สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การแยกและการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราในสภาพธรรมชาติ เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

นางสาวมาริสา บินอุสมัน
นายยุทธกร นาคศรี
นายรอง พิริยะพิทยา

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2540

วพ.
ม 476 ก
2540
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 30622
วัน, เดือน, ปี 28 ก.ค. 2541

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolation and Selection of The Fungi in the Natural for Producing Xylanase Enzyme

Miss Marisa Bin-usman

Mr. Yutthakorn Narksri

Mr. Rong Piriyapittaya

A Special Project Submitted in Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การแยกและการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราในสภาพธรรมชาติเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

โดย นางสาวมาริสา บินอุสมัน

นายยุทธกร นาคศรี

นายรอง พิริยะพิทยา

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อารี ฤทธิบูรณ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

_____ หัวหน้าภาควิชา

(ผศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ

(อาจารย์อารี ฤทธิบูรณ์)

_____ กรรมการ

(ผศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต)

_____ กรรมการ

(อาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การแยกและการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราในสภาพธรรมชาติเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส
โดย	นางสาวมาริสา บินอุสมัน
	นายยุทธกร นาคศรี
	นายรอง พิริยะพิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อารี ฤทธิบูรณ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2540

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อจากสภาพธรรมชาติ โดยนำมาเลี้ยงและคัดเลือกจุลินทรีย์ในสูตรอาหาร xylan medium และ rice husk medium ซึ่งมีการใช้ไซแลนและฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน และทำการตรวจสอบกิจกรรมของเชื้อราที่มีต่อสารอาหารและทำการคัดเลือกเชื้อโดยการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase activity) ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณด้วยการวัด clear zone และวัดค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ที่ 550 นาโนเมตร แล้วเทียบกับกราฟมาตรฐานของไซโลส จากการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพพบว่า เชื้อที่ 6 มีขนาดของ clear zone ใหญ่ที่สุดในอาหาร xylan medium คือ 4.1 ซม. จากการหยดเชื้อปริมาณ 5 ไมโครลิตร และ 4.4 ซม. จากการหยดเชื้อปริมาณ 10 ไมโครลิตร และพบว่าเชื้อที่ 15 มีขนาดของ clear zone ใหญ่ที่สุดในอาหาร ricew husk medium คือ 2.6 ซม. จากการหยดเชื้อปริมาณ 5 ไมโครลิตร และ 3.2 ซม. จากการหยดเชื้อปริมาณ 10 ไมโครลิตร และจากการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณพบว่าเชื้อที่ 15 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดในอาหาร xylan medium คือ 89.33 ยูนิต/มิลลิลิตร และเชื้อที่ 6 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดในอาหาร rice husk medium คือ 62.83 ยูนิต/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Isolation and Selection of the Fungi in the Natural for Producing Xylanase Enzyme
Name	Miss Marisa Bin-usman
	Mr. Yutthakorn Narksri
	Mr. Rong Piriyapittaya
Special Project Adviser	Mrs. Aree Rittiboon
Department	Applied Biology
Academic Year	1997

Abstract

This research was performed by isolating fungi in nature follwing by cultivating them on xylan and rice husk media. So that they use xylan and rice husk from media like carbon sources. Enzyme activity was then tested and selected by studying the xylanase activity in both their quality and quantity. The quality activity was tested by checking clear zone and the quantity activity was tested by OD test at 550 nm, by compairing with standard curve of xylose. From this experiment, it was found that fungi number 6 had the highest values of clear zone for xylan medium (4.1 cm in 5 µl of suspension and 4.4 cm in 10 µl of suspension). For rice husk medium, it was found that fungi number 15 had the highest values of clear zone (2.6 cm in 5 µl of suspension and 3.2 cm in 10 µl of suspension). And it was found that enzyme activity of strain number 15 had the highest activity in xylan medium (89.33 unit/ml) and strain number 6 had the highest activity in rice husk medium (62.83 unit/ml).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณอาจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษนี้ที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานภาษาที่ใช้ และขอขอบพระคุณผศ.ดร.พรรณี ฐิตาพิชิต และอาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล กรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำในโครงงานพิเศษนี้อย่างดียิ่งเสมอมา ทำให้รายงานฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้สำหรับการทดลอง สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้

นางสาวมาริสา บินอุสมัน
นายยุทธกร นาคศรี
นายรอง พิริยะพิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	1
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
2.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูเลส	3
2.2 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ และคุณสมบัติของเอนไซม์	5
2.3 การแปรสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	11
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา	13
2.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนส	24
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องหรือคล้ายคลึง	27
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	28
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ	28
3.2 วิธีการทดลองและวิเคราะห์	28
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	32
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	38
ข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	45
ภาคผนวก ก อาหารสูตรต่าง ๆ ในการเลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์	46
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายไซแลน	5
ตารางที่ 2	สมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	9
ตารางที่ 3	การแปรสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมโดยกรรมวิธีต่าง ๆ	11
ตารางที่ 4	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ Aureobasidium sp.	15
ตารางที่ 5	ผลของกลูโคสและฟรุคโตสในการชักนำให้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากไซโลสของ Aureobasidium pullulan	15
ตารางที่ 6	เชื้อราที่ผลิตไซลาเนสเมื่อเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ	17
ตารางที่ 7	พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เพื่อสร้างไซลาเนส	20
ตารางที่ 8	สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เพื่อสร้างไซลาเนส	23
ตารางที่ 9	ค่ากิจกรรมไซลาเนสของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร XYLAN MEDIUM และ RICE HUSK MEDIUM	32
ตารางที่ 10	ขนาดของโคโลนีและขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อที่ทำการคัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบน XYLAN MEDIUM	33
ตารางที่ 11	ขนาดของโคโลนีและขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อที่ทำการคัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบน RICE HUSK MEDIUM	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	เปรียบเทียบขนาดของโคโลนี และขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อที่ทำการคัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อใน XYLAN MEDIUM	35
รูปที่ 2	เปรียบเทียบขนาดของโคโลนี และขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อที่ทำการคัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อใน RICE HUSK MEDIUM	36
รูปที่ 3	แสดงค่ากิจกรรมของไซลาเนสของเชื้อที่ทำการคัดเลือก เมื่อทำการเลี้ยงใน XYLAN MEDIUM และ RICE HUSK MEDIUM	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เชื้อราเป็นเชื้อที่มีศักยภาพมากที่สุดในการย่อยสลายสารลิกโนเซลลูโลส (Beguin , 1990) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของพืชในสภาพธรรมชาติ และเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ใช้แล้วไม่หมดไป (Reversible Natural Resources) แหล่งใหญ่มาก (McCarthy ,1987 ; Gomes , et al. , 1989) แต่ยังมีเชื้อราน้อยชนิดที่สามารถย่อยสลายสารเหล่านี้ และให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอนไซม์ไซลาเนสที่เป็นไปได้ในทางเศรษฐกิจ (Bisaria and Ghose , 1981) ถ้าการผลิตเอนไซม์จากสารเหล่านี้เป็นไปได้ก็จะเป็นการนำแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกมาใช้แทนแหล่งคาร์บอนเดิมที่ใช้กันอยู่แต่มีราคาแพงมาก เป็นการลดต้นทุนได้อย่างมากเนื่องจากแหล่งคาร์บอนคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนของการผลิตเอนไซม์ทั้งหมด (Chahal , 1985) เนื่องจากสาเหตุเหล่านี้ จึงทำการศึกษาการแยก และการคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสารลิกโนเซลลูโลสและสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้เพื่อนำมาผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในทางเศรษฐกิจได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.ศึกษาการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราในสภาพธรรมชาติที่สามารถย่อยสารประกอบพวกลิกโนเซลลูโลสในวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

2. ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์ของเชื้อราที่คัดเลือก

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เก็บตัวอย่างเชื้อราในสภาพธรรมชาติ ทำการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารประกอบลิกโนเซลลูโลสจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรและสามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 <u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

1. สามารถแยกและคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราในสภาพธรรมชาติที่สามารถย่อยสารประกอบลิกโนเซลลูโลสในวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

2. ทราบถึงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราที่ได้จากการแยกและคัดเลือกจากสภาพธรรมชาติ

3. เพื่อเป็นแนวทางในการทำวิจัยขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส

2.1.1 เอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีน มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรต : โปรตีนเท่ากับ 1:1 ละลายน้ำได้ ไม่ต้องการโคแฟคเตอร์หรือโลหะอื่นในการเข้าทำปฏิกิริยา เป็นเอนไซม์เชิงซ้อนประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ส่วน ซึ่ง Enari (1983) รายงานไว้ดังนี้

1. Endogluconase (1,4-beta-D-glucanohydrolase ; EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อย beta-1,4-glucosidic linkage แบบสุ่มได้กลูโคส เซลโลไบโอส เซลโลไตรโอส ไม่ย่อยเซลโลไบโอสแต่ย่อยเซลโลเดรกซ์ตริน (CMC) และไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (HEC) และสามารถย่อยเซลลูโลสรูปผลึก (Crystalline cellulose) ได้ด้วย ความจำเพาะของเอนไซม์ไม่สูงมากนัก วิเคราะห์เอนไซม์นี้ได้โดยใช้ CMC และ HEC เป็นสับสเตรท

2. Cellobiohydrolase (1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase ; EC 3.2.1.9) ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้าน non-reducing end ของเส้นสายได้เซลโลไบโอส การวิเคราะห์เอนไซม์นี้ใช้สำลี อวิเซลและ Amorphous cellulose เป็นสับสเตรท

3. Beta-galactosidase (beta-D-glucohydrolase ; EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอส และเซลโล-โอลิโกแซคคาไรด์ (Cellooligosaccharide) ได้กลูโคสแต่ไม่ย่อยเซลลูโลสหรือเซลโลเดรกซ์ตริน วิเคราะห์เอนไซม์นี้โดยใช้เซลโลไบโอส-พี-ไนโตรฟีนิล-เบต้า-ดี-กลูโคไซด์ (Cellobiose-p-nitrophenyl-beta-D-glucoside) หรือซาลิซิน (Salicin) เป็นสับสเตรท

Toussaunt และ Bataille (1985) รายงานว่าเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์ที่ทำกิจกรรม 3 อย่าง คือ Cellobiohydrolase (CBH) CX activity ซึ่งมี endo-beta-1,4 -glucanase และ exo-beta-1,4-glucan glucohydrolase เพื่อที่จะย่อยเซลลูโลสรูปผลึกได้เซลโลไบโอส จากนั้น beta-glucosidase เปลี่ยนเซลโลไบโอสได้กลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 <u>เอนไซม์เฮมิเซลลูเลส</u>

เป็นเอนไซม์ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสเป็นกิ่งก้านสาขาและประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสที่มีหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่เป็นพวกดี-ไซลาเนส ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Rogalski , et al. ,1985) คือ

1. endo-1,4-beta-D-xylanase (1,4-beta-D-Xylan xylanohydrolase ; EC 3.2.1.8) ทำการย่อยสลายพันธะ 1,4-glucosidic ของ beta-D-xylopyranoside ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของไซแลน และให้ผลิตภัณฑ์ออกมาในรูปของไซโล-โอลิโกแซ็คคาไรด์และไซโลไบโอส วิเคราะห์เอนไซม์นี้ด้วยไซแลน

2. Exo-1,4-beta-D-xylosidase (1,4-beta-D-xylan xylohydrolase ; EC 3.2.1.37) ย่อยสลายเซลโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์และไซโลไบโอส ออกมาได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส การทดสอบเอนไซม์นี้ใช้พี-ไนโตรฟีนิล-เบต้า-ดี-กลูโคไซด์เป็นสับสเตรท

นอกจากเอนไซม์กลุ่มหลัก 2 กลุ่มใหญ่ ๆ แล้ว เพื่อให้การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสสมบูรณ์ยิ่งขึ้นจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์อีกหลายชนิดได้แก่

3. D-galactanase เอนไซม์กลุ่มนี้ย่อย ดี-กาแลคแตน และแอล-อะราบีโน-ดี-กาแลคแตน

4. D-mannanase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย (1⟶4) beta-D-mannanopyranosyl linkage ของดี-แมนแนน ดี-กลูโค-ดี-แมนแนน และดี-กาแลคโต-ดี-แมนแนน

5. Acetyl esterase ในโครงสร้างหลักของเฮมิเซลลูโลสตรงตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 และ 3 ของสายพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลส จะมีกลุ่มของ Acetyl เกาะอยู่ ในการย่อย Acetyl ออกจากสายพอลิเมอร์ของไซโลสจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ Esterase เข้าช่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ และคุณสมบัติของเอนไซม์

2.2.1 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาพบว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme) (Gascoigne , 1960 ; Strobel , 1963 ; Kusakabe , et al. , 1966 ; Paice , et al. , 1978) แต่ก็มีบางชนิดที่เป็นเอนไซม์ที่ผลิตและอยู่ในเซลล์ (Intracellular enzyme) อาทิเช่น Aspergillus niger (Iwamoto , et al. , 1973) Aspergillus foetidus (Whister and Masak , 1955) Butyrivibrio fibrisovens (Clarke , et al. , 1975)

การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเริ่มผลิตในระยะที่มีการเจริญคงที่ (Stationary growth phase) ตัวอย่างเช่น Pseudomonas stuzeri (Toh , 1978) Streptomyces sp. (Nakanishi , et al. , 1976) Aspergillus niger (John , et al. , 1979) ยกเว้น Penicillium variabile ซึ่ง Matinez และคณะ (1974) รายงานว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเกิดไปพร้อม ๆ กับการเจริญ

ไซลาเนสพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ แอคติโนมัยสีท โปรโตซัว พืช แมลงและสัตว์ทะเลบางชนิด เอนไซม์ในกลุ่มนี้ที่นิยมศึกษามักมาจากจุลินทรีย์ เนื่องจากเจริญได้รวดเร็ว เพาะเลี้ยงได้ง่าย จุลินทรีย์บางสายพันธุ์จะสร้างและปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ แต่บางสายพันธุ์จะสร้างและเก็บไว้ภายในเซลล์ ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori	Tenkanen, et al., 1993.
Aspergillus awamori AANTG 19	Smith and Wood, 1991a.
Aspergillus foetidus	Biely and Poutanen, 1989.
Aspergillus fumigatus	Lindner, et al., 1994.
Aspergillus fumigatus Fresenius	Kitpreechavanich, et al., 1992
Aspergillus niger	John, et al., 1979.
Aspergillus niger NCIM 1207	Gokhale, et al., 1986.
Aspergillus niger 15	Rodionova, et al., 1983.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus ochraceus	Biswas, et al., 1987.
Aspergillus oryzae	Tenkanen, et al., 1993.
Aspergillus terreus	Biely and Poutanen, 1989.
Aureobasidium pullulans	Tenkanen, et al., 1993.
Bacillus circulan	Ratto, et al., 1992.
Bacillus stearothermophilus	Nanmori, et al., 1990.
Bacillus subtilis	Lindner, et al., 1994.
Bacteroides xylanoticus	Schyns and Stams, 1992.
Butyrivibrio fibrisolvens	Utt, et al., 1991.
Cellulomonas uda	Rapp and Wagner, 1986.
Chaetomium trilaterale	Uziie, et al., 1985.
Clostridium acetobutyricum ATTCC 824	Lee and Forsberg, 1987.
Clostridium stercorarium	Wolfgang, et al., 1990.
Cryptococcus albidus	Biely, et al., 1980.
Dictyoglomus sp.	Ratto, et al., 1994.
Emericella nidulans	Matsuo and Yasui, 1984b.
Fibrobacter succinogenes	Smith and Forsberg, 1991
Humicola lanuginosa	Kitpreechavanich, et al., 1984.
Neocallimastix frontalis	Hebraud and Fevre, 1990.
Neurospora crassa	Deshpande, et al., 1985.
Penicillium funiculosum	Misha, et al., 1985
Penicillium wortmanni	Win, et al., 1987.
Penicillium wortmanni IFO 7237	Matsuo, et al., 1987.
Phanerochaete chrysosporium	Copa-Patino, et al., 1993.
Pullularia pullulans	Pou-Llinas and Driguez, 1987.
Rhodobacter marinus	Dahlberg, et al., 1993.
Sclerotinia sclerotiorum	Riou, et al., 1991.
Shizophyllum commune	Tenkanen, et al., 1993.
Streptomyces lividans 1326	Kluepfel, et al., 1986
Streptomyces olivochromogenes	Tenkanen, et al., 1993.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp.	Nakanishi, et al., 1987.
Streptomyces sp. EC 1	Godden, et al., 1989.
Talaromyces byssochlamydoides	Yoshioka, et al., 1981.
Thermoanaerobacter ethanolicus	Shao and Wiegel, 1992.
Thermoanaerobacterium saccharolyticum	Lee, et al., 1993.
Thermoascus aurantiacus	Gomes, et al., 1994.
Thermomonospora fusca	McCarthy and Bachmann, 1992.
Thermomonospora strain LL	Ristroph and Humphreyt, 1985.
Thermomyces lanuginosa	Gomes, et al., 1993a.
Trichoderma lignorum	Defaye, et al., 1985.
Trichoderma reesei	Tenkanen, et al., 1993.
Trichoderma viride	Matsuo and Yasui, 1984a.

2.2.2. คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

โดยทั่วไปเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 50 องศาเซลเซียส แต่สำหรับพีเอชที่เหมาะสม พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสจากแบคทีเรียและแอคติโนมัยซิสมีพีเอชที่เหมาะสมค่อนข้างเป็นกลาง แต่ของเชื้อราค่อนข้างจะเป็นกรด ส่วนความคงตัวต่อพีเอช และความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์จะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์

1. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อเอนไซม์

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสค่อนข้างแปรผันโดยขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนมากจะสร้างไซลาเนสที่ทำงานได้ดีในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส ดังตัวอย่างต่อไปนี้คือ

ไซลาเนสจาก Thermospora fusca BD 25 (Trio and Ball, 1994) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 60 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงมากกว่า 70 องศาเซลเซียส ไซลาเนสจาก Thermospora สายพันธุ์ 29 (Srivastava, 1993) สร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้ที่อุณหภูมิมากกว่า 80 องศาเซลเซียส แต่เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ที่ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 วัน พบว่าแอคติวิตีจะลดลง 50% นอกจากนี้ไซลาเนสจากรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fusiadium สายพันธุ์ BX 1 (Ohno, et al., 1994) สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 0-50 องศาเซลเซียส

2. ผลของความเป็นกรดด่างต่อเอนไซม์

เอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็นกลางถึงด่าง เช่น Bacillus stearothermophilus (Khasin, et al., 1993) ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 9.0 ขึ้นไป

เอนไซม์ไซลาเนสจาก Trichoderma reesei (Dekker, 1983) มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างตั้งแต่ 2.0-10.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 สมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิที่แอคติวิตีเกิดอย่างสมบูรณ์	เอกสารอ้างอิง
Aureobasidium pullulans Y 2311	4.8	4.5	54	70°ซ,30นาที	Li, et al., 1993
Aureobasidium pullulans	4.0	5.0	45	80	Myburgh, et al., 1991
Bacillus subtilis	6.0	3.5-9.0	45	-	John, et al., 1979
Bacillus stearothermophilus	9.0	7.0	65	65°ซ,มากกว่า 6 ชม.	Khasin, et al., 1993
Bacillus stearothermophilus	6.0	5.0-11.0	60	80°ซ, 1 ชม.	Nanmori, et al., 1990
Ceratocystis paradoxa.	5.1	5.0-10.0	80	100	Dekker and Richards, 1976
Chainia sp.	6.0	5.0-7.0	60	-	Bastawde, et al., 1991
Dictyoglomur sp.	6.0-7.0	9.0	90	-	Ratto, et al., 1994
Fusidium sp. BX1	5.5	4.0-9.0	60	-	Ohno, et al., 1994

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิที่แอคติวิตีเกิดอย่างสมบูรณ์	เอกสารอ้างอิง
Phanerochate crysosporium	5.0	4.0-9.0	50	-	Copa-Patino, et al., 1993
Rhodothermus marinus	7.1	-	65	มากกว่า 80°ซ ,24ชม.	Dahlberg, et al., 1993
Streptomyces sp. S 510	6.0	4.0-11.0	60	-	Rhyum, et al., 1993
Streptomyces HM 15	5.0-7.0	5.7	50-60	60°ซ,มากกว่า 5 ชม.	Patel and Ray, 1994
Streptomyces sp.	5.5	-	60	-	Okeke and Paterson, 1992
*Streptomyces sp.*E-86	5.5-6.2	4.5-10.5	55-60	70	Kusakabe, et al., 1977
Streptomyces sp. KT23	5.5	4.0-10.0	55	-	Nagajima, et al.,1984
Streptomyces sp. No.3137	5.0-6.0	4.0-8.0	50-60	-	Nakanishi, et al., 1976
Streptomyces xylophagus	6.2	5.3-7.3	55-60	70	Kawaminami and Lizuka, 1969
Thermomonospora fusca BD 25	7.0-8.0	มากกว่า 9	60	-	Trigo and Ball, 1994
Thermophacus aurantiscus	5.0	3.0-9.0	80	-	Gomes, et al., 1994
Trichoderma reesei	5.5-6.0	3.0-7.0	-	90	Shamala and Sreekantish, 1986

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การแปรสภาพ (Pretreatment) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ในการปรับปรุงคุณค่าทางอาหารของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีหลายวิธีที่จะนำมาปรับปรุงเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร ปริมาณการกิน และการย่อยได้สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง แบ่งออกเป็นวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ (Ibrahim , 1981) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 การแปรสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมโดยกรรมวิธีต่าง ๆ

วิธีทางกายภาพ	วิธีทางเคมี	วิธีทางชีวภาพ
การแช่น้ำ	โซเดียมไฮดรอกไซด์	การใช้เอนไซม์
การสับ,การบด	แคลเซียมไฮดรอกไซด์	การหมักด้วยเชื้อรา
การอัดเม็ด	โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์	(white-rot fungi)
การนึ่ง,การต้ม	แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	
การใช้รังสีแกมมา	ยูเรีย/แอมโมเนีย	
	โซเดียมคาร์บอเนต	
	แกสคลอรีน	
	ซัลเฟอร์ไดออกไซด์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการแปรสภาพต่าง ๆ ได้แก่ การบดเป็นการทำให้อนุภาคของลิกโนเซลลูโลสมีขนาดเล็กลงเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวและลดปริมาณเซลลูโลสรูปผลึก (Jones , et al. , 1980) วิธีทางเคมีโดยใช้ด่างหรือตัวทำละลาย (Viikari , et al. , 1994) สกัดหรือแยกเฮมิเซลลูโลส หรือการใช้ไอน้ำ อุณหภูมิ 120-180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถึง 2 ชั่วโมง ซึ่งการแปรสภาพด้วยวิธีการให้ความร้อนนี้จะทำให้ไซแลนและไซโลสออกจากวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสละลายในน้ำเพิ่มขึ้น 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ภายใต้ไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและใช้เวลานานจะทำให้ไซโลสเปลี่ยนเป็น Furfural ส่วนไซแลนจะสามารถนำไปใช้เป็นสับสเตรททางเคมี ชีวเคมี หรือกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากกระบวนการหมัก เช่น การใช้กระบวนการที่ใช้ความร้อนในสภาวะที่มีน้ำ (Hydrothermolysis) จะได้ของเหลวเรียกว่า ไฮโดรไลเสท (Hydrolysate) ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส รวมทั้งส่วนของลิกนินที่ละลายได้ เช่น Conifer alcohol , Syringa aldehyde , 4-hydroxybenzoic acid , Vanillin , Furfural เป็นต้น ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมากน้อยแค่ไหนขึ้นกับชนิดของพวกลิกโนเซลลูโลส ส่วนของแข็งที่เหลือจะมีเพียงเซลลูโลสและลิกนินซึ่งสามารถย่อยด้วยเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา

2.4.1. แหล่งคาร์บอน

มีการผลิตเซลลูเลสโดยใช้เซลลูโลสในธรรมชาติ เช่น ฟางข้าวสาลี (Doppelbauer , et al. , 1987) การชานอ้อย (Kawamori , et al. , 1986) เศษกระดาษหนังสือพิมพ์ (Shu Chen and Wayman , 1991) และน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อโรงงานน้ำมันปาล์ม (เบญจวรรณ ชิตมณี , 2534)

วิเชียร กิจปรีชาวนิช และคณะ (2535) พบว่าฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ Aspergillus fumigatus Freanius รหัส 4-45-1F และให้ผลดีกว่าการใช้ชานอ้อย ซังข้าวโพดและรำข้าวสาลี

น้อย เกษมสุขสกุล (2529) พบว่าฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก Aspergillus fumigatus (Freanius) เมื่อเปรียบเทียบกับผักตบชวา เปลือกมันสำปะหลัง แกลบ และขี้เลื่อย

Karni และคณะ (1993) ศึกษาการผลิตเบตาไซลาเนส จากเชื้อ Aurebasidium pullulans ซึ่งเจริญในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของกลูโคส ฟรุกโตส หรือ ไซโลส พบว่ากิจกรรมสูงสุดของเบตาไซลาเนสผลิตเมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่4) และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (ตารางที่5)

Okazaki และคณะ (1984) ได้ศึกษาการสร้างไซลาเนสโดย Bacillus spp. 4 สายพันธุ์ คือ W1, W2, W3 และ W4 โดยเลี้ยง Bacillus spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนหลายชนิด คือ ไซแลน ไซโลส และรำข้าวสาลี พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถสร้างไซลาเนสสูงสุดในช่วง 34.00-111.80 หน่วยต่อมล. เมื่อมีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับ W1 และ W2 จะ ผลิตไซแลนลดลงมากเหลือเพียง 1.50-3.00 หน่วยต่อมล. (เมื่อใช้ไซโลสและกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน) แต่ W3 และ W4 สามารถใช้ไซโลสในการชักนำการสร้างเอนไซม์ได้ดีพอๆ กับการใช้ไซแลน

Sewell และคณะ (1988) ศึกษาการสร้างไซลาเนสโดย Butyrivibrio fibrisolvens พบว่า จุลินทรีย์จะสร้างและปลดปล่อยไซลาเนสออกมานอกเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แต่เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้ไซแลนปรากฏว่าไม่พบการสร้างไซลาเนสเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ได้มีผู้ทำการศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการชักนำการสร้างไซลาเนส

Godden และคณะ (1989) ทำการแยก Streptomyces sp. จากดินที่มีการทับถมของพวกวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Ball milled straw เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถชักนำการสร้างเอนไซม์ บีตาไซลาเนส

Linder และคณะ (1989) พบว่ายีนที่เป็นรหัสของการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยสลายไซแลนใน Bacillus subtilis เป็นส่วนเดียวกับส่วนของ carbon repression regulation กลูโคสจึงมีผลกับการสร้างเอนไซม์

Streptomyces cyaneus สามารถใช้ ball-milled straw ในการชักนำการสร้างไซลาเนสได้มากกว่าไซแลนถึง 2 ท่า (Wang ,et al., 1993)

Wase และคณะ (1985) เลี้ยง Aspergillus fumigatus IMI 255091 แบบอาหารเหลวในฟลาส์กโดยใช้ฟางข้าวบดความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 4.0 และ 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ ฟางข้าวบด 4.0เปอร์เซนต์ให้กิจกรรมของ เบตา-ดี กลูโคซิเดส, endo-1,4-beta-D-glucanase และ D-xylanase สูงสุดในวันที่6 หรือ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 5.88 , 3.24 และ 67.65 ยูนิต / มิลลิลิตร ตามลำดับ

Chahal (1985) เลี้ยงเชื้อ Trichodema reesie QMY1 ในอาหารเหลวโดยใช้ความเข้มข้นของฟางข้าวสาลีต่างกัน คือ 1.0 เปอร์เซนต์ (เซลลูโลส 0.4%) และ 5% (เซลลูโลส 2.0 %) พบว่ากิจกรรมของเซลลูโลสสูงสุดในฟางข้าวสาลี 1.0 %เท่ากับ 1.65 ยูนิต/มิลลิลิตร ได้ผลผลิตของเซลลูเลสเท่ากับ 412 ยูนิต / กรัมเซลลูโลส และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟางข้าวสาลีเป็น 5.0 % เวลาการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 7 เป็น 11 วัน กิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเป็น 6.0 ยูนิต / มิลลิลิตร แต่ผลผลิตของเซลลูเลสลดลงเป็น 300 ยูนิต/กรัม เซลลูโลส ซึ่งการลดลงของของผลผลิต อาจจะเนื่องจากการถ่ายเทมวลสารเกิดขึ้นน้อยในสารละลายที่เข้มข้นมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ Aureobasidium pullulans

แหล่งคาร์บอนเสริม (ความเข้มข้น 1%(w/v))	จำนวนเซลล์ (จำนวนเซลล์x10^7/ml)	กิจกรรมของเบตาไซลาเนส	
		(ยูนิต/มิลลิลิตร)	(ยูนิต/10^7cell)
ไม่มี	2	Nil	Nil
กลูโคส	26	2.2	0.08
ฟรุกโตส	17	0.6	0.04
แลคโตส	3	0.6	0.2
มอลโตส	3	Nil	Nil
ไซแลน	10	31	3.1
ไซโลส	11	39	3.6

ตารางที่ 5 ผลของกลูโคสและ / หรือฟรุคโตสในการชักนำให้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากไซโลสของ Aureobasidium pullulans.

สับสเตรทที่ใช้ในการเจริญ (ความเข้มข้น 1%(w/v))	จำนวนเซลล์ (จำนวนเซลล์×10^7 /มิลลิลิตร)	กิจกรรมของเบต้า-ไซลาเนส	
		(ยูนิต/มิลลิลิตร)	(ยูนิต/10^7เซลล์)
ไซโลส	11	40	3.6
กลูโคส	24	0.3	0.01
ฟรุคโตส	12	0.7	0.06
ไซโลส+กลูโคส	25	8.2	0.3
ไซโลส+ฟรุคโตส	27	13.3	0.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Konishita และคณะ (1983) พบว่าอัตราส่วนฟางข้าวต่อรำข้าว เท่ากับ 4:6 ขี้เลื่อยต่อรำข้าว เท่ากับ 1:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ Aspergillus sp.

Storbel (1963) ศึกษาและรายงานว่า Diplodia viticola จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสก็ต่อเมื่อมีไซแลน เซลลูโลส ไซโลส หรืออะราบิโนสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่จะไม่ผลิตเมื่อมีกลูโคสหรือเซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน

Shewale และ Sadana (1978) พบว่าการเติมกลูโคส 0.01-0.02 เปอร์เซนต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยในการเจริญของเชื้อในช่วงต้นแต่การผลิตเอนไซม์จะไม่เพิ่มขึ้น

Chead และ Ooi (1984) พบว่าการใช้กลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อรา cf-27 พบว่าจะยับยั้งการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ขณะเดียวกันก็มีผู้รายงานว่า พบเชื้อราหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้เมื่อเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน ดังที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 6 เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	เอกสารอ้างอิง
Chrysosporium lignorum	Cellulose	Eriksson & Rzidowski. 1969
Diplodia viticola	L-arabinose	Strobel , 1963
	D-xylose	
	Cellulose	
Stereum sanguinolenrum	Cellulose	Bucht & Eriksson , 1968
Tricoderma viride	Sophorose	Nisizawa , 1971

2.4.2. แหล่งไนโตรเจน

Okeke และ Obi (1993) ทำการทดลองผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส และไซแลนโดยเชื้อ Arthrographis sp. สายพันธุ์ F4 พบว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส

Coutts และ Smith (1976) เลี้ยงเชื้อ Sporotrichum thermophile โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ $NH_4H_2PO_4$ $NaNO_3$ NH_4NO_3 และยูเรีย พบว่า $NaNO_3$ และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และ $NaNO_3$ ความเข้มข้น 0.05-0.4 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสไม่แตกต่างกัน

Raimbult และ Alazard (1980) หมัก Aspergillus niger ในแป้งมันสำปะหลังโดยใช้ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ายูเรียใน 40-50 %ของไนโตรเจนทั้งหมดจะกระตุ้นการเจริญของเชื้อราซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างโปรตีน การใช้คาร์โบไฮเดรตมีมากขึ้นเมื่ออัตราส่วนของยูเรียเพิ่มขึ้น และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้มีผลต่อpH คือการใช้เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เมื่อเชื้อราเจริญจะเกิดกรดอย่างรวดเร็ว ทำให้การเจริญหยุดชะงัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
30622

Stewart และ Parry (1981) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย Aspergillus fumigatus IMI 246651 คือ NH_4NO_3 ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร และรองลงมาคือ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร

Joglekar และ Karanth (1984) เลี้ยง Aspergillus funiculosum UV-49 ในอาหารเหลวพบว่ายูเรียและ $NaNO_3$ (ไนโตรเจน 0.5 กรัมต่อลิตร) ดีกว่า $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4NO_3 และดีกว่าเคซีนและเปลือกถั่วลิสง หากเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนมากกว่า 0.5 กรัม/ลิตร พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ไนโตรเจนอนินทรีย์ ส่วนการใช้ไนโตรเจนอินทรีย์กิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 1-1.2 กรัม/ลิตร อย่างไรก็ตามการเพิ่มไนโตรเจนเป็นการเพิ่มต้นทุนและไนโตรเจนมากกว่า 2 กรัม/ลิตรจะเพิ่มปัญหา คือทำให้ค่าพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูงซึ่งไม่เหมาะในการผลิตเอนไซม์

Gomes และคณะ (1989) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ Gliocoadium virens พบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ดีที่สุดคือ Bactopeptone เข้มข้นร้อยละ 0.2 อาจจะเนื่องมาจากมีองค์ประกอบของ กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตเซลลูเลสของเชื้อ และถ้าความเข้มข้นมากกว่า 0.4 เปอร์เซ็นต์จะยับยั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์

เบญจวรรณ ชิตมณี (2534) พบว่าการใช้ NH_4NO_3 เข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับโปรติโอสเปปโตนเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการใช้ NH_4NO_3 เพียงอย่างเดียวในการเลี้ยงเชื้อ Cladosporium sp.

2.4.3. เกลือแร่

Desrochers และคณะ (1981) ทดสอบผลของความเข้มข้นของ KH_2PO_4 0.13 0.20 และ 0.27 เปอร์เซ็นต์ ต่อการผลิตเบต้า-กลูโคซิเดส ของเชื้อ Schizophyllum commune พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือร้อยละ 0.20

Gomes และคณะ (1989) พบว่าความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ที่เพิ่มการผลิตเซลลูเลสของเชื้อ Gliocoadium virens คือร้อยละ 1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4. พีเอช

พีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การหมักในระยะแรก พีเอชของการเลี้ยงเชื้อเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชเปลี่ยนแปลง อาจเกิดการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่น ๆ ออกมา หรือมีการย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์ขึ้น เป็นผลให้พีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพีเอชอย่างช้า ๆ บัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา

Mandel และ Weder (1969) และ Neuboerffer และ Smith (1970) รายงานว่าค่าพีเอชที่เป็นด่างและเป็นกลางไม่เป็นที่ต้องการสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา เพราะการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีปริมาณสูงภายใต้สภาวะที่เป็นกรด และพีเอชที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 8

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเป็นกรดด่างแตกต่างกันคือ จุลินทรีย์พวกรามักจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ เช่น Aspergillus AANTG 19 และ Thermoascus aurantiacus เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0 (Smith and Wood, 1991 b ; Gomes et al., 1994) แอคติโนมัยสีทจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเป็นกลาง เช่น Streptomyces T 7 เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 (Ross, et al., 1993) Thermomonospora fusca สามารถผลิตไซลาเนสได้ดีเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 9.0 (Bachmann and McCarthy, 1989) แบคทีเรียอื่น ๆ จะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นค่อนข้างสูง เช่น Bacillus cirulan สามารถเจริญและผลิตเบต้าไซโลซิเดสได้ดีเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 8.0-8.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	พีเอชที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus fumigatus IMI 246651	6.0	Stewart & Parry 1981
Aspergillus terreus	5.0	D-sousa, et al., 1982
Aspergillus fumigatus IMI 255091	5.0	Wase, et al., 1985
Penicillium funiculosum UV-49	4.5	Joklekar & Karanth 1984
Trichoderma reesei	5.8	Chahal 1985
Tricoderma reesei D1-6 และ *Aspergillus wentii* Pt 2804	4.8	Panda 1989

2.4.5. อุณหภูมิ

ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทลงสู่อาหารทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่งที่จุลินทรีย์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ ดังนั้นในกระบวนการหมักต่างๆ จึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ Aspergillus. niger ในการหมักอาหารแข็งที่มีมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทอยู่ระหว่าง 35-40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงจะยับยั้งการงอกของสปอร์ แต่ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญของไมซีเลียม (Raimbault and Alazard , 1980)

อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างไซลาเนสส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส เช่น Cellulomonas uda สามารถเจริญและผลิตไซลาเนสได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Rapp and Wangner, 1986) แต่ก็มีจุลินทรีย์บางกลุ่ม เช่น รา แอคติโนมัยสีท หรือแบคทีเรีย ที่สามารถเจริญในที่อุณหภูมิสูง และสามารถสร้างไซลาเนสได้ จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส เช่น Dictyoglomus sp. B1 และ Rhodothermus marinus สามารถเจริญและผลิตไซลาเนสได้ดีที่อุณหภูมิ 68 และ 65 องศาเซลเซียสตามลำดับ (Dahlberg, et al., 1993 ; Ethier, et al., 1993 ; Faulds and Williamson, 1994 and Ratto, et al., 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stewart และ Parry (1981) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต Exo- และ Endoglucanase ของเชื้อ A. fumigatus IMI 246651 คือ 35-45 องศาเซลเซียส และจากการเลี้ยงเชื้อ A. niger JB 1984 พบว่าอุณหภูมิสูงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 48 ชั่วโมงแรก จากนั้นจะลดลง และอัตราการสร้างโปรตีนสูงขึ้น ระหว่าง 48 ชั่วโมงแรกของการหมักเช่นกัน นั่นคือการสร้างโปรตีนมากจะทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งเกิดจากเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ (Essifie , et al. , 1986)

Gomes และคณะ (1992) รายงานถึงระดับความเหมาะสมของอุณหภูมิต่อการผลิต Fpase , Xylanase และ beta-glucosidase สูงสุดที่อุณหภูมิ 32 , 34 และ 31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

2.4.6. การให้อากาศ

การเจริญของจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนวัตถุดิบหรือสารอาหารใด ๆ ไปเป็นผลิตภัณฑ์อาจเกิดขึ้นได้ในสภาพที่มีอากาศหรือไร้อากาศ ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการหมักและชนิดของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสเป็นกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศ วิธีที่จะทำให้จุลินทรีย์ได้รับอากาศเพียงพอ ทำได้โดยการให้อากาศระหว่างการหมัก ซึ่งต้องควบคุมให้พอเหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์จะมากน้อยเพียงใดขึ้นกับชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ จำนวนรอบของการเขย่าหรือการกวนและปริมาตรของสารอาหารต่อปริมาตรของถังหมัก

2.4.7. ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (inoculum size)

Battaglino และคณะ (1991) ศึกษาขนาดของเชื้อเริ่มต้น (10^4 , 10^6 และ 10^8 สปอร์ / กรัมสับสเตรต) ต่อการเจริญของเชื้อ Aspergillus. oryzae ในอาหารแข็ง (แกลบ:รำข้าว = 7:3) พบว่าการเพิ่มขนาดของเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^6 สปอร์ต่อกรัมซับสเตรท ทำให้ผลผลิตของเอนไซม์โปรทิเอสเพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับ Ofuya และ Ukpong (1989) ที่รายงานว่าความเข้มข้นของอะไมเลส เซลลูเลส และอะไมโลกลูโคซิเดสเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 4 เท่า เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นจาก 7×10^4 เป็น 3.5×10^5 เซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.8. ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างไซลาเนสนั้น พบว่าจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียจะใช้เวลาในการเจริญและสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดที่เวลาประมาณ 2-3 วัน เช่น *Streptomyces roseiscleroticus* และ *Bacillus sp.* สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดที่เวลา 2 วัน (Okazaki, et al., 1984 ; Jeffries, et al., 1991) แต่จุลินทรีย์จำพวกราต้องใช้เวลาในการเจริญและสร้างเอนไซม์สูงสุดที่เวลาประมาณ 4-10 วัน เช่น *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดที่เวลา 4 วัน (John, et al., 1979 ; Ghosh and Kinda, 1980 ; Copa-Patino, et al., 1993 ; Gomes, et al., 1994)

Joglekar และคณะ (1984) เลี้ยง Penicillium funiculsum ในถังหมัก พบว่าการเจริญจะเกิดขึ้นรวดเร็วในถังหมักและมีผลให้เกิดมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นหนาแน่นภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งความหนืดของน้ำเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นตามเวลาและมีค่าสูงสุดที่ 72-96 ชั่วโมง จากนั้นลดลง การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มเร็วมากในช่วงเวลา 24-72 ชั่วโมง โดยจะให้ค่า exo-beta-D-glucanase endo-beta-D-glucose และ beta-glucosidase ภายใน 72 ชั่วโมง เป็น 3 , 26 และ 9 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ

Gomes และคณะ (1989) เลี้ยง Gliocodium virens ในฟลาส์กเพื่อการผลิตเซลลูเลสและไซลาเนสในฟางข้าวสาลีที่ผ่านการแปรสภาพด้วยไอน้ำ พบว่าเริ่มมีการสังเคราะห์เอนไซม์ภายใน 24 ชั่วโมงของการบ่ม การเปลี่ยนแปลงพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังการบ่ม 1 วัน และลดลงในวันที่ 2 และ 3 ไมซีเลียมจะเกิดการสลายตัวเอง (Autolysis) ปลดปล่อยเอนไซม์ลงสู่อาหาร พีเอชเพิ่มขึ้น ระยะเวลาการปรับตัว (lag phase) ของเชื้อลดลง การใช้แอมโมเนียและการลดลงของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (ลิกโนเซลลูโลสกับไมซีเลียม) ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมักและลดลงช้ามากหรือหยุดในช่วงที่มีการเจริญคงที่ และการใช้ลิกโนเซลลูโลสก็ช้าด้วย ซึ่งอาจเนื่องมาจากการมีน้ำตาลอิสระ ทำให้เกิดการยับยั้งหรือเนื่องมาจากการขาดสารอาหารในการเลี้ยงเป็นผลให้การเจริญของเชื้อราช้าและลดการใช้เซลลูโลส จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมได้ค่า Fpase beta-glucosidase และ Xylanase 0.33 , 1.52 , 30.45 ยูนิต ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงในถังหมักได้ Fpase beta-glucosidase และ Xylanase เป็น 0.25 , 0.77 และ 24.04 ยูนิต ตามลำดับ

ตัวอย่างค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เพื่อสร้างเอนไซม์ไซลาเนสดังแสดงไว้ในตารางที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อสร้างไซลาเนส

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (°C)	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus AANG 19	4.0	35	4-7	Smith and Wood, 1991b
Aspergillus fumigatus	-	40	5	Kitpreechavanich, et al., 1986
Aspergillus niger	5.5	30	3	John, et al., 1979
Aspergillus ochraces	6.5	30	6-14	Biswas, et al., 1987
Aspergillus terreus	4.8-4.9	30	7	Ghosh and Kunda, 1980
Bacillus circulan	8.0-8.5	30	2-3	Ratto, et al., 1992
Butyrivibrio fibrisolven	6.8-7.	37	2	Sewell, et al., 1988
Dictyoglomus sp B 1	7.0	68	3	Ratto, et al., 1994
Cellulomonas uda	7.0	30	5	Rapp and Wagner, 1986
Penicillium wortmanni	5.4	30	5	Matsuo, et al., 1987
Rhodobacter marinus	7.1	65	2	Dahlberg, et al., 1993
Rhoderthesmus marinus	7.1	65	1	Dahlberg, et al., 1993
Streptomyces T 7	7.0	50	3	Ross, et al., 1992
Thermoascus aurantiacus	5.0-5.5	45	8	Gomes, et al., 1994
Thermoascus aurantiacus	4.0	50	-	Gomes, et al., 1994
Thermomonospora fusca	8.0	50	3	Bachmann and McCarthy, 1989
Thermomonospora fusca BD 25	7.0	50-55	2-4	Trigo and Ball, 1994
Thermomonospora strain LL	*7.6*	55	2	Ristroph and Humphreyt, 1985
Thermomyces lanuginosa	-	50	5-6	Gomes, et al., 1993

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีรายงานไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนส (Wong , et al., 1988)

2.5.1. กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (Bioconversion)

กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสให้เป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาล ซึ่งอาจเป็นวัตถุดิบในการหมักต่อไป

Walch , et al., (1992) ใช้เอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อที่แยกมาจากดิน คือ Enzyme B5 และ เอนไซม์ไซลาเนสทางการค้าได้แก่ Roth 5246 และ Rohm EL 182-87 (แอคทิวิตี 1 ยูนิต / มิลลิลิตร) ย่อยสารละลายไซลาเนสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และไฮโดรไลเสทจากชานอ้อย โดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ Roth. Rohm และ Enzyme B5 ย่อยของเหลวที่ได้จากการแปรสภาพชานอ้อยด้วยกระบวนการที่ใช้ความร้อน แบบ direct flow-through เพียงครั้งเดียว (200 องศาเซลเซียส) จะให้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลไซโลส 3.0 2.6 และ 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ เอนไซม์แต่ละชนิดย่อยสับสเตรทให้ปริมาณน้ำตาลต่างกัน เนื่องจากน้ำตาลไซโลสที่ได้จะมีผลยับยั้งไซลาเนสแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน นอกจากนี้อุณหภูมิที่ใช้และระยะเวลาเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการย่อยสลาย ซึ่งการใช้เอนไซม์ผสมของ Aspergillus fumigatus Fresenius รหัส 4-45-1F กับ Humicola lanuginosa ย่อยสลายฟางข้าวพบว่าการย่อยสลายสับสเตรทเกิดขึ้นสูงสุดที่อุณหภูมิระหว่าง 55-60 และ 50-55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการย่อยสลาย 12 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มปฏิกิริยาเป็น 24 ชั่วโมง น้ำตาลกลูโคสและไซโลสจะเกิดขึ้นสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในช่วงแรกของการย่อยสลายน้ำตาลกลูโคส และไซโลสมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเกิดได้รวดเร็วในช่วงอุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลกลับลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อยสลาย เนื่องจากเอนไซม์จะสูญเสียคุณสมบัติเนื่องจากความร้อน (วิเชียร สีสุข , 2532)

Saddler และคณะ , (1983) ใช้เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำหรือตัวทำละลายจากเนื้อไม้ Aspen มาเป็นสับสเตรทและย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนสจาก Trichoderma sp. E 58 พบว่าได้น้ำตาลรีดิวส์ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลักมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทธานอล-เบนซิน ให้ปริมาณน้ำตาลใกล้เคียงกับไซแลนทางการค้าและมากกว่าการใช้เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยกรดก่อนการใช้ไอน้ำ และการย่อยเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยกรดก่อนการใช้ไอน้ำ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการสกัดที่ไม่ใช้กรดก่อนการใช้ไอน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Viikari และคณะ (1994) สกัดไซแลนจาก pine kraft pulp ที่สกัดด้วย KOH เข้มข้น 1.32 โมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซไนโตรเจน และทำให้เข้มข้นโดยการระเหยให้เหลือปริมาตรเพียงครึ่งหนึ่ง จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยสารละลายผสมของเอธานอลและกรดอะซิติค แล้วล้างด้วยเอทธานอลและอีเทอร์ เมื่อทดลองใช้ไซแลนที่สกัดได้ และไซแลนที่สกัดจาก brich kraft pulp ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์เป็นสับสเตรทในการย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนส I และ II จาก Trichoderma reesi RUT C-30 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง พบว่าไซลาเนส II (pH 9.0) ย่อยไซแลนจาก birch kraft pulp ได้ผลิตภัณฑ์ 52 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมากกว่าค่าที่ได้จากการใช้ไซแลนเนส I (pH 5.5) ถึง 2 เท่า โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส ส่วนการย่อยไซแลนจาก pine kraft pulp พบว่าเอนไซม์ไซลาเนส I และ II ให้ผลิตภัณฑ์ที่ใกล้เคียงกัน (55 เปอร์เซ็นต์) สำหรับคุณสมบัติการละลายน้ำ พบว่าไซแลนจาก birch kraft pulp ละลายน้ำได้ 1 เปอร์เซ็นต์ และไซแลนจาก pine kraft pulp ละลายน้ำได้มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมี Arabinose side-group ในส่วนแกนกลาง (Blackbone) ของไซแลนอยู่สูงและมี Polymerization ต่ำ

2.5.2. Biopulping

ในอดีตกระบวนการทำกระดาษจะใช้เชื้อราในการย่อยสลายเนื้อเยื่อไม้ เพราะสามารถช่วยลดต้นทุนด้านพลังงานในกระบวนการฟอก (Refining) อย่างไรก็ตาม การใช้เอนไซม์ไซลาเนสจะช่วยลดระยะเวลาในการย่อยสลายเนื้อเยื่อไม้และได้เยื่อไม้ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ เนื่องจากสารละลายของเนื้อเยื่อไม้มีเฮมิเซลลูโลสซึ่งระหว่างการให้ความร้อนหรือในสภาวะที่เป็นด่าง ไซแลนบางส่วนละลายออกมาในลักษณะสายสั้น ๆ ตกตะกอนอยู่บนผิว microfibril ของเซลลูโลส (Ratto , et al. , 1994) จึงมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ ไซลาเนสในการฟอกเนื้อเยื่อไม้สำหรับทำเยื่อกระดาษ เพื่อลดการใช้สารเคมี เช่น คลอรีน โดยเอนไซม์จะไปย่อยไซแลนที่ตกตะกอนเหล่านั้น Christov และ Prior (1993) ใช้เอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเชื้อ Aureobasidium pullulan NRRL Y-2311-1 ที่มีแอคทิวิตี 1500 ยูนิต/กรัม (เตรียมสารละลายเอนไซม์ในซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.5) ย่อยสารละลายเยื่อไม้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่บ่มและแอคทิวิตีของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นโดยย่อยได้น้ำตาลรีดิวส์เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อไม้ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในช่วงเวลาต่าง ๆ ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3. <u>กระบวนการอื่น ๆ</u>

เอนไซม์ทำให้น้ำผลไม้ ช่วยในการย่อยอาหารสัตว์ ซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าของอาหารสัตว์มีการใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการเตรียมวัตถุดิบในการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ใช้ศึกษาคุณสมบัติของโพลีแซคคาไรด์และผนังเซลล์ของพืช (Wong , et al. , 1988) และประยุกต์ใช้ในการสกัดน้ำมันปาล์มเช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนส โดยใช้ในอัตรา 200-1000 กรัม/ตัน ที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง เพื่อแปรสภาพเนื้อเยื่อพืชก่อนนำไปสกัดด้วยกระบวนการที่ใช้น้ำปริมาณน้อยและแยกน้ำมันด้วยการหมุนเหวี่ยงในกระบวนการขั้นต่อไป นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันและน้ำทิ้งโดยลดปริมาณเนื้อเยื่อของพืชที่มีโมเลกุลสูง ซึ่งทำให้เกิดความหนืดหรือข้น เช่น กลูแคน เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และเพคติน ทำให้การแยกน้ำมันในขั้นตอนการทำให้ใส (Clarification) ดีขึ้น (Gofrey , 1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องหรือคล้ายคลึง

จากการศึกษาเรื่องการแยกเชื้อราเพื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูโลไลทิค พบว่ามีเชื้อรา 6 สายพันธ์ที่สามารถย่อยสลายต้นปอแห้ง และติดเชื้อเข้าที่ต้นปอได้ คือ Trichoderma viride , T. harzainum , Gliocladium viren , Aspergillus niger , A. terreus และ Tiarosporella phasiolina และได้มีการนำมาทดลองกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูโลไลทิค และเฮมิเซลลูโลไลทิค แล้วทำการเปรียบเทียบ กับเชื้อ T. reesei MCG77 ผลการทดลองปรากฏว่าการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราทั้งหมดนี้ผลิตได้น้อยกว่าเชื้อ T. reesei ในบางสายพันธุ์ (T. viride , T. hazainum และ G. virens) ที่ผลิต carboxymethyl cellulase , β- glucosidase , xylanase และ β- xylosidase และทำการเปรียบเทียบกับ T. reesei , A. terreus และ A. niger ที่ผลิตได้ 3:2 และ 1:2 นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถผลิต β- glucosidase ที่ทำงานได้ดีกว่า T. reesei เมื่อทำการทดสอบด้วยน้ำตาลเซลลูโลส

ราส่วนใหญ่และแบคทีเรียบางสายพันธุ์ สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ เมื่อนำสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโต โดยผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อทำการย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลที่สามารถละลายน้ำได้ พบว่า T. reesei และราที่กลายพันธุ์จากเชื้อนี้สามารถผลิตเซลลูเลสได้เป็นจำนวนมาก แต่ในความเป็นจริงเอนไซม์เซลลูเลสนี้จะถูกยับยั้งด้วยความร้อนที่ 50^{0} ซ มีการผลิต β-glucosidase ในปริมาณที่น้อยลง และการเตรียมเซลลูโลสที่มีพันธะของลิกนินด้วยจะมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก แต่ถ้าสามารถแยกออกมาได้ จะพบว่าสามารถผลิตเซลลูเลสที่มีกิจกรรมมาก มีประสิทธิภาพที่ดีกว่า และสามารถต้านทานการยับยั้งของผลิตภัณฑ์และอุณหภูมิสูงได้ด้วย การผลิตเซลลูเลส ที่ได้จากราจะใกล้เคียงกับ T. reesei QM 9411 และ T. reesei QM 6a ดังนั้นจึงได้มีการทดสอบและทำการแยกเชื้อรา ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ และสามารถผลิตเอนไซม์โดยใช้การเพาะเลี้ยงแบบเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- เครื่องหมุนเหวี่ยง
- กล้องจุลทรรศน์
- ตู้เขี่ยเชื้อ
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- อุปกรณ์นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (Hemacytometer)
- เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องเขย่าหลอด
- เครื่องแก้ว
- เครื่องเขย่า

3.2 วิธีการทดลอง

(1) การเก็บตัวอย่างเชื้อ

ขั้นตอนในการเก็บตัวอย่างเชื้อมีดังต่อไปนี้

1. เก็บตัวอย่างเชื้อ โดยบันทึกสถานที่เก็บ วัน และเวลาที่เก็บ
2. เลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรต่าง ๆ ดังนี้

อาหารเหลว

- สารละลายเกลือแร่ (MS Medium) ประกอบด้วย KH_2PO_4 2.0 กรัม / ลิตร , $(NH_4)_2HPO_4$ 1.4 กรัม / ลิตร , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 กรัม / ลิตร , $CaCL_2 \cdot 2H_2O$ 0.3 กรัม / ลิตร , ยูเรีย 0.3 กรัม / ลิตร , โปรติโอสเปปโตน 0.25 กรัม / ลิตร , ยีสต์สกัด 0.1 กรัม / ลิตร , และแร่ธาตุผสม 0.1 มิลลิลิตร (แร่ธาตุผสมประกอบด้วย $FeSO_4 \cdot 5H_2O$ 5 กรัม , $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.4 กรัม , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 4.56 กรัม , $CoCL_2$ 2.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)
- ปรับ pH ของสารละลายเป็น 5.0 ด้วย HCl เข้มข้น 1 นอร์มัล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารแข็ง

- ใช้ ไซแลนหรือฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เติมลงใน MS Medium เรียกว่า Xylan Medium และ Rice Husk Medium และทำให้เป็นอาหารแข็งโดยเติมวุ้นปริมาณ 16 กรัม/ลิตร

ก. วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์

1. ละลายสารทั้งหมด (ยกเว้น ไซแลนและฟางข้าว) เข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

2. แบ่งอาหารที่ได้จากข้อ 1 ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเติมผงวุ้นครึ่งหนึ่งลงไป (8 กรัม / ลิตร) ต้มจนวุ้นละลาย จึงนำไปบรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร ส่วนที่สองเติมไซแลนแล้วคนให้ของผสมเข้ากัน แล้วเติมผงวุ้นที่เหลือลงไป ต้มจนวุ้นละลาย บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 ° ซ 15 นาที

4. เอียงอาหารในหลอดฝาเกลียว จนกระทั่งวุ้นแข็งตัว แล้วเติมอาหารส่วนที่สองลงไป 3 มิลลิลิตร โดยวิธีปลอดเชื้อ เอียงหลอดอีกครั้งจนกระทั่งวุ้นแข็งตัว

ข. วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้เลี้ยงเพื่อแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์

- สารอาหารเช่นเดียวกัน

1. ละลายสารอาหารทั้งหมดเข้าด้วยกัน (ยกเว้น ผงวุ้นและ ไซแลน) ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร แล้วเติมไซแลนหรือฟางข้าวลงไป คนให้เข้ากัน

2. เติมผงวุ้นลงไปต้มจนวุ้นละลาย จึงนำไปบรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร

3. นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 ° ซ 15 นาที

4. เอียงหลอดฝาเกลียวจนกระทั่งวุ้นแข็งตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการแยกเชื้อราที่ย่อยไซแลนจากตามธรรมชาติ

ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อ แยกเชื้อที่สามารถย่อยไซแลนได้ โดยเก็บเชื้อจากสภาพธรรมชาติ

- ตัวอย่างที่มีเชื้อปรากฏอยู่ ทำการเขี่ยเชื้อบนอาหารวุ้น 2 ชนิด คือ Xylan Medium และ Rice Husk Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น แยกเชื้อราที่มีลักษณะปรากฏแตกต่างกัน โดยการ Streak Plate บนอาหารทั้งสองชนิดในจานเพาะเชื้อ จนได้เชื้อราบริสุทธิ์ เก็บรักษาในอาหารวุ้นเอียง 2 ชั้น

- ตัวอย่างที่ไม่มีปรากฏการเจริญของเชื้อรา ทำการแยกโดยชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่บรรจุ MS Medium 50 มิลลิลิตร ที่มีฟางข้าวร้อยละ 0.75 เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ / นาที ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน จากนั้นปิเปตสารละลายใส 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร Xylan Medium และ Rice Husk Medium และทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อในอาหารวุ้นเอียง 2 ชั้น

(2) การคัดเลือกเชื้อ

ทำการคัดเลือกเชื้อโดยเปรียบเทียบกิจกรรมของไซลาเนส (Xylanase Activity) ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณของเชื้อราที่แยกได้ (จากข้อ 1) และเชื้อราที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์ เช่น Aspergillus niger ATCC 6275 , Sporotrichum pulverulentum โดยเป็นเชื้อที่ได้จากการเก็บรักษาตามหน่วยงานต่าง ๆ ในประเทศไทย

2.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของไซลาเนสในเชิงคุณภาพ

เปรียบเทียบกิจกรรมของเซลลูเลสในเชิงคุณภาพ โดยการวัดขนาดของวงใสรอบโคโลนีและขนาดของโคโลนีของเชื้อที่เลี้ยงบน Xylan Medium และ Rice Husk Medium โดยบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาย้อมสีด้วย Congo red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงล้างออกด้วย NaCl 1 โมลาร์เป็นเวลา 10 นาที และทำการเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน

2.2 เปรียบเทียบกิจกรรมของไซลาเนสในเชิงปริมาณ

เปรียบเทียบกิจกรรมของไซลาเนส โดยการวิเคราะห์หากิจกรรม (Xylanase Activity)ตามวิธีของ Tang และคณะ (1987) มีวิธีการคือ

- เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายไซแลนเข้มข้น ร้อยละ 1.0 ที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8
- บ่มที่ 50 ° ซ เป็นเวลา 10 นาที
- หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS ลงไป 3 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที
- ทำให้เย็นโดยใช้น้ำก๊อก
- เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Blank ใช้น้ำกลั่นแทนเอนไซม์

- วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร เทียบค่าไซโลสจากกราฟมาตรฐาน

- 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

2.2.1 วิธีการเลี้ยงเชื้อราเพื่อการวิเคราะห์กิจกรรมไซลาเนส

ใช้เชื้อราที่เป็นตัวเปรียบเทียบ เลี้ยงจนได้สปอร์ ทำสารละลายของสปอร์โดยเติม Tween 80 ร้อยละ 0.1 ในน้ำกลั่น ใช้ปริมาณสปอร์ 1.6×10^6 สปอร์ (Montenecourt and Eveligh ,1977) ลงใน Xylan Medium หรือ Rice Husk Medium 50 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ / นาที เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 600 รอบ / นาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายในที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของไซลาเนส

2.2.2 เปรียบเทียบกิจกรรมของไซลาเนสของเชื้อราที่แยกได้กับเชื้อราที่เป็นตัวเปรียบเทียบ

นำเชื้อราที่แยกได้ (จากข้อ 2.1) และเชื้อราที่เป็นตัวเปรียบเทียบที่มีกิจกรรมไซลาเนสสูง มาเลี้ยงใน Xylan Medium หรือ Rice Husk Medium เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยง และนำส่วนเหลวมาวิเคราะห์กิจกรรมของไซลาเนส

<u>การเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส</u>

1. เตรียมน้ำตาลไซโลส (ที่ผ่านการอบที่ 60 ° ซ 2 - 3 ชั่วโมง) ที่ความเข้มข้น 0 , 0.1 , 0.2 , 0.3 ,0.4 , และ 0.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร

2. นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลไซโลส

- หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม DNS 3 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที

- ทำให้เย็นโดยใช้น้ำก๊อก

- เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- Blank ใช้น้ำกลั่น

- วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์

ตารางที่ 9 แสดงค่ากิจกรรมไซลาเนสของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร Xylan Medium และ Rice husk Medium

เชื่อที่	ค่ากิจกรรมไซลาเนสเมื่อเลี้ยงบน Xylan medium (ยูนิต/มล)	ค่ากิจกรรมไซลาเนสเมื่อเลี้ยงบน Rice husk medium (ยูนิต/มล.)
1	83.48^{a}	59.76^{ab}
2	61.3^{cd}	31.84^{e}
3	82.85^{a}	17.95^{f}
4	65.71^{c}	51.76^{bc}
5	80.22^{ab}	46.88^{cd}
6	54.12^{dc}	62.83^{a}
7	35.9^{f}	32.14^{e}
8	35.48^{f}	15.14^{f}
9	71.44^{b}	39.05^{de}
10	29.74^{fg}	50.4^{c}
11	47.76^{e}	34.13^{e}
12	- *	- *
13	36.81^{f}	14.14^{f}
14	36.44^{f}	11^{f}
15	89.33^{a}	13.16^{f}
16	19.67^{gh}	12.77^{f}
17	16.36^{hi}	10.85^{f}
18	6.86^{i}	1.46^{g}

* หมายถึง เชื้อเจริญเติบโตช้าจึงไม่สามารถหาค่ากิจกรรมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ขนาดของโคโลนี และขนาดวงใสรอบโคโรนีของเชื้อที่ทำการคัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบน XYLAN MEDIUM

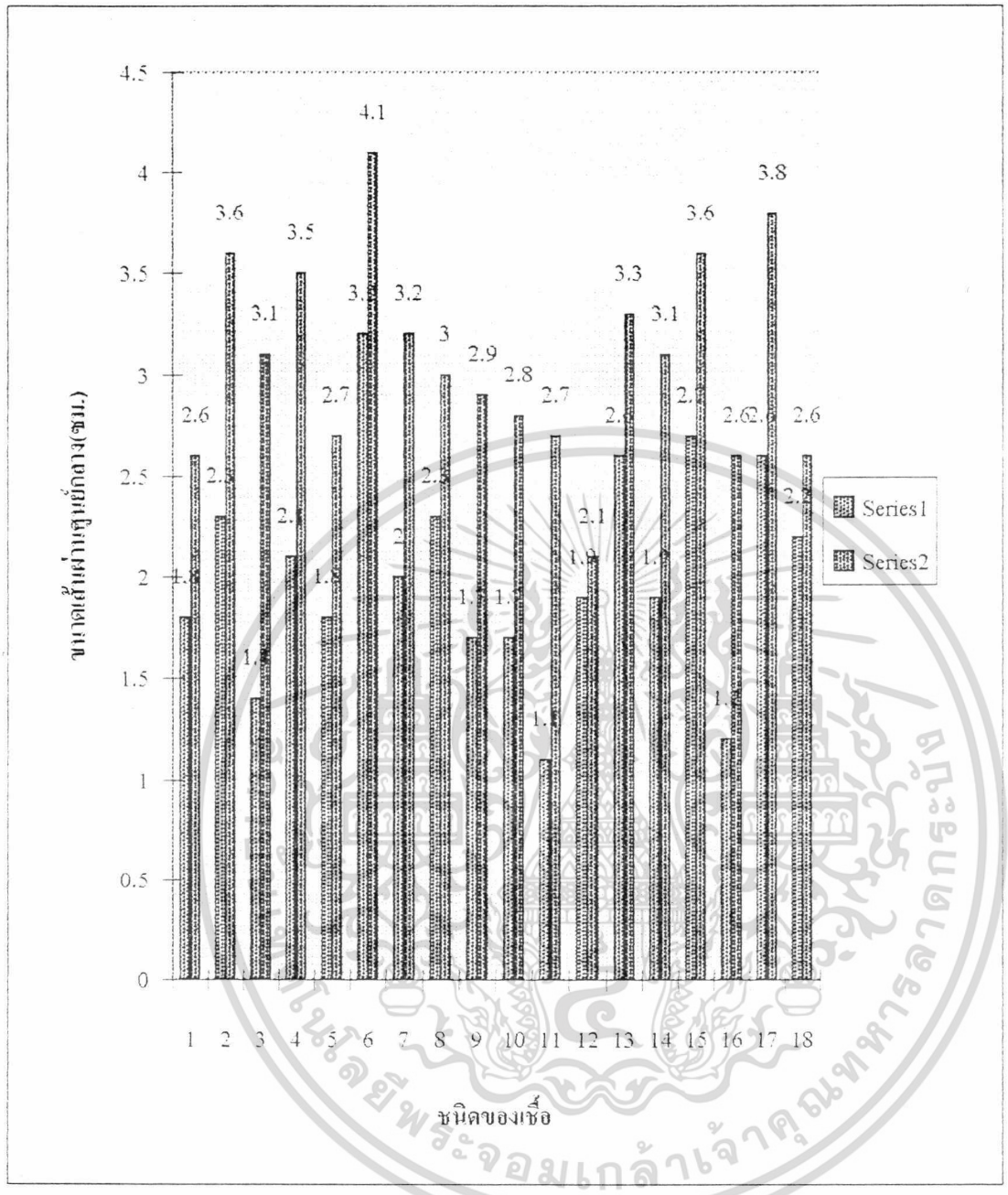
เชื้อที่	ขนาด Colony		ขนาด Clear Zone	
	5 µl	10 µl	5 µl	10 µl
1	1.8	2.0	2.6	3.0
2	2.3	2.5	3.6[3]	4.0[3]
3	1.4	1.9	3.1	3.4
4	2.1	2.3	3.5	3.7
5	1.8	2.3	2.7	2.5
6	3.2[1]	3.6[1]	4.1[1]	4.4[1]
7	2.0	2.6	3.2	4.0[3]
8	2.3	2.9[2]	3.0	3.8
9	1.7	2.2	2.9	2.8
10	1.7	2.3	2.8	3.1
11	1.1	1.7	2.7	3.7
12	1.9	2.3	2.1	2.5
13	2.6[3]	2.8[3]	3.3	3.5
14	1.9	2.3	3.1	3.7
15	2.7[2]	2.8[3]	3.6[3]	3.8
16	1.2	2.2	2.6	3.2
17	2.6[3]	2.8[3]	3.8[2]	4.2[2]
18	2.2	2.5	2.6	3.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 ขนาดโคโลนี และขนาดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราที่ทำการคัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบน RICE HUSK MEDIUM

เชื้อที่	ขนาด Colony		ขนาด Clear Zone	
	5 µl	10 µl	5 µl	10 µl
1	1.6	2.5[3]	1.7	2.6[3]
2	1.5	1.8	1.8	2.2
3	1.2	1.3	1.2	1.3
4	1.0	1.7	1.1	1.7
5	1.1	1.2	1.1	1.6
6	2.2[2]	3.0[1]	2.3[3]	3.2[1]
7	1.6	1.8	2.0	2.1
8	2.2[2]	2.7[2]	2.4[2]	2.9[2]
9	1.4	1.8	1.4	1.9
10	1.3	1.8	1.4	1.8
11	1.5	2.4	1.8	2.6[3]
12	1.3	1.6	1.4	1.6
13	1.7[3]	2.0	1.8	2.1
14	1.2	1.5	1.8	2.2
15	2.5[1]	3.0[1]	2.6[1]	3.2[1]
16	1.1	1.7	1.1	1.8
17	1.5	1.8	1.8	2.0
18	1.3	1.4	1.4	1.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

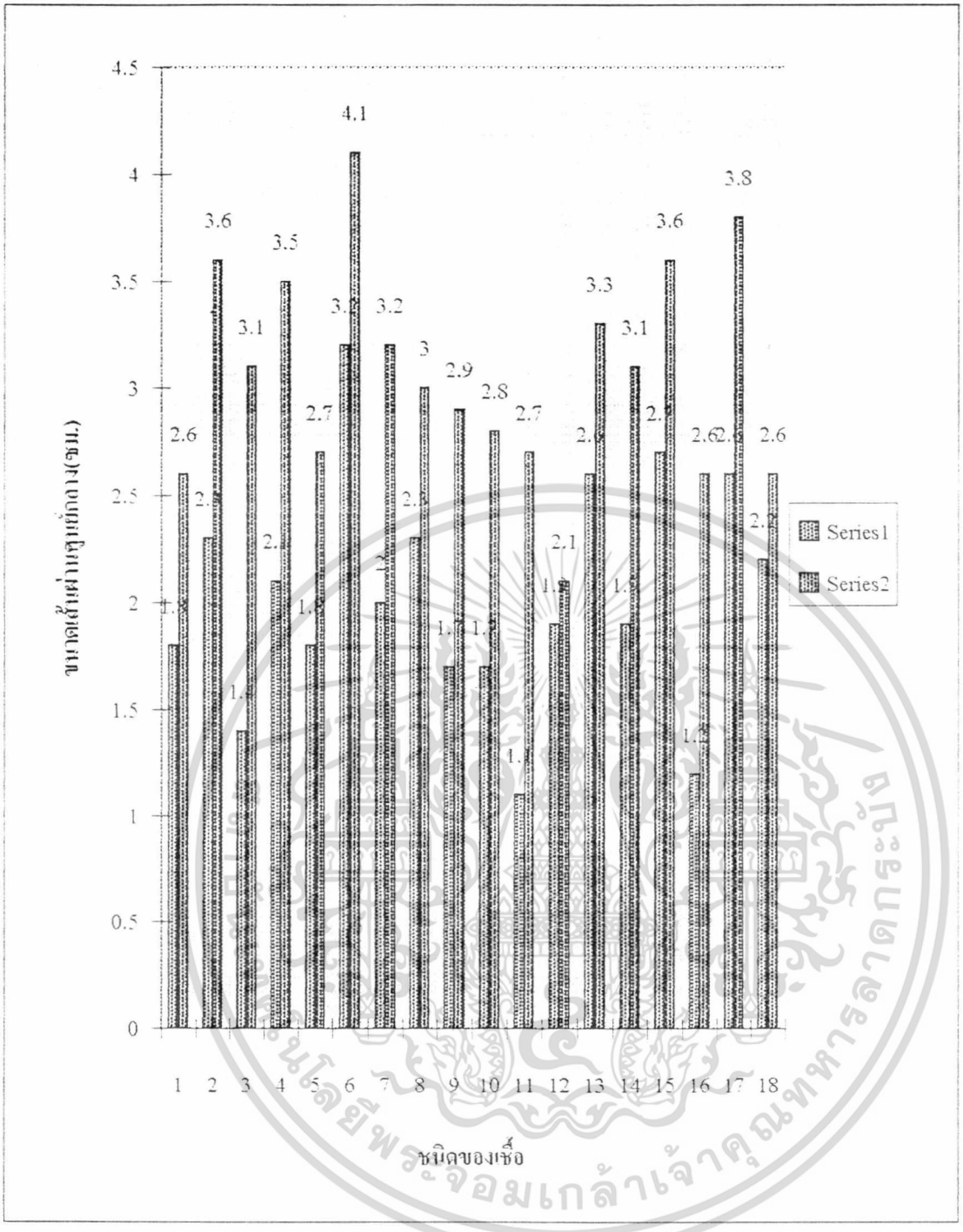


ชุด1 : ขนาด colony

ชุด2 : ขนาด clear zone

รูปที่ 1 กราฟเปรียบเทียบขนาดของโคโลนี และขนาดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อที่ทำการคัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อใน XYLAN MEDIUM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

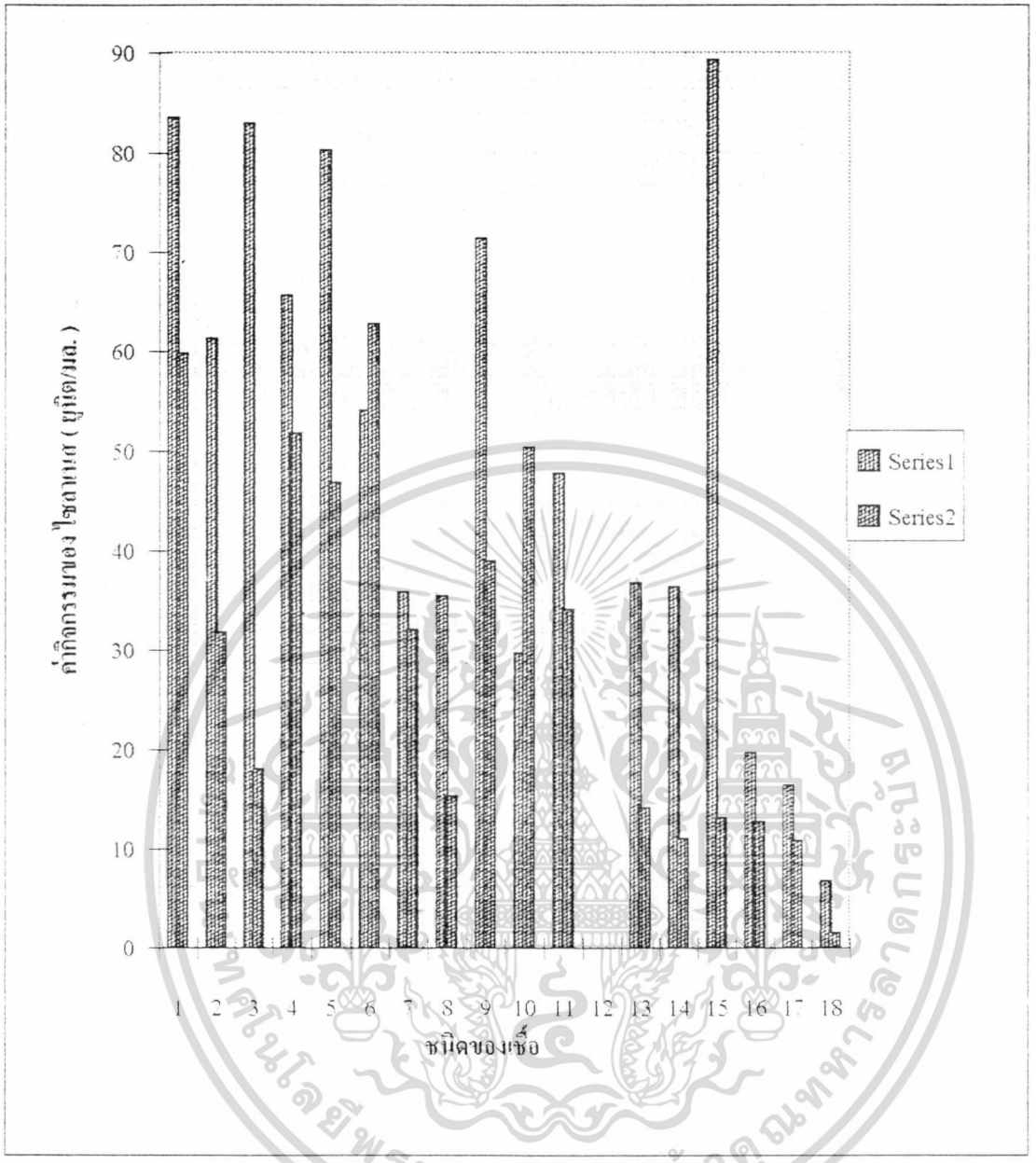


ชุดที่1 : ขนาด colony

ชุดที่ 2 : ขนาด clear zone

รูปที่ 2 กราฟเปรียบเทียบขนาดของโคโลนีและขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อที่ทำการคัดเลือกเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อใน rice husk medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ชุดที่1 : เลี้ยงใน Xylan medium

ชุดที่2 : เลี้ยงใน Rice husk medium

รูปที่ 3 แสดงค่ากิจกรรมของไซลาเนสของเชื้อที่ทำการคัดเลือก เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อใน xylan medium และ rice husk medium

**หมายเหตุ เชื้อที่ 12 เจริญเติบโตช้าจึงไม่สามารถหาค่ากิจกรรมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในการเลี้ยงเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยการคัดเลือกเชื้อราทั้ง 18 ชนิดจากสภาพธรรมชาติ โดยทำการเขี่ยเชื้อที่ย่อยไซแลนได้ในจานเพาะเชื้อลงบนอาหารแยกเชื้อราที่ลักษณะแตกต่างกันให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ด้วยการ Streak Plate แล้วเก็บเชื้อทั้งหมดไว้เป็น stock ภายหลังการทดสอบกิจกรรมของไซลาเนสในเชิงคุณภาพของเชื้อทั้งหมด โดยการวัดขนาดของวงใสรอบๆโคโลนี และขนาดของโคโลนี ซึ่งใช้เทคนิคการ Drop Plate ที่นำสารละลายของเชื้อที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์/10 มิลลิลิตร drop เป็นสองขนาดคือ 5 และ10 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร Xylan Medium และ Rice husk Medium แล้วบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ผลที่ได้คือปรากฏเป็นวงโคโลนีขนาด 3.2 ซ.ม. และ3.6 ซ.ม. ในอาหาร Xylan Medium และขนาด 2.2 ซ.ม. กับ 3.0 ซ.ม. ในอาหาร Rice husk Medium ของเชื้อที่ 6ให้ผลสูงสุดในอาหารทั้ง 2 ชนิดขณะที่การทดสอบกิจกรรมของไซลาเนสของเชื้อในเชิงปริมาณ ที่ทำการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ที่มีฟางข้าว 1%ผสมอยู่ในอาหาร Rice husk Medium เมื่อเลี้ยงครบ 4 วันนำส่วนใสมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งผลที่ได้สูงสุดคือ เชื้อที่ 15 ที่มีค่ากิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 89.33 Unit/ml สำหรับอาหาร Xylan Medium และ 62.83 Unit/ml ในRice husk Medium ของเชื้อที่ 6

เมื่อนำผลที่ได้จากการทดสอบทั้งหมดของทุกๆเชื้อมาพิจารณารวมกันสามารถสรุปหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส คือสายพันธุ์ที่ 6 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากที่สุด ซึ่งจะนำไปจำแนกหาสายพันธุ์เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราควรมีการเพิ่มชนิดของเชื้อราที่นำมาวิเคราะห์ เพื่อใช้เปรียบเทียบหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งอาจนำมาจากแหล่งธรรมชาติอื่น เช่นน้ำทิ้งโรงงานกระดาษ เศษกากชานอ้อย หรือโรงเก็บข้าวโพด ข้าวสาลี เป็นต้น
2. ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น แบคทีเรีย, ยีสต์ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้กับเชื้อราในสภาวะต่างๆ
3. ควรมีการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ศึกษาอยู่ เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น และหาเทคนิคการผลิต รวมถึงแหล่งคาร์บอนและสารอาหารต่างๆให้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ของเชื้อราแต่ละชนิดได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เบญจวรรณ ชิตมณี. 2534. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์มโดยเชื้อราที่แยกได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 131 หน้า.

น้อย เกษมสุขสกุล. 2529. การผลิตเซลลูเลสโดยเชื้อราที่ชอบอุณภูมิสูงบนวัสดุที่เป็นของแข็ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 159 หน้า.

วิเชียร กิจปรีชาวนิช. วิเชียร สีสุข. อัญชริดา สวารชร และนภา โล่ห์ทอง. 2535. การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนจากวัสดุเหลือทิ้งจากเกษตรกรรมโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส4-45-1F. ว. เกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์. 26:296-305.

Battaglino, R.A., Huergo, M., Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B. 1991. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. Appl. Microbiol. And Biotechnol. 35:292-296.

Beguin , P. 1990. Molecgula biology of cellulose degradation. Annu. Rev.Microbiol. 44:219-248.

Biely , B. 1985 Microbiol xylanolytic systems. Trends Bitechnol. 3:286-290.

Bisaria , V.S. and Ghose , T.K. 1981. Biodegradation cellulosic matterials: substats, microorganism enzyme and products. Enzyme microb. Tecnol. 3:90-104.

Bucht, B. and Eriksson, K.E. 1968. Extracellular enzyme system utilized by the rot fungus *Stereum sanguinolentum* for the breakdown of cellulose. Arch. Biophys. 124:135-141.

Chahal , D.S. 1985 Solid - state fermentation with *Trichoderma reesi* for cellulase production. Appl. Environ..Microbiol. 49:205-210.

Cheah, S.C., and Ooi L.C.L. 1984. Isolation of the thermophilic cellulolytic fungi. Paper presented at the reginal UNESCO Symposium on Applied Microbiology, Bangkok and Khon Kean, Thailand, 23-26 December, 1984.

Christov. L.P. and Prior, B.A. 1993. Xylan removal from dissolving pulp using enzymes of *Aureobasidium pullulans*. Biotechnol. Lett., 15:1269-1274.

Clarke, R.T.J., Balley, R.W. and Gaillard, B.D.E. 1969. Growth of rumen bacteria on plant cell wall poltsaccharide. J. Gen. Microbiol. 56:79-86.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Coutts, A.D. and Smith, R.E. 1976. Factors influencing the production of cellulases by *Sporotrichum thermophile.* Appl. and Environ. Microbiol. 31:819-821.

Dekker, R.F.H. and Richards, G.N. 1976. Hemicellulose : Their occurrence purification, Properties and mode of the action. Adv. Carbonhyd. Chem. Biochem. 32:277-352.

Desrochers, M., Jurasek, L. and Paice, M.R. 1981. High production of beta glucosidase in *Schizophyllum commune* : Isolation of the enzyme and effect of the culture filtrate on cellulose hydrolysis. Appl. Eviron. Microbiol. 41:222-228.

Doppelbauer, R., Esterbauer, H., Stiener, W., lafferty, R.M. and Steinmuller, H. 1987. The use of lignocellulosic wastes for production of cellulose by *Trichoderma reesei.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 26:485-494.

D'souza, J. and Volfva, O. 1982. The effect pH on the production of cellulase is *Apergillus terreus.* Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16:123-125.

Eriksson, K.E. and Rzedowski. 1969. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Chrysosporium lignorum* for the breakdown of cellulose. L. Studies on the enzyme production. Arch. Biochem. Biophys. 129:683-688.

Essific, R.J., Bavor, J.H. and Scurray, G. 1986. Protein upgrading of orange peel waste for potential stock feed by solid substrate fermentation. ASEAN Food J. 2(1):25-30.

Faulds, C. B., and William, G. 1994. Purification and characterization of a ferulic acid esterase (Eae-III) from *Aspergillus niger* specific for the phenolic moiety and binding to mycrocrystalline cellulose, Microbiol. 140:779-787.

Fukuda, M., Muramatsu, T., and Egami, F. 1969. β-xylosidase from the liver of *Charonia lampus* I. Purification, properties and application in carbohydrates research. J. Biochem. 65: 191-199.

Gascoigne, J.A. and Gascoigne, M.M. 1960. The xylanase of *Fusaarium roseum.* J. Gen. Microbiol. 22:242-248.

Ghosh, B. S., and Kunda, A. B. 1980. Induction of cellulases and hemicellulase by Tamarin (*Tamarindus indica*) Kernel polysaccharide. J. Ferment. Technol. 58(2): 135-141.

Gilbert, M., Yaguchi, M., Watson, D. C., Wong, K. K. K., Breuil, C., and Saddler, J. N. 1993. A comparison of 2 xylanases from the Thermophilic fungi *Thielavia terrestris* and *Thermoascus crustaceus*. Appl. Microbiol. And Biotechnol. 40(4): 508-514.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gilbert, H. J., and Hazlewod, G. P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. J. Gen. Microbiol. 139:187-194.

Godden, B.,Legon, T.,Helvenstein, P., and Penninekx, M.1989. Regulation of the production of hemicellulylytic and cellulytic enzymes by a *Streptomyces* sp. Growing on lignocellulose J. Gen. Microbiol. 135: 285-292.

Godfrey, T. 1983. Edible oils. *In* Industrail Enzymology. The Application of Enzyme in industry. (Godfrey, T. and Reichent, J., eds.) pp. 424-427. The Nature Press New York.

Gokhale, D. V., Puntambekar, U. S., and Deobagkar, D. N. 1986.Xylanase and β-xylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. Biotechnol. Lett. 8(2): 137-138.

Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W. and Esterbauer, H. 1992. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:701-707.

Gomes , J. , Esterbauer , H. , Gomes , I. and steiner , W. 1989. Screening of some wild fungi isolates for cellulolytic activities. Letters in Apply Microbiol. 8:67-70.

Gomes, D. J., Gomes, J., and Steiner, W.1994. Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophillic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme. J. Biotechnol. 37: 11-12.

Gomes, D. J., Gomes,J., Kreiner, W., Esterbauer, H., Sinner, M., and Steiner, W. 1993a. Production of high level of cellulase-free and thermostable xylanse by a wild strain of *Thermomyces lanuginosus* using brichwood xylan. J. Biotechnol. 30:289-297.

Gomes, D. J., and Purkarthofer, H., Hayn, M., Kapplmiler, J., Sinner, M., and Steineer, W. 1993b. Production of high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* using beechwood xylan. J. Biotechnol. 30:283-297.

Gundde-Cimerman , N. , Cimeman, A. and Perdih , A. 1986. *Aspergillus niger* mutants for bioconvertion of apple distillerry wastes. Enzyme.Microb. Technol. 8:166-170.

Hayakawa, M., and Nonomura, H. 1987. Humic acid-vitamin agar , a new medium for the selective isolation of soil actinomyces. J. Ferment. Technol. 65(5):501-509.

Hebraud, M., and Ferve, M.1990. Purification and characterization of an extracellular beta-xylosidase from the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis.* FEMS. Microbiol. Lett. 17(1):11-16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ibrahim, M.N.M. 1981. Physical, chemical. Physio-chemical and biological treatmant of crop residues. *In* Pearce, G.R. (ed.). the utilization of FibrousAgricultural Residues as animal Feed. Univ. Melbourne. Victoria. p. 53-68.

International Union of Biochemistry (IUB). Nomenclature committee of the international.1984. Enzyme Nomenclature: Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry on the nomenclature and classification of enzyme catalyzed reaction. Academic Press. Orlando:646 P.

Iwamoto, T. Sasaki, T. and Inaoka, M. 1973. Mem. Ehime. Univ. 17:13-25. *In* dekker, R.F.H. and Richards. 1976. Hemicellulase : Their occurrence, purification, properties and mode of action. Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 32:277-352.

Jeffries, T.W. 1992. Enzymetic treatments of pulps. ACS. SYMPOSIUM. SERIES. 476:313-329.

Jurasek, L., and Paice, M. G. 1992. Saving bleaching chemicals and minimizing Pollution with xylanase . In Proceeding of the International Symposium on Pollution Prreventation in the Manufacture of Pulp and Paper , Opportunities and Barriers. Pulp and Paper Cluster , U.S. Environmental Protection Agency , Washington, D.C.,p 105-107

John, M.,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*.Can. J. Biochem.57:125-135

Joglekar , A.V. and Karantth , N.G. 1984. Studies on cellulose production by a mutant - *Penicilium funiculosum* UV 49. Biotechnol. and Bioeng . 26:1079-1084.

Jhon, M., Schmidt. B. and schmidt. B. and schmidt. J. 1979. Purification and some properties of five Endo-1,4-beta-D-xylanase and a beta-D-xylosidase produced by strain of *Aspergillus niger.* Can. J. Biochem. 57:125-134.

Karni, M., Deopurkar, R.L. and Prale, V.B. 1993. β-Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grow on sugars and agricultural residues. J. Microbiol. Biotechnol. 9:476-478.

Kawaminami, T., and Lizuka, H. 1969. Studies on xylanase from microorganisms (part III): Production of xylanase by *Streptomyces xylophagus* Nov.sp..Agric. Biol. Chem. 32(2):1787-1789

Kawamori, M., Morikawa, Y., Ado, Y. and Takasawa, S. 1986. Production of cellulases from alkali-treated bagass in *Trichoderma reesei.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:d454-458.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Kitpreechavanich, V., Hayashi, M., and Nagai , S.1984. Production of xylan degrading enzymes by thermophilic fungi, *Aspergillus fumigatus* and *Humicola lanuginosa*. J. Ferment Technol. 62(1):63-69

Kitpreechavanich, Hayashi, M., and Nagai, S. 1986. Purification and characterization of extracellular β-xylosidase and β-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* . Agric. Biol. Chem. 50(7):1703-1711

Kitpreechavanich, Srisuk, W., Svanchorn, A., and Lotong, N. 1992. Production of cellulose and xylan degrading enzymes by *Aspergillus fumigatus* No. 4-45-IF using agricultural wastes as substrate. The Kasetsart J. 20(2):296-306.

Kluepfel, D., Shareck, F., Mondou, F., and Morosoil, R. 1986. Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces Ividan*. Appl. Microbiol. Technol. 24:230-234.

Knowles , J. , Lehtovaara , P. and Teeri , T. 1987. Cellulase gene and their families.TIBTECH. 5:255-261.

Kusakabe, I., Yasui, T., and Kobayashi, T. 1977. The action of the *Streptomyces xylananase* on various xylans and xylooligosaccharide (studies on xylanase system of Streptomyces part VIII). J. Agric. Biol. Chem. Soc. Jap. 51(7):439-448.

Kusakabe, L., Yasui, T. and Kobayashi, T. 1966. Studieson xylanaseof system of *Streptomyces*. Part I. Some properties of extracellular xylanase fron *Streptomyces*. Agr. Biol. Chem. 29:520-524.

Lee, Y.E., Lowe, S.E., and Zeikus, J.G. 1993. Regulation and characterization of xylanolytic enzymes of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. Appl. Environ. Microbiol. 59(3):763-771.

Li, X.L., Zhang, Z. Q., Dean, J. F. D., Eriksson, K. E. L., and ljungdahl, L. G. 1993. Purification and characterization of a new xylanase (Apx-II) from the fungus Aureobasidium pullulans Y 22311-1. Appl. And Environ. Microbiol. 59(10):3212-3218.

Lindner, C., Stulket, J., and Hecker, M. 1994. Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. Microbiol. 140:753-757.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mandels, M. and Weber, J. 1969. The production of cellulase. *In* cellulase and Their Application (Gould, R.E. ed.) Adv. Chem. Ser. 95. American Chemistry society, Washington, D.C. p. 391-387.

Matsuo, M., and Yasui, T. 1984b. Purification and some properties of β-xylosidase from *Trichoderma viride*. Agric. Biol. Chem. 51(9):2367-2379.

Matsuo,Fujie, A., Win, M., and Yasui, T. 1987. Four types of β-xylosidase from *Penicillium wotmanni* IFO 7237. Agric. Biol. Chem. 51(9):2367-2379.

McCarthy , A.J. 1987. Lignocellulose-degrading actinomyces. FEMS. Microbiol. Rev. 46:145-163.

McCarthy, A. J., and Bachmann, S. L. 1992. Xylan degrading enzymes produced by the thermophilic actinomyces *Thermomonospora fusca*. In Visser, J., Beldman, G., Someren, K. A.K. V., and Voragen, A. G. T. (eds) Progress in Biotechnology. Vol 7. Elserier Science Publicers: Netherlands. p.295-300.

Misha, C., Seeta, R., and Rao, M. 1985. Production of highly thermo-stable enzyme in assosiation with the cellulytic activities of *Penicillium funiculosum*. Enz. Microbiol. Technol. 7:295-299

Myburgh, J., Prior,B. A., and Kilian, S. G. 1991. The themperature and pH properties of the extracellular hemicellulose degrading enzymes of *Aureobasidium pullulans* NRRL Y 2311-Process Biochem. 26(6):343-348.

Nagajima, T., Tsukamoto, K., Watanabe, T., Kainuma, K., and Matsuda, K. 1984. Purification and some properties of and endo-1,4-β-xylulosidase from *Streptomyces* sp. J. Ferment. Technol. 65(1):1-6

Nakanishi, K.,Yasui, T., and Kobayashi, T. 1976. A preliminary experiment on the xylanase production by *Streptomyces sp.*. J. Ferment. Technol. 65(1):1-6

Nakanishi, K.,Yasui, T., and Kobayashi, T. 1987. Induction of membrane bound xylosidase in a *Streptomyces sp.* J. Ferment. Technol. 65(1):1-6

Nanmori, T., Watanabe, T., Shinke, R., Kohno, A., and Kawamura, Y. 1990. Purification and some properties of thermostable of xylanase and β-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. J. Bacteriol. 172(12):6669-6672.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nakanishi, K., Yasui, T. and Kobayashi, T. 1976a. A preliminary experiment on the xylanase production by *Streptomyces sp.* J. Ferment. Technol. 54:801-807.

Neudoerffer, T.S. and Smith, R.E. 1970. An evaluation of fungal enzyme for the solubilization of wheat bran constituents. Can. J. Microbiol. 16(3):139-146.

Nisizawa, T., Suzuki, H. and Nisizawa, K. 1971. "De novo" synthesis of cellulase induced by sophorose in *Trichoderma viride* cells. J. Biochem. 70:387-393.

Okazaki, W. Akiba, T., Horikoshi, K., and Akashoshi, R. 1984. Production and properties of two types of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus spp.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 19:335-340.

Ohno, N., Fujiwara, K., Shinoyama, H., and Fujii, T. 1994. Xylanase produced by a *Peculiar* imperfect fungus, *Fusidium sp.* Bx-1 1994. 72(1):13-19.

Okeke, B. C., and Paterson, A. 1992. Simultaneous product and induction of cellulolytic and xylanolytic enzymes in *Streptomyces sp.*. World J. Microbiol. Biotechnol. 85(5):493-487.

Okeke, B.C. and Obi, S.K.C. 1993. Production of cellulolytic and xylanilytic enzyme by an *Arthrographis species.* J. Microbiol. Biotechnol. 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 commne.* Appl. and Env. Microbiol. 36:802-808.

Panda, T. 1989. Simulation of shake flask conditions in a bioreactor for the biosynthesis of cellulase and xylanase by mixed culture of *Trichoderma reesei* D1-6 and *Aspergillus wentii* Pt 2804. Process Biochem. 104-108.

Patel, B. N., and Ray, R. M. 1994. Production and characterization of a xylanase from *Streptomyces sp.* Grown on agridultural waste. World. J. Microbiol. And Biotechnol. 10(5):594-599.

Pou-Llinas, J., and Driguez. H. 1987. D-Xylose as inducer of the xylan-degrading enzyme system in the yeast *Pullularia pullulans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27;134-138.

Raimbault, M. and Alazard D. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. European J. Appl. Microbial. 9:199-209.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rapp, P., and Wagner, F. 1986. Production and properties of xylan-degrading enzymes from *Cellulomonas uda*. Appl. Environ. Microbiol. 51(4):746-752.

Ratto, M., Mahrani, I.M., Ahring, B., and Viikari, L. 1992. Production of xylanolytic enzymes by alkalotolerant *Bacillus circulans* strain. Appl. Microbiol Technol. 37: 470-473.

Ratto, Mahrani, I.M., Ahring, B., and Viikari, L. 1994, Application of Thermostable xylanase of *Dictyoglomus sp.* In enzymatic treatment of kraft pulps. Appl. Microbiol biotechnol. 41:130-133.

Ratto, M., Mathrai, I.M. Ahring, B. and Vilkari, L. 1994. Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus sp.* In enzymatic treatment of hraft pulps. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41:130-133.

Regulski, J., Dawidowiez, A., Ikczuk, Z. and Lconowise, A. 1985. Enzyme Microb. Technol. 7:395-400. อ้างโดยโคภิษฐ์ เวทยสุภรณ์. 2531. การศึกษาขบวนการผลิตเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสและเซลลูเลสจากเปลือกข้าวโพด โดยแบคทีเรียผสมใน fermentor. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า วิทยาเขตธนบุรี.

Rhyum, S. B., Kang, M. K., Maeng, P. J., Park, H. M., and Rhee, Y. M. 1993. Purification and characterization of xylanase from alkalophilic *Streptomyces sp.* S-510. Kor. J. Microbiol.31(5): 436-444.

Riou, C., Freyssinet, G., and fevre, M. 1991. Production of cell wall degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Appl. Environ. Microbiol. 57(50):1478-1484.

Ristroph, D. L., And Humphreyt, A. E. 1985. The β-xylosidase of *Thermomonospora fusca*. Biotechnol. Bioeng. 27:909-913.

Rodionova, N. A., and Tavobilov, I. M. 1983. β-xylosidase from *Aspergillus niger* 15: purification and properties. J. Appl. Biochem. 5:300-312.

Ross, N.W., Johnson, K. G., Braun, C., Mackenzie, C. R., And Schneider, H. 1992. Enzymatic hydrolysis of water-soluble lignin carbohydrate complexs from *Populus deltoides* effects of combination of β-mannanase, xylanase and acetyl xylanesterase. Enzyme and Microbial Technol. 14(2):90-95.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schyns, P. J. Y. M. J., and Stams, A.J.M. 1992. Xylandegradation of the anaerobic bacterium *Bacteroides xylanolyticuc* X 5-1. In Visser, J., Beldman, G., Someren, K.. A. K.. V. And Voragen, A. G. T.(eds.) Progress in Biotechnology. Vol. 7. Elsevier Science Publisers, Netherlands. P. 295-300.

Sewell, G. W., Aidrich, H. C., Williams, D., Manarelli, B., Wilkie, A., Hespell, R. B., Smith, P. H., and Ingram, L.O. 1988. Isolation and characterization of xylan-degrading strains of *Butyrivibrio fibrisolvens* from a Napier grass-fed anaerobic dijester. Appl. Env. Microbiol. 54(5):1085-1090.

Shamala, T. R., and Sreekantish, K. R. 1986. Production of cellulase and β-Xylanase by some selected fungal isolates. Enz. Microbiol. Technol. 8:178-182.

Shao, W., and Wiegel, J. 1992. Purification and characterization of a thermostable β-Xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. J. Bacteriol. 174(8):5848-5853.

Smith, D.C., and Forsberg, C.W. 1991. α-Glucuronidase and other hemicellulase activities of Fibrobacter succinogenes S 85 grown on crystalline cellulose or ball-milled barley straw. Appl. Environ. Microbiol. 57(12):3552-3557.

Smith, D.C., and Wood, T. M. 1991a. Isolation of mutants of *Aspergillus awamori* with enhanced production of extracellular xylanase and β-xylosidase. World. J. Microbiol. Biotechnol. 7:343-354.

Smith, 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. Biotechnol. Bioeng. 38(3):883-890.

Shewale, J.G. and Sadana, J.C. 1978. Cellulase and beta- glucosidase production by a *Basidiomyces sp.* Can. J. Microbiol. 24:1204-1216.

Shu Chen and Wayman. M. 1991. Cellulase production induced by carbon sources derived from waste news paper. Process Biochem. 26:93-100.

Stewart, J.C. and Parry J.C.B. 1981. Factors influencing the production of cellulase by *Aspergillus fumigatus*. J. of Gen. Microbiol. 125:33-39.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Tang, L.U.L., Yu, E.K.C., Louis-Seize, G.W. ans Saddle, J.N. 1987. Inexpensive rapid procedure for bulk purification of cellulase-free beta-1,4-D-xylanase for high specific activity. Biotechmol. Bioeng. 30:96-106.

Tenkanen, M., Puls, J., Ratto, M., and Viikari, L. 1993. Enzymatic deacetylation of galactoglucomannans. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:159-165.

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

Toussaint, P. and Betaille, P.F. 1985. The effectof pretreatment on the enzymic hydrolysis of cellulosic industrial waste. J. Chem. Tech. Biotechnol. 35B:205-215.

Trigo, C. and Ball, A.S. 1994. Production of extracellar enzyme during the solubilisation of xylans lignocellulose materials. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41:124-129.

Utta, E.A., Eddy, C.K., Keshar, K. F., and Ingram, L. O. 1991. Sequencing and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* xyl B. Gene encoding novel bifunctional protein with β-D-xylosidase and α-L-arabinofuranosidase of activites. Appl. Environ. Microbiol. 57(4):1227-1234.

Uziie, M., Matsuo, M., and Yasui, T. 1985. Possible identity of β-xylosidase and β-glucosidase of *Chaetomiun trilaterate*. Agric. Biol. Chem. 49(4):1167-1173.

Viiihari, L. Kantelinen, A. Buchert, J. and Puls, J. 1994. Enzymatic accessibility of xylans lignocellulosic materials. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41:124-129.

Wang, P., Mason, J. C., and Broda, P. 1993. Xylanase from *Streptomyces cyanus* their production , purification and characterization. J. General. Microbiol. 139:1987-1993.

Win, M., Matsuo, M., and Yasui, T. 1987. Immunological relationships of four types of β-xylosidase from *Penicillium wortmanni* IFO 7237. Agric Bilo. Chem. 51(11):3151-3152.

Wolfgang, H., Schwarz, H., Adelsberger, H., Jauris, S., Hertel, C., Funk, B., and Standenbauer, W. L. 1990. Xylan degrading thermophilic *Clostridium stercorarium*; cloning and expression of xylanase. β-D-xylosidase and α-L-arabinofuranosidase genes in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33(1-6):68-373.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Walch, E., Zemann, A., Schinner, F., Boon, G, and Bobleter, O. 1992. Enzymaticsaccharification of hemicellulose obtained from hydrothermally perteratated sugar cane bahasse and beech bark. Biol. Technol. 39:172-177.

Whistler, R.L. and Masak, E. 1995. Enzymatic hydrolysis of xylan. J. Anim. Chem. Soc. 77:1241-1243.

Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. 1988. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms : fungtion and applications. Microbiol. Rev. 52(3):305-317.

Xu , J. and Taylor , K.B. 1993.Characterisation of ethanol production from xylose and Xylitol by a cell-free *Pachysolen tannophilus* system. Appl. Environ. Microbiol. 59:231-235.

Yoshioka, H., Chavanich, S., Nilubol, N., and Hayashida, S. Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. Agri. Biol. Chem. 45(3):579-586,1981.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารสูตรต่าง ๆ ในการเลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

XYLAN MEDIUM / RICE HUSK MEDIUM

ประกอบด้วย

KH_2PO_4	2.00 %
$(NH_4)_2HPO_4$	1.40 %
$MgSO_4.7H_2O$	0.30 %
$CaCl_2.2H_2O$	0.30 %
UREA	0.30 %
PROTEOSE-PEPTONE	0.25 %
YEAST EXTRACT	0.10 %
แร่ธาตุผสม	**1.00 มิลลิลิตร/ลิตร**
-$FeSO_4.5H_2O$	5.00 กรัม/ลิตร
-$ZnSO_4$	1.40 กรัม/ลิตร
-$MnSO_4.H_2O$	4.56 กรัม/ลิตร
-$CoCl_2$	2.00 กรัม/ลิตร

XYLAN 1.00 % $\Rightarrow$ XYLAN MEDIUM

RICE HUSK MEDIUM 1.00 % $\Rightarrow$ RICE HUSK MEDIUM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์

1. ละลายสารทั้งหมด (ยกเว้น ไซแลนและฟางข้าว) เข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

2. แบ่งอาหารที่ได้จากข้อ 1 ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเติมผงวุ้นครึ่งหนึ่งลงไป (8 กรัม / ลิตร) ต้มจนวุ้นละลาย จึงนำไปบรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร ส่วนที่สองเติมไซแลนแล้วคนให้ของผสมเข้ากัน แล้วเติมผงวุ้นที่เหลือลงไป ต้มจนวุ้นละลาย บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 ° ซ 15 นาที

4. เอียงอาหารในหลอดฝาเกลียว จนกระทั่งวุ้นแข็งตัว แล้วเติมอาหารส่วนที่สองลงไป 3 มิลลิลิตร โดยวิธีปลอดเชื้อ เอียงหลอดอีกครั้งจนกระทั่งวุ้นแข็งตัว

ข. วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้เลี้ยงเพื่อแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์

- สารอาหารเช่นเดียวกัน

1. ละลายสารอาหารทั้งหมดเข้าด้วยกัน (ยกเว้น ผงวุ้นและ ไซแลน) ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร แล้วเติมไซ แลนหรือฟางข้าวลงไป คนให้เข้ากัน

2. เติมผงวุ้นลงไปต้มจนวุ้นละลาย จึงนำไปบรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร

3. นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 ° ซ 15 นาที

4. เอียงหลอดฝาเกลียวจนกระทั่งวุ้นแข็งตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส โดยใช้DNS reagent

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย

dinitrosalicylic acid	1%
1. phenol	0.2%
2. sodium potassium tartrate (Rochelle salt)	20%
3. Na_2SO_4	0.05%
4. NaOH	1%

<u>วิธีการเตรียม DNS reagent</u>

ละลาย NaOH ในน้ำตาลปริมาณที่ต้องการจนหมด เติมสารเคมีที่เหลือละลายตามลงไป แล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับจำนวนที่ต้องการ

<u>วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลสสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมไซลาเนส</u>

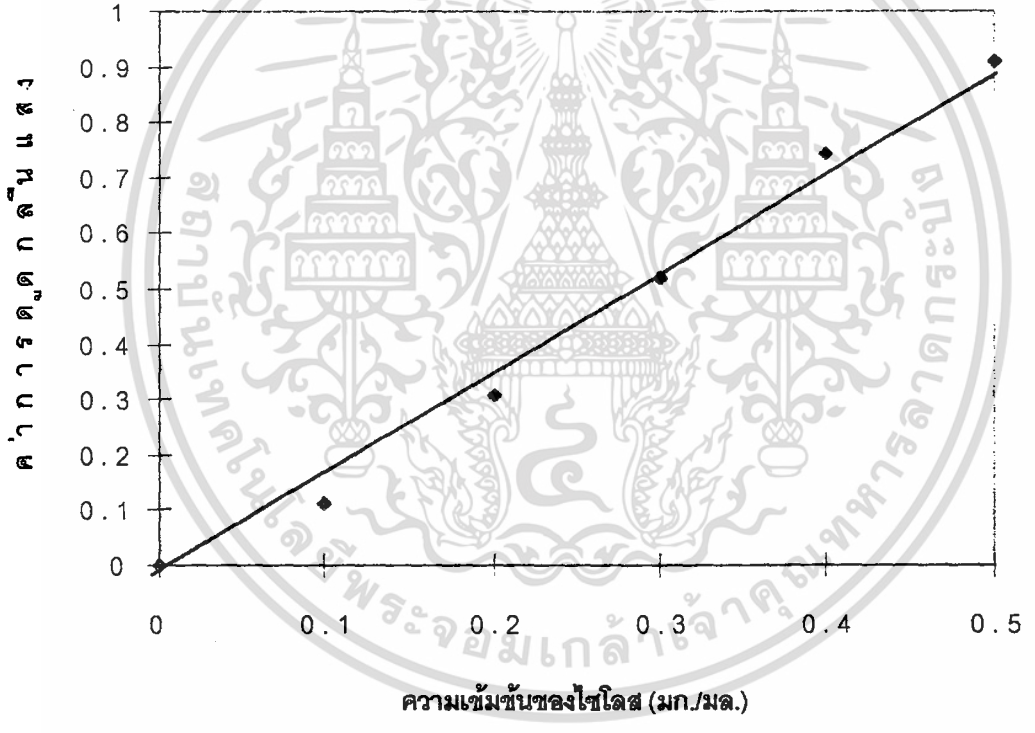
1. เตรียม stock solution ของไซโลสให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1 มาความเข้มข้นละ 0.1 มล. (Blank ใช้น้ำกลั่นแทน)
3. เติมสารละลาย DNS reagent ลงไป 3 มล.
4. ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็น
5. เติมน้ำกลั่น 6 มล. ผสมให้เข้ากันโดยทั่ว
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร แล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ กับปริมาณไซโลส ดังแสดงในรูปผนวกที่ ข1
7. สำหรับสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ให้ปฏิบัติตามข้อ 2-6 ถ้าในตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลอยู่สูง ให้เจือจางตัวอย่างจนสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ แล้วจึงนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่ากิจกรรมของไซลาเนส

$$\text{ยูนิต / มล.} = \frac{\text{มก.ของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจางสลล.เอนไซม์}}{\text{MW. ของ ไซโลส} \times \text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ปริมาตรสลล.เอนไซม์}}$$

$$= \frac{\text{มก.ของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจางสลล.เอนไซม์}}{150.13 \times 10 \times 0.5}$$



รูปผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้นไซโลส
กับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การหาค่า Xylanase activity

Xylanase activity assay mixture ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ 0.5 มล. รวมกับ0.5 มล.ของไซแลนที่มีความเข้มข้น 1% ในโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย DNS ลงไป3 มล. ทำให้เย็น เติมน้ำกลั่น 6 มล. ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร

3. CLEAR ZONE METHOD

การทดสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ของจุลินทรีย์ที่แยกได้โยอาศัยการเกิดโคโลนี และวงใสรอบโคโลนี

<u>วิธีการ</u>

1. นำเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดนำมาทำเป็นสารละลายเจือจางของเชื้อที่ความเข้มข้นเดียวกัน
2. ทำการหยดสลล.ที่ได้จากข้อ1. ลงบนอาหาร Xylan Medium และ อาหาร Rice husk Medium ด้วยเทคนิค Drop plate (1 หยด มีปริมาตรประมาณ 5-10 ไมโครลิตร)
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน
4. วัดขนาดโคโลนีที่เกิดขึ้นแล้วบันทึกผลไว้
5. ทดสอบ Clear Zone โดยย้อมสีด้วย 1 กรัม/ลิตร (0.1%) ของสีCongo red ให้ท่วมอาหารวุ้นเป็นเวลา 15 นาที
6. เททิ้งแล้วราดทับด้วย 1 M NaCl ทิ้งไว้อีก 15 นาที
7. เทสลล.ทิ้ง แล้วบันทึกขนาดของ Clear Zone ที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้