บทที่ 2
ทบทวนเอกสาร

เฮมิเซลลูโลส เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิง อาหาร สารเคมี อีกทั้งยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญซึ่งจุลินทรีย์หลายชนิดนำไปใช้ได้ (Soltes, 1983) โดยทั่วไปมีการอยู่ร่วมกับเซลลูโลสและลิกนินในพืช (Araujo and Ward, 1990a) ตัวอย่างของเฮมิเซลลูโลสได้แก่ glucan, xylan, galactan, galacturonan และ mannan เราสามารถพบเฮมิเซลลูโลสเหล่านี้ได้จากเศษเหลือทิ้งของอุตสาหกรรมทางการเกษตร ในไม้เนื้ออ่อนในอุตสาหกรรมทำกระดาษเป็นต้น จากการไฮโดรไลซ์พืชจำพวก gymnosperm (softwood) จะพบ mannan มาก ส่วน angiosperm (hardwood) จะพบ xylan มาก

Mannan เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยmannoseต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 side chain เป็น galactose (Soltes, 1983) มีความสำคัญในอุตสาหกรรมมาก พบได้ในเมล็ดพืชต่างๆเช่น เมล็ดกาแฟ เมล็ดพืชตระกูลถั่ว หัวบุก (Ooi and Kikuchi, 1995) จากมะพร้าวที่เหลือจากการสกัดน้ำมันมะพร้าว (Itoh and Kamiyama, 1995) สาหร่ายทะเลบางชนิด (Tamaru *et al.*, 1997) จากต้น *Asparagus officinalis* (Goldberg *et al.*, 1991) โดยทั่วไปตามธรรมชาติจะพบ mannan บริสุทธิ์ยาก แต่มักพบอยู่ร่วมกับสารอื่นเช่น galactose หรือ glucose เป็นต้น (Yalpani, 1988) mannan แบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้

1. Galactomannan โครงสร้างหลักประกอบด้วยน้ำตาล mannose ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ตัวอย่างเช่น ivory nut mannan, guar gum, locust bean gum และ arabic gum เป็นต้น

ivory nut mannan ได้จาก ivory nut ซึ่งเป็นเมล็ดถั่วแห้ง ต้นคล้ายปาล์ม พบในเขต tropical forest ของอเมริกาใต้ ไม่ใช้รับประทาน สามารถนำเมล็ดมาแกะสลักได้ โครงสร้างของ mannan ประเภทนี้ประกอบด้วย mannose ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ส่วนปลายจะมี galactose เกาะอยู่ ซึ่งมีประโยชน์ทางอุตสาหกรรมมาก เพราะมีคุณสมบัติคล้ายเจล

guar gum หรือ guaran ได้จาก guar seed มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 220,000 ดาลตัน

locust bean gum ได้จาก endosperm ของ Carob หรือ locust seed (*Ceratonia siliqua*) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 330,000 ดาลตัน มีลักษณะสีขาวถึงขาวเหลือง ไม่มีสีไม่มีกลิ่น สามารถละลายน้ำได้ ในสมัยก่อนคริสตกาลชาวอียิปต์ได้ใช้ประโยชน์จาก locust bean gum ในการทำมัมมี่ โดยใช้เป็นตัวเชื่อมประสาน ในปัจจุบันใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆมากมายเช่น ในอาหารแช่แข็ง

ไอสครีม เนย ซอส เยลลี่ อาหารสัตว์ หรือใช้เป็นตัวยึดเกาะในการทำ wall paper (Thomas, 1998)

arabic gum ได้จาก exudate ของต้น *Acacia* sp. มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 580,000 ดาลตัน

อัตราส่วนระหว่าง mannose กับ galactose ที่ได้จากแหล่งต่างๆจะแตกต่างกันออกไป โดย guar gum จะมีอัตราส่วนเป็น 2:1 ถ้าเป็น locust bean gum จะมีอัตราส่วน 3:1

2. Glucomannan โครงสร้างหลักเป็นน้ำตาล mannose กับ glucose ต่อกัน พบได้ในเปลือกไม้ประเภทสน หัวบุก *Asparagus officinalis* มีความสามารถในการกระเด้งได้ดี (bounce) มีคุณสมบัติในการเป็นเจลดีกว่า galactomannan

(Gal) - M - M - M - M - M - A - Ivory nut mannan

- M - M - M - M - M - M - B - Galactomannans
| |
Gal Gal

- G - M - G - M - M - M - G - C - Glucomannans
| |
(Ac) (Ac)

- G - M - G - M - M - M - G - D- Galactoglucomannans
| | | |
Gal Ac Gal Ac

M = β(1-4) linked D-mannopyranosyl units

G = β(1-4) linked D-glucopyranosyl units

Ac = Acetyl

Gal = D-galactopyranosyl units

ภาพ 1 โครงสร้างของ mannan ชนิดต่างๆ (Yalpani, 1988)

mannanase (1,4-β-D-mannan mannanohydrolase; EC 3.2.1.78) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์ β-1,4 mannose ของ β-mannan พบในพืชบางชนิดขณะงอก มีประโยชน์หลายอย่างเช่น ใช้ในการสกัดน้ำมันพืชออกจากเมล็ดพืชตระกูลถั่ว ช่วยลดความหนืดในระหว่างการทำกาแฟผงสำเร็จรูป (Marga *et al.*, 1996) ป้องกันการขุ่นของไวน์องุ่น (Firantas *et al.*, 1982) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมกระดาษ การทำกระดาษมีมานานกว่า 100 ปีแล้วและมีการพัฒนามาเรื่อยๆ ความต้องการกระดาษมีมากกว่า 100 ล้านตันต่อปี ในการทำกระดาษจำเป็นจะต้องกำจัด lignin ออกเพื่อให้กระดาษมีความขาวสามารถทำได้โดยใช้สารละลายของ Na_2S/NaOH ที่อุณหภูมิ 170°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กระดาษที่กำจัด lignin ออกโดยวิธีนี้แล้วยังคงมีสีน้ำตาลของ lignin ที่ตกค้างอยู่ประมาณ 10 % นั่นคือเป็น lignin ที่เกาะติดกับ hemicellulose อยู่ด้วยพันธะ covalent จึงจำเป็นจะต้องฟอกกระดาษให้ขาว (bleaching) ด้วย chlorine, hypochlorite, chlorine dioxide, oxygen และ hydrogenperoxide จะเห็นได้ว่าขั้นตอนทำกระดาษที่ทำให้สามารถใช้ได้อยู่ทุกวันนี้ ผ่านขั้นตอนของการใช้สารที่ก่อให้เกิดมลภาวะมากมาย และต้องกำจัดของเสียเหล่านี้ก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมซึ่งต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก (Moo-Young, 1985) จึงมีการพัฒนาวิธีใหม่ๆแทนการใช้สารเคมีเหล่านี้ วิธีการใช้เอนไซม์จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจ Underwood and Brumer (1997) จึงใช้ mannanase จาก *Phanerochaete chrysosporium* ซึ่งเป็น white rot fungus มาแยก cellulose, hemicellulose และ lignin ที่มีอยู่ใน softwood ที่จะมาทำกระดาษออกจากกัน ขั้นตอนเหล่านี้อยู่ในระหว่างการทดลอง

การศึกษา mannanase จากแบคทีเรีย

Ratto and Poutanen (1988) ศึกษาจุลินทรีย์ 4 ชนิดที่สามารถผลิต mannanase ได้คือ *Bacillus subtilis* ATCC 12711, *Streptomyces olivochromogenes*, *Aspergillus awamori* VTT-D-75028 และ *Trichoderma reesei* QM9414 พบว่า *Bacillus subtilis* สามารถผลิต mannanase ได้สูงสุดเท่ากับ 268 nkat/ml (katal หรือ kat คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้น 1 mole ให้เป็นผลิตผลได้ภายในเวลา 1 วินาทีในสภาวะมาตรฐาน) เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย wheat bran 30 g/l และ locust bean gum 5 g/l แต่เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อชนิดนี้ไม่สามารถตรวจวัดการทำงานของ β-mannosidase และ α-galactosidase ได้ ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสับสเตรทไม่พบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

Araujo and Ward (1990b)ได้คัดเลือก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่างๆและสปีชีส์ต่างๆที่สามารถผลิต mannanase, β-mannosidase และ galactanaseได้พบว่า *B. Subtilis* NRRL356 ผลิต mannanase ได้มากที่สุดคือเท่ากับ 106.2 U/ml แต่ให้ β-mannosidase และ galactanase ต่ำ แหล่ง

คาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆมีผลต่อการผลิต mannanase และ galactanase ของ *B. brevis* ATCC 8186, *B. licheniformis* ATCC 27811, *B. polymyxa* NRRL842 และ *B. subtilis* NRRL356 จึงได้ศึกษา 4 เชื้อนี้ พบว่า locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน *B. subtilis* NRRL356 *Bacillus* ทั้ง 4 ชนิดนี้จะสร้าง β-mannosidase ได้โดยการชักนำของ locust bean gum และมี galactose เป็นตัวชักนำในการผลิต galactanase การผลิต galactanase ได้มากต้องใช้ sodium nitrate เป็นแหล่งไนโตรเจน mannanase จาก *B. brevis, B. licheniformis, B. polymyxa* และ *B.subtilis* ยังคงสภาพอยู่ได้ 100% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 65 $^{\circ}$C, 56 $^{\circ}$C และ 55 $^{\circ}$C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่วน galactanase ยังคงสภาพอยู่ได้ 95 % เมื่อบ่มที่ 55 $^{\circ}$C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง pH ที่เหมาะสมสำหรับ mannanase อยู่ในช่วง 6.5-6.8 galactanase จาก *B. brevis* มี pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 5.1 ส่วน galactanase จาก *B. polymyxa* มี pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0

Dong *et al.* (1991) ได้แยกแอนแอโรบิคแบคทีเรียที่มีสปอร์และสามารถย่อยสลาย galactomannan ได้ใน methanogenic granular sludge จากถังหมักซึ่งใช้ในการกำจัดน้ำเสียจากโรงงานทำน้ำตาล เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าเป็น *Clostridium butyricum* ผลิตภัณฑ์ที่ได้ภายหลังการย่อยประกอบด้วย acetate, butyrate, hydrogen, formate และ CO_2 เชื้อตัวนี้สามารถผลิต endo-mannanase, exo-mannanase และ α-galactosidase ได้ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วย galactomannan เชื้อจะผลิต mannanase ได้ แต่จะไม่ผลิต mannanase เมื่อเลี้ยงใน glucose, galactose หรือ mannose

Mendosa *et al.* (1992) ได้แยกแบคทีเรียที่ย่อยสลาย mannan จากดินในประเทศฟิลิปปินส์บริเวณที่มีการทำอุตสาหกรรมเกี่ยวกับมะพร้าวอยู่ พบว่ามีแบคทีเรีย 7 ไอโซเลทจาก 46 ไอโซเลทที่ให้ mannanase สูงโดยสังเกตจากการเกิด clear zone บน mannan agar แล้วคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถย่อยสลาย coconut meat residue และ locust bean mannan ได้ดีที่สุดพบว่าไอโซเลทนั้นคือ *Bacillus subtilis* สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่อุณหภูมิ 50-55 $^{\circ}$C pH 5-6 โดยจะให้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็น mannose

Arcand *et al.* (1993) ศึกษายีนที่ code สำหรับ β-mannanase จาก *Streptomyces lividans* และ DNA sequence พบว่า β-mannanase จาก clone *Streptomyces lividans* IAF36 เมื่อเลี้ยงใน mineral salt medium ที่มี galactomannan เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเอนไซม์มี molecular mass เท่ากับ 36 kDa (kilo Dalton) และมี specific activity เท่ากับ 876 i.u./mg of protein สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 58 $^{\circ}$C ที่ pH 6.8 มีค่า Vmax (maximum velocity) เท่ากับ 205 U/mg และมีค่า Km (Michalelis constant) เท่ากับ 0.77 mg/ml และจากการทำ SDS/PAGE และ Western blotting พบว่าเชื้อนี้เป็น wild-type strain

Mendosa *et al.* (1994a) ได้แยก *Bacillus subtilis* NM-39 ได้ จากดินในประเทศฟิลิปปินส์ บริเวณที่มีการทำอุตสาหกรรมเกี่ยวกับมะพร้าวโดยวิธี enrichment technique และโดยวิธีการดูวงใส จากการย่อย mannan บนอาหารแข็ง pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นี้เท่ากับ 5.0-6.0 และ 50 °C-60 °C ตามลำดับ เชื้อชนิดนี้จะผลิต mannanase ได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงใน liquid mineral salt medium ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนเป็น coconut residue และแหล่งไนโตรเจนเป็นแป้งถั่วเหลืองอย่างละ 1%(w/v) ที่ pH 7.0 ในสภาวะ aerobic ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 28 ชั่วโมง โดยมีค่า enzyme activity เท่ากับ 8.8 U/ml

Marga *et al.* (1996) สามารถเพิ่มการผลิต mannanase ได้โดยใส่ β-mannanase gene จาก *Streptomyces lividans* (pIAF 36) ไปใน *Escherichiai coli* (pTZ 19) พบว่าสามารถผลิต mannanase ได้มากกว่าเดิม 15 เท่าและมากกว่า wild-type strain *S. lividans* 1326 ถึง 350 เท่า

El-Helow *et al.* (1997) ศึกษา *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากเศษวัสดุทางการเกษตร พบว่าเมื่อใช้ wheat bran 35 g/l เป็นสับสเตรทหลักร่วมกับ palm seed powder 10 g/l จะเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิต mannanase โดยมี enzyme activity 102 U/ml และมี specific activity 59.3 U/mg

การศึกษา mannanase จากฟังไจ

วรางคณา (2539) ได้แยกเชื้อโดยใช้อาหารเหลวเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณที่มี locust bean gum 1%(w/v) และคัดเลือกเชื้อราที่ผลิต mannanase โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตmannanase ที่มี locust bean gum 1%(w/v) pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีพบเชื้อราที่ผลิต mannanase ได้ 27 ไอโซเลท เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Miller และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้สารละลาย coomassie พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากดินบริเวณน้ำตกผาลาดอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย ไอโซเลท KM-1 มีการทำงานของเอนไซม์และ specific activityได้ดีที่สุดเท่ากับ 3.3 U/ml และ 97.4U/mg ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าเป็น *Talaromyces* sp. ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ locust bean gum 1.5% (w/v) แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ corn steep solid ร่วมกับ $NaNO_3$ 0.1 และ 0.2% (w/v) ตามลำดับที่ pH 5.5 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่อุณหภูมิ 55 °C pH 5.5 เป็นเวลา 15 นาที โดยมีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 6.0 U/ml และมี specific activity เท่ากับ 261.5 U/mg

