สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา ที่แยกได้จากสภาพธรรมชาติ

นางสาวสุพัตรา บวรลักษณกุล
นางสาวสุวัฒนาวดี ไชยวัน
นางสาวอัจฉรา บุตรสุด

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2542

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 35856
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Optimization of Producing Xylanase from the fungi in Nature.

Miss Supatra Bwornluksanakul

Miss Suwattanawadee Chaiyawan

Miss Atchara Budsud

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 1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ไซลาเนสของเชื้อราที่แยกได้จากสภาพธรรมชาติ	
โดย	นางสาวสุพัตรา	บวรลักษณกุล
	นางสาวสุวัฒนาวดี	ไชยวัน
	นางสาวอัจฉรา	บุตรสุด
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี	ฤทธิบูรณ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต) หัวหน้าภาควิชา

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต) ประธานกรรมการ

(ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์) กรรมการ

(ผศ.วันชัย สุทธินุ่น) กรรมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ไซลาเนสของเชื้อราที่แยกได้จากสภาพธรรมชาติ	
โดย	นางสาวสุพัตรา	บวรลักษณกุล
	นางสาวสุวัฒนาวดี	ไชยวัน
	นางสาวอัจฉรา	บุตรสุด
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี	ฤทธิบูรณ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
ปีการศึกษา	2542	

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ทำการจำแนกเชื้อที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติคือ เชื้อที่ 1, 4, 5, 6 และ 14 (อารี, 2541) และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ปัจจัยที่ใช้ศึกษาคือ แหล่งคาร์บอนโดยใช้ไซแลนและฟางข้าว ใช้ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ชนิดและแหล่งไนโตรเจนคือ ยูเรียและเคซีนไฮโดรไลเสท โดยใช้ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วน NH_4NO_3 และ $(NH_4)_2SO_4$ ใช้ที่ความเข้มข้น 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ทำการคัดเลือกเชื้อโดยการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส จากการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าเชื้อ 4 ที่ความเข้มข้นของฟางข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ เคซีนไฮโดรไลเสท 0.5 เปอร์เซ็นต์ และพีเอชเริ่มต้น 4.0 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ 73.888 ยูนิต/มิลลิลิตร และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด 492.586 ยูนิต/มิลลิกรัม เชื้อ 5 ที่ความเข้มข้นของไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์ และพีเอชเริ่มต้น 4.0 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 78.754 ยูนิต/มิลลิลิตร และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด 1,789.863 ยูนิต/มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Optimization of Producing Xylanase Enzyme from the fungi in Nature.	
Name	Miss Supatra	Bwornluksanakul
	Miss Suwattanawadee	Chaiyawan
	Miss Atchara	Budsud
Special Project Adviser	Assistant Professor Aree	Rittiboon
Department	Applied Biology	
Academic Year	1999	

Abstract

The species of fungi used in this research were numbers 1, 4, 5, 6 and 14 which were isolated from nature. The aim of the study was to optimize the factors for xylanase production. Xylan and rice straw at the concentrations of 1, 2 and 3 % were used as carbon source. Urea and casein hydrolysate (at the concentrations of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5%) including NH_4NO_3 and $(NH_4)_2SO_4$ (at the concentrations of 0.4, 0.5, 0.6 and 0.7%) were used as nitrogen source. Different levels of pH (3, 4, 5, 6, 7 and 8) were varied in the experiment. The results found that the fungus number 4 had the highest activity (73.888 unit/ml.) and specific activity 492.586 unit/mg. when 2% rice straw and 0.5% caseinhydrolysate (at pH 4.0) were used, while fungus number 5 had the highest activity (78.754 unit/ml.) and specific activity 1,789.863 unit/mg. when 1% xylan and 0.5% urea (at pH 4.0) were used.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งทำสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานภาษาที่ใช้ ตลอดจนอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง รองศาสตราจารย์ ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต ประธานกรมการโครงงานพิเศษ ที่ได้ให้ความรู้และข้อเสนอแนะในเรื่องของการจำแนกชนิดของเชื้อรา ผู้ช่วยศาสตราจารย์วันชัย สุทธินุ่น กรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ อาจารย์สุจิตรา สุคนธมัติ ที่ได้ให้ความรู้และข้อเสนอแนะในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทดลอง สุดท้ายนี้ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคน ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้

นางสาวสุพัตรา บวรลักษณกุล
นางสาวสุวัฒนาวดี ไชยวัน
นางสาวคัจฉรา บุตรสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ฌ
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	1
ของเขตของโครงงานพิเศษ	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
การตรวจเอกสาร	3
ลักษณะของเชื้อราที่มีในธรรมชาติ	3
โครงสร้างและลักษณะของไซแลน	7
คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส	7
แหล่งที่พบเอนไซม์ไซลาเนส	8
โครงสร้างและการทำงานของไซลาโนไลติกเอนไซม์	8
ชนิดของเอนไซม์ไซลาเนสที่เกี่ยวข้องในการย่อยไซแลน	9
สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	10
การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในระดับอุตสาหกรรม	19
ขั้นตอนในการดำเนินงาน	22
วัสดุ	22
อุปกรณ์	22
ขั้นตอนและวิธีการ	23
ผลการทดลองและวิจารณ์	25
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	56
เอกสารอ้างอิง	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	60
ภาคผนวก ก การเตรียมกราฟมาตรฐานและการวิเคราะห์ข้อมูล	60
ภาคผนวก ข ตารางวิเคราะห์ทางสถิติ	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางภาคผนวกที่ ข1	เปรียบเทียบชนิดของเชื้อและเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	64
ตารางภาคผนวกที่ ข2	เปรียบเทียบชนิดของเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	65
ตารางภาคผนวกที่ ข3	เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	66
ตารางภาคผนวกที่ ข4	เปรียบเทียบชนิดของเชื้อและเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	67
ตารางภาคผนวกที่ ข5	เปรียบเทียบชนิดของเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	68
ตารางภาคผนวกที่ ข6	เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	69
ตารางภาคผนวกที่ ข7	เปรียบเทียบชนิดของเชื้อและเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	70
ตารางภาคผนวกที่ ข8	เปรียบเทียบชนิดของเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	71
ตารางภาคผนวกที่ ข9	เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าว ความเข้มเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	72
ตารางภาคผนวกที่ ข10	เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 4 และความเข้มข้นของฟางข้าว ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน	73
ตารางภาคผนวกที่ ข11	เปรียบเทียบความเข้มข้นของฟางข้าวที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ในการเลี้ยงเชื้อ 4	74
ตารางภาคผนวกที่ ข12	เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 4 เมื่อใช้ฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน	75
ตารางภาคผนวกที่ ข13	เปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ตารางภาคผนวกที่ ข14	เปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	77
ตารางภาคผนวกที่ ข15	เปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	78
ตารางภาคผนวกที่ ข16	เปรียบเทียบพีเอชของอาหารเริ่มต้นเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน และเคซีนเป็นแหล่งไนโตรเจน	81
ตารางภาคผนวกที่ ข17	เปรียบเทียบพีเอชของอาหารเริ่มต้นเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน และเคซีนเป็นแหล่งไนโตรเจน	81
ตารางภาคผนวกที่ ข18	เปรียบเทียบชนิดของเชื้อและเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	83
ตารางภาคผนวกที่ ข19	เปรียบเทียบชนิดของเชื้อเมื่อใช้ไซแลน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน	84
ตารางภาคผนวกที่ ข20	เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	85
ตารางภาคผนวกที่ ข21	เปรียบเทียบชนิดของเชื้อและเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	86
ตารางภาคผนวกที่ ข22	เปรียบเทียบชนิดของเชื้อเมื่อใช้ไซแลน ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน	87
ตารางภาคผนวกที่ ข23	เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลน ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	88
ตารางภาคผนวกที่ ข24	เปรียบเทียบชนิดของเชื้อและเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	89
ตารางภาคผนวกที่ ข25	เปรียบเทียบชนิดของเชื้อเมื่อใช้ไซแลน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน	90
ตารางภาคผนวกที่ ข26	เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน	91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ตารางภาคผนวกที่ ข27	เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 5 และความเข้มข้นของไซแลนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน	92
ตารางภาคผนวกที่ ข28	เปรียบเทียบความเข้มข้นของไซแลนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน	93
ตารางภาคผนวกที่ ข29	เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 4 เมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน	94
ตารางภาคผนวกที่ ข30	เปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน	95
ตารางภาคผนวกที่ ข31	เปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน	96
ตารางภาคผนวกที่ ข32	เปรียบเทียบความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน	97
ตารางภาคผนวกที่ ข33	ตารางเปรียบเทียบพีเอชของอาหารเริ่มต้นเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน	100
ตารางภาคผนวกที่ ข34	ตารางเปรียบเทียบพีเอชของอาหารเริ่มต้นเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของ *Aspergillus sp.*	4
รูปที่ 2 ลักษณะโคนิดิโอฟอร์และโคนิเดียของ *Aspergillus sp.*	4
รูปที่ 3 ลักษณะของ *Aspergillus sp.* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	5
รูปที่ 4 ลักษณะโครงสร้างของ *Penicillium sp* a-b. ลักษณะของโคนิดิโอฟอร์	6
รูปที่ 5 ลักษณะโคนิดิโอฟอร์และโคนิเดียของ *Penicillium sp*	6
รูปที่ 6 ลักษณะของ *Penicillium sp* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	7
รูปที่ 7 ผลของน้ำตาลแอลซอโบส(A)และโซโฟโรส(B)ที่มีต่อความเข้มข้นของเอนไซม์ ใน *Trichoderma reesei* PC-3-5	17
รูปที่ 8 แนวโน้มของเอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำในแอลซอโบส(A,500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และซอโฟโรส (B,100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	18
รูปที่ 9. ลักษณะการเจริญของเชื้อ 1 บนอาหารวุ้นเอียง	25
รูปที่ 10 ลักษณะของเชื้อ 1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	26
รูปที่ 11 ลักษณะการเจริญของเชื้อ 4 บนอาหารวุ้นเอียง	27
รูปที่ 12 ลักษณะของเชื้อ 4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	28
รูปที่ 13. ลักษณะการเจริญของเชื้อ 5 บนอาหารวุ้นเอียง	29
รูปที่ 14 ลักษณะของเชื้อ 5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	30
รูปที่ 15. ลักษณะการเจริญของเชื้อ 6 บนอาหารวุ้นเอียง	31
รูปที่ 16 ลักษณะของเชื้อ 6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	32
รูปที่ 17 ลักษณะการเจริญของเชื้อ 14 บนอาหารวุ้นเอียง	33
รูปที่ 18 ลักษณะของเชื้อ 14 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	34
รูปที่ 19 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ 4 เมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้นต่าง ๆ	36
รูปที่ 20 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	37
รูปที่ 21 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์	38
รูปที่ 22 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 23 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ 4 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ฟางข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน 41

รูปที่ 24 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ 4 ที่เจริญบนอาหารที่ใช้ฟางข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เคซีนไฮโดรไลเสท 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน 43

รูปที่ 25 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เคซีนไฮโดรไลเสท 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น 4.0 และทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน 44

รูปที่ 26 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ 5 เมื่อใช้ไซแลนความเข้มข้นต่าง ๆ 46

รูปที่ 27 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ไซแลน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน 47

รูปที่ 28 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ไซแลน ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน 48

รูปที่ 29 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ไซแลน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน 49

รูปที่ 30 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ 5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน 51

รูปที่ 31 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ 5 ที่เจริญบนอาหารที่ใช้ไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน 53

รูปที่ 32 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร 63

รูปผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovin serum albumin) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร 64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

เชื้อราเป็นเชื้อที่มีศักยภาพมากที่สุดในการย่อยสลายสารลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นส่วนประกอบของพืชในธรรมชาติ เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ใช้แล้วไม่หมดไป ยังมีเชื้อราน้อยชนิดที่สามารถย่อยสลายสารเหล่านี้ได้ และให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอนไซม์ไซลาเนสที่เป็นไปได้ในทางเศรษฐกิจ ซึ่งถ้าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่เป็นไปได้ก็จะเป็นการนำแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกมาใช้แทนแหล่งคาร์บอนเดิมที่ใช้กันอยู่ ซึ่งมีราคาแพงมากจะเป็นการลดต้นทุนได้อย่างมาก เนื่องจากแหล่งคาร์บอนคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของต้นทุนการผลิตเอนไซม์ทั้งหมด ซึ่งเชื้อราที่จะนำมาใช้ประโยชน์จะได้มาจากการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราในสภาพธรรมชาติ (อารี ฤทธิบูรณ์, 2541) เมื่อได้ทำการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ได้ค่อนข้างสูง งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราที่คัดเลือกได้ เพื่อที่จะศึกษาดูว่าเชื้อราที่คัดเลือกมีศักยภาพสูงพอที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในระดับการผลิตที่สูงขึ้นหรือไม่

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราที่คัดเลือกจากเชื้อราที่แยกได้จากสภาพธรรมชาติ
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราที่คัดเลือกจากเชื้อราที่ได้จากการแยกสภาพธรรมชาติในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราที่คัดเลือกมาใช้ในการศึกษา โดยวิธีการย้อมสีด้วยแลคโตฟีนอล คอตตอล บลู (lactophenol cotton blue) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อให้ทราบถึงจีนัส (Genus) ของเชื้อรา
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ได้แก่ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและพีเอชเริ่มต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อให้ทราบวิธีการศึกษาทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราและสามารถจัดจำแนกเชื้อราอย่างคร่าว ๆ ได้

2. เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราที่คัดเลือกจากฟางข้าวหรือไซแลนในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว และเพื่อหาสภาวะที่เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

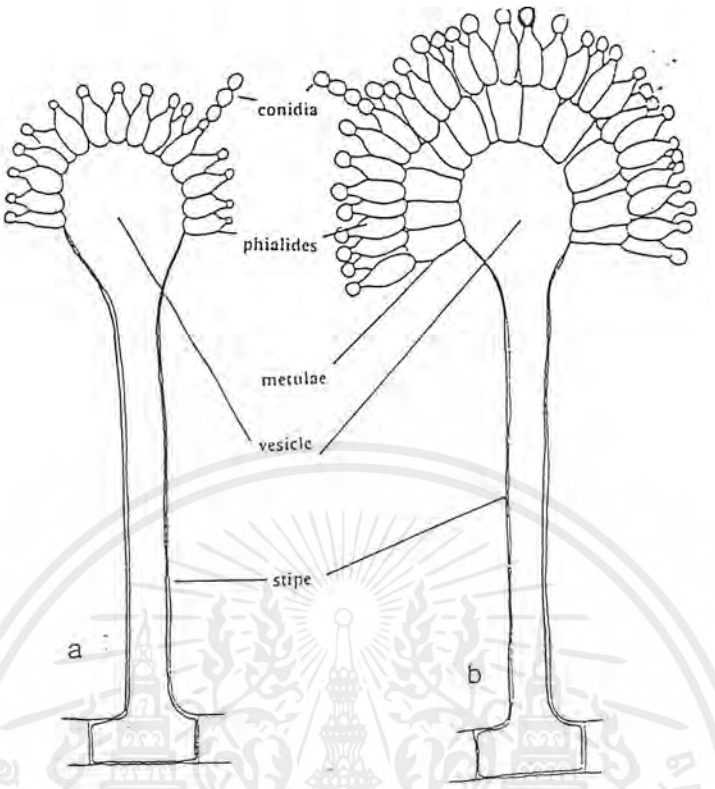
ลักษณะของเชื้อราที่มีในธรรมชาติ

เชื้อราที่มีในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิดแต่ชนิดเช่น *Mucor sp. Rhizopus sp. Fusarium sp. Penicillium sp.*และ *Aspergillus sp.* เป็นต้น แต่ชนิดที่มีความน่าสนใจสำหรับการทดลองนี้มี 2 ชนิดคือ *Aspergillus sp.* และ *Penicillium sp.*

Aspergillus sp. (Samson and Ellen, 1988)

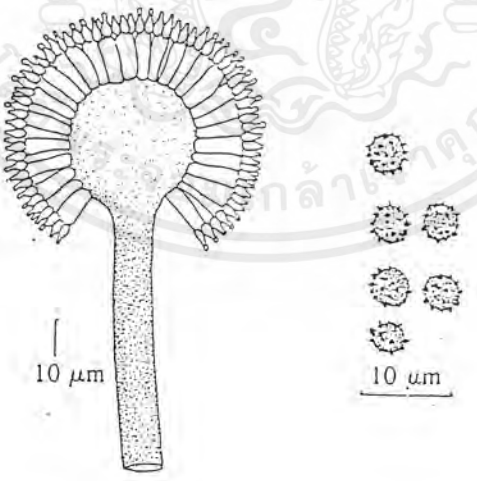
โคโลนีมีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีสีขาว สีเหลือง สีน้ำตาลอมเหลือง สีน้ำตาลถึงดำหรือสีโทนเขียว โคนิดิโอฟอร์ (Conidiophores) จะตั้งตรงและหนาแน่น (มีผนังกั้น) มีลักษณะเป็นกิ่งก้านส่วนปลายจะพองตัวเป็นถุง (vesicle) phialides จะตั้งอยู่บนถุงนั้น อาจมี 1 ชั้น หรือ 2 ชั้น โคนิเดีย (conidia) จะเกิดเป็นสายที่ปลาย phialide โคนิเดียที่แห้งแล้วจะอัดตัวกันเป็นปล้อง ๆ คล้ายปล้องไม้ไผ่ หรือแยกออกเป็นแฉก (รูปที่ 1, 2 และ 3) *Aspergillus sp.* สามารถปนเปื้อนในสับสเตรต (substrate) หลายชนิด สามารถเจริญในอากาศร้อนได้ดีกว่า *Penicillium* หลายสปีชีส์ (species) จะมีกระบวนการดูดสารอาหารได้โดยตรง สามารถผลิตสารพิษจากกระบวนการผลิตเมทาบอไลท์ (metabolite) มีความสำคัญในกระบวนการหมักของอาหาร (ประเภทอาหารตะวันออก) และสามารถถูกประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตสารอินทรีย์ หรือผลิตเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของ *Aspergillus sp.*

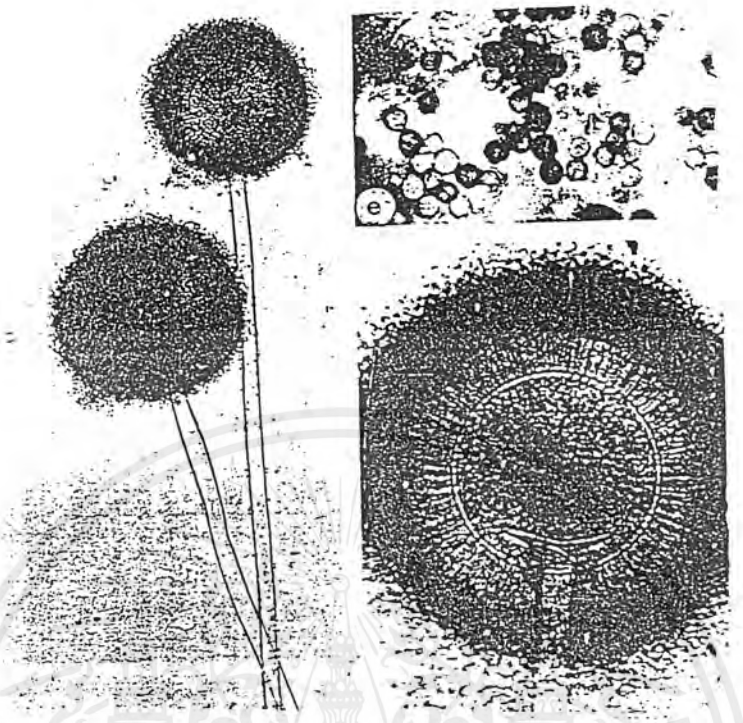
ที่มา : Samson และ Ellen (1988)



