# การผลิตน้ำตาลไซโลเตตระโอสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยเอนไซม์ไซลาโนไลติกจากแบคทีเรียชอบร้อน *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12

**จิตรลดา ฐิติกรอมร [1] คิน เลย์ คู [2] กนก รัตนะกนกชัย[3] ***

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ท่าข้าม บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

**และ ยัน เซ็ค ลี [4]**

Kyung Hee University, 1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, South Korea

*รับเมื่อ 14 กรกฎาคม 2551 ตอบรับเมื่อ 6 กุมภาพันธ์ 2552*

## บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกแบคทีเรีย 21 สายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างดินบริเวณโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษ พบว่าแบคทีเรียชอบร้อน *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 สามารถผลิตน้ำตาลไซโลเตตระโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลักในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมี birchwood xylan เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อนำ crude xylanolytic enzyme ที่ประกอบด้วยไซลาเนส 3 ชนิด เบต้าไซโลซิเดส อะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะเซทิลเอสเตอเรสที่ผลิตจากแบคทีเรียนี้มาย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าย่อยแกลบได้ดีกว่าเปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด ฟางข้าว และชานอ้อย เมื่อตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ถูกผลิตขึ้น พบว่าเอนไซม์ไซลาโนไลติกย่อยแกลบได้น้ำตาลไซโลสและไซโลเตตระโอส ในขณะที่ย่อยเปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด ชานอ้อย และฟางข้าวจะได้น้ำตาลไซโลเตตระโอสเพียงชนิดเดียว น้ำตาลไซโลเตตระโอสเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้มากมาย

**คำสำคัญ :** วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร / *Anoxybacillus* sp. / แบคทีเรียชอบร้อน / เอนไซม์ไซลาโนไลติก / น้ำตาลไซโลเตตระโอส

**Corresponding author: E-mail: khanok.rat@kmutt.ac.th*

*[1] นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

*[2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

*[3] รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

*[4] Lecturer, Department of Medical Zoology, College of Medicine*

# Production of Xylotetraose from Agricultural Residues by Using Xylanolytic Enzyme from Thermophilic *Anoxybacillus* sp. Strain JT-12

**Jitladda Thitikorn-amorn [1], Khin Lay Kyu [2], Khanok Ratanakhanokchai [3*],**
King Mongkut's University of Technology Thonburi, Takham, Bangkhuntien, Bangkok 10150
**and Yun-Sik Lee [4]**
Kyung Hee University, 1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, South Korea

*Received 14 July 2008 2007 ; accepted 6 February 2009*

## Abstract

Among 21 microorganisms isolated from a soil sample of pulp and paper industry, a thermophilic *Anoxybacillus* sp. strain JT-12 was found to produce xylotetraose as the main product during cultivation on medium containing birchwood xylan as a sole carbon source. Hydrolysis of agriculture residues such as rice husk, corn hull, corn cob, rice straw and bagasse by the crude xylanolytic enzyme (consist of 3 types of xylanases, β-xylosidase, arabinofuranosidase and acetylesterase) was investigated at pH 7.0, 50ºC for 48 hours. The results showed that it could hydrolyze rice husk better than corn hull, corn cob, rice straw and bagasse. The enzymatic products of rice husk were xylose and xylotetraose while the hydrolysis of corn hull, corn cob, rice straw and bagasse yielded only xylotetraose. Xylotetraose is a high valuable product and can be used in many manufacturers.

**Keywords :** Agricultural residue / *Anoxybacillus* sp. / Thermophilic bacterium / Xylanolytic enzyme / Xylotetraose

**Corresponding author: E-mail: khanok.rat@kmutt.ac.th*

*[1] Graduate Student, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

*[2] Assistant Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

*[3] Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

*[4] Lecturer, Department of Medical Zoology, College of Medicine.*

## 1. บทนำ

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชที่มีโครงสร้างซับซ้อน ไซแลนมีโครงสร้างหลักเป็นน้ำตาลไซโลสหลายหน่วยย่อยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1,4-β-D-xylosidic และมีกิ่งก้านที่เกิดจากน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดต่างๆ ทำให้การย่อยสลายให้สมบูรณ์เกิดขึ้นได้ยาก การย่อยสลายโครงสร้างที่ซับซ้อนของไซแลนต้องอาศัยเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกหลายชนิดทำงานร่วมกัน (synergistic action) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างหลัก ได้แก่ เอ็กโซไซลาเนส เอ็นโดไซลาเนส และเบต้าไซโลซิเดส โดยมีหน้าที่ย่อยสลายพันธะ 1,4-β-D-xylosidic ของโครงสร้างหลักไซแลน และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยบริเวณกิ่งก้าน (debranching enzymes) ได้แก่ อะราบิโนฟูราโนซิเดสทำหน้าที่ตัดพันธะระหว่างน้ำตาลอะราบิโนสกับโครงสร้างหลักไซแลน อะเซทิลเอสเตอเรสทำหน้าที่ตัดพันธะระหว่างหมู่อะเซทิลจากโครงสร้างหลักไซแลน กลูคูโรนิเดสทำหน้าที่ตัดพันธะระหว่างเมทธิวกลูคูโรนิคแอซิด (methylglucuronic acid) กับโครงสร้างหลักไซแลน และฟีโนลิกแอซิดเอสเตอเรส (phenolic acid esterase) ย่อยกรดอะโรมาติกออกจากน้ำตาลอะราบิโนส [1-2] เอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกผลิตได้จากแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีส [1] ปัจจุบันเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกจากจุลินทรีย์ชอบร้อนได้รับความสนใจจากอุตสาหกรรมในการนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตเพื่อลดต้นทุนในขั้นตอนการหล่อเย็น [3]

น้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีขนาด degree of polymerization (DP) ประมาณ 2-7 ที่ผลิตได้จากการย่อยไซแลน [4] การผลิตน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากไซแลนอาจผลิตได้ด้วยวิธีทางเคมีและ/หรือวิธีทางเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม การผลิตด้วยวิธีทางเคมีจะได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด เกิดสารพิษไม่สามารถควบคุมได้ ต้องใช้น้ำและสารเคมีในปริมาณมาก และต้องใช้พลังงานสูงในการผลิต ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม ในขณะที่การผลิตโดยวิธีทางเอนไซม์ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า เนื่องจากเอนไซม์ไซลาโนไลติกมีความไวและความจำเพาะสูงต่อการย่อยไซแลน [5] น้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาสูงขึ้นกับความบริสุทธิ์และขนาดของ DP (ขนาดใหญ่มีราคาแพงกว่า) ในปัจจุบันน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้รับความนิยมในการนำไปเป็นส่วนประกอบของอาหารประเภท functional food และเป็น active component ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและยา [6] เนื่องจากน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และสภาวะความเป็นกรดของของเหลวภายในกระเพาะอาหาร แต่ถูกย่อยได้ด้วยแบคทีเรียชนิดที่เป็นผลดีต่อสุขภาพภายในลำไส้ จึงมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก โดยมีหน้าที่กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ เช่น สกุล *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* บางสปีชี่ [6-7] อีกทั้งลดความเข้มข้นของกรดน้ำดี ซึ่งหลั่งออกมาเป็นครั้งที่ 2 ระหว่างกระบวนการย่อย ซึ่งกรดน้ำดีครั้งที่ 2 นี้ส่งผลเสียต่อลำไส้ใหญ่ และกระตุ้นการเกิดเนื้องอก นอกจากนี้ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์มีคุณสมบัติทางเภสัชกรรม เช่น ต่อต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันและควบคุมโรคโลหิตจางและการแข็งตัวของเส้นเลือดแดง ต่อต้านการอักเสบ ยับยั้งการปลดปล่อยฮีสตามีน ป้องกันโรคเบาหวานชนิดที่ 2 [6] ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และ *Helicobacter pylori* [8] ต่อต้านและยับยั้งการเจริญของ *Vibrio anguillarum* ต่อต้านอาการแพ้ ปรับระบบภูมิคุ้มกัน และป้องกันและรักษาความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน [6] เป็นต้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกบาซิลลัสชอบร้อนที่ผลิตเอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติก และย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว ซึ่งน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาสูง แต่ผลิตได้ยากในปัจจุบัน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยหรือนำไปเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอางและอาหารต่อไป

## 2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

### 2.1 การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์

คัดแยกบาซิลลัสชอบร้อนจากตัวอย่างดินบริเวณรอบๆ โรงงานผลิตเยื่อและกระดาษของบริษัทเยื่อกระดาษสยามจำกัด (มหาชน) จังหวัดราชบุรี ในสูตรอาหารแข็งของ Berg และคณะ [9] ซึ่งเป็น selective medium ต่อการเจริญของ *Bacillus* spp. ที่ประกอบด้วย

$NaNO_3$ ร้อยละ 0.2, $K_2HPO_4$ ร้อยละ 0.05, $MgSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.02, $MnSO_2.H_2O$ ร้อยละ 0.002, $FeSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.002 และ $CaCl_2.2H_2O$ ร้อยละ 0.002 และมี birchwood xylan (Sigma-Aldrich Inc.) ร้อยละ 0.75 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 55 °C เมื่อได้บาซิลลัสบริสุทธิ์ที่ทำให้เกิดวงใส (clear zone) ในจานอาหารเพาะเชื้อ จึงคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวของ Berg และคณะ [9] ที่มี birchwood xylan ร้อยละ 0.75 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มใน incubator shaker ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 55 °C เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกกากเซลล์และไซแลนออกที่ความเร็ว 8,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำส่วนใสบางส่วนมาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมัก ส่วนใสที่เหลือเก็บไว้เป็น crude enzyme สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

### 2.2 การจำแนกจุลินทรีย์

ศึกษาสมบัติทางกายภาพของบาซิลลัสชอบร้อนที่คัดเลือกไว้ แล้วจำแนกตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [10] และเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับ 16S rDNA ของจุลินทรีย์ [11] จากฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST ของ National Center of Biotechnology Information databases (NCBI databases)

### 2.3 การเตรียมเอนไซม์

การเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างเอนไซม์จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตตามวิธีของ Harris และ Angal [12] โดยวัดปริมาตรแล้วนำไปคำนวณหาปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องใช้ในการตกตะกอน หลังจากนั้นตกตะกอนเอนไซม์ที่ความเข้มข้นอิ่มตัว (saturation) ร้อยละ 90 ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยค่อยๆ เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตบดที่เตรียมไว้ในบีกเกอร์ที่บรรจุเอนไซม์ที่ตั้งบน magnetic stirrer ที่มีถาดน้ำแข็งเพื่อหล่อเย็นเอนไซม์ ภายหลังจากเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตหมดแล้ว ปล่อยให้กวนต่อไปอีกสักครู่ ทิ้งไว้ในห้องเย็นให้โปรตีนตกตะกอนข้ามคืนจนสมบูรณ์ แล้วนำของเหลวทั้งหมดใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงนำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แยก supernatant ทิ้งไป ละลายตะกอนที่ติดอยู่ในหลอดปั่นเหวี่ยงด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ในปริมาณที่น้อยที่สุดที่จะละลายตะกอนได้หมด นำสารละลายเอนไซม์ ที่ได้ไป dialysis ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ วัดปริมาตรที่ได้แล้วนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

### 2.4 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์

ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส คาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส และอะไวซิเลส (เอนไซม์แต่ละชนิดใช้ไซแลน คาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส และอะไวเซล (Sigma-Aldrich Inc.) เป็นซับสเตรต ตามลำดับ) ด้วยวิธีของ Ratanakhanokchai และคณะ [13] ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีของ Somogyi [14] สำหรับเอนไซม์ไซลาเนสใช้ไซโลส (Merck KGaA) เป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ส่วนคาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลสและอะไวซิเลสใช้กลูโคส (Merck KGaA) ในการเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

เอนไซม์ไซลาเนส คาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส หรืออะไวซิเลส 1 ยูนิต (U) หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยซับสเตรตโดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ตามลำดับ ภายใต้ภาวะที่ทำการทดสอบ

ตรวจสอบกิจกรรมของเบต้าไซโลซิเดส เซลโลไบโอไฮโดรเลส และเบต้ากลูโคซิเดส ด้วยวิธีของ Kyu และคณะ [15] และ Kohring และคณะ [16] (เอนไซม์แต่ละชนิดใช้ *p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside, *p*-nitrophenyl-β-D-cellobioside และ *p*-nitrophenyl-β-D glucopyranoside (Sigma-Aldrich Inc.) เป็นซับสเตรต ตามลำดับ) ตรวจหาปริมาณ *p*-nitrophenol (Sigma-Aldrich Inc.) ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

ตรวจสอบกิจกรรมของอะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะเซทิลเอสเตอเรสโดยวิธีของ Mockenzie และ Bilous [17] โดยใช้ *p*-nitrophenyl-β-D-arabinofuranoside

และ *p*-nitrophenyl acetate (Sigma-Aldrich Inc.) เป็นซับสเตรต ตามลำดับ ตรวจหาปริมาณ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส เซลโลไบโอไฮโดรเลสเบต้ากลูโคซิเดส อะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะเซทิลเอสเตอเรส 1 ยูนิต (U) หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิต *p*-nitrophenol 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดสอบ

### 2.5 การตรวจสอบปริมาณโปรตีน

ตรวจวัดปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างโดยวิธีของ Lowry และคณะ [18] และใช้สารละลาย bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Inc.) เป็นสารมาตรฐานในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

### 2.6 Gel electrophoresis และ zymogram

การตรวจสอบขนาดและจำนวนของโปรตีนในตัวอย่างใช้วิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีการของ Laemmli [19] และการตรวจสอบจำนวนไซลาเนสใช้วิธี xylanase zymogram ตามวิธีของ Ratanakhanokchai และคณะ [13] โดยเติม soluble birchwood xylan ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในแผ่นเจล

### 2.7 การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

บ่มวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ แกลบ เปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด ฟางข้าว และชานอ้อยร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 กับ crude xylanolytic enzyme ที่มีกิจกรรมไซลาเนส 0.1 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 50 °C เก็บตัวอย่างหลังการย่อยที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6, 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกิจกรรมการย่อยสลายของ crude xylanolytic enzyme โดยวิธีของ Somogyi [14] และวิเคราะห์ชนิดของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ด้วยเทคนิค thin-layer chromatography (TLC) [20]

### 2.8 การตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์น้ำตาล

ตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยวิธี TLC [20] โดยอบแผ่น silica gel (aluminum sheets silica gel 60 $F_{254}$, Merck) ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในโหลกันชื้น จากนั้นหยดสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตรบนแผ่น silica gel ทำให้แห้งด้วยเครื่องเป่าผม แล้วนำไปจุ่มใน developing solvent ที่ประกอบด้วย *n*-butanol, acetic acid และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 5:2:3 (โดยปริมาตร) จนกระทั่ง solvent เคลื่อนที่ขึ้นไปประมาณ 3/4 ของแผ่น TLC วางแผ่น silica gel ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นพ่นด้วยสารละลาย aniline : α-diphenylamine : acetone : phosphoric acid (1 มล. : 1 กรัม : 50 มล. : 7.5 มล.) แล้วอบที่อุณหภูมิ 100 °C จนเห็นตัวอย่างชัดเจน โดยสารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ น้ำตาลไซโลสและน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ขนาดต่างๆ ที่ได้จากการย่อย oat spelt xylan ด้วยเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Bacillus* sp. strain K-1 [13]

## 3. ผลการทดลองและวิจารณ์

### 3.1 การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์

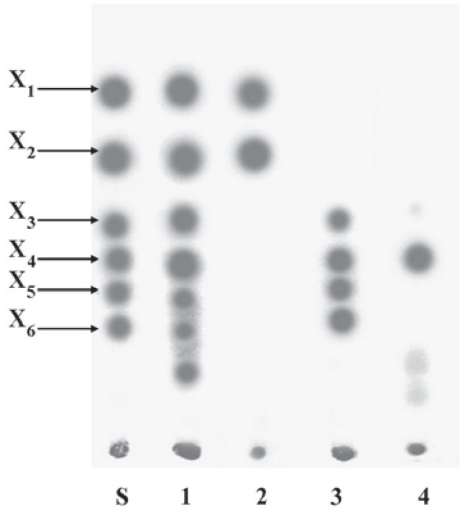
จากการแยกบาซิลลัสชอบร้อนจากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณรอบๆ โรงงานผลิตเยื่อและกระดาษของบริษัทเยื่อกระดาษสยาม จำกัด (มหาชน) ในอาหารสูตรของ Berg และคณะ [9] โดยมีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิสูง 55 °C พบว่าสามารถแยกบาซิลลัสสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ย่อยไซแลนได้จำนวน 21 สายพันธุ์ (JT-1 ถึง JT-21) ซึ่งบาซิลลัสแต่ละชนิดผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ และให้กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าจากบาซิลลัสบริสุทธิ์ 21 สายพันธุ์มีเพียงสายพันธุ์ที่ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาเล็กน้อย ซึ่งได้แก่ บาซิลลัสสายพันธุ์ JT-2, 4, 6, 7, 9, 13 และ 16 ในขณะที่บาซิลลัสบริสุทธิ์อีก 14 สายพันธุ์ ได้แก่ บาซิลลัสสายพันธุ์ JT-1, 3, 5, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20 และ 21 สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณมาก สาเหตุที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกันนี้อาจเนื่องจากบาซิลลัสบริสุทธิ์แต่ละชนิดมีอัตราการนำน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยไซแลนไปใช้แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรีย

แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ไม่ต่างกันมากนัก และเมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์น้ำตาลในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย พบว่า 14 สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณน้ำตาลสูง จากเทคนิค TLC สามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 4 กลุ่มตามรูปแบบผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้น ดังรูปที่ 1

**ตารางที่ 1** ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ และกิจกรรมของไซลาเนส ในอาหารที่เพาะเลี้ยงที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 2 วัน โดยมี birchwood xylan เป็นแหล่งคาร์บอน

| รหัสจุลินทรีย์ | น้ำตาลรีดิวซ์* (มก./ล.) | กิจกรรมไซลาเนส* (ยูนิต/ล.) |
|---|---|---|
| JT-1 | 220.8 ± 9.5 | 9.5 ± 0.3 |
| JT-2 | 1.9 ± 0.2 | 5.0 ± 0.2 |
| JT-3 | 206.5 ± 7.3 | 6.9 ± 0.5 |
| JT-4 | 3.5 ± 0.2 | 8.0 ± 0.5 |
| JT-5 | 276.9 ± 8.4 | 8.8 ± 0.1 |
| JT-6 | 5.0 ± 0.5 | 4.0 ± 0.2 |
| JT-7 | 3.1 ± 0.2 | 9.0 ± 0.3 |
| JT-8 | 196.5 ± 8.3 | 3.5 ± 0.2 |
| JT-9 | 5.0 ± 0.1 | 5.0 ± 0.3 |
| JT-10 | 168.1 ± 4.4 | 9.1 ± 0.4 |
| JT-11 | 189.6 ± 3.9 | 3.2 ± 0.1 |
| JT-12 | 231.5 ± 7.3 | 8.5 ± 0.2 |
| JT-13 | 10.4 ± 1.1 | 8.0 ± 0.4 |
| JT-14 | 401.5 ± 6.8 | 2.4 ± 0.1 |
| JT-15 | 192.5 ± 4.6 | 6.9 ± 0.3 |
| JT-16 | 3.8 ± 0.3 | 2.0 ± 0.1 |
| JT-17 | 202.7 ± 2.3 | 3.2 ± 0.1 |
| JT-18 | 520.4 ± 8.8 | 7.6 ± 0.4 |
| JT-19 | 194.6 ± 3.4 | 3.5 ± 0.2 |
| JT-20 | 205.4 ± 5.1 | 4.6 ± 0.3 |
| JT-21 | 195.2 ± 2.9 | 9.7 ± 0.4 |

* ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง




**รูปที่ 1** TLC ของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลวที่มี birchwood xylan เป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 2 วัน (S = น้ำตาลมาตรฐานจากการย่อย oat spelt xylan ด้วยไซลาเนสจาก *Bacillus* sp. strain K-1 [13] แถวที่ 1-4 เป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ผลิตโดยบาซิลลัสกลุ่มต่างๆ)
$X_1$ = ไซโลส, $X_2$ = ไซโลไบโอส, $X_3$ = ไซโลไตรโอส, $X_4$ = ไซโลเตตระโอส,
$X_5$ = ไซโลเพนตระโอส และ $X_6$ = ไซโลเฮ็กซะโอส

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ บาซิลลัสสายพันธุ์ JT-1, 11, 14, 15, 17, 18, 19 และ 21 ซึ่งเป็นบาซิลลัสกลุ่มใหญ่ที่ผลิตน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่างๆ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ บาซิลลัสสายพันธุ์ JT-3, 8, 10 และ 20 ซึ่งผลิตเฉพาะน้ำตาลขนาดโมเลกุลเล็ก ได้แก่ น้ำตาลไซโลสและน้ำตาลไซโลไบโอส ซึ่งเหมาะต่อการนำไปผลิตเป็นเอทานอล (ราคาลิตรละ 19.33 บาท [21]) แต่เป็นผลผลิตราคาต่ำกว่าน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีราคาเฉลี่ยประมาณกิโลกรัมละ 690 บาท [6] กลุ่มที่ 3 มีเพียงแบคทีเรียชนิดเดียว (JT-5) ที่ผลิตน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ขนาดระหว่างน้ำตาลไซโลไตรโอสถึงเฮ็กซะโอส ($X_3$-$X_6$) และกลุ่มที่ 4 มีบาซิลลัสสายพันธุ์ JT-12 เพียงชนิดเดียวที่ผลิตเฉพาะน้ำตาลไซโลเตตระโอส (ราคา 210 บาทต่อมิลลิกรัม [22]) ซึ่งง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์มากกว่าผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ JT-5 ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ JT-12 มาศึกษาสมบัติทางกายภาพ และการผลิตน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ การที่บาซิลลัสชอบร้อนแต่ละกลุ่มผลิตน้ำตาลในรูปแบบที่แตกต่างกัน น่าจะมีสาเหตุจากความจำเพาะต่อการย่อยไซแลนโดยไซลาโนไลติกเอนไซม์ และ/หรือ อัตราการนำน้ำตาลไปใช้โดยบาซิลลัสแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน [23]

### 3.2 การจำแนกชนิดจุลินทรีย์

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของบาซิลลัสสายพันธุ์ JT-12 ตามวิธีของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [10] พบว่าเป็นแบคทีเรียแบบใช้ออกซิเจน (strictly aerobic bacteria) โคโลนีมีลักษณะกลมนูน สีครีมขุ่น ตรงกลางและขอบมีสีน้ำตาลเข้ม และเมื่อสังเกตลักษณะนี้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากการย้อมแกรมแบคทีเรีย พบว่ามีรูปร่างแท่ง และติดสีม่วงของ crystal violet จึงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีการสร้างเอ็นโดสปอร์รูปไข่ที่บริเวณปลายเซลล์ (terminal endospore) ซึ่งติดสีของ malachite green ในการย้อมเอ็นโดสปอร์

เมื่อจำแนกสายพันธุ์บาซิลลัสโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,140 bp กับ 16S rDNA [11]

ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST ของ NCBI พบว่ามีความคล้ายกับ *Anoxybacillus contaminans* ร้อยละ 97 และคล้ายกับ *Anoxybacillus amylolyticus* และ *Anoxybacillus voinovskiensis* ร้อยละ 96 ส่วนแบคทีเรียอื่นที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงรองลงมาส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ในจีนัส *Anoxybacillus* และ *Geobacillus* และพบว่าบาซิลลัสสายพันธุ์ JT-12 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (55-65 °C) แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 °C ดังนั้นจึงจัดว่าเป็นบาซิลลัสสายพันธุ์ชอบร้อน

### 3.3 การผลิตเอนไซม์

เซลลูโลสและไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์พืช ดังนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีเซลลูโลสหรือไซแลนเพียงชนิดเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์จึงมักผลิตทั้งเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกและไซลาโนไลติกร่วมกัน [13] จากการเพาะเลี้ยง *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 เพื่อผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวที่มี birchwood xylan เป็นแหล่งคาร์บอน และเพิ่มความเข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกและไซลาโนไลติก ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 2 โดยพบว่า *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 เป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติก ได้แก่ ไซลาเนส เบต้าไซโลซิเดส อะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะเซทิลเอสเตอเรส แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติก ได้แก่ คาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส อะไวซิเลส เบต้ากลูโคซิเดส และเซลโลไบโอไฮโดรเลส แม้ว่าจะทำให้มีความเข้มข้นของ birchwood xylan มากขึ้นแล้วก็ตาม

**ตารางที่ 2** กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่ผลิตโดย *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 เมื่อเจริญในอาหารที่มี birchwood xylan เป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 2 วัน

| เอนไซม์ | กิจกรรมจำเพาะ* (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) |
|---|---|
| เอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติก | |
| ไซลาเนส | 5.1 ± 0.2 |
| เบต้าไซโลซิเดส | 2.8 ± 0.1 |
| อะราบิโนฟูราโนซิเดส | 1.0 ± 0.1 |
| อะเซทิลเอสเตอเรส | 0.5 ± 0.1 |
| เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติก | |
| คาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส | - |
| อะไวซิเลส | - |
| เบต้ากลูโคซิเดส | - |
| เซลโลไบโอไฮโดรเลส | - |

* ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

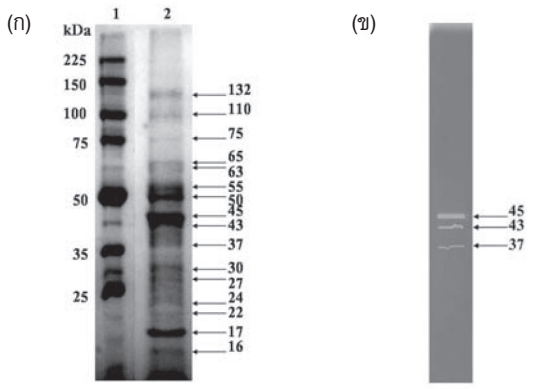
\- หมายถึงไม่สามารถตรวจวัดได้ภายใต้สภาวะที่ศึกษา

*Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งไซแลนเป็นสารพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ จึงไม่สามารถเคลื่อนผ่านเข้าไปในเซลล์เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตเอนไซม์ ดังนั้นน้ำตาลไซโลสและไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ ที่สามารถเคลื่อนผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ จึงทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกออกมาย่อยไซแลน [24] เพื่อเกิดเป็นน้ำตาลให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเจริญ จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลาต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง พบว่าในช่วงแรกตรวจพบน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่างๆ ที่มีขนาดใหญ่กว่าน้ำตาลไซโลส (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ซึ่งน่าจะเกิดจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ไซลาเนสและเบต้าไซโลซิเดส ส่วนเอนไซม์อะราบิโนฟูราโนซิเดสจะตัดพันธะซึ่งเชื่อมน้ำตาลอะราบิโนสจากน้ำตาลไซโลสที่เป็นน้ำตาลสายหลัก ซึ่งอะราบิโนสเป็นโมโนแซ็กคาไรด์ที่สามารถถูกนำไปใช้โดย thermophilic *Anoxybacillus* spp. เช่น *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. และ *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov. [25] และเอนไซม์อะเซทิลเอสเตอเรสจะตัดพันธะซึ่งเชื่อมหมู่ O-acetyl จากน้ำตาลไซโลสที่เป็นสายหลักของไซแลน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะเซทิลไซแลนเอสเตอเรสมีจำนวนน้อย เช่น *Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens* และ *Streptomyces flavogriseus* เป็นต้น เนื่องจาก acetyl residue เป็นเพียงส่วนประกอบหนึ่งของโครงสร้างไซแลนเท่านั้น [1]

การที่ thermophilic *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 ผลิตเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกแต่ไม่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกนั้น นับว่าเป็นผลดีต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมผลิตเยื่อและกระดาษ อุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมน้ำผลไม้ และอุตสาหกรรมการแปรรูปสารประกอบต่างๆ ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง เช่น เอทานอล กรดอินทรีย์ และไซลิทอล [2-3] โดยเฉพาะในกรณีน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ไม่มีการปนเปื้อนจากน้ำตาลกลูโคสและกลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน หรือย่อยด้วย crude xylanolytic enzyme เป็นต้น นอกจากนี้ *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 เป็นแบคทีเรียประเภทชอบร้อน ซึ่งจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงมักผลิตเอนไซม์ที่ทำงานและมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูง ทำให้น่าจะได้รับความสนใจมาก เนื่องจากสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนทางอุตสาหกรรมที่ใช้ความร้อนสูงในการผลิต โดยช่วยลดต้นทุนในขั้นตอนการลดอุณหภูมิ เพื่อให้เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ อีกทั้งช่วยเพิ่มการละลาย ลดความหนืด และลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ [3]

### 3.4 การตรวจสอบขนาดและจำนวนของเอนไซม์ไซลาเนส

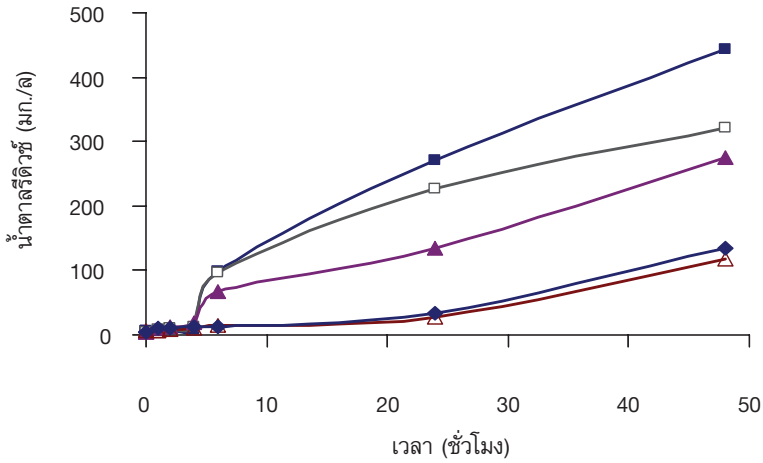
*Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 ผลิตเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติก และให้น้ำตาลไซโลเตตระโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลักเพียงชนิดเดียว จึงนำ crude enzyme มาตรวจสอบจำนวนและขนาดของไซลาเนส โดยคาดว่าน่าจะมีเอนไซม์ชนิดเอ็กโซไซลาเนสที่ย่อยไซโลเตตระโอสออกจากไซแลนครั้งละ 1 โมเลกุล ซึ่งปัจจุบันพบเอนไซม์ชนิดนี้น้อยมาก สำหรับขนาดของไซลาเนสได้จากการตรวจสอบขนาดของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานด้วยเทคนิค SDS-PAGE ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C และมีการเติมสารที่มีสมบัติเป็น denaturant ได้แก่ sodium dodecyl sulfate และ beta-mercaptoethanol ทำให้โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนถูกทำลาย โดยการเคลื่อนที่ของโปรตีนขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีน ซึ่งโปรตีนที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่เร็วกว่าโปรตีนขนาดใหญ่ [19] ผลการทดลองพบว่า crude enzyme ประกอบด้วยโปรตีน 16 ชนิด ที่มีขนาด 132, 110, 75, 65, 63, 55, 50, 45, 43, 37, 30, 27, 24, 22, 17 และ 16 กิโลดาลตัล (รูปที่ 2ก) ในขณะที่เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค zymogram ซึ่งมีการเติมไซแลนที่ละลายน้ำลงไปในเจล พบว่า *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 ผลิตไซลาเนส 3 ชนิด ที่มีขนาด 45, 43 และ 37 กิโลดาลตัล ดังรูปที่ 2ข) ซึ่งกลุ่มวิจัยเตรียมการที่จะทำให้ไซลาเนส 3 ชนิดนี้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์ต่อไป



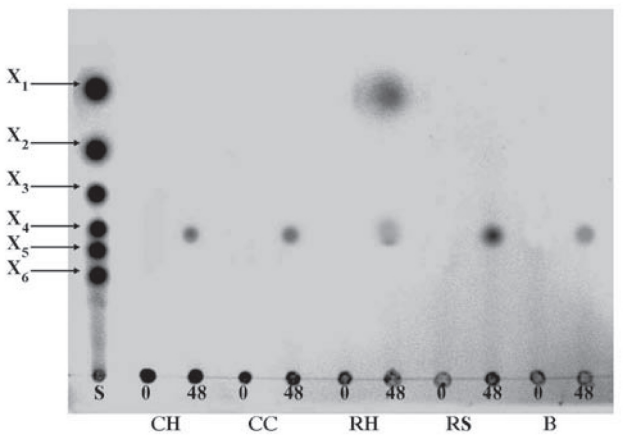

**รูปที่ 2** (ก) SDS-PAGE ของ crude enzyme ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 เป็นเวลา 2 วัน ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 55 °C โดยมี birchwood xylan เป็นแหล่งคาร์บอน
แถวที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน (บริษัท Promega Corporation)
แถวที่ 2 คือ โปรตีนใน crude enzyme
(ข) Zymogram สำหรับ xylanase activity ของ crude enzyme

### 3.5 การผลิตน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

*Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 ผลิตเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติก แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติก อีกทั้งในระหว่างเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี birchwood xylan เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตน้ำตาลไซโลเตตระโอส ซึ่งมีราคาสูงเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และเมื่อพิจารณาโครงสร้างของผนังเซลล์พืชพบว่ามีไซแลนเป็นองค์ประกอบอยู่มาก [26] อีกทั้งประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม จึงมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจากกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก และมักก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและเป็นภาระในการกำจัดของเสีย แม้ว่าจะมีการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ เช่น ใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ และปุ๋ย แต่การใช้ประโยชน์ดังกล่าวยังมีมูลค่าต่ำ หากนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งมีไซแลนเป็นส่วนประกอบมาใช้เป็นวัตถุดิบแทนไซแลนบริสุทธิ์ ซึ่งมีราคา 84.50 บาทต่อกรัม ในการผลิตน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ที่มีราคาสูงจะช่วยลดต้นทุนการผลิตได้เป็นอย่างมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีอยู่มากในประเทศไทย ได้แก่ เปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด แกลบ ชานอ้อย และฟางข้าวด้วย crude xylanolytic enzyme จาก *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 ผลการทดลองพบว่าภายใต้สภาวะที่ศึกษาแกลบถูกย่อยได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด ชานอ้อย และฟางข้าว ตามลำดับ ดังรูปที่ 3 และเมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC พบว่าการย่อยเปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด ฟางข้าว และชานอ้อยด้วยไซลาโนไลติกเอนไซม์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลเตตระโอสเพียงชนิดเดียว ในขณะที่การย่อยแกลบได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลสและไซโลเตตระโอส ดังรูปที่ 4




**รูปที่ 3** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ด้วย crude xylanolytic enzyme (■ = แกลบ, □ = เปลือกข้าวโพด, ▲ = ซังข้าวโพด, ♦ = ชานอ้อย และ Δ = ฟางข้าว)




**รูปที่ 4** TLC ของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ด้วย crude xylanolytic enzyme เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (S = น้ำตาลมาตรฐาน, CH = เปลือกข้าวโพด, CC = ซังข้าวโพด, RH = แกลบ, RS = ฟางข้าว และ B = ชานอ้อย, $X_1$ = ไซโลส, $X_2$ = ไซโลไบโอส, $X_3$ = ไซโลไตรโอส, $X_4$ = ไซโลเตตระโอส, $X_5$ = ไซโลเพนตระโอส และ $X_6$ = ไซโลเฮ็กซะโอส)

เมื่อพิจารณาลำดับความสามารถในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร พบว่า crude xylanolytic enzyme จาก *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 ย่อยแกลบได้ดีที่สุด รองลงมาคือเปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด ชานอ้อย และฟางข้าว ตามลำดับ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากโครงสร้างของไซแลนที่อยู่ในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิดแตกต่างกัน [27] โดยไซแลนในแกลบอาจมีโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกจาก *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 มากที่สุด รองลงมาคือ เปลือกข้าวโพดซึ่งมีปริมาณไซแลนมากที่สุด และสามารถย่อยซังข้าวโพด ฟางข้าว และชานอ้อย ซึ่งมีปริมาณไซแลนรองลงมาตามลำดับ [26] แม้ว่าแกลบจะถูกย่อยได้ดีที่สุดแต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีน้ำตาลไซโลสปนอยู่ด้วย ในขณะที่วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่นได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลเตตระโอสเพียงชนิดเดียว อีกทั้งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบที่ไม่มีมูลค่า จึงนับว่าเป็นการประหยัดต้นทุนการผลิตเป็นอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการผลิตน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมที่ต้องผ่านการทำปฏิกิริยากับกรด ด่าง ความร้อน หรือน้ำร้อน เพื่อสกัดไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ออกจากไซแลน จากนั้นจึงทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่างๆ ทั้งวิธีทางเคมีและเอนไซม์ [4-6] แต่งานวิจัยนี้สามารถผลิตไซโลเตตระโอสเพียงชนิดเดียวได้ด้วยการย่อยด้วย crude xylanolytic enzyme จาก *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 ในขั้นตอนเดียว อีกทั้งจุลินทรีย์นี้ผลิตเฉพาะไซลาโนไลติกเอนไซม์ ดังนั้นจึงไม่ย่อยเซลลูโลสที่เป็นอีกหนึ่งองค์ประกอบหลักในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้เป็นน้ำตาลกลูโคสหรือกลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์อื่น [28] ซึ่งเป็นผลดีอย่างมากต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตน้ำตาลไซโลเตตระโอสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในระดับอุตสาหกรรม [4-6]

## 4. สรุปผลการวิจัย

จากการแยกบาซิลลัสบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยไซแลนได้ดีจำนวน 21 สายพันธุ์ ได้คัดเลือก

แบคทีเรียชอบร้อน *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 ซึ่งสามารถผลิตน้ำตาลไซโลเตตระโอสที่มีมูลค่าสูงเป็นผลิตภัณฑ์หลักระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี birchwood xylan เป็นแหล่งคาร์บอน โดย *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 ผลิตเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติก ได้แก่ ไซลาเนส (3 ชนิดที่มีขนาด 45, 43 และ 37 กิโลดาลตัล) เบต้าไซโลซิเดส อะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะเซทิลเอสเตอเรส และเมื่อย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วย crude xylanolytic enzyme พบว่าสามารถย่อยเปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด ฟางข้าว และชานอ้อยได้เป็นไซโลเตตระโอสเพียงชนิดเดียว ซึ่งไซโลเตตระโอสมีประโยชน์อย่างมาก และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยหรือใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ด้านเครื่องสำอาง อาหาร และยาได้หลากหลาย นับว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่คุ้มค่าต่อการผลิต อีกทั้งสามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้เป็นอย่างมาก

## 5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ประจำปี 2552-2553

## 6. เอกสารอ้างอิง

1. Sunna, A. and Antranikian, G., 1997, “Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria”, *Critical Review in Biotechnology*, Vol. 17, pp. 39-67.

2. Chávez, R., Bull, P., and Eyzaguirre, J., 2006, “The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*”, *Journal of Biotechnology*, Vol. 123, pp. 413-433.

3. Liu, M-Q. and Liu, G-F., 2008, “Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in *Pichia pastoris* and Xylooligosaccharides released from xylans by it”, *Protein Expression and Purification*, Vol. 57, pp. 101-107.

4. Yuan, Q.P., Zhang, H., Qian, Z.M., and Yang, X.J., 2004, “Pilot-plant Production of Xylo-oligosaccharides from corn cob by steaming, enzymatic hydrolysis and Nanofiltration”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 79, pp. 1073-

1079.

5. Vegas, R., Alonso, J.L., Dominguez, H., and Parajo, J.C., 2004, "Processing of rice husk autohydrolysis liquors for obtaining food Ingredients", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 52, pp. 7311-7317.

6. Moure, A., Gullon, P., Dominguez, H., and Parajo, J.C., 2006, "Advances in the manufacture, purification and applications of Xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceutricals", *Process Biochemistry*, Vol. 41, pp. 1913-1923.

7. Jaskari, J., Kontula, P., Siitonen, A., Jousimies-Somer, H., Mattila-Sandholm, T., and Poutanen, K., 1998, "Oat β-glucan and xylan hydrolysate as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Strains", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 49, pp. 175-181.

8. Christakopoulos, P., Katapodis, P., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B.J., Stamatis, H., and Skaltsa, H., 2003, "Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 31, pp. 171-175.

9. Berg, B., Hofstan, B.V., and Petterson, G., 1972, "Growth and cellulase formation by *Cellvibrio fulvus*", *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 35, pp. 201-214.

10. Sneath, P.H.A., 1986, "Endospore-forming gram-positive rods and cocci", In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 1104-1139.

11. Techkarnjanaruk, S., Pongpattanakitshote, S., and Goodman., A.E., 1997, "Use of a promoterless LacZ gene insertion to investigate chitinase gene expression in the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain S9", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, pp. 2989-2996.

12. Harris, E.L.V. and Angal, S., 1989, *Protein Purification Methods, Oxford University*, New York. pp. 154-157.

13. Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L., and Tanticharoen, M., 1999, "Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 85, pp. 694-697.

14. Somogyi, M., 1952, "Notes on sugar determination", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 195, pp. 19-23.

15. Kyu, K.L., Ratanakhanokchai, K., Uttapap, D., and Tanicharoen, M., 1994, "Induction of xylanase in *Bacillus circulans* B6", *Bioresource Technology*, Vol. 48, pp. 163-167.

16. Kohring, S., Wiegal, J., and Mayer, F., 1990, "Subunit composition and glycosidic activity of the cellulase complex from *Clostridium thermocellum* JW20", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, pp. 3798-3804.

17. Mockenzie, C.R. and Bilous, D., 1988, "Ferulic and esterase activity from *Schizophyllum commune*", *Applied and Environmental Microbio-logy*, Vol. 54, pp. 1170-1173.

18. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951, "Protein Measurement with the folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 193, pp. 265-275.

19. Laemmli, U.K., 1970, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4", *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685.

20. Sornyotha, S., Kyu, K.L., and Ratanakhanokchai, K., 2007, "Purification and detection of Linamarin from cassava root cortex by high performance liquid chromatography", *Food Chemistry*, Vol. 104, pp. 1750-1754.

21. สูตรราคาเอทานอล [Online], Available :

http://www.energy.go.th/th/etha.htm [2007, March 15]

22. Xylo-oligosaccharide [Online], Available : www.21food.com/.../27019/productlist/s-p1.html [2007, March 15]

23. Bastawde, K.B., 1992, "Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 8, pp. 353-368.

24. Ratanakhanokchai, K., Noiduang, P., and Kyu, K.L., 2002, "Two extracellular endoxylanases from elkaliphilic *Bacillus firmus* differ in their synthesis", *Biotechnology Letters*, Vol. 24, pp. 1487-1490.

25. Dulger, S., Demirbag, Z., and Belduz, A.O., 2004, "*Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 54, pp. 1499-1503.

26. Vazquez, M.J., Alonso, J.L., Dominguez, H. and, Parajo, J.C., 2000, "Xylooligosaccharides: manufacture and applications", *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 11, pp. 387-393.

27. Luciana, A.O., Porto, A.L.F., and Tambourgi, E.B., 2006, "Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes", *Bioresource Technology*, Vol. 97, pp. 862-867.

28. Lama, L., Calandrelli, V., Gambacorta, A., and Nicolaus, B., 2004, "Purification and characterization of thermostable xylanase and β-xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*", *Research in Microbiology*, Vol. 155, pp. 283-289.