อนุวัฒน์ (2541) ได้แยกเอนโดไฟติคฟังไจจากส่วนต่างๆของต้นก่อที่เก็บได้จากอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุยได้ 142 ไอโซเลทแล้วคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิต mannanase โดยวิธี gel diffusion assay คัดเลือกเชื้อที่ให้วงใสที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1.5 เซนติเมตร ได้ 20 ไอโซเลทแล้วนำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้วมาหมักใน cultivation medium ที่ประกอบด้วย locust bean gum 1% (w/v) หรือ coconut residue 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิห้องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 วัน นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย DNS reagent แล้วหาปริมาณโปรตีนด้วย Lowry method พบว่า เอนโดไฟติกฟังไจไอโซเลท 120 ใช้ locust bean gum ได้ดีมีการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 8.2 U/ml และมี specific activity เท่ากับ 132.4 U/mg ไอโซเลท 127 สามารถใช้ coconut residue ได้ดีมีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 5.7 U/ml มี specific activity เท่ากับ 103.8 U/mg เมื่อตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลท 120 และ 127 พบว่าทั้งสองไอโซเลทเป็นพวกที่ไม่มีโครงสร้างสืบพันธุ์จึงจัดไว้ใน mycelia sterilia group

Araujo and Ward (1990a) ได้ศึกษา mannanase และ galactanase จาก thermophilic fungi 8 ชนิดคือ *Talaromyces byssochlamydoides* NRRL 3658, *Talaromyces emersonii* NRRL 3221, *Talaromyces emersonii* ATCC 18080, *Thielavia terrestris* NRRL 8126, *Thielavia terrestris* ATCC 26917, *Thermoascus aurantiacus* ATCC 26904, *Thermoascus aurantiacus* ATCC 28082 และ *Sporotricum cellulophilum* ATCC 24093 พบว่า *Talaromyces byssochlamydoides* และ *Talaromyces emersonii* ผลิต mannanase ได้มากที่สุด เชื้อทุกตัวสามารถถูกชักนำให้ผลิต mannanase ได้โดย locust bean gum ยกเว้น *Thermoascus aurantiacus* จะถูกชักนำด้วย mannose ส่วน locust bean gum เป็นตัวชักนำให้เกิดการผลิต galactanase และ β-mannosidase ยกเว้น *T. emersonii* จะถูกชักนำด้วย galactose *Talaromyces* สามารถผลิต mannanase ได้มากที่สุดเมื่อใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนส่วน *Thielavia terrestris* และ *T. aurantiacus* จะให้ mannanase ได้มากเมื่อใช้ sodium nitrate เป็นแหล่งไนโตรเจน pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ mannanase จาก thermophilic fungi ทั้ง 8 ชนิดนี้อยู่ในช่วง 5.0-6.6 ส่วน galactanase มี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.3-5.8 mannanase จาก *T. emersonii* และ galactanase จาก *T. terrestris* มีความคงทนที่สุดคือ 100% ที่อุณหภูมิ 60°C 3 ชั่วโมง

Johnson (1990) ได้ศึกษา exocellular β-mannan และ xylan-degrading enzyme จาก wood rotting fungi 8 ชนิดคือ *Coriolus versicolor* NRCC 5906, *Haematosterium sanguinolentum* NRCC 5902, *Glionatix trabeum* NRCC 5907, *Lenzites saepiaria* NRCC 5910, *Polyporus versicolor* NRCC 5909, *Poria placenta* NRCC 5909, *Schizophyllum commune* NRCC 5911 และ *Trichocladium candense* NRCC 5903 ทุกสายพันธุ์สามารถผลิต β-mannanase, endoxylanase และ

acethylxylan esterase ได้ มีบางชนิดสามารถผลิต L-α-arabinosidase และ 4-o-methylglucuronidase ส่วน β-mannosidase ไม่มีเชื้อใดสามารถผลิตได้ *Schizophylum commune* และ *Polyporus versicolor* ผลิต β-mannanase และ endoxylanase ได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร Avicel-supplemented media β-mannanase จาก *Linzites saepira* และ *S. commune* สามารถย่อย glucomannan และ galactomannan ได้ ส่วน β-mannanase จาก *P. versicolor* ย่อย glucomannan ได้ แต่ไม่ย่อย guar gum galactomannan

Arisan-Atac *et al.* (1993) ได้ศึกษาการผลิต β-mannanase จาก *Trichoderma reesii* จากการใช้คาร์บอนชนิดต่างๆพบว่า เชื้อนี้สามารถผลิต β-mannanase ได้มากที่สุดเมื่อใช้ cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนแต่ถ้าใช้แป้งบุก หรือ locust bean gum จะให้เอนไซม์ต่ำกว่า จากการศึกษาเอนไซม์นี้โดย chromato-focusing และ anion exchange fast protein liquid chromatography พบว่าเอนไซม์นี้มี molecular mass เท่ากับ 46 kDa isoelectric point เท่ากับ 5.2 pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 2.5-7.0 แต่ที่เหมาะสมที่สุดคือที่ pH 5.0 ทนความร้อนได้นาน 60 นาทีที่อุณหภูมิ 55 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่อุณหภูมิ 75 °C เมื่อใช้เอนไซม์นี้ย่อย locust bean gum จะให้ผลผลิตเป็น trisaccharide และ disaccharide

Ghareib and Nour-el-Dein (1994) กล่าวว่า *Aspergillus carbonarius* สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลาย cell wall ของจุลินทรีย์ได้ เอนไซม์ที่มีผลต่อเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่และ heat-treated cell ของแบคทีเรียบางชนิดและยีสต์บางชนิด โดยสาร โพลีเมอร์ใน cell wall ของจุลินทรีย์เหล่านั้นจะถูกย่อยสลาย เอนไซม์นี้ประกอบด้วย endo-1,3-beta-glucanase, mannanase และ protease ซึ่งทำงานได้ดีที่ pH 7.2 อุณหภูมิ 35 °C

Oda and Tonomura (1996) ศึกษา β-mannanase และ β-mannosidase จาก *Trichosporon cutaneum* JCM 2947 พบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 49900 และ 114000 เมื่อใช้วิธี SDS-PAGE แต่เมื่อใช้วิธี gel filtration พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 4500 และ 193000 β-mannanase มีค่า Km และ Vmax เท่ากับ 0.25 mmol/l และ 91.7 U/mg of protein เมื่อใช้ p-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 40 °C

การศึกษา mannanase จากพืช

Wozniewski *et al.* (1992) พบว่าหัวของ *Lilium testaceum* มี beta-1,4-glucomannan สะสมอยู่มากโดยมีอัตราส่วนของ mannose กับ glucose เป็น 7 ต่อ 3 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 230,000 เมื่อมีการเจริญจะมีการปล่อยเอนไซม์หลายชนิดออกมาได้แก่ α-amylase, α-glucosodase, β-

glucosidase β-mannosidase และ endo-β-mannanase เมื่อแยกเอา β-mannanase มาศึกษาพบว่าจะทำงานได้ดีที่ pH 4.5 ที่อุณหภูมิ 40 $^{\circ}$C มีน้ำหนักโมเลกุล 33,000

การศึกษา mannanase จากสัตว์

Kudo (1992) พบว่าใน fertilization envelope ของไข่ปลา *Salmo gairdneri* ประกอบด้วย mannanase, cellulase, chitinase, xylanase, dextranase, protease และ lysozyme ทำหน้าที่ป้องกันตัวอ่อนของปลาจากฟังไจ *Saprolignia parasitica*

