลทรรศน์
(กำลังขยาย 1,000x3.52 เท่า)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 แสดงลักษณะของผิวสปอร์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน
(กำลังขยาย 10,000x1.94 เท่า)

ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9

ลักษณะ	
1. แบบของสายใยอากาศและสายสปอร์	เรคตัส เฟลคซิบิลิส สไปราเลส (Rectus Flexibilis, Spirales)
2. สัณฐานวิทยาของสปอร์และผิวสปอร์	ทรงกลม ผิวเป็นหนาม (spiny)
3. สีของสายใยอากาศ (Aerial mycelium)	ขาวอมเทา (White-Grey)
4. สีของสปอร์	เทา (Grey)
5. สีของสายใยสับสเตรท (Substrate mycelium)	น้ำตาลอมเหลือง (Yellow-Brown)
6. *ปฏิกิริยาต่อการเปลี่ยนระดับความเป็นกรดด่าง	
กรด	ไม่เปลี่ยนสี
ด่าง	ไม่เปลี่ยนสี

หมายเหตุ *ใช้ 0.05 N HCl และ 0.05 N NaOH หยดลงบนสายใยสับสเตรทแล้วดูการเปลี่ยนแปลงสี

ตารางที่ 9 ลักษณะสรีรวิทยา (Physiological charecteristics) ของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะสรีรวิทยา
1. อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ	28-30 องศาเซลเซียส
2. ระดับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเจริญ	pH 6-8
3. การสร้างรงควัตถุเมลานิน pigment)	ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นิวเตรียนท์ เจลาติน
4. การเจริญบนซาเพค อการ์ (Czapek's agar)	น้อยมาก
5. การทนเค็ม (NaCl tolerance)	มากกว่า 4% แต่น้อยกว่า 7%
6. การสร้างรงควัตถุละลายน้ำ pigment)	ในกลีเซอรอล แอสพาราจีน อการ์ และไทโรซีน อการ์
7. การรีดิวส์ไนเตรท	ไม่รีดิวส์ไนเตรท
8. การย่อยเจลาติน	ไม่ย่อยเจลาตินที่อุณหภูมิห้อง
9. การตกตะกอนนม	ไม่ตกตะกอนนม
10. การใช้สารแหล่งคาร์บอน*	
ดี-กลูโคส +++ ดี-ไซโลส ++ แรฟฟิโนส + มอลโทส +++	
ดี-แมนนิทอล + แอล-อราบิโนส +++ เซลโลไบโอส +++ ซัลลิซิน -	
แอล-อินโนซิทอล - ซูโครส + กาแลคโทส ++	
ดี-ฟรักโทส ++ แรมโนส + แมนโนส ++	

หมายเหตุ * +++ หมายถึง การเจริญของเชื้อดีมาก
++ " การเจริญของเชื้อดีปานกลาง
+ " การเจริญของเชื้อน้อย
- " ไม่มีการเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 10 ลักษณะการเจริญ (Culture characteristics) ของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 42-9

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญ	สีของสายใยอากาศ	การสร้างรงควัตถุละลายน้ำ
1. โอทมิลล์ อการ์	ดีมาก	ขาวอมเทา	-
2. ยีสต์เอกซ์แทรก-มอลท์เอกซ์แทรก อการ์	ไม่ดี	ไม่สร้างสายใยอากาศ	-
3. กลีเซอรอล แอสพาราจีน อการ์	ดี	ขาวอมเทา	สีเหลืองอ่อน
4. อินออร์แกนนิค ซอลท์ สตาร์ช อการ์	ดี	ขาวอมเทา	-
5. ไซแลน อการ์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 2)	ดี	ขาวอมเทา	-
6. ไรซ์ แบรน อการ์ (Rice bran agar) (ภาคผนวก ก. หมายเลข 2 แต่มีกากรำข้าว 1% เป็นแหล่งคาร์บอน)	ดี	ขาวอมเทา	-
7. ไทโรซีน อการ์	ดี	ขาวอมเทา	สีเหลืองอ่อน
8. สตาร์ช อการ์	น้อยมาก	ขาวอมเทา	-
9. ซ่าเพค อการ์	น้อยมาก	ขาว	-
10. นิวเตรียนท์ อการ์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 20)	ดี	ไม่สร้างสายใยอากาศ	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำ