บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากรากพืช

หลังจากบ่มรากพืชบน starch casein medium ที่มีสารปฏิชีวนะผสมอยู่เป็นเวลา 7 วัน สามารถมองเห็นการเจริญของแอคติโนมัยซีสออกมารอบๆรากข่า 3 โคโลนีและรากตะไคร้ 2 โคโลนี โดยจะให้ code เป็น RK และ RT ตามลำดับ โคโลนีของแอคติโนมัยซีสมีลักษณะหยาบเป็นปุยสั้นๆ สีเทาฝังติดแน่นลงไปในเนื้ออาหาร แสดงดังภาพ 3

ภาพ 3 โคโลนีของแอคติโนมัยซีสที่เจริญบริเวณรากข่า (ลูกศรชี้) บน starch casein medium

2. ผลการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดิน

หลังจากใช้เวลาในการบ่ม 3-4 สัปดาห์จะพบโคโลนีที่เป็นลักษณะของแอคติโนมัยซีสคือมีลักษณะหยาบ เป็นปุยสั้นๆ ฝังติดแน่นลงไปใน humic vitamin agar โดยจะพบจำนวนไอโซเลทแตกต่างกัน คือพบแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินบริเวณน้ำตกมณฑาธารจำนวน 71 ไอโซเลท จากดินบริเวณแหลมสนและห้วยคอกม้าที่ treat ด้วยสารละลาย benzethonium chloride 0.01%, 0.03% และ control จำนวน 2, 9 และ 20 ไอโซเลทตามลำดับ

3. ผลการทดสอบแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ที่ผลิต mannanase โดยวิธี gel diffusion assay (Downie *et al*, 1994)

จากเชื้อแอคติโนมัยซีสที่เก็บไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 142 ไอโซเลท จากรากพืช 5 ไอโซเลทและจากดิน 102 ไอโซเลทนำมาทดสอบความสามารถในการผลิต manananse โดยวิธี gel diffusion assay พบว่ามีเชื้อที่ผลิต mannanase ได้จำนวน 38 ไอโซเลทเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี locust bean gum 1%(w/v) บ่มที่อุณหภูมิ ห้องเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วัน จากเชื้อที่สามารถผลิต mannanase ได้ 38 ไอโซเลทได้คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ให้เส้นผ่าศูนย์กลางวงใสขนาดใหญ่มากกว่า 10 มิลลิเมตร จำนวน 3 ไอโซเลทได้แก่ M4, 4/37 และ E2/22 มาทดสอบความสามารถในการผลิต mannanase เมื่อหมักในอาหารเหลวและหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ ปรากฏว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลท E2/22 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 12.27 U/ml มี specific activity เท่ากับ 132.79 U/mg (ตาราง 3)

ตาราง 3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสและการทำงานของ mannanase ของแอคติโนมัยซีสไอโซเลท M4, 4/37 และ E2/22

actinomycetes	clear zone diameter (mm)	enzyme activity (U/ml)	specific activity (U/mg)
M4	13	5.16	259.35
4/37	13	4.64	113.72
E2/22	17	12.27	132.79

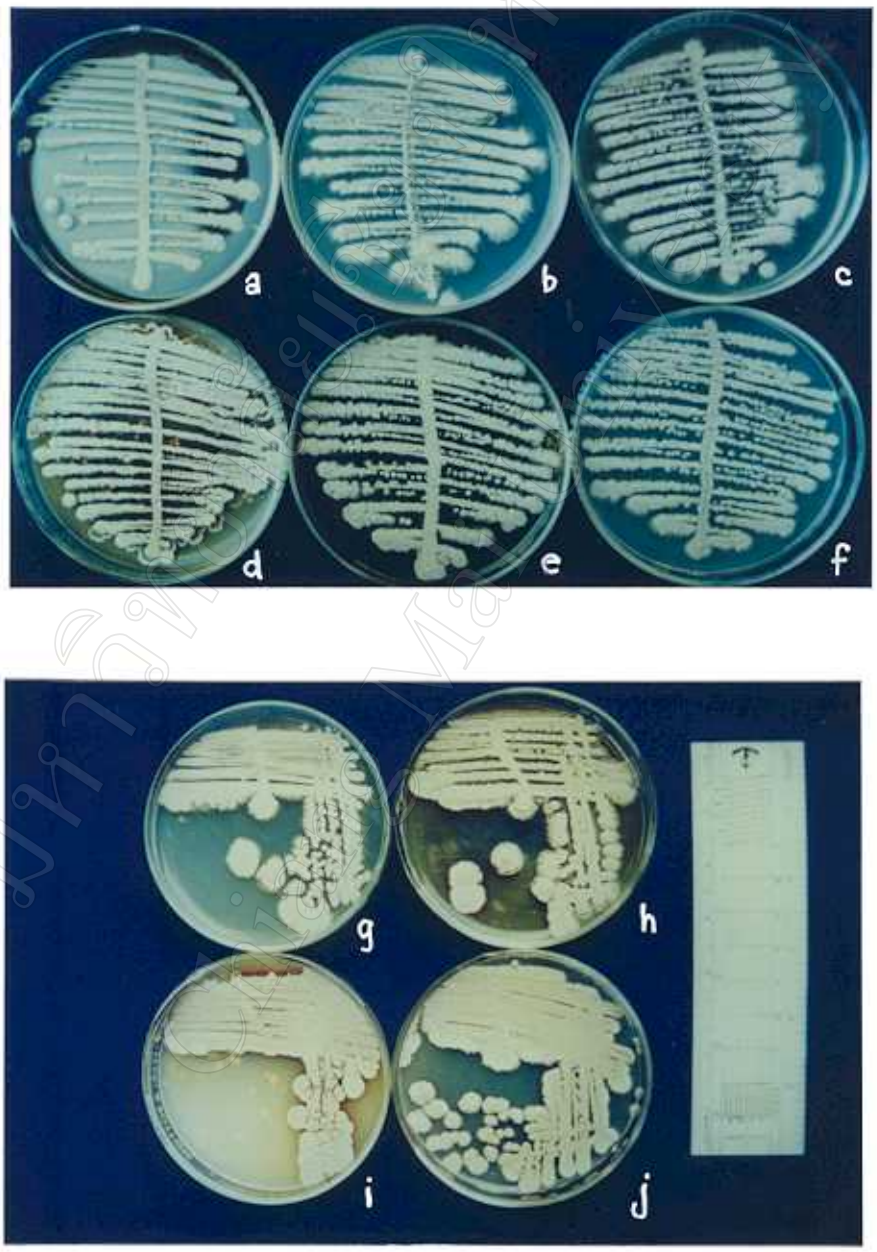
จากผลที่ได้นี้จึงคัดเลือกแอคติโนมัยซีสไอโซเลท E2/22 ที่ได้จาก stock ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณริมแม่น้ำปิงที่มีการทับถมของกิ่งไม้และใบไม้ผุ เพื่อทำการศึกษาลักษณะของเชื้อ และความสามารถในการผลิต mannanase ต่อไป

4. การเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีส E2/22 บนอาหารแข็ง

4.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีส E2/22 บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ

หลังจากเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส E2/22 บน HT agar, nutrient agar, Bennet's agar, oat meal mannitol agar, potato dextrose agar, yeast extract agar, ISP medium No.1, 2, 3และ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน แล้วนำมาตรวจดูการเจริญของเชื้อพบว่าสามารถเจริญได้ดีในทุกอาหาร โดยเชื้อเจริญได้ดีที่สุดบน HT agar สังเกตจากเส้นใยที่เจริญขึ้นไปในอากาศจะมีมากที่สุด

ส่วน potato dextrose agar ซึ่งเป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราและ nutrient agar ซึ่งเป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย เชื้อแอคติโนมัยซีส E2/22 ก็ยังสามารถเจริญได้ดี ลักษณะโคโลนีบนอาหารชนิดต่างๆแสดงดังภาพ 4



ภาพ 4 โคโลนีของแอคติโนมัยซีส E2/22 บน HT agar(a), nutrient agar(b), Bennet's agar(c), oat meal mannitol agar(d), potato dextrose agar(e), yeast extract agar(f), ISP No.1(g), ISP No. 2(h), ISP No. 3(I), ISP No. 4(j) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน

การเจริญของแอคติโนมัยซีส E2/22 บนอาหารแข็งชนิดต่างๆสามารถแสดงได้ดังตาราง 4 ใน HT agar จะเป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงแอคติโนมัยซีสโดยทั่วไป และ nutrient agar เป็นอาหารที่เหมาะสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย เตรียมง่าย ราคาถูก จึงใช้ HT agar และ nutrient agar ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตาราง 4 การเจริญของแอคติโนมัยซีส E2/22 บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ30°C เป็นเวลา 14 วัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญ	ลักษณะเส้นใยที่เจริญขึ้นไปในอากาศ/สี	สีด้านหลังโคโลนี	สีที่แพร่ลงในอาหาร
HT agar	ดีมาก	มีมากที่สุด/สีเทา	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลเข้ม
nutrient agar	ดีมาก	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลอ่อน	-
Bennet's agar	ดีมาก	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลอ่อน	-
oat meal mannitol agar	ดีมาก	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลแดง	-
potato dextrose agar	ดีมาก	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาล	สีน้ำตาลเข้ม
yeast extract agar	ดีมาก	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลอ่อน	-
ISP medium No.1	ดีมาก	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลอ่อน	-
ISP medium No.2	ดีมาก	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลเข้ม
ISP medium No.3	ดีมาก	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลอ่อน
ISP medium No.4	ดีมาก	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลแดง	-

4.2 ผลของ pH ในอาหารแข็งต่อการเจริญของแอคติโนมัยซีส E2/22

เมื่อเลี้ยงเชื้อใน HT agar และ nutrient agar ที่มี pH เริ่มต้น 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน พบว่าบน HT agar เชื้อสามารถเจริญได้ดีตั้งแต่ pH 5-10 โดยที่ pH 8 เชื้อจะเจริญได้ดีที่สุด การสร้างสีแพร่ลงไปในเนื้ออาหารจะเพิ่มขึ้นตาม pH ของอาหารที่เพิ่มขึ้นจนถึง pH 8 ซึ่งมีการสร้างสีแพร่ลงไปในเนื้ออาหารมากที่สุด ที่ pH 9 และ 10 สีที่แพร่ลงไปในเนื้ออาหารจะน้อยลง ส่วนบน nutrient agar เชื้อจะเจริญได้ดีเท่าๆกันที่ pH 5-10 แต่ที่ pH 10 จะมีการสร้างสีน้ำตาลอ่อนแพร่ลงไปในเนื้ออาหาร ลักษณะโคโลนีบน HT agar และ nutrient agar ที่ pH ต่างๆแสดงดังภาพ 5

ภาพ 5 การเจริญของแอคติโนมัยซีส E2/22 บน HT agar(a) และ nutrient agar(b) ที่มี pH ต่างๆกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน (1 = pH5, 2 = pH6, 3 = pH7, 4 = pH8, 5 = pH9, 6 = pH10)

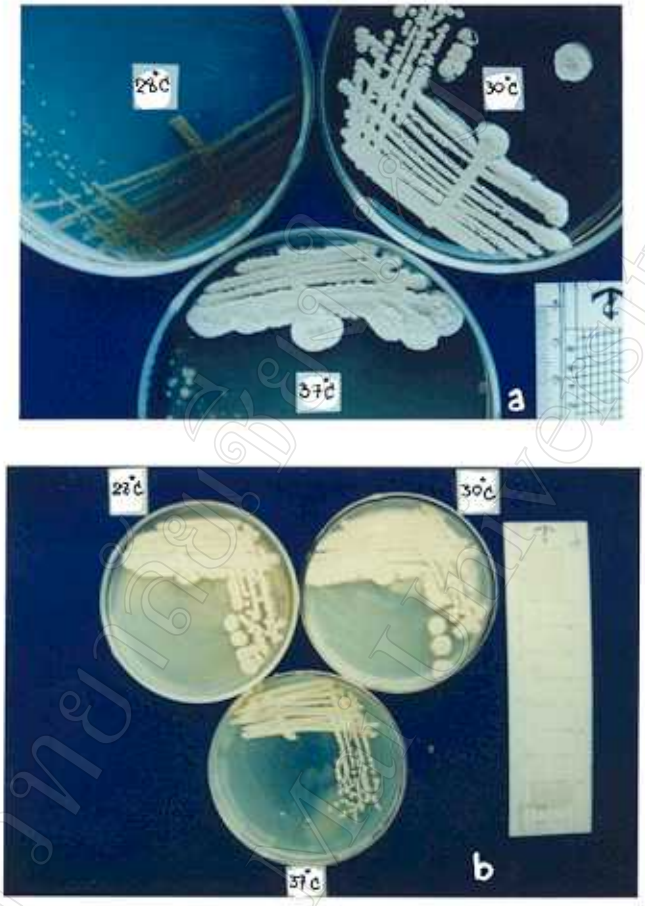
การเจริญของแอคติโนมัยซีส E2/22 บน HT agar และ nutrient agar ที่มี pH ต่างๆสามารถแสดงได้ดังตาราง 5

ตาราง 5 การเจริญของแอคติโนมัยซีส E2/22 บน HT agar และ nutrient agar ที่มี pH ต่างๆกันบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	pH ของอาหาร	การเจริญ	ลักษณะเส้นใยที่เจริญขึ้นไปในอากาศ/สี	สีด้านหลังโคโลนี	สีที่แพร่ลงในอาหาร
HT agar	5	ดี	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลอ่อน
HT agar	6	ดี	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาล
HT agar	7	ดี	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาล
HT agar	8	ดีมาก	มีมากที่สุด/สีเทา	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลเข้ม
HT agar	9	ดี	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาล
HT agar	10	ดี	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาล
nutrient agar	5	ดี	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลอ่อน	-
nutrient agar	6	ดี	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลอ่อน	-
nutrient agar	7	ดี	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลอ่อน	-
nutrient agar	8	ดี	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลอ่อน	-
nutrient agar	9	ดี	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลอ่อน	-
nutrient agar	10	ดี	มีมาก/สีเทา	สีน้ำตาลอ่อน	สีน้ำตาลอ่อน

4.3 การเจริญของแอคติโนมัยซีส E2/22 ที่อุณหภูมิต่างๆ

เชื้อแอคติโนมัยซีส E2/22 เจริญได้ดีมากใน HT agar ที่อุณหภูมิ 30-37 °C เวลา 14 วัน มีการสร้างสีน้ำตาลแพร่ลงมาในอาหารมากที่อุณหภูมิ 30°C เจริญได้น้อยที่อุณหภูมิ 28 °C และไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45°C ส่วนบน nutrient agar เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 28-30°C มีการสร้างสีน้ำตาลอ่อนแพร่ออกมาเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 28°C ที่อุณหภูมิ 37°C มีการเจริญได้ปานกลาง ส่วนที่อุณหภูมิ 45°C เชื้อไม่เจริญ ดังภาพ 4 และตาราง 5 สรุปได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีส E2/22 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C



ภาพ 6 การเจริญของแอคติโนมัยซีส E2/22 ที่อุณหภูมิ 28°C , 30°C และ 37°C บ่มบน HT agar (a) และ nutrient agar (b) เป็นเวลา 14 วัน

ตาราง 6 การเจริญของแอคติโนมัยซีส E2/22 ที่อุณหภูมิ 28, 30, 37 และ 45°C เป็นเวลา 14 วัน