Yamaura and Matsumoto (1993) ศึกษา endo-1,4-β-D-mannanase จาก mud snail *Pomacea insularus* (de Ordigny) พบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 44,000 เอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีใน pH ช่วงกว้างตั้งแต่ 5.0 ถึง 10.5 โดยที่ pH 5.5 จะมีค่าการทำงานได้ดีที่สุด และเอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งได้ด้วย Ag^{+}, Hg^{2+}, Cu^{2+} และ dithiothreitol ที่ความเข้มข้น 1 mM และถ้ามี N-bromosuccinimide จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้อย่างสมบูรณ์

วิธีการหาปริมาณ mannanase

Downie *et al.* (1994) ได้ใช้วิธี gel diffusion assay ในการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตและวัดปริมาณ endo-β-D-mannanase ได้ สามารถวัดปริมาณ mannanase ได้ตั้งแต่ 0.07 pkatal ถึง 14 nkat วิธีการทำจะใช้สี Congo red ย้อมเจลที่มีการย่อยสลายระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทในเจลซึ่งประกอบด้วย Phyta gel 0.7%(w/v) และ galactomannan 0.1%(w/v) โดยละลายใน citrate 0.1 M /phosphate 0.2 M buffer ซึ่งวิธีนี้เหมาะสำหรับการหาเอนไซม์ที่ได้จากเมล็ดพืช ผลไม้ หัวพืช และฟังไจโดยให้ผลใกล้เคียงกับวิธี viscometric assay

Fulop and Ponyi (1997) พบว่าการย้อม carboxymethylcellulose และ locust bean gum galactomannan ด้วย Ramazol Brilliant Blue R จะเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการตรวจวัด endo-1,4-glucanase และ endo-β-1,4-D-mannanase เมื่อทดสอบกับ *Cellulomonas* sp. CelB7 library ที่มียีนสำหรับ cellulolytic enzyme และ hemicellulolytic enzyme จะพบวงใส วิธีนี้มีประสิทธิภาพดีเมื่อเทียบกับวิธีที่ใช้ spectrophotometer

Araujo and Ward (1990a) ได้ศึกษาการทำงานของ mannanase, galactanase และ β-mannosidase ดังนี้

การวัดการทำงานของ mannanase ใช้ locust bean gum galactomannan 1%(w/v) ใน sodium acetate buffer0.1 M , pH 5.8 ปริมาณ 0.5 ml เป็นสับสเตรททำปฏิกิริยากับเอนไซม์ 0.5 ml

บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เทียบกับสารละลายมาตรฐาน mannose โดยใช้ dinitrosalicylic acid (DNS) วิธีของ Miller

การวัดการทำงานของ galactanase ใช้ arabic gum 1%(w/v) ใน sodium acetate buffer 0.1 M , pH 5.8 ปริมาณ 0.5 ml เป็นสับสเตรท ทำปฏิกริยากับเอนไซม์ 0.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เทียบกับสารละลายมาตรฐาน galactose โดยใช้ DNS

การวัดการทำงานของ β-mannosidase ใช้เอนไซม์ 0.5 ml ทำปฏิกริยากับสับสเตรท *p*-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside (Sigma) 2 mM ใน sodium acetate buffer 0.1 mM pH 5.8 ปริมาณ 0.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกริยาด้วย sodium carbonate 2% (w/v) 2 ml แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm เทียบกับสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol

Firantas *et al.* (1982) ศึกษาการทำงานของ β-mannanase จาก *Bacillus subtilis* โดยเปรียบเทียบระหว่าง viscosimetric และ spectrophotometric method โดยใช้ galactomannan จาก *Ceratonia siliqua* เป็นสับสเตรท พบว่าโดย viscosimetric method ให้ค่า Vmax เท่ากับ 1.4 μcal/g ที่ pH 5.8 อุณหภูมิ 40 °C และ Michaelis constant เท่ากับ 0.6 nM วิธี viscosimetric เป็นวิธีที่มีความไวมากกว่า ส่วนวิธี spectrophotometric เหมาะสำหรับวัดเอนไซม์ในปริมาณมาก

Oligosaccharide

ธนิต (2540) กล่าวว่าชีวเคมีมีบทบาทมากในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการใช้เอนไซม์เพื่อทำหน้าที่เป็นเครื่องมือสำคัญในการสร้างและพัฒนา ตัวอย่างเช่น การสร้างคาร์โบไฮเดรตชนิดพิเศษขึ้นจากวัตถุดิบทางการเกษตรกลุ่มหนึ่งที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก คาร์โบไฮเดรตที่สร้างขึ้นได้นั้นเป็นคาร์โบไฮเดรตสายสั้นๆเรียกโดยรวมว่า โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) การสร้างโอลิโกแซคคาไรด์นั้นเป็นการสร้างผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มประเภทหนึ่งจากวัตถุดิบทางการเกษตรซึ่งปกติจะราคาไม่สูง โอลิโกแซคคาไรด์ที่สร้างขึ้นจะมีสมบัติแตกต่างไปจากสารตั้งต้นทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในลักษณะพิเศษเฉพาะทาง และแน่นอนที่สุดสามารถจำหน่ายได้ในราคาที่สูงกว่าตัวอย่างเช่น แลคโตซูโครส เป็นน้ำตาลสังเคราะห์ซึ่งระบบย่อยอาหารของร่างกายไม่เคยรู้จักมาก่อนเมื่อรับประทานเข้าไปแล้วจึงถูกย่อยน้อยมาก จึงเป็นสารให้ความหวานที่ดีสำหรับผู้ที่ต้องการความหวานอร่อยแต่ไม่ต้องการเพิ่มแคลอรี่และระดับน้ำตาลในเลือด เมื่อแลคโตซูโครสไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารได้ จึงเคลื่อนที่ต่อลงไปสู่ระบบลำไส้ส่วนล่างและณ ตำแหน่งนี้เองแลคโตซูโครสได้ทำประโยชน์สำคัญแก่ผู้บริโภค คือ แบคทีเรียประจำถิ่น bifidobacteria จะเจริญเติบโตได้ดี แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นชนิดหนึ่งของกลุ่ม lactic acid bacteria ถ้าในลำไส้มีแบคที่เรียชนิดนี้มากจะส่งผลทำให้สุขภาพโดยรวมดีขึ้นด้วย เช่น

เดียวกับ Onishi และ Yokozeki (1996) ได้กล่าวว่า galacto-oligosaccharide ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ transgalactosylate ของ lactose จะช่วยให้ bifidobacteria ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์เจริญได้ดี มีผลทำให้การทำงานของระบบทางเดินอาหารดีไปด้วย ปัจจุบันบริษัท Ensuiko Sugar Refining แห่งประเทศญี่ปุ่นได้พัฒนาเทคโนโลยีการผลิตแลคโตซูโครสในระดับอุตสาหกรรมขึ้นได้โดยการนำเข้าวัตถุดิบในรูปของน้ำตาลประเภทไม่ฟอกสีเข้ามาจากประเทศไทยเป็นหลัก จากนั้นใช้ความรู้ที่พัฒนาขึ้นเปลี่ยนซูโครสให้เป็นสินค้าที่มีลักษณะพิเศษและราคาพิเศษกว่าเดิมอีกด้วย