รูปที่ 2 ลักษณะโคนิดิโอฟอร์และโคนิเดียของ *Aspergillus sp.*

ที่มา : Samson และ Ellen (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

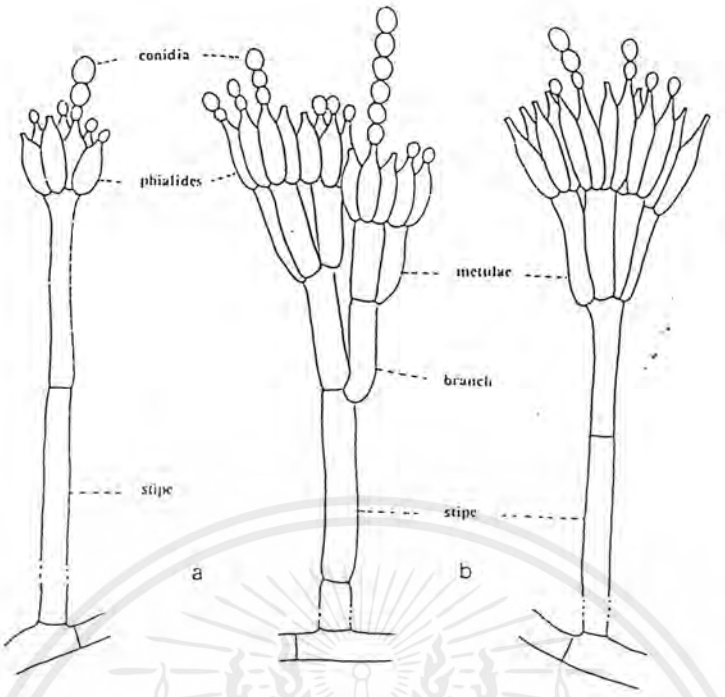


รูปที่ 3 ลักษณะของ *Aspergillus sp.* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ที่มา : Samson และ Ellen (1988)

Penicillium sp. (Samaon and Ellen, 1988)

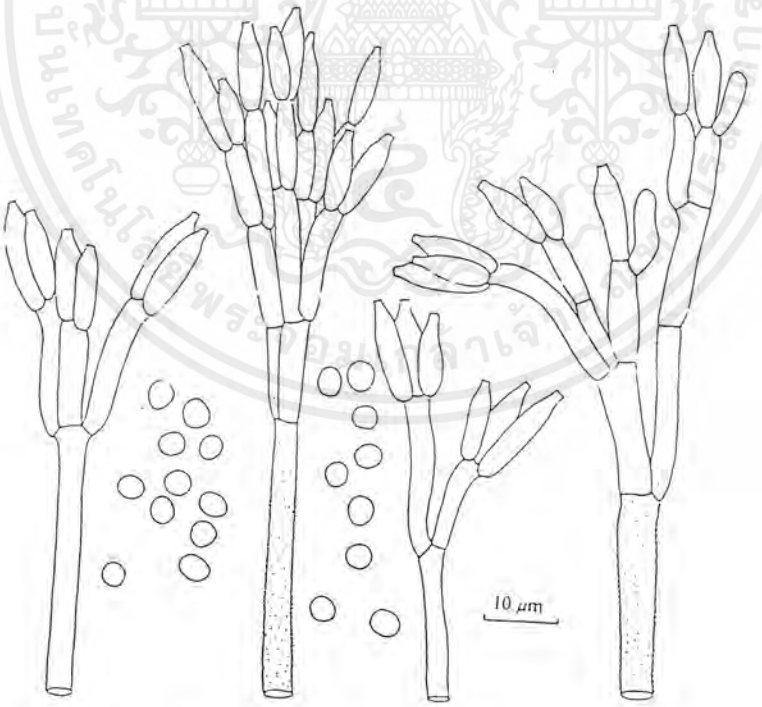
โคโลนีจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วมีสีเขียวเข้ม บางครั้งมีสีขาว ส่วนมากจะอยู่ติดกันอย่างหนาแน่น โคนิดิโอฟอร์อาจเป็นแบบเดี่ยว ๆ หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ๆ อยู่บนส่วนปลายของก้านและมี phialide อยู่รอบ ๆ โคนิดิโอฟอร์ ดังรูปที่ 4 *Penicillium sp* จะแตกกิ่งก้านสาขา อาจจะแตก 1 กิ่ง หรือมากกว่า 1 กิ่งก็ได้ (รูปที่ 5 และ 6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 ลักษณะโครงสร้างของ *Penicillium sp* a-b. ลักษณะของโคนิดิโอฟอร์

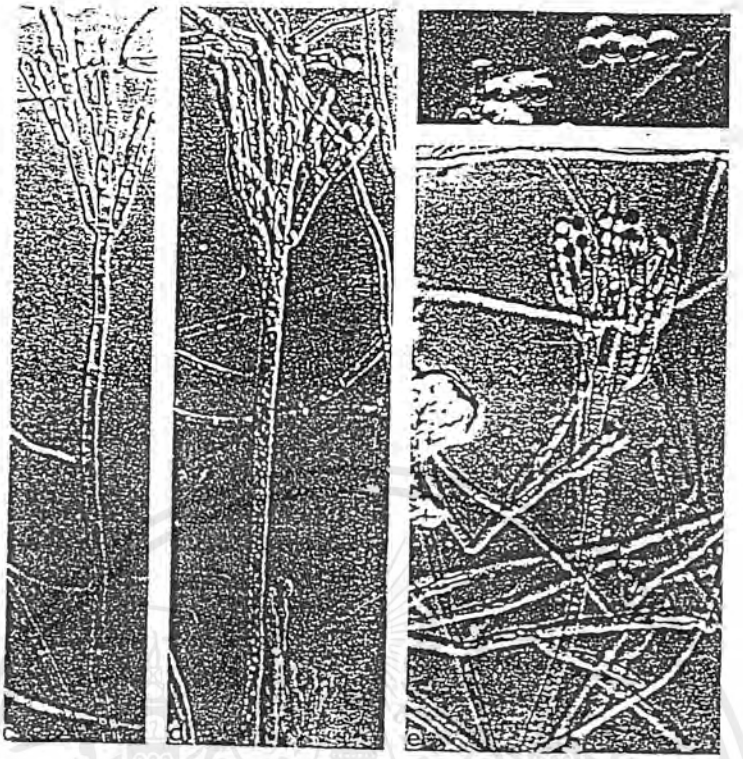
ที่มา : Samson และ Ellen (1988)



รูปที่ 5 ลักษณะโคนิดิโอฟอร์และโคนิเดียของ *Penicillium sp*

ที่มา : Samson และ Ellen (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 ลักษณะของ *Penicillium sp* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ที่มา : Samson และ Ellen (1988)

โครงสร้างและลักษณะของไซแลน

ไซแลนเป็นส่วนประกอบหลักทั้งในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน ประกอบด้วยพันธะ 1,4-เบต้า-ดี-ไซโลไพราโนซิล (1,4-β-D-xylopyranosyl) (Whistler and Richards, 1970) ส่วนมากไซแลนที่พบจะเป็นพวกเฮทเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide) มีหมู่แทนที่ต่างกันในสายโซ่หลัก (backbone) และโซ่ข้าง (sidechain) (Biely, 1985; Puls and Poutaner, 1989) หมู่แทนที่ในสายโซ่หลักโดยทั่วไปจะเป็นอะซิติล (acetyl) อะราบิโนซิล (arabinosyl) และกลูคูโร-โนซิล (glucuronosyl) (Whistler และ Richards, 1970) ส่วนโฮโมไซแลนมีหมู่แทนที่เป็นไซโลซิลเพียงอย่างเดียว และพบได้ไม่มากนักในธรรมชาติ

คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

เอนไซม์ไซลาเนสคงตัวที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลา 3 ชั่วโมง จะสูญเสียกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส (Chen, et. al., 1997) ทั้งนี้ความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์ไซลาเนสจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ด้วย เอนไซม์ไซลาเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากเชื้อรามีพีเอชที่เหมาะสมในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด ประมาณ 5.0 และเสถียรที่พีเอช 2.0 ถึง 9.0 (Buchert, et. al., 1994) แต่เอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากแบคทีเรียมีพีเอชที่เหมาะสมค่อนข้างเป็นกลาง (Breccia, et. al., 1998) เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Cyathus stercoreus* จะเสถียรที่พีเอช 4.5-7.5 ระยะเวลา 2 ชั่วโมง แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ความเสถียรจะลดลง (Saxena, et. al., 1994) เชื้อ *Bacillus amyloliqueficiens* จะเสถียรที่พีเอช 9 (Breccia, et. al., 1998) และจากเชื้อ *Schizophyllum radiatum* เสถียรที่พีเอชช่วง 5-7.5 (Cavazzoni, et. al., 1989) เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อราและแบคทีเรียส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์ที่ทนต่ออุณหภูมิต่ำกว่า 40-50 องศาเซลเซียส (Buchert, et. al., 1994) เช่น เอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเชื้อ *Streptomyces viridosporus* T74 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในช่วงอุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส (Magnuson and Crawford, 1997) แต่เชื้อ *Thermotoga spp.* สามารถผลิตเอนไซม์ที่ทนอุณหภูมิสูง (thermophilic enzyme) ได้ถึง 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Buchert, et. al., 1994)

แหล่งที่พบเอนไซม์ไซลาเนส

จะพบเอนไซม์ไซลาเนสได้ทั่วไปในธรรมชาติ อาจพบในแบคทีเรียที่อยู่ในทะเลและพื้นดิน แบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง สาหร่ายทะเล โปรโตซัว สัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง หอยทาก แมลง และเมล็ดพืชที่กำลังงอก (Sunna and Antranikian, 1997)

โครงสร้างและการทำงานของไซลาโนไลติกเอนไซม์ (xylanolytic enzyme)

เอนไซม์ไซลาเนสเป็นไซลาโนไลติกเอนไซม์ที่มีการทำงานร่วมกันในการย่อยสลายทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากว่าเซลลูโลสมีโครงสร้างที่ซับซ้อนและมีหมู่แทนที่ที่แตกต่างกันหลายชนิด จึงต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดเพื่อทำงานร่วมกันในการย่อยหมู่แทนที่ต่าง ๆ เช่นในเฮทเทอโรไซแลน (heteroxylan) ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีหมู่แทนที่ในโซ่ข้างหลายหมู่ เอนไซม์จะต้องทำการไฮโดรไลซิสร่วมกัน โดยเอนไซม์ เบต้า-1,4-เอนโดไซลาเนส (β-1,4-endoxylanase) จะย่อยสลายโซ่หลักของไซแลน (1,4-เบต้า-ดี-ไซแลน;1,4-β-D-xylan) โซ่ข้างหมู่แทนที่ต่าง ๆ จะถูกย่อยโดยแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส (α-L-arabinofuranosidase) อะซิติลไซแลนเอสเทอเรส (acetylxylan esterase) และ เบต้า-กลูคูโรนิเดส (β-glucuronidase) (Sunna and Antranikian, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของเอนไซม์ไซลาเนสที่เกี่ยวข้องในการย่อยไซแลน

1.เอนโดไซลาเนส (endoxylanase) (1,4-β-D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.8) มีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรต โดยจะย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) ในเฮทเทอโรไซแลน พันธะที่ถูกย่อยสลายจะขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสับสเตรตด้วย ผลผลิตจากการย่อยสลายจะอยู่ในรูปไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) และจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นไซโลไตรโอส (xylotriose) ไซโลไบโอส (xylobiose) และไซโลส (xylose) (Deckker and Richard, 1976 ; Wong, et. al., 1988)

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของเอนโดไซลาเนสจากแบคทีเรียและเชื้อราจะขึ้นอยู่กับมวลโมเลกุลและจุดไอโซอิเลคทริกพอยท์ (isoelectric point)

2.เบต้า-ไซโลซิเดส (β-xylosidase) (β-D-xyloside xylohydrolase;EC 3.2.1.37) จะย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์และไซโลไบโอส จากปลายที่ไม่สามารถเกิดปฏิกริยารีดิวซ์ (non reducing end) พบได้ทั้งในแบคทีเรียและเชื้อรา ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นไซโลส

3.แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส (α-L-arabinofuranosidase;EC 3.2.1.55) แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดสจะย่อยสลายทั้งพันธะ 1,3 และ 1,5 แอลฟา-แอล-อะราบิโนซิลฟิวราโนซิลในอะราบิโนไซแลน (arabinoxylan) โดยจะย่อยพันธะ 1,3 ที่เชื่อมกับอะราบิโนฟิวราโนซิลก่อน แล้วจะค่อย ๆ ย่อยแอลฟา-แอล-1,5-อะราบิแนน (α-L-1,5-arabinan) ได้ผลิตภัณฑ์คือ อะราบิโนส (arabinose)

4.แอลฟา-กลูคูโรนิเดส (α-glucuronidase) แอลฟา-กลูคูโรนิเดสจะย่อยสลายพันธะแอลฟา 1,2 ที่เชื่อมระหว่างกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) และไซโลสในกลูคูโรโนไซแลน ความจำเพาะต่อสับสเตรตของแอลฟา-กลูคูโรนิเดสขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ที่ได้จาก *Agaricus bisporus* ต้องการสับสเตรตคือ กลูคูโรโนไซแลนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ

5.อะซิติลไซแลน เอสเทอเรส (acetylxylan esterase;EC 3.1.1.6) เอนไซม์นี้จะเคลื่อนย้ายหมู่โอ-อะซิติล (O-acetyl) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และที่ 3 ของไซแลน อะซิติลไซแลนเอสเทอเรส จาก *Trichoderma reesei* จะย่อยกรดอะซิติกจากหมู่แทนที่อะซิติลของไซโลโอลิโกเมอร์ (xylooligomer)

6.เฟอร์รูลิก (ferulic) และพารา-คิวเมอร์ริก แอซิด เอสเทอเรส (p-coumaric acid esterase) กรดเฟอรูลิก และพารา-คิวเมอริกเชื่อมด้วยพันธะเอสเทอร์ (Bacon, et. al., 1975) คิวเมอริก แอซิด เอสเทอเรส แยกพันธะเอสเทอร์ระหว่างอะราบิโนสซึ่งเป็นโซ่ข้างและกรดฟีรูริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ferulic acid) ในไซแลน ส่วนพารา-คิวเมอริก เอซิด เอสเทอเรสจะแยกพันธะเอสเทอร์ระหว่างอะราบิโนสและกรดพารา-คิวเมอริก

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ในปัจจุบันมีการผลิตเอนไซม์หลายชนิดทั้งในการค้าและใช้ในอุตสาหกรรม เอนไซม์ไซลาเนสก็เช่นกัน ได้มีผู้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ดังนี้

1.ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ธาตุอาหารที่เชื้อจุลินทรีย์ต้องการมีหลายชนิดซึ่งบางชนิดต้องการปริมาณมาก (macroelement) บางชนิดต้องการปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ (microelement) ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผลคือ ถ้าความเข้มข้นของอาหารมีน้อยเกินไป เชื้อจุลินทรีย์จะไม่สามารถใช้คาร์บอนเพื่อนำไปสร้างพลังงานและเซลล์ได้อย่างเพียงพอ ทำให้เชื้อเจริญและผลิตเอนไซม์ได้อย่างไม่เต็มที่ แต่ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนมากเกินไป อาหารมีความเข้มข้นมากเกินไป จะทำให้อาหารหนืดและอาจจะไปมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตได้ มีการใช้เซลลูโลสธรรมชาติ เช่น รำข้าวสาลี ฟางข้าวสาลี ฟางข้าว กากถั่วเขียว และรำข้าว ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* A99 ซึ่งฟางข้าวสาลี 10 เปอร์เซ็นต์ จะให้ปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสมากที่สุด (Archana and Satyanarayana, 1997)

การเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma harzianum* E58 บนอาหารที่มีความเข้มข้น 0.1-3.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอาหารผสมระหว่างไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ และ stream-treat aspenwood (SEA-WS) จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าเอนไซม์เอนโดกลูโคเนส เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน แต่จะผลิตเอนไซม์เอนโดกลูโคเนสได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน และเมื่อแยกแหล่งคาร์บอนและทำการเลี้ยง พบว่าไซแลน 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงกว่า solka floc 1 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ผสมกันกับที่แยกใช้ พบว่าที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ กับ SEA-WS 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมดีที่สุด (Senior, et.al.,1989)

เบิร์ชวูด ไซแลน (birchwood xylan) 1 เปอร์เซ็นต์ ถูกนำมาใช้เลี้ยงเชื้อ *Thermatoga marittima* สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสบริสุทธิ์ ซึ่งมีกิจกรรมจำเพาะ 131 ยูนิต/มิลลิกรัม (Chen, et. al., 1997)

การเลี้ยงเชื้อ *Thermomonospora fusca* BD25 ให้ผลิตเอนไซม์ 3 ชนิดคือ เบต้า-ไซลาเนส เบต้า-เอนโดกลูคาเนส และเพอร์ออกซิเดส โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนระหว่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และไซแลน 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แทนฟางที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน เชื้อ *T. fusca* BD25 จะผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสลดลงเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนแทนฟาง และตรวจไม่พบว่ามีเพอร์ออกซิเดสเมื่อใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสแทนฟาง แต่เอนไซม์ไซลาเนส เบต้า-เอนโดกลูคาเนสจะยังคงมีกิจกรรมสูงเมื่อใช้ฟางข้าวและไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน (Trigo and Ball, 1994)

เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* NCIM 1207 ในอาหารที่มีไซแลนความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบรำข้าวสาลี 4.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถใช้รำข้าวสาลีผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงสุด ไซแลนความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ผลิตได้ 10.0 ยูนิต/มิลลิลิตร.) เชื้อใช้ในการผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ (9.7 ยูนิต/มิลลิลิตร.) เพียงเล็กน้อยซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยสรุปจึงใช้รำข้าวสาลี 4.0 เปอร์เซ็นต์ และไซแลน 3.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และเบต้าไซโลซิเดส (Gokhale and Deobagkar, 1986)

ฟางข้าวที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ใช้เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus fumigatus* IMI255091 สามารถผลิตเอนไซม์ เบต้า-ดี-กลูโคซิเดสได้ในปริมาณสูง แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ จะผลิตเอนไซม์ได้ลดลง เพราะความเข้มข้นมากทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อหนืด การถ่ายเทมวลและอากาศจะไม่ดี ทำให้เชื้อเจริญน้อยลง และผลิตเอนไซม์ลดลง (Wase, et. al., 1984)

เอนไซม์จากเชื้อ *Cyathus stercoreus* ที่เลี้ยงในเฮมิเซลลูโลสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ 1,600 ยูนิต/ลิตร สูงกว่าใช้ไซแลนความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีกิจกรรม 760 ยูนิต/ลิตร แต่เปลือกข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อใช้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ให้กิจกรรมสูงถึง 2,000 ยูนิต/ลิตร ส่วนฟางข้าวสาลีเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดคือ 2,800 ยูนิต/ลิตร (Sexena, et. al., 1994)

เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Trichoderma viride* โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กันคือ เปลือกข้าวบาร์เลย์ เปลือกข้าว ฟางข้าวสาลี เส้นใยปอกระเจา กิ่งปอกระเจา (jute stick) กระดาษหนังสือพิมพ์ sulphite pulp acicel และไซแลน พบว่าเมื่อใช้ sulphite pulp เป็นแหล่งคาร์บอน เอนไซม์ไซลาเนส และเบต้า-กลูโคซิเดสมีกิจกรรมสูงสุด (190.0 ยูนิต/มิลลิลิตร.) รองลงมาคือ จากเปลือกข้าวสาลี (111.2 ยูนิต/มิลลิลิตร.) (Gome, et. al., 1991)

solka-floc 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* โดยมีกิจกรรมสูงสุด 207 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ larch wood xylan 1 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสูงกว่านี้จะยับยั้งการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์เอนไซม์ และถ้าใช้ canola meal เป็นแหล่งคาร์บอนจะพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจะสูงขึ้นตามความเข้มข้นจนถึงความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุด 210 ยูนิต/มิลลิลิตร แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นมากกว่านี้ อาหารจะมีความหนืด ทำให้ยากต่อการกวนและให้อากาศ (Gattinger, et. al., 1990)

ทำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus circulans* B6 โดยใช้ไซแลนความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *B. circulans* B6 สามารถใช้ไซแลนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ในการผลิตไซลาเนสได้สูงสุด และมีการเติมดี-กาแลกโตส (D-galactose) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 1 3 และ 5 มิลลิกรัม/ลิตร ลงในไซแลนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าไซแลน 10 มิลลิกรัม/ลิตร และเติมดี-กาแลกโตส 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะมีกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 8.1 ยูนิต/มิลลิกรัม

2. ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

แหล่งไนโตรเจนไม่ว่าจะเป็นสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ก็มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Gome, et. al., 1991) โดยเชื้อจะนำไนโตรเจนไปใช้สำหรับเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโนเพื่อสังเคราะห์เซลล์ ซึ่งแหล่งไนโตรเจนจะมีจำนวนไม่มากที่ศึกษาการใช้งาน เช่น การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cyathus stercoreus* ในอาหารพื้นฐาน (basal medium) โดยเติมไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ ยูเรีย กรดกลูตามิก เคซีนไฮโดรไลเสท เคซีน เปปโตน แอมโมเนียมไนเตรต และไดแอมโมเนียมซัลเฟต แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน พบว่าแหล่งที่ได้จากสารอินทรีย์จะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าไนโตรเจนที่ได้จากสารอนินทรีย์ (Sexena, et. al., 1994)

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและไซลาเนสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* โดยไม่มีการควบคุมพีเอชเริ่มต้น พบว่าใช้ยูเรียมีผลทำให้พีเอชเพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 6.7 (ในอาหารที่มียูเรีย 1.5 กรัม/ลิตร ร่วมกับโปรติโอสเปปโตน 3 กรัม/ลิตร และยีสต์สกัด 1.0 กรัม/ลิตร) และในอาหารที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวในปริมาณ 1.5 กรัม/ลิตร พีเอชจะเป็น 6.5 ภายใน 10 วัน เนื่องจากมีการกำจัดแอมโมเนียไปเป็นยูเรีย ในอาหารที่ใช้โปรติโอสเปปโตน 3 กรัม/ลิตร และยีสต์สกัด 1.0 กรัม/ลิตร พีเอชสุดท้ายจะเป็น 6.0 ในอาหารที่มีโปรติโอสเปปโตน 3 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวพีเอชสุดท้ายจะเป็น 5.9 ในอาหารที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวในปริมาณ 1.0 กรัม/ลิตร พีเอชจะเป็น 5.7 แต่ถ้าไม่มียูเรียพีเอชจะลดลงเป็น 4.7 เป็นที่ทราบกันดีว่าพีเอชมีผลต่อการผลิตเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลลูเลสและไซลาเนส ที่พีเอช 4.0 จะผลิตเอนโดกลูคาเนสได้สูงสุด และพีเอช 6.0-7.0 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูง โดยใช้เซลลูโลสและไซแลนเป็นสับสเตรต (Haapala, et. al., 1996)

แหล่งไนโตรเจนที่ศึกษาว่าเหมาะสมกับการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus fumigatus* IMI 246651คือ NH_4NO_3 ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร และรองลงมาคือ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร (Stewart and Parry, 1981)

แหล่งไนโตรเจนทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ปริมาณเปปโตนมีผลอย่างมากต่อกิจกรรมเอนไซม์ เมื่อเพิ่มปริมาณเปปโตนจาก 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เชื้อ *Trichoderma viride* ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เพิ่มขึ้นแต่เมื่อทดลองใช้ไดแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ความเข้มข้น 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แหล่งไนโตรเจนทั้งสองชนิดนี้ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในทุกความเข้มข้น (Gome, et. al., 1992)

3. ผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

การศึกษาอิทธิพลของพีเอช ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้เซลลูโลสและไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้เซลลูโลสจะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับที่พีเอช 4.0 ในขณะที่จะผลิตไซลาเนสได้มากที่พีเอช 6.0-7.0 และเมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ไซแลนเป็นสับสเตรตที่พีเอชสูง ๆ (6.0-7.0) เชื้อราจะผลิตไซลาเนสได้มากกว่าที่พีเอช 4.0 เช่นกันและจะผลิตเซลลูเลสได้ต่ำทุกพีเอชที่ทดลองคือ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 7.5 (Bailey, et. al., 1993) พีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesei* เท่ากับ 6.0-7.0 จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด โดยใช้ไซลูโลส (xylulose) และไซแลน เป็นแหล่งอาหาร (Haapala, et. al., 1996)

ส่วนการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Trichoderma longibrachiatum* จะใช้พีเอชเริ่มแรกของอาหารที่เลี้ยงอยู่ที่ 4.5-6.5 เมื่อเชื้อเจริญจะทำให้พีเอชเพิ่มขึ้นอีก 0.5-1.2 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสคือ 6.5-7.7 และพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 4.8-5.8 (Royer and Nakas, 1989)

เอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* พีเอช 3.5 ถึง 6.0 มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ที่ใช้ 0.05 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง และพบอีกว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสคือ 4.5-4.6 พีเอชที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ไซลาเนสคือ 5.2 (Gome, et. al., 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองผลิตไซลาโนไลติกเอนไซม์ที่พีเอช 6.5 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด โดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (หญ้าบด) 1 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Das and Nanda, 1994)

เอนไซม์ ดี-ไซลาเนสจากการผลิตของเห็ด *Schizophyllum radiatum* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ 4.9 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และจะเสถียรในช่วงพีเอชที่แตกต่างกันคือ เอนไซม์จะมีกิจกรรม 77.3 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 4.0 หลังจากเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ที่ 25 องศาเซลเซียส 94.6 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 4.6 และกิจกรรมจะได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 5.0-7.5 แต่กิจกรรมจะลดลงเหลือ 98 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 8.0 (Cavazzoni, et. al., 1989)

การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (carboxymethylcellulase) และเอนไซม์ไซลาเนสจะเริ่มถูกสร้างในสภาวะที่พีเอชมีความเป็นกรดถึงความเป็นกลาง (6.0-7.0) จากเชื้อ *Cellulomonas* และ *Micrococcus spp.* (Sexena, et. al., 1986) และได้มีการศึกษาพีเอชเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของ *Cyathus stercoreus* คือ 5.6 และพีเอชที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์คือ 5.5 แต่จะเสถียรที่พีเอชในช่วงกว้างคือ 4.5-7.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ 25 องศาเซลเซียส (Saxena, et. al., 1994)

Acidobacterium capsulatum เป็นแบคทีเรียที่ชอบกรด (acidophilic bacterium) เจริญที่พีเอช 3.0-6.0 และจะไม่เจริญเมื่อพีเอชเพิ่มไปถึง 6.5 เอนไซม์ที่สร้างขึ้นจะมีกิจกรรมได้ที่ 1.5-8.5 โดยจะทำงานได้ดีที่สุดที่ 5.0 แต่ที่พีเอช 3.0-8.0 ก็ยังสามารถเกิดกิจกรรมเอนไซม์ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (Inagaki, et. al., 1998)

การผลิตเอนไซม์จาก *Bacillus amyloliquefaciens* จะมีพีเอชที่เหมาะสมประมาณ 6.8-7.0 ซึ่งการเกิดกิจกรรมสูงอยู่ในช่วง 4.0-7.5 และจะเสถียรที่พีเอช 9.0 (Breecia, 1998)

เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่เกิดจากเชื้อ *Thermomonospora fusca* BD25 จะมีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ที่ 7.0-8.0 ที่พีเอช 4.5 และ 10.5 เอนไซม์จะทำงานเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ และที่พีเอช 2.0 และ 12.0 กิจกรรมเอนไซม์จะเหลือเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาของ McCarthy และคณะ (1985) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสคือ 4.5-8.0 เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจะมีพีเอชที่เหมาะสมที่ 6.0 (Trigo and Ball, 1994)

เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* DSM5826 จะทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 4.5-6.5 โดยพีเอชที่เหมาะสมคือ 5.0-7.0 เอนไซม์จะเสถียรที่พีเอช 5.0-9.0 ซึ่งเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมน้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ที่พีเอช 12.0 จะสูญเสียกิจกรรม 30 เปอร์เซ็นต์ และที่พีเอชต่ำกว่าเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมเช่นกันคือที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีเอช 4.0 เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรม 30 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3 วัน และพีเอช 3.0 เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมจนหมดภายในเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (Cesar and Mrsa, 1996)

4. ผลของอุณหภูมิ ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Acidobacterium capsulatum* อยู่ระหว่าง 20-80 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 65 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เอนไซม์เสถียรคือ 20-50 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส ขึ้นไปกิจกรรมจะลดลง เมื่อถึง 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกทำลายสมบูรณ์ (Inagaki, 1998)

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ของ *Bacillus lichenifomis* A99 โดยการทดลองเลี้ยงที่ 26, 37, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ รองลงมาจะผลิตได้ดีที่ 45 องศาเซลเซียส และที่ 26 องศาเซลเซียส จะผลิตน้อยที่สุด (Archana and Satyanarayanas, 1997)

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces viridosporus* T7Aคือ 65-70 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษาของ Marui และคณะ (1985) ก็ได้ผลใกล้เคียงกันคืออยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ที่ผลิตได้จะเสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส (Magnuson and Crawford, 1997)

เชื้อ *Cellulomonas* และ *Micrococcus spp.* จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดจากการผลิตของ *Micrococcus* DS15 และ GS2คือ 30-45 องศาเซลเซียส (Sexena, et. al., 1986)

เอนไซม์ที่เกิดจาก *Bacillus amyloliquefaciens* MIR32 จะเกิดกิจกรรมเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมกับกิจกรรมเอนไซม์ที่ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่เมื่อที่ 65 องศาเซลเซียสขึ้นไปเอนไซม์จะถูกทำลาย ถึงแม้ว่ากิจกรรมจะเกิดที่อุณหภูมิสูงดี แต่เมื่ออุณหภูมิสูงถูกทำลายกิจกรรมเอนไซม์ก็ไม่สามารถเกิดได้เช่นกัน (Breccia, et. al., 1998)

เชื้อ *Cyathus stercoreus* จะเจริญที่อุณหภูมิตั้งแต่ 45 องศาเซลเซียสลงมา และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คือที่ 30 องศาเซลเซียส หลังจากเลี้ยง 9 ถึง 12 วัน เอนไซม์ที่ได้จะเสถียรที่ 25-45 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกทำลาย 60 เปอร์เซ็นต์ และจะถูกทำลายหมดที่ 70 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมเอนไซม์คือ 45-50 องศาเซลเซียส (Saxena, et. al., 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เห็ด *Schizophyllum radiatum* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ให้กิจกรรมสูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส และมีครึ่งชีวิต 12 ชั่วโมงที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เสถียรที่สุด และจะเสถียรน้อยที่สุดที่ 50 องศาเซลเซียส โดยมีครึ่งชีวิตที่ 2.3 ชั่วโมง และเอนไซม์จะมีความไวต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียส(Cavazzoni, et. al., 1989)

กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากเชื้อ *Thermomonospora fusca* BD25 จะสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และจะลดลงเมื่ออุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะเสถียรที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส โดยจะมีครึ่งชีวิตเท่ากับ 70 และ 40 นาที ตามลำดับ แต่เอนไซม์ไซลาเนสและเอนโดกลูคาเนสจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสูงกว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสคือ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไซลาเนสจะเสถียรที่ 80 องศาเซลเซียส มากกว่า 30 นาที และเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสเสถียรที่ 65 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (Trigo and Ball, 1994)

Thermomyces lanuginosus DSM5826 ผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แต่ถ้าเติมกลีเซอรอล (glycerol) เบต้า-เมอแคปโตเอทานอล (β-mercaptoethanol) หรือ โพลิเอทิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) จะสามารถเก็บได้ถึง 96 ชั่วโมงที่ 60 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมถึง 70 เปอร์เซ็นต์ และเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกทำลายมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 40 นาที (Cesar and Mrsa, 1996)

5. ผลของเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีท (actinomyces) *Thermomonospora fusca* BD25 ซึ่งผลิตเอนไซม์ 3 ชนิดคือ เอนโดไซลาเนส (endoxylanase) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) และเพอร์ออกซิเดส (peroxidase) การผลิตเอนไซม์จะมีการผลิตในระยะแรกของการเจริญ และกิจกรรมเอนไซม์จะสูงสุดจนถึงปลายระยะเอ็กโพเนนเชียล (exponential phase) ประมาณ 48-96 ชั่วโมง (Trigo and Ball, 1994)

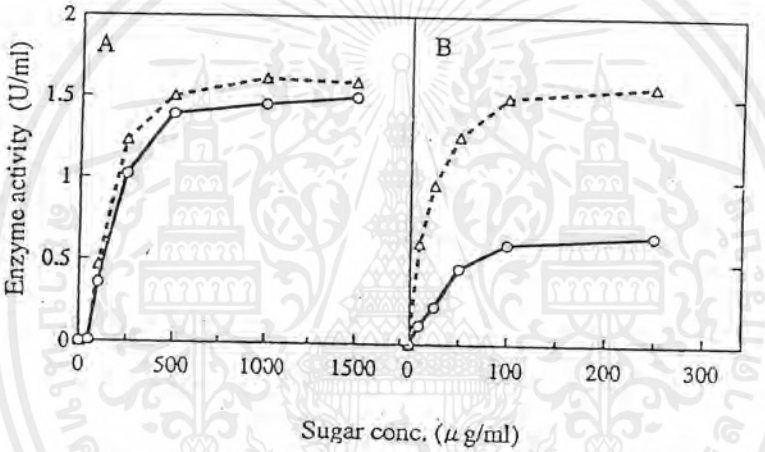
Gattinger และคณะ (1990) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้โคโนลามีล (conola meal) เป็นวัตถุดิบ ได้ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 9-12 วัน เลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบที่ใช้คือ 200 รอบ/นาที พบว่าในช่วงวันที่ 9-12 จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

6. ผลของตัวยับยั้งและตัวเหนี่ยวนำที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

Xu และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ไซลาเนสที่ถูกชักนำโดยแอลซอโบส (L-sorbose) ในเชื้อรา *Trichoderma reesei* PC-3-5 โดยได้ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 220 รอบ/นาที พบว่าแอลซอโบสจะมีผลต่อการชักนำไซลาเนสI (Xyn I) และ ไซลาเนสII (Xyn II) ใน *Trichoderma reesei* ถ้ามีน้ำตาลชนิดนี้อยู่จะทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น โดยเปรียบเทียบกับโซโฟโรส (Sophorose) พบว่าแอลซอโบสจะชักนำการผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าโซโฟโรส ดังรูปที่ 7



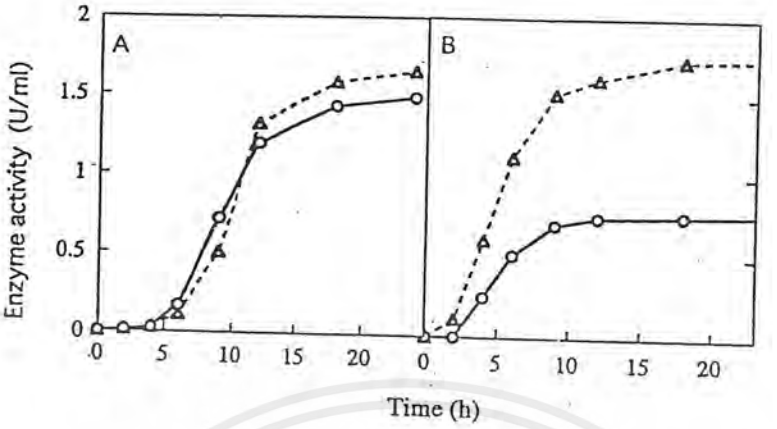
รูปที่ 7 ผลของน้ำตาลแอลซอโบส(A)และโซโฟโรส(B)ที่มีต่อความเข้มข้นของเอนไซม์ใน *Trichoderma reesei* PC-3-5

O กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

Δ กิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนส

และทำการศึกษาต่ออีกว่าแอลซอโบสจะมีผลต่อเอนไซม์อื่นหรือไม่ โดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (Xylanase activity) กับกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (Endogluconase activity) พบว่าแอลซอโบสความเข้มข้น 500ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในช่วง 10 ชั่วโมงแรก กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจะสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนส แต่หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนสจะสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส และแอลซอโบสความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนสจะสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสตลอดการทดลอง ดังรูปที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
35856



รูปที่ 8 แนวโน้มของเอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำในแอลซอโบส(A,500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และซอโฟโรส (B,100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

o กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

Δ กิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนส

การเติมสารพวกกลูโคส มอลต์สกัด เปปโตน น้ำแช่ข้าวโพด และ mustard oil cake อย่างละ 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ลงในรำข้าวสาลีที่ใช้เป็นสับสเตรต สำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Bacillus licheniformis* A99 พบว่ามอลต์สกัด mustard oil cake และเปปโตนยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทดลองใช้ไอออนของโลหะเป็นตัวยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ โดยใช้ Ca^{2+} Co^{2+} Cu^{2+} Fe^{3+} Hg^{2+} K^{+} Mg^{2+} Sn^{2+} Zn^{2+} และ EDTA แต่ละชนิดใช้ในปริมาณ 5 มิลลิโมล เพื่อทดสอบดูว่าแต่ละชนิดมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์หรือไม่ พบว่า Cu^{2+} Fe^{3+} Hg^{2+} จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces viridosporus* T7A โดยไอออนเหล่านี้จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับอะซิดิก อะมิโน แอซิด (Acidic amino acid) ที่บริเวณแอกทีฟไซด์ของเอนไซม์ ส่วนไอออนตัวอื่น ๆ จะไม่ทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (Magnuson and Crawford, 1997)

เชื้อ *Aspergillus ochraceus* 42 ที่เจริญบนหญ้าบดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสและเบต้าไซโลซิเดสจะสูงสุดคือ 6.46 และ 5.00 ตามลำดับ แต่เมื่อความเข้มข้นของอาหารเพิ่มขึ้น กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์จะลดลง เหตุผลเนื่องจากจะมีการหลั่งโปรตีนที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific protein) ออกมาปนกับอาหารมากขึ้น นอกจากนี้ไอออนของโลหะต่าง ๆ ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Ca^{2+} Co^{2+} K^{+} Mg^{2+} Zn^{2+} และ EDTA แต่ละชนิดเติมใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณ 10 โมล/ลิตร จะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) ของลิกโนเซลลูโลสในหญ้า เมื่อมีไอออนของโปแตสเซียมและไอออนของสังกะสีจะเหนี่ยวนำให้เกิดแซคคาริฟิเคชันได้ดีกว่าไอออนของแมกนีเซียม แคลเซียม และแมงกานีส ไอออนที่เติมลงไปที่มีผลต่อแซคคาริฟิเคชันดังนี้ Ca^{2+} 15.12 เปอร์เซ็นต์ Co^{2+} 18.49 เปอร์เซ็นต์ K^{+} 8.43 เปอร์เซ็นต์ Mg^{2+} 20.55 เปอร์เซ็นต์ Zn^{2+} 30.88 เปอร์เซ็นต์ และ EDTA 16.48 เปอร์เซ็นต์ (Das and Nanda, 1994)

8. ผลของทวีน 80 (tween 80) ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทวีน 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cyathus stercoreus* โดยทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างทวีน 80 น้ำมันมะกอก และกลีเซอรอล โดยใช้อย่างละ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) การผลิตเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเป็น 1,000 ถึง 1,350 ยูนิต/ลิตร ซึ่งทวีน 80 มีผลต่อการผลิตมากที่สุด โดยผลิตได้ถึง 1,350 ยูนิต/ลิตร (Saxena, et. al., 1994)

การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในระดับอุตสาหกรรม

1.การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการฟอกเยื่อกระดาษ เพื่อกำจัดลิกนินและลดการใช้คลอรีน

การฟอกเยื่อไม้เพื่อผลิตกระดาษมีปริมาณมากที่สุดถึง 160 ล้านเมตริกตัน/ปี ทั่วโลก ในขณะเดียวกันก็เป็นการกำจัดลิกนินที่ก่อให้เกิดสีน้ำตาลเข้มในกระบวนการฟอกเยื่อไม้ ซึ่งมีการใช้สารเคมีพวกคลอรีนเบส (chlorine-based) ในการช่วยฟอก ลิกนินที่ละลายน้ำที่เกิดจากการผลิตทำให้น้ำมีสีเข้มขึ้นและก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนั้นยังพบสารพิษไดออกซิน (dioxin) ในน้ำเสียที่เกิดจากการฟอกเยื่อไม้อีกด้วย จึงมีการคิดค้นหาวิธีที่จะลดปริมาณการใช้คลอรีนในการฟอกเยื่อไม้ลง

Viikari และคณะ (1986) เป็นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่ใช้วิธีการไบโอบลีชชิ่ง (biobleaching) โดยใช้เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตเป็นทางการค้าจากเชื้อราและแบคทีเรีย เอนไซม์ไซลาเนสที่มีกิจกรรมสูงและมีความเสถียรเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ๆ ได้จากจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิสูง (Thermophilic microorganism) พวกแอคติโนมัยสีท (actinomyces) เป็นแหล่งเอนไซม์ไซลาเนสที่สำคัญและมีรายงานว่ามีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสจาก mesophilic streptomyces เพื่อใช้ในการฟอกเยื่อไม้

การผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *Streptomyces thermoviolaceus* ในการทดสอบเอนไซม์ในการฟอกเยื่อไม้ โดยใช้ความเข้มข้น 1 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สับสเตรตเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด โดยใช้เยื่อไม้ 1, 2, 5, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ กำหนดเอนไซม์ต่อสับสเตรตในสัดส่วน 10 ยูนิต ต่อ 1 กรัมเยื่อไม้ ที่เยื่อไม้ 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) จะค่อนข้างคงที่ เมื่อเวลาเข้าใกล้ชั่วโมงที่ 6 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ส่วนความเข้มข้นอื่น ๆ เอนไซม์จะหลั่งต่อไปเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 10 จะเริ่มคงที่ ความเข้มข้นของเยื่อไม้ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ10 ยูนิต/กรัมเยื่อไม้ ที่ความเข้มข้นเยื่อไม้ตั้งแต่ 2 เปอร์เซนต์ขึ้นไปจะมีการหลั่งน้ำตาลรีดิวซ์อยู่เรื่อย ๆ ขณะที่ความเข้มข้นเยื่อไม้ 1 เปอร์เซ็นต์ จะพบน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณเท่าเดิมเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง การตรวจน้ำตาลรีดิวซ์นี้ แสดงให้เห็นว่าเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสระหว่างเอนไซม์และสับสเตรตได้ดีเพียงใด (Garg, et. al., 1996)

2.การผลิตและการนำเซลลูโลไลติกเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในการไฮโดรไลซิสของเสียทางการเกษตร

ของเสียทางการเกษตรเช่น ฟางข้าว รำข้าวสาลี ฟางข้าวสาลี ผงเซลลูโลส กระดาษหางนมและอื่น ๆ อีกมากมายที่สามารถนำมาใช้เป็นสับสเตรตในการผลิตเอนไซม์ แต่มีปัญหาตรงที่ว่ากระบวนการแแปรสภาพวัตถุดิบ ให้สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอ็นไซม์นั้น ต้องใช้ต้นทุนสูง ดังนั้นจึงต้องใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก รำข้าวสาลีและฟางข้าวซึ่งเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งที่ได้จากการเกษตรและมีปริมาณมาก สามารถนำมาใช้ผลิต เอนไซม์เซลลูเลส เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และ ดี-ไซลา-เนส โดยใช้จุลินทรีย์พวกเซลลูโลไลติกเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น *Aspergillus ustus* *Trichoderma sp.*(a) *trichoderma sp.*(b) *Botrytis sp.*และ *Sporotrichum pulverulentum* โดยเปรียบเทียบในสับสเตรตระหว่าง ฟางข้าวและรำข้าวสาลี ใช้การหมักแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semi solid fermentation)

การย่อยสลายมวลชีวภาพของพืชในธรรมชาติ เกียวข้องกับเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ จากการศึกษาการใช้เชื้อผสมระหว่างจุลินทรีย์ 2 ชนิดเพื่อดูกิจกรรมของ เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส พบว่าไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอ็นไซม์ได้ เพราะว่าผลผลิตจากการเมตาโบไลต์ของจุลิทรีย์ชนิดแรก จะยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตเอ็นไซม์ของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

ฟางข้าวเป็นสับสเตรตที่ดีสำหรับการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสและดี-ไซลาเนส รูปแบบอื่นจากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส พบว่าโปรตีนที่ได้จากฟางข้าวเพิ่มขึ้นจาก 3 เปอร์เซ็นต์ เป็น 7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่รำข้าวสาลีปริมาณโปรตีนจะลดลงจาก 14 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นไปได้ที่จุลินทรีย์ใช้โปรตีนในรำข้าวสาลีเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโต โปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายนี้สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปใช้เลี้ยงสัตว์ได้ (Shamala and Sreekantiah, 1986)

3.ใช้เอ็นไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสเพื่อแก้ปัญหาทางด้านพลังงานและการขาดแคลนอาหาร

การย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญกระบวนการหนึ่งทางเทคโนโลยีชีวภาพและสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล เพื่อใช้ผลิตสารละลายอินทรีย์เช่นเอทานอล (Bill and Ingram,1992 ; XU and Taylor,1993) หรือโปรตีนเซลล์เดียว (Moo-yang, et. al., 1992) เพื่อเป็นการแก้ปัญหาทางด้านพลังงานและการขาดแคลนอาหาร (Lutzen, et. al., 1983 ;Smith, et. al., 1985) โดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสและเอ็นไซม์ไซลาเนสเพื่อเปลี่ยนของเสียทางการเกษตรให้เป็นสารละลายน้ำตาล

ของเสียทางการเกษตรสามารถเปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาลได้ โดยเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิ-เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ 2 ชนิดคือ *Sporotrichum pruinosum* และ *Arthrographis sp.* โดย *Sporothichum pruinosum* สามารถเกิดไฮโดรไลซิสสูงสุดประมาณ 15.1 เปอร์เซ็นต์ และ Arthrographis *sp.* 7.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เปลือกแตงโมเป็นสับสเตรต การทำสับสเตรตให้มีสภาพเป็นด่างสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซิสได้ การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่ละลายน้ำได้ใช้วิธี HPLC โดยจะพบกลูโคสมากที่สุดและไซโลไบโอสในปริมาณเล็กน้อย ส่วนผลผลิตพวกไซลาโนไลซิสส่วนมากจะเป็นพวกไซโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ ส่วนไซโลไบโอสจะพบไซโลสและอะราบิโนสในปริมาณน้อย (Okeke and Obi, 1994)

Buchert และคณะ (1994) ได้ทำการทดลองศึกษาการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ พบว่ามีปัญหาที่เกิดจากการใช้คลอรีน (Chlorine) ในอุตสาหกรรมฟอกขาวของกระดาษคือคลอรีนส่วนหนึ่งจะกลายเป็นก๊าซและบางส่วนจะกลายเป็นคลอรีนไดออกไซด์ (Chlorine dioxide) ซึ่งเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมจึงได้นำเอนไซม์ไซลาเนสมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกขาวแทนคลอรีนซึ่งจะไม่เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

เอนไซม์ไซลาเนสได้นำมาใช้ในการฟอกขาวของอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษเพื่อลดการใช้คลอรีน การทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสจะช่วยในการย้ายลิกนิน (Lignin) ออกจากเยื่อซึ่งจะทำให้การฟอกขาวง่ายขึ้น เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อราและแบคทีเรียจะทำงานที่ pH 10 และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Niclsen and Boll, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนในการดำเนินงาน

วัสดุ

วัตถุดิบ

ฟางข้าวที่ใช้จะต้องนำมาตากแดดให้แห้งเพื่อป้องกันเชื้อรา จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดให้มีขนาดไม่เกิน 2.5 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องบดหญ้า และนำมาอบให้แห้งอีกครั้ง จากนั้นจะเก็บไว้ในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท เพื่อป้องกันฟางข้าวดูดความชื้นทำให้เก็บไว้ใช้ได้ตลอดการทดลอง

จุลินทรีย์

เชื้อที่ใช้จะเป็นเชื้อราที่ได้จากการแยกจากธรรมชาติ โดยจะใช้ตัวเลข (1, 4, 5, 6 และ 14) เป็นชื่อเชื้อก่อนที่จะจำแนกว่าเป็นเชื้อชนิดใด โดยทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารวุ้นเอียง PDA (Potato Dextrose Agar) โดยจะถ่ายเชื้อเดือนละ 2 ครั้ง เมื่อเชื้อเจริญและสร้างสปอร์สมบูรณ์แล้วจะเก็บเชื้อไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีน (ภาคผนวก ก)

อุปกรณ์

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
ตู้อบแห้ง
กล้องจุลทรรศน์
ตู้เขี่ยเชื้อ
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
เครื่องวัดพีเอช
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
ตู้เย็น
เครื่องเขย่าหลอด
เครื่องเขย่าขวดรูปชมพู่
เครื่องชั่ง
เครื่องแก้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนและวิธีการ

1. การเตรียมอาหารในการเลี้ยงเชื้อรา

อาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย สารละลายเกลือแร่ประกอบด้วยสารดังต่อไปนี้คือ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 2 กรัม/ลิตร ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) 1.4 กรัม/ลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.3 กรัม/ลิตร แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 0.3 กรัม/ลิตร ยูเรีย 0.3 กรัม/ลิตร โปรติโอสเปปโตน (Proteose peptone) 0.23 กรัม และยีสต์สกัด (Yeast extract) 0.1 กรัม/ลิตร และเติมแร่ธาตุผสม 0.1 มิลลิลตร/ลิตร (แร่ธาตุผสมประกอบด้วย เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 5H_2O$) 5 กรัม/ลิตร ซิงก์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) 1.4 กรัม/ลิตร แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$) และโคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2$) 2 กรัม/ลิตร) จากนั้นปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล แบ่งอาหารใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 75 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอนตามจำนวนที่ต้องการ และทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.การเตรียมสปอร์ของเชื้อราและสารละลายสปอร์

นำเชื้อราที่จะใช้ในการศึกษามาเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ในหลอดทดลอง โดยวางเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อให้เกิดสปอร์เต็มที่ จากนั้นเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นและทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ 2 เดือน เมื่อต้องการนำสปอร์มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว นำสปอร์รามาผสมในน้ำกลั่นที่เติมทวีน 80 ปริมาณ 2-3 หยด ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ให้ได้จำนวนสปอร์ประมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร นำไปเติมในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที สุ่มตัวอย่างทุก ๆ วันเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำตัวอย่างที่สุ่มได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำส่วนใสไปวัดพีเอช และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีของ Tang และคณะ (1987)

3.ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราที่คัดเลือก ดังนี้คือ

3.1 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ใช้ฟางข้าวหรือไซแลน ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน โดยการเติมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ในความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกคือ ยูเรีย เคซีนไฮโดรไลเสท แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) หรือไดแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 และ 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีชุดควบคุมคืออาหารเหลวที่มียูเรีย โปรติโอสเปปโตน และยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.3, 0.25 และ 0.1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

3.3 ผลของพีเอชเริ่มต้น ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้น โดยการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อที่เติมแหล่งคาร์บอนรวมทั้งชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกเป็น 3, 4, 5, 6, 7 และ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

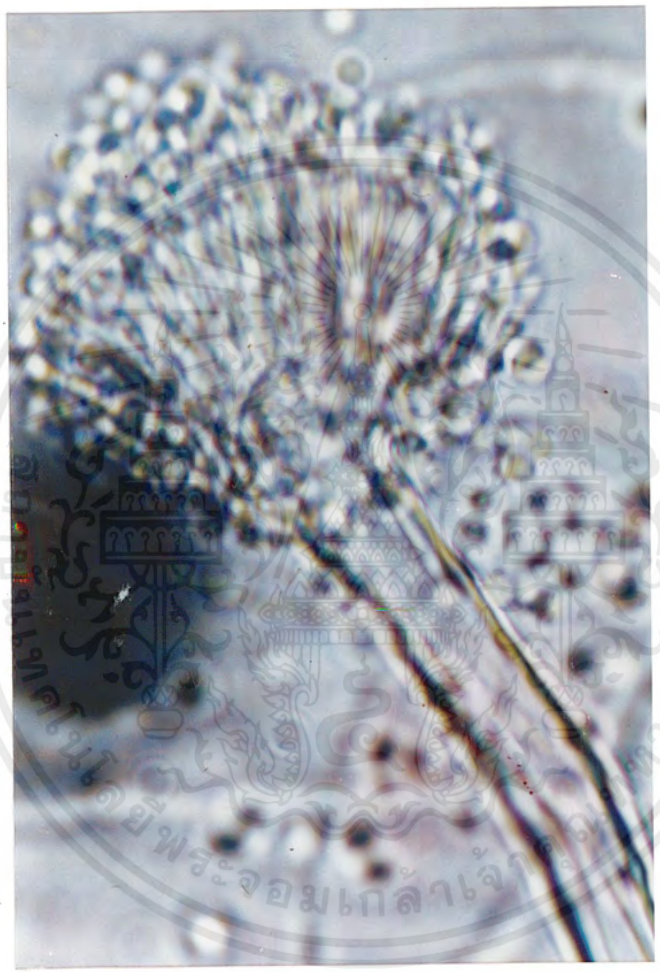
1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

   1.1 เชื้อ 1

   ลักษณะที่สังเกตได้คือ เส้นใยมีสีขาว เมื่อแก่สปอร์มีสีน้ำตาล ดังรูปที่ 9 และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังรูปที่ 10

รูปที่ 9. ลักษณะการเจริญของเชื้อ 1 บนอาหารวุ้นเอียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 ลักษณะของเชื้อ 1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 เชื้อ 4

ลักษณะที่สังเกตได้คือ เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียวอมน้ำตาล ดังรูปที่ 11 และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังรูปที่ 12

รูปที่ 11 ลักษณะการเจริญของเชื้อ 4 บนอาหารวุ้นเอียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 12 ลักษณะของเชื้อ 4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 เชื้อ 5

ลักษณะที่สังเกตได้คือ เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียวอมน้ำตาล ดังรูปที่ 13 และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังรูปที่ 14

รูปที่ 13. ลักษณะการเจริญของเชื้อ 5 บนอาหารวุ้นเอียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 14 ลักษณะของเชื้อ 5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 เชื้อ 6

ลักษณะที่สังเกตได้คือ เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีดำ ดังรูปที่ 15 และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังรูปที่ 16

รูปที่ 15. ลักษณะการเจริญของเชื้อ 6 บนอาหารวุ้นเอียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 16 ลักษณะของเชื้อ 6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

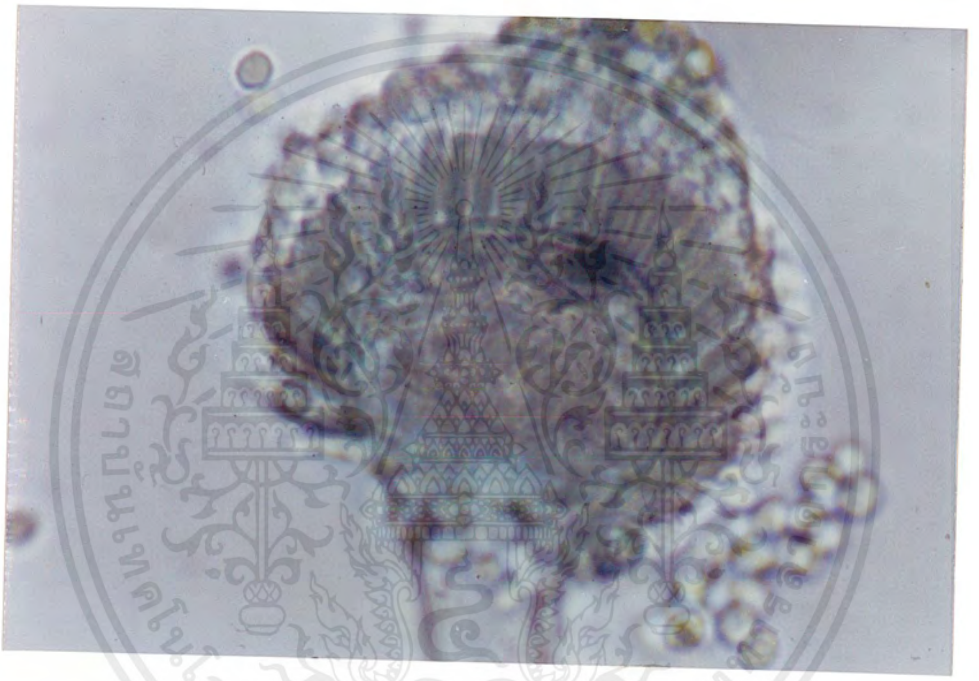
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 เชื้อ 14

ลักษณะที่สังเกตได้คือ เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีน้ำตาลอมเขียว ดังรูปที่ 17 และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังรูปที่ 18

รูปที่ 17 ลักษณะการเจริญของเชื้อ 14 บนอาหารวุ้นเอียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 ลักษณะของเชื้อ 14 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาลักษณะของเชื้อราที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติพบว่า

เชื้อ 1 คือ *Aspergillus sp.*

เชื้อ 4 คือ *Penicillium sp.*

เชื้อ 5 คือ *Penicillium sp.*

เชื้อ 6 คือ *Aspergillus sp.*

เชื้อ 14 คือ *Aspergillus sp.*

จากผลการทดลองลักษณะของเชื้อราคล้ายกับลักษณะของเชื้อราที่ศึกษาโดย Samson และ Ellen (1988)

2.การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อที่คัดเลือกได้จากสภาพธรรมชาติในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว

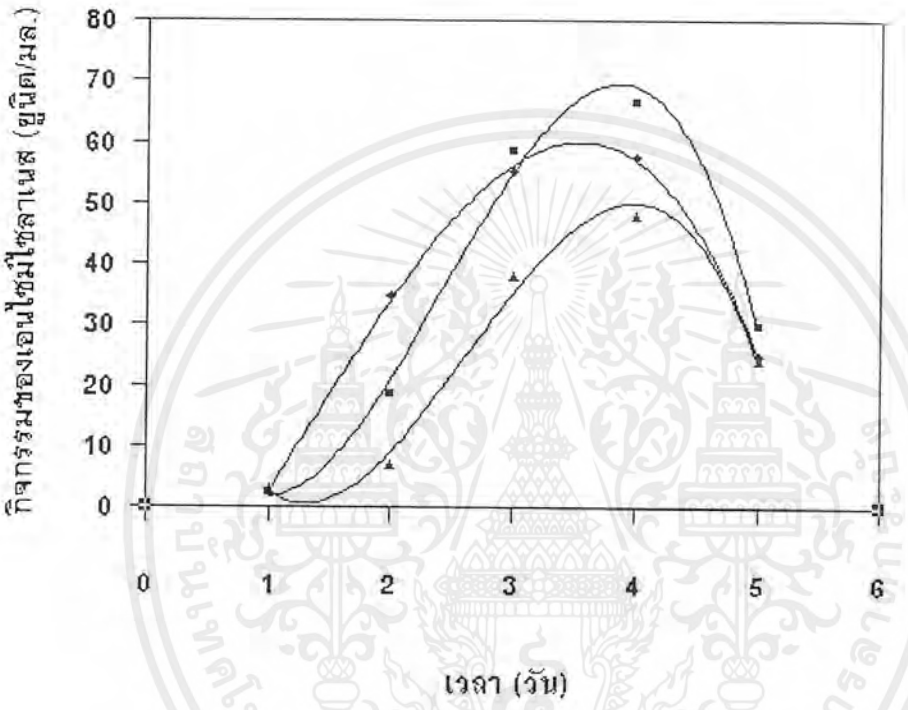
2.1 ใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

2.1.1 ความเข้มข้นของฟางข้าว

จากการทดลองควบคุมความเข้มข้นของฟางข้าวโดยใช้เชื้อ 4 ดังในรูปที่ 19 พบว่าเชื้อ 4 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ความเข้มข้นของฟางข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 4 ของการเลี้ยง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 66.59 ยูนิต/มิลลิลิตร และที่ความเข้มข้นของฟางข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wase และคณะ (1984) พบว่า *Aspergillus fumigatus* IMI255091 สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส ได้ในปริมาณสูงเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าใช้ฟางข้าวมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ จะผลิตเอนไซม์ได้ลดลง เพราะความเข้มข้นมากอาหารจะหนืด การถ่ายเทมวลและอากาศไม่ดี ทำให้เชื้อเจริญได้น้อยลง ในทำนองเดียวกันกับผลการทดลองที่ใช้ฟางข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ จะผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ เพราะที่ฟางข้าว 3 เปอร์เซ็นต์ อาหารจะหนืดการถ่ายเทมวลและอากาศไม่ดี เชื้อ 4 เจริญได้น้อยลง และผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้น้อยลง

ส่วนการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการเจริญเติบโต พบว่าพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อยคือ พีเอชเริ่มต้นในการทดลองเท่ากับ 5.0 พีเอชเปลี่ยนไปเป็น 5.05 เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ส่วนเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน (รูปที่ 20, 21 และ 22)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



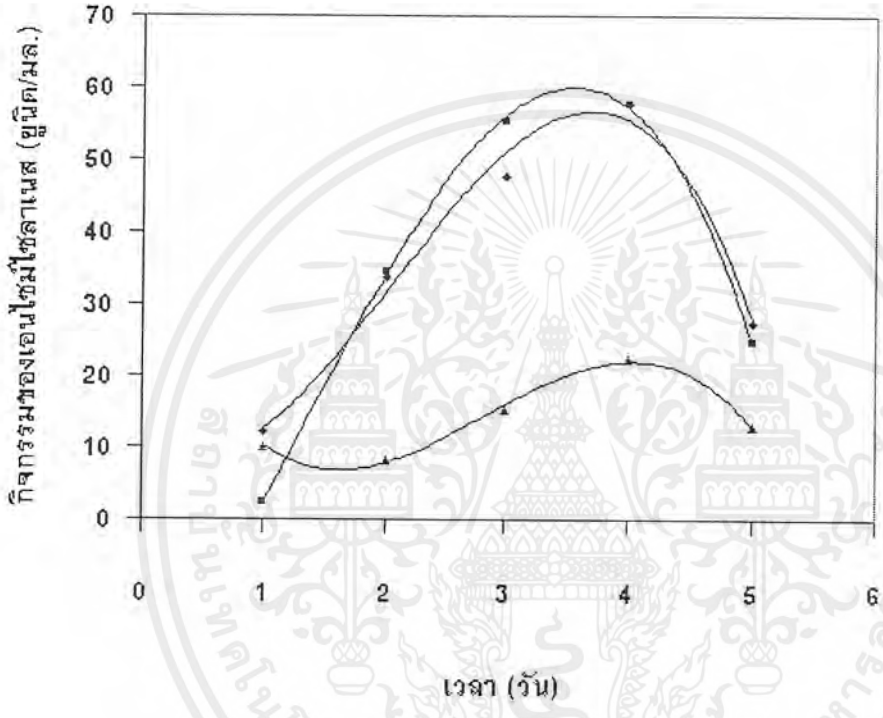
รูปที่ 19 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ 4 โดยใช้ฟางข้าวความเข้มข้นต่าง ๆ

◆ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

■ ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

▲ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



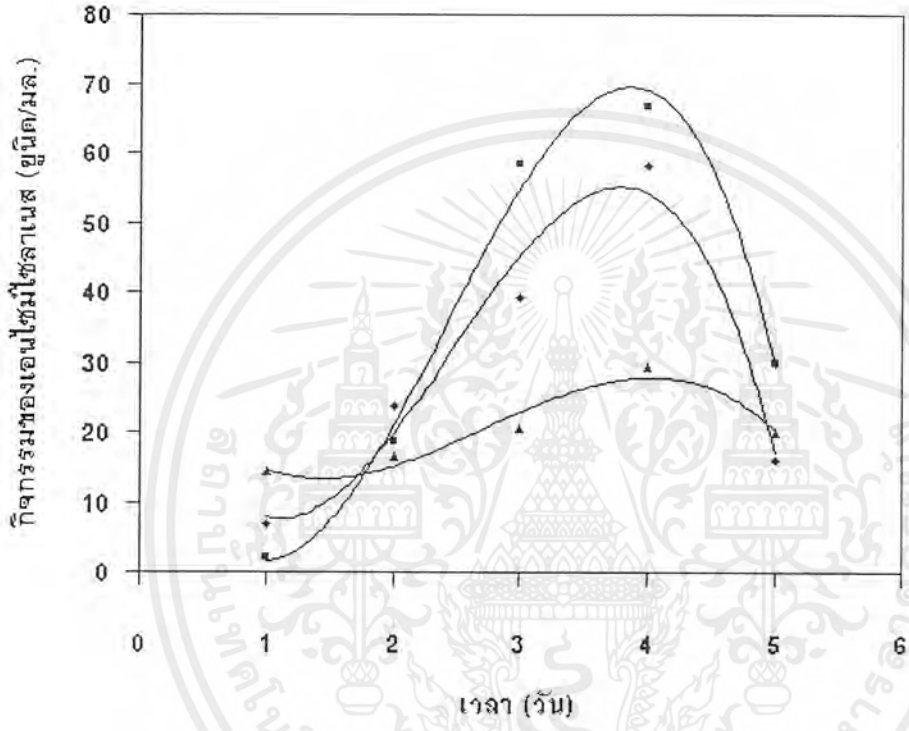
รูปที่ 20 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

◆ เชื้อ 1

■ เชื้อ 4

▲ เชื้อ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



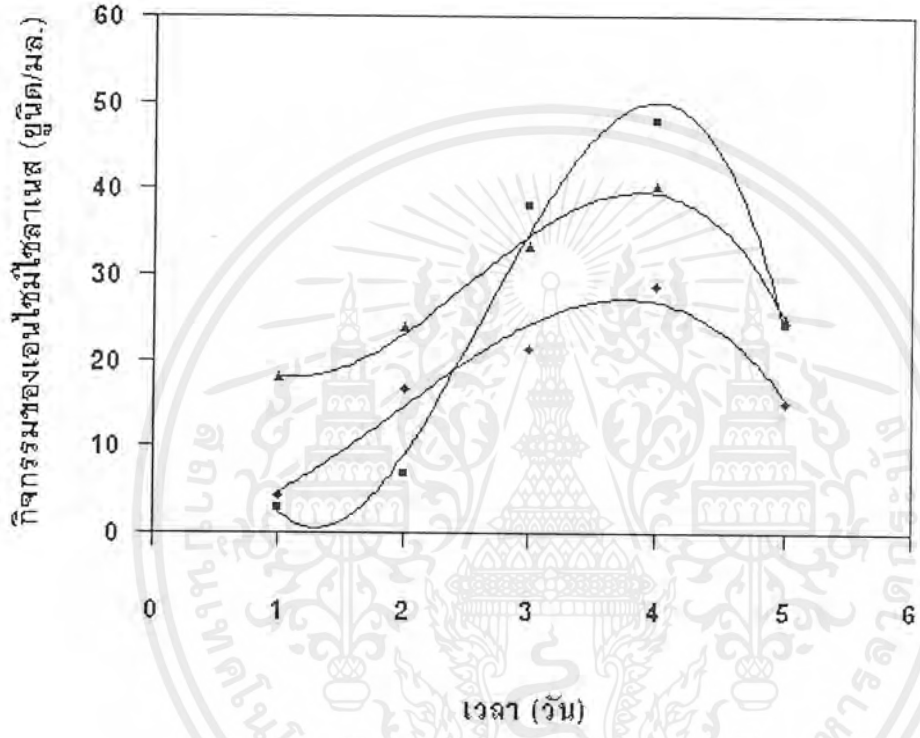
รูปที่ 21 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

◆ เชื้อ 1

■ เชื้อ 4

▲ เชื้อ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 22 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

◆ เชื้อ 1

■ เชื้อ 4

▲ เชื้อ 6

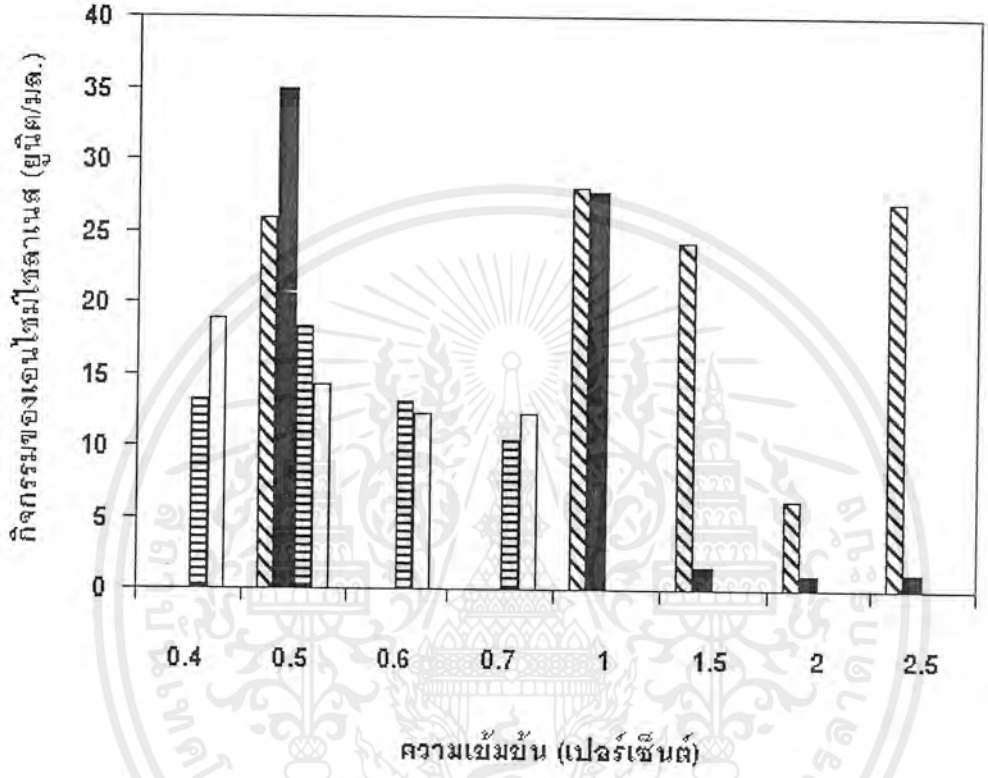
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองควบคุมการใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนคือ ยูเรีย เคซีนไฮโดรไลเสท แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) และไดแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] พบว่าเชื้อ 4 สามารถใช้เคซีนไฮโดรไลเสทและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 34.931 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาคือยูเรียความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 28.047 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้เคซีนไฮโดรไลเสท ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต และไดแอมโมเนียมซัลเฟตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ความเข้มข้นของเคซีนไฮโดรไลเสทเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดโดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของเคซีนไฮโดรไลเสท 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 23 ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองของ Stewart และ Parry (1981) อาจเนื่องมาจาก เชื้อ 4 ซึ่งเป็นเชื้อ *Penicillium* ใช้เคซีนไฮโดรไลเสท และยูเรียซึ่งเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนได้ดีกว่าเชื้อ *Aspergillus fumigatus* IMI246651 พบว่าแอมโมเนียมไนเตรต 1.5 กรัม/ลิตร เชื้อ *Aspergillus fumigatus* IMI246651 จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด และรองลงมาคือไดแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร

ส่วนการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการเจริญของเชื้อรา พบว่าพีเอชเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 1 และ 2 พีเอชสุดท้ายที่ ความเข้มข้นของเคซีนไฮโดรไลเสท 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ คือ 5.38, 5.92, 8.63, 8.74 และ 8.69 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 23 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ 4 โดยเลี้ยงในอาหารที่ใช้ฟางข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน

- ▨ ยูเรีย
- ■ เคซีนไฮโดรไลเสท
- ▤ แอมโมเนียมไนเตรต
- □ ไดแอมโมเนียมซัลเฟต

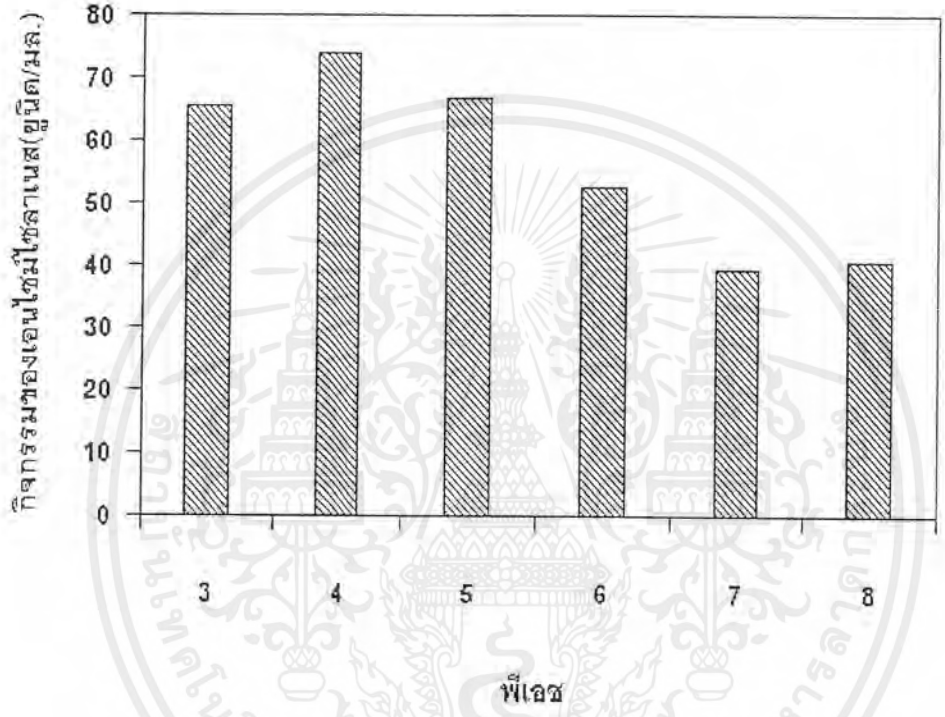
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 พีเอชเริ่มต้น

ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ 4 แสดงในรูปที่ 24 จะเห็นได้ว่าการใช้พีเอชเริ่มต้น 4.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 73.888 ยูนิต/มิลลิลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน รองลงมาคือที่พีเอชเริ่มต้น 5.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 66.895 ยูนิต/มิลลิลิตร อย่างไรก็ตามที่พีเอชเริ่มต้น 3.0, 4.0 และ 5.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่พีเอชเริ่มต้น 4.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าพีเอชเริ่มต้น 6.0, 7.0 และ 8.0 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองของ Haapala และคณะ (1996) พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesei* ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสคือ 6.0-7.0 ซึ่งจะใช้ไซแลนและไซลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน เพราะเชื้อ 4 อาจใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่พีเอชค่อนข้างเป็นกรดได้ดีกว่าพีเอชค่อนข้างเป็นกลาง เมื่อเลี้ยงเชื้อ 4 ในฟางข้าวเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เคซีนไฮโดรไลเสท 0.5 เปอร์เซ็นต์ และที่พีเอชของอาหารเริ่มต้น 4.0 ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุด 492.586 ยูนิต/มิลลิกรัม ดังรูปที่ 25

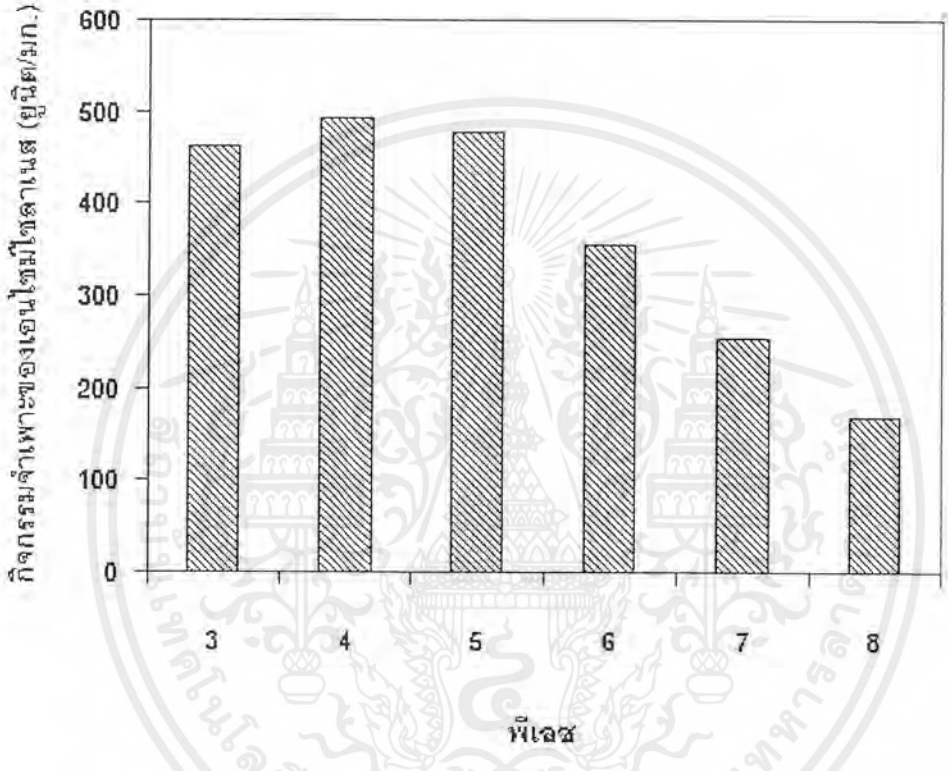
การเปลี่ยนแปลงพีเอช พบว่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่ำคือ 3.0, 4.0 และ 5.0 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน พีเอชของอาหารจะเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับพีเอชอาหารเริ่มต้น โดยจะเพิ่มขึ้นเป็น 5.87, 5.85 และ 5.71 ตามลำดับ แต่พีเอชของอาหารเริ่มต้น 6.0, 7.0 และ 8.0 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน พีเอชจะมีแนวโน้มลดลงเป็น 4.52, 3.86 และ 3.58 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 24 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ 4 ที่เจริญบนอาหารที่ใช้ฟางข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เคซีนไฮโดรไลเสท 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 25 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนส โดยเลี้ยงในอาหารที่ใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เคซีนไฮโดรไลเสท 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น 4.0 และทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

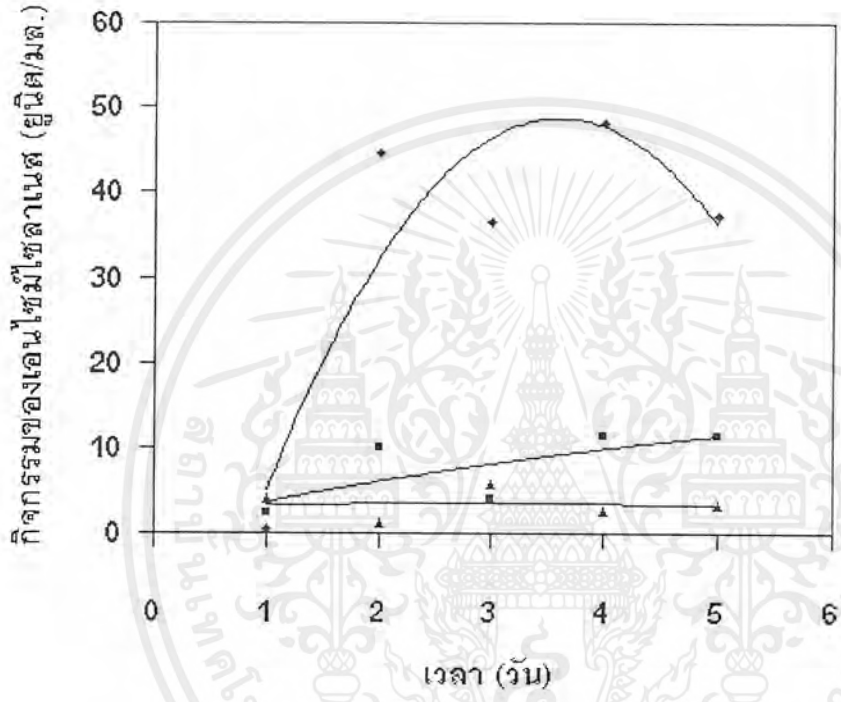
2.2 ใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

2.2.1 ความเข้มข้นของไซแลน

จากการทดลองควบคุมความเข้มข้นของไซแลน โดยใช้เชื้อ 5 ดังแสดงในรูปที่ 26 พบว่าเชื้อ 5 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ความเข้มข้นของไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 4 ของการเลี้ยง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 48.230 ยูนิต/มิลลิลิตร และที่ความเข้มข้นของไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าใช้ไซแลนความเข้มข้น 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการใช้ solka-floc 1 เปอร์เซ็นต์ และ larch wood xylan 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesei* จะสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด แต่ถ้าความเข้มข้นสูงกว่านี้จะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ (Gattinger, et. al., 1990) ในทำนองเดียวกัน ความเข้มข้นของไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ 5 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด แต่ที่ความเข้มข้นของไซแลน 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ของเชื้อ 5

ส่วนการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ พบว่าพีเอชมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยมีพีเอชสุดท้ายของความเข้มข้นของไซแลน 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์คือ 5.87 และ 5.55 ตามลำดับ ยกเว้นไซแลน 3 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอชสุดท้ายลดลงคือ 4.05 ส่วนเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน (รูปที่ 27, 28 และ 29)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



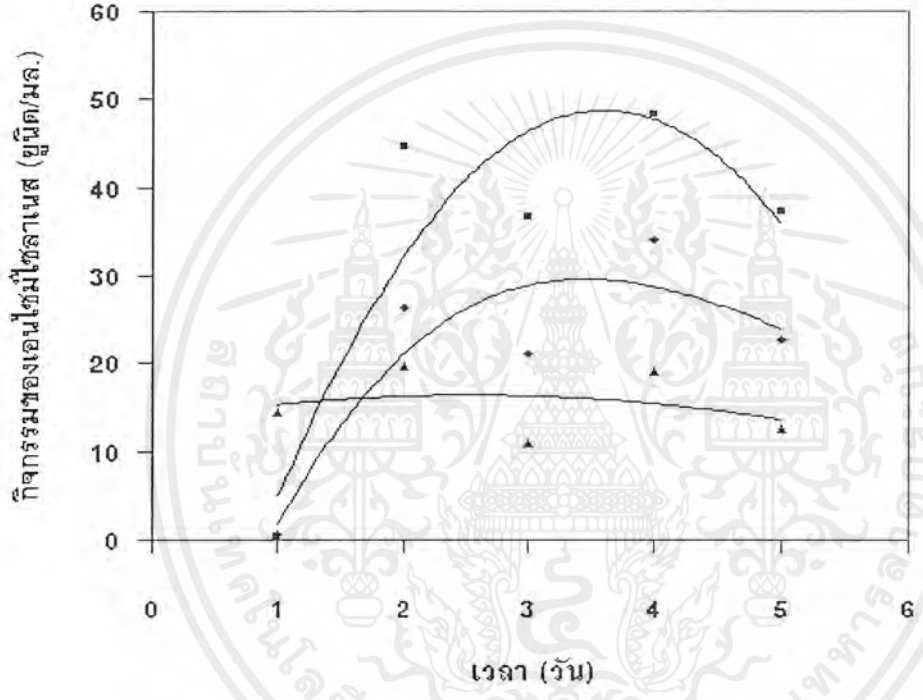
รูปที่ 26 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ 5 โดยใช้ไซแลนความเข้มข้นต่าง ๆ

◆ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

■ ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

▲ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



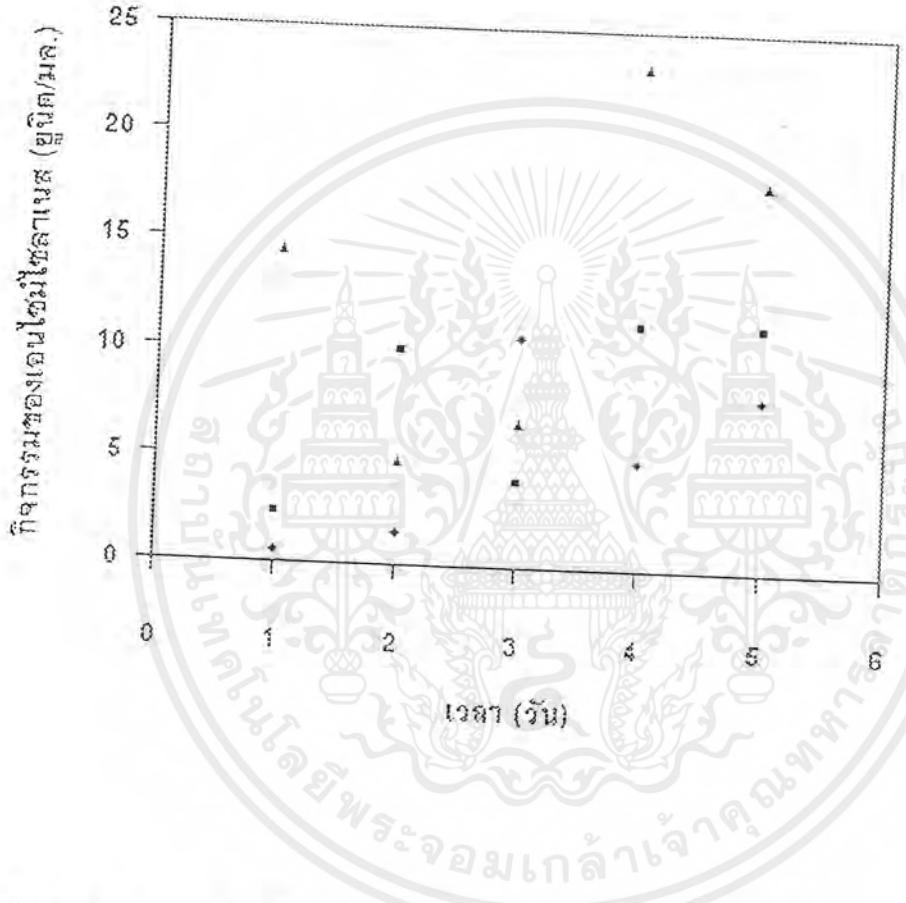
รูปที่ 27 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

◆ เชื้อ 1

■ เชื้อ 5

▲ เชื้อ 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



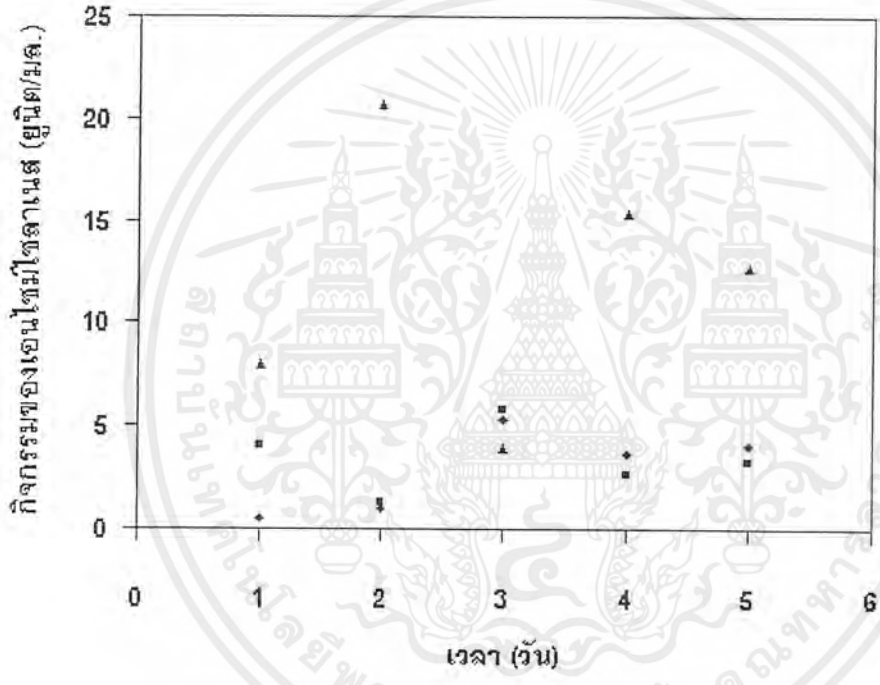
รูปที่ 28 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ไซแลนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

◆ เชื้อ 1

■ เชื้อ 5

▲ เชื้อ 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 29 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ไซแลนความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

◆ เชื้อ 1

■ เชื้อ 5

▲ เชื้อ 14

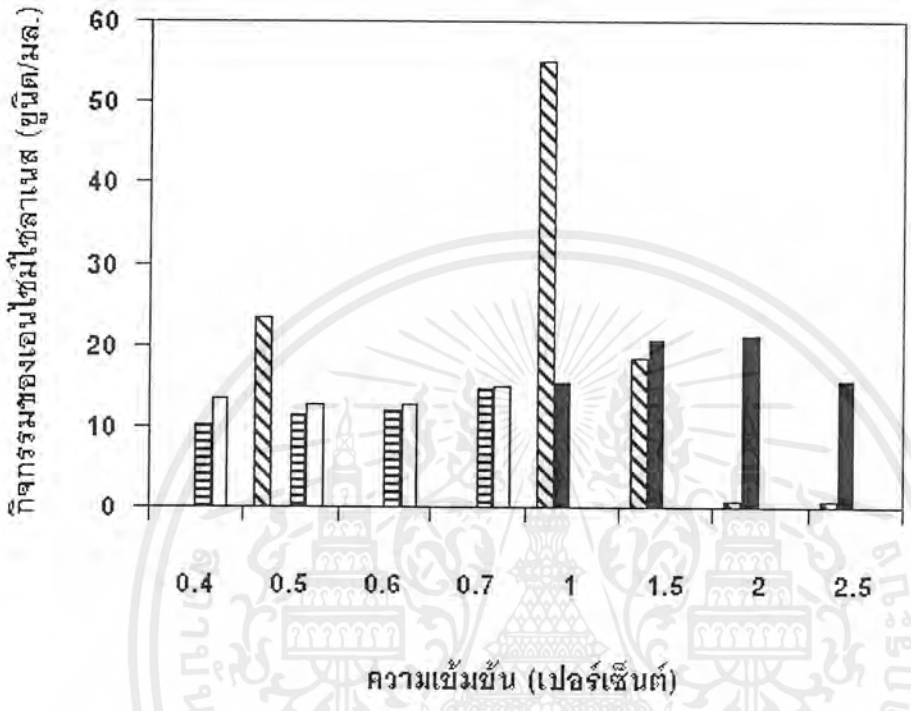
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองควบคุมการใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนคือ ยูเรีย เคซีนไฮโดรไลเสท แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) และไดแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] พบว่าเชื้อ 5 สามารถใช้ยูเรียและให้ค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 55.024 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาคือยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรม 23.328 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้เคซีนไฮโดรไลเสท ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต และไดแอมโมเนียมซัลเฟตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดโดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของยูเรีย 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 30 หลังจากเลี้ยงเชื้อ 3 วัน ความเข้มข้นของยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า ยูเรีย 0.5, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการทดลองแตกต่างจากผลการทดลองของ Stewart และ Perry (1981) อาจเนื่องมาจาก เชื้อ 5 ซึ่งเป็นเชื้อ *Penicillium* เช่นเดียวกับเชื้อ 4 สามารถใช้ยูเรียได้ดีกว่าเชื้อ *Aspergillus fumigatus* IMI246651 พบว่าแอมโมเนียมไนเตรต 1.5 กรัม/ลิตร เชื้อ *Aspergillus fumigatus* IMI246651 จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด และรองลงมาคือ ไดแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร

ส่วนการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการเจริญของเชื้อ พบว่าพีเอชมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และมีพีเอชสุดท้ายของยูเรียความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์คือ 6.45, 6.18, 5.97, 6.57 และ 7.83 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 30 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ เชื้อ 5 โดยเลี้ยงในอาหารที่ใช้ไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

▨ ยูเรีย

■ เคซีนไฮโดรไลเสท

⊟ แอมโมเนียมไนเตรต

□ ไดแอมโมเนียมซัลเฟต

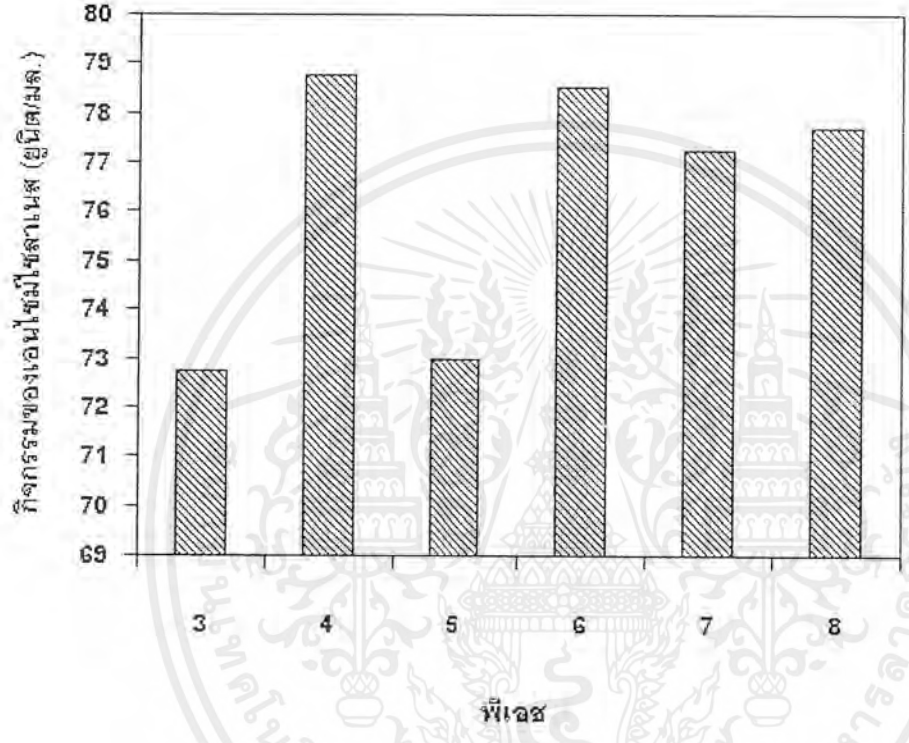
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 พีเอชเริ่มต้น

ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ 5 แสดงดังรูปที่ 31 จะเห็นว่าการใช้พีเอชเริ่มต้น 4.0 ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดคือ 78.754 ยูนิต/มิลลิลตร หลังจากเลี้ยงเชื้อ 3 วัน รองลงมาคือพีเอชเริ่มต้น 6.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 78.511 ยูนิต/มิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม พีเอชเริ่มต้น 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ Haapala และคณะ (1996) พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesei* ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสคือ 6.0-7.0 ซึ่งจะใช้ไซแลนและไซลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ 5 ที่ความเข้มข้นของไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์ และพีเอชเริ่มต้นของอาหาร 4.0 ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 1,789.863 ยูนิต/มิลลิกรัม ดังรูปที่ 32

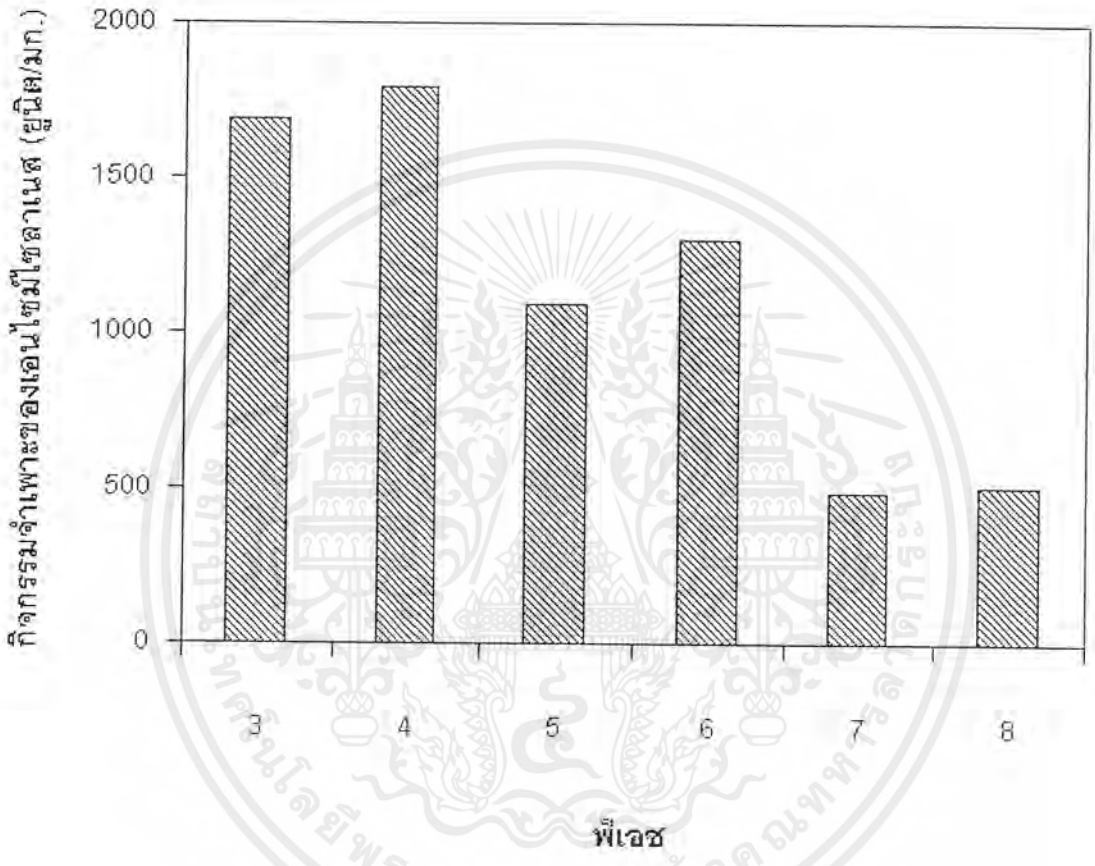
ส่วนการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการเจริญของเชื้อ พบว่าพีเอชมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ยกเว้นพีเอชเริ่มต้นที่ 7.0 และ 8.0 โดยที่พีเอชเริ่มต้น 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 จะมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชเป็น 5.54, 5.66, 5.38, 6.14, 5.78 และ 5.50 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 31 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ 5 ที่เจริญบนอาหารที่ใช้ไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 32 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนส โดยเลี้ยงในอาหารที่ใช้ไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

จากการใช้ไซแลนและฟางข้าวเป็นสับสเตรตในการคัดเลือกเชื้อจากสภาพธรรมชาติโดยการเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าสูงสุดเมื่อเติมไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเติมยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชของอาหารเป็น 4.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5×10^5 ถึง 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เชื้อจะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 78.754 ยูนิต/มิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) 1,789.863 ยูนิต/มิลลิกรัม ส่วนการใช้ฟางข้าวเป็นสับสเตรต พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าสูงสุดเมื่อเติมฟางข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเติมเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเป็น 4.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5×10^5 ถึง 5×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน เชื้อจะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 73.888 ยูนิต/มิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) 492.586 ยูนิต/มิลลิกรัม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการปรับปรุงสายพันธุ์ที่มีการศึกษาอยู่ เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น และหาเทคนิคในการผลิต เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ในปริมาณมาก

2. ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้กับเชื้อราในสภาวะต่าง ๆ

3. หาแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ ที่มีราคาถูกหรือของเสียจากอุตสาหกรรม เช่น ชานอ้อย น้ำทิ้งจากโรงงานฟอกกระดาษ เพื่อสามารถลดต้นทุนในการผลิตและเป็นการกำจัดของเสีย

4. ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมจากเชื้อราที่คัดเลือกได้จากสภาพธรรมชาติในขั้นตอนต่อไปควรมีการศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ เช่น อุณหภูมิ การเติมเกลือแร่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และสารเหนี่ยวนำหรือยับยั้ง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

อารี ฤทธิบูรณ์. 2541. การแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราในสภาพธรรมชาติเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.5:138-146.

Archana A. and Satyanarayana T. 1997. Xylanase production by thermophilic *Bacillus lichenifomis* A99 in solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology. 21:12-17.

Bailey M. J., Buchert J. and Viikari L. .1993. Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan- and cellulose-based media.Applied Microbiology and Biotechnology.40:224-229.

Breccia J. D., Sineriz F., Baigori M. D., Castro Grmo. and Rajni H.- K. 1998. Purification and charactrization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloloquefaciens*. Enzyme and Microbial Technology. 22:42-49.

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

Cavazzoni, V., Manzoni, M., Parini, C. and Bonferoni, M.C. 1989. D-xylanase pror\duced by *Schizophyllum radiatum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 30:247-251.

Cesar T. and Mrsa V.. 1996. Purification and properties of the xylanase produced by Thermomyces lanuginosus. Enzyme and Microbial Technology.19:289-295.

Chen Chih-Cheng, Adolphson Ryan, Dean Jeffrey F.D., Eriksson Karl-Erik L.,Adams Michael W.W., and Wastpheling Janet. 1997. Release of lignin from kraft pulp by a hyperthermophilic xylanase from *Thermatoga maritima*. Enzyme and Microbial Technology.20:39-45.

Chen Guodong, Fournier Ronald L. and Varanasi Sasidhar. 1997. Experimental demonstration of pH control for a sequential two-step enzymatic reaction. Enzyme and Microbial Technology. 21:491-495.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Das A. and Nanda G.. 1994. Production of xylanolytic enzymes during growth on pulverized grass by *Aspergillus ochraceus*-42. Letters in Applied Microbiology. 20:141-144.

Garg, A.P. McCarthy, A.J. and Roberts, J.C. 1996. Biobleaching effect of *Streptomyces thermoviolaceus* xylanase preparations on birchwood kraft pulp. Enzyme and Microbial Technology. 18:261-267.

Gattinger, L.D., Duvnjak, Z., and Khan, W. 1990. The use of canola meal as a substrate for xylanase production by *Trichoderma reesei*. Applied Microbiology and Biotechnology. 33:21-25.

Ghosh M. and Nanda G.. 1993. High activity xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49 during growth on jute stalk lignocellulose. Applied Microbiology 17:68-71.

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

Gomes, I., Gomes, J., Strainer, W. and Esterbauer,H.1992. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. Applied Microbiology and Biotechnology. 40:224-229.

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

Kyu K.L., Ratanakhanokchai K., Uttapap D. and Tanticharoen M. 1994. Induction of xylanase in *Bacillus circulans* B6. Bioresource Technology.48:163-167.

Magnuson T. S. and Crawford D. L. 1997. Purification and characterization of an alkaline xylanase from *Streptomyces viridosporus* T7A. Enzyme and Microbial Technology. 21:160-164.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal.Chem. 31:426-428.

Okeke, B.C., and Obi, S.K.C. 1995. Saccharification of agro-waste materials by fungal cellulases and hemicellulases. Bioresource Technology. 51:23-27.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Samson Robert A. and Ellen S. van Reenen-Hoekstra. (1988).Introduction to food-borne fungi (third edition).Natherlands.

Saxena, A., Kuhad, R.C., Saxena, R.K. and Gupta, R. 1994. Production and characterization of a xylanase from *Cyathus stercoreus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 10:293-295.

Saxena, Shailendra, Bahadur, J and Varma Ajit. 1991. Production and locaisation of carboxymethylcellulase, xylanase and β-glucosidase from *Cellulomonas* and *Micrococcus* spp. Applied Microbiology and Biotechnology. 34:668-670.

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

Shamala, T.R.and Sreekantiah, K.R. 1987. Successive cultivation of selected cellulolytic fungi on rice straw and wheat bran for economic production of cellulose and D- xylanase. Enzyme Microb. Technol.9:97-101.

Trigo, C.and Ball, A.S. 1994. Production of extracellular enzymes during the solubilisation of straw by *Thermomonospora fusca* BD 25. Applied Microbiology and Biotechnology. 41:366-372.

Wase,D.A.J.,Raymahasay,S.and Wang,C.W. 1985. Production of β-D glucosidase, endo-1,4-β-D lucanase and D-xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI255091.Enzyme Microb. Technol.7:225-229.

Xu J., Nogawa M., Okada H. and Morikawa Y. 1998. Xylanase induction by L-sorbose in a fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7. Biosci. Biotechnol. Biochem.62(8): 1555-1559.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส และการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์โดย DNS reagent ของ Miller (1959)

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย (ร้อยละ)

1. Dinitrosalicylic (DNS) acid	1
2. phenol	0.2
3.sodium potassium tartrate (Rochelle salt)	20
4. Na_2SO_4	0.05
5. NaOH	1

วิธีการเตรียม DNS reagent

ละลาย NaOH ในน้ำตามปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงค่อย ๆ เติมสารละลายอื่น ๆ ลงในสารละลาย NaOH

1.1. การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลสสำหรับการวิเคราะห์เอนไซมไซลาเนส

1.1.1 เตรียมสารละลายของน้ำตาลไซโลสให้มีความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

1.1.2 ปิเปตสารละลายข้อ 2.1 ความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร (blank ใช้น้ำกลั่น แทน)

1.1.3 เติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร

1.1.4 นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบนำมาทำให้เย็นโดยใช้น้ำก๊อก

1.1.5 เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลไซโลส ดังแสดงในรูปผนวกที่ ก1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส

$$\text{ยูนิต/มิลลิลิตรของอาหารเหลว} = \frac{\text{มก.ของไซโลส} \times 1{,}000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของไซโลส} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

1.2 การวิเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้

1.2.1 สารละลายไซแลนร้อยละ 1.0 ในซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8

1.2.2 เติมสารละลายเอนไซม์เจือจางที่เหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร (blank ใช้น้ำกลั่น)

1.2.3 บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.2.4 หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร

1.2.5 นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบนำมาทำให้เย็นโดยใช้น้ำก๊อก

1.2.6 เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานโบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Lowry (1951)

สารเคมี

1. โซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$)

2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3. โพแทสเซียมโซเดียมทาเทรต ($COOK(CHOH)_2COONa \cdot 4H_2O$)

4. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

5. Folin-Ciocalteu reagent 1 N

2.1 วิธีการเตรียมสารเคมี

2.1.1. ละลายโซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$) 2 กรัม ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.1.2. ละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาเทรต ($COOK(CHOH)_2COONa \cdot 4H_2O$) 2.7 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.1.3. ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4. นำ Folin-Ciocalteu reagent 2 นอร์มัล มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1 : 1 (สารนี้ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้)

2.1.5 นำสารละลายในข้อ 1 100.0 มิลลิลิตร เติมสารละลายข้อ 2 และ 3 อย่างละ 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (เตรียมเมื่อต้องการใช้)

2.2 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานโบรวีน ซีรัม อัลบูมิน

2.2.1. เตรียมสารละลาย โบรวีน ซีรัม อัลบูมิน ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (blank ใช้น้ำกลั่นแทน)

2.2.2. ปิเปตสารละลายโบรวีน ซีรัม อัลบูมินข้อ1 มาความเข้มข้นละ 1.0 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ)

2.2.3. เติมสารละลายข้อ 5 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดสารละลายโบรวีน ซีรัม อัลบูมิน ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

2.2.4. เติม Folin-Ciocalteu reagent 1 N 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

2.2.5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโบรวีน ซีรัม อัลบูมิน

2.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ไซลาเนส

2.3.1.เจือจางเอนไซม์ที่ได้ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม

2.3.2. ปิเปตสารละลายเอนไซม์ข้อ 1 มา 1.0 มิลลิลิตร

2.3.3. เติมสารละลายข้อ 5 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดสารละลายตัวอย่างเอนไซม์ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

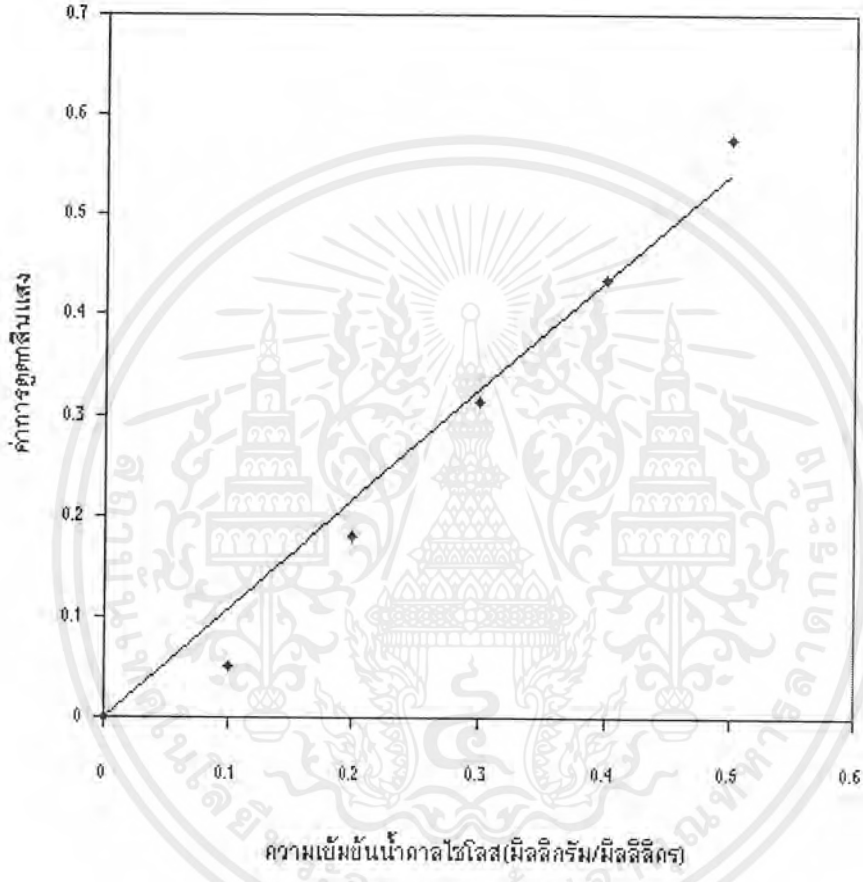
2.3.4. เติม Folin-Ciocalteu reagent 1 นอร์มัล 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

2.3.5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

คำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนส

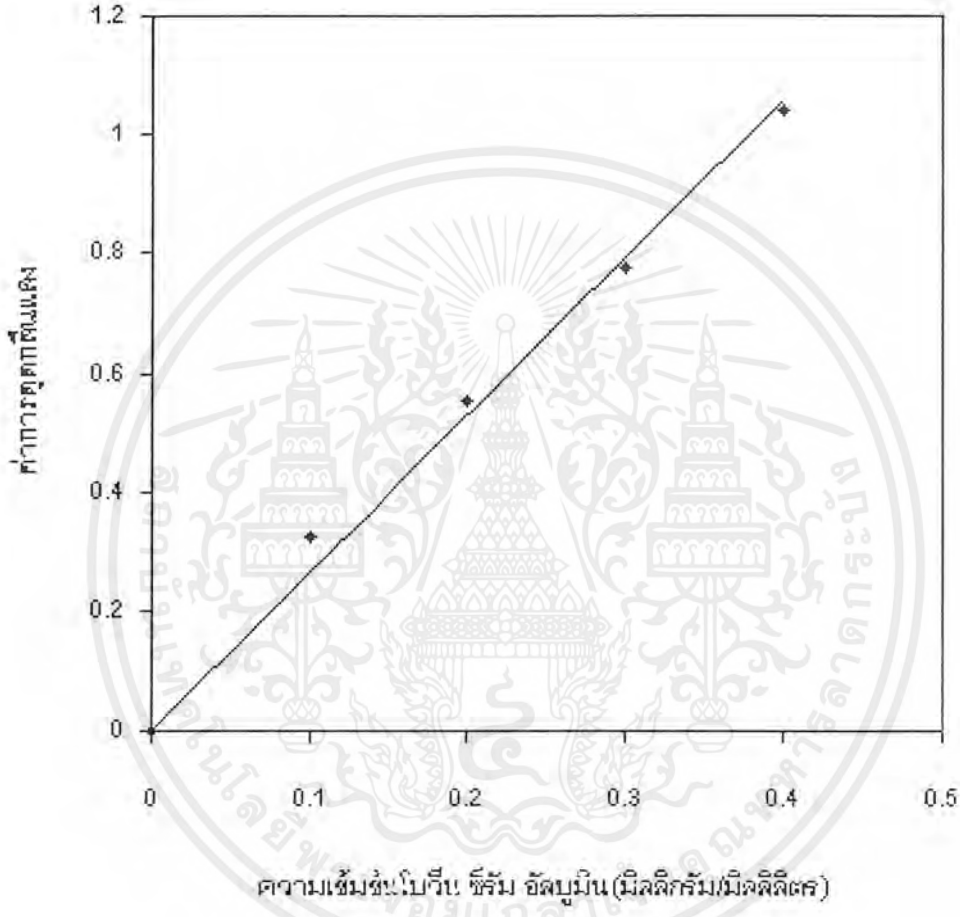
$$\text{กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิกรัม)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มล.)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส
กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโบวีน ซีรัม อัลบูมิน กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ข1 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อและเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ชนิดยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติของการแจกแจงของตัวแปรสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	4216.049	6	702.675	6.997	.007
จุดตัด	11841.059	1	11841.059	117.918	.000
เวลา	2671.898	4	667.974	6.652	.012
เชื้อ	1544.151	2	772.075	7.689	.014
ค่าความคลาดเคลื่อน	803.344	8	100.418		
ผลรวม	16860.452	15			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	5019.393	14			

a R Squared = .840 (Adjusted R Squared = .720)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข2 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย(I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %	
(I) เชื้อ	(J) เชื้อ				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	4	.8412	6.3378	.898	-13.7737	15.4561
	6	21.9314*	6.3378	.009	7.3165	36.5463
4	1	-.8412	6.3378	.898	-15.4561	13.7737
	6	21.0902*	6.3378	.010	6.4753	35.7051
6	1	-21.9314*	6.3378	.009	-36.5463	-7.3165
	4	-21.0902*	6.3378	.010	-35.7051	-6.4753

* ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข3 เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %	
(I) เวลา	(J) เวลา				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	2	-17.4100	8.1820	.066	-36.277	1.4578
	3	-31.2960*	8.1820	.005	-50.163	-12.4282
	4	-37.7213*	8.1820	.002	-56.589	-18.8536
	5	-13.4977	8.1820	.138	-32.365	5.3701
2	1	17.4100	8.1820	.066	-1.457	36.2778
	3	-13.8860	8.1820	.128	-32.753	4.9818
	4	-20.3113*	8.1820	.038	-39.179	-1.4436
	5	3.9123	8.1820	.645	-14.955	22.7801
3	1	31.2960*	8.1820	.005	12.428	50.1638
	2	13.8860	8.1820	.128	-4.981	32.7538
	4	-6.4253	8.1820	.455	-25.293	12.4424
	5	17.7983	8.1820	.061	-1.069	36.6661
4	1	37.7213*	8.1820	.002	18.853	56.5891
	2	20.3113*	8.1820	.038	1.443	39.1791
	3	6.4253	8.1820	.455	-12.442	25.2931
	5	24.2237*	8.1820	.018	5.355	43.0914
5	1	13.4977	8.1820	.138	-5.370	32.3654
	2	-3.9123	8.1820	.645	-22.780	14.9554
	3	-17.7983	8.1820	.061	-36.666	1.0694
	4	-24.2237*	8.1820	.018	-43.091	-5.3559

* ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข4 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อและเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ชนิดยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติของการแจกแจงของตัวแปรสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	4134.259	6	689.043	4.924	.021
จุดตัด	11769.242	1	11769.242	84.105	.000
เวลา	3566.560	4	891.640	6.372	.013
เชื้อ	567.699	2	283.849	2.028	.194
ค่าความคลาดเคลื่อน	1119.480	8	139.935		
ผลรวม	17022.981	15			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	5253.739	14			

a R Squared = .787 (Adjusted R Squared = .627)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข5 เปรียบเทียบขนิดของเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %	
(I) เชื้อ	(J) เชื้อ				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	4	-6.3254	7.4816	.422	-23.5779	10.9271
	6	8.6822	7.4816	.279	-8.5703	25.9347
4	1	6.3254	7.4816	.422	-10.9271	23.5779
	6	15.0076	7.4816	.080	-2.2449	32.2601
6	1	-8.6822	7.4816	.279	-25.9347	8.5703
	4	-15.0076	7.4816	.080	-32.2601	2.2449

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข6 เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %	
(I) เวลา	(J) เวลา				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	2	-11.7730	9.6587	.258	-34.045	10.4999
	3	-31.5790*	9.6587	.011	-53.851	-9.3061
	4	-43.4790*	9.6587	.002	-65.751	-21.2061
	5	-1423	9.6587	.185	-36.275	8.2706
2	1	11.7730	9.6587	.258	-10.499	34.0459
	3	-19.8060	9.6587	.074	-42.078	2.4669
	4	-31.7060*	9.6587	.011	-53.978	-9.4331
	5	-2.2293	9.6587	.823	-24.502	20.0436
3	1	31.5790*	9.6587	.011	9.306	53.8519
	2	19.8060	9.6587	.074	-2.466	42.0789
	4	-11.9000	9.6587	.253	-34.172	10.3729
	5	17.5767	9.6587	.106	-4.696	39.8496
4	1	43.4790*	9.6587	.002	21.206	65.7519
	2	31.7060*	9.6587	.011	9.433	53.9789
	3	11.9000	9.6587	.253	-10.372	34.1729
	5	29.4767*	9.6587	.016	7.203	51.7496
5	1	14.0023	9.6587	.185	-8.270	36.2753
	2	2.2293	9.6587	.823	-20.043	24.5023
	3	-17.5767	9.6587	.106	-39.849	4.6963
	4	-29.4767*	9.6587	.016	-51.749	-7.2037

* ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข7 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อและเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ชนิดยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติของการแจกแจงของตัวแปรสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	2055.664	6	342.611	7.241	.007
จุดตัด	7962.624	1	7962.624	168.286	.000
เวลา	1754.388	4	438.597	9.270	.004
เชื้อ	301.276	2	150.638	3.184	.096
ค่าความคลาดเคลื่อน	378.527	8	47.316		
ผลรวม	10396.815	15			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	2434.191	14			

a R Squared = .844 (Adjusted R Squared = .728)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข8 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %	
(I) เชื้อ	(J) เชื้อ				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	4	-6.8110	4.3504	.156	-16.8431	3.2211
	6	-10.8614*	4.3504	.037	-20.8935	-.8293
4	1	6.8110	4.3504	.156	-3.2211	16.8431
	6	-4.0504	4.3504	.379	-14.0825	5.9817
6	1	10.8614*	4.3504	.037	.8293	20.8935
	4	4.0504	4.3504	.379	-5.9817	14.0825

* ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข9 เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %	
(I) เวลา	(J) เวลา				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	2	-7.4180	5.6164	.223	-20.3694	5.5334
	3	-22.4607*	5.6164	.004	-35.4121	-9.5092
	4	-30.5893*	5.6164	.001	-43.5408	-17.6379
	5	-12.9737*	5.6164	.050	-25.9251	-2.2224E-02
2	1	7.4180	5.6164	.223	-5.5334	20.3694
	3	-15.0427*	5.6164	.028	-27.9941	-2.0912
	4	-23.1713*	5.6164	.003	-36.1228	-10.2199
	5	-5.5557	5.6164	.352	-18.5071	7.3958
3	1	22.4607*	5.6164	.004	9.5092	35.4121
	2	15.0427*	5.6164	.028	2.0912	27.9941
	4	-8.1287	5.6164	.186	-21.0301	4.8228
	5	9.4870	5.6164	.130	-3.4644	22.4384
4	1	30.5893*	5.6164	.001	17.6379	43.5408
	2	23.1713*	5.6164	.003	10.2199	36.1228
	3	8.1287	5.6164	.186	-4.8228	21.0801
	5	17.6157	5.6164	.014	4.6642	30.5671
5	1	12.9737*	5.6164	.050	2.222E-02	25.9251
	2	5.5557	5.6164	.352	-7.3958	18.5071
	3	-9.4870	5.6164	.130	-22.4384	3.4644
	4	-17.6157*	5.6164	.014	-30.5671	-4.6642

* ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข10 เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 4 และความเข้มข้นของฟางข้าวที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ชนิดยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติของการแจกแจงของตัวแปรสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	6564.442	6	1094.074	21.430	.000
จุดตัด	14652.813	1	14652.813	287.005	.000
เวลา	6147.676	4	1536.919	30.104	.000
ความเข้มข้น	416.766	2	208.383	4.082	.060
ค่าความคลาดเคลื่อน	408.433	8	51.054		
ผลรวม	21625.688	15			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	6972.875	14			

a R Squared = .941 (Adjusted R Squared = .897)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข11 เปรียบเทียบความเข้มข้นของฟางข้าวที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อใช้เชื้อ 4

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %	
(I) ความเข้มข้น	(J) ความเข้มข้น				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1.00	2.00	-.2820	4.5190	.952	-10.7029	10.1389
	3.00	11.0380*	4.5190	.040	.6171	21.4589
2.00	1.00	.2820	4.5190	.952	-10.1389	10.7029
	3.00	11.3200*	4.5190	.037	.8991	21.7409
3.00	1.00	-11.0380*	4.5190	.040	-21.4589	-.6171
	2.00	-11.3200*	4.5190	.037	-21.7409	-.8991

* ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข12 เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 4 เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

(I) เวลา	(J) เวลา	การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	2	-17.7567*	5.8340	.016	-31.2100	-4.3033
	3	-48.3400*	5.8340	.000	-61.7933	-34.8867
	4	-55.1133*	5.8340	.000	-68.5667	-41.6600
	5	-23.9133*	5.8340	.003	-37.3667	-10.4600
2	1	17.7567*	5.8340	.016	4.3033	31.2100
	3	-30.5833*	5.8340	.001	-44.0367	-17.1300
	4	-37.3567*	5.8340	.000	-50.8100	-23.9033
	5	-6.1567	5.8340	.322	-19.6100	7.2967
3	1	48.3400*	5.8340	.000	34.8867	61.7933
	2	30.5833*	5.8340	.001	17.1300	44.0367
	4	-6.7733	5.8340	.279	-20.2267	6.6800
	5	24.4267*	5.8340	.003	10.9733	37.8800
4	1	55.1133*	5.8340	.000	41.6600	68.5667
	2	37.3567*	5.8340	.000	23.9033	50.8100
	3	6.7733	5.8340	.279	-6.6800	20.2267
	5	31.2000*	5.8340	.001	17.7467	44.6533
5	1	23.9133*	5.8340	.003	10.4600	37.3667
	2	6.1567	5.8340	.322	-7.2967	19.6100
	3	-24.4267*	5.8340	.003	-37.8800	-10.9733
	4	-31.2000*	5.8340	.001	-44.6533	-17.7467

* ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข13 เปรียบเทียบความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ชนิดยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติของการแจกแจงของตัวแปรสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	1205.051	10	120.505	2.296	.141
จุดตัด	3591.305	1	3591.305	68.422	.000
ชนิด	380.238	3	126.746	2.415	.152
ความเข้มข้น	948.726	7	135.532	2.582	.117
ค่าความคลาดเคลื่อน	367.415	7	52.488		
ผลรวม	6591.517	18			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	1572.466	17			

a R Squared = .766 (Adjusted R Squared = .433)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข14 เปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %	
(I) ชนิด	(J) ชนิด				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	2	7.0110	4.5820	.170	-3.823	17.8458
	3	6.1001	4.8600	.250	-5.392	17.5922
	4	10.3056	4.8600	.072	-1.186	21.7977
2	1	-7.0110	4.5820	.170	-17.845	3.8238
	3	-.9109	4.8600	.857	-12.403	10.5812
	4	3.2946	4.8600	.520	-8.197	14.7867
3	1	-6.1001	4.8600	.250	-17.592	5.3920
	2	.9109	4.8600	.857	-10.581	12.4030
	4	4.2055	5.1229	.439	-7.908	16.3192
4	1	-10.3056	4.8600	.072	-21.797	1.1865
	2	-3.2946	4.8600	.520	-14.786	8.1975
	3	-4.2055	5.1229	.439	-16.319	7.9082

