รายงานการวิจัยเรื่อง

การแยกและการคัดเลือกเชื้อราจากดินในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

Isolation and selection of fungi from soil in Eastern Thailand for xylanase production

โดย

ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปีงบประมาณ 2547

RCH
QP
702
.X87
D6977
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 58898
วัน,เดือน,ปี 10 ก.พ. 2549

b.11506234
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสสูตรตั้งต้นประมาณ 7 เท่า โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสสูงสุด เท่ากับ 236.53 และ 0.22 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน และวัดค่าพีเอชสุดท้ายของน้ำหมักได้เท่ากับ 3.6 เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *A. foetidus* TISTR 3159 ภายใต้สภาวะการเจริญเดียวกัน พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 แต่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 อย่างมีนัยสำคัญ โดย *A. foetidus* TISTR 3159 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 211.90 และ 0.28 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน และวัดค่าพีเอชสุดท้ายของน้ำหมักได้เท่ากับ 3.4 และสามารถจำแนกชนิดของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ได้เป็น *Aspergillus niger*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Xylanase producing fungi were isolated and selected from soil in Eastern Thailand. Seventy two strains of fungi were isolated, 30 of these strains were different in morphology. In these 30 strains, strain no. 15 and no. 27 were able to grow in high temperature (45°C) and alkaline (pH 8.0) conditions. When potential of using xylan as carbon source in both qualitative and quantitative methods were tested by comparing with *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 (reference strain), it was found that at pH 6, strain no.27 produced xylanase with the highest value of 3.57 when the ratio of the clear zone to that of the colony was determined in solid-state cultivation, and the xylanase activity in liquid-state cultivation was 33.82 U/ml.

Optimal conditions in xylanase production by strain no.27 using liquid-state cultivation were as follows. Corn cobs was the best carbon source compared to corn hull, sugarcane bagasse, xylan and rice straw, respectively. In addition, 3 % (w/v) corn cobs was the most suitable concentration. For organic nitrogen sources, 0.3 g/l urea, 0.25 g/l proteosepepptone and 0.05 g/l yeast extract were the most suitable sources. When diammonium hydrogen phosphate was used as inorganic nitrogen source, the highest xylanase activity was obtained compared to those of NH_4NO_3 , $(NH_4)_2SO_4$ and $NaNO_3$, and 0.3 gm of (N)/l (1.4 g/l) of diammonium hydrogen phosphate was the most suitable concentration. The adding of 0.2% (v/v) tween 80 to the culture was significantly increasing the xylanase activity while adding the mixed mineral solutions of $FeSO_4$, $ZnSO_4$, $MnSO_4$ and $CoCl_2$ were not effective for the production of xylanase by strain no.27. pH 6.0 was found to be the initial pH of the medium for xylanase production.

Studies on production of xylanase under the optimal conditions of strain no.27 were performed by using liquid-state cultivation by incubating initial spores (10^6 spores/ml) in 70 ml xylan liquid medium in a 250 ml Erlenmeyer flask and shaking at 200 rpm. at 30°C for 6 days. It was found that both maximum xylanase (236.53 U/ml) and cellulase (0.22 U/ml) activities were obtained after 5 days. These values were about 7 times higher than those when the original formula of xylan medium was used. The final pH obtained on the fifth day of incubation was 3.6. When these results were compared with those of *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 under the same conditions, strain no.27 gave significantly higher xylanase activity but lower cellulase activity than *A. foetidus* TISTR 3159. The highest xylanase and cellulase activities produced by *A. foetidus* TISTR 3159 on the 5th day of incubation were 211.90 and 0.28 U/ml, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The final pH on the 5th day of incubation of *A. foetidus* TISTR 3159 was 3.4. The fungus strain no.27 was identified as *Aspergillus niger*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....

สารบัญ.....

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย.....

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....

บทที่ 2 การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร.....

2.2 เฮมิเซลลูโลส.....

2.2.1 เฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้ออ่อน.....

2.2.2 เฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็ง.....

2.2.3 เฮมิเซลลูโลสในไม้ล้มลุกและพืชตระกูลหญ้า.....

2.3 ไซแลน.....

2.4 ไซลาโนไลติกเอนไซม์.....

2.4.1 กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลัก.....

2.4.1.1 เบต้า 1,4 เอนโดไซลาเนส.....

2.4.1.2 เบต้า-ไซโลซิเดส.....

2.4.2 กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างที่เป็นกิ่งก้าน.....

2.4.2.1 แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส.....

2.4.2.2 แอลฟา-กลูคูโรนิเดส.....

2.4.2.3 อะซิทิลไซแลนเอสเตอเรส.....

2.5 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกเอนไซม์.....

2.6 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆและคุณสมบัติของเอนไซม์.....

2.6.1 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....

2.6.2 คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.6.2.1 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อเอนไซม์.....
2.6.2.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อเอนไซม์.....
2.7 ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา.....
2.8 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา.....
2.8.1 Slide culture technique.....
2.8.2 Cover sandwich technique.....
2.9 การสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา.....
2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซลาโนไลติกเอนไซม์โดยการหมัก.....
2.10.1 แหล่งคาร์บอน.....
2.10.2 แหล่งไนโตรเจน.....
2.10.3 อุณหภูมิ.....
2.10.4 พีเอช.....
2.10.5 แร่ธาตุ.....
2.10.6 สารลดแรงตึงผิว.....
2.10.7 ความเร็วรอบในการเขย่าและอัตราการให้อากาศ.....
2.10.8 สารเหนี่ยวนำเอนไซม์.....

บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย..... 31

3.1 วัสดุ.....
3.1.1 วัตถุดิบ.....
3.1.2 จุลินทรีย์.....
3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....
3.2 อุปกรณ์.....
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....
3.3.1 อาหารแข็งสูตร Czapek medium.....
3.3.3 อาหารแข็งสูตร Xylanmedium.....
3.3.4 อาหารเหลวสูตร Xylan medium.....
3.4 การแยกเชื้อราที่ย่อยสลายไซแลนจากดิน.....
3.5 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.3.2 อาหาร potato dextrose agar.....
3.3.3 อาหารแข็งสูตร Xylanmedium.....
3.3.4 อาหารเหลวสูตร Xylan medium.....
3.4 การแยกเชื้อราที่ย่อยสลายไซแลนจากดิน.....
3.5 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....
3.5.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส.....
ในเชิงคุณภาพ
3.5.2 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส.....
ในเชิงปริมาณ
3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....
ของเชื้อราที่คัดเลือกได้
3.6.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....
3.6.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....
3.6.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อ.....
การผลิตเอนไซม์ไซลาเนส
3.6.3.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์.....
3.6.3.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์.....
3.6.3.3 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์.....
3.6.4 พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....
3.6.5 ความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมที่มีผลต่อ.....
การผลิตเอนไซม์ไซลาเนส
3.6.6 สารลดแรงตรึงผิว (surfactant) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....
3.7 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราที่คัดเลือก.....
3.8 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....39
4.1 การแยกเชื้อราที่ย่อยสลายไซแลนจากดิน.....
4.2 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.2.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส.....
ในเชิงคุณภาพ
4.2.2 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส.....
ในเชิงปริมาณ
4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....
ของเชื้อราที่คัดเลือกได้
4.3.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....
4.3.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....
4.3.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อ.....
การผลิตเอนไซม์ไซลาเนส
4.3.3.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์.....
4.3.3.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์.....
4.3.3.3 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์.....
4.3.4 พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....
4.3.5 ความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมที่มีผลต่อ.....
การผลิตเอนไซม์ไซลาเนส
4.3.6 สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....
4.4 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราที่คัดเลือก.....

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 71

บรรณานุกรม.....73

ภาคผนวก
90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นสารประกอบเฮทเตอโรพอลิแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide) มีหน้าที่เป็นตัวค้ำจุนเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์พืช มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก คือ ดี-ไซโลส (D-xylose), ดี-แมนโนส (D-mannose), ดี-กาแลคโตส (D-galactose)และแอล-อะราบิโนส (L-arabinose) โดยมีสายโซ่ (side chain) คือ 4-O-methyl-D-glucuronic acid เชื่อมกันด้วยพันธะ β-glycosidic การแบ่งชนิดของเฮมิเซลลูโลสจึงแบ่งตามชนิดของน้ำตาล ได้แก่ ไซแลน (xylan) แมนแนน (mannan) กาแลคแทน (galactan) และอะราบิแนน (arabinan) เป็นต้น โดยส่วนมากเฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างหลักเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่เรียกว่าไซแลน ซึ่งไซแลนมีโครงสร้างหลักเป็นเบต้า-ดี-ไซโลส (β-D-xylose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4- ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic) และมีโซ่กิ่ง (branch chain) เป็นพวกกลุ่ม acetyl, 4-O-methyl-D-glucurosyl และ L-arabinofuranosyl ไซแลนมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ดังนั้นในการย่อยสลายให้สมบูรณ์ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติก (xylanolytic enzyme) หลายชนิดเข้าช่วยในการทำปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลัก ได้แก่ เอนโด-ไซลาเนส (endo-1,4-β-xylanase) และเบต้า-ไซโลซิเดส (β-xylosidase) ส่วนเอนไซม์ที่ย่อยสลายส่วนที่เป็นโซ่กิ่ง ได้แก่ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิ-เดส (α-L-arabinofuranosidase), แอลฟา-กลูคูโรนิ-เดส (α-glucuronidase) และอะซิติลไซแลน-เอสเตอเรส (acetylxylan esterase) ดังนั้นเอนไซม์ไซลาเนสจึงมีศักยภาพในการที่จะเปลี่ยนไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบของ เฮมิเซลลูโลสได้เป็นน้ำตาล แอลกอฮอล์ และผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์อื่น ๆ (Wong *et. al.*, 1988)

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพมากที่สุดในการย่อยสลายสารลิกโนเซลลูโลส (Beguin, 1990) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของพืชในสภาพธรรมชาติและเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ใช้แล้วไม่หมดไป (reversible natural resources) แหล่งใหญ่มาก (McCarthy, 1987) แต่ยังมีเชื้อราน้อยชนิดที่สามารถย่อยสลายสารเหล่านี้ และให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอนไซม์ไซลาเนสที่เป็นไปได้ทางเศรษฐกิจ (Bisaria and Ghose, 1981) โดยเอนไซม์ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากมีศักยภาพทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและมีการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย เช่น ด้านอุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมอาหาร ยารักษาโรค และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมกระดาษ ถ้าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากสารลิกโนเซลลูโลสเป็นไปได้ จะเป็นการนำแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกมาใช้แทนแหล่งคาร์บอนเดิมที่ใช้กันอยู่ซึ่งมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ราคาแพงมาก จึงเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตได้เป็นอย่างมาก เนื่องจากแหล่งคาร์บอนคิดเป็นร้อยละ 50 ของต้นทุนการผลิตเอนไซม์ทั้งหมด (Chahal, 1985)

งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการแยกเชื้อราจากดินโดยเฉพาะในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทยซึ่งมีลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่หลากหลายและน่าจะมีความแปรผัน (variation) ของเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างมาก เพื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่สามารถย่อยสลายไซแลนที่เป็นองค์ประกอบของสารลิกโนเซลลูโลสเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่เป็นไปได้ในทางเศรษฐกิจ และในประเทศไทยนั้นเป็นประเทศที่มีการทำเกษตรกรรมจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรค่อนข้างมาก ซึ่งมีส่วนประกอบของเฮมิเซลลูโลสอยู่ด้วย จึงคิดว่าน่าจะนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเหล่านี้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อรา เพื่อเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราจากดินที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์เชื้อราที่คัดเลือกได้ โดยศึกษาหาสภาวะที่เชื้อราจะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงและผลิตเอนไซม์ไซม์เซลลูเลสได้น้อยหรือไม่มีการผลิต โดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ เช่น ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อยและฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ใช้ไซแลนบริสุทธิ์ซึ่งมีราคาสูงเป็นตัวเปรียบเทียบ พร้อมทั้งศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา เช่น ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น ผลของแร่ธาตุและสารลดแรงตึงผิว (surfactant) เป็นต้น

1.2.3 เพื่อศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่คัดเลือกได้อย่างเหมาะสม การจำแนกเชื้อราจะจำแนกจนถึงระดับสปีชีส์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เก็บตัวอย่างเชื้อราจากดินตามสถานที่ที่แตกต่างกัน เช่น ป่าไม้ ภูเขา เป็นต้น ในเขตท้องที่ภาคตะวันออกของประเทศไทยมาทำการแยกเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อให้ได้สายพันธุ์เชื้อราที่บริสุทธิ์ นำเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเบื้องต้น เช่น สีของเส้นใย สีของสปอร์ และตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อจำแนกความแตกต่างเบื้องต้นของเชื้อรา ทำการเก็บเชื้อราที่แยกได้ในอาหาร potato dextrose agar (PDA) จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาคัดเลือกโดยการทดสอบความสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาพอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยวัดจากขนาดของวงใสรอบโคโลนี (clear zone) และขนาดของโคโลนี เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีกับขนาดของโคโลนี ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยมีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่สุด นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร เช่น ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อยและฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับการใช้ไซแลน และศึกษาปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความ เข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น ผลของแร่ธาตุผสมและผลของสารลดแรงตึงผิว เป็นต้น โดยการเลี้ยงเชื้อในระดับฟลาสก์ แล้วนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรามาวัดค่าพีเอช และทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ไซลาเนส (Tang *et. al.*, 1987) และ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Mandels and Weber, 1969) และเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้กับสายพันธุ์อ้างอิง ซึ่งเป็นสายพันธุ์เชื้อราที่ผ่านการกลายพันธุ์เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ได้แก่ *Aspergilus foetidus* TISTR 3159 เมื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็นที่ต้องการมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมาก ที่สุดและผลิตเอนไซม์ไซม์เซลลูเลสน้อยหรือไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นนำสายพันธุ์ของเชื้อราที่คัดเลือกมาจำแนกชนิดของเชื้อราถึงระดับสปีชีส์ตามวิธีของ Campbell *et. al.* (1985) โดยการเตรียม slide culture plate technique ตรวจดูรูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่มี camera lucida ประกอบอยู่ แล้วเปรียบเทียบกับเอกสารและหนังสือที่จำแนกชนิดของเชื้อรา ได้แก่ The Genus Aspergillus (Raper and Fennell , 1965) ; A manual of the Penicillia (Raper and Thom , 1949) และ The Genus Penicillium (Pitt , 1980)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถแยกและคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราในสภาพธรรมชาติที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี

1.4.2 ทำให้ทราบถึงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราที่คัดเลือกได้

1.4.3 เป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่มีอยู่เป็นปริมาณมากในประเทศไทยเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า ซึ่งเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร

วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร เป็นสารพวกลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ที่มีองค์ประกอบหลักเป็น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน อยู่ร่วมกันในผนังเซลล์พืช ซึ่งปริมาณองค์ประกอบของสารต่างๆ เหล่านี้ขึ้นกับชนิดของพืช (ตารางที่ 2.1) ในแต่ละปีมีปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั่วโลกประมาณ 10-50 x 10^9 ตัน (Kuhad , 1999) ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ในแต่ละปีมีจึงมีปริมาณวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรประเภทต่างๆ เช่น ฟางข้าว ซังและเปลือกข้าวโพด ชานอ้อยและเปลือกถั่วเป็นจำนวนมาก ปริมาณผลผลิตและวัสดุเศษเหลือหลังการเก็บเกี่ยวของประเทศไทยที่ประเมินไว้ในปี พ.ศ. 2539/2540โดยสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร แสดงดังตาราง ที่ 2.2 โดยพบว่าเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในประเทศไทยมีปริมาณมากกว่า 74,765,000 ตัน ซึ่งการนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์มีค่อนข้างน้อย โดยมากจะถูกทิ้งสะสมเป็นของเสีย แต่ในปัจจุบันมีการนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและมีปริมาณมากในแต่ละปี

ตารางที่ 2.1 ปริมาณขององค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (%)

Substrate	Cellulose	Hemicellulose(	Lignin	Ash
Bagasse	33	30	29	4
Barley straw	40	20	15	11
Birch	40	33	21	4
Corn cobs	42	39	14	2
Corn hull	43.8	39.6	14.3	1.6
Oat straw	41	16	11	12
Pine	41	10	27	8
Rice straw	32	24	13	12
Rice hulls	36	15	19	20
Rice bran	13	11	N.D.	21
Saw dust	55	14	21	5
Wheat straw	30	24	18	10

N.D. = not dertermined

ที่มา : Barber and Benedito de Barder (1974) ; Kuhad (1999)

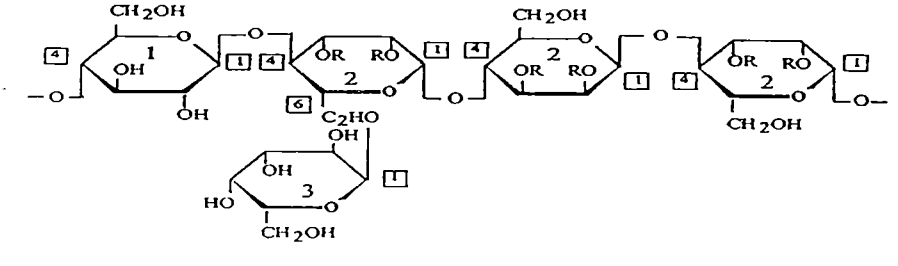
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตประเภทเฮทเตอโรพอลิแซ็กคาไรด์ มีหน้าที่เป็นตัวค้ำจุนเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์พืช ต่างจากเซลลูโลสตรงที่เซลลูโลสเป็นสารประกอบประเภทโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ที่ประกอบด้วยกลูโคสเพียงอย่างเดียว เฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก คือ ดี-ไซโลส ดี-แมนโนส ดี-กาแลคโตสและแอล-อะราบิโนส โดยมีสายโซ่ข้าง (side chain) คือ 4-O-methyl-D-glucuronic acid เชื่อมกันด้วยพันธะ β-glycosidic การแบ่งชนิดของเฮมิเซลลูโลสจึงแบ่งตามชนิดของน้ำตาล ได้แก่ ไซแลน แมนแนน กาแลคแทนและอะราบิแนน เป็นต้น โดยส่วนมากเฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างหลักเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-glycosidic และมีสายโซ่กิ่งเป็น arabinosyl, glucuronosyl, acetyl และ mannosyl residues (Tsujibo *et. al.*, 1990) เฮมิเซลลูโลสมีค่า degree of polymerization (DP) ประมาณ 200 (Sjostrom, 1981) ในไม้มีเฮมิเซลลูโลสอยู่ประมาณร้อยละ 20 ถึง 30 (ของน้ำหนักแห้ง) เฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้ออ่อนมีโครงสร้างแตกต่างจากไม้เนื้อแข็ง และในส่วนต่าง ๆ ของต้นไม้ เช่น ระหว่างลำต้น รากและกิ่ง จะมีโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสที่ต่างกัน (Sjostrom, 1981)

2.2.1 เฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้ออ่อน

2.2.1.1 กาแลคโตกลูโคแมนแนน (galactoglucomannans) เป็นเฮมิเซลลูโลสที่พบมากในไม้เนื้ออ่อน (ประมาณร้อยละ 20) มีสายโซ่หลักเป็น β-1,4-glycosidic และมีสายโซ่กิ่งที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของกลูโคสหรือแมนโนส โดย β-D-galactopyranose จับกับโครงสร้างหลักด้วยพันธะ 1,6-glycosidic (รูปที่ 2.1) กาแลคโตกลูโคแมนแนนสามารถแยกได้เป็น 2 ส่วน ขึ้นอยู่กับปริมาณของกาแลคโตสที่ต่างกัน ในส่วนที่มีกาแลคโตสในปริมาณน้อยจะมีอัตราส่วนของกาแลคโตสต่อกลูโคสต่อแมนโนส เท่ากับ 0.1 ต่อ 1 ต่อ 4 และในส่วนที่มีปริมาณของกาแลคโตสสูงจะมีอัตราส่วนเท่ากับ 1 ต่อ 1 ต่อ 3 ในส่วนคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ของกลูโคสและแมนโนสจะมี หมู่อะซิทิล (acetyl group) จับอยู่โดยมีปริมาณเฉลี่ย 1 กลุ่มต่อ 3 ถึง 4 หน่วยของเฮกโซสของ galactoglucomannans



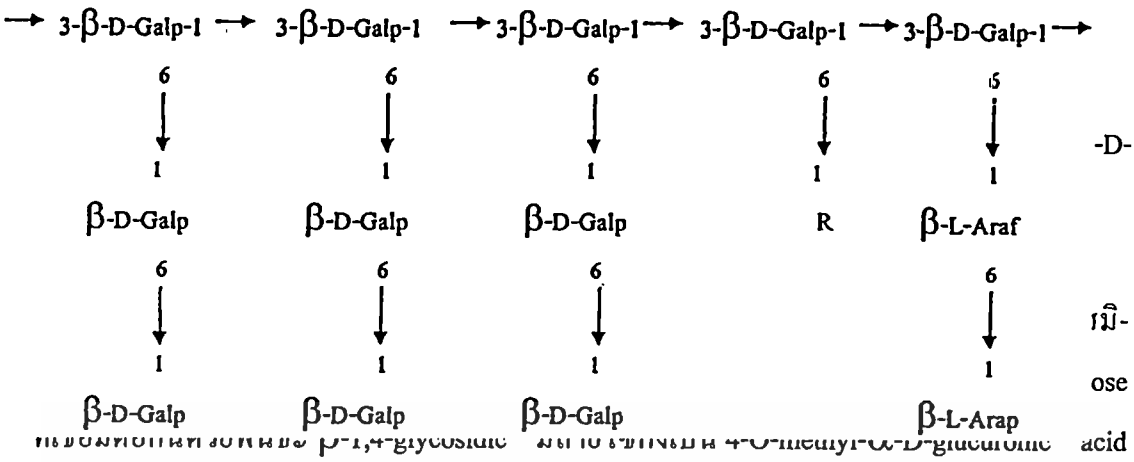
4-β-D-Glcp-1 4-β-D-Manp-1 4-β-D-Manp-1 4-β-D-Manp-1

6 2,3

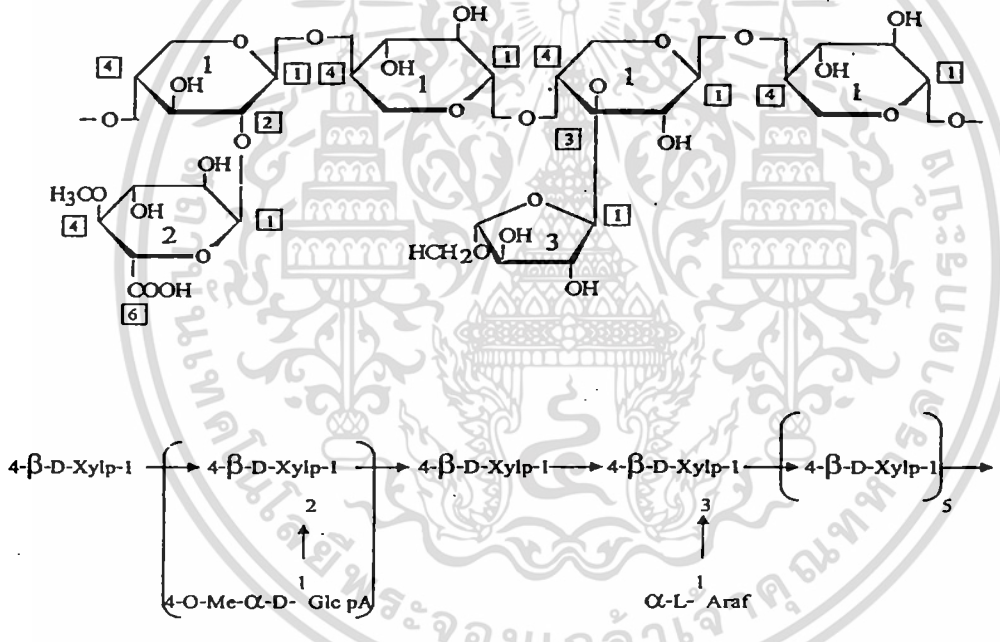
1 Ac

α-D-Glcp-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ที่ส่วนใหญ่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-glycosidic และมี 4-O-methyl-α-D-glucuronic acid เชื่อมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของน้ำตาลไซโลส และมี L-arabinofuranose เชื่อมที่ตำแหน่ง C3 ของน้ำตาลไซโลสของสายไซแลน โดยเฉลี่ยมี 4-O-methyl-α-D-glucuronic acid ประมาณ 2 กลุ่มต่อ 10 หน่วยของไซโลส และมี L-arabinofuranose เฉลี่ย 1.3 กลุ่มต่อ 10 หน่วยของไซโลส ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ arabinoglucuronoxylan

น้ำตาลตำแหน่งที่ 1 , β-D-xylopyranose (Xylp); 2 , 4-O-methyl-α-D-glucuronic acid (GlcpA); 3 , α-L-arabinofuranose (Araf)

ที่มา : Sjostrom (1981)

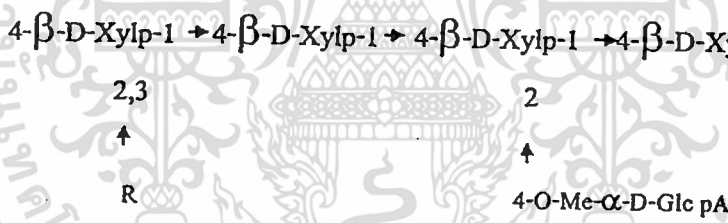
2.2.1.3 อะราบิโนกาแลคแทน (arabinogalactan) เป็นเฮมิเซลลูโลสที่สามารถละลายน้ำได้ มีโครงสร้างหลักเป็น D-galactopyranose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,3-glycosidic และมีสายโซ่กิ่งเป็น L-arabinose เชื่อมต่อกับสายของ D-galactopyranose ด้วยพันธะ β-1,6-glycosidic ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 เฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็ง

2.2.2.1 กลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) หรือ O-acetyl-4-O-methylglucurono-β-D-xylan ในไม้เนื้อแข็งมีอยู่ประมาณร้อยละ 15 ถึง 30 ของน้ำหนักแห้งของไม้ glucuronoxylan มีโครงสร้างหลักเป็น β-D-xylopyranose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-glycosidic ไซโลสส่วนใหญ่ประกอบด้วยหมู่อะซิทิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ของน้ำตาลไซโลส ในสายของไซแลนมีหมู่อะซิทิล 7 หน่วย ต่อ 10 หน่วยของไซโลส และมี 4-O-methyl glucuronic acid ที่เชื่อมต่อกับไซโลสด้วยพันธะ 1,4 glycosidic โดยมีกรดยูโรนิก (uronic acid) 1 หน่วย ต่อ 10 หน่วยของ ไซโลส (รูปที่ 2.4) พันธะที่เชื่อมต่อระหว่างไซโลสสามารถย่อยสลายได้ด้วยกรด ส่วนพันธะที่เชื่อมระหว่างไซโลสกับหมู่ acetyl สามารถย่อยสลายได้ด้วยด่าง

2.2.2.2 กลูโคแมนแนน (glucomannan) ในไม้เนื้อแข็งมีอยู่ประมาณร้อยละ 2 ถึง 5 ซึ่ง glucomannan มีโครงสร้างเป็น β-D-glucopyranose และ β-D-mannopyranose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-glycosidic (รูปที่ 2.5) อัตราส่วนของกลูโคสต่อแมนโนสในสายของ glucomannan เท่ากับ 1 ต่อ 2 หรือ 1 ต่อ 1 ขึ้นอยู่กับชนิดของไม้ glucomannan ถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยกรด



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ glucuronoxylan

น้ำตาล β-D-xylopyranose (Xylp); 4-O-methyl-α-D-glucopyranosyl uronic acid (4-O-Me-α-D-Glc pA); R คือ acetyl group (CH_3CO)

ที่มา : Sjostrom (1981)

→ 4-β-D-Glcp-1 → 4-β-D-Glcp-1 → 4-β-D-Manp-1 → 4-β-D-Glcp-1 → 4-β-D-Manp-1 →

รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ glucomannan

น้ำตาล β-D-glucopyranose (Glcp); β-D-mannopyranose (Manp)

ที่มา : Sjostrom (1981)

2.2.3 เฮมิเซลลูโลสในไม้ล้มลุก และ พืชตระกูลหญ้า

O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan มี degree of polymerization เท่ากับ 70 ความแตกต่างของ O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan ระหว่างไม้เนื้อแข็งกับพืชตระกูลหญ้า คือในพืชตระกูลหญ้ามีพันธะ 1,3-glycosidic ที่เชื่อม 4-O-methyl-α-D-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

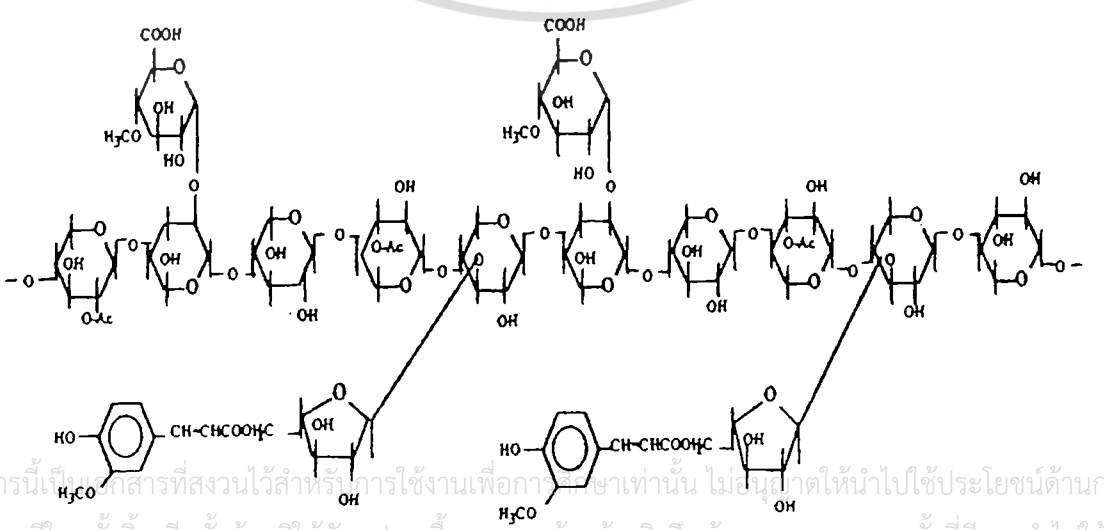
glucuronic acid น้อยกว่าในไม้เนื้อแข็ง แต่จะมีปริมาณของ L-arabinofuranosyl side chain ที่เชื่อมตรงบริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 หรือทั้งสองตำแหน่งมากกว่าในไม้เนื้อแข็ง และมีหมู่อะซิทิลเชื่อมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ในน้ำตาลไซโลสของโครงสร้างหลัก ดังรูปที่ 2.6

2.3 ไซแลน

ไซแลนเป็นคาร์โบไฮเดรตหลักที่พบในผนังเซลล์พืช ไม้เนื้ออ่อนพบประมาณร้อยละ 7 ถึง 12 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด ไม้เนื้อแข็งพบประมาณร้อยละ 15 ถึง 30 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด และในไม้ล้มลุกพบมากกว่าร้อยละ 30 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (Wong *et. al.*, 1988 and Whistler and Richard, 1970) ไซแลนมีโครงสร้างหลักเป็นเบต้า-ดี-ไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-glycosidic และมีสายโซ่กิ่งเป็นพวก acetyl, 4-O-methy-D-glucurosyl และ L-arabinofuranosyl group ดังรูปที่ 2.7

ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนได้แก่ arabino-4-O-methyl-glucuronoxylan (รูปที่ 2.8) 4-O-methylglucuronic acid สร้างพันธะ α-1,2 glycosidic bond ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของไซโลสในโครงสร้างหลัก และมี L-arabinofuranoside เชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของน้ำตาลไซโลส ด้วยพันธะ α-1,3 glycosidic bond ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนไม่พบหมู่อะซิทิล และพบว่ามีอัตราส่วนของไซโลส ต่อ 4-O-methylglucuronic acid ต่อ arabinose เท่ากับ 8 ต่อ 1.6 ต่อ 1

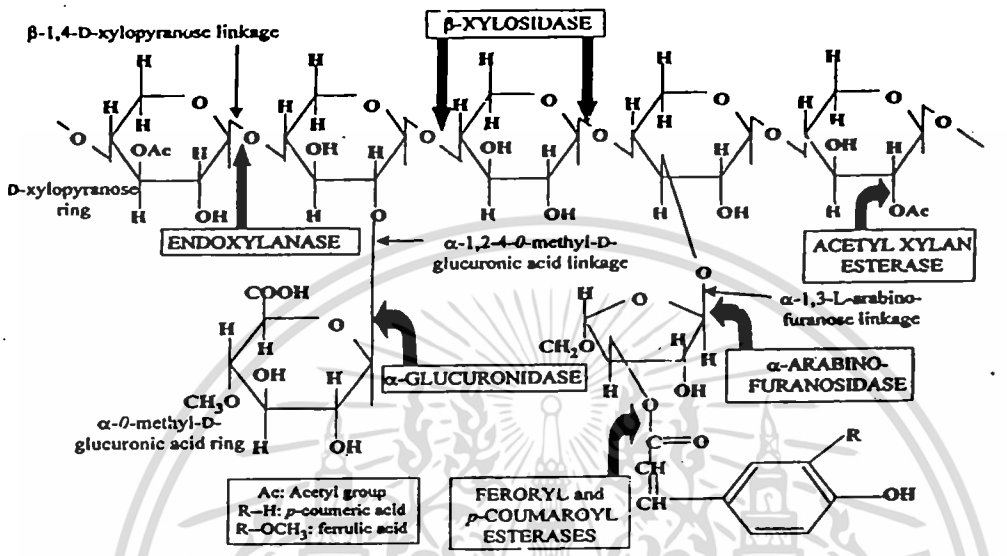
ไซแลนในไม้เนื้อแข็งได้แก่ O-acetyl-4-O-methyl-glucuronoxylan (รูปที่ 2.9) ไซแลนในไม้เนื้อแข็งจะมีอัตราส่วนของไซโลส ต่อ 4-O-methylglucuronic acid ต่อ acetic acid เท่ากับ 10 ต่อ 1 ต่อ 7 โดยที่ไซแลนในไม้เนื้อแข็งมีหมู่อะซิทิลเชื่อมต่อกับไซโลสในสายโครงสร้างหลักที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 อยู่เป็นจำนวนมาก และทุก ๆ 10 โมเลกุลของไซโลสพบ 4-O-methylglucuronic acid เชื่อมต่อกับไซโลสที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 ของไซโลส



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

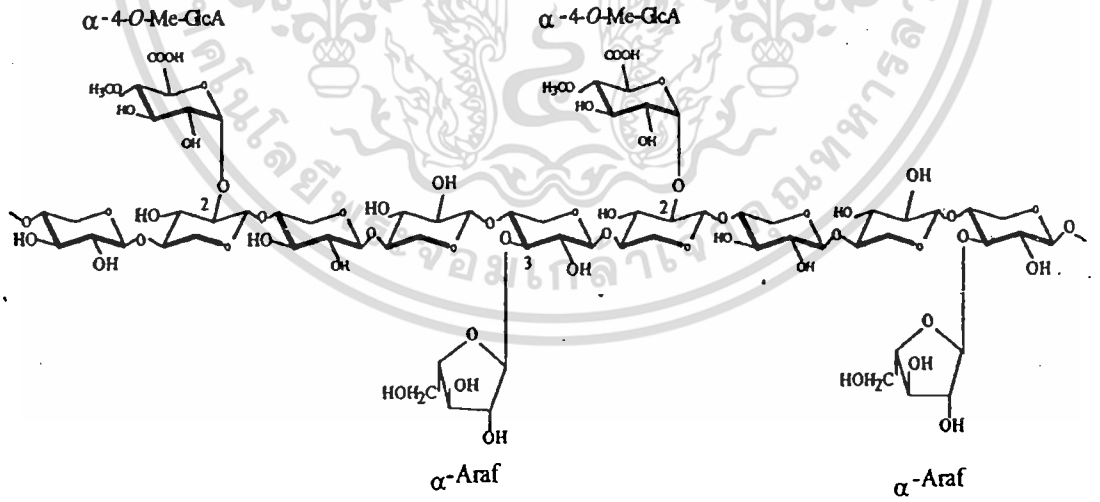
รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan ในพืชล้มลุกและพืชตระกูลหญ้า

ที่มา : Coughlan and Hazlewood (1993)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของไซแลน ซึ่งแสดงความแตกต่างของกลุ่มแทนที่ กับตำแหน่งที่จับ

ที่มา : Beg *et. al.* (2001)

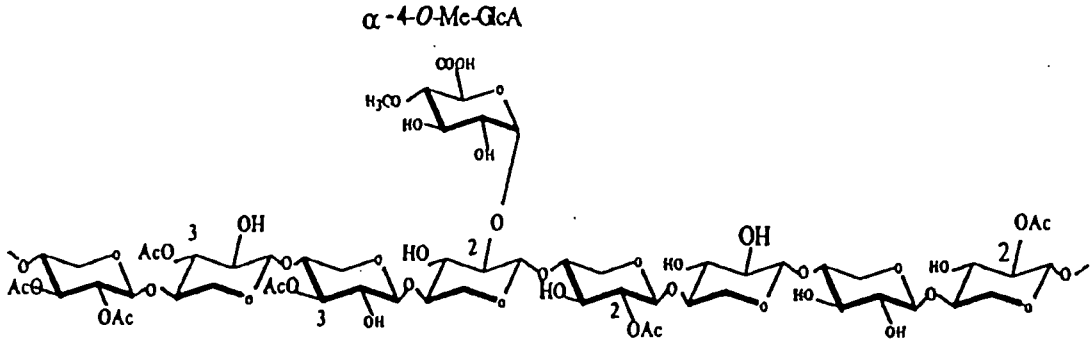


รูปที่ 2.8 ส่วนประกอบของ arabino-4-O-methyl-glucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้ออ่อน) ตัวเลขแสดงถึงตำแหน่งโซ่กิ่งชนิดต่าง ๆ สร้างพันธะกับคาร์บอนอะตอม

α-Araf : α-Arabinofuranose ; α-4-O-Me-GlcA ; α-4-O-methylglucuronic acid

ที่มา : Viilkari *et. al.* (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 ส่วนประกอบของ O-acetyl-4-O-methyl-glucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้อแข็ง) ตัวเลขแสดงถึงตำแหน่งโซ่กิ่งชนิดต่าง ๆ สร้างพันธะกับคาร์บอนอะตอม

Ac : Acetyl group ; α-4-O-Me-GlcA : α-4-O-methylglucuronic acid

ที่มา : Viilkari *et. al.* (1993)

ไซแลนในไม้ล้มลุกและพืชตระกูลหญ้า ได้แก่ O-acetyl-arabino-4-O-methyl-glucuronoxylan (รูปที่ 2.6) ไซแลนในไม้ล้มลุกมีโซ่กิ่งเป็น 4-O-methylglucuronic acid น้อยกว่าในไม้เนื้อแข็ง โดยส่วนใหญ่เป็น L-arabinofuranosyl group ซึ่งเชื่อมต่อกับไซโลสใน โครงสร้างหลักที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 หรือทั้งสองตำแหน่ง นอกจากนั้นพบหมู่อะซิทิล ร้อยละ 2 ถึง 5 เชื่อมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ในน้ำตาลไซโลสของโครงสร้างหลัก และมี arabinosyl side chain และมี *p*-coumarosyl ประมาณร้อยละ 6 และ 3 ตามลำดับ (Viilkari *et. al.*, 1993)

2.4 ไซลาโนไลติกเอนไซม์ (xylanolytic enzymes)

ไซลาโนไลติกเอนไซม์เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเฮมิเซลลูโลส ไซลาโนไลติกเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.4.1 กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลัก

2.4.1.1 เบต้า-1,4-เอนโดไซลาเนส (1,4-β-D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.8) ย่อยสลายพันธะ β-1,4 glycosidic ภายในเส้นสายของไซแลนอย่างสุ่ม การย่อยสลายขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น เช่น ความยาวของสายไซแลนและจำนวนโซ่กิ่ง ในช่วงแรกของการย่อยสลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ เมื่อเกิดการย่อยสลายต่อไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จะถูกย่อยสลายเป็นไซโลไตรโอส ไซโลไบโอสและไซโลส ตามลำดับ (Sunna and Antranikian, 1997)

2.4.1.2 เบต้า-ไซโลซิเดส (β-D-xyloside xylohydrolase; EC 3.2.1.37) เป็น exoglycosidase ที่ย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ และ ไซโลไบโอสจากปลายด้าน non-reducing และสามารถย่อยสลายสับสเตรทสังเคราะห์ (artificial substrate) เช่น *p*-nitrophenyl-β-D-xyloside การทำงานของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสต่อการย่อยสลายไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ลดลงเมื่อสายของไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถย่อยสลายไซแลนได้แต่อัตราการย่อยสลายเกิดได้ช้ามากโดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส (Kormelink *et. al.*, 1993)

2.4.2 กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างที่เป็นสายโซ่กิ่ง

2.4.2.1 แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส (α-L-arabinofuranosidase; EC 3.2.1.55) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายไซแลนโดยเฉพาะไซแลนในไม้เนื้ออ่อน อะราบิโนฟูราโนซิเดสแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ (1) exo-acting α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) ซึ่งสามารถย่อยสลาย *p*-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside และสาขาของ arabinan (2) endo-1,5-α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.99) โดยมีผลเฉพาะต่อ arabinan ที่เป็นเส้นตรงเท่านั้น และพบว่าการทำงานร่วมกันของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดสกับไซลาเนสทำให้ได้ไซโลส ไซโลไบโอสและอะราบิโนส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนเพิ่มขึ้น (Kormelink *et. al.*, 1993)

2.4.2.2 แอลฟา-กลูคูโรนิเดส (α-glucuronidase, EC 3.2.1.139) ย่อยสลาย α-1,2 linkage ระหว่างไซโลสและ D-glucuronic acid หรือ 4-O-methyl ether ที่พบในกลูคูโรโน-ไซแลน ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์แอลฟา-กลูคูโรนิเดสขึ้นอยู่กับแหล่งของเอนไซม์ (Kormelink และคณะ , 1993)

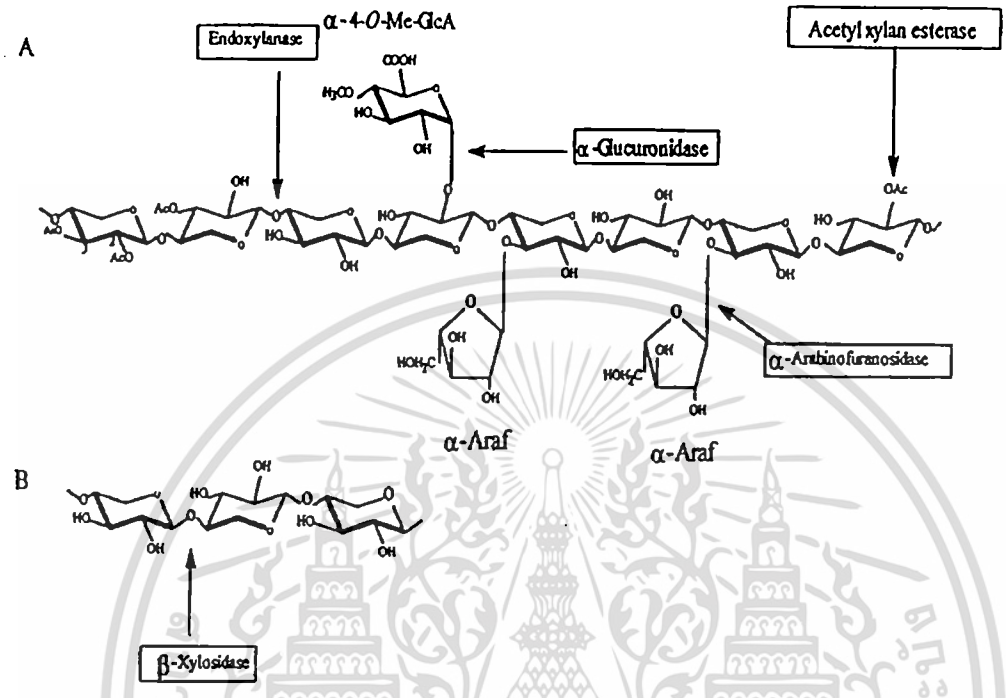
2.4.2.3 อะซิทิลไซแลนเอสเทอเรส (acetylxylan esterase, EC 3.1.1.6) ย่อยสลายพันธะระหว่าง O-acetyl residue ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ในสายของ acetylxylan (Kormelink *et. al.*, 1993)

2.5 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกเอนไซม์

ไซแลนมีโครงสร้างที่ซับซ้อน การย่อยสลายให้สมบูรณ์จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันในกลุ่มของไซลาโนไลติกเอนไซม์หลายชนิดเข้าช่วยในการทำปฏิกิริยา (ดังรูปที่ 2.10) ซึ่งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลักได้แก่ เอนโดไซลาเนสและเบต้า-ไซโลซิเดส ส่วนเอนไซม์ที่ย่อยสลายส่วนที่เป็นกิ่งก้านได้แก่ แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส แอลฟา-กลูคูโรนิเดสและอะซิทิลไซแลนเอสเตอเรส ระบบของเอนไซม์ไซลาเนสจะมีเอนไซม์หลายชนิดเกี่ยวข้อง พบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีหน้าที่โดยเฉพาะในการย่อยสลายไซแลน มีการรายงานว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโลไลติกที่ซับซ้อนได้ เช่น *Penicillium purpurogenum* (Belancic *et. al.*, 1995) ; *Melanocarpus albomyces* IIS 68 (Sarawat and Bisaria, 1997) ; *Aeromonas caviae* W 61 (Okai *et. al.*, 1998) เป็นต้น ยังมีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกโดย Haltrich *et. al.* (1994) รายงานว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sclerotium rolfsii ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส รวมทั้งมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในการย่อยสลายไซแลนไปเป็นไซโลส



รูปที่ 2.10 (A) การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซแลน
Ac : Acetyl group; α-Araf : α-Arabinofuranose; α-4-O-Me-GlcA : α-4-O-methylglucuronic acid
(B) การย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยเบต้าไซโลซิเดส

ที่มา : Sunna and Antranikian (1997)

2.6 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และคุณสมบัติของเอนไซม์

2.6.1 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

เอนไซม์ไซลาเนสพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่นแบคทีเรีย รา ยีสต์ แอคติโนมัยสีท โปรโตซัว พืช แมลงและสัตว์ทะเลบางชนิด เอนไซม์ในกลุ่มนี้ที่นิยมศึกษามักมาจากจุลินทรีย์ เนื่องจากเจริญได้รวดเร็ว เพาะเลี้ยงได้ง่าย จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) (Gascoigne, 1960 ; Strobel, 1963 ; Kusakabe *et. al.*, 1966 and Paice *et. al.*, 1978) แต่ก็มีบางชนิดที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสอยู่ในเซลล์ (intracellular enzyme) เช่น *Aspergillus niger* (Iwamoto *et. al.*, 1973) *A. foetidus* (Whister and Masak, 1995) และ *Butyrivibrio fibrisovens* (Clarke *et. al.*, 1969) เป็นต้น และการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเริ่มผลิตในระยะที่มีการเจริญคงที่ (Stationary growth phase) เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pseudomonas stuzeri (Toh, 1978) *Streptomyces* sp. (Nakanishi *et. al.*, 1976) และ *A. niger* (John *et. al.*, 1979) เป็นต้น

2.6.2 คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

โดยทั่วไปเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส แต่สำหรับพีเอชที่เหมาะสมพบว่า เอนไซม์ไซลาเนสจากแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทมีพีเอชที่เหมาะสมค่อนข้างเป็นกลาง แต่ของเชื้อราค่อนข้างจะเป็นกรด ส่วนความคงตัวต่อพีเอชและความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์จะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์

2.6.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อเอนไซม์

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสค่อนข้างแปรผันโดยขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนมากจะสร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส มีการศึกษาของ Trigo and Ball (1994) ได้รายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Thermospora fusca* BD25 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 60 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงมากกว่า 70 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน Ohno *et. al.* (1994) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Fusidium* BX1 พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสสามารทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและมีความเสถียรต่ออุณหภูมิตั้งแต่อุณหภูมิ 0 ถึง 50 องศาเซลเซียส ความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงของเอนไซม์ส่วนมากจะพิจารณาจากค่าครึ่งชีวิต (half-life ; $T_{1/2}$) ของกิจกรรมเอนไซม์ และความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโปรตีนใน supernatant จากการเลี้ยงเชื้อ เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophilic fungi) ตามปกติจะมีความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงมากกว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic fungi) แต่น้อยกว่าแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง (Thermophilic bacterria) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีค่าครึ่งชีวิต ($T_{1/2}$) ยาวนานที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสหรือที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียเหล่านี้จะมีระดับต่ำกว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูง (Lisching *et. al.*, 1993) มีการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงของพวกเชื้อราชอบอุณหภูมิสูงโดย Sing *et. al.* (2000) รายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนสของ *Thermomyces lanuginosus* SSBP มีความสามารถคงตัวสูงที่สุด ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิต ($T_{1/2}$) เท่ากับ 337 นาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และสามารถรักษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้สมบูรณ์ที่สุดที่อุณหภูมิสูงถึง 65 องศาเซลเซียส และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ประมาณร้อยละ 45 หลังจากระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อีกทั้งยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สามารถรักษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสได้นานที่สุดเป็นระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 60 องศา-เซลเซียส ยิ่งกว่านั้น Gome *et. al.*, 1993 ได้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงของ *T. lanuginosus* พบว่าความความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงของ *T. lanuginosus* จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารลิกโนเซลลูโลสที่ใช้เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ ซังข้าวโพดและใบข้าวโพดเป็นสับสเตรทเชื้อรานี้จะมีความสามารถคงตัวที่อุณหภูมิสูงได้ดีที่สุด

2.6.2.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อเอนไซม์

เอนไซม์ไซลาเนสจากแบคทีเรียส่วนใหญ่มีความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงพีเอชที่เป็นกลางถึงด่าง มีการศึกษาของ Khasin *et. al.* (1994) ได้ศึกษาถึงผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Bacillus stearothermophilus* พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์นี้ที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 9.0 ขึ้นไป เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราชอบอุณหภูมิสูงส่วนใหญ่มีความสามารถในการคงตัวได้ดีในพีเอชช่วงแคบประมาณ 5.5 ถึง 9.5 แต่จะสามารถคงตัวได้ดีในพีเอชช่วงกว้างขึ้นเมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Sing *et. al.*,2000) มีกลุ่มเชื้อราที่ชอบด่าง (Alkaliphilic fungi) เช่น *A. fischeri* Fxn 1 สามาถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทำงานได้ในสภาวะที่เป็นด่าง (Raj and Chandra, 1996)

2.7 ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา

เชื้อราที่แท้จริงจัดอยู่ในอยู่ 4 ไฟลัม คือ Chytridiomycota , Zygomycota , Ascomycota และ Basidiomycota (Kirk *et. al.*, 2001) เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ชนิดเฮทเตอโรโทรฟิก (heterotrophic) ซึ่งแต่ก่อนพิจารณาว่าเป็นพืชชั้นต่ำ ไม่มีคลอโรฟิลล์ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อมีความชัดเจนทางด้านโมเลกุลจึงได้มีข้อเสนอแนะสนับสนุนว่าเชื้อรามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสัตว์มากกว่ากลุ่มของสิ่งมีชีวิตพวก ยูคาริโอต (eukaryotes) ชนิดอื่น โดยในความเป็นจริงแล้วเชื้อรามีลักษณะพิเศษอยู่ในตัวเองและมีอยู่เพียงกลุ่มเดียวในโลกจึงกำหนดให้มีอาณาจักรของตัวเอง ซึ่งมีการจัดจำแนกไว้มากกว่า 70,000 สปีชีส์ และในแต่ละปีมีการค้นพบอีกประมาณ 1,700 สปีชีส์ สำหรับการคาดคะเนอย่างคร่าว ๆ พิจารณาว่าจำนวนทั้งหมดของเชื้อรามีมากกว่า 1.5 ล้าน สปีชีส์ (Hawksworth, 1991) ดังนั้นเชื้อราจึงจัดว่าเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากกลุ่มของพวกแมลง

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีนิวเคลียสแบบยูคาริโอต ไม่มีคลอโรฟิลล์ สร้างสปอร์ได้ มีการ สืบพันธ์ทั้งแบบมีเพศและไม่มีเพศ โครงสร้างเป็นแบบเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ โดยเซลล์เรียงตัวอยู่ในแนวเดียวกันเป็นเส้นใยที่เจริญขยายตามแนวยาวได้อย่างไม่มีขอบเขตจำกัด ผนังเซลล์ประกอบด้วยสารพวกไคตินหรือเซลลูโลส (บัญญัติ สุขศรีงาม , 2534) เชื้อราที่มีเซลล์เดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรียกว่ายีสต์ ส่วนพวกที่มีหลายเซลล์จะประกอบด้วยเซลล์เรียงตัวในแนวเดียวกันเป็นเส้นใยเรียกว่า ไฮฟา (hypha) เส้นใยจะมีการเพิ่มจำนวนและรวมกลุ่มกันจนมีขนาดใหญ่และมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) เชื้อราส่วนมากมีเส้นใยแบบมีผนังกั้น เรียกว่า septate hypha ทำให้มีลักษณะเป็นห้อง ๆ ซึ่งผนังกั้นนั้นเรียกว่า septa โดยแต่ละเซลล์จะเชื่อมต่อกันด้วยรูตรงกลางของผนังกั้น ในแต่ละเซลล์อาจมีหนึ่งนิวเคลียส (uninucleate) หรือหลายนิวเคลียส (multinucleate) ส่วนชนิดของเชื้อราที่เส้นใยไม่มีผนังกั้น เรียกว่า coenolytic hypha ทำให้เส้นใยมีลักษณะเป็นท่อทะลุถึงกันโดยตลอด เป็นเซลล์ที่ยาวมีหลายนิวเคลียส เชื้อรามีการเจริญอย่างรวดเร็วที่บริเวณปลายสุดของเส้นใย การแบ่งนิวเคลียสของเชื้อราไม่เหมือนกับจุลินทรีย์ชั้นสูงกว่าเนื่องจากไม่มี centrioles โดยจะไม่แยกออกจากกันระหว่างระยะไมโตซิส (mitosis) *(คือ ไมโตซิสแบบ "ปิด" โดยมีลักษณะของการเกิดไมโต-ซิสน้อยมาก)* ซึ่งโดยทั่วไปวงจรชีวิตของเชื้อราจะเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยในระยะดิพพลอยด์ (diploid) จะมีการสร้างไซโกต (zygote) หลังจากนั้นจะตามด้วยการแบ่งนิวเคลียสในระยะไมโอซิส (meiosis) และเกิดการสร้างสปอร์

สภาพแวดล้อมในการเจริญของเชื้อราโดยทั่วไปที่สำคัญ ๆ (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534) ได้แก่

1. <u>อาหาร</u> อาหารที่จำเป็นในการเจริญเป็นได้ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยทั่วไปเชื้อราจะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ใช้สารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน การเจริญของเชื้อราในอาหารต่าง ๆ นั้นมีการสร้างเอนไซม์ออกมาสองชนิด คือเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์และเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ จะปลดปล่อยออกมาจากเซลล์เพื่อย่อยสลายอาหารที่มีโมเลกุลซับซ้อนให้เป็นสารโมเลกุลเชิงเดี่ยวเพื่อให้ดูดซึมไปใช้ได้ ส่วนเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์จะย่อยสลายสารอาหารที่ดูดซึมเข้าไปและปลดปล่อยพลังงานออกมาใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์

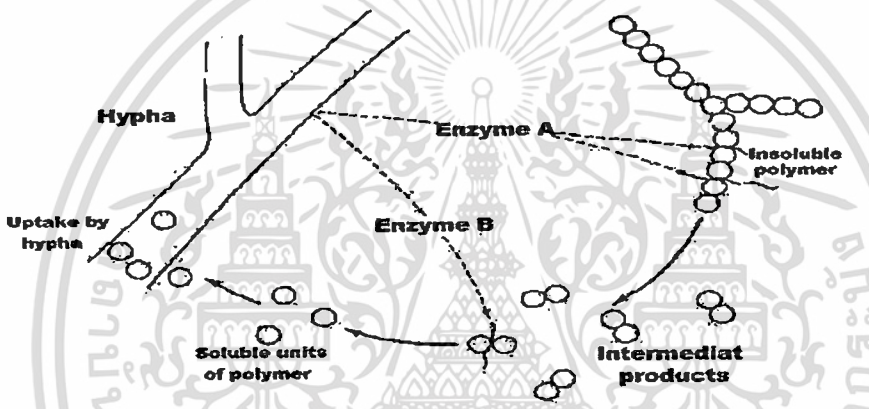
2. <u>อุณหภูมิ</u> เชื้อรามีช่วงอุณหภูมิในการเจริญได้แคบกว่าแบคทีเรีย ส่วนมากเจริญที่อุณหภูมิ 0 ถึง 35 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส และในบางชนิดเป็นพวกเชื้อราชอบอุณหภูมิสูง มีอุณหภูมิสูงสุดเจริญได้ที่ 50 องศาเซลเซียส และในบางครั้งอาจถึง 60 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิต่ำเจริญได้คือ 20 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามสปอร์ของเชื้อราบางชนิดทนต่ออุณหภูมิต่ำมาก ๆ ได้ดี เช่น สปอร์ที่อยู่ในไนโตรเจนเหลวจะทนอุณหภูมิต่ำได้มากถึง –196 องศาเซลเซียส

3. <u>พีเอช</u> เชื้อราเจริญได้ในช่วงพีเอช 2 ถึง 10 แต่พีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4 ถึง 6 ซึ่งเป็นกรด ดังนั้นสภาวะที่เป็นกรดจะทำให้เชื้อราเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย

เชื้อราทั้งหมดเป็นพวกเฮทเตอโรโทรฟิก มีการดำรงชีวิตโดยใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นสารอาหาร ซึ่งมักอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นแหล่งของสารอาหาร สารประกอบคาร์บอนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยเชื้อรา ได้แก่ สารที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แป้ง ลิกนิน ไคติน เคอราติน โปรตีนและไขมัน เป็นต้น และสาร ที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและคู่ กรดไขมันและกรดอะมิโน เป็นต้น โดยเชื้อราจะขนส่งสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กผ่านข้ามเซลล์เมมเบรน ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านไปได้ ในอีกทางหนึ่งเชื้อราจะหลั่งเอนไซม์มาย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนให้เปลี่ยนเป็นสารที่มีโมเลกุลเดี่ยว ต่อมาจะถูกดูดซึมและนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์และแหล่งคาร์บอน ซึ่งเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์สามารถแพร่ออกจากเส้นใยของเชื้อราหรือยึดติดกับผนังเซลล์ของเชื้อรา ดังแสดงในรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 การย่อยสลายภายนอกเซลล์ของเชื้อรา เอนไซม์หลั่งออกมาเพื่อย่อยสารพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่ได้เป็นสารตัวกลางเกิดขึ้น และต่อมาจะเกิดการย่อยสลายได้ผลเป็นหน่วยของมอนอเมอร์เพื่อให้เชื้อราดูดซึมต่อไป

ที่มา : Carlile *et. al.* (2001)

2.8 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา (Campbell *et. al.*, 1985)

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เราจำเป็นต้องนำเชื้อหรือเซลล์หรือชิ้นส่วนที่ต้องการศึกษานั้นมาเตรียมสไลด์ ซึ่งวิธีที่ง่ายที่สุด คือการทำ wet mount แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ อาจทำให้ส่วนประกอบหรือโครงสร้างบางอย่างของเชื้อรา เสียหาย เช่นทำให้ไยราแตกหักหรือทำให้โคนิเดีย (conidia) หลุดหายจึงทำให้เห็นโครงสร้างที่แท้จริงไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีวิธีการทำสไลด์ที่เลียนแบบการเจริญเติบโตตามธรรมชาติของเชื้อราเพื่อทำให้การศึกษาลักษณะของเชื้อราถูกต้องมากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการจัดจำแนกชนิดของ เชื้อรา

2.8.1 Slide culture technique (Microslide culture technique) (Campbell *et. al.*, 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

วิธีนี้มีขั้นตอนการเตรียมสไลด์ดังต่อไปนี้ ใช้ใบมีดโกนที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดวุ้น PDA ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร หรืออาจใช้คอร์กบอเรอร์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเจาะวุ้นให้เป็นแท่งกลมนำไปวางบนสไลด์ในจานเลี้ยงเชื้อที่ภายในบุด้วยสำลีและมีแท่งแก้วรูปตัววีที่ด้านบนมีแผ่นแก้วปิดสไลด์วางพาดอยู่ (slide culture plate) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเส้นใยจากเชื้อราที่ต้องการศึกษามาแตะตรงกลางของชิ้นวุ้น แล้วใช้ปากคีบ (forceps) คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ไปจุ่มแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 แล้วลนไฟและปล่อยให้เย็นก่อนที่จะนำไปปิดบนแผ่นวุ้น เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงบนสำลีให้ชื้นเพื่อไม่ให้วุ้นแห้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ถึง 4 วัน โดยพยายามไม่ให้น้ำบนสำลีแห้ง (เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเมื่อจำเป็น) นำ slide culture plate มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบว่ามีการสร้างโคนิเดียให้คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ออกแล้วเขี่ยชิ้นวุ้นทิ้งไป จะสังเกตได้ว่ามีเส้นใยและโคนิเดียเกาะบนแผ่นแก้วปิดสไลด์และบนสไลด์ แล้วหยดแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 95 ลงบนบริเวณสไลด์ในบริเวณที่มีเส้นใยเกาะเพื่อไล่ฟองอากาศ หยดสีย้อม lactophenol cotton blue บนสไลด์ที่สะอาดและปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ที่สะอาด จะได้ slide culture ทั้งหมด 2 ชุด จากการเพาะเลี้ยงเชื้อเพียง 1 ชุด

2.8.2 **Coverslip sandwich- technique (Campbell *et. al.*, 1985)**

วิธีนี้มีขั้นตอนการเตรียมสไลด์ดังต่อไปนี้ ใช้ลูพ (loop) เขี่ยเชื้อราโดยให้ได้เส้นใยรา (mycelia) แล้วขีด (streak) ลงบนผิวของอาหาร PDA โดยขีดจานละ 4 ตำแหน่ง คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ (ขนาดเล็ก) 2 แผ่น ต่อรอยขีด 1 ตำแหน่ง แล้วปิดฝาจาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 ถึง 5 วัน เชื้อราจะเจริญบนผิววุ้นก่อนแล้วจึงจะเจริญขึ้นมาทั้ง 2 ด้านของแผ่นแก้วปิดสไลด์ หลังจากนั้นใช้ปากคีบค่อย ๆ ดึงแผ่นแก้วปิดสไลด์ (1 แผ่น) ออกมาวางบนสไลด์ที่ได้หยดสี lactophenol cotton blue ไว้แล้ว 1 หยด ต่อไปหยด lactophenol cotton blue 2 ถึง 3 หยดบนแผ่นแก้วปิดสไลด์นั้น ๆ แล้วปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 1 แผ่น ดังนั้นแผ่นแก้วปิดสไลด์ขนาดเล็กซึ่งมีเชื้อราจะถูกประกบด้วยสไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ที่มีขนาดใหญ่กว่าในลักษณะคล้ายแซนด์วิช ดังนั้นจากอาหาร PDA 1 ชุดจะสามารถเตรียมสไลด์ได้ 8 แผ่น

2.9 การสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา

ตามปกติเอนไซม์ไซลาเนสมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์เหนี่ยวนำ (inducible enzyme) ซึ่งจะขับออกมาในอาหารที่มีไซแลนบริสุทธิ์หรือวัสดุเศษเหลือทิ้งที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยไซแลน (Balakrishnan *et. al.*, 1997) ซึ่งลักษณะโดยรวมของการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ย่อยสลายสารจำพวก พอลิเมอร์ (polymeric substances) คือเป็นการสร้างเอนไซม์ในระดับต่ำและขับออกมา โดยปลดปล่อยส่วนที่ละลายได้ของสารพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาเพียงเล็กน้อยแล้วทะลุผ่านเซลล์เมมเบรนออกมา ตามความเข้าใจที่เกี่ยวกับจุลินทรีย์ พบว่าสารประกอบหรือโมเลกุลที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

58898

เกิดขึ้นเหล่านี้จะกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ในปริมาณที่เพียงพอสำหรับการย่อยสลายของจุลินทรีย์ และบ่อยครั้งจะพบว่า สารคะตาบอไลต์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลน มีผลช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสทั้งในเชื้อราและยีสต์ ตัวอย่างที่เด่นชัด เช่นไซโลไบโอส น่าจะมีความเป็นไปได้ว่าเป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่มีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกันกับกลุ่มจุลินทรีย์ทั้งหมด เช่นเดียวกับ ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น (Hrmova *et. al.*,1986 ; Hrmova *et. al.*, 1989 ; Royer and Nakas, 1990 and Pinaga *et. al.*, 1994) การย่อยสลายไซโลไบโอสจะได้ผลลัพธ์เป็นไซโลสซึ่งสามารถแสดง คุณสมบัติเป็นสารคะตาบอไลต์ที่ยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนส ในทางตรงกันข้ามไซโลสสามารถเป็นตัวเหนี่ยวนำที่ดีของการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้ด้วย (Maheshwari and Kamalam, 1985 ; Pou-linase and Drigues,1987 ; Hrmova *et. al.*, 1989 ; Ghosh and Nanda, 1994 ; Pukarthofer and Steiner, 1995)

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไซแลนได้มักจะสามารถสร้างเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติก (cellulolytic enzyme) และขับออกมาผสมกับเอนไซม์ไซลาเนส ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากการสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ไม่เพียงแต่จะมีการแสดงออกเมื่อใช้ไซแลนเป็นสับสเตรทเพียงอย่างเดียว แต่ยังสามารถแสดงออกได้เมื่อมีเซลลูโลสอยู่ด้วย Hrmova *et. al.* (1986) และ Senior *et. al.* (1989a) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *T. reesei* และ *T. harzianum* พบว่าเมื่อเชื้อราทั้งสองเจริญบนเซลลูโลสการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเกิดได้น้อยมาก แต่เมื่อเจริญบนไซแลนจะสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากขึ้น ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์บางชนิดจะสามารถควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ไซลาเนสและเซลลูเลสแยกออกจากกันได้ แต่ยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมาพร้อมกับเอนไซม์เซลลูเลสเสมอ ดังเช่นการศึกษาของ Hrmova *et. al.* (1986) ซึ่งได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *T. reesei* พบว่าไซแลนและไซโลไบโอสช่วยชักนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *T. reesei* แต่เมื่อใช้ sophorose เป็นสับสเตรตจะชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตทั้งเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสออกมาพร้อมกัน โดยส่วนมากกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเหนี่ยวนำด้วย sophorose จะเป็นการแสดงออกด้วยคุณสมบัติของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสชนิดที่ไม่จำเพาะ ฉะนั้น *T. reesei* เมื่อเจริญบน sophorose ซึ่งเป็นสารประกอบน้ำตาลโมเลกุลคู่จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสชนิดที่มีความจำเพาะน้อย Hrmova *et. al.* (1989) ยังได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *A. terreus* พบว่าเมื่อใช้ไซแลน ไซโลไบโอสหรือดี-ไซโลสเป็นสับสเตรต เชื้อราจะสามารถสร้างเอนไซม์ ไซลาเนสได้ แต่เมื่อใช้เซลลูโลสหรือเซลโลไบโอสเป็นสับสเตรต เชื้อราจะสร้างทั้งเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสออกมาด้วยกัน มีการศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Schizophyllum commune* โดย Haltrich *et. al.* (1995) รายงานว่า *S. commune* สามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้เซลลูโลสหรือสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น เซลโลไบโอสหรือ sophorose และจะเป็นตัวเหนี่ยวนำที่มี ประสิทธิภาพใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งจะยับยั้งไม่ให้มีการปะปนของเอนไซม์ ไซลาเนส ในทางตรงกันข้ามไซแลนหรือไซโลไบโอสไม่มีประสิทธิภาพในการเป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส แต่เป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส ยิ่งกว่านั้น Haltrich and Steiner (1994) รายงานว่าการเจริญของ *S. commune* บนอาหารที่ประกอบด้วยส่วนผสมระหว่างเซลลูโลสและไซแลนมีผลทำให้เชื้อรานี้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเจริญในอาหารที่ประกอบด้วยเซลลูโลสเพียงอย่างเดียว และยังพบว่าการเพิ่มอัตราส่วนของไซแลนต่อเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสลดลงด้วย

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าในการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสมีลักษณะเช่นเดียวกันกับการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ของเอนไซม์เหนี่ยวนำชนิดอื่น ๆ เช่น แมนแนนเนสและเซลลูเลส เป็นต้น ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของยีนควบคุม (regulator gene) อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างสมบูรณ์สำหรับกลไกการควบคุมการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ ด้วยเหตุที่ว่าไซแลนไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ การเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจะมีการตอบสนองกับส่วนของไซแลนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งจะนำไปเป็นสับสเตรตสำหรับการผลิตเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้องค์ประกอบเหล่านี้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถผลิตเอนไซม์ได้ (Bastawde, 1992 and Kulkarni *et. al.*, 1999) และยังพบว่าบนพื้นผิวหน้าของจุลินทรีย์หลายชนิดจะมีสารเชิงซ้อนที่เรียกว่า "ไซลาโนโซม" (xylanosome) ซึ่งเป็นสารเชิงซ้อนที่อยู่อย่างกระจัดกระจาย มีคุณสมบัติเป็น multienzyme complexes ที่มีหน้าที่หลายอย่าง (multifunctional) และสารเชิงซ้อนนี้มีบทบาทสำคัญใน การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส (Sunna and Antranikian, 1997)

2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซลาโนไลติกเอนไซม์โดยการหมัก

การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสามารถผลิตได้ทั้งในการหมักในสภาวะอาหารแข็ง (solid-state fermentation systems) และการหมักในสภาวะอาหารเหลว (submerged fermentation systems) การหมักในสภาวะอาหารแข็ง หมายถึง ระบบการหมักที่อาศัยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารแห้งในสภาพซึ่งไม่มีน้ำอิสระ (free liquid) อยู่ในระบบ อย่างไรก็ตามน้ำที่อยู่ในระบบจะอยู่ในรูปความชื้น (moisture) ที่ถูกดูดซับอยู่กับวัตถุดิบเท่านั้น ในระบบการหมักในสภาวะอาหารแข็งเช่นนี้ ปริมาณความชื้นหรือน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ (a_w , available water) จึงค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงเหมาะสมต่อการหมักโดยเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสภาวะของการเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในการหมักในสภาวะอาหารแข็งต้องควบคุมให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อรา ดังนี้คือ วัตถุดิบที่นิยมใช้ในการหมักในสภาพอาหารแข็งมักเป็นพวกธัญพืช ซึ่งอาจใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการทำอาหาร เป็นต้น โดยมีความสำคัญในการใช้เป็นตัวชักนำ ซึ่งจะเป็นแหล่งคาร์บอนของการผลิตเอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติก สับสเตรตเหล่านี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องใช้ความเข้มข้นสูงมาก โดยขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดซับน้ำของสับสเตรตและขนาดของสับสเตรตต้องควบคุมให้มีความเหมาะสม ทั้งนี้เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างอนุภาคของสับสเตรตเพียงพอที่จะให้อากาศถ่ายเทหมุนเวียนได้ดี นอกจากนี้อาจมีการเติมสารอาหารอื่น ๆ เช่น แหล่งไนโตรเจนหรือเกลือแร่ ข้อได้เปรียบของ การหมักในสภาวะอาหารแข็งที่ดีกว่าการหมักในสภาวะอาหารเหลว เช่น ปริมาตรของการเก็บเกี่ยว ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมีขนาดเล็กกว่า สับสเตรตมีราคาถูก การเลี้ยงเชื้อมีการลงทุนน้อยกว่าและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนต่ำ มีการศึกษาเกี่ยวกับการปรับปรุงการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย Gutierrez-Correa and Tengerdy (1998) ซึ่งใช้การเลี้ยงเชื้อราแบบผสมของ *T. reesei* LM-UC4 E 1, *Aspergillus niger* ATCC 10864 และ *A. phoenicis* QM 329 พบว่าให้ผลได้ของเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลได้ของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากการหมักในสภาวะอาหารเหลวของ *Melanocarpus albomyces* IIS-68 ซึ่งใช้ฟางข้าวสาลีและชานอ้อยเป็นสารตั้งต้น (Jain, 1995) การหมักในสภาวะอาหารเหลว หมายถึง เป็นการหมักที่วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักละลายอยู่ในอาหารเหลว ดังนั้นส่วนประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นน้ำที่มีสารอาหารต่าง ๆ และวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานละลายอยู่ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และทำการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่อไป ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยการหมักในสภาวะอาหารเหลวต้องมีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เช่นเดียวกันกับการหมักในสภาวะอาหารแข็ง

โดยทั่วไปกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมของการหมัก การผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณสูงจะต้องควบคุมปัจจัยต่างๆ ให้ เหมาะสมกับจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ เอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติกเป็นเอนไซม์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้ผลิตขึ้นได้โดยใช้สารอาหารที่เหมาะสม ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดและปริมาณของสารอาหารให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์จะทำให้ได้เอนไซม์ปริมาณสูง ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ได้แก่

2.10.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์พลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปกระบวนการหมักเพื่อผลิตไซลาโนไลติกเอนไซม์โดยทั่วไปนิยมใช้สารคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน การเลือกใช้สับสเตรตที่เหมาะสมมีความสำคัญมากสำหรับความสำเร็จในการผลิตเอนไซม์ ไซลาเนส สับสเตรตไม่เพียงแต่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แต่ยังใช้เป็นสารประกอบที่จำเป็นสำหรับการชักนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ ไซแลนซึ่งเป็นสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำสามารถช่วยเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีมาก ไซแลนบริสุทธ์สามารถใช้เป็นสับสเตรทที่ดีและบ่อยครั้งมีการนำไปใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในระดับการทดลองขนาดเล็ก ความสำคัญของสับสเตรตไม่เพียงแต่ส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(yields) ของเอนไซม์ไซลาเนส เท่านั้น แต่การเลือกใช้สับสเตรตที่มีความสามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีโดยไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วยหรืออาจจะมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณที่น้อยมากจะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น (Yu *et. al.*, 1987 ; Hrmova *et. al.*, 1989 ; Senior *et. al.*, 1989b ; Biswas *et. al.*, 1990 and Gilbert *et. al.*, 1992) สำหรับกระบวนการผลิตเอนไซม์ ไซลาเนสขนาดใหญ่ การใช้สับสเตรตที่มีราคาแพงจะไม่มีความเหมาะสมต่อการผลิต เนื่องจากไม่คุ้มต้นทุน ยกเว้นแต่ว่าสามารถหาวัตถุดิบที่ใช้ทดแทนสารประกอบไซแลนหรือไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เหล่านี้ได้และต้องมีราคาเหมาะสมกับกระบวนการผลิต จากการพิจารณาเหตุผลดังกล่าว พบว่าการใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรหรือวัสดุเศษเหลือจากป่าไม้ (Senior *et. al.*, 1989b and Bailey and Viikari, 1993) หรือใช้ไซแลนที่แยกได้จากผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น ไซแลนที่แยกได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเส้นใยสังเคราะห์เรยอน (Gamerith *et. al.*, 1992) สับสเตรตที่มีราคาถูกโดยทั่วไปมักเป็นสารพวกลิกโนเซลลูโลส เช่น เปลือกข้าวบาร์เลย์ ซังข้าวโพด หญ้าแห้ง รำหรือฟางข้าวสาลี เป็นต้น มีงานวิจัยที่ผ่านมามากมายได้ทำการศึกษาจำแนกและประเมินค่าสารประกอบเหล่านี้ในด้านการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการผลิตเอนไซม์ ไซลาเนส และพบว่าสับสเตรตเหล่านี้บางชนิดมีคุณสมบัติที่ดีกว่าการใช้ไซแลนหรือเซลลูโลสบริสุทธิ์ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสอย่างมีนัยสำคัญ ฉะนั้นจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ดีสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตขนาดใหญ่ มีการใช้วัสดุพวกเฮมิเซลลูโลสหรือพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นสับสเตรตที่ไม่ละลายน้ำ เช่น รำข้าวสาลี ฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย เป็นต้น ในการ ชักนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อรา (Kesker, 1992 ; Kuhad *et. al.*, 1998 ; Puchart *et. al.*, 1999 ; Beg *et. al.*, 2000a and Gupta *et. al.*, 2001) เช่น Purkarthofer *et. al.* (1993b) รายงานว่า ซังข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *T. lanuginosus* DSM 5826 เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น และเมื่อใช้ซังข้าวโพดบดความเข้มข้น 31.2 กรัม ต่อลิตร เลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวปริมาตร 30 ลิตร อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และ 7.5 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด 1,950 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นค่าความสามารถในการผลิต (productivity) เท่ากับ 16,525 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง$^{-1}$ Gasper *et. al.* (1997) ได้ศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติกโดย *P. caneseens* 10-10c พบว่าการผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ถั่วเหลืองป่นหรือฟางข้าวสาลีเป็น แหล่งคาร์บอน ส่วนการใช้กลูโคส ไซโลสหรือกาแลคโตส จะให้ผลเป็นสารยับยั้งการผลิตเอนไซม์ ไซลาเนส นอกจากนี้ยังมีข้อเสนอแนะว่าการใช้สารพวกลิกโนเซลลูโลสซึ่งไม่เพียงแต่ประกอบด้วย เฮมิเซลลูโลสอย่างเดียว แต่ยังมีสารชนิดอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย เช่น ลิกนิน เพคตินและเซลลูโลส เป็นต้น เมื่อนำสารเหล่านี้มาใช้ในการผลิตเอนไซม์โดยเชื้อราจะได้ปริมาณเอนไซม์ ไซลาเนสในระดับต่ำ เนื่องจากไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถนำสารเหล่านี้ไปใช้ในระบบเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ แต่ พบว่าหากมีการแปรสภาพ (pretreatment) สารลิกโนเซลลูโลสจะช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราได้ วิธีการแปรสภาพวัตถุดิบเหล่านี้มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การแปรสภาพลักษณะทางฟิสิกส์ของลิกนินมีผลทำให้ลิกนินละลายน้ำได้ การเพิ่มความสามารถในการใช้ประโยชน์ของสารเหล่านี้โดยทำให้อนุภาคของสารลิกโนเซลลูโลสเล็กลง ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวหน้าและขนาดของรูพรุน การลดปริมาณเซลลูโลสที่อยู่ในรูปผลึก (decrystallinization) หรือการลดความเป็น พอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส (depolymerization) เป็นต้น ดังนั้นการแปรสภาพวัตถุดิบจึงให้ผลที่ดีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส มีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับผลของการแปรสภาพวัตถุดิบที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เช่น Purkarthofer *et. al.* (1993b) ได้ศึกษาการใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการแปรสภาพโดยการลดขนาดให้มีขนาดอนุภาค 2 ถึง 7 มิลลิเมตร เป็นสับสเตรตสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *T. lanuginosus* พบว่ามีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ไซลาเนสเท่ากับ 26,700 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการแปรสภาพให้มีขนาดอนุภาคเป็นผงลักษณะคล้ายแป้ง พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสลดลง 3 เท่า ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส เท่ากับ 7,952 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร ยังมีการศึกษาถึงการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากสับสเตรตที่ละลายน้ำได้ เช่น Sachslehner *et. al.* (1998) และ Xu *et. al.*, (1998) รายงานว่าการใช้แอล-ซอร์โบส (L-sorbose) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *S. rolfsii* และ *T. reesei* PC-3-7 ได้ ส่วน Liu *et. al.* (1998) รายงานว่าไซโลสสามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *T. cutaneum* SL409 แต่เมื่อมีกลูโคสเกิดขึ้นจะยับยั้งการผลิตเอนไซม์ ในทำนองเดียวกันมีการรายงานว่าน้ำตาลที่สามารถเมแทบอไลต์ อย่างสมบูรณ์ เช่นกลูโคสและ/หรือไซโลสมีผลเป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนส (Fernandez-Epsinar *et. al.*, 1992 ; Ishihara *et. al.*, 1997 ; Bataillon *et. al.*, 1998 ; Liu *et. al.*, 1999 and Beg *et. al.*, 2000a) นอกจากนี้ Purkarthofer and Steiner (1995) รายงานว่าจลนพลศาสตร์ของการปลดปล่อยเอนไซม์ไซลาเนสขององุลินทรีย์ จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรทที่ใช้เป็นตัวชักนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส หากมีการใช้ประโยชน์จากตัวชักนำที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ให้หมดลงอย่างช้า ๆ โดยตลอดระยะเวลาของการหมัก ซึ่งเป็นการทำให้ระยะเวลาของการหมักยาวนานขึ้น จะช่วยส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงขึ้น มีงานวิจัยที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้โดย Lenartovicz *et. al.* (2003) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการใช้วัสดุเศษเหลือพวกลิกโน-เซลลูโลสหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดใช้ความเข้มข้นร้อยละ 2 และ ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการผลิตเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดสโดย *A. fumigatus* ในกระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารเหลว พบว่าเมื่อใช้ซังข้าวโพดบดความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน จะได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดสสูงสุดเท่ากับ 45.40 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วน Singh *et. al.* (1995) รายงานว่าเมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มปริมาณความเข้มข้นของรำข้าวสาลีจากความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 3 พบว่าปริมาณการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส โดย *Fusarium oxysporum* NTG-19 เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของรำข้าวสาลีมากกว่าร้อยละ 3 จะไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ทั้งสอง

2.10.2 แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8 ถึง 10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป โดยบางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ แต่บางชนิดจะต้องการสารไนโตรเจนอินทรีย์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีสารไนโตรเจนอินทรีย์เป็นองค์ประกอบได้เร็วกว่าในอาหารที่มีสารไนโตรเจนอนินทรีย์เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจึงขึ้นอยู่กับว่าจุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดใดได้ดี โดยต้องพิจารณาควบคู่ไปกับราคาของแหล่งไนโตรเจนและประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิตด้วย เช่นเชื้อรา โดยทั่วไปจะสามารถใช้เกลือแอมโมเนียได้ดี จึงนิยมใช้เกลือแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา เป็นต้น (สมใจ ศิริโภค, 2537) ในทางตรงกันข้ามหากมีการใช้เกลือแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว พบว่าเมื่อเชื้อราเจริญจะมีการปลดปล่อยกรดออกมาอย่างรวดเร็ว ทำให้การเจริญของเชื้อราหยุดชะงักได้ (Raimbault and Alazard, 1980) มีการศึกษาถึงแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เช่น Hoq *et. al.* (1994) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ปราศจาก เซลลูเลส โดย *T. lanuginosus* RT9 พบว่าจุลินทรีย์สามารถใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีมากกว่าการใช้แอมโมเนียมออโทฟอสเฟสในการผลิตเอนไซม์ ส่วน Haapala *et. al.* (1996) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้อ *T. reesei* ที่ตรึงเซลล์บนเส้นใยไนลอน เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวในสูตร Ib (ประกอบด้วยโปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 3.0 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) , Id (ประกอบด้วยโปรติโอสเปปโตนความเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร) และ Ie (ประกอบด้วยยีสต์สกัด ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร) ที่ไม่มี ยูเรียเป็นองค์ประกอบ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสอยู่ในช่วง 1,550 ถึง 1,800 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้อาหารสูตร Ic ที่มียูเรียเพียงอย่างเดียว (ยูเรีย ความเข้มข้น1.5 กรัมต่อลิตร) ได้ค่า กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเพียง 1,490 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งไม่เพียงพอต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และพบว่าสูตรอาหารที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ไซลาเนสสูงสุดคือ Ia ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ประกอบด้วยยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 1.5, 3.0 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุดเท่ากับ 8,020 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ 2.4) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อน ซึ่งได้แก่ ยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด มีผลช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยโปรติโอสเปปโตนประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นและยีสต์สกัดจะเป็นแหล่งที่ดีของวิตามิน บีรวม ส่วนการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น พบว่ายูเรียจะต้องเปลี่ยนรูปไปเป็นแอมโมเนียโดยเอนไซม์ยูเรียเอสก่อน จากนั้นจุลินทรีย์จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นการใช้ยูเรียที่ความเข้มข้นต่ำอาจจะไม่เพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ (Stewart, 1980) มีการศึกษาที่ผ่านมาจำนวนมากที่สนับสนุนการใช้โปรติโอสเปปโตนหรือยีสต์สกัดว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีของจุลินทรีย์ เมื่อใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงขึ้น และแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้สามารถเทียบเคียงได้กับ แหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนชนิดอื่น ๆ ที่มีราคาถูก เช่น น้ำแช่ข้าวโพด ฟาร์มามีเดีย กากถั่วเหลือง โปรตีนจากมันฝรั่ง เป็นต้น (Haltrich *et. al.*, 1993 ; Purkarthofer *et. al.*, 1993a ; Haltrich *et. al.*, 1994 and Gomes *et. al.*, 1994b) ยิ่งกว่านี้ยังมีการสนับสนุนการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์โดย Fernandez-Espinar *et. al.* (1992) รายงานว่าการเพิ่มสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อนมีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจน อนินทรีย์เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถึงแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นเท่ากันก็ตาม ในทางตรงข้ามมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เช่น Christakopoulos *et. al.* (1996) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *F. oxysporum* F3 ใน Erlenmeyer flasks ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร minimal medium ปริมาตร 200 มิลลิลิตรโดยใช้ซังข้าวโพดบด ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมฟอสเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 8.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 4 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจำเพาะ (specific activity) สูงสุดเท่ากับ 331 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นอกจากนี้ Haapala *et. al.* (1994) รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์มีผลต่อค่าพีเอชของอาหาร อย่างมีนัยสำคัญในระหว่างการหมัก ซึ่งทำให้ค่าพีเอชของอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงและอาจส่งผลให้ จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้ลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ในระหว่างระยะเวลาของการหมักเพื่อป้องกันการสูญเสียของผลผลิต ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Joglekar and Karfanth (1984) ที่รายงานว่าการใช้ไนโตรเจนอนินทรีย์ความเข้มข้นสูง โดยเฉพาะความเข้มข้นมากกว่า 2 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จะทำให้พีเอชของอาหารมีค่าเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูงทำให้ไม่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และเช่นเดียวกันการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตอีกด้วย มีการรายงานที่เกี่ยวข้องกับผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดย Biely (1991) รายงานว่าการจำกัดความสามารถในการใช้ประโยชน์ของสารเริ่มต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(precursors) สำหรับการสังเคราะห์โปรตีน (อยู่ภายใต้ค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อความเข้มข้นของคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อ) โดยอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อคาร์บอนที่ต่ำจะทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสถูกควบคุมให้แยกออกจากกันอย่างเด็ดขาด

2.10.3 อุณหภูมิ

ในธรรมชาติจุลินทรีย์สามารถรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนได้ในช่วงอุณหภูมิ 10 ถึง 90 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ช่วงหนึ่ง ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าช่วงนี้จะส่งผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ อุณหภูมิที่ส่งผลให้มีการเจริญสูงสุดใน ช่วงเวลาสั้น เรียกว่า optimum growth temperature ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทลงสู่อาหาร ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่งที่จุลินทรีย์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ ดังนั้นในกระบวนการหมักต่าง ๆ จึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม และอุณหภูมิสูงจะยับยั้งการงอกของสปอร์แต่ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญของไมซีเลียม (Raimbault and Alazard, 1980) มีการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เช่น Tuncer *et. al.* (1999) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิกโนเซลลูโลไลติกเอนไซม์ (lignocellulolytic enzyme) จาก *Thermomonospora fusca* BD25 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวใน minimal salt-yeast extract โดยเพาะเลี้ยงในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์เอนโดไซลาเนสและเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสสูงสุด 1.54 และ 0.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ *Gome et. al.* (1992) รายงานถึงระดับที่เหมาะสมของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเบต้า-กลูโคซิเดส โดยเชื้อ *T. viride* พบว่ามีการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสและเบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุดที่อุณหภูมิ 34 และ 31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

2.10.4 พีเอช

การเจริญของจุลินทรีย์จะถูกควบคุมโดยกระบวนการเมแทบอลิซึมซึ่งมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและการทำงานของเอนไซม์จะถูกควบคุมโดยพีเอช สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามปกติ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ที่จะช่วยรักษาระดับของพีเอชให้คงที่อยู่แล้ว แต่ในกระบวนการหมักหลายชนิดพีเอชในน้ำหมักเปลี่ยนแปลงเร็วมากจนไม่อาจรักษาพีเอชไว้ได้ เป็นผลให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นในการหมักแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงหนึ่งเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการสูงสุด (Kuhad, 1999) พีเอชจึงมีความสำคัญต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ โดยพีเอชที่ เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน กระบวนการหมักในระยะแรกค่าพีเอชของการเลี้ยงเชื้อจะเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ในระหว่างการหมักค่าพีเอชจะมีการเปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนเกิดขึ้น ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่น ๆ ออกมาหรืออาจมีการย่อยสลายสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตซึ่งทำให้เกิดกรดอินทรีย์ต่าง ๆ จึงส่งผลให้พีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมให้พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ โดยการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงไปในอาหาร ซึ่งบัฟเฟอร์จะเข้าไปรวมตัวกับกรดหรือด่าง เพื่อป้องกันไม่ให้มีการปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา (สมใจ ศิริโภค, 2537) จึงทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยทั่วไปเชื้อราสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่ค่าพีเอชต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Smith and Wood (1991b) รายงานว่า ค่าพีเอชที่เป็นกรดมีความเหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *A. awamori* และเมื่อพีเอช มีค่าเท่ากับ 5.0 หรือสูงกว่านี้จะส่งผลให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสลดลง Bailey and Viikari (1993) รายงานว่าในระยะเวลาช่วงหลังของการเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จะส่งผลให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำกว่า 3.0 ทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีระดับต่ำลง Haitrich *et. al.* (1994) รายงานว่าค่าพีเอชที่ต่ำลงจะส่งผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *S. rolfsii* พบว่าในระหว่างการเลี้ยงเชื้อรานี้ พีเอชจะมีค่าลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ไปเป็น ค่าพีเอชระหว่าง 3.0 และ 3.5 ซึ่งผลของการลดลงของค่าพีเอชในระหว่างการหมักจะส่งผลให้เชื้อราปลดปล่อยกรดออกซาลิก (oxalic acid) ออกมาภายนอกเซลล์ในปริมาณมาก ซึ่งทำให้ทั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราลดต่ำลง จากการที่ค่าพีเอชลดต่ำลงในระหว่างการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสนี้จึงต้องมีการควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการหมักให้คงที่เพื่อให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ Hop *et. al.* (1994) ได้ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของสารอาหารในการหมักต่อการผลิตไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสโดยเชื้อรา *T. lanuginosus* RT9 ในอาหารเปปโตนที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งค่าพีเอชที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วง 5.0 ถึง 8.0 พบว่าพีเอช 6.6 เป็นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และ Xiong *et. al.* (2003) ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของพีเอชที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *T. reesi* Rut C-30 ในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ (batch cultivations) ในอาหาร lactose-based medium ที่มีแลคโตสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และทำการแปรผันค่าพีเอชให้อยู่ระหว่าง 3.5 ถึง 7.5 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 6.0 ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 94.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากระยะเวลา 5 วัน ของการเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.5 แร่ธาตุ

แร่ธาตุ หมายถึงสารอนินทรีย์ที่สิ่งมีชีวิตต้องการในปริมาณเล็กน้อย แร่ธาตุที่มีความสำคัญซึ่งปกติต้องเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียมและคลอรีน นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อย เช่น โคบอลต์ ทองแดง แมงกานีส เหล็ก โมลิบดินัมและสังกะสี เป็นต้น แต่โดยทั่วไปมักจะพบว่ามีแร่ธาตุเหล่านี้เจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ในวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรหรือของเหลือทิ้ง (waste) ที่ไม่ต้องการจากกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ เป็นต้น ฉะนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้สารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นในการเตรียมอาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) ซึ่งจำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง และยังพบว่าความเข้มข้นของแร่ธาตุบางชนิดหรือหลายชนิดรวมกันอาจมีอิทธิพลต่อการผลิตสาร บางอย่าง (สมใจ ศิริโภค, 2537) มีการศึกษาถึงผลของแร่ธาตุต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เช่น Haltrich *et. al.* (1994) ได้ศึกษาผลขององค์ประกอบของสารอาหารที่มีต่อการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสโดย *S. rolfsii* ซึ่งใช้การวางแผนการทดลองทางสถิติในการวิเคราะห์ผล พบว่าการเพิ่มความเข้มข้น ของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และมีการเติมสารละลายแร่ธาตุปริมาณเพียงเล็กน้อยพร้อมกับเพิ่ม ความเข้มข้นของเซลลูโลสจากความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็น 60 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถกระตุ้นให้ *S. rolfsii* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากขึ้น ในทางตรงกันข้ามเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแร่ธาตุให้มากขึ้น พบว่าไม่มีผลทำให้ *S. rolfsii* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้น เนื่องจากโดยทั่วไป แร่ธาตุเป็นสารอนินทรีย์ที่สิ่งมีชีวิตต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อย Siedenberg *et. al.* (1997) ศึกษา ผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *A. awamori* ในถังปฏิกรณ์แบบ airlift tower loop โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ที่มีปริมาณฟอสเฟตเริ่มต้นความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.30, 1.05 และ 2.01 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส และ 4.5 ตามลำดับ อัตราการให้อากาศ 0.2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟต เริ่มต้น 0.3 กรัมต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Ratanakhanokchai *et. al.* (1998) พบว่า Fe^{2+}, Ca^{2+}, และ Mg^{2+} มีผลช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ ไซลาเนส ส่วน Mn^{2+} มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส และพบว่า Co^{2+}, Zn^{2+} และ Cd^{2+} มีผลช่วยเพิ่มการยึดเกาะของเอนไซม์ไซลาเนสกับไซแลนชนิดที่ไม่ละลายน้ำ

2.10.6 สารลดแรงตึงผิว (surfactant)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารลดแรงตึงผิวชนิดต่าง ๆ เช่น Tween 80 และ sucrose monopalmitate หรือ กรด ไขมัน ซึ่งบ่อยครั้งจะใช้เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสให้สูงขึ้น คือมีผลโดยตรงต่อคุณสมบัติการซึมผ่านเข้าและออกของสารของเซลล์เมมเบรน ทั้งในการนำสารประกอบต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์เพื่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ง่ายแล้ว ยังสามารถช่วยให้การปลดปล่อยเอนไซม์ออกจากเซลล์เกิดได้ดีขึ้นด้วย โดยทั่วไปนิยมใช้ Tween 80 ซึ่งเป็น nonionic surfactant ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้กับการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา และสารลดแรงตึงผิวมีการตอบสนองที่ดีต่อการผลิตเอนไซม์ที่มีการปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ในทางตรงกันข้ามจะไม่มีประโยชน์ต่อการผลิตเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามในการใช้ประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราจะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราด้วย ซึ่งอาจจะให้ผลดีต่อเชื้อราบางชนิดเท่านั้น และยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ด้วย มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการศึกษาผลของ Tween 80 ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลเนส เช่น Reese and Maguire (1969) รายงานว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* ในสภาวะอาหารเหลว ในอาหารสารละลายเกลือแร่ ที่มีสารตั้งต้นความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 พบว่าสามารถเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสได้ 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม Tween 80 และยังพบความสัมพันธ์ของการใช้ Tween 80 กับเปอร์เซ็นต์การเพิ่มของการผลิตเอนไซม์คือ ให้ผลดีที่สุดกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณน้อยมากเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารปกติที่ไม่มีการเติม Tween 80 และ Liu *et. al.* (1998) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *T. cutaneum* SL409 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ดังกล่าวที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยใช้รำข้าวสาลี ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด 39.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้นเป็น 74 หน่วยต่อมิลลิลิตร ยิ่งกว่านี้มีการยืนยันผลของสารลดแรงตึงผิวที่มีต่อเชื้อราบางชนิดโดย Takahashi *et. al.* (1960) รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวสามารถนำมาใช้ได้ดีกับการเลี้ยงเชื้อราในสภาวะอาหารเหลว ซึ่งจะช่วยเปลี่ยนรูปของ pellet ไปเป็นไมซีเลียมที่สามารถกระจายได้ทั่วถึงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเช่นเดียวกัน Peunescu *et. al.* (1964) รายงานว่าในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เมื่อใช้ Tween 80 เพิ่มไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถชักนำให้สารประกอบต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์ได้ดี ยังมีการศึกษาผลของ Tween 80 ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าการใช้ Tween 80 เติมลงไปในอาหารที่ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 ถึง 3 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ประมาณร้อยละ 12 ถึง 60 แต่ในบางกรณีพบว่า Tween 80 ไม่มีผลช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ ไซลาเนสของจุลินทรีย์ (Dubeau *et. al.*, 1987 ; Fernandez-Espinar *et. al.*, 1992 ; Okeke and Obi, 1993 ; Gomes *et. al.*, 1993a and Singh *et. al.*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1995) ในการที่ Tween 80 มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากสาเหตุดังต่อไปนี้ คือ 1) จากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์และการเพิ่มขึ้นของสารประกอบภายในเซลล์อื่น ๆ ที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ และ 2) จากการที่ Tween 80 ให้ผลที่ซับซ้อนมากเกินกว่าการเปลี่ยนคุณสมบัติการซึมผ่านได้ของสารของเซลล์ เมมเบรนเพียงอย่างเดียว (Reese and Maguire, 1969)

2.10.7 ความเร็วรอบในการเขย่าและอัตราการให้อากาศ

การเจริญของจุลินทรีย์และกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนวัตถุดิบหรือสารอาหารใด ๆ ไปเป็นผลิตภัณฑ์อาจเกิดขึ้นได้ในสภาวะมีอากาศหรือไร้อากาศ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการหมักและชนิดของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเป็นกระบวน การหมักที่ต้องการอากาศ ซึ่งจะใช้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักเพื่อการเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ การควบคุมกระบวนการหมักจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการควบคุมการให้อากาศให้เพียงพอ เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ จะมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ โดยใช้การกวนในอัตราที่เหมาะสม ซึ่งเป็นการทำให้อาหาร จุลินทรีย์และอากาศผสมกันได้อย่างทั่วถึงและช่วยให้ฟองอากาศมีขนาดเล็กลง โดยในการหมักแบบอาหารเหลว ระบบการกวนที่มีประสิทธิภาพจะทำให้การละลายได้ของออกซิเจนในอาหารเหลวมีปริมาตรเท่า ๆ กันทุกจุดในถังหมัก แต่การกวนจะมีผลทำให้การมีรูพรุนของสับสเตรทลดลง ทำให้อนุภาคของสับสเตรทอัดกันแน่น ทำลายการยึดจับ สับสเตรทและทำลายไมซีเลียมของเชื้อรา ดังนั้นการกวนจึงมักทำเป็นคราว ๆ มากกว่าทำตลอดเวลา (Lonsane *et. al.*, 1992) และการที่ไมซีเลียมถูกทำลาย ทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์ลดลง (Panda, 1989) การปั่นหรือเขย่าที่มีจำนวนรอบของการเขย่าเหมาะสม เป็นการทำให้จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ และในการหมักต้องคำนึงถึงปริมาตรของสารอาหารต่อปริมาตรของถังหมักด้วย มีการศึกษาผลของรอบในการเขย่าและอัตราการให้อากาศ เช่น Hoq *et. al.* (1994) ศึกษา ผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์ เบต้า-ไซโลซิเดสจาก *T. lanuginosus* RT9 ในถังปฏิกรณ์ขนาด 15 ลิตร ปริมาตรการทำงาน 10 ลิตร ในอาหารเปปโตนที่มีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 จากการศึกษาพบว่าอัตราการกวน 200 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เป็นสภาวะที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองสูงสุด ยังมีการศึกษาของ Lejeune and Baron (1995) ศึกษาผลของอัตราการกวนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *T. reesei* ในถังปฏิกรณ์ขนาด 15 ลิตร โดยมีแลกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที ทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด

2.10.8 สารเหนี่ยวนำเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์เหนี่ยวนำซึ่งจุลินทรีย์สร้างได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีสารเหนี่ยวนำ และตามปกติแล้วสารเหนี่ยวนำมักเป็น สับสเตรทของเอนไซม์หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรต โดยเอนไซม์ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์ผลิตขึ้นได้ มีการศึกษาถึงสารเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เช่น Royer and Nakas (1989) รายงานว่า *T. longibrachiatum* ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 272 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวในระดับฟลาสก์ที่ใช้ Solka Floc ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน Biswas *et. al.* (1990) รายงานว่า *A. ochraceus* NG-13 เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีชานอ้อยความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 28 องศาเซลเซียสและ 6.5 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 7 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 46 หน่วยต่อมิลลิลิตร Gome et. al. (1992) รายงานว่า *T. viride* BT 2169 เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มี sulfite pulp ความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 33 องศาเซลเซียสและ 5.5 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 190 หน่วยต่อมิลลิลิตร Milagres and Duran (1992) รายงานว่า *P. janthinellum* 87M-115 เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีไฮโดรไลเซท (hydrolyzate) ของชานอ้อยความเข้มข้น 23 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 30 องศาเซลเซียสและ 5.8 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 12 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไซลาเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 36.8 และ 0.35 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Wiacek-Zychlinska et. al. (1992) รายงานว่า *Chaetomium globosum* II-Ch.g./5 เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีรำข้าวสาลีความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 30 องศาเซลเซียสและ 4.8 เป็นระยะเวลา 9 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 65.3 และ 1.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Chanadra Raj and Chandra (1995) รายงานว่า *A. fischeri* Fxn1 เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีรำข้าวสาลีความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 9.5 เป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 45 หน่วยต่อมิลลิลิตร Xu และคณะ (1998) รายงานว่า แอล-ซอร์โบส (L-sorbose) สามารถเหนี่ยวนำให้ *T. reesei* PC-3-7 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีกว่าการใช้ sophorose และไซโลส ยิ่งกว่านั้น Bastawde *et. al.* (1994) รายงานว่า ยีสต์สายพันธุ์ NCIM 3574 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 570 หน่วยต่อมิลลิลิตร และไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสร่วมออกมา เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่ใช้ oat spelt xylan ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร ได้แก่ ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าว ที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร และไซแลนจาก oat spelt xylan

3.1.2 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองได้จากการเก็บตัวอย่างเชื้อราจากดินในบริเวณภาคตะวันออกของประเทศไทยและทำการแยกเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ รวมทั้งเชื้อราบริสุทธิ์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง (reference strains) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย คือ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เชื้อราทั้งหมดเก็บรักษาในหลอดอาหารวุ้นเอียง potato dextrose agar (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการย้ายเชื้อทุกๆ เดือน

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนส เซลลูเลส การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (ภาคผนวก ข) และสารที่ใช้ย้อมวงใสรอบโคโลนี (clear zone) ของเชื้อ

3.2 อุปกรณ์

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และกล้องจุลทรรศน์ ของบริษัท Olympus optical, Japan

เครื่องกวนระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น MS 115 ของบริษัท Sciencetific industries, Inc

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectophotometer) รุ่น UV 1601 ของบริษัท Shimadzu

ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Scientific Promotion

ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow) ของบริษัท International Scientific Supply

ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น 1375 FX ของบริษัท Sheldon Manufacturing.Inc

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น Innova 4330 ของบริษัท Scientific Promotion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Z 383K ของบริษัท Hermle-Labortech, Germany

หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น Tomy SS 325 ของบริษัท Tomy-seiko

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Memmert ของบริษัท United Instrument

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น Cybascan 2000 ของบริษัท United Instrument

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง รุ่น PG 803 ของบริษัท Mettler-Todedo, Thailand

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Mettler-Todedo, Thailand

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) ของบริษัท Scientific industries, Inc

ไมโครปิเปต (micropipette) ของบริษัท Brand, Germany

เครื่องแก้วต่างๆ ของบริษัท Pyrex

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหารแข็งสูตร Czapek medium เป็นอาหารที่ใช้สำหรับแยกเชื้อราจากดิน (ภาคผนวก ก)

3.3.2 อาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อรา เพื่อเป็น stock culture (ภาคผนวก ก)

3.3.3 อาหารแข็งสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างเอนไซม์ไซลาเนส เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพ (ภาคผนวก ก)

3.3.4 อาหารเหลวสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างเอนไซม์ไซลาเนส เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสในเชิงปริมาณและใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้ (ภาคผนวก ก)

3.4 การแยกเชื้อราที่ย่อยสลายไซแลนจากดิน

ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อราจากดินในเขตท้องที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย ถ้าเป็นตัวอย่างที่มีเชื้อปรากฏอยู่ให้ทำการเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Czapek medium ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น แยกเชื้อราที่มีลักษณะปรากฏที่แตกต่างกันนำมาเลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar แยกเชื้อจนกระทั่งได้เชื้อราบริสุทธิ์ ส่วนตัวอย่างที่ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อรา ทำการแยกโดยชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเจือจางตัวอย่างให้เป็น 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ตามลำดับ จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมาเกลี่ย (spread plate) บนอาหารแข็ง Czapek medium เลี้ยงเชื้อที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อราเจริญจึงทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยใช้คอร์ก-บอยร์เลอร์ ตัดเส้นใยราบริเวณขอบโคโลนีซึ่งเป็นเส้นใยที่มีอายุน้อยที่เจริญบนอาหารแข็ง Czapek medium แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA หลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์โดยตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ นำเชื้อบริสุทธิ์เก็บรักษาในอาหารวุ้นเอียง PDA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อไป

3.5 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการคัดเลือกเชื้อราโดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase activity) ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของเชื้อราที่แยกได้กับ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง

3.5.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพ

เขี่ยเส้นใยเชื้อราที่คัดเลือกได้จำนวนทั้งหมด 30 สายพันธุ์ และเส้นใยของ *A. foetidus* TISTR 3159 ที่มีอายุ 18 ชั่วโมงโดยใช้คอร์ก บอยร์เลอร์ (cork boiler) มาเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่มีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารแข็งเท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 เลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 2 วัน แล้วบันทึกผลโดยวัดขนาดของโคโลนีที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการย้อมสีด้วยสี congo red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ท่วมอาหารวุ้นเป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสีทิ้งและราดทับด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมล ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งและวัดขนาดของวงใสรอบโคโลนีที่เกิดขึ้น นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี แล้วนำค่าที่ได้ทั้งหมดของแต่ละพีเอชที่ทำการศึกษามาเปรียบเทียบกับ *A. foetidus* TISTR 3159 เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมากกว่าเชื้อ *A. foetidus* TISTR 3159 ไปทำการศึกษาขั้นต่อไป

3.5.2 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณ

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 3.5.1) คือ สายพันธุ์ที่ 13, 30, 21, 20, 22, 27 และ *A. foetidus* TISTR 3159 ในเออเลนเมเยอร์ ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่มีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 70 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Montenecourt และ Eveligh, 1977) ที่ได้จากการนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา โดยเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำที่ผสม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 หยดลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ และนับจำนวนสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า ทำการเลี้ยงเชื้อราทุกสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 ยกเว้นสายพันธุ์ที่ 27 เลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 ในสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วสุ่มเก็บตัวอย่างปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 มิลลิลิตร ในวันที่ 3 , 4 , 5 และ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ แยกเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลส ตามวิธีของ Tang *et. al.* (1987) และMandels and Weber (1969) ตามลำดับ (ภาคผนวก ข) แล้วเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสระหว่างเชื้อที่คัดเลือกได้ กับ *A. foetidus* TISTR 3159 เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

3.6.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่ทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อยและฟางข้าว ที่มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 1 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 ในสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สุ่มเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในวันที่ 3 , 4 , 5 และ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ แยกเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลส และในการศึกษามีการเลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนโดยกำหนดให้เป็นชุดเปรียบเทียบ นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่มีซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร เป็นแหล่งคาร์บอน และทำการแปรผันความเข้มข้นของซังข้าวโพด ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2 , 3 , 4 และ 5 ขั้นตอนต่อจากนี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสทั้งหมดที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของซังข้าวโพดซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดและให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสน้อยหรือไม่มีไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ศึกษาผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น

3.6.3.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่มีซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน และทำการแปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งประกอบด้วย ยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด (Haapala *et. al.* , 1996) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังตารางที่ 3.1 ขั้นตอนต่อจากนี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดและให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสน้อยหรือไม่มีไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.3.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่มีซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ประกอบด้วย ยูเรีย ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร โปรติโอสเปปโตน ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ทำการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) (1.4 กรัมต่อลิตร) โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) (0.91 กรัมต่อลิตร) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) (0.86 กรัมต่อลิตร) และ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) (1.4 กรัมต่อลิตร) ซึ่งแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ทั้งหมดกำหนดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร ขั้นตอนต่อจากนี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่างๆ สำหรับการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสม

สูตรอาหาร	ยูเรีย (กรัมต่อลิตร)	โปรติโอสเปปโตน (กรัมต่อลิตร)	ยีสต์สกัด (กรัมต่อลิตร)
A	0.1	0.25	0.1
B	0.2	0.25	0.1
C	0.4	0.25	0.1
D	0.3	0.1	0.1
E	0.3	0.2	0.1
F	0.3	0.3	0.1
G	0.3	0.4	0.1
H	0.3	0.25	0.05
I	0.3	0.25	0.15
J	0.3	0.25	0.2
K	0.3	0.25	0.1

3.6.3.3 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่มีซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร โปรติโอสเปปโตน ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ทำการแปรผันความเข้มข้นของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เท่ากับ 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร ขั้นตอนต่อจากนี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.4 พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

70 มิลลิลิตร ที่มีซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร โปรติโอสเปปโตน ความเข้มข้น0.25 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ทำการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.0 และ 8.0 ขั้นตอนต่อจากนี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวที่เหมาะสมซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.5 ความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้ จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่มีซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร โปรติโอสเปปโตน ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 ทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสม (ประกอบด้วย เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) 5.0 กรัมต่อลิตร; ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.H_2O$) 1.4 กรัมต่อลิตร ; แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.7H_2O$) 4.56 กรัมต่อลิตร และโคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) 2.0 กรัมต่อลิตร) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 , 0.05 , 0.1 , 0.15 และ 0.2 ขั้นตอนต่อจากนี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายแร่ธาตุผสมซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.6 สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้ จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่มีซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร โปรติโอสเปปโตน ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 โดยไม่มีการเติมสารละลายแร่ธาตุผสม และทำการแปรผันความเข้มข้นของ Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 , 0.1 , 0.2 , 0.3 และ 0.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนต่อจากนี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 แล้วนำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของ Tween 80 ที่เหมาะสมซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.7 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราที่คัดเลือก

นำเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ปริมาณสูงที่คัดเลือกได้ มาจำแนกชนิดของเชื้อราถึงระดับสปีชีส์ ตามวิธีของ Campbell *et. al.* (1985) โดยการเตรียม Slide culture plate technique ตรวจดูรูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วัดขนาดของเส้นใย, สปอร์, conidiophore, vesicle และถ่ายภาพของเชื้อราจากกล้องจุลทรรศน์ที่มี camera lucida ประกอบอยู่ แล้วทำเปรียบเทียบกับเอกสารและหนังสือที่จำแนกชนิดของเชื้อราได้แก่ The Genus Aspergillus (Raper and Fennell , 1965) , A manual of the Penicillia (Raper and Thom , 1949) และ The Genus Penicillium (Pitt , 1980)

3.8 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง) แบบ Duncan 'new Mulpitle-Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 11.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อราที่ย่อยสลายไซแลนจากดิน

ผลการแยกเชื้อราจากดินในเขตท้องที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย ทั้งในตัวอย่าง ที่มีและไม่มีเชื้อปรากฏอยู่ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง Czapek medium ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส แยกเชื้อในอาหาร potato dextrose agar จนกระทั่งได้เชื้อราบริสุทธิ์ พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 72 สายพันธุ์ แต่มีเชื้อราที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันจำนวน 30 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และยังพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 15 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ส่วนสายพันธุ์ที่ 27 สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชที่เป็นด่างคือ พีเอชเท่ากับ 8.0

4.2 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

4.2.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพ

ผลของการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพของเชื้อราที่คัดเลือกได้จำนวนทั้งหมด 30 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์อ้างอิง *A. foetidus* TISTR 3159 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งที่มีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารแข็งเท่ากับ 6.0 , 7.0 และ 8.0 เป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งสังเกตได้จากวงใสรอบโคโลนีและมีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราทั้งหมดภายใต้สภาวะการเจริญที่ค่าพีเอช 6.0 , 7.0 และ 8.0 แสดงดังตารางที่ 4.2 , 4.3 และ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 สายพันธุ์เชื้อราที่แยกได้จากธรรมชาติในบริเวณภาคตะวันออกของประเทศไทย

สายพันธุ์เชื้อรา	บริเวณที่เก็บเชื้อรา	ลักษณะภายนอกของเชื้อรา
1	ชลบุรี	เส้นใยสีขาวครีม สปอร์สีน้ำตาลอ่อน
2	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวแก่
3	ชลบุรี	เส้นใยสีขาวครีม สปอร์สีดำ
4	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีน้ำตาลปนเหลือง
5	ชลบุรี	เส้นใยสีครีม สปอร์สีน้ำตาลปนเขียวอ่อน
6	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวขี้ม้า
7	ชลบุรี	เส้นใยสีขาวครีม สปอร์สีน้ำตาล
8	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีน้ำตาลเข้ม
9	ชลบุรี	เส้นใยสีครีม สปอร์สีเทาอ่อน
10	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวขี้มา
11	ชลบุรี	เส้นใยสีขาวปนเหลือง สปอร์สีดำ
12	ชลบุรี	เส้นใยขาว สปอร์สีเขียวขี้ม้า
13	ชลบุรี	เส้นใยขาว สปอร์สีเขียวอ่อน
14	ชลบุรี	เส้นใยขาว สปอร์สีเขียวปนเหลือง
15	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวเข้ม
16	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีน้ำตาลปนเทา
17	ชลบุรี	เส้นใยสีครีม สปอร์สีเขียวปนเทา
18	ระยอง	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย สปอร์สีน้ำตาลอ่อนปนขาวครีม
19	ระยอง	เส้นใยสีขาว สปอร์สีดำ
20	ระยอง	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวปนเทา
21	ตราด	เส้นใยสีครีม สปอร์สีดำเข้ม
22	ตราด	เส้นใยสีขาว สปอร์สีดำเข้ม
23	จันทบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเทาดำ
24	ชลบุรี	เส้นใยสีขาวครีม สปอร์สีเขียวปนน้ำตาล
25	จันทบุรี	เส้นใยสีครีม สปอร์สีเขียวแก่
26	ระยอง	เส้นใยสีขาว สปอร์สีน้ำตาลปนเทาดำ
27	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีดำปนน้ำตาลเข้ม
28	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีน้ำตาลปนส้มอ่อน
29	ระยอง	เส้นใยสีครีม สปอร์สีดำปนเทาเข้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30	ระยอง	เส้นใยสีขาวปนเหลืองอ่อน สปอร์สีดำปนน้ำตาลเข้ม

ตารางที่ 4.2 ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้และของเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะพีเอช 6.0 เป็นระยะเวลา 2 วัน

สายพันธุ์เชื้อรา	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงใสรอบโคโลนี (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี
1	2.93	3.33	1.14^{hi}
2	2.53	2.73	1.08^{hi}
3	2.10	3.43	1.64^{def}
4	2.76	3.53	1.28^{hi}
5	2.90	3.20	1.10^{hi}
6	1.50	1.80	1.20^{hi}
7	2.63	3.20	1.22^{hi}
8	2.93	3.06	1.04^{i}
9	2.70	3.00	1.11^{hi}
10	2.30	3.13	1.36^{fghi}
11	1.66	2.13	1.28^{hi}
12	2.23	3.13	1.40^{fgh}
13	1.63	3.13	1.92^{bcd}
14	1.97	2.50	1.27^{hi}
15	2.06	2.90	1.40^{fgh}
16	2.83	3.67	1.30^{ghi}
17	2.08	3.63	1.75^{cde}
18	2.45	4.27	1.74^{cde}
19	2.75	4.53	1.65^{def}
20	0.83	1.70	2.06^{b}
21	1.94	3.93	2.04^{bc}
22	1.87	3.97	2.13^{b}
23	2.87	4.00	1.39^{fgh}
24	1.03	1.67	1.62^{def}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25	3.40	4.10	1.21^{hi}
26	1.27	2.03	1.60^{efg}
27	1.20	4.27	3.57^{a}
28	2.50	3.27	1.31^{ghi}
29	4.73	5.27	1.11^{hi}
30	1.43	2.87	2.04^{bc}
A. foetidus TISTR 3159	2.10	4.00	1.90^{bcdc}

ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ตารางที่ 4.3 ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้และของเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะพีเอช 7.0 เป็นระยะเวลา 2 วัน

สายพันธุ์เชื้อรา	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงใสรอบโคโลนี (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี
1	2.43	2.74	1.13^{k}
2	1.80	2.38	1.32^{fgh}
3	---	---	---
4	1.96	2.40	1.22^{hijk}
5	2.50	2.97	1.19^{ijk}
6	---	---	---
7	2.20	2.55	1.16^{jk}
8	2.56	2.97	1.16^{jk}
9	2.00	2.34	1.17^{jk}
10	2.07	2.80	1.35^{fg}
11	1.50	1.95	1.13^{k}
12	1.66	2.09	1.26^{ghij}
13	---	---	---
14	1.80	2.07	1.15^{jk}
15	1.53		1.57^{c}
16	2.68	3.50	1.31^{fghi}
17	1.77	2.90	1.64^{cde}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18	2.03	3.27	1.61^{de}
19	2.42	3.73	1.54^{e}
20	0.77	1.34	1.75^{c}
21	2.17	3.70	1.71^{cd}
22	2.00	3.76	1.88^{b}
23	2.37	3.17	1.34^{fgh}
24	0.77	1.21	1.57^{e}
25	3.20	3.70	1.16^{jk}
26	1.37	1.93	1.41^{f}
27	1.17	3.74	3.20^{a}
28	2.33	3.13	1.34^{fgh}
29	3.43	3.77	1.10^{k}
30	1.27	2.37	1.87^{b}
A. foetidus TISTR 3159	1.90	3.23	1.70^{cd}

ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

--- หมายถึง ไม่มีการเจริญ

ตารางที่ 4.4 ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้และของเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะพีเอช 8.0 เป็นระยะเวลา 2 วัน

สายพันธุ์เชื้อรา	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงใสรอบโคโลนี (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี
1	---	---	---
2	---	---	---
3	---	---	---
4	---	---	---
5	---	---	---
6	---	---	---
7	---	---	---
8	---	---	---
9	---	---	---
10	---	---	---

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11	---	---	---
12	---	---	---
13	---	---	---
14	---	---	---
15	---	---	---
16	2.42	3.10	1.28^{f}
17	1.50	2.45	1.63^{d}
18	1.03	1.80	1.75^{bc}
19	1.90	2.67	1.41^{e}
20	---	---	---
21	---	---	---
22	1.90	3.17	1.67^{cd}
23	2.17	2.90	1.34^{ef}
24	---	---	---
25	3.10	3.43	1.11^{g}
26	1.13	1.80	1.60^{d}
27	1.13	3.13	2.77^{a}
28	2.10	2.77	1.32^{ef}
29	2.83	3.03	1.07^{g}
30	1.17	2.14	1.83^{b}
A. foetidus TISTR 3159	1.50	2.60	1.73^{c}

ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

--- หมายถึง ไม่มีการเจริญ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ค่าพีเอช 6.0 เชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าที่สภาวะการเจริญในอาหารแข็งที่ค่าพีเอช 6.0 7.0 และ 8.0 เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุดเท่ากับ 3.57, 3.20 และ 2.77 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 กับค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์อื่นที่ทำการเปรียบเทียบ ในขณะที่สภาวะการเจริญที่พีเอช 6.0 พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 22, 20, 21, 30 และ 13 ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีรองลงมาจากสายพันธุ์ที่ 27 ตามลำดับ และมากกว่า *A. foetidus* TISTR 3159 โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

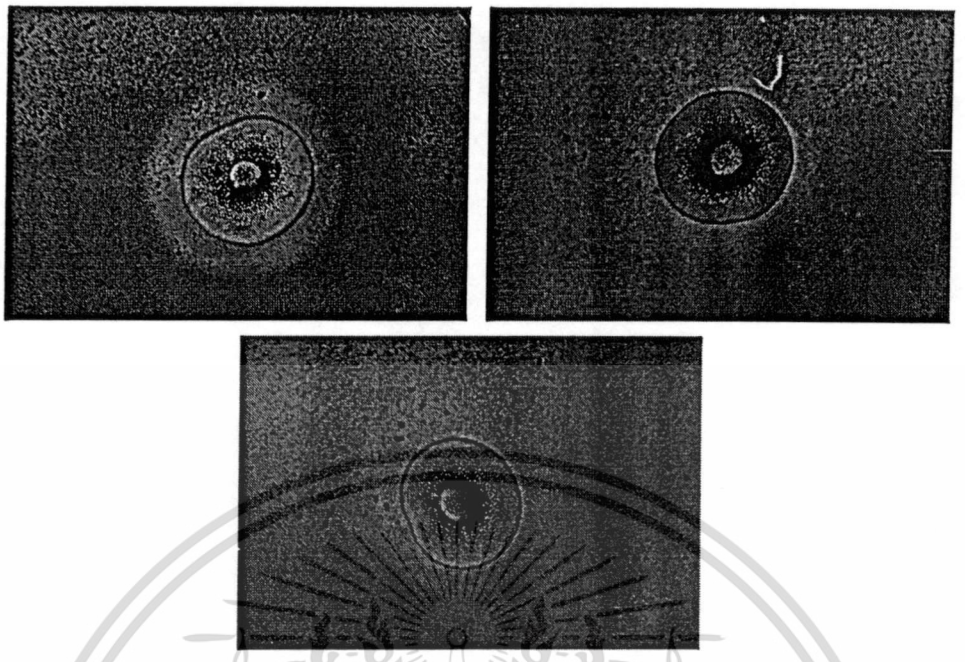
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ส่วนที่พีเอช 7.0 พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 22, 30, 20 และ 21 ให้ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีรองลงมาจากสายพันธุ์ที่ 27 ตามลำดับ และมากกว่า *A. foetidus* TISTR 3159 โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 และในพีเอช 8.0 พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 30 และ 18 ให้ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีรองลงมาจากสายพันธุ์ที่ 27 ตามลำดับ และมากกว่า *A. foetidus* TISTR 3159 โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ฉะนั้นอาจสรุปได้ว่าเชื้อราที่มีค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงน่าจะผลิตเอนไซม์ได้สูงด้วย เนื่องจากค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ (Daigneault - Sylvestre and Kluepfel, 1979) ลักษณะของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 และ *A. foetidus* TISTR 3159 แสดงดังรูปที่ 4.1 และ 4.2

จากผลการทดลองที่ได้นี้จึงคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่มีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีที่มีค่ามากกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสภาวะการเจริญของทุกค่าพีเอช (ดังตารางที่ 4.5) เพื่อนำไปศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณต่อไป

รูปที่ 4.1 ลักษณะของวงใสรอบโคโลนีของ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อเจริญในอาหารแข็งที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะพีเอช 6.0 (บนซ้าย) พีเอช 7.0 (บนขวา) และพีเอช 8.0 (ล่าง) เป็นระยะเวลา 2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ลักษณะของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเจริญในอาหารแข็งที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะพีเอช 6.0 (บนซ้าย) พีเอช 7.0 (บนขวา) และพีเอช 8.0 (ล่าง) เป็นระยะเวลา 2 วัน

ตารางที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ของค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้ที่มีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบ โคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมากกว่า *A. foetidus* TISTR 3159 ในการเปรียบเทียบ กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพ เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นระยะเวลา 2 วัน

สายพันธุ์เชื้อรา	ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี
27 (6)	3.57^{a}
27 (7)	3.20^{b}
27 (8)	2.77^{c}
22 (6)	2.13^{d}
20 (6)	2.06^{de}
21 (6)	2.04^{de}
30 (6)	2.04^{de}
13 (6)	1.97^{def}
A. foetidus TISTR 3159 (6)	1.90^{def}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

22 (7)	1.88^{def}
30 (7)	1.87^{def}
30 (8)	1.83^{ef}
18 (8)	1.75^{f}
20 (7)	1.74^{f}
A. foetidus TISTR 3159 (8)	1.73^{f}
21 (7)	1.71^{f}
A. foetidus TISTR 3159 (7)	1.70^{f}

ตัวเลขในวงเล็บ หมายถึง ค่าพีเอชที่เชื้อราเจริญ

4.2.2 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณ

ผลการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณของเชื้อ *A. foetidus* TISTR 3159 กับเชื้อราสายพันธุ์ที่ 13, 30, 21, 20, 22, 27 ที่คัดเลือกได้จากการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน และจากผลการทดลองในการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพที่ผ่านมาจึงกำหนดสภาวะพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราได้ดังนี้ คือเชื้อราสายพันธุ์ที่ 13 เลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 เชื้อราสายพันธุ์ที่ 18 เลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 8.0 เชื้อราสายพันธุ์ที่ 20, 21 และ 22 เลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 กับ 7.0 และเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 เช่นเดียวกันกับ *A. foetidus* TISTR 3159 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6 พบว่าเชื้อราทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้นสูงสุดจนถึงวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเจริญที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 33.82 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดของ *A. foetidus* TISTR 3159 ที่มีค่าเท่ากับ 33.42 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์อื่น ๆ ทั้งหมดที่ทำการทดลอง พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

อย่างไรก็ตาม *A. foetidus* TISTR 3159 ที่เป็นเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง เป็นเชื้อราที่ใช้เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันทางสถิติ แต่จากเหตุผลที่ว่าในการเปรียบเทียบในเชิงคุณภาพเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 มีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมากกว่าเชื้อรา *A. foetidus* TISTR 3159 อย่างมีนัยสำคัญ ประกอบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้มีค่าสูงเทียบเท่ากับของ *A. foetidus* TISTR 3159 จากเหตุผลข้างต้นจึงคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้เป็นเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด เพื่อใช้สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสต่อไป

ตารางที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ของการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณ เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นระยะเวลา 6 วัน

สายพันธุ์เชื้อรา	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
27 (6)	33.82[a]
A. foetidus TISTR 3159 (6)	33.42[a]
21 (6)	26.38[b]
22 (6)	26.31[b]
30 (6)	24.97[b]
13 (6)	22.69[b]
20 (6)	21.28[b]
27 (7)	8.39[c]
27 (8)	4.28[c]

ตัวเลขในวงเล็บ หมายถึง ค่าพีเอชที่เชื้อราเจริญ

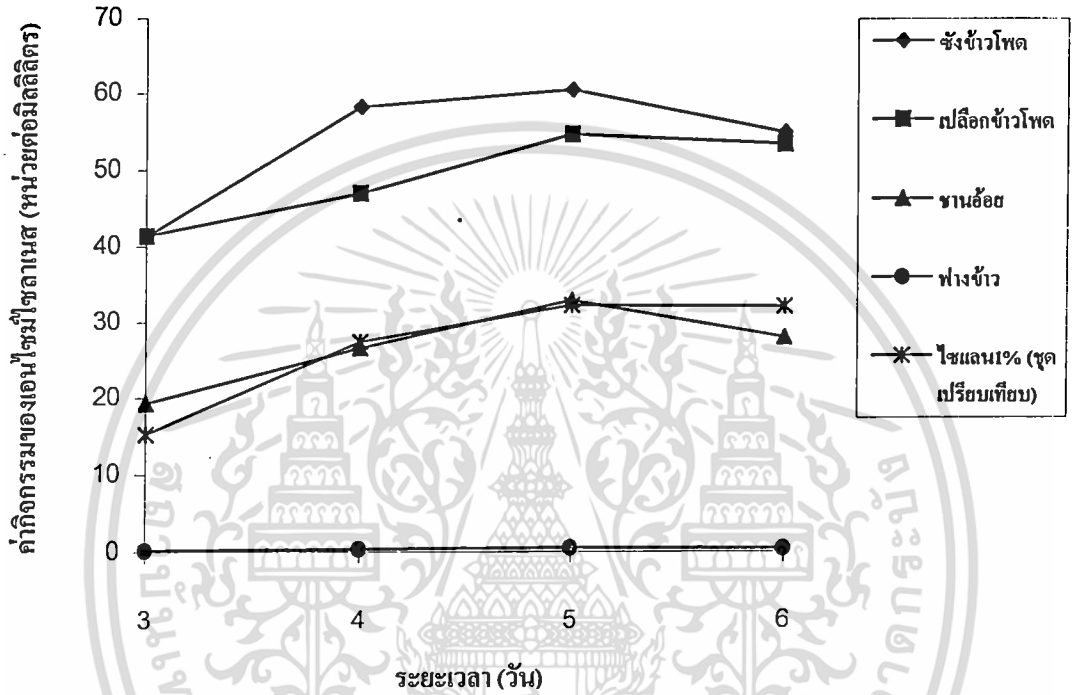
4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

4.3.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลของการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อยและฟางข้าวที่ผ่านการบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 1 เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่าเมื่อใช้ ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อรา ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด เท่ากับ 60.38 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งสูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค.1) ในขณะที่ชุดเปรียบเทียบซึ่งมีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซ-

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลาเนสสูงสุดเท่ากับ 32.23 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 จากผลการทดลองพบว่าฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อราใช้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้น้อยที่สุด โดยได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 0.59 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27



รูปที่ 4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

จากการที่เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 สามารถใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่สุด อาจเนื่องจากในซังข้าวโพดมีองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสอยู่มาก คือร้อยละ 39 และมีส่วนของลิกนินซึ่งย่อยสลายได้ยากในปริมาณน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ (Barber and Benedito de Barder, 1974 and Kuhad, 1999) อีกทั้งอาจเนื่องจากการจัดเรียงตัวของไซแลนในโครงสร้างของซังข้าวโพดอยู่ในตำแหน่งที่ย่อยสลายได้ง่ายกว่า ส่วนของเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนที่สามารถนำไปใช้ได้ง่ายที่สุดเมื่อเทียบกับเซลลูโลสและลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของซังข้าวโพด (Kuhad, 1999) ดังนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากที่สุด ประกอบกับในซังข้าวโพดอาจมีแหล่งของสารอาหารอื่น ๆ เช่น แหล่งไนโตรเจน วิตามิน แร่ธาตุ เป็นต้น ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา จึงช่วยส่งเสริมให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากขึ้น (Purkarthofer *et. al.*, 1993b) ส่วนสาเหตุที่ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อราใช้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้น้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากฟางข้าวมีองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสน้อยที่สุด คือร้อยละ 24 (Barber and Benedito de Barder, 1974 and Kuhad, 1999) และการจัดเรียงตัวขององค์ประกอบต่าง ๆ ในฟางข้าวอาจจะทำให้เชื้อรานำไซแลนมาใช้ได้ยากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่นที่ศึกษา (Kuhad, 1999) โดยผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Purkarthofer *et. al.* (1993b) ซึ่งรายงานว่าซังข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *T. lanuginosus* DSM 5826 เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น และเมื่อใช้ซังข้าวโพดบดความเข้มข้น 31.2 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวปริมาตร 30 ลิตร อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และ 7.5 เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด 1,950 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นค่าความสามารถในการผลิต (productivity) เท่ากับ 16,525 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง$^{-1}$ ยิ่งกว่านั้นยังมีการรายงานมากมายที่แสดงให้เห็นว่ามีการใช้สารพวกเฮมิเซลลูโลสหรือพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ เช่น รำข้าวสาลี ฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย เป็นต้น เพื่อเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อรา (Kesker, 1992 ; Kuhad *et. al.*, 1998 ; Puchart *et. al.*, 1999 ; Beg *et. al.*, 2000a and Gupta *et. al.*, 2001)

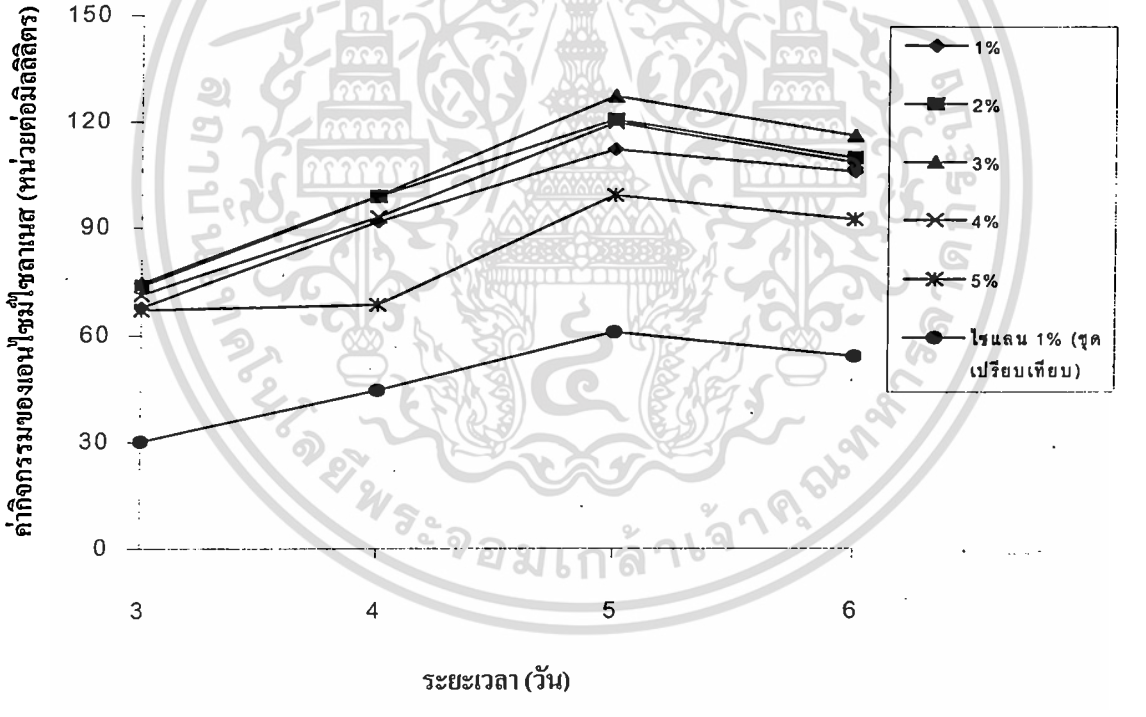
4.3.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลของการใช้ซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 พบว่าเมื่อใช้ซังข้าวโพด ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลทำให้เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 127.24 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ใช้ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค.2) ส่วนชุดควบคุมที่ใช้ไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 60.94 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าการใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ใช้ศึกษาโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

จากผลการทดลองสังเกตได้ว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจะมีค่าสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อใช้ซังข้าวโพด ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน จนกระทั่งถึงความเข้มข้นร้อยละ 3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้รับจะมีค่าสูงที่สุด และค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจะเริ่มลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อความเข้มข้นของซังข้าวโพดเพิ่มมากกว่าร้อยละ 3 โดยพบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 และ 5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจะมีค่าลดลงเรื่อย ๆ ซึ่งสาเหตุการลดลงของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของซังข้าวโพดมากขึ้น อาจเนื่องจากการเพิ่มปริมาณซังข้าวโพดที่มากเกินไปและมีผลทำให้มีปริมาณหรือการถ่ายเทมวลสารของออกซิเจนน้อยลง จึงส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ทำให้การเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราลดลง (Singh *et. al.*, 1995) หรืออาจเกิดจากการสะสมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายของเอนไซม์ไซลาเนสและสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่เชื้อราผลิตขึ้นในปริมาณมาก ที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา (พรพิมล อุ้ยจันทร์ภักดี, 2533) ดังนั้นจึงเลือกซังข้าวโพด ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของซังข้าวโพดที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีงานวิจัยที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้โดย Lenartovicz *et. al.* (2003) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการใช้วัสดุเศษเหลือทิ้งพวกลิกโนเซลลูโลสหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 และ ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการผลิตเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส โดย *A. fumigatus* ในการหมักแบบสภาวะอาหารเหลว พบว่าเมื่อใช้ซังข้าวโพดบดความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน จะได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดสสูงสุดเท่ากับ 45.40 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วน Singh *et. al.* (1995) รายงานว่าเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของรำข้าวสาลีจากความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 3 พบว่าปริมาณการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส โดย *Fusarium oxysporum* NTG-19 เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของรำข้าวสาลี มากกว่าร้อยละ 3 จะไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ทั้งสอง นอกจากนี้ Purkarthofer and Steiner (1995) รายงานว่าจลนพลศาสตร์ของการปลดปล่อยเอนไซม์ไซลาเนสขององุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรทที่ใช้เป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ ไซลาเนส หากมีการใช้ประโยชน์จากตัวชักนำที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ให้หมดลงอย่างช้า ๆ โดยตลอดระยะเวลาของการหมัก ซึ่งเป็นการทำให้ระยะเวลาของการหมักยาวนานขึ้น จะช่วยส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงขึ้น

4.3.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

4.3.3.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ซึ่งประกอบด้วย ยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (ดังตารางที่ 3.1) ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7 พบว่าเมื่อใช้ไนโตรเจนอินทรีย์สูตร G ซึ่งประกอบด้วยยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.3, 0.4 และ 0.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 191.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าสูตรอื่น ๆ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 กับสูตร H (ประกอบด้วยยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.3, 0.25 และ 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) , K (ประกอบด้วยยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.3, 0.25 และ 0.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) และ J (ประกอบด้วยยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.3, 0.25 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด เป็นพื้นฐาน พบว่าไนโตรเจนอินทรีย์สูตร H มีความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดนี้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตร G, J และ K ซึ่งเป็นการใช้สารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ที่คุ้มค่าไม่สิ้นเปลือง และยังให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซลาเนสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับไนโตรเจนอินทรีย์สูตร G, J และ K ดังนั้นจึงเลือกใช้ไนโตรเจนอินทรีย์สูตร H เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด 185.97 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน

ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Haapala *et. al.* (1996) ซึ่งศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *T. reesei* ที่ตรึงเซลล์บนเส้นใยไนลอน โดยการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่มีไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราในสูตร Ib (ประกอบด้วยโปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 3.0 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ), Id (ประกอบด้วยโปรติโอสเปปโตน ความเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร) และ Ie (ประกอบด้วยยีสต์สกัด ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร) ที่ไม่มียูเรียเป็นองค์ประกอบ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสอยู่ในช่วง 1,550 ถึง 1,800 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้อาหารสูตร Ic ที่มียูเรียเพียงอย่างเดียว (ประกอบด้วยยูเรีย ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร) ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเพียง 1,490 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งไม่เพียงพอต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และพบว่าสูตรอาหารที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดคือ Ia ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ประกอบด้วยยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 1.5, 3.0 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 8,020 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนซึ่งได้แก่ ยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด มีผลช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งโปรติโอสเปปโตนประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นและยีสต์สกัดจะเป็นแหล่งที่ดีของวิตามินบีรวม ส่วนการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น พบว่ายูเรียจะต้องเปลี่ยนรูปไปเป็นแอมโมเนียโดยเอนไซม์ยูเรียเอสก่อน จากนั้นจุลินทรีย์จึงจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นการใช้ยูเรียที่ความเข้มข้นต่ำอาจจะไม่เพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ (Stewart, 1980)

มีการรายงานที่ผ่านมาซึ่งสนับสนุนการใช้โปรติโอสเปปโตนหรือยีสต์สกัดว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีของจุลินทรีย์ เมื่อใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงขึ้น (Haltrich *et. al.*, 1993 ; Purkarthofer *et. al.*, 1993a ; Haltrich *et. al.*, 1994 and Gomes *et. al.*, 1994b) ซึ่งยังมีการสนับสนุนการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์โดย Fernandez-Espinar *et. al.* (1992) รายงานว่าการเพิ่มสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อนมีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถึงแม้ว่าจะใช้ในความเข้มข้นที่เท่ากันก็ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

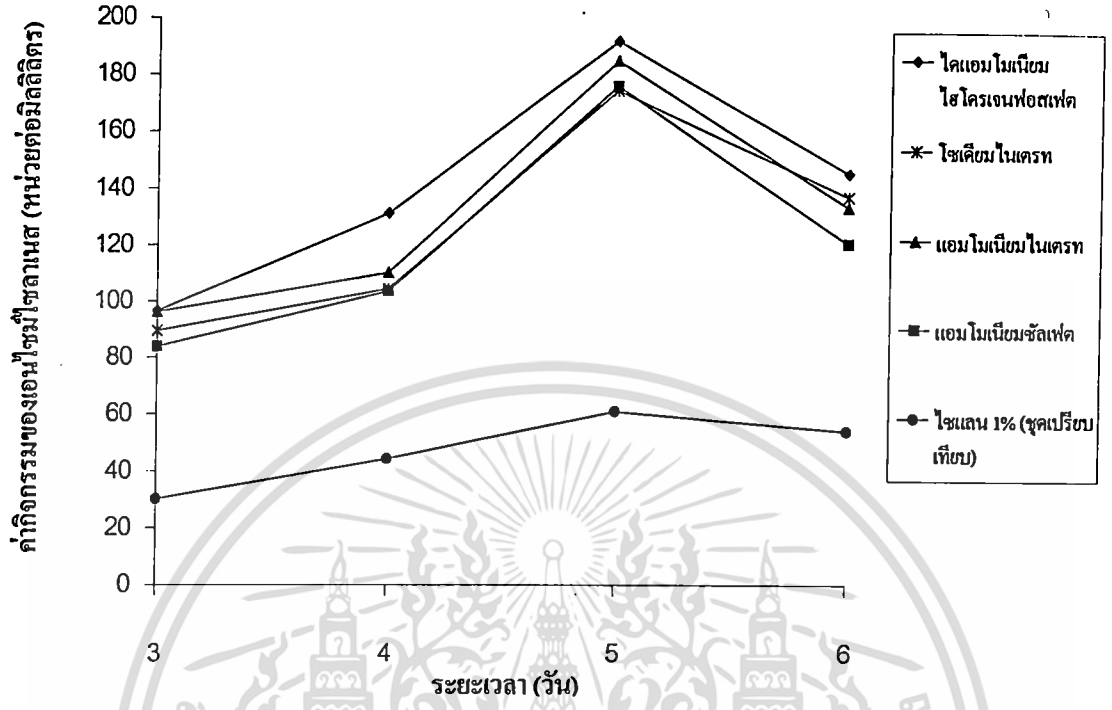
ไนโตรเจนอินทรีย์	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
A	158.98[d]
B	163.09[cd]
C	171.19[bcd]
D	171.97[bc]
E	164.22[cd]
F	165.43[cd]
G	191.20[a]
H	185.97[a]
I	182.08[ab]
J	183.87[a]
K	184.98[a]
ชุดเปรียบเทียบ*	69.60[e]

ชุดเปรียบเทียบ* หมายถึง ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ใช้ไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

4.3.3.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ไดแอมโมเนียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ซึ่งกำหนดให้มีความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร (ความเข้มข้น 1.4 , 0.91 , 0.86 และ 1.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.5 พบว่าเมื่อใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 191.60 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ศึกษาโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค.3) และจากการทดลองยังพบว่าน้ำหมักมีค่าพีเอชลดลง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ผลของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ในสภาวะอาหารโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

จากผลการทดลองพบว่าไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อราใช้ NH_4^+ จากสารประกอบเป็นสารอาหารสำหรับกิจกรรมของเซลล์ก่อน แล้วจะเกิด HPO_4^{-2} ซึ่งเป็นพวกอนุมูลของสารพวกฟอสเฟตที่เป็นแร่ธาตุที่จุลินทรีย์ต้องการมากสำหรับการเจริญ เพราะมีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการอีเล็กโทรไลต์ (electrolyte) ของเซลล์ หรืออาจจะนำไปใช้เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์บางชนิด หรือเป็นองค์ประกอบของสารบางชนิด และฟอสเฟตยังมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ ซึ่งอาจจะช่วยควบคุมพีเอชของน้ำหมักให้คงที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมได้ จึงอาจจะช่วยส่งเสริมให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีขึ้น (สมใจ ศิริโภค, 2537) ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้โซเดียมไนเตรทและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์จะได้รับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสน้อยที่สุด (ภาคผนวก ค.3) เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดอื่นที่ใช้ในการทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตทำให้มีการสะสมอนุมูลของซัลเฟอร์ และส่งผลให้พีเอชของน้ำหมักลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้การเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ถูกจำกัด (Forage and Righelato, 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนการใช้โซเดียมไนเตรท พบว่าจุลินทรีย์จะสามารถใช้ประโยชน์ได้จะต้องมีการเปลี่ยนรูปเป็นแอมโมเนียก่อน ซึ่งต้องใช้ขบวนการเมแทบอไลต์ 2 ขั้นตอน (Stewart, 1980) ฉะนั้นเชื้อราจึงนำไปใช้ได้ช้า จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในระดับต่ำ

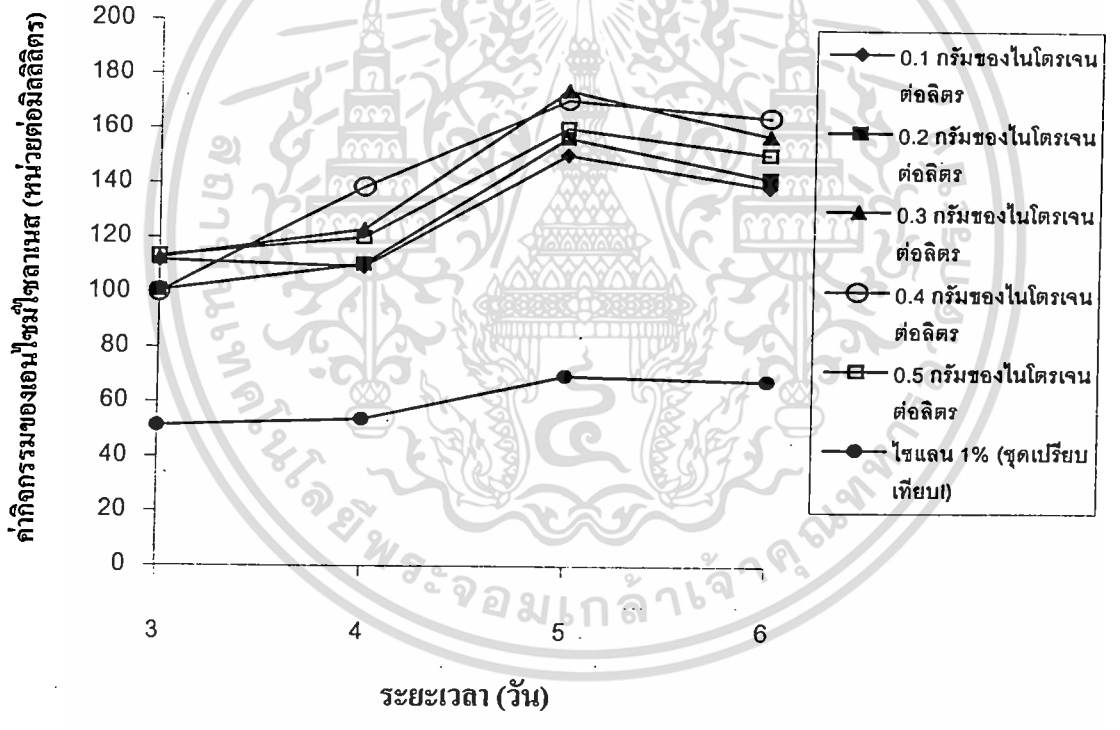
มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย Christakopoulos *et. al.* (1996) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Fusarium oxysporum* F3 ในเออเลนเมเยอร์ ฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร minimal medium ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีซังข้าวโพดบด ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมฟอสเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 เป็นระยะเวลา 4 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจำเพาะ (specific activity) สูงสุดเท่ากับ 331 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นอกจากนี้ Haapala *et. al.* (1994) รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์มีผลต่อค่าพีเอชของอาหารอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างการหมัก ซึ่งทำให้ค่าพีเอชของอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงและอาจส่งผลให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้ลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ในระหว่างระยะเวลาของการหมัก เพื่อป้องกันการสูญเสียของผลผลิต

4.3.3.3 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลาเนส

ผลของการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของการใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร (ความเข้มข้น 0.47 , 0.94 , 1.40 , 1.89 และ 2.36 ตามลำดับ) ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 พบว่าเมื่อใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 173.89 หน่วยต่อมิลลิลิตรหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งสูงกว่าการใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ทำการศึกษา แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 กับการใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 170.34 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในทางตรงกันข้ามพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 กับการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์นี้ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.5 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร (ภาคผนวก ค.4) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตตั้งแต่ความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งได้รับค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 0.3 หรือ 0.4 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.5 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จะลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อคำนึงถึงความเข้มข้นของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ใช้ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ได้อย่างคุ้มค่ากว่า เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเทียบเท่ากับการใช้ที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นที่มากกว่า จากเหตุผลดังกล่าวจึงเลือกใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจน-ฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27. ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6 และจากการทดลองยังพบว่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าลดลงเรื่อย ๆ ซึ่งมีค่าพีเอชสุดท้ายของน้ำหมักเท่ากับ 3.65, 3.77, 3.89, 3.85 และ 3.74 เมื่อใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

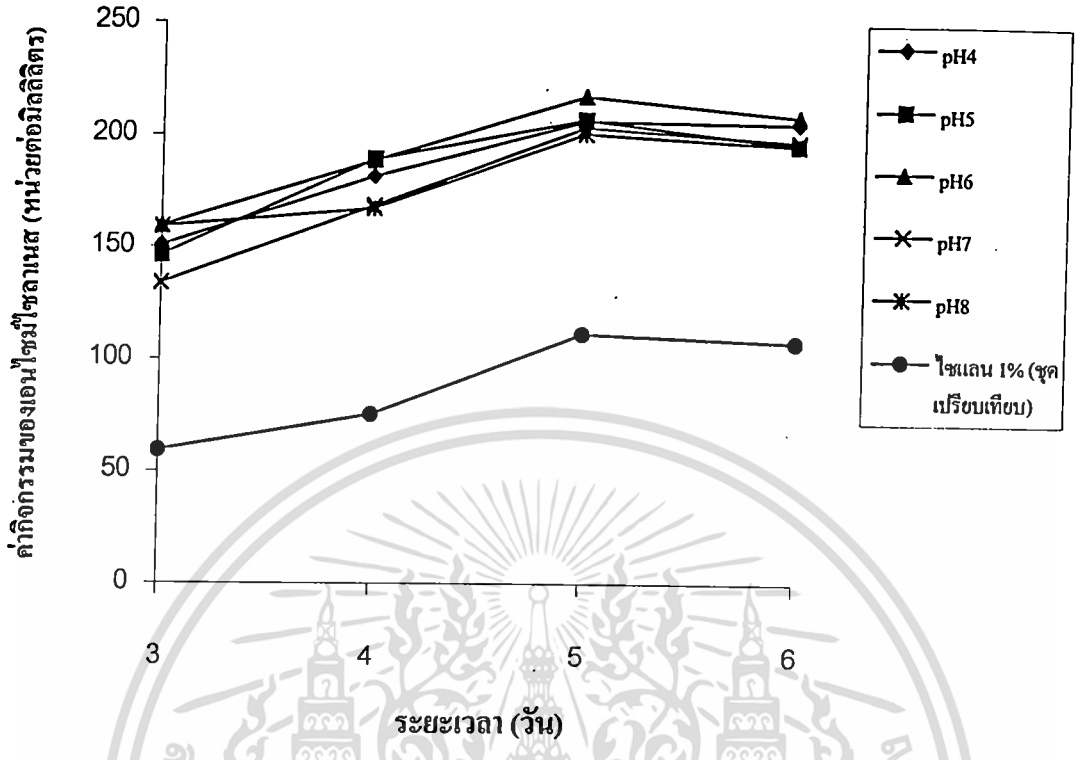
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4 พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 โดยทำการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่สภาวะพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 218.07 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ และสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวอื่น ๆ ที่ได้ศึกษา และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 (ภาคผนวก ค.5) ส่วนการเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชอื่น ๆ พบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสใกล้เคียงกัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7 และยังพบว่าในน้ำหมักมีค่าพีเอชลดลง โดยมีค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 3.14, 3.50, 3.73, 3.79 และ 3.85 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่า เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง แต่พีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (optimum pH) มีค่าอยู่ที่พีเอช 6.0 ดังนั้นจึงเลือกค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอช 6.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27

ซึ่งมีงานวิจัยที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้โดย Xiong *et. al.* (2003) ได้ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *T. reesi* Rut C-30 ในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ (batch cultivations) ในอาหาร lactose-based medium ที่มีแลคโตส ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และทำการแปรผันค่าพีเอชให้อยู่ระหว่าง 3.5 ถึง 7.5 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 ได้รับค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 94.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อราสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่ค่าพีเอชต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Smith and Wood (1991b) ที่รายงานว่า ค่าพีเอชที่เป็นกรดมีความเหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *A. awamori* และเมื่อพีเอชมีค่าเท่ากับ 5.0 หรือสูงกว่านี้ จะส่งผลให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสลดลง และจากผลการศึกษาของ Bailey and Viikari (1993) รายงานว่าในระยะเวลาช่วงหลังของการเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จะส่งผลให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำกว่า 3.0 ทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีระดับต่ำลง นอกจากนี้ Haitrich *et. al.* (1994) ได้รายงานว่าค่าพีเอชที่ต่ำลงจะส่งผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *S. rolfsii* พบว่าในระหว่างการเลี้ยงเชื้อรานี้ พีเอชจะมีค่าลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เปลี่ยนไปเป็นค่าพีเอชระหว่าง 3.0 และ 3.5 ซึ่งผลของการลดลงของค่าพีเอชในระหว่างการหมักจะส่งผลให้เชื้อราปลดปล่อยกรดออกซาลิก (oxalic acid) ออกมาภายนอกเซลล์ในปริมาณมาก ทำให้ทั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราลดต่ำลง และจากการที่ค่าพีเอชลดต่ำลงในระหว่างการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสนี้ จึงต้องมีการควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการหมักให้คงที่เพื่อให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

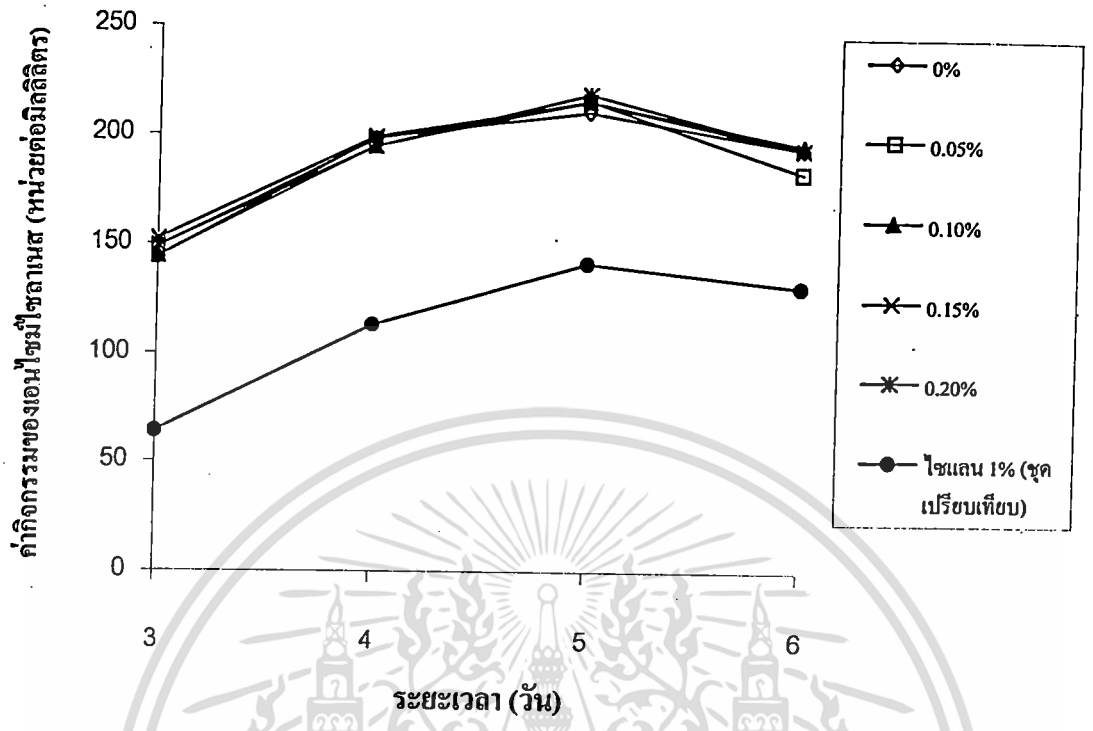


รูปที่ 4.7 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน

4.3.5 ความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลจากการเติมสารละลายแร่ธาตุผสมซึ่งประกอบด้วย เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.H_2O$) แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.7H_2O$) และโคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เพื่อเป็นแหล่งของแร่ธาตุสำหรับการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 พบว่าเมื่อเติมสารละลายแร่ธาตุผสมที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดใกล้เคียงกันโดยประมาณ 215 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกันกับเมื่อไม่เติมสารละลายแร่ธาตุผสม (ร้อยละ 0) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทุกความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค.6) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกการไม่เติมสารละลายแร่ธาตุผสมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อนำไปศึกษาขั้นต่อไป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ผลของความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

เมื่อพิจารณาผลการทดลองทางสถิติ อาจกล่าวได้ว่าสารละลายแร่ธาตุผสมไม่มีผลในการเพิ่มความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ทั้งนี้อาจเนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งของแร่ธาตุที่เพียงพออยู่แล้วสำหรับการเจริญและผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจอยู่ในรูปของสารประกอบอนินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.H_2O$) โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ในทำนองเดียวกันซังข้าวโพดที่เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ตามธรรมชาติที่อาจจะมีส่วนประกอบของสารอาหารจำพวกแร่ธาตุและวิตามินต่าง ๆ อยู่ในปริมาณที่เพียงพอและเหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา (สมใจ ศิริโภค, 2537) ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ

มีการศึกษาที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้โดย Haltrich *et. al.* (1994) ได้ศึกษาผลขององค์ประกอบของสารอาหารที่มีต่อการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสโดย *S. rolfsii* ซึ่งใช้การวางแผนการทดลองทางสถิติในการวิเคราะห์ผล พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อินทรีย์ และมีการเติมสารละลายแร่ธาตุปริมาณเพียงเล็กน้อย พร้อมกับมีการเพิ่มความเข้มข้นของเซลลูโลส จากความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็น 60 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถกระตุ้นให้ *S. rolfsii* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากขึ้น ในทางตรงกันข้ามเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือแร่ให้มากขึ้น พบว่าไม่มีผลทำให้ *S. rolfsii* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้เพิ่มขึ้น โดยทั่วไปแร่ธาตุเป็นสารอนินทรีย์ที่สิ่งมีชีวิตต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Ratanakhanokchai *et. al.* (1998) พบว่า Fe^{2+}, Ca^{2+}, และ Mg^{2+} มีผลช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส แต่ Mn^{2+} มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส และพบว่า Co^{2+}, Zn^{2+} และ Cd^{2+} มีผลช่วยเพิ่มการยึดเกาะของเอนไซม์ไซลาเนสกับไซแลนชนิดที่ไม่ละลายน้ำ

4.3.6 สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลจากการเติม Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 พบว่าเมื่อเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าการเติม Tween 80 ที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค.7) โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 190.84 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อ 5 วัน จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ Tween 80 จากความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ถึง ร้อยละ 0.2 มีผลให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติม Tween 80 ในทางตรงกันข้ามเมื่อความเข้มข้นของ Tween 80 มากกว่าร้อยละ 0.2 ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไซลาเนส ยิ่งกว่านั้นยังพบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีการเติม Tween 80 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 187.97 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 0.4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค.7) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.9 ดังนั้นจึงเลือกใช้ Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อพิจารณาผลการทดลองแสดงว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ Tween 80 มากกว่าร้อยละ 0.2 จะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่ Tween 80 มีผลต่อการเพิ่มคุณสมบัติการซึมผ่านได้ของสาร (permeability) ของเซลล์เมมเบรน และส่งผลดีต่อการปลดปล่อยเอนไซม์ (Okeke and Obi, 1993) ดังนั้นจากผลการเติม Tween 80 ที่ความเข้มข้นสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้เชื้อราสามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น และทำให้ภายในเซลล์มีอัตราการเมแทบอไลต์ไซแลนสูงในระยะเวลาที่รวดเร็ว และส่งผลให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมาภายนอกเซลล์ในปริมาณมาก โดยเอนไซม์ไซลาเนสจะย่อยสลายไซแลนจากซังข้าวโพดได้ มากขึ้น และให้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น ๆ แล้วไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ สาย

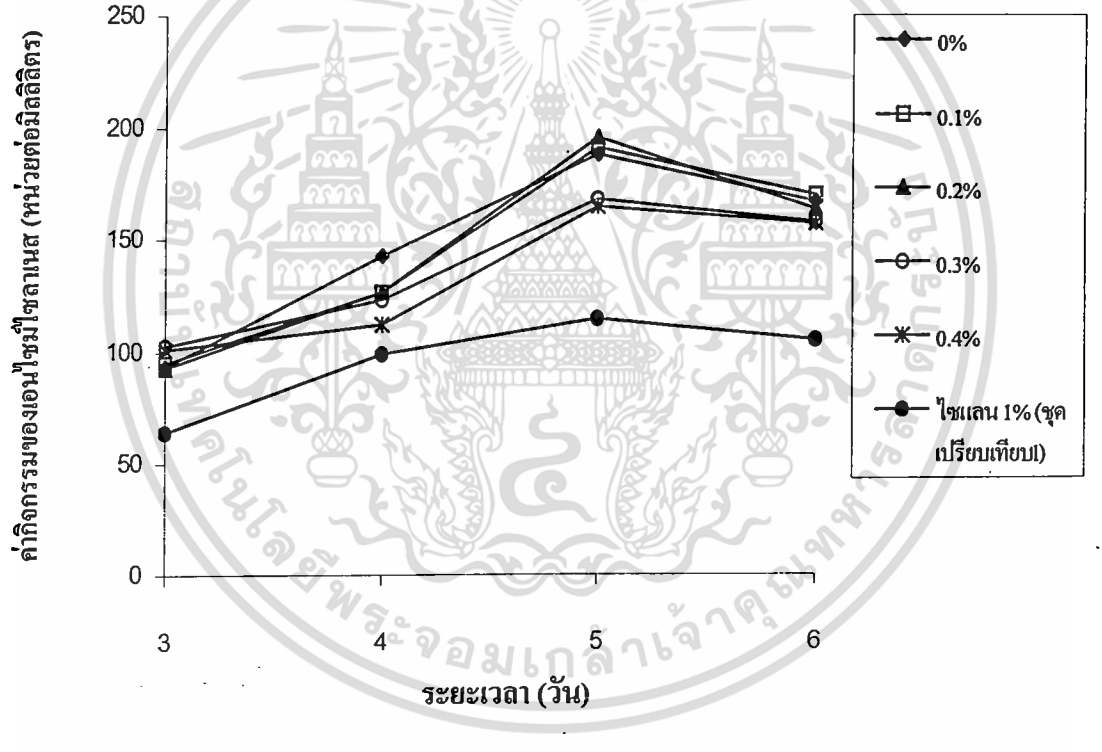
เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สั้น ๆ นี้จะถูกส่งผ่านเข้าสู่เซลล์ และเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมาอย่างต่อเนื่องในปริมาณสูง ในที่สุดจะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการเมแทบอไลต์ของ ไซแลนในช่วงแรกของการหมัก ซึ่งน้ำตาลไซโลสปริมาณมากที่เกิดขึ้นนี้อาจจะมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา เนื่องจากน้ำตาลไซโลสจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ของเซลล์และเกิดการสร้างผลิตภัณฑ์หลายชนิดออกมาจำนวนมาก เช่น กรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา อัตราการเจริญจึงถูกจำกัดและส่งผลให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ต่ำลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก จากเหตุผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การใช้ Tween 80 ความเข้มข้นสูงจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสน้อยกว่าการใช้ Tween 80 ความเข้มข้นต่ำ อย่างไรก็ตามการใช้ Tween 80 ความเข้มข้นต่ำเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูง อาจเนื่องจากการซึมผ่านของสารอาหารเข้าสู่เซลล์เกิดขึ้นได้ดีเช่นกัน แต่อาจจะมีการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ในอัตราเร็วที่ต่ำกว่า เซลล์จึงมีการเมแทบอไลต์ไซแลนอย่างช้า ๆ ทำให้มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมาในปริมาณที่เหมาะสมและไม่ทำให้อัตราการเจริญถูกจำกัดด้วยไซโลส จึงทำให้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้อย่างต่อเนื่องในอัตราการเมตาบอไลต์อย่างช้า ๆ จากการเหนี่ยวนำของไซโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์สายสั้น ๆ เพียงเล็กน้อย จนกระทั่งสารอาหารหมดลงหรืออัตราการเจริญลดลงจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก (Okeke and Obi, 1993)

มีงานวิจัยที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้โดย Reese and Maguire (1969) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* ในสภาวะอาหารเหลว ในอาหารสารละลายเกลือแร่ที่มีสับสเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สามารถเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสได้ 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม Tween 80 และยังพบความสัมพันธ์ของการใช้ Tween 80 กับเปอร์เซ็นต์การเพิ่มของการผลิตเอนไซม์ จะให้ผลดีที่สุดกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณน้อยมากเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารปกติที่ไม่มีการเติม Tween 80 ส่วน Liu *et. al.* (1998) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *T. cutaneum* SL409 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยใช้รำข้าวสาลี ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด 39.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้นเป็น 74 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในทางตรงกันข้ามการใช้ Tween 80 มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ได้เช่นกัน ซึ่งอาจเนื่องจากสาเหตุดังนี้ คือ 1) จากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์และการเพิ่มขึ้นของสารประกอบภายในเซลล์อื่น ๆ ที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ และ 2) จากการที่ Tween 80 ให้ผลที่ซับซ้อนมากเกินกว่าการเปลี่ยนคุณสมบัติการซึมผ่านได้ของสารของเซลล์เมมเบรนเพียงอย่างเดียว (Reese and Maguire, 1969) จากการศึกษาผลของ Tween 80 ต่อการผลิตเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าการใช้ Tween 80 เติมลงไปในอาหารที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 ถึง 3.0 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ประมาณร้อยละ 12 ถึง 60 แต่ในบางกรณีพบว่า Tween 80 ไม่มีผลช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ (Dubeau *et. al.*, 1987 ; Fernandez-Espinar *et. al.*, 1992 ; Okeke and Obi, 1993 ; Gomes *et. al.*, 1993a and Singh *et. al.*, 1995) ยิ่งกว่านี้มีการยืนยันเกี่ยวกับผลของสารลดแรงตรึงผิวที่มีต่อเชื้อราบางชนิดโดย Takahashi *et. al.* (1960) รายงานว่าสารลดแรงตรึงผิวสามารถนำมาใช้ได้ดีกับการเลี้ยงเชื้อราในสภาวะอาหารเหลว ซึ่งจะช่วยเปลี่ยนรูปของเพลเลต (pellet) ไปเป็นไมซีเลียมที่สามารถกระจายได้ทั่วถึงในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.9 ผลของ Tween 80 ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

ผลการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบว่า *A. foetidus* TISTR 3159 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.28 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 (ภาคผนวก ค.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาผลการทดลองทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 ซึ่งนับว่าเป็นคุณสมบัติที่ดีของจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากจุดประสงค์ที่สำคัญของการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสนั้น คือต้องการจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงและต้องไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วย หรืออาจจะมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ส่วนการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 และ *A. foetidus* TISTR 3159 พบว่าพีเอชมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 5 วัน ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นพีเอชจะมีค่าค่อนข้างคงที่ ซึ่งพีเอชสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 และ *A. foetidus* TISTR 3159 เป็นเวลา 6 วัน มีค่าเท่ากับ 3.6 และ 3.4 ตามลำดับ เมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอช 6.0 มีงานวิจัยที่คล้ายคลึงกับงานวิจัยนี้ ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีการใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรหรือวัสดุเหลือทิ้ง (waste) จากกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมหลายชนิด ซึ่งประกอบด้วยสารพวกลิกโนเซลลูโลสที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ โดยเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีคล้ายคลึงกันกับงานวิจัยนี้นี้ เช่น Biswas *et. al.* (1990) รายงานว่าเมื่อใช้ ชานอ้อย ความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร เป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อ *A. ochraceus* NG-13 ในสภาวะอาหารเหลว ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส และ 6.5 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 46.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ Singh *et. al.* (1995) รายงานว่าเมื่อใช้รำข้าวสาลี ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อ *F. oxysporum* NTG-19 ในสภาวะอาหารเหลว ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 5.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าให้กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 53.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามยังมีเชื้อราสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ปริมาณสูงกว่า เช่น Royer and Nakas (1989) รายงานว่า *T. longibrachiatum* ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 272 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวในระดับฟลาสก์ที่มี Solka Floc ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะการเจริญที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เป็นระยะเวลา 6 วัน เป็นต้น ยิ่งกว่านั้น Bastawde *et. al.* (1994) รายงานว่ายีสต์สายพันธุ์ NCIM 3574 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 570 หน่วยต่อมิลลิลิตร และไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสร่วมออกมา เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่ใช้ oat spelt xylan ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะการเจริญที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ดังนั้นหากมีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับปรุงกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เช่นใช้ระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง ใช้ระบบการตรึงเซลล์หรืออาจใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมปรับปรุงพันธุ์ อาจทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นและยังทำให้ราคาของเอนไซม์ไซลาเนสลดลงด้วย (Haltrich *et. al.*, 1996)

4.4 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราที่คัดเลือกได้

จากการตรวจดูรูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยวัดขนาดของสปอร์ conidiophores และ vesicles ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27, 22, 20, 21, 30 และ 13 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ปริมาณสูงจากการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพ ตามลำดับ และเชื้อราสายพันธุ์ที่ 15 ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.8 แล้วนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอก (macroscopic) และภายใน (microscopic) มาทำเปรียบเทียบกับเอกสารและหนังสือที่จำแนกชนิดของเชื้อราของ Raper and Fennell (1965) , Raper and Thom (1949) และ Pitt (1980) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.9 และลักษณะของเชื้อราเหล่านี้แสดงดังรูปที่ 4.12 ถึง 4.18

ตารางที่ 4.8 ขนาดของสปอร์, conidiophores และ vesicles ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 13, 15, 21, 22, 27 และ 30 เมื่อเจริญบนอาหาร Czapek agar และสายพันธุ์ที่ 20 เจริญบนอาหาร Malt extract agar

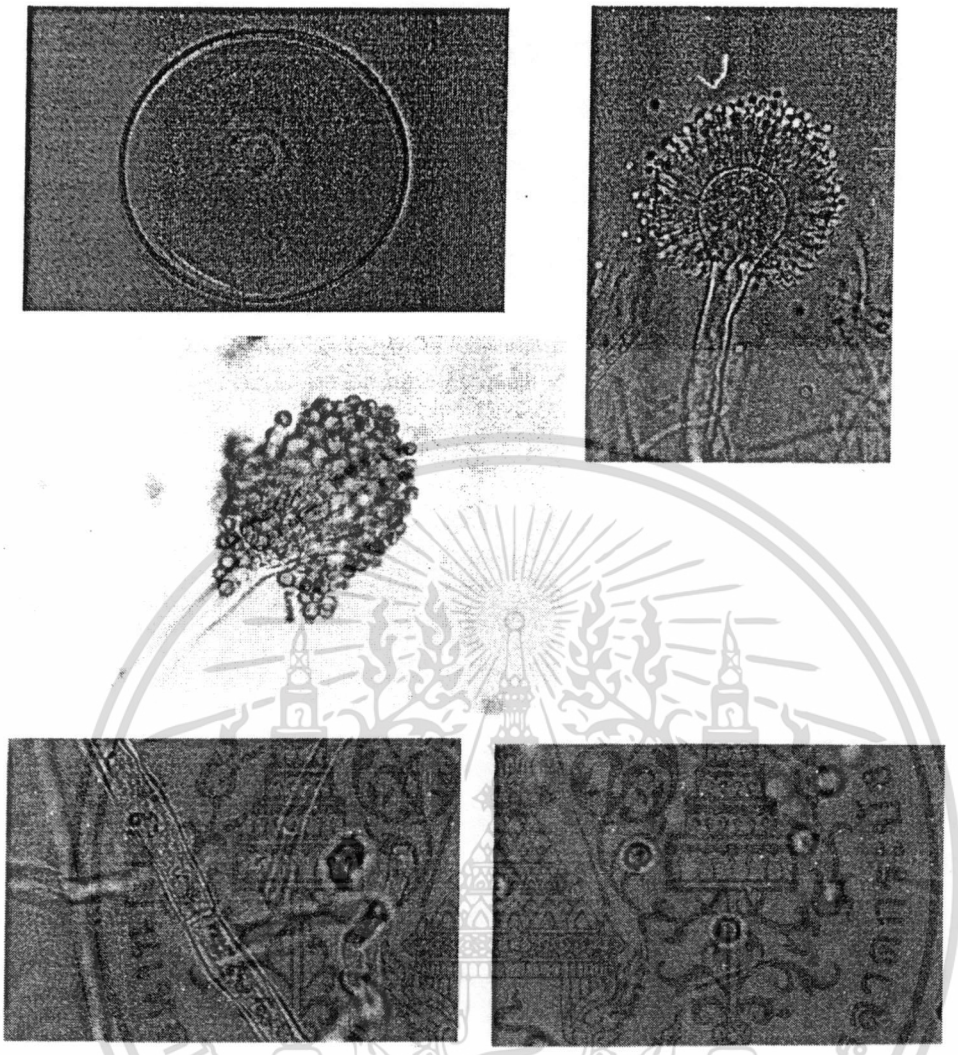
สายพันธุ์เชื้อรา	ขนาด (ไมครอน ; μm)			
	สปอร์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง)	Vesicles (ความกว้าง)	Conidiophores(ความกว้าง x ความยาว)	Phialides (ความยาว)
13	4.0	26-28	7.4x500.0	19.4
15	1.6	15-18	6.0x219.0	11.4
20	2.4	ไม่ได้ตรวจสอบ	6.0x254.0	22.4
21	6.0	42-51	8.0x700.0	ไม่ได้ตรวจสอบ
22	3.2	19-23	8.0x670.4	13.8
27	4.0	45-53	8.0x348.2	9.34
30	4.0	45-60	8.0x310.0	7.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ผลการจัดจำแนกเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่คัดเลือกได้โดยเปรียบเทียบกับเอกสารและหนังสือที่จำแนกชนิดของเชื้อรา

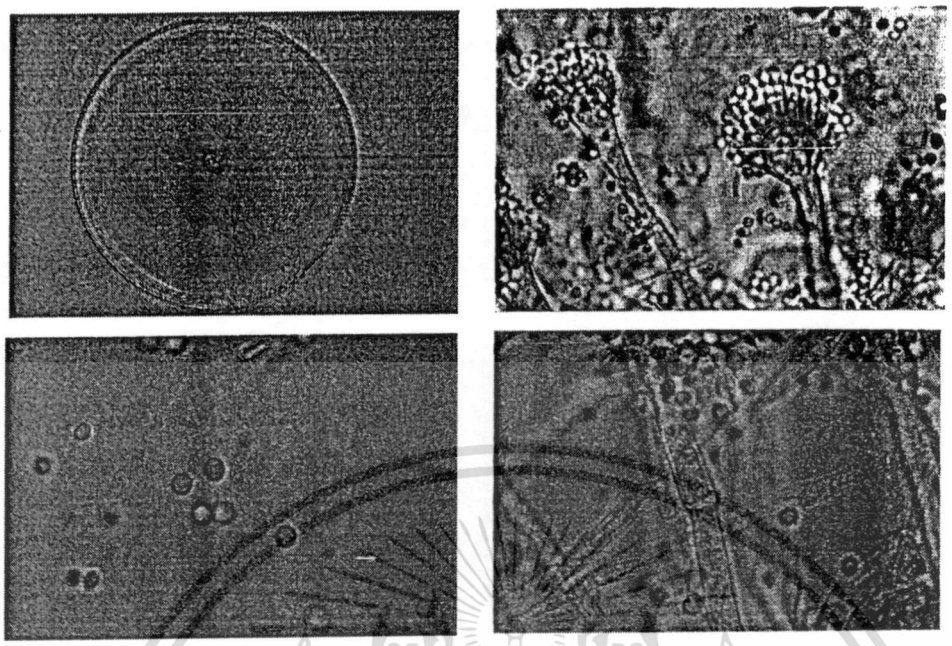
สายพันธุ์เชื้อรา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนก
13	โคโลนีมีสปอร์สีเขียวอ่อน, เส้นใยสีขาวเป็นชนิดมีผนังกั้น (septate hypha), phialides เกิดอยู่บน metula ที่เกิดล้อมรอบ vesicle รูปทรงกลม, จัดอยู่ใน *Aspergillus flavus* group จำแนกชนิดได้เป็น ***Aspergillus flavus***
15	โคโลนีมีสปอร์สีเขียวเข้มและมีลักษณะค่อนข้างเป็นผงละเอียด, เส้นใยสีขาวเป็นชนิดมีผนังกั้น, conidiophores เป็นรูปทรงกระบอก, phialides เกิดอยู่บน vesicle เฉพาะด้านบนของหัว,จัดอยู่ใน *Aspergillus fumigatus* group. จำแนกชนิดได้เป็น ***Aspergillus fumigatus***
20	โคโลนีมีสปอร์สีเขียวปนเทา, เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกั้น, ไม่มี vesicle, จำแนกชนิดได้เป็น ***Penicillium sp.***
21	โคโลนีมีสปอร์สีดำ, เส้นใยมีสีครีมเป็นชนิดมีผนังกั้น, จัดอยู่ใน *Aspergillus niger* group., แต่ลักษณะของ phialides ยังไม่ชัดเจน จำแนกชนิดได้เป็น ***Aspergillus sp.***
22	โคโลนีมีสปอร์สีดำ, เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกั้น, จัดอยู่ใน *Aspergillus niger* group., แต่ลักษณะของ phialides ยังไม่ชัดเจน จำแนกชนิดได้เป็น ***Aspergillus sp.***
27	โคโลนีมีสปอร์สีดำปนน้ำตาลเข้ม, เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกั้น, จัดอยู่ใน *Aspergillus niger* group. phialides เกิดอยู่บน metula ที่เกิดล้อมรอบ vesicle รูปทรงกลม, สปอร์มีร่องตามแนวยาว จำแนกชนิดได้เป็น ***Aspergillus niger***
30	โคโลนีมีสปอร์สีดำปนน้ำตาลเข้ม, เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกั้น, จัดอยู่ใน *Aspergillus niger* group. , phialides เกิดล้อมรอบ vesicle รูปทรงกลม จำแนกชนิดได้เป็น ***Aspergillus japonicus***

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

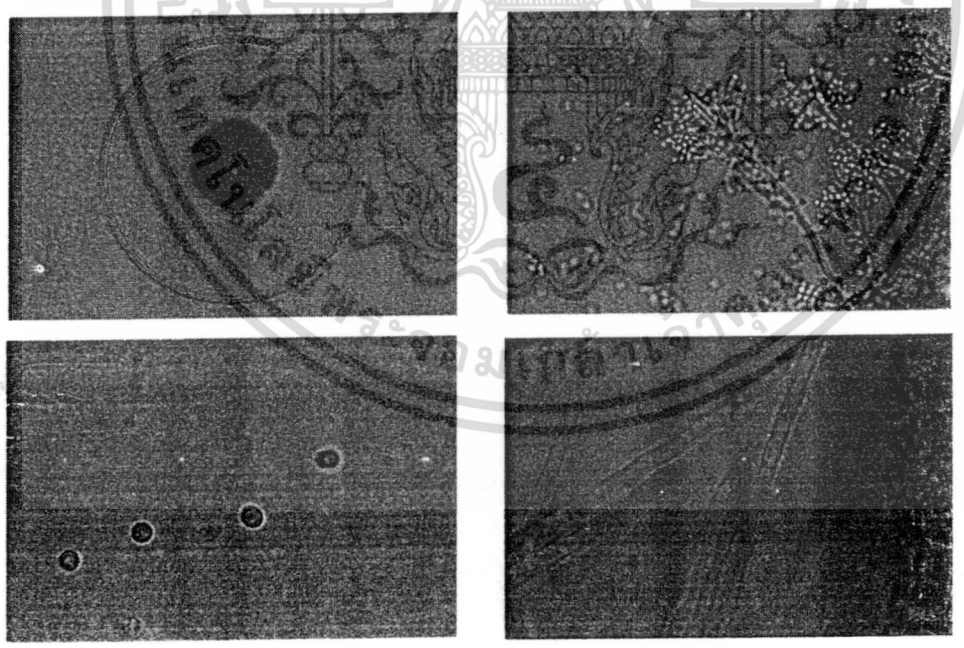


รูปที่ 4.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 13 โคโลนีมีสปอร์สีเขียวอ่อน เส้นใยสีขาวเป็นชนิดมีผนังกั้น ด้านหลังของโคโลนีมีสีครีมและ phialides เกิดอยู่บน metula ที่เกิดล้อมรอบ vesicle รูปทรงกลม จัดอยู่ใน *Aspergillus flavus* group จำแนกชนิดได้เป็น ***Aspergillus flavus***

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

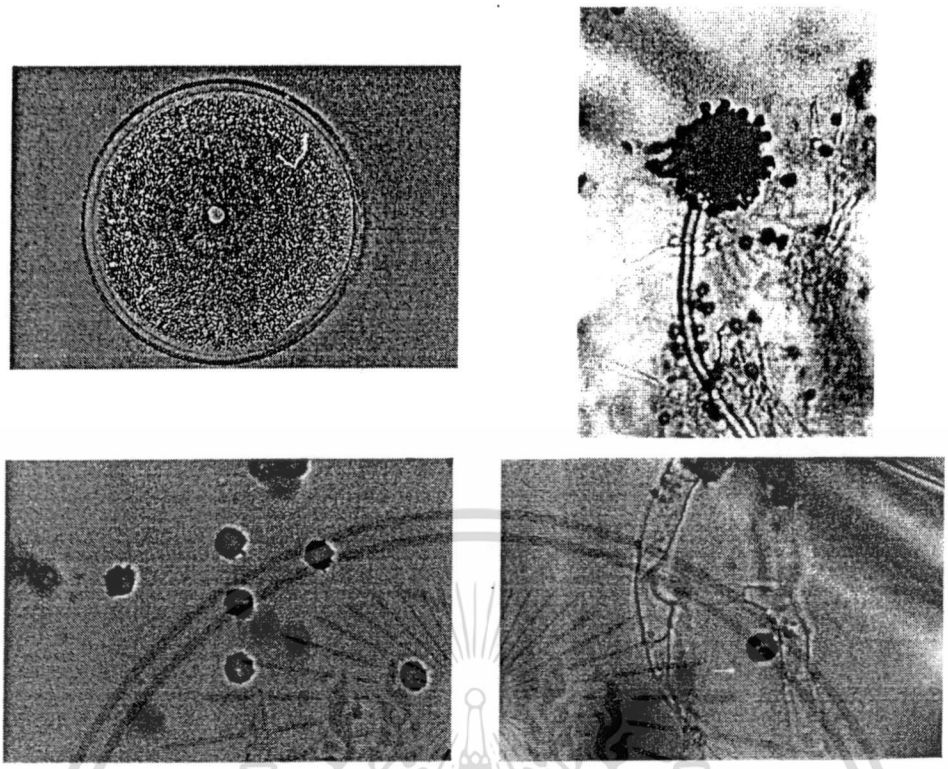


รูปที่ 4.13 **ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 15 โคโลนีมีสปอร์สีเขียวเข้มและมีลักษณะค่อนข้างเป็นผงละเอียด เส้นใยสีขาวเป็นชนิดมีผนังกั้น ด้านหลังของโคโลนีมีสีขาวครีม conidiophores เป็นรูปทรงกระบอกและ phialides เกิดอยู่บน vesicle เฉพาะด้านบนของหัว จัดอยู่ใน *Aspergillus fumigatus* group. จำแนกชนิดได้เป็น *Aspergillus fumigatus***

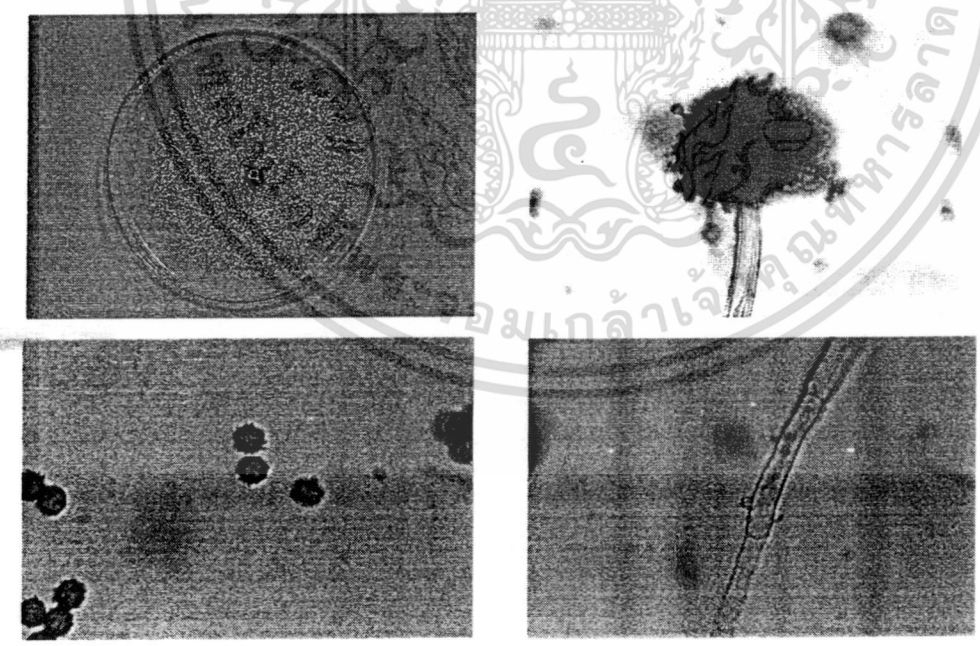


รูปที่ 4.14 **ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 20 โคโลนีมีสปอร์สีเขียวปนเทา เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกั้น ด้านหลังของโคโลนีมีสีขาวครีมและไม่มี vesicle จำแนกชนิดได้เป็น *Penicillium sp.***

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

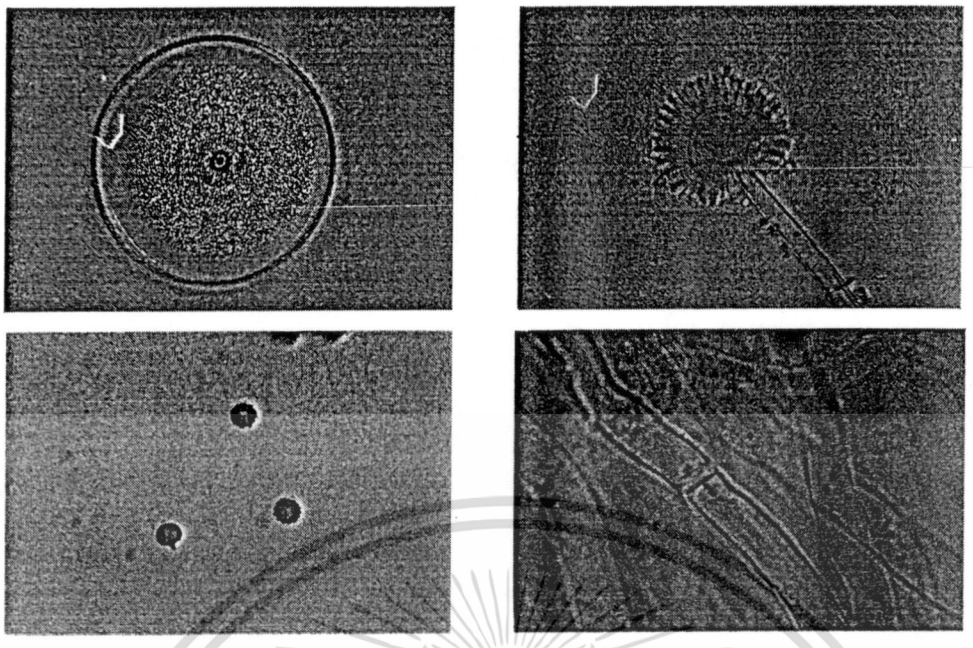


รูปที่ 4.15 **ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 21 โคโลนีมีสปอร์สีดำ เส้นใยมีสีครีมเป็นชนิดมีผนังกั้น ด้านหลังของโคโลนีมีสีขาวครีม จัดอยู่ใน *Aspergillus niger* group. แต่ลักษณะของ phialides ยังไม่ชัดเจน จำแนกชนิดได้เป็น *Aspergillus sp.***

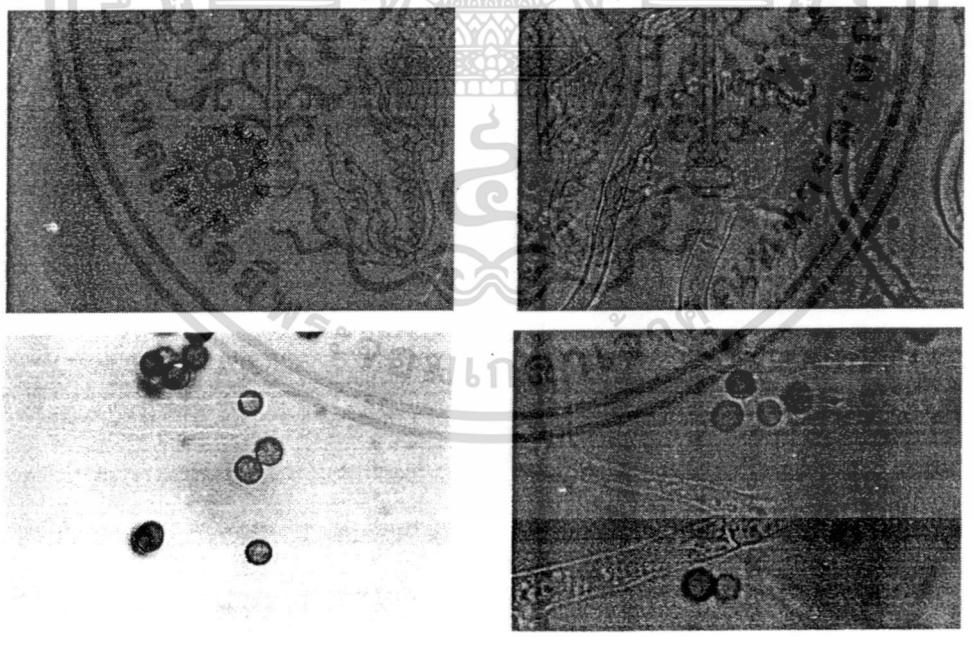


รูปที่ 4.16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 22โคโลนีมีสปอร์สีดำ เส้นใยมีสีขาว เป็นชนิดมีผนังกั้น ด้านหลังของโคโลนีมีสีขาว จัดอยู่ใน *Aspergillus niger* group. แต่ลักษณะของ phialides ยังไม่ชัดเจน จำแนกชนิดได้เป็น ***Aspergillus sp.***

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 โคโลนีมีสปอร์สีดำปนน้ำตาลเข้ม เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกั้นและด้านหลังของโคโลนีมีสีขาวครีม จัดอยู่ใน *Aspergillus niger* group. และ phialides เกิดอยู่บน metula ที่เกิดล้อมรอบ vesicle รูปทรงกลม สปอร์มีร่องตามแนวยาว จำแนกชนิดได้เป็น ***Aspergillus niger***



รูปที่ 4.18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 30 โคโลนีมีสปอร์สีดำปนน้ำตาลเข้ม เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกั้น ด้านหลังของโคโลนีมีสีเหลืองอมน้ำตาล จัดอยู่ใน *Aspergillus niger* group. และ phialides เกิดล้อมรอบ vesicle รูปทรงกลม จำแนกชนิดได้เป็น ***Aspergillus japonicus***

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการแยกและคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากตัวอย่างดินในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้จำนวน 72 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันจำนวน 30 สายพันธุ์ ในเชื้อราจำนวนนี้มีเชื้อราสายพันธุ์ที่ 15 และ 27 สามารถเจริญได้ในสภาวะอุณหภูมิสูง (45 องศาเซลเซียส) และในสภาพความเป็นด่าง (พีเอช 8.0) ตามลำดับ เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อราทั้ง 30 สายพันธุ์ ด้วยการทดสอบความสามารถของเชื้อราต่อการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณเปรียบเทียบกับ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง พบว่าภายใต้สภาวะการเจริญที่ค่าพีเอช 6.0 เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุด โดยให้ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาด ของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารแข็งเท่ากับ 3.57 และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาพอาหารเหลวเท่ากับ 33.82 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ในสภาวะอาหารเหลว คือใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อใน เออเลนเมเยอร์ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวปริมาตร 70 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย โปรตีโอส-เปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.3, 0.25 และ 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ส่วนไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ และเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ภายใต้สภาวะการเจริญที่อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ ด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสนี้ พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว xylan medium สูตรดั้งเดิมประมาณ 7 เท่า โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 236.53 และ 0.22 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะเวลา 5 วัน และวัดค่าพีเอชสุดท้ายของน้ำหมักได้เท่ากับ 3.6 เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *A. foetidus* TISTR 3159 ภายใต้สภาวะการเจริญเดียวกัน พบว่าเชื้อรา สายพันธุ์ที่ 27 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 แต่ให้ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 อย่างมีนัยสำคัญ โดย *A. foetidus* TISTR 3159 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

211.90 และ 0.28 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน และวัดค่าพีเอช สุดท้ายของน้ำหมักได้เท่ากับ 3.4 และสามารถจำแนกชนิดของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ได้เป็น *A. niger*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

พรพิมล อุ้ยจันทร์ภักดี. 2533. "ผลของน้ำตาลในการเหนี่ยวนำและกดดันการสร้างไซแลนเนสของ *Bacillus circulan* B6" วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สมใจ ศิริโภค. 2537. **เทคโนโลยีการหมัก.** กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2542. "การพยากรณ์ผลผลิตการเกษตร." **วารสารการพยากรณ์ผลผลิตการเกษตร.** 14(4) : 1-8.

Alam, M., Gomes, I., Mohiuddin, G. and Hoq, M.M. 1994. "Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses." **Enzyme and Microbial Technology.** 16 : 298-302.

Bailey, M.J. and Poutanen, K. 1989. "Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus.*" **Applied Microbiology and Biotechnology.** 30 : 5-10.

Bailey, M.J., Plus, J. and Poutanen, K. 1991. "Purification and properties of two xylanases from *Aspergillus oryzae.*" **Biotechnology and Applied Biochemistry.** 13 : 380-389.

Bailey, M.J., Biely, P. and Poutanen, K. 1992. "Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity." **Journal of Biotechnology.** 23 : 257-270.

Bailey, M. J. and Viikari, L. 1993. "Production of xylanase by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan based media." **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** 9 : 80-84.

Bajpai, P. 1999. "Application of enzymes in the pulp and paper industry." **Biotechnology progress.** 15 : 147-157.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Balakrishnan, H., Srinivasan, M.C. and Rele, M.V. 1997. "Extracellular protease activities in relation to xylanase secretion in an alkalophilic *Bacillus* sp." **Biotechnology Letter.** 18 : 599-601.

Barber, S. and Benedito de Barder, C. 1974. "Basic and applied research needs for optimizing utilization of rice bran as food and feed." **Proceedings of the rice by-product utilization international conference, Institue of Agrochemistry and Food Technology, Valencia.** 4 : 1-99.

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

Bastawde, K.B., Puntambekar, U.S. and Gokhale D.V. 1994. "Optimization of cellulasfree xylanase production by a novel yeast strain " **Journal of Industrial Microbiology.** 13 : 220-224.

Bataillon, M., Cardinali, A.P.N. and Duchiron, F. 1998. "Production of xylanases from a newly isolated alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp." **Biotechnology Letter.** 20 : 1067-1071.

Beg, O.K., Bhushan, B., Kapoor, M. and Hoondal, G.S. 2000a. "Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3." **Journal of Industry Microbiology and Biotechnology.** 24 : 396-402.

Beg, O.K., Kapoor, M., Mahajan, L. and Hoondal, G.S. 2001. "Microbial xylanases and their industrial applications : a review." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 56 : 326-338.

Beguin, P. 1990. "Molecular biology of cellulose degradation." **Annual Reviews of Microbiology.** 44 : 296-305.

Belancic, A., Scarpa, J., Peirano, A., Diaz, R., Steiner, J. and Eyzayuirre, J. 1995. "*Penicillium purpurogenum* produces several xylanases; purification and properties of two of the enzymes." **Journal ol Biotechnology.** 41 : 71-79.

Biely, P. 1985. "Microbial Xylanolytic System." **Trends in Biotechnology.** 3 : 286-290.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Biely, P. 1991. "Biotechnological potential and production of xylanolytic systems free of cellulases." 408-416. in. Leathem, G.F. and Himmel, M.E. (eds.) **Advances in Chemistry Serology.** Vol. 460. Washington, D.C. : American Chemical Society.

Biely, P., Mislovicova, D. and Toman, R. 1985. "Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4-β-xylanases and endo-1,4-β-glucanases." **Analytical Biochemistry.** 144 : 142-146.

Bisaria, V.S. and Ghose, T.K. 1981. "Biodegradation cellulosic matterials : substrate, microorganism enzyme and product." **Enzyme and microbial Technology.** 3 : 90-104.

Biswas, S.R., Mishra, A.K. and Nanda, G. 1988. "Xylanase and β-xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses." **Biotechnology and Bioengineering.** 31 : 613-616.

Biswas, S.R., Jana, S.C., Mishrs, A.K. and Nanda, G. 1990. "Production, purification, and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*." **Biotechnology and Bioengineering.** 35 : 244-251.

Buchert, J., Tenkanen, M., Kantelinen, A. and Viikari, L. 1994. "Application of xylanase in the pulp and paper industry." **Bioresource Technology.** 50 : 65-72.

Campbell, C.K., Davis, C. and Mackenzie, D.W.R. 1985. "Detection and isolation of pathogenic fungi." 329-343. in. Collins, C.H. and Grange, J.M. **Society for Applied Bacteriology Technical**, No. 21. London : Academic Press.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C. and Gooday, G.W. 2001. **Fungi.** 2nd ed. San Diego, Califoenia : Acadimic Press.

Chahal, D.S. 1985. "Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production." **Applied and Enviromental Microbiology.** 49 : 205-210.

Chandra Raj, K. and Chandra, T.S. 1995. "A cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn 1." **Biotechnology Letter.** 17 : 309-314.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Christakopoulos, P. Kekos, D., Kolisis, F.N. and Marcris, B.J. 1995. "Controlling simultaneous production of endoglucanase and beta-glucosidase by *Fusarium oxysporum* in submerged culture." **Biotechnology Letter.** 17 (8) : 883-888.

Christov, L.P., Myburgh, J., O'Neill, F.H., Tonder, A.V. and Prior, B.A. 1999a. "Modification of carbohydrate composition of sulfite pulp by purified and characterized β-xylanase and β-xylosidase of *Aureobasidium pullulans*." **Biotechnology Progress.** 15 : 196-200.

Clarke, R.T.J., Balley, R.W. and Gaillard, B.D.E. 1969. "Growth of rumen bacteria on plant cell wall polysaccharide." **Journal of General Microbiology.** 56 : 79-86.

Costa-Ferreira, M., Dias, A. , Maximo, C., Morgado, M.J., Sena-Martins, G. and Duarte, J.C. 1994. "Xylanolytic enzyme production by an *Aspergillus niger* isolation." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 44 : 231-242.

Coughlan, P.M. and Hazlewood, P.M. 1993. "β-1,4-D-xylan-degradating enzyme systems: biochemistry, molecular biology and application." **Biotechnology and Applied Biochemistry.** 17 : 259-289.

Daigneault-Sylvestre, N. and Kluepfel, D. 1979. "Method of the rapid screening of cellulolytic streptomycetes and their mutants." **Canadian Journal of Microbiology.** 25 : 858-860.

Dey, D., Hing, J., Shendye, A. and Rao, M. 1992. "Purification and properties of extracellular endoxylanase from alkalophilic *Bacillus* sp." **Canadian Journal of Microbiology.** 38 : 436-442.

Doppelbauer, R., Esterbauer, H., Steiner, W. , Lafferty, R.M. and Steinmuller, H. 1987. "The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei*." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 26 : 485-494.

Dubeau, H., Chahal, D.S. and Ishaque, M. 1987. "Xylanase of *Chaetomium cellulolyticum*: its nature of production and hydrolytic potential." **Biotechnology Letters.** 9 : 275-280.

Fernandez-Espinar, M.T., Ramon, D., Pinaga, F. and Valles, S. 1992. "Xylanase production by *Aspergillus nidulans*." **FEMS Microbiology Letters.** 91 : 91-96.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Forage, A.J. and Righelato, R.C. 1979. "Biomass from carbohydrates." 289-319. in Rose, A.H. (ed.) **Microbial Biomass.** New York : Academic Press.

Gamerith, G., Groicher, R., Zeilinger, S., Herzog, P. and Kubicek, C.P. 1992. "Cellulase-poor xylanases produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on hemicellulose substates." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 38 : 315-322.

Gascoigne, J. and Gascoigne, M.M. 1960. "The xylanase of *Fusarium roseum*." **Journal of General Microbiology.** 22 : 242-248.

Gasper, A., Cosson, T. and Thonart, P. 1997. "Study on the production of a xylanolytic complex from *Penicillium caneseens* 10-10c." **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 67 : 45-58.

Ghosh, M. and Nanda, G. 1994. "Physiological studies on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzyme in *Aspergillus sydowii* MG 49." **FEMS Microbiology Letters.** 117 : 151-156.

Gilbert, M., Breuil, C. and Saddler, J.N. 1992. "Characterization of the enzymes present in the cellulase system of *Thielavia terrestris* 255B." **Bioresource Technology.** 39 : 147-154.

Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W. and Esterbauer, H. 1992. "Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 36 : 701-707.

Gomes, J., Purkarthofer, H., Hayn, M., Kapplmuller, J., Sinner, M. and Steiner, W. 1993. "Production of a high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 39 : 700-707.

Gomes, J., Gomes, I., Kreiner, W., Esterbauer, H., Sinner, M. and Steiner, W. 1993a. "Production of high level of cellulase-free and thermostable xylanase by a wild strain of *Thermomyces lanuginosus* using beechwood xylan." **Journal of Biotechnology.** 30 : 283-297.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gomes, D.J., Gomes, J. and Steiner, W. 1994a. "Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme." **Journal of Biotechnology.** 37 : 11-22.

Gorbacheva, I.V. and Rodionova, N.V. 1977. "Studies on xylan degrading enzymes.I. Purification and characterization of endo-1,4-β-xylanase from *Aspergillus niger* str.14." **Biochemical Biophysical Acta.** 484 : 79-93.

Gubtiz, G.M., Lisching, T., Stebbing, D. and Saddler, J.N. 1997. "Enzymatic removal of hemicellulose from dissolving pulps." **Biotechnology Letter.** 19 : 491-495.

Gutierrez-Correa, M. and Tengerdy, R.P. 1998. "Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugarcane bagasse." **Biotechnology Letter.** 20 : 45-47.

Haapala, R., Linko, S., Parkkinen, E. and Suominen, P. 1994. "Production of endo-1,4-β-glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam." **Biotechnology Techniques.** 8 : 401-406.

Haapala, R., Parkkinen, E., Soominer, P. and Linko, S. 1996. "Production of endo-1,4-β-glucanase and xylanase with nylon-web immobilized and Free *Trichoderma reesei.*" **Enzyme and Microbial Technology.** 18 : 495-501.

Haarhoff, J., Moes, C.J., Cerff, C., Van Wyk, W.J., Gerischer, G. and Janse, B.J.K. 1999. "Characterization and biobleaching effect of hemicellulose produced by thermophilic fungi." **Biotechnology Letters.** 21 : 415-420.

Haltrich, D., Preib, M. and Steiner, W. 1993. "Optimization of a culture medium for increased xylanase production a wild strain of *Schizophyllum commune.*" **Enzyme and Microbial Technology.** 15 : 854-860.

Haltrich, D., Laussamayer, B. and Steiner, W. 1994. "Xylanase formation by *Sclerotium rolfsii* : Effect of growth substrates and development of a culture medium using statistically designed experiments." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 42 : 522-530.

Haltrich, D. and Steiner,W. 1994. "Fomation of xylanase by *Schizophyllum commune*: effect of medium components." **Enzyme and Microbial Technology.** 16 : 229-235.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Haltrich, D., Sebesta, B. and Steiner, W. 1995. "Introduction of xylanase and cellulase in *Schizophyllum commune*." 305-318. in Saddler, J.N. and Penner, M.H. (eds.) **Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates.** Vol. 618. Washington : American Chemical Society.

Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, D.K., Steiner, W. and Zupancie, S. 1996. "Production of fungal xylanases." **Bioresource Technology.** 58 : 137-161.

Hawksworth, D.L. 1991. "The fungal dimension of biodiversity : magnitude, significance, and conservation." **Mycological Research.** 95 : 641-655.

Hoq, M.M., Hempel, C. and Deckwer, W.D. 1994. "Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9 : Effect of agitation and medium components on production." **Journal of Biotechnology.** 37 : 49-58.

Hoq, M.M. and Deckwer, W.D. 1995. "Cellulose-free xylanase by thermophilic fungi : a comparison of xylanase production by two *Thermomyces lanuginosus* strains" **Applied Microbiology and Biotechnology.** 43 : 604-609.

Hrmová, M., Biely, P. and Vršanská, M. 1986. "Specificity of cellulase and β-xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414." **Archives of Microbiology.** 144 : 307-311.

Hrmová, M., Biely, P. and Vršanská, M. 1989. "Cellulose and xylan-degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*." **Enzyme and Microbial technology.** 11 : 610-616.

Ishihara, M., Tawata, S. and Toyama, S. 1997. "Purification and some properties of a thermostable xylanase from thermophilic fungus strain HG-1." **Journal of fermentation and Bioengineering.** 83 : 478-480.

Iwamoto, T., Sasaki, T. and Inaoka, M. 1973. "Hemicellulase : Their occurrence, purification, properties and mode of action." **Advance Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.** 32 : 277-352.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jain, A. 1995. "Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS 68." **Process Biochemistry.** 30 : 705-709.

Joglekar, A.V. and Karanth, N.G. 1984. "Studies on cellulase production by a mutant *Penicillium funiculosm* UV-49." **Biotechnology and Bioengineering.** 26 : 1079-1084.

John, M., Schmidt, B. and Schmidt, J. 1979. "Purification and some properties of five endo-1,4-β-D-xylosidase and a β-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*." **Canadian Journal of Biochemistry.** 57 : 125-135.

Johnson, K.G., Silva, M.C., Mackenzie, C.R., Schnedier, H. and Fontana, J.D. 1989. "Microbial degradation of hemicellulosic materials." **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 20/21 : 245-258.

Kang, S.W., Kim, S.W. and Lee, J.S. 1995. "Production of cellulase and xylanase in a bubble column using immobilized *Aspergillus niger* KKS." **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 53 : 101-106.

Kendrick, B., editor. 1979. **The Whole Fungus.** Vol. 2. Ottawa : National Meseums of Canada and the Kananaskis Foundation.

Khan, A.W., Tremblay, D. and LeDuy, A. 1986. "Assay of xylanase and xylosidase activities in bacterial and fungal cultures." **Enzyme and Microbial technology.** 8 : 373-377.

Khanongnuch, C., Lumyong, S., Ooi, T. and Kinoshita, S. 1999. "A non-cellulase producing strain of *Bacillus subtilis* and its potential use in pulp biobleaching." **Biotechnology Letter.** 21 : 61-63.

Khasin, A., Aichanati, I. and Shoram, Y. 1994. "Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6." **Applied and Enveroment Microbiology.** 59(6) : 1725-1730.

Khowala, S., Mukherjee, M. and Sengupta, S. 1988. "Carboxymethyl xylan-a specific substate directly differentiating backbone-hydrolysing and side-chain-reacting β-D-(1→4)-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

xylanases of the mushroom *Termitomyces clypeatus*." **Enzyme and Microbial technology.** 10 : 563-567.

Kirk, P.M., Cannon, P.E., David, J.C. and Stalpers, J.A. 2001. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 9th** (ed.) CAB Publishing; UK.

Kormelink, F.J.M., Searle-van Leeuween, M.J.F., Wood, T.M. and Voragen, A.G.J. 1993. "Purification and characterization of three endo-(1,4)-β-xylanase and one β-xylosidase from *Aspergillus awamori*." **Journal of Biotechnology.** 27 : 249-265.

Kuhad, R.C., Manchanda, M. and Singh, A. 1998. "Optimization of xylanase production by a hyper-xylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*." **Process Biochemistry.** 33 : 641-647.

Kuhad, R.C. 1999. "Lignocellulose biotechnology : Current and future prospects." **Critical Reviews in Biotechnology.** 13 : 151-172.

Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. 1999. "Molecular and biotechnological aspects of xylanases." **FEMS Microbiology Reviews.** 23 : 411-456.

Kusakabe, L., Yasui, T. and Kobayashi, T. 1966. "Studieson xylanase of system of *Streptomyces*. Part I. Some properties of extracellular xylanase from *Streptomyces*." **Agricultural Biology and chemistry.** 29 : 520-524.

Lee, M.J. 1992. **Biochemical Engineering.** Eaglewood Cliffs : Prentice-Hall.

Lejeune, R. and Baron, G.V. 1995. "Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 43 : 249-258.

Lemos, J.L.S., Fontes Almeida de Carolina, M. and Nei Pereira, Jr. "Xylanase production by *Aspergillus awamori* and the influence of different nitrogen sources." [Online]. Avaible : http://www.ct.ornl.gov/symposium/22nd/index_files/poster06.32.htm. 2003.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lenartovicz, V., Marques de Souza, C.G., Moreira, F.G. and Peralta, R.M. 2003. "Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β-xylosidase by *Aspergillus fumigatus*." **Process Biochemistry.** 38 : 1775-1780.

Lillie. 1948. **Histopathologic technique.** Blakiston, Philadelphia and Toronto.

Lischnig, T., Purkarthofer, H. and Steiner, W. 1993. "Thermostability of endo-β-xylanase from the thermophillic fungus *Thermomyces lanuginosus*." **Biotechnology Letter.** 15 : 411-414.

Liu, W., Zhu, W., Lu, Y., Kong, J. and Ma, G. 1998. "Production, Partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL 409." **Process Biochemistry.** 33 : 331-326.

Liu, W., Lu, Y. and Ma, G. 1999. "Induction and glucose repression of endo-β-xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL 409." **Process Biochemistry.** 34 : 67-72.

Lonsane, B.K., Saucedo-Castanedo, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzaliz, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M. and Krishnaiah, M.M. 1992. "Scale up strategies for solid state fermentation system." **Process Biochemistry.** 27 : 259-273.

Maheshwari, R. and Kamalam, P.T. 1985. "Isolation and culture of a thermophilic fungus, *Melanocarpus albomyces*, and factors influencing the production and activity of xylanase." **Journal of General Microbiology.** 131 : 3017-3027.

Mandels, M. and Weber, J. 1969. "The production of cellulase" 391-398. in Gould, R.E. (ed.) **Advances in Chemistry Serology.** Washington, D.C. : American Chemistry Society.

McCarthy, A.J. 1987. "Lignocellulose-degradation actinomyces." **FEMS Microbiology Reviews.** 46 : 145-163.

McCleary. 1992. "Measurement of endo-1,4-β-D-xylanase." **Progress in Biotechnology.** 7 : 161-169.

Milagres, A.M.F. and Duran, N. 1992. "Xylanolytic enzymes from *Penicillium janthinellum* and its applications in bleaching of pulp." **Progress in Biotechnology.** 7 : 539-545.

เอกสารนี้ [illegible] ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Miller, G.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." **Analytical Chemistry.** 31 : 426-428.

Montenecourt, B.S. and Eveleigh, D.E. 1977. "Preparation of mutants of Trichoderma reesei with enhanced cellulase production." **Applied and Enviromental Microbiology.** 134 : 777-782.

Nakanishi, K., Yasui, T. and Kobayashi, T. 1976. "A preliminary experiment on the xylanase production by *Streptomyces* sp." **Journal of Fermentation and Technology.** 65(1) : 1-6.

Nummi, M., Perrin, J.M., Niku-Paavola, M.L. and Enari, T. M. 1985. "Measurement of xylanase activity with insoluble xylan substrate." **Biochemistry Journal.** 226 : 617-620.

Ohno, N., Fujiwara, K., Shinoyama, H. and Fujii, T. 1944. "Xylanase produced by a Peculiar imperfect fungus, *Fusidium* sp. BX-1." **Enzyme and Microbial technology.** 72(1) : 13-19.

Okai, N., Fukasaku, M., Kaneko, J., Tomita, T., Muramotu, K. and Kamio, Y. 1998. "Molecular properties and activity of a carboxyl-terminal truncated form of xylanase 3 from *Aeromonas caviae* W-61." **Bioscience Biotechnology and Biochemistry.** 62 : 1560-1567.

Okeke, B.C. and Obi, S. K. C. 1993. "Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an *Arthrographis* species." **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** 9 : 345-349.

Paice, M.G., Jurask, L., Carpenter, M.R. and Smillie, L.H. 1978. "Production, characterization and partial amino acid sequence of xylanase A. from *Schizophyllum commune.*" **Applied and Enviromental Microbiology.** 36 : 802-808.

Panda, T. 1989. "Simulation of shake flask conditions in a bioreactor for the biosynthesis of cellulase and xylanase by a mixed culture of *Trichoderma reesei* D 1-6 and *Aspergillus wentii* Pt 2804." **Process Biochemistry.** 104-108.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Paunescu, E., Ciolac-Negocseu, A. and Pisica, G. 1964 "The effect of Tween 80 and penicillin on the physiochemical properties of the cell wall in mycobacteria " **Populare Romine Studii Cercetari Biochim.** 7 : 83-89.

Pinaga, F., Fernandez-Espinar, M.T., Valles, S. and Ramon, D. 1994. "Xylanase production in *Aspergillus nidulans*: induction and carbon catabolite repression." **FEMS Microbiology Letters.** 115 : 319-324.

Pitt, J. 1980. **The Genus Penicillium.** New York : Academic Press.

Pou-Llinas, J. and Driguez, H. 1987. "D-Xylòse as inducer of the xylan-degrading enzyme system in the yeast *Pullularia pullulans*" **Applied Microbiology and Biotechnology.** 27 : 134-138.

Puchart, V., Katapodis, P., Biely, P., Kremnicky, L., Christakopoulos, P., Vrsanska, M., Kekos, D., Macris, B.J. and Bhat, M.K. 1999. "Production of xylanase, mannanase, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*." **Enzyme and Microbial technology.** 24 : 355-361.

Purkarthofer, H., Sinner, M. and Steiner, W. 1993a. "Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* : Optimization of production in submerged and solid-state culture." **Enzyme and Microbial Technology.** 15 : 677-682.

Purkarthofer, H., Sinner, M. and Steiner, W. 1993b. "Effect of shear rate and culture pH on the production of xylanase by *Thermomyces lanuginosus*." **Biotechnology Letters.** 15 : 405-410.

Purkarthofer, H. and Steiner, W. 1995. "Induction of endo-β-xylanase in the fungus *Thermomyces lanuginosus*." **Enzyme and Microbial Technology.** 17 : 114-118.

Ragauskas, A.J., Poll, K.N. and Cesternino, A. 1994. "Effect of xylanase pretreatment procedures on non-chlorine bleaching." **Enzyme and Microbial Technology.** 16 : 492-495.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Raimbault, M. and Alazard, D. 1980. "Culture method to study fungal growth in solid fermentation." **European Journal of Applied Microbiology.** 9 : 199-209.

Raj, K.C. and Chandra, T.S. 1996. "Purification of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fisheri* Fxn 1." **FEMS Microbiology Letters.** 15 : 457-461.

Raper, K.B. and Thom, C. 1949. **A. manual of the Penicillia.** Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.

Raper, K.B. and Fennell, D.I. 1965. **The Genus Aspergillus.** Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.

Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L. and Lertwerawat, Y. 1998. "Cellulosome structure of thermophilic cellulolytic and alkaliphilic xylanolytic microorganism." **Final report : NRCT-JSPS large-scale cooperative research program in the field of biotechnology, Submitted to National Research Council of Thailand.** 33-40.

Reese, E.T. and Maguire, A. 1969. "Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms." **Applied Microbiology.** 17(2) : 242-245.

Robyt, J.F. and Whelan, W.F. 1972. "Reducing values methods for maltodextrins I. Chain-length independence of alkaline 3,5-dinitro-salicylate and chain length independence of alkaline copper." **Analytical Biochemistry.** 45 : 510-516.

Rotto, M., Poutanen, K. and Viikari, L. 1992. "Production of xylanolytic enzymes by an alkalitolerant *Bacillus circulans* strain." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 37 : 470-473.

Royer, J.C. and Nakas, J.P. 1989. "Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum.*" **Enzyme and Microbial Technology.** 11 : 405-410.

Royer, J.C. and Nakas, J.P. 1990. "Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum.*" **Applied and Enviromental Microbiology.** 56 : 2535-2539.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sachslehner, A., Nidetzky, B., Kulbe, K.D. and Haltrich, D. 1998. "Induction of mannanase, xylanase and endoglucanase activities in *Sclerotium rolfsii*" **Applied and Enviromental Microbiology.** 64 : 594-600.

Saraswat, V. and Bisaria, V.S. 1997. "Biosynthesis of xylanolytic and xylan-debranching enzymes in *Melanocarpus albomyces* IIS 68." **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 83 : 352-357.

Sengupta, S., Khowala, S. and Goswami, P.K. 1987. "Assay of endo-β-D-xylanase activity with a soluble *O*-(carboxymethyl) derivative of larch-wood D-xylan." **Carbohydrate Research.** 14 : 341-353.

Senior, D.J., Mayers, P.R. and Saddler, J.N. 1989a. "Production and purification of xylanases" 641-654. in Lewis, N.G. and Paice, M.G. (eds.) **Biogenesis and Biodegradation of Plant Cell Wall Polymers.** ACS Symp. Series, Vol. 399. Washington : American Chemical Society.

Senior, D.J., Mayers, P.R. and Saddler, J.N. 1989b. "Xylanase production *by Trichoderma harzianum* E58." **Appiled Microbiology and Biotechnology.** 32 : 137-142.

Senior, D.J., Hamilton, J. and Bernier, R.L. Jr. 1992. "Use of *Streptomyces lividans* xylanase for biobleaching of kraft pulps." 555-557. In Visser, J., Beldman, G., vanSomeren, M.A.K. and Voragen, A.G.J. (eds.) **Xylans and xylanases.** Amsterdam : Elsevier.

Siendenberg, D., Gerlach, S.R., Weigel, B., Schugerl, K., Giuseppin, M.L.F. and Honik, J. 1997. "Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in stirred tank and airlift tower loop reactors : The influence of stirrer speed and phostphate concentration." **Journal of Biotechnology.** 56 : 103-114.

Singh, A., Kuhad, R.C. and Kumar, M. 1995. "Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*." **Enzyme and Microbial Technology.** 17 : 551-553.

Singh, S., Pillay, B. and Prior, B.A. 2000. "Thermal stability of β-xylanase produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains." **Enzyme and Microbial Technology.** 26 : 502-508.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singh, S., Pillay, B., Dilsook, V. and Prior, B.A. 2000. "Production and properties of hemicellulases by *Thermomyces lanuginosus* strains." **Journal of Applied Microbiology.** 88 : 975-982.

Singh, S., Reddy, P., Haarhoff, J., Biely, P., Janse, B., Pillay B., Pillay, D. and Prior, B.A. 2000. "Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase." **Journal of Biotechnology.** 81 : 119-128.

Sjostrom, F. 1981. **Wood Chemistry (fundamentals and application).** New York : Academic Press.

Smith, D.C. and Wood, T.M. 1991b. "Xylanase production by *Aspergillus awamori.* Development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and β-xylosidase while maintaining low protease production." **Biotechnology and Bioengineering.** 38 : 883-890.

Stewrt, W.D.P. 1980. "Transport and utilization of nitrogen source by algae." 585-586. in Payne, J.W. (ed.) **Microorganisms and Nitrogen Source.** Great Britain : Page Bros Ltd.

Strobel, G.A. 1963. "A. xylanase system produced by *Diplodia viticola.*" **Phytopathlogy.** 53 : 592-596.

Sunna, A. and Antranikian, G. 1997. "Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria." **Critical Reviews in Biotechnology.** 17 : 39-67.

Suumakki, A., Tenkanen, M., Buchert, J. and Viikari, L. 1997. "Hemicelluloses in the bleaching of chemical pulps." **Advances Biochemical engineering and Biotechnology.** 57 : 261-287.

Takahashi, J., Abekawa, G. and Yamada, K. 1960. "Effect of non-ionic surface active agents on mycelial form and amylase production of *A. niger.*" **Nippon Nozei Kogaku Korishi.** 34 : 1043-1045.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tang, L.U.L., Yu, E.K.C., Louis-Seize, G.W. and Saddler, J.W. 1987. "Inexpensive, rapid procedure for bulk purification of cellulase-free beta, 1-4, D-xylanase for high specific activity." **Biotechnology and Bioengineering.** 30 : 96-106.

Toh, Suan EE. 1978. **Xylanase produced by xylan utilizing microorganisms.** International Post-Graduate University Course in Microbiology. Osaka University.

Tolan, J.S. 1996. "Pulp and paper" 327-338. in Godfrey, T. and West, S. (eds.) **Industrial Enzymology.** London : Macmillan Press

Tolan, S.J., Olson, D. and Dines, E.R. 1996. "Survey of mill usage of xylanase" 25-35. in Thomas, W.J. and ViiKari, L. (eds.) **Enzyme for pulp and paper processing.** Washington : American Chemical Society..

Trigo, C. and Ball, A.S. 1994. "Production of extracellular enzyme during the solubilisation of xylan lignocellulose materials." **Appiled Microbiology and Biotechnology.** 41 : 124-129.

Tsujibo, H., Sakamoto, T., Nishino, N., Hasegawa, T. and Inamori, Y. 1990. "Purification and properties of three types of xylanase produced by an alkalophilic actinomycete." **Journal of Applied Bacteriology.** 69 : 398-405.

Tsujibo, H., Ohtsuki, T., Ito, T., Yamasaki, I., Miyamoto, K., Sugiyama, M. and Inamori, Y. 1997. "Cloning and sequence analysis of gene encoding xylanase and acetyl xylan esterase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520." **Applied and Enviromental Microbiology.** 63 : 615-620.

Tuncer, M., Ball, A.S., Rub, A. and Wilson, M.T. 1999. "Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD 25." **Enzyme and Microbial Technology.** 25 : 38-47.

Viilkari, L., Tenkanen, M., Buchert, J., Ratto, M., Bailey, M., Siika-aho, M. and Linko, M. 1993. "Hemicellulase for industrial appication" 113-182. in Saddler, J.N. and Wallingford, C.A.B. (eds.) **Bioconversion of forest and agricultural plant residues.** New York : International public.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vodopich and Moore. 2002. **Biology Laboratory Manual.** 5th ed. Boston, Massachusetts : McGraw-Hill Companies, Inc.

Webster, J. 1980. **Introduction to Fungi.** Cambridge : University Press.

Whistler, R.L. and Richards, E.L. 1970. "Hemicellulose" 447-469. in Pigman, W. and Horton, D. (eds.) **The carbohydrates.** New York : Academic Press.

Whistler, R.L. and Masak, E. 1995. "Enzymatic hydrolysys of xylan." **Journal of Animal and Chemistry Society.** 77 : 1241-1243.

Wiacek-Zychlinska, A., Czakaj, J., Jedrychowska, B. and Sawicka-Zukowska, R. 1992. "Production of xylanases by *Chaetomium globosum*" **Progress in Biotechnology.** 7 : 493-496.

Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. 1988. "Multiplicity of β-1,4-xylanase in microorganism : functions and applications." **Microbiology Reviews.** 52 : 305-517.

Xiong, H., Weymarn, Nv., Leisola, M. and Turunen, O. 2003. "Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30." **Process Biochemistry.** 1-6.

Xu, J., Nogawa, M., Okada, H. and Morikawa, Y. 1998. "Xylanase induction by L-sorbose in a fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7." **Bioscience Biotechnology and Biochemistry.** 62 : 1555-1559.

Yu, E.K.C., Tan, L.U.L., Chan, M.K.H., Deschatelets, L. and Saddler, J.N. 1987. "Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*." **Enzyme and Microbial Technology.** 9 : 16-24.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. อาหารสูตร Potato dextrose agar (PDA)

ประกอบด้วย

potato dextrose agar *39* *กรัม*

น้ำกลั่น **1000.0 มิลลิลิตร**

วิธีการเตรียม

ละลาย potato dextrose agar ในน้ำกลั่น แล้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตร Czapek medium

ประกอบด้วย

โซเดียมไนเตรต	3.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.5	กรัม
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.01	กรัม
ยีสต์สกัด	5.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนประกอบตามลำดับ ในน้ำกลั่นแล้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารสูตรสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส

ส่วนประกอบอาหารส่วนที่ 1

ประกอบด้วย

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.0	กรัม
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$)	1.4	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	0.3	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.3	กรัม
ยูเรีย (urea)	0.3	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรติโอสเปปโตน (proteose peptone)	0.23	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบอาหารส่วนที่ 2

ประกอบด้วย

เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$)	5.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	1.4	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.7H_2O$)	4.56	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

นำส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 1 ละลายน้ำตามลำดับรวมกัน ยกเว้นไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต จะต้องเตรียมแยกออกมาเนื่องจากจะทำให้ตกตะกอน แล้วนำส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 2 ละลายน้ำตามลำดับรวมกัน หลังจากนั้นนำส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 2 ร้อยละ 0.1 เติมลงไปในส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 1 ปรับค่า พีเอชเป็น 6.0 จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 1 และเติมผงวุ้นร้อยละ 18 ถึง 20 ต้มวุ้นให้ละลาย และเติมแมกนีเซียมซัลเฟตที่ละลายไว้ตามสัดส่วน คนให้เข้ากันแล้วบรรจุลงขวดอาหารนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนของไดแอมโมเนียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟตที่แยกไว้ไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.25 ไมครอน ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่ออาหารเย็นลงนำไปผสมกับไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ผ่านการกรองจุลินทรีย์แล้วตามสัดส่วน ส่วนอาหารเหลวทำการเตรียมเช่นเดียวกัน แต่ไม่เติมวุ้น

4. การเตรียมซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ตามวิธีของ Lillie (1948)

<u>เตรียม stock solution</u> :

(A) : สารละลายของกรดซิตริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

(B) : สารละลายของโซเดียมซิเตรต ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$) 0.05 โมลาร์

วิธีการ

เติมสารละลายของกรดซิตริกความเข้มข้น 0.05 โมลลาร์ ปริมาณ 230 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายของโซเดียมซิเตรต 0.05 โมลาร์ ปริมาณ 270 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสตามวิธีของ Tang *et. al.* (1987)

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย (ร้อยละ)

1. dinitrosalicylic (DNS) acid	1.0
2. phenol	0.2
3. sodium potassium tartrate	20.0
4. sodiumsulphite (Na_2SO_3)	0.05
5. sodiumhydroxide	1.0

<u>วิธีการเตรียม DNS reagent</u>

ละลาย sodiumhydroxide ในน้ำกลั่นตามปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเติม sodium potassium tartrate , phenol และ dinitrosalicylic (DNS) acid ลงในสารละลาย sodiumhydroxide จากนั้นทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในขวดสีชาเก็บไว้ในที่มืด ก่อนใช้ให้เติม sodiumsulphite 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ DNS reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายไซแลนเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมล พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
2. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร แล้วต้มในน้ำเดือด 5 นาที
3. ทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำก๊อก
4. เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานไซโลส

(ชุดควบคุม : นำเอนไซม์ไปต้มเดือด 5 นาที แล้วทำการเติมสารละลายไซแลน แต่ไม่บ่ม โดยเติม DNS reagent ลงไปทันที นำไปต้มแล้วทำตามวิธีการข้างต้น)

<u>การคำนวณค่ากิจกรรมไซลาเนส</u>

$$\text{ยูนิตต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไซโลส X 1000 X จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลไซโลส X ระยะเวลาบ่ม X ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

(กรัมต่อโมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

1.1 การเตรียมกราฟมาตราฐานของไซโลสในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

<u>วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส</u>

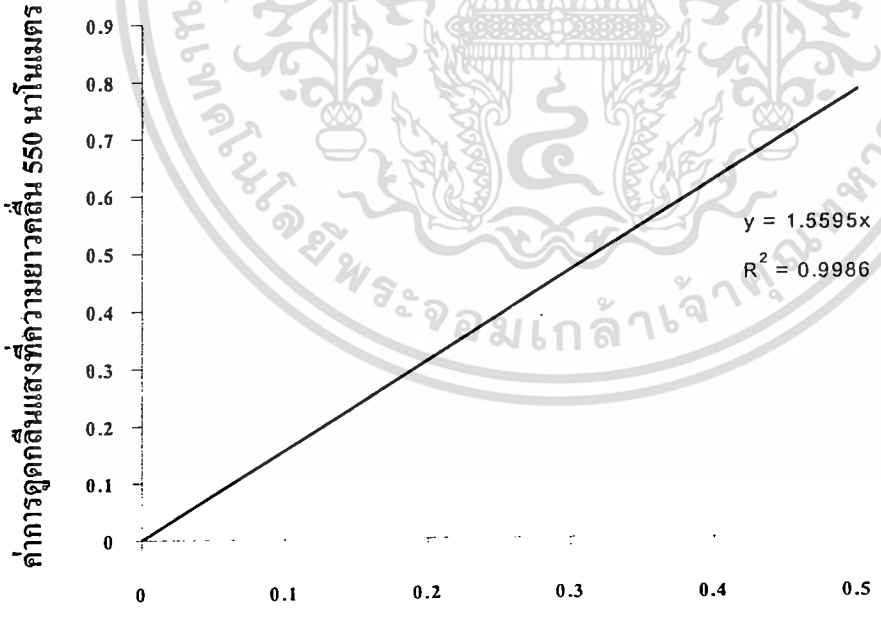
1. เตรียม stock solution ของไซโลสให้มีความเข้มข้น 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ปีเปตสารละลายจากข้อ 1 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร (blank ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทน)

3. เติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร

4. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบทำให้เย็นด้วยน้ำก๊อก

5. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของไซโลส



รูปที่ ข.1 กราฟมาตราฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mandels *et. al.* (1969)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส (Carboxymethylcellulose; CMC) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในซิเตรเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมล พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ข้อ 1)

<u>การคำนวณค่ากิจกรรมเซลลูเลส</u>

$$\text{ยูนิตต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของกลูโคส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

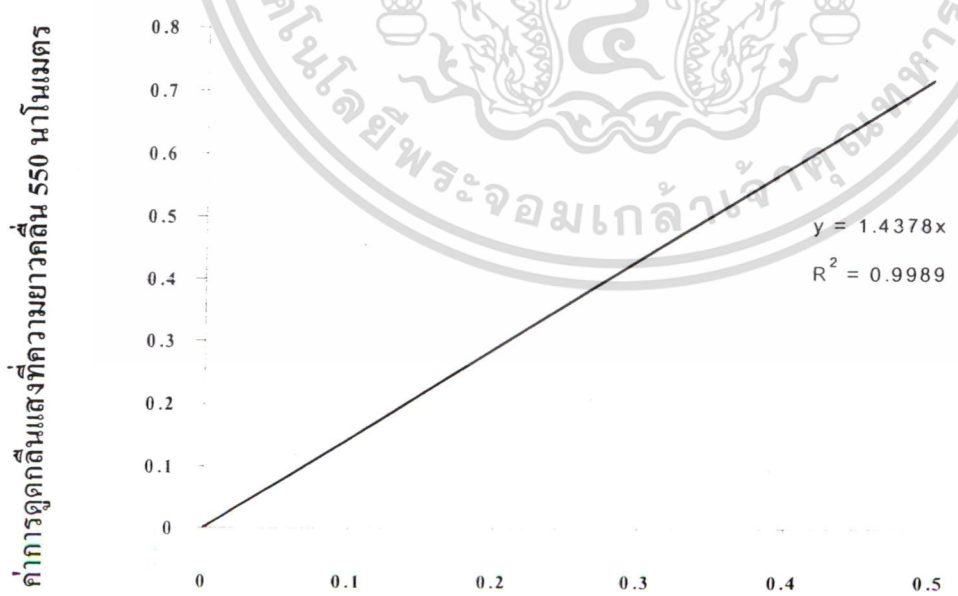
(กรัมต่อโมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

2.1 การเตรียมกราฟมาตราฐานของกลูโคสในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคส

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส (ข้อ 1.1) แต่ใช้สารละลายกลูโคสแทนสารละลายไซโลส นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกลูโคส



รูปที่ ข.2 กราฟมาตราฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้