ตัวอย่างโอลิโกแซคคาไรด์อีกชนิดหนึ่งคือกลูโคไซล์อินอซิทอล (glucosylinositol) ซึ่งได้จากการใช้เอนไซม์ cyclomaltodestrin glucanotransferase (CGTase) ซึ่งได้จาก *Bacillus obenis* ย่อยกลูโคสออกจากแป้ง แล้วนำโมเลกุลของกลูโคสไปต่อกับอินอซิทอลด้วยพันธะ α-1,4 เกิดเป็นกลูโคไซล์อินอซิทอลซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ประเภทคือกลูโคสและอินอซิทอลซึ่งมีความสำคัญต่อเซลล์ไม่ยิ่งหย่อนไปกว่ากัน กล่าวคือกลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน ในขณะที่อินอซิทอลเป็นองค์ประกอบของฟอสโฟไลปิดตัวหนึ่งคือ phosphotidyl inositol ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ทุกๆเซลล์โดยเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า bifidobacteria ในลำไส้สามารถนำกลูโคไซล์อินอซิทอลไปใช้ประโยชน์ได้ และเจริญเติบโตได้ดีเป็นพิเศษ รำข้าวเป็นแหล่งสำคัญของอินอซิทอล การสังเคราะห์กลูโคไซล์อินอซิทอลจึงไม่น่ามีต้นทุนสูงมากนัก และกลูโคไซล์อินอซิทอลจะมีบทบาทสำคัญในการสนับสนุนการใช้โปรไบโอตติก (probiotic) สำหรับสัตว์เลี้ยงในอนาคต

Onishi and Yokozeki (1996) ศึกษายีสต์ 3 ชนิดคือ *Sterigmatomyces elviae* CBS 8119, *Rhodotorula minuta* IFO 879 และ *Sirobasidium magnum* CBS 6803 เป็นยีสต์ที่สามารถสร้าง galacto-oligosaccharide (Gal-OS) จาก lactose ได้ และสามารถสร้าง gluco-oligosaccharide (Glc-OS) จาก cellobiose ได้ด้วยวิธี transglucosylation โดย *R. minuta* IFO 879 จะสร้าง Gal-OS ได้มากที่สุดจึงศึกษาสภาวะต่างๆในการสร้าง Glc-OS และ Gal-OS จากเชื้อนี้ เมื่อใช้ *R. minuta* IFO 879 ที่เป็น toluene-treated resting cells พบว่าจะสร้าง Glc-OS ได้สูงสุด 70 mg/ml จาก cellobiose 200 mg/ml และสร้าง Gal-OS ได้ 76 mg/ml จาก lactose 200 mg/ml นอกจากนี้ยังพบว่า glucose ซึ่งเป็น by-product จะยับยั้งการสร้างโอลิโกแซคคาไรด์และสามารถกำจัดออกโดยจุลินทรีย์อื่นที่ใช้ glucose ในการเจริญซึ่งก็คือ *S. elviae* CBS 8119 ในสภาวะที่เหมาะสมพบว่าต้องใช้ cellobiose 40 mg/ml จะสร้าง Glc-OS ได้ 201 mg/ml และใช้ lactose 360 mg/ml จะสร้าง Gal-OS ได้ 230 mg/ml จากการศึกษาโครงสร้างพบว่า Glc-OS เป็น cellotriose ส่วน Gal-OS เป็น *O*-*β*-D-galactopyranosyl-(1→4)-*O*-*β*-D--galactopyranosyl-(1→4)-D-glucopyranose(4-galactosyl-lactose)

การแยกแอคติโนมัยซีส

โดยทั่วไปแล้วแอคติโนมัยซีสส่วนใหญ่จะแยกได้จากดินและมักอยู่ในจีนัส *Streptomyces* มากกว่า 50% ดังนั้นถ้าต้องการแยกแอคติโนมัยซีสจีนัสอื่นๆจึงอาจทำได้โดยหาแหล่งที่อยู่ใหม่ของการแยกเชื้อเช่นในต้นพืช (endophytic actinomycetes) หรือแยกจากน้ำเป็นต้น อีกวิธีหนึ่งก็คือกดการเจริญหรือฆ่า *Streptomyces* เพื่อให้แอคติโนมัยซีสจีนัสอื่นๆที่มีอยู่จำนวนน้อยกว่าสามารถมีโอกาสเจริญขึ้นมาได้ มีผู้ทำการศึกษาดังต่อไป

Hsu and Lockwood (1975) ได้แยกแอคติโนมัยซีสจากดินและน้ำโดยใช้อาหารแข็งซึ่งประกอบด้วย colloidal chitin 0.4 % และ mineral salt pH 8.0 พบว่าแอคติโนมัยซีสสามารถเจริญได้ดี ส่วนแบคทีเรียและฟังไจเจริญได้น้อย

Shearer (1987) กล่าวว่า *Streptomyces* เป็นแอคติโนมัยซีสที่พบมากในดินเป็นอันดับหนึ่ง โดยพบมากกว่า 50 % จากแอคติโนมัยซีสทั้งหมด การแยกแอคติโนมัยซีสโดยวิธีปกติทั่วไปและการแยก non-streptomyces actinomycetes 2 วิธีคือ Heat-Treatment technique และ Makkar and Gross technique ดังนี้

วิธีการแยกแอคติโนมัยซีสโดยวิธีปกติเริ่มด้วยผึ่งดินให้แห้งเพื่อลดการเจริญของแบคทีเรีย แล้วบดดินให้ละเอียด ก่อนนำไปเจือจางด้วย saline แล้วเลี้ยงลงในอาหาร non-selective media ที่มี cyclohexamide และ nystatin เพื่อลดการปนเปื้อนจากฟังไจ

Heat-Treatment technique ทำโดยผึ่งดินให้แห้งแล้วบด จากนั้นนำมาอบที่ 120°C เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปเจือจางด้วย saline ก่อนเพาะเลี้ยงลงใน Acid Vitamin Agar ที่มี cyclohexamide และ nystatin วิธีนี้เหมาะสำหรับแยก *Streptosporangium* และ *Microbispora*

Makkar and Gross technique ทำโดยผึ่งดินให้แห้งที่อุณหภูมิ 30 °C แล้วใช้ดิน 0.5 g ผสมลงในน้ำประปา 50 ml นำสารละลายนี้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมกับเขย่าเป็นระยะๆ จากนั้นดูดสารละลายบริเวณผิวหน้ามาเพาะเลี้ยงลงใน soil extract agar, oatmeal-soil extract agar หรือ starch-casein agar วิธีนี้เหมาะสำหรับแยกแอคติโนมัยซีสที่มี zoospore คือ *Actinoplanaceae*

Galatenko and Terekhova (1990) แยกแอคติโนมัยซีสจากดินโดยใช้แสง ultra violet พบจีนัสที่ทนต่อแสง ultra violet ได้แก่ *Micromonospora*, *Amylolatopsis* และ *Nocardia*

Hayakawa *et al.* (1991) ศึกษาการแยก *Micromonospora* และ *Microbispora* จากดินโดยถ้าต้องการแยก *Micromonospora* จะนำดินมาตากแห้งแล้วเจือจางด้วยน้ำก่อนที่จะมา treat ด้วย phenol 1.5% แล้วเลี้ยงบน Humic acid vitamin agar ที่มี tunicamycin และ nalidixic acid อย่างละ 20 ppm ผสมอยู่ ส่วนการแยก *Microbispora* ทำได้โดย ผึ่งดินให้แห้งแล้วอบด้วยความร้อน 120 °C

เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ว treat ด้วย phenol 1.5% และ chlorhexidine gluconate 0.03% แล้วเลี้ยงบน Humic acid vitamin agar ที่มี nalidixic acid 20 ppm ผสมอยู่ phenol จะช่วยกำจัดแบคทีเรียและ *Streptomyces* ที่อยู่ในดิน แต่ไม่เป็นอันตรายต่อ *Micromonospora* และ *Microbispora* การใช้ tunicamycin จะกดการเจริญของ *Microbispora* ทำให้ *Micromonospora* เด่นขึ้นมา การอบด้วยความร้อนแห้งจะช่วยลดจำนวนแบคทีเรียในดิน *Streptomyces* และ *Micromonospora* แต่ไม่ลดจำนวน *Microbispora* วิธีแยกเชื้อทั้ง 2 วิธีนี้จะแยกเชื้อได้มากกว่า 90%

Sardi *et al.* (1992) ได้แยกแอคติโนมัยซีสจากรากพืช 28 ชนิดโดยทำความสะอาดบริเวณรอบรากพืชด้วยการอบด้วยไอของ propylene oxide เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วเพาะเลี้ยงบน starch casein medium และ 2.5% water agar ที่มี nystatin และ cyclohexamide อย่างละ 50 ppm ผสมอยู่ เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 21 วัน พบ *Streptomyces* มากที่สุดถึง 482 ไอโซเลทจากรากพืช 28 ชนิด รองลงมาได้แก่ *Nocardia, Streptoverticillium, Micromonospora* และ *Streptosporangium* จำนวน 4, 2, 1 และ 1 ไอโซเลทตามลำดับ

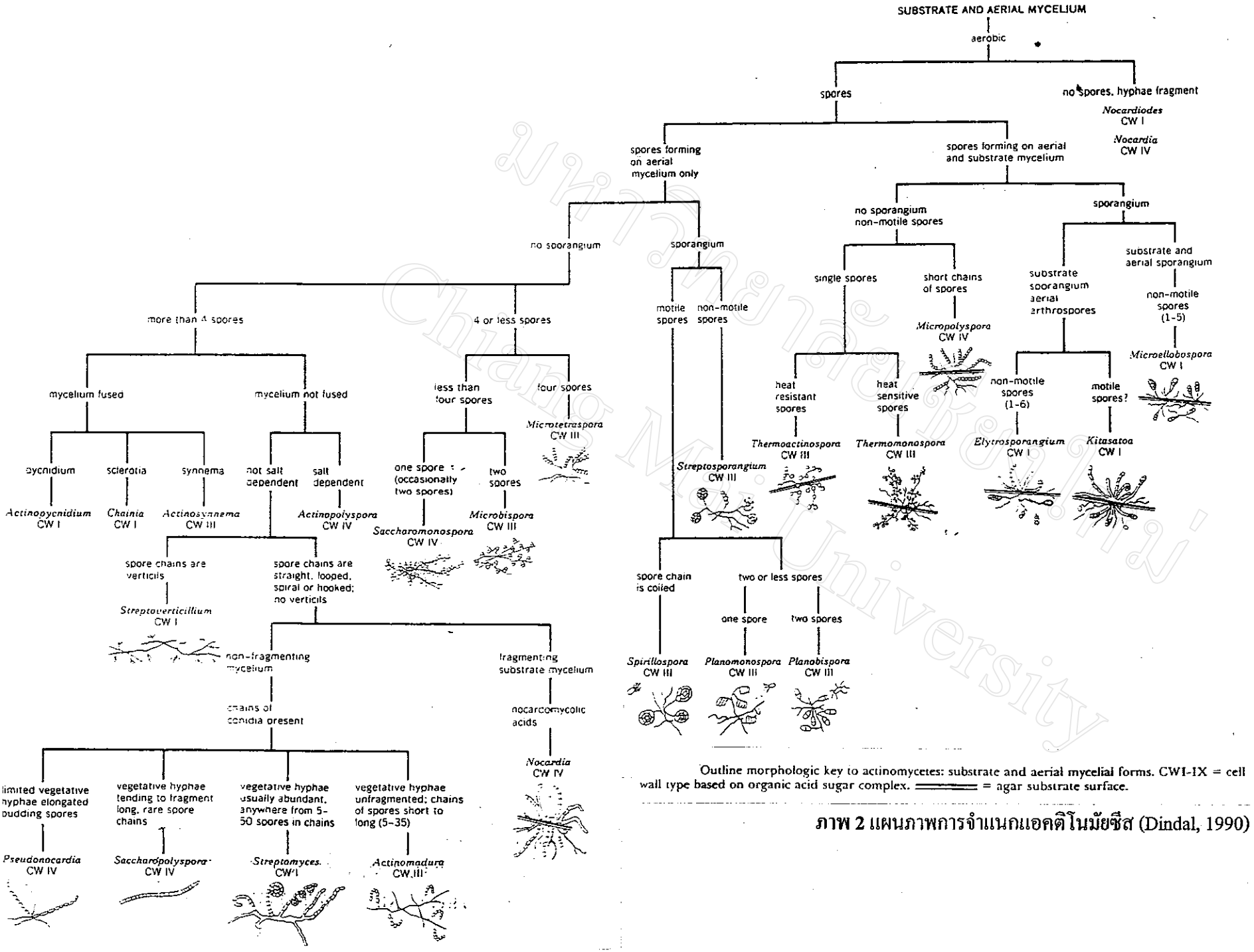
Peterolini *et al.* (1993) พบแอคติโนมัยซีสจีนัสใหม่ *Planopolyspora* gen. nov. แยกได้จากดินบริเวณที่มีการทับถมของใบ *Prunus persica* โดยใช้ Anderson sampler กับ sedimentation chamber ในการแยก เชื้อนี้มีลักษณะสปอร์ที่แตกต่างจากที่เคยพบมาคือมี wall chemotype III และ whole-cell sugar pattern B จึงเรียกใหม่ว่าเป็น Maduromycetes: *Planopolyspora* gen. nov.

Hayakawa *et al.* (1995) เสนอวิธีที่ใช้แยก *Actinomadura viridis* จากดินโดยผึ่งดินให้แห้ง แล้วอบด้วยความร้อน 110 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเจือจางด้วยน้ำ จากนั้นนำไป treat ด้วย phenol 1.0% แล้วเลี้ยงบน Humic acid vitamin agar ที่มี kanamycin, josamysin, lysozyme และ nalidixic acid อย่างละ 20, 2, 500 และ 20 mg/l ตามลำดับ

Hayakawa *et al.* (1996) ศึกษาวิธีแยก *Microtetraspora glauca* ซึ่งเป็น four-spored actinomycetes โดยใช้ plate culture method เริ่มจากนำดินที่ผึ่งให้แห้งแล้วมาอบแห้งด้วยความร้อน 110 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้ว treat ด้วย benzethonium chloride (BC) 0.05% จากนั้นจึงเพาะลงบนอาหารพิเศษ LSV-SE agar ซึ่งมี kanamycin, norfloxacin, nalidixic acid, cyclohexamide และ nystatin อย่างละ 20, 20, 10, 50 และ 50 mg/l ตามลำดับ อาหารชนิดนี้ประกอบด้วย lignin เป็นแหล่งคาร์บอน จากการเพาะเลี้ยงพบว่าสามารถแยก *M. glauca* ได้ 2-27% จากแอคติโนมัยซีสทั้งหมด การแยกเชื้อโดยวิธีนี้จะช่วยลดปริมาณของแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีสจีนัสอื่นๆได้ดี