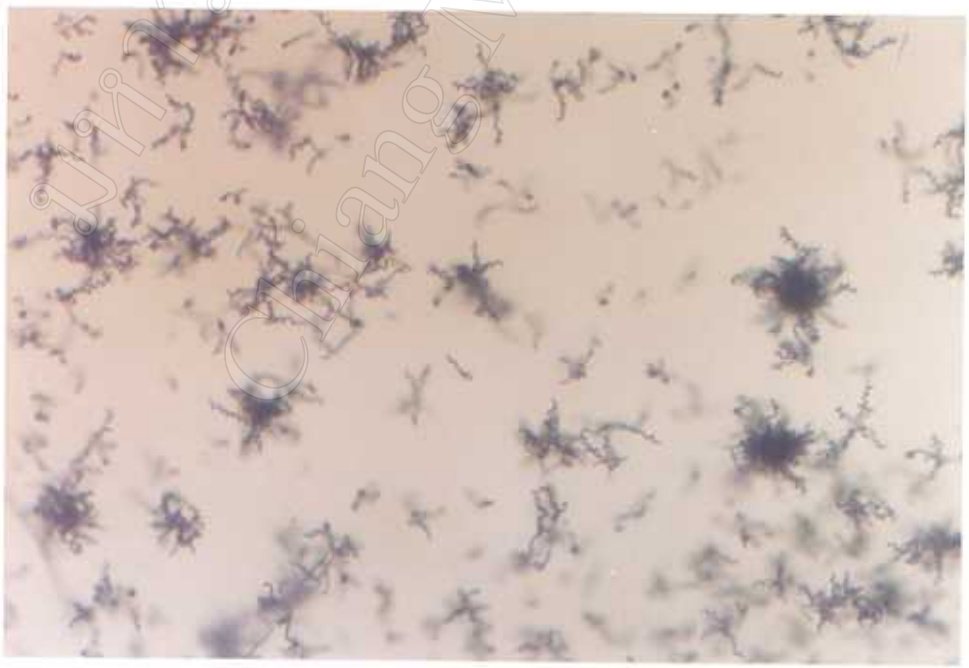
อาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ (°C)			
	28	30	37	45
HT agar				
การเจริญ	น้อย	ดีมาก	ดีมาก	ไม่เจริญ
สีที่แพร่ลงในอาหาร	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาล	-
nutrient agar				
การเจริญ	ดี	ดี	ปานกลาง	ไม่เจริญ
สีที่แพร่ลงในอาหาร	-	-	-	-

5. ผลการทดสอบชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีส E2/22

จากการทดสอบทางชีวเคมี (ตาราง 7) และลักษณะของเซลล์ที่ติดสีกรัมบวก มีการสร้าง aerial mycelium ที่เรียงต่อกันเป็นเซลล์ยาว (ภาพ 7) ลักษณะเหล่านี้จัดเป็นลักษณะประจำของจีนัส *Streptomyces*

ตาราง 7 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Streptomyces* sp. E2/22

การทดสอบ	คุณสมบัติทางชีวเคมี
การย่อยเคซีน	-
การย่อยแป้ง	+
การย่อยเจลาติน	+
การรีดิวซ์ไนเตรท	-
การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์	-
การทนเกลือ	6%



ภาพ 7 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยซีส E2/22 จากกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ(กำลังขยาย 100 เท่า)

6. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase โดย *Streptomyces* sp. E2/22

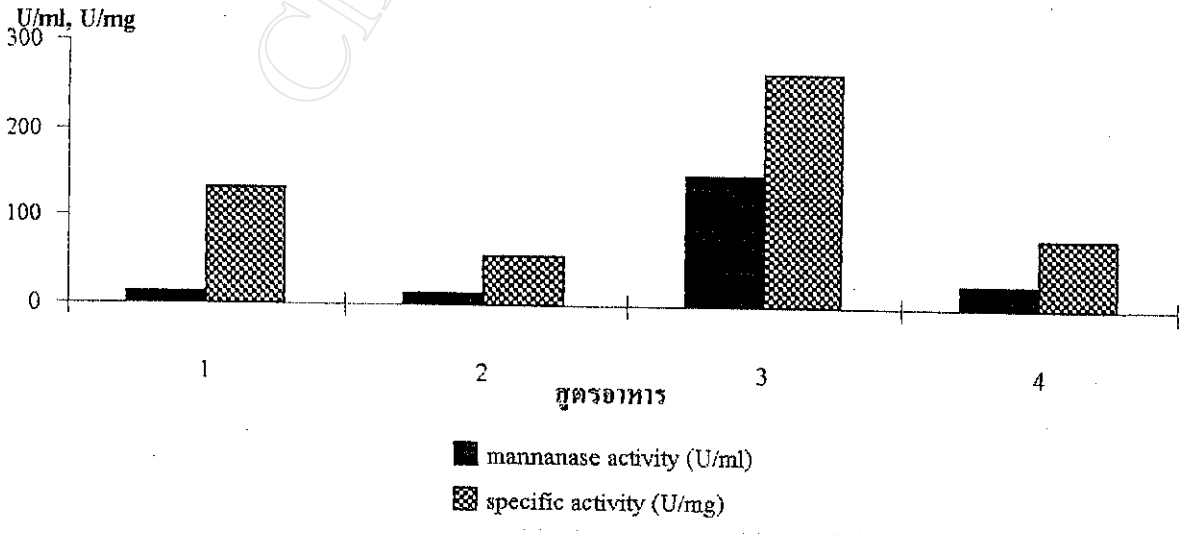
6.1 ผลของสูตรอาหารที่เหมาะสม

เมื่อเตรียมหัวเชื้อสำหรับใช้เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์จะพบเชื้อเป็นก้อน (pellet) ขนาด 1-2 มิลลิเมตรจากนั้นจึงนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์

จากการเลี้ยง *Streptomyces* sp.E2/22 ในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ 4 สูตรโดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 ° C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วันพบว่าเชื้อสามารถสร้าง mannanase ได้ในอาหารทั้ง 4 สูตร เมื่อตรวจวัด mannanase activity โดยใช้ locust bean gum 1.0% (w/v) เป็นสับสเตรทบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที พบว่าอาหารสูตรที่ 3 มีการสร้างเอนไซม์สูงที่สุด 148.39 U/ml และมีค่า specific activity 263.99 U/mg รองลงมาได้แก่อาหารสูตรที่ 4, 1 และ 2 ตามลำดับ แสดงค่าดังตาราง 8

ตาราง 8 mannanase activity ของ *Streptomyces* sp. E2/22 ในอาหารสูตรต่างๆ

สูตรอาหาร	mannanase activity (U/ml)	specific activity (U/mg)
1	12.27	132.79
2	11.91	54.08
3	148.39	263.99
4	24.93	77.36



ภาพ 8 mannanase activity ของ *Streptomyces* sp. E2/22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ

6.2 ผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต mannnanase

เมื่อเลี้ยง *Streptomyces* sp. E2/22 ในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย peptone 0.5%(w/v), KH_2PO_4 0.05%(w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%(w/v) pH 6.5 แล้วเติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 15 ชนิดคือ glucose, galactose, fructose, lactose, maltose, xylose, mannose, mannitol, sorbitol, soluble starch, locust bean gum, กากมะพร้าวป่น, แป้งบุก, mannan จาก *Acacia variabilis* และ mannan จาก *Acacia campanulatus* โดยเติมในปริมาณ 1.0%(w/v)บ่มที่อุณหภูมิ30° C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วันแล้วนำน้ำที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาทดสอบ enzyme activity และ specific activity ปรากฏว่าเมื่อใช้ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อนี้จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 46.87 U/ml และมี specific activity 443.84 U/mg ส่วนเมื่อใช้แป้งบุก, mannose, mannan จาก *Acacia campanulatus* และ mannan จาก *Acacia variabilis* เชื้อจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณรองลงมาคือเท่ากับ 4.7, 2.4, 1.8 และ 1.2 U/ml มี specific activity 18.43, 9.6, 3.0 และ 2.2 U/mg ตามลำดับแต่เมื่อใช้ glucose, galactose, fructose, lactose, maltose, xylose, sorbitol และ soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่า enzyme activity ต่ำกว่า 1.0 U/mlส่วนเมื่อใช้ mannitol และกากมะพร้าวป่นตากแห้งเป็นแหล่งคาร์บอนจะไม่สามารถตรวจพบน้ำตาลรีดิวซ์ได้ ดังตาราง 9

ตาราง 9 mannanase activity ของ *Streptomyces* sp.E2/22 ที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ

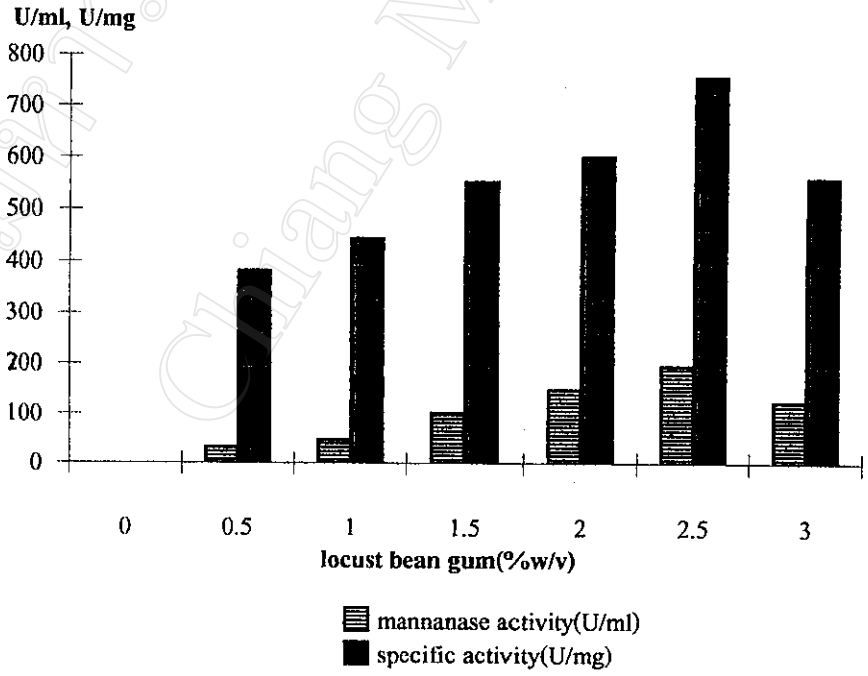
carbon source	mannanase activity (U/ml)	specific activity (U/mg)
glucose	0.8	3.1
galactose	0.6	3.3
fructose	0.4	2.3
lactose	0.6	4.0
maltose	0.6	1.9
xylose	0.4	1.4
mannose	2.4	9.6
mannitol	0	0
sorbitol	0.4	4.0
soluble starch	0.4	1.1
coconut residue	0	0
Acacia variabilis mannan	1.2	2.2
Acacia campanulatus mannan	1.8	3.0
konjac powder	4.7	18.43
locust bean gum	46.87	443.84
none	0	0

6.3 ผลการศึกษาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase

เมื่อบ่ม *Streptomyces* sp. E2/22 ในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย peptone 0.5 %(w/v), KH_2PO_4 0.05%(w/v)และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%(w/v) ที่มีปริมาณ locust bean gum ปริมาณ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วันแล้วแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบหาปริมาณเอนไซม์และโปรตีน พบว่าเมื่อใช้ locust bean gum 2.5 %(w/v)แล้ว *Streptomyces* sp. E2/22 จะผลิต mannanase ได้มากที่สุดคือ 196.08 U/ml มี specific activity เท่ากับ 756.19 U/mg ดังตาราง 10 ดังนั้นจึงใช้ locust bean gum 2.5% (w/v) ในการศึกษาต่อไป

ตาราง 10 mannanase activity ของ *Streptomyces* sp. E2/22 เมื่อใช้ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณต่างๆ

locust bean gum%(w/v)	mannanase activity (U/ml)	specific activity (U/mg)
0	0	0
0.5	30.93	381.38
1.0	46.87	443.84
1.5	102.11	551.57
2.0	148.69	600.04
2.5	198.08	756.19
3.0	124.49	559.76



ภาพ 9 mannanase activity ของ *Streptomyces* sp. E2/22 เมื่อใช้ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

6.4 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase

เมื่อบ่ม *Streptomyces* sp. E2/22 ในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย KH_2PO_4 0.05%(w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%(w/v)และ locust bean gum 2.5 %(w/v) ที่มี แหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน 9 ชนิดคือ คือ peptone, casein, casitone, beef extract, soy bean meal, tryptone, urea, $NaNO_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 0.5 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วันแล้วแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบหาปริมาณเอนไซม์และโปรตีน พบว่าเมื่อใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนแล้ว *Streptomyces* sp. E2/22 จะผลิต mannanase ได้ 177.65 U/ml มีค่า specific activity เท่ากับ 640.63 U/mg ถ้าใช้ casein เป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้ 226.50 U/ml มีค่า specific activity เท่ากับ 410.76 U/mg จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ casein เป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อจะมีค่า enzyme activity มากกว่าเมื่อใช้ peptone เป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่อสังเกตดูค่า specific activity จะพบว่าเมื่อใช้ peptone เป็นแหล่งคาร์บอนจะมีค่า specific activity มากกว่าเมื่อใช้ casein เป็นแหล่งคาร์บอน ดังตาราง 11 แสดงว่าเมื่อใช้ casein เป็นแหล่งคาร์บอนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดสอบมีโปรตีนอื่นๆปนมามากกว่าเมื่อใช้ peptone เป็นแหล่งคาร์บอนดังนั้นจึงใช้ peptone ในการศึกษาต่อไป

ตาราง 11 mannanase activity ของ *Streptomyces* sp. E2/22 เมื่อใช้ไนโตรเจนแหล่งต่างๆ

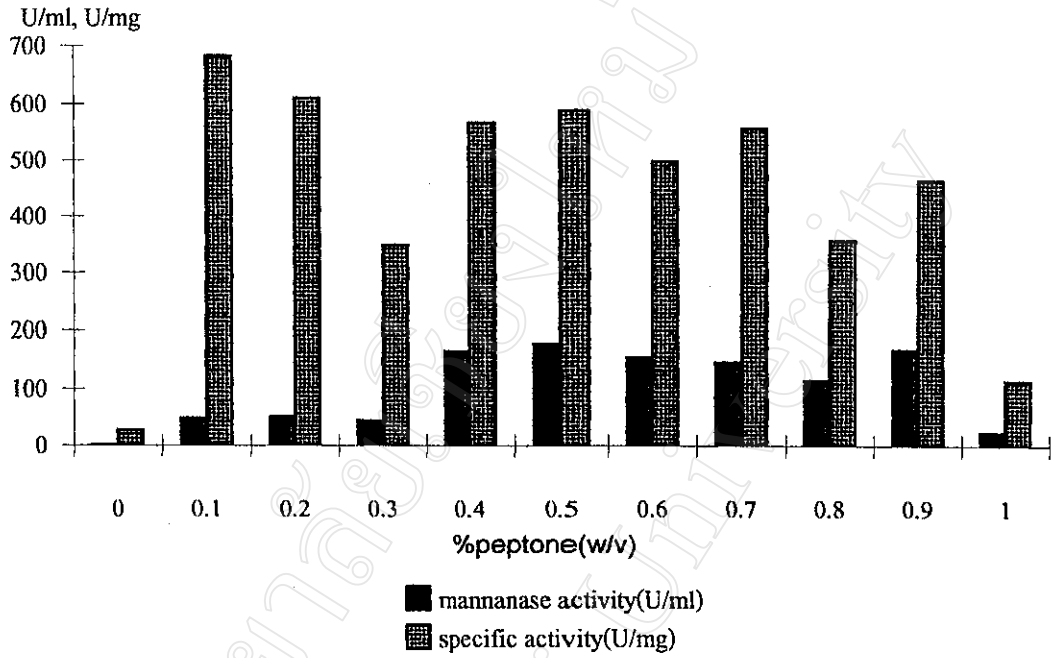
Nitrogen source	mannanase activity (U/ml)	specific activity (U/mg)
peptone	177.65	640.63
casein	226.50	410.76
casitone	5.25	171.57
beef extract	100.82	497.64
soy bean meal	21.12	285.02
tryptone	17.85	209.51
urea	7.56	45.21
$NaNO_3$	33.39	455.47
$(NH_4)_2SO_4$	0.09	2.5

6.5 ผลการศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase

หลังจากบ่ม *Streptomyces* sp. E2/22 ในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย locust bean gum 2.5%(w/v), KH_2PO_4 0.05%(w/v) และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%(w/v) ที่มี peptone 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0%(w/v) ที่อุณหภูมิ 30 ° C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วันแล้วแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบหาปริมาณเอนไซม์และโปรตีน พบว่าเมื่อใช้ peptone 0.5%(w/v) แล้ว *Streptomyces* sp. E2/22 จะผลิต mannanase ได้มากที่สุดคือ 176.34 U/ml และมี specific activity เท่ากับ 588.77 U/mg ดังตาราง 12 จึงใช้ peptone 0.5%(w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนในการศึกษาต่อไป

ตาราง 12 การผลิต mannanase ของ *Streptomyces* sp. E2/22 เมื่อใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ

%peptone(w/v)	mannanase activity (U/ml)	specific activity (U/mg)
0	1.17	26.73
0.1	48.36	683.09
0.2	51.35	609.86
0.3	43.79	348.92
0.4	163.45	567.73
0.5	176.34	588.77
0.6	153.70	498.39
0.7	144.92	557.18
0.8	114.85	356.33
0.9	116.21	463.36
1.0	23.00	113.64



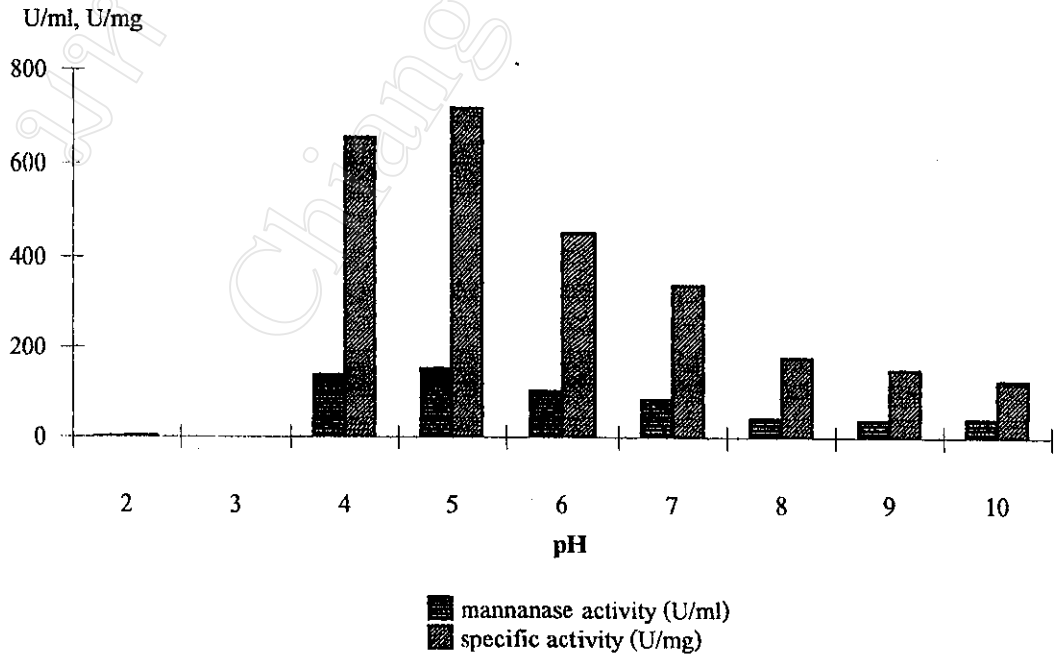
ภาพ 10 mannanase activity ของ *Streptomyces* sp. E2/22 เมื่อใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ

6.6 ผลการศึกษา pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase

เมื่อเตรียมหัวเชื้อโดยใช้ขดลวดสปริงใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ด้วยจะพบเชื้อเป็นก้อน (pellet) ขนาดเล็กลงกว่าเดิมโดยมีขนาด 0.5 มิลลิเมตรจากนั้นจึงนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ หลังจากบ่ม *Streptomyces* sp. E2/22 ในอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย locust bean gum 2.5%(w/v), peptone 0.5%(w/v), KH_2PO_4 0.05%(w/v) และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%(w/v) โดยมี pH เริ่มต้นต่างๆตั้งแต่ 2-10 บ่มที่อุณหภูมิ 30° C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วันแล้วแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบหาปริมาณเอนไซม์และโปรตีนพบว่าเมื่อ pH เริ่มต้นของอาหารเป็นกรดเท่ากับ 5.0 แล้ว *Streptomyces* sp. E2/22 จะผลิตเอนไซม์ mannanaseและมี specific activity สูงสุดคือ 151.45 U/ml และ 717.42 U/mg ตามลำดับ ส่วนที่ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 2 และ3 เชื้อ *Streptomyces* sp. E2/22 จะผลิตเอนไซม์ออกมาได้น้อยมาก เชื้อจะเริ่มผลิตเอนไซม์ออกมาได้ดีที่ pH เริ่มต้นตั้งแต่ 4 เมื่อ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 จะผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดแล้วการผลิตเอนไซม์จะลดลงตาม pH ที่เพิ่มขึ้นดังตาราง 13 ในการทดลองขั้นต่อไปจึงปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 5

ตาราง 13 mannanase activity ของ *Streptomyces* sp. E2/22 ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารต่างๆกัน

pH เริ่มต้นของอาหาร	mannanase activity(U/ml)	specific activity(U/mg)
2	1.30	2.56
3	0	0
4	138.14	655.74
5	151.45	717.42
6	100.98	451.52
7	81.38	337.24
8	40.66	176.46
9	36.19	149.99
10	39.56	125.16



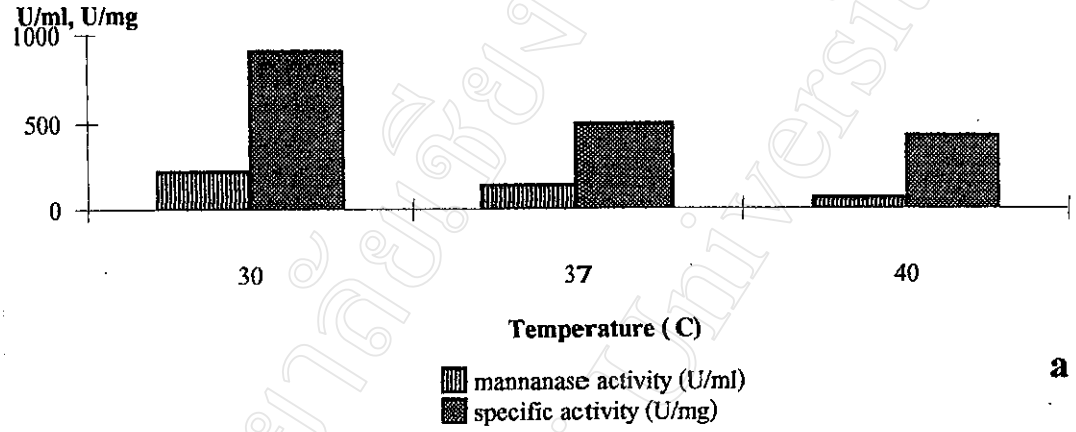
ภาพ 11 mannanase activity ของ *Streptomyces* sp. E2/22 ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารต่างๆกัน

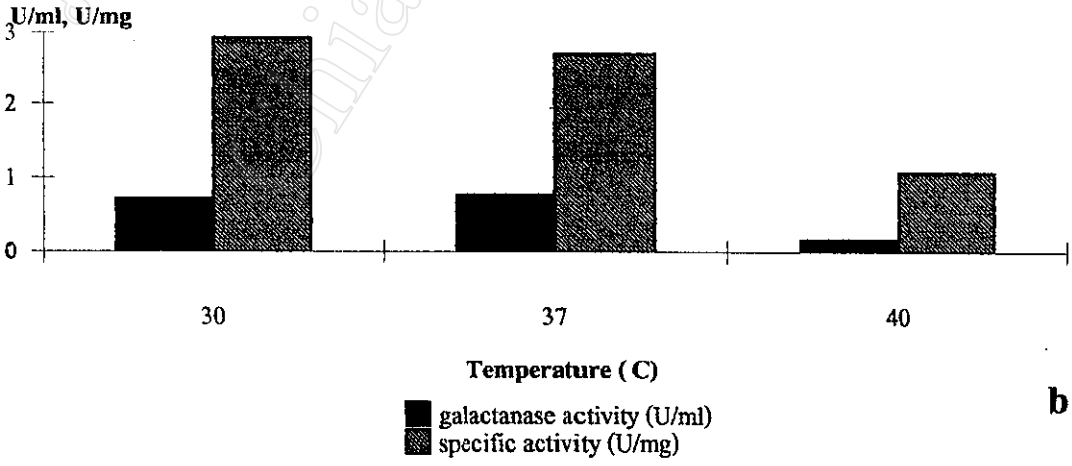
6.7 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase

หลังจากการบ่มเชื้อในอาหารซึ่งประกอบด้วย locust bean gum 2.5 %(w/v), peptone 0.5% (w/v), KH_2PO_4 0.05%(w/v) และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 %(w/v) pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ40 ° C บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วันแล้วพบว่าที่อุณหภูมิ 30 ° C เชื้อจะผลิต mannanase ได้มากที่สุดเท่ากับ 222.34 U/ml มี specific activity เท่ากับ 909.72 U/mg รองลงมาได้แก่ ที่อุณหภูมิ 37 ° C และอุณหภูมิ 40° C ตามลำดับส่วนการผลิต galactanase จะใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 30 ° C และ 37 ° C คือเท่ากับ 0.71 และ 0.76 U/ml และมี specific activity เท่ากับ 2.92 และ 2.69 U/mg ตามลำดับและจะลดลงที่อุณหภูมิ 40 °C ดังตาราง 14

ตาราง 14 mannanase activity และ galactanase โดย *Streptomyces* sp. E2/22 ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40°C

Temperature(°C)	mannanase		galactanase	
	activity (U/ml)	specific activity (U/mg)	activity (U/ml)	specific activity (U/mg)
30	222.34	909.72	0.71	2.92
37	139.25	495.20	0.76	2.69
40	65.18	425.15	0.16	1.06





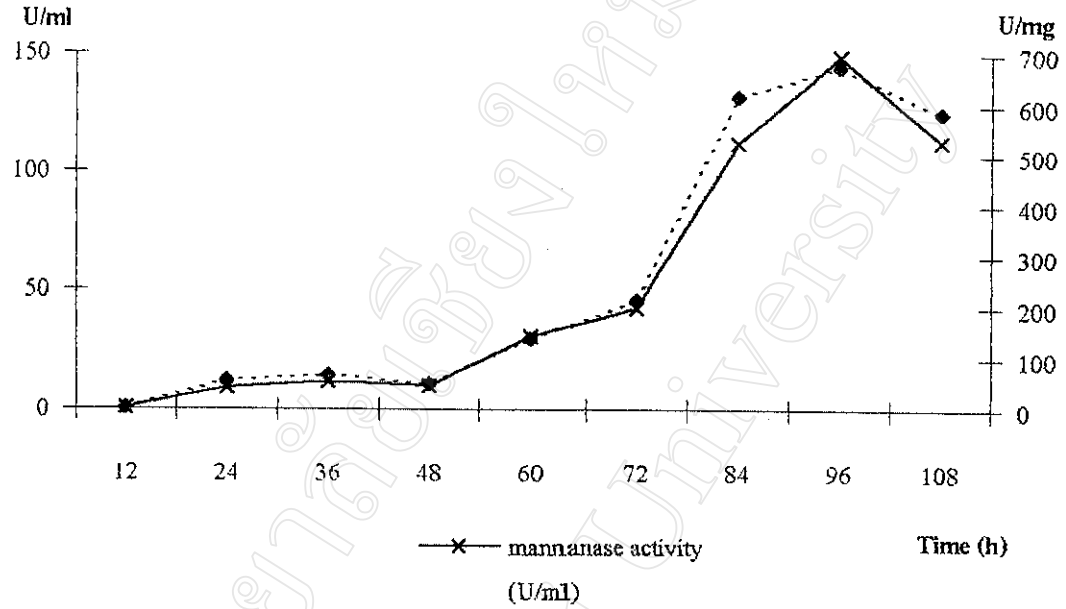
ภาพ 12 mannanase activity (a)และ galactanase activity (b) โดย *Streptomyces* sp. E2/22 ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40° C

6.8 ผลการศึกษาไคเนติกของการผลิต mannanase, galactanase และ β-mannosidase โดย *Streptomyces* sp. E2/22

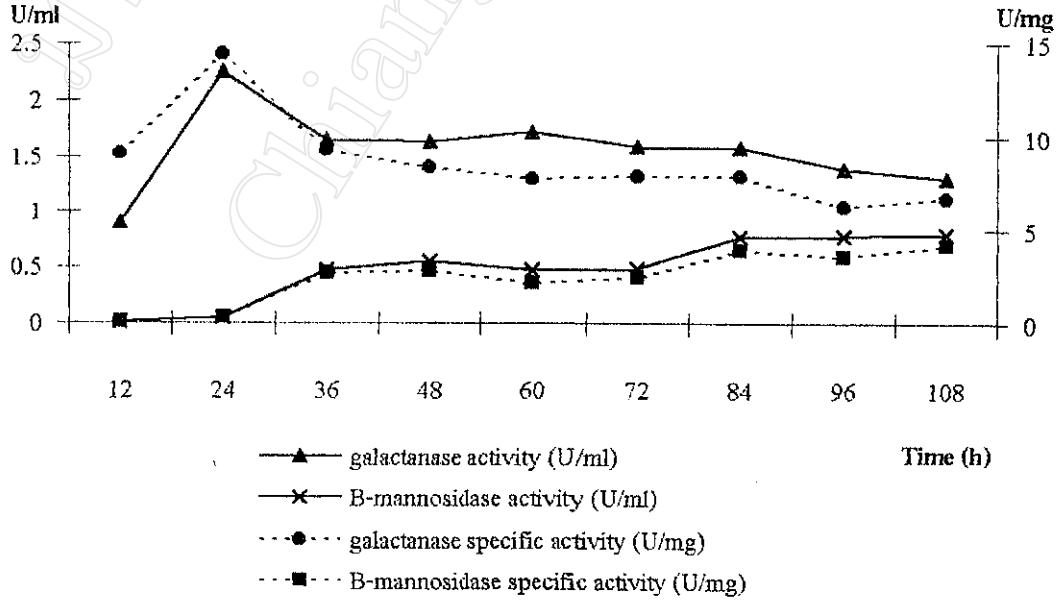
จากการบ่มเชื้อ *Streptomyces* sp. E2/22 ที่อุณหภูมิ 30 ° C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีแล้วแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบหาปริมาณเอนไซม์ต่างๆและโปรตีนในแต่ละช่วงเวลาพบว่าเชื้อจะค่อยๆผลิต mannanase มากขึ้น เชื้อจะผลิต mannanase ได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 149.92 U/ml มี specific activity เท่ากับ 675.62 U/mg จากนั้นการผลิตก็จะลดลง ในชั่วโมงที่ 24 เชื้อจะผลิต galactanase ได้สูงที่สุดโดยมี galactanase activity เท่ากับ 2.25 U/ml และมี specific activity 14.43 U/mg หลังจากนั้นเอนไซม์จะลดลงไปเรื่อยๆ ส่วนการผลิต β-mannosidase จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนค่าการผลิตเอนไซม์ค่อนข้างคงที่ในชั่วโมงที่ 86, 96 และ 108 โดยมีค่า β-mannosidase activity เท่ากับ 0.76, 0.77 และ 0.79 U/ml ตามลำดับหลังการบ่มเชื้อจะมีค่า pH เท่ากับ 8.0 เชื้อมีน้ำหนักแห้งสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 (ตาราง 15)

ตาราง 15 ไคเนติกของการผลิต mannanase, galactanase และ β-manosidase โดย *Streptomyces* sp. E2/22

Time (h)	mannanase		galactanase		*β-mannosidase*		dry weight(mg/10ml)
	U/ml	U/mg	U/ml	U/mg	U/ml	U/mg	
12	0.24	2.45	0.90	9.18	0.01	0.07	4
24	8.96	57.47	2.25	14.43	0.05	0.31	10
36	11.76	66.40	1.65	9.32	0.47	2.63	32
48	9.75	50.33	1.63	8.41	0.54	2.76	54
60	30.55	138.30	1.72	7.79	0.47	2.11	56
72	42.20	211.53	1.58	7.92	0.48	2.42	52
84	112.31	617.10	1.57	7.92	0.76	3.85	48
96	149.92	675.62	1.38	6.22	0.77	3.47	46
108	113.25	584.97	1.30	6.71	0.79	4.10	42



ภาพ 13 ไคเนติกของการผลิต mannanase โดย *Streptomyces* sp. E2/22



ภาพ 14 ไคเนติกของการผลิต galactanase และ β-mannosidase โดย *Streptomyces* sp. E2/22

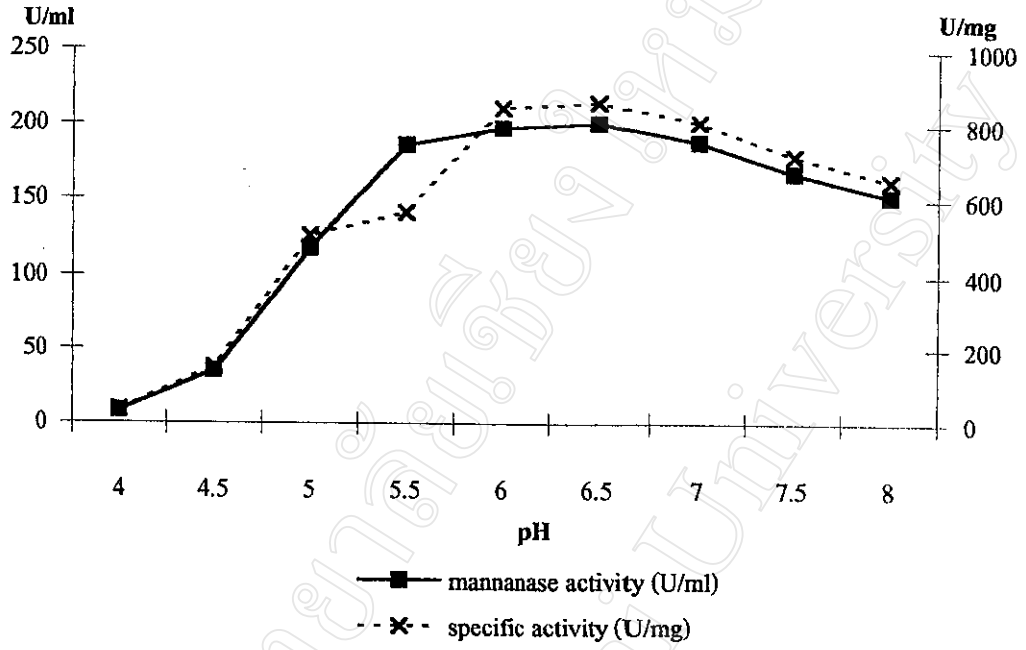
7. ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของ crude enzyme mannanase

7.1 ผลของ pH ต่อ mannanase activity

หลังจากบ่ม crude enzyme กับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 30° C เป็นเวลา 30 นาทีที่ pH ต่างๆพบว่าจาก pH 4.0 ค่า mannanase activity จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งที่ pH 6.0 และ 6.5 จะมีค่า mannanase activity ใกล้เคียงกันคือ 197.60 และ 201.45 ตามลำดับแต่ที่ pH 6.5 ค่า mannanase activity และ specific activity สูงสุดคือ 201.45 U/ml และ 861.28 U/mg ตามลำดับ เมื่อ pH เพิ่มขึ้นอีกค่า enzyme activity จะค่อยๆลดลง (ตาราง 16) ดังนั้นในการทดสอบต่อไปจึงใช้ 0.1M phosphate buffer pH 6.5 ในการทำปฏิกิริยา

ตาราง 16 ผลของ pH ต่อการทำงานของ mannanase

pH	mannanase activity (U/ml)	specific activity (U/mg)
4.0	8.23	35.17
4.5	35.19	150.46
5.0	118.16	505.19
5.5	186.18	566.19
6.0	197.60	844.83
6.5	201.45	861.28
7.0	188.53	806.03
7.5	167.95	718.04
8.0	152.48	651.92



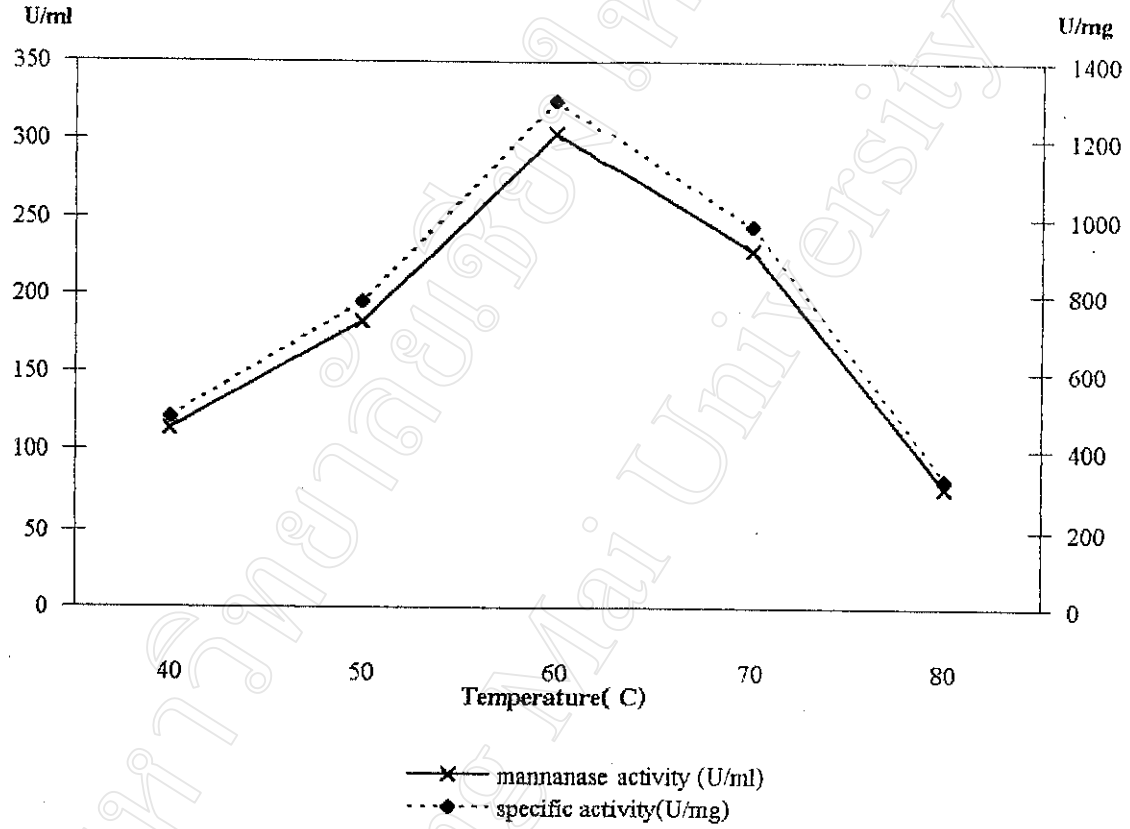
ภาพ 15 ผลของ pH ต่างๆที่มีต่อการทำงานของ mannanase

7.2 ผลของอุณหภูมิต่อ mannanase activity

หลังจากบ่ม curude enzyme กับสับสเตรทที่ละลายใน phosphate buffer 0.1 M pH6.5 ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 °C เป็นเวลา 30 นาทีพบว่าที่อุณหภูมิ 60°C จะมีค่า mannanase activity สูงสุดคือ 303.88 U/ml และมี specific activity เท่ากับ 1299.19 U/mg ดังตาราง 17

ตาราง 17 การทำงานของ mannanase ที่อุณหภูมิต่างๆ

Temperature(°C)	mannanase activity(U/ml)	specific activity (U/mg)
40	112.98	483.03
50	182.79	781.49
60	303.88	1299.19
70	228.82	978.28
80	76.73	328.05



ภาพ 16 การทำงานของ mannanase ที่อุณหภูมิต่างๆ

7.3 ผลของเวลาต่อ mannanase activity

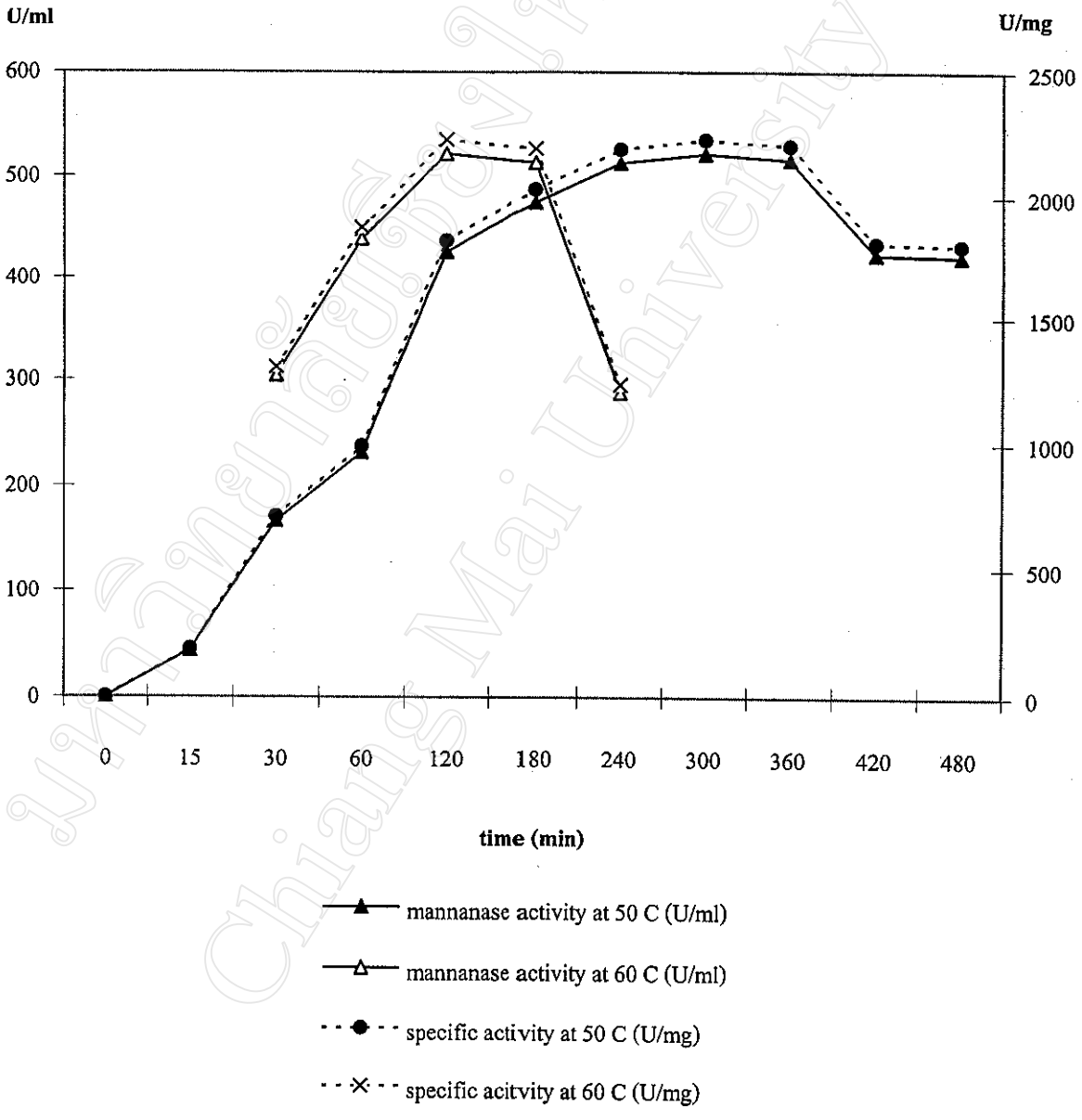
เมื่อบ่ม crude enzyme กับสับสเตรทที่ละลายใน phosphate buffer 0.1 M pH6.5 ที่อุณหภูมิ 50 °C ปรากฏว่าค่า mannanase activity จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปจนกระทั่งที่เวลา 300 นาที (5 ชั่วโมง) จะมีค่า mannanase activity สูงที่สุดคือ 521.33 U/ml มี specific activity เท่ากับ 2228.87 U/mg หลังจากนั้นค่า mannanase activity และspecific activity จะลดลงแต่เมื่อบ่มcrude enzyme กับสับสเตรทที่ละลายด้วย phosphate buffer 0.1 M pH6.5 ที่อุณหภูมิ 60 °C จะพบว่าค่า mannanase activity จะสูงสุดเมื่อ 120 นาที (2 ชั่วโมง) คือเท่ากับ 521.68 U/ml และมี specific activity เท่ากับ 2230.35 U/mg (ตาราง 18)

ตาราง 18 การทำงานของ mannanase ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 °C ที่เวลาต่างๆ

Time (min)	mannanase at 50 °C		mannanase at 60 °C	
	activity (U/ml)	specific activity(U/mg)	activity (U/ml)	specific activity (U/mg)
0	0	0	-	-
15	43.72	186.93	-	-
30	166.42	711.49	303.88	1299.19
60	231.83	991.13	438.51	1874.77
120	425.85	1820.65	521.68	2230.35
180	474.72	2029.58	513.28	2194.44
240	512.63	2191.66	287.83	1230.57
300	521.33	2228.87	-	-
360	515.86	2205.46	-	-
420	423.39	1810.15	-	-
480	421.07	1800.23	-	-

- = ไม่ได้ทำการทดสอบ

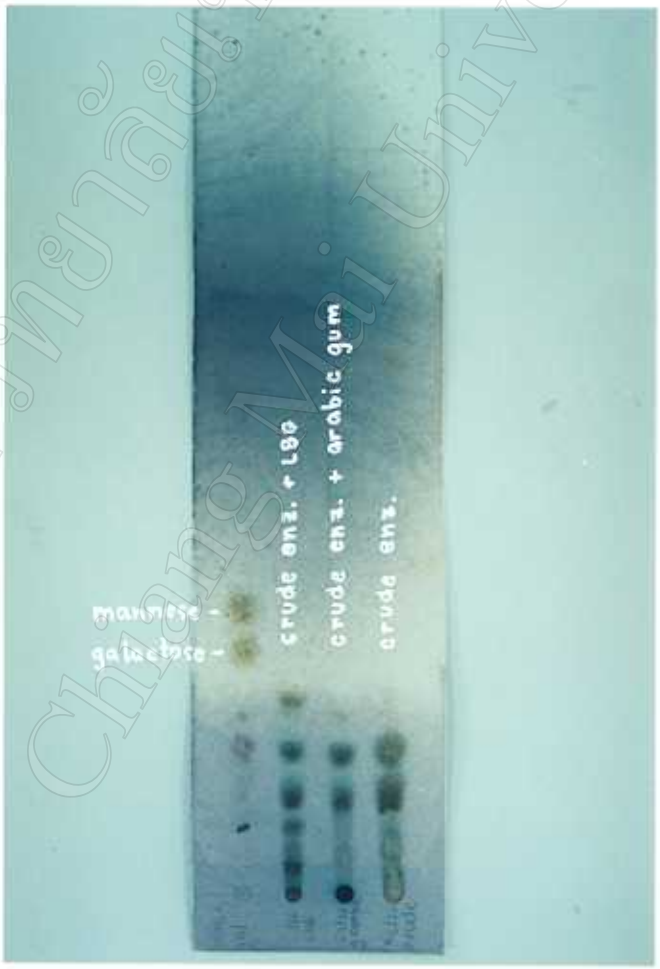
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



ภาพ 17 การทำงานของ mannanase ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 °C ที่เวลาต่างๆ

8. การตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มสับสเตรทกับ crude enzyme

หลังจากบ่มสับสเตรทกับ crude enzyme แล้วนำไปตรวจสอบชนิดของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธี Thin layer chromatography แล้วพบว่า crude enzyme นี้สามารถย่อยสับสเตรทเป็นโมเลกุลเล็กๆได้ (ภาพ 18)



ภาพ 18 ผลการตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักใน locust bean gum และ arabic gum เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University