การจัดจำแนกแอคติโนมัยซีส

แอคติโนมัยซีสเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบทั่วไปในธรรมชาติจัดอยู่ในFamily Actinomycetales ที่มีความหลากหลายทางรูปร่างอยู่มากแตกต่างกันไปตั้งแต่ coccoid, coccoid-rod, non-branching rod, slightly branching rod, fragmenting hyphal form ไปจนถึง highly differentiated branched mycelia โดยมีการสร้างสปอร์ที่บริเวณ aerial hyphae อาจพบสปอร์เป็นแบบ motile หรือmultilocular (many-compartmented) sporangia การจัดจำแนกแอคติโนมัยซีสต้องอาศัยลักษณะทาง macroscopic microscopic คุณสมบัติทางชีวเคมี และการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีประกอบกัน ลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนกประกอบด้วยลักษณะของ mycelium, conidia, sporangia และโครงสร้างอื่นๆเช่น scerotia เป็นต้นการตรวจสอบลักษณะเหล่านี้สามารถสังเกตได้จากแอคติโนมัยซีสที่เจริญบนอาหารชนิดต่างๆเช่น Czapek's agar, yeast extract-malt extract agar, glyceral asparagine agar และ inorganic salt-starch agar สำหรับแอคติโนมัยซีสที่หายากอาจเพาะเลี้ยงบน ATCC medium No.172 (NZ-amine glucose starch agar) (Labeda, 1987) เพื่อความสะดวกจึงมีผู้ทำแผนภาพเพื่อใช้ในการจัดจำแนกแอคติโนมัยซีส (ภาพ2) (Dindal, 1990) และการวิเคราะห์ทางชีวเคมีแสดงตัวอย่างเฉพาะของจีนัส *Streptomyces* ซึ่งเป็นจีนัสที่พบมากเป็นอันดับหนึ่ง (ตาราง 1) (Holt *et al.*, 1994)



Outline morphologic key to actinomycetes: substrate and aerial mycelial forms. CWI-IX = cell wall type based on organic acid sugar complex. ═══ = agar substrate surface.

ภาพ 2 แผนภาพการจำแนกแอคติโนมัยซีส (Dindal, 1990)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

Characteristics	*S. albidoflavus*	*S. albus*	*S. antibioticus*	*S. anulatus*	*S. chromofuscus*	*S. cyaneus*	*S. diastaticus*	*S. exfoliatus*	*S. fulvissimus*	*S. griseoflavus*	*S. griseoruber*	*S. griseoviridis*	*S. halstedii*	*S. lavendulae*	*S. lydicus*	*S. microflavus*	*S. olivaceoviridis*	*S. phaeochromogenes*	*S. purpureus*	*S. rimosus*	*S. rochei*	*S. violaceus*	*S. violaceusniger*
Spore chain *Rectiflexibiles*	70	1	20	90	22	5	42	99	67	1	1	1	77	92	1	20	1	1	99	14	4	38	1
Spore chains *Spirales*	1	99	60	38	78	82	58	1	22	1	99	99	23	17	99	40	86	67	1	57	64	50	99
Spore mass red	5	1	1	5	1	31	16	39	66	17	12	99	1	83	9	1	14	1	25	1	7	13	1
Spore mass grey	1	1	99	3	34	31	48	38	11	1	78	1	99	8	91	80	71	1	75	1	77	13	99
Mycelial pigment red-orange	1	1	1	1	1	21	16	11	89	1	67	1	1	1	1	20	1	1	1	1	8	1	1
Diffusible pigment produced	20	1	1	11	11	33	10	39	33	1	99	99	8	1	1	20	29	50	99	1	4	1	1
Diffusible pigment yellow-brown	15	1	1	11	11	13	5	28	1	1	1	99	1	1	1	1	29	33	99	1	4	1	1
Melanin on peptone-yeast-iron agar	5	1	80	13	33	97	47	61	67	17	22	1	1	99	1	80	14	17	75	1	4	88	1
Melanin on tyrosine agar	10	1	60	24	22	85	47	61	1	17	22	17	1	92	1	80	14	33	1	1	1	99	1
Antibiosis against:																							
Bacillus subtilis NCIB 3610	5	17	40	50	11	44	21	56	78	17	1	99	8	92	73	80	1	17	50	99	35	50	67
Micrococcus luteus NCIB 196	5	17	20	71	11	33	21	44	89	17	1	99	8	83	99	99	1	17	50	86	35	38	99
Candida albicans CBS 562	85	1	99	21	1	3	1	1	11	1	1	33	8	67	27	1	1	1	1	57	19	1	17
Saccharomyces cerevisiae CBS 1171	80	1	99	13	1	5	1	1	22	1	1	33	8	67	27	1	29	17	1	86	15	1	50
Streptomyces murinus ISP 5091	10	17	80	61	22	62	5	39	99	67	22	80	15	99	99	99	1	1	75	99	39	88	50
Aspergillus niger LIV 131	55	17	80	32	1	10	11	6	22	1	1	33	1	75	99	1	1	1	50	99	27	25	33
Lecithinase activity	15	1	40	3	11	10	1	50	44	1	1	50	15	99	64	60	1	1	75	86	4	75	1
Lipolysis	99	99	1	99	89	49	26	94	99	99	89	83	99	33	18	40	86	83	25	99	73	63	99
Pectin hydrolysis	5	1	40	53	22	56	68	61	1	99	99	67	77	8	1	99	14	50	1	14	42	13	50
Nitrate reduction	20	1	80	79	22	36	47	83	1	83	89	33	23	50	9	1	14	17	99	86	27	99	83
H_2S production	85	83	1	90	89	90	79	89	67	99	99	99	92	42	1	99	99	83	75	14	92	63	99
Hippurate hydrolysis	1	1	40	13	13	3	28	44	44	67	56	67	77	1	30	40	50	83	1	71	9	88	67
Elastin degradation	90	50	1	87	67	41	37	89	67	17	44	50	85	92	36	60	57	99	99	99	50	88	83
Xanthine degradation	95	83	80	95	22	80	53	94	99	1	78	83	99	83	82	60	29	99	99	86	96	88	1
Arbutin degradation	99	99	99	99	99	54	53	99	67	50	99	99	99	92	99	99	1	67	75	71	96	99	99

ตาราง 1 เปอร์เซนต์การเกิดผลบวกต่อลักษณะต่างๆของ Streptomycete species (Holt *et al*, 1994)

Characteristics	*S. albidoflavus*	*S. albus*	*S. antibioticus*	*S. anulatus*	*S. chromofuscus*	*S. cyaneus*	*S. diastaticus*	*S. exfoliatus*	*S. fulvissimus*	*S. griseoflavus*	*S. griseoruber*	*S. griseoviridis*	*S. halstedii*	*S. lavendulae*	*S. lydicus*	*S. microflavus*	*S. olivaceoviridis*	*S. phaeochromogenes*	*S. purpureus*	*S. rimosus*	*S. rochei*	*S. violaceus*	*S. violaceusniger*
Resistance to:																							
Neomycin (50 µg/ml)	1	1	1	1	1	1	1	11	89	1	1	1	1	50	18	1	1	1	75	99	8	25	1
Rifampicin (50 µg/ml)	40	99	20	66	33	46	68	11	99	50	78	83	31	33	9	99	86	50	99	99	89	99	83
Oleandomycin (100 µg/ml)	70	83	1	84	1	13	26	44	99	83	1	17	99	8	9	1	1	33	75	71	46	13	50
Penicillin G (10 i.u.)	90	99	40	74	44	64	47	44	99	83	78	99	92	58	91	20	14	33	25	99	92	99	17
Growth at 45°C	1	99	80	5	67	41	16	17	22	1	1	67	23	17	1	60	86	67	1	43	77	1	50
Growth with (%, w/v):																							
NaCl (7.0)	85	99	20	74	44	18	32	22	22	33	78	83	92	1	55	1	29	83	25	99	92	38	1
Sodium azide (0.01)	75	99	60	32	56	15	5	23	1	33	11	99	85	1	18	60	57	67	1	71	62	63	50
Phenol (0.1)	90	17	80	92	22	64	95	72	44	99	89	83	85	58	9	99	86	99	1	71	96	99	1
Potassium tellurite (0.001)	85	50	60	87	67	46	74	83	56	99	78	99	99	42	55	80	57	99	1	71	73	99	17
Thallous acetate (0.001)	90	1	40	87	54	13	21	67	22	50	33	50	92	17	46	1	14	33	1	14	54	63	1
Utilization of:																							
DL-α-Amino-*n*-butyric acid	65	1	20	37	67	31	32	61	89	17	33	1	54	42	9	60	57	67	1	1	12	88	99
L-Cysteine	60	1	80	61	67	72	79	50	44	17	78	83	69	33	46	60	99	17	1	29	50	38	33
L-Valine	35	17	60	37	33	69	74	50	99	1	56	17	62	17	27	40	86	99	1	57	15	50	33
L-Phenylalanine	70	17	40	61	11	67	16	83	89	17	33	33	77	42	99	99	71	83	1	86	46	99	67
L-Histidine	40	99	99	74	70	85	68	78	99	17	99	83	69	8	36	40	99	83	1	99	77	25	99
L-Hydroxyproline	1	67	40	37	1	28	21	89	78	17	22	17	23	42	55	20	1	67	1	29	8	88	83
Sucrose	45	33	80	26	33	92	74	28	34	83	44	17	23	50	73	99	86	83	25	1	81	38	33
meso-Inositol	45	33	80	32	89	92	84	6	99	83	99	67	23	25	91	40	57	99	75	99	96	63	67
Mannitol	90	99	80	99	99	95	90	1	99	99	99	99	69	8	91	99	99	99	25	99	99	38	99
L-Rhamnose	20	17	60	82	67	92	95	61	22	83	99	83	69	17	18	80	99	99	1	1	96	38	83
Raffinose	5	33	60	18	22	99	84	33	89	33	99	50	31	8	82	99	99	99	1	86	69	63	83
D-Melezitose	55	67	80	71	22	72	26	22	44	67	56	33	46	33	82	40	29	99	99	57	81	50	83
Adonitol	50	99	20	66	22	82	16	1	89	1	22	67	8	8	82	1	14	99	1	99	35	13	67
D-Melibiose	25	50	99	32	44	98	95	28	89	67	78	33	77	17	82	40	99	83	25	99	96	75	83
Dextran	20	1	1	76	78	59	16	6	22	50	44	17	69	1	1	1	14	50	1	14	89	13	17
Xylitol	5	1	1	21	1	21	16	1	11	1	1	1	1	1	55	40	29	99	25	86	46	1	17

ตาราง 1 (ต่อ) เปอร์เซนต์การเกิดผลบวกต่อลักษณะต่างๆของ Streptomycete species (Holt *et al*, 1994)

การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีมีความจำเป็นเพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่างแอคติโนมัยซีสที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายกัน หรือในกรณีที่ไม่มีการสร้างสปอร์ ความแตกต่างกันของ cell wall type และ whole cell sugar pattern สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี thin layer chromatography (ตาราง 2) การวิเคราะห์ manaquinonesโดยวิธี thin layer chromatography หรือ HPLC การวิเคราะห์ mycolic acid โดยวิธี gas chromatography และการวิเคราะห์ phospholipid composition ซึ่งพบว่ามี 5 แบบคือ

PI ไม่มี nitrogenous phospholipid

PII มี phosphatidylethanolamine

PIII มี phosphatidylcholine

PIV มี phosphatidylethanolamine และ glucosamine containing phospholipid

PV มี glucosamine containing phospholipid

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตาราง 2 ลักษณะผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีส (Labeda, 1987)

Type I cell wall

Streptomyces - chains of conidia on aerial mycelium.

Streptoverticillium - chains or umbels of conidia on verticils formed on aerial mycelium.

Nocardioides - substrate and aerial mycelium fragment into coccoid elements.

Actinopycnidium - same as *Streptomyces* but pycnidia-like structures formed.

Actinosporangium - same as *Streptomyces* but spores accumulate in drops.

Chainia - same as *Streptomyces* but sclerotia are also formed.

Elytrosporangium - same as *Streptomyces* but merosporangia are also produced on vegetative mycelium.

Intrasporangium - no aerial mycelia; substrate mycelium forms vesicles.

Microellobosporia - merosporangia produced on both aerial and substrate mycelia.

Sporichthya - no substrate mycelium; aerial chains of motile conidia held to surface of substrate by holdfasts.

Kitasatoa - single spores in sporangia on aerial and substrate mycelia; spores motile.

Type II cell wall

Micromonospora - no aerial mycelium; single conidia produced.

Actinoplanes - globose-to-lageniform sporangia; motile spores.

Amorphosporangium - same as *Actinoplanes* but irregular sporangia; spore generally non-motile.

Ampullariella - lageniform-to-globose sporangia; motile rod-shaped spores.

Dactyosporangium - claviform sporangia containing one chain of motile spores.

Glycomyces - aerial mycelium with chains of non-motile conidia.

Type III cell wall

No characteristic whole cell sugars

Actinosynnema - synnemata with chains of motile conidia.

Geodermatophilus - hyphae divide in all planes, forming packets of motile coccoid conidia.

Nocardiopsis - long chains of conidia on aerial mycelium.

Thermomonospora - single conidia formed on aerial and substrate mycelium.

Thermoactinomyces - single heat-resistant endospores produced on aerial and substrate mycelium.

Madurose as characteristic whole cell sugar

Actinomadura - short chains of conidia on aerial mycelium.

Dermatophilus - same as *Geodermatophilus*.

Exellospora - short chains of conidia on aerial and substrate mycelia.

Microbispora - longitudinal pairs of conidia on aerial mycelium.

Microtetraspora - chains of four to six conidia on aerial mycelium.

Planobispora - cylindrical sporangia, each containing two motile spores.

Planomonospora - cylindrical sporangia, each containing one motile spore.

Spirulospora - globose sporangia with rod-shaped motile spores.

Streptosporangium - globose sporangia with nonmotile spores.

Rhamnose and galactose as characteristic whole cell sugars

Saccharothrix - long chains of conidia on aerial mycelium.

Type IV cell wall

Nocardia - abundant filamentation, often fragmenting into coccoid rods; aerial mycelium and chains of conidia sometimes formed.

Actinopolyspora - long chains of conidia on aerial mycelium; substrate may fragment.

Amycolata - abundant filamentation, chains of conidia formed on aerial mycelium; substrate mycelium may fragment.

Amycolatopsis - same as *Amycolata*.

Micropolyspora - short chains of conidia formed on aerial and substrate mycelia.

Faenia - same as *Micropolyspora*.

Pseudonocardia - long, cylindrical conidia formed on aerial mycelium, diving into shorter coccoid elements.

Saccharomonospora - single spore primarily on aerial mycelium.

Saccharopolyspora - similar to *Nocardiopsis*.

Kibdelosporangium - chains of conidia produced on aerial mycelium; sporangia-like structures also produced.

Type X cell wall (cell walls contain glycine and *meso* and LL isomers of DAP)

Kitasatospora - long chains of conidia produced on aerial mycelium.