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข15 เปรียบเทียบความเข้มข้นชนิดของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %	
(I)ความเข้มข้น	(J) ความเข้มข้น				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
0.40	0.50	-9.7850	6.2742	.163	-24.6212	5.0512
	0.60	-1.1805	7.2448	.875	-18.3118	15.9508
	0.70	-5.5000E-02	7.2448	.994	-17.1863	17.0763
	1.00	-14.6675	7.2448	.083	-31.7988	2.4638
	1.50	-4.6960	7.2448	.538	-21.8273	12.4353
	2.00	9.5840	7.2448	.227	-7.5473	26.7153
	2.50	-.9365	7.2448	.901	-18.0678	16.1948
0.50	0.40	9.7850	6.2742	.163	-5.0512	24.6212
	0.60	8.6045	6.2742	.213	-6.2317	23.4407
	0.70	9.7300	6.2742	.165	-5.1062	24.5662
	1.00	-4.8825	6.2742	.462	-19.7187	9.9537
	1.50	5.0890	6.2742	.444	-9.7472	19.9252
	2.00	19.3690*	6.2742	.018	4.5328	34.2052
	2.50	8.8485	6.2742	.201	-5.9877	23.6847
0.60	0.40	1.1805	7.2448	.875	-15.9508	18.3118
	0.50	-8.6045	6.2742	.213	-23.4407	6.2317
	0.70	1.1255	7.2448	.881	-16.0058	18.2568
	1.00	-13.4870	7.2448	.105	-30.6183	3.6443
	1.50	-3.5155	7.2448	.642	-20.6468	13.6158
	2.00	10.7645	7.2448	.181	-6.3668	27.8958
	2.50	.2440	7.2448	.974	-16.8873	17.3753

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข15 (ต่อ)

(I) ความเข้มข้น	(J) ความเข้มข้น	การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
0.70	0.40	5.500E-02	7.2448	.994	-17.0763	17.1863
	0.50	-9.7300	6.2742	.165	-24.5662	5.1062
	0.60	-1.1255	7.2448	.881	-18.2568	16.0058
	1.00	-14.6125	7.2448	.084	-31.7438	2.5188
	1.50	-4.6410	7.2448	.542	-21.7723	12.4903
	2.00	9.6390	7.2448	.225	-7.4923	26.7703
	2.50	-.8815	7.2448	.907	-18.0128	16.2498
1.00	0.40	14.6675	7.2448	.083	-2.4638	31.7988
	0.50	4.8825	6.2742	.462	-9.9537	19.7187
	0.60	13.4870	7.2448	.105	-3.6443	30.6183
	0.70	14.6125	7.2448	.084	-2.5188	31.7438
	1.50	9.9715	7.2448	.211	-7.1598	27.1028
	2.00	24.2515*	7.2448	.012	7.1202	41.3828
	2.50	13.7310	7.2448	.100	-3.4003	30.8623
1.50	0.40	4.6960	7.2448	.538	-12.4353	21.8273
	0.50	-5.0890	6.2742	.444	-19.9252	9.7472
	0.60	3.5155	7.2448	.642	-13.6158	20.6468
	0.70	4.6410	7.2448	.542	-12.4903	21.7723
	1.00	-9.9715	7.2448	.211	-27.1028	7.1598
	2.00	14.2800	7.2448	.089	-2.8513	31.4113
	2.50	3.7595	7.2448	.620	-13.3718	20.8908

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข15 (ต่อ)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %	
(I)ความเข้มข้น	(J) ความเข้มข้น				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
2.00	0.40	-9.5840	7.2448	.227	-26.7153	7.5473
	0.50	-19.3690*	6.2742	.018	-34.2052	-4.5328
	0.60	-10.7645	7.2448	.181	-27.8958	6.3668
	0.70	-9.6390	7.2448	.225	-26.7703	7.4923
	1.00	-24.2515*	7.2448	.012	-41.3828	-7.1202
	1.50	-14.2800	7.2448	.089	-31.4113	2.8513
	2.50	-10.5205	7.2448	.190	-27.6518	6.6108
2.50	0.40	.9365	7.2448	.901	-16.1948	18.0678
	0.50	-8.8485	6.2742	.201	-23.6847	5.9877
	0.60	-.2440	7.2448	.974	-17.3753	16.8873
	0.70	.8815	7.2448	.907	-16.2498	18.0128
	1.00	-13.7310	7.2448	.100	-30.8623	3.4003
	1.50	-3.7595	7.2448	.620	-20.8908	13.3718
	2.00	10.5205	7.2448	.190	-6.6108	27.6518

* ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข16 เปรียบเทียบพีเอชของอาหารเริ่มต้นเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและเคซีนเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

	ผลรวมยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติของการแจกแจงของตัวแปรสุ่ม	นัยสำคัญ
เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม	1704.637	5	340.927	16.407	.002
เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม	124.675	6	20.779		
ผลรวม	1829.312	11			

ตารางภาคผนวกที่ ข17 เปรียบเทียบพีเอชของอาหารเริ่มต้นเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและเคซีนเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %	
(I) พีเอช	(J) พีเอช				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
3	4	-2.0980	4.5584	.662	-13.252	9.0560
	5	2.5235	4.5584	.600	-8.630	13.6775
	6	13.7740*	4.5584	.023	2.620	24.9280
	7	26.5145*	4.5584	.001	15.360	37.6685
	8	26.4840*	4.5584	.001	15.330	37.6380
4	3	2.0980	4.5584	.662	-9.056	13.2520
	5	4.6215	4.5584	.350	-6.532	15.7755
	6	15.8720*	4.5584	.013	4.718	27.0260
	7	28.6125*	4.5584	.001	17.458	39.7665
	8	28.5820*	4.5584	.001	17.428	39.7360

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข17 (ต่อ)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %	
(I) พีเอช	(J) พีเอช				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
5	3	-2.5235	4.5584	.600	-13.677	8.6305
	4	-4.6215	4.5584	.350	-15.775	6.5325
	6	11.2505*	4.5584	.049	9.646E-0	22.4045
	7	23.9910*	4.5584	.002	12.837	35.1450
	8	23.9605*	4.5584	.002	12.806	35.1145
6	3	-13.7740*	4.5584	.023	-24.928	-2.6200
	4	-15.8720*	4.5584	.013	-27.026	-4.7180
	5	-11.2505*	4.5584	.049	-22.404	-9.6458E-02
	7	12.7405*	4.5584	.031	1.586	23.8945
	8	12.7100*	4.5584	.032	1.556	23.8640
7	3	-26.5145*	4.5584	.001	-37.668	-15.3605
	4	-28.6125*	4.5584	.001	-39.766	-17.4585
	5	-23.9910*	4.5584	.002	-35.145	-12.8370
	6	-12.7405*	4.5584	.031	-23.894	-1.5865
	8	-3.0500E-02	4.5584	.995	-11.184	11.1235
8	3	-26.4840*	4.5584	.001	-37.638	-15.3300
	4	-28.5820*	4.5584	.001	-39.736	-17.4280
	5	-23.9605*	4.5584	.002	-35.114	-12.8065
	6	-12.7100*	4.5584	.032	-23.864	-1.5560
	7	3.050E-02	4.5584	.995	-11.123	11.1845

* ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข18 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อและเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ชนิดยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติของการแจกแจงของตัวแปรสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	2323.93	6	387.322	4.700	.024
จุดตัด	8136.50	1	8136.501	98.726	.000
เวลา	1480.33	4	370.083	4.490	.034
เชื้อ	843.60	2	421.801	5.118	.037
ค่าความคลาดเคลื่อน	659.31	8	82.415		
ผลรวม	11119.75	15			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	2983.25	14			

a R Squared = .779 (Adjusted R Squared = .613)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข19 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อเมื่อใช้ไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95%	
(I) เชื้อ	(J) เชื้อ				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	5	-12.5486	5.741	.060	-25.7887	.6915
	14	5.3438	5.741	.379	-7.8963	18.5839
5	1	12.5486	5.741	.060	-.6915	25.7887
	14	17.8924*	5.741	.014	4.6523	31.1325
14	1	-5.3438	5.741	.379	-18.5839	7.8963
	5	-17.8924*	5.741	.014	-31.1325	-4.6523

* ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข20 เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95%	
(I) เวลา	(J) เวลา				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	2	-25.0257*	7.4124	.010	-42.1186	-7.9327
	3	-17.7157*	7.4124	.044	-34.8086	-.6227
	4	-28.9090*	7.4124	.005	-46.0019	-11.8161
	5	-19.0457*	7.4124	.033	-36.1386	-1.9527
2	1	25.0257*	7.4124	.010	7.9327	42.1186
	3	7.3100	7.4124	.353	-9.7829	24.4029
	4	-3.8833	7.4124	.615	-20.9763	13.2096
	5	5.9800	7.4124	.443	-11.1129	23.0729
3	1	17.7157*	7.4124	.044	.6227	34.8086
	2	-7.3100	7.4124	.353	-24.4029	9.7829
	4	-11.1933	7.4124	.169	-28.2863	5.8996
	5	-1.3300	7.4124	.862	-18.4229	15.7629
4	1	28.9090*	7.4124	.005	11.8161	46.0019
	2	3.8833	7.4124	.615	-13.2096	20.9763
	3	11.1933	7.4124	.169	-5.8996	28.2863
	5	9.8633	7.4124	.220	-7.2296	26.9563
5	1	19.0457*	7.4124	.033	1.9527	36.1386
	2	-5.9800	7.4124	.443	-23.0729	11.1129
	3	1.3300	7.4124	.862	-15.7629	18.4229
	4	-9.8633	7.4124	.220	-26.9563	7.2296

* ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข21 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อและเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ชนิดยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติของการแจกแจงของตัวแปรสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	348.252	6	58.042	2.118	.161
จุดตัด	1156.906	1	1156.906	42.215	.000
เวลา	168.489	4	42.122	1.537	.280
เชื้อ	179.763	2	89.882	3.280	.091
ค่าความคลาดเคลื่อน	219.239	8	27.405		
ผลรวม	1724.396	15			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	567.491	14			

a R Squared = .614 (Adjusted R Squared = .324)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข22 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อเมื่อใช้ไซแลนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95%	
(I) เชื้อ	(J) เชื้อ				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	5	-2.6434	3.3109	.448	-10.2783	4.9915
	14	-8.2994*	3.3109	.037	-15.9343	-.6645
5	1	2.6434	3.3109	.448	-4.9915	10.2783
	14	-5.6560	3.3109	.126	-13.2909	1.9789
14	1	8.2994*	3.3109	.037	.6645	15.9343
	5	5.6560	3.3109	.126	-1.9789	13.2909

* ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข23 เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95%	
(I) เวลา	(J) เวลา				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	2	.3517	4.2743	.936	-9.5050	10.2083
	3	-1.3113	4.2743	.767	-11.1680	8.5453
	4	-7.4373	4.2743	.120	-17.2940	2.4193
	5	-6.6590	4.2743	.158	-16.5156	3.1976
2	1	-.3517	4.2743	.936	-10.2083	9.5050
	3	-1.6630	4.2743	.707	-11.5196	8.1936
	4	-7.7890	4.2743	.106	-17.6456	2.0676
	5	-7.0107	4.2743	.140	-16.8673	2.8460
3	1	1.3113	4.2743	.767	-8.5453	11.1680
	2	1.6630	4.2743	.707	-8.1936	11.5196
	4	-6.1260	4.2743	.190	-15.9826	3.7306
	5	-5.3477	4.2743	.246	-15.2043	4.5090
4	1	7.4373	4.2743	.120	-2.4193	17.2940
	2	7.7890	4.2743	.106	-2.0676	17.6456
	3	6.1260	4.2743	.190	-3.7306	15.9826
	5	.7783	4.2743	.860	-9.0783	10.6350
5	1	6.6590	4.2743	.158	-3.1976	16.5156
	2	7.0107	4.2743	.140	-2.8460	16.8673
	3	5.3477	4.2743	.246	-4.5090	15.2043
	4	-.7783	4.2743	.860	-10.6350	9.0783

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข24 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อและเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลนความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ชนิดยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติของการแจกแจงของตัวแปรสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	295.35	6	49.226	2.323	.134
จุดตัด	563.17	1	563.175	26.574	.001
เวลา	26.42	4	6.606	.312	.862
เชื้อ	268.92	2	134.464	6.345	.022
ค่าความคลาดเคลื่อน	169.54	8	21.193		
ผลรวม	1028.07	15			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	464.89	14			

a R Squared = .635 (Adjusted R Squared = .362)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข25 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อเมื่อใช้ไซแลนความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95%	
(I) เชื้อ	(J) เชื้อ				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	5	-.5182	2.9115	.863	-7.2322	6.1958
	14	-9.2300*	2.9115	.013	-15.9440	-2.5160
5	1	.5182	2.9115	.863	-6.1958	7.2322
	14	-8.7118*	2.9115	.017	-15.4258	-1.9978
14	1	9.2300*	2.9115	.013	2.5160	15.9440
	5	8.7118*	2.9115	.017	1.9978	15.4258

* ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข26 เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไซแลนความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95%	
(I) เวลา	(J) เวลา				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	2	-3.4673	3.7588	.383	-12.135	5.2004
	3	-.8627	3.7588	.824	-9.530	7.8051
	4	-3.0637	3.7588	.439	-11.731	5.6041
	5	-2.4833	3.7588	.527	-11.151	6.1844
2	1	3.4673	3.7588	.383	-5.200	12.1351
	3	2.6047	3.7588	.508	-6.063	11.2724
	4	.4037	3.7588	.917	-8.264	9.0714
	5	.9840	3.7588	.800	-7.683	9.6518
3	1	.8627	3.7588	.824	-7.805	9.5304
	2	-2.6047	3.7588	.508	-11.272	6.0631
	4	-2.2010	3.7588	.574	-10.868	6.4668
	5	-1.6207	3.7588	.678	-10.288	7.0471
4	1	3.0637	3.7588	.439	-5.604	11.7314
	2	-.4037	3.7588	.917	-9.071	8.2641
	3	2.2010	3.7588	.574	-6.466	10.8688
	5	.5803	3.7588	.881	-8.087	9.2481
5	1	2.4833	3.7588	.527	-6.184	11.1511
	2	-.9840	3.7588	.800	-9.651	7.6838
	3	1.6207	3.7588	.678	-7.047	10.2884
	4	-.5803	3.7588	.881	-9.248	8.0874

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข27 เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 5 และความเข้มข้นของไซแลนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ชนิดยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติของการแจกแจงของตัวแปรสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	3274.41	6	545.736	4.850	.022
จุดตัด	3316.15	1	3316.159	29.474	.001
เวลา	640.73	4	160.182	1.424	.310
ความเข้มข้น	2633.68	2	1316.843	11.704	.004
ค่าความคลาดเคลื่อน	900.10	8	112.513		
ผลรวม	7490.67	15			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	4174.52	14			

a R Squared = .784 (Adjusted R Squared = .623)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข28 เปรียบเทียบความเข้มข้นของไซแลนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95%	
(I) ความเข้มข้น	(J) ความเข้มข้น				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1.00	2.00	25.6580*	6.7086	.005	10.1880	41.1280
	3.00	30.0440*	6.7086	.002	14.5740	45.5140
2.00	1.00	-25.6580*	6.7086	.005	-41.1280	-10.1880
	3.00	4.3860	6.7086	.532	-11.0840	19.8560
3.00	1.00	-30.0440*	6.7086	.002	-45.5140	-14.5740
	2.00	-4.3860	6.7086	.532	-19.8560	11.0840

* ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข29 เปรียบเทียบเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 4 เมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

(I) เวลา	(J) เวลา	การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95% ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	2	-16.3433	8.6608	.096	-36.3151	3.6284
	3	-13.1900	8.6608	.166	-33.1617	6.7817
	4	-18.4767	8.6608	.065	-38.4484	1.4951
	5	-15.0333	8.6608	.121	-35.0051	4.9384
2	1	16.3433	8.6608	.096	-3.6284	36.3151
	3	3.1533	8.6608	.725	-16.8184	23.1251
	4	-2.1333	8.6608	.812	-22.1051	17.8384
	5	1.3100	8.6608	.884	-18.6617	21.2817
3	1	13.1900	8.6608	.166	-6.7817	33.1617
	2	-3.1533	8.6608	.725	-23.1251	16.8184
	4	-5.2867	8.6608	.559	-25.2584	14.6851
	5	-1.8433	8.6608	.837	-21.8151	18.1284
4	1	18.4767	8.6608	.065	-1.4951	38.4484
	2	2.1333	8.6608	.812	-17.8384	22.1051
	3	5.2867	8.6608	.559	-14.6851	25.2584
	5	3.4433	8.6608	.701	-16.5284	23.4151
5	1	15.0333	8.6608	.121	-4.9384	35.0051
	2	-1.3100	8.6608	.884	-21.2817	18.6617
	3	1.8433	8.6608	.837	-18.1284	21.8151
	4	-3.4433	8.6608	.701	-23.4151	16.5284

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข30 เปรียบเทียบความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

แหล่งข้อมูล	ผลรวม 3 ชนิดยกกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติของการแจกแจงของตัวแปรสุ่ม	นัยสำคัญ
รูปแบบที่ถูกต้อง	1090.20	10	109.020	.593	.778
จุดตัด	3908.15	1	3908.156	21.265	.004
ชนิด	87.32	3	29.108	.158	.920
ความเข้มข้น	915.47	7	130.782	.712	.669
ค่าความคลาดเคลื่อน	1102.72	6	183.787		
ผลรวม	6589.49	17			
ข้อมูลรวมที่ถูกต้อง	2192.92	16			

a R Squared = .497 (Adjusted R Squared = -.341)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข31 เปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95%	
(I) ชนิด	(J) ชนิด				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
1	2	1.4377	9.0942	.880	-20.8150	23.6903
	3	7.5982	9.0942	.435	-14.6545	29.8508
	4	6.2119	9.0942	.520	-16.0408	28.4646
2	1	-1.4377	9.0942	.880	-23.6903	20.8150
	3	6.1605	9.5861	.544	-17.2959	29.6169
	4	4.7742	9.5861	.636	-18.6821	28.2306
3	1	-7.5982	9.0942	.435	-29.8508	14.6545
	2	-6.1605	9.5861	.544	-29.6169	17.2959
	4	-1.3863	9.5861	.890	-24.8426	22.0701
4	1	-6.2119	9.0942	.520	-28.4646	16.0408
	2	-4.7742	9.5861	.636	-28.2306	18.6821
	3	1.3863	9.5861	.890	-22.0701	24.8426

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข32 เปรียบเทียบความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95%	
(I) ความเข้มข้น	(J) ความเข้มข้น				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
0.40	.50	-4.0583	12.3756	.754	-34.3404	26.2237
	0.60	-.4865	13.5568	.973	-33.6588	32.6858
	0.70	-2.8945	13.5568	.838	-36.0668	30.2778
	1.00	-23.4135	13.5568	.135	-56.5858	9.7588
	1.50	-7.7235	13.5568	.590	-40.8958	25.4488
	2.00	.9240	13.5568	.948	-32.2483	34.0963
	2.50	3.5760	13.5568	.801	-29.5963	36.7483
.50	0.40	4.0583	12.3756	.754	-26.2237	34.3404
	0.60	3.5718	12.3756	.783	-26.7102	33.8539
	0.70	1.1638	12.3756	.928	-29.1182	31.4459
	1.00	-19.3552	12.3756	.169	-49.6372	10.9269
	1.50	-3.6652	12.3756	.777	-33.9472	26.6169
	2.00	4.9823	12.3756	.701	-25.2997	35.2644
	2.50	7.6343	12.3756	.560	-22.6477	37.9164
0.60	0.40	.4865	13.5568	.973	-32.6858	33.6588
	.50	-3.5718	12.3756	.783	-33.8539	26.7102
	0.70	-2.4080	13.5568	.865	-35.5803	30.7643
	1.00	-22.9270	13.5568	.142	-56.0993	10.2453
	1.50	-7.2370	13.5568	.613	-40.4093	25.9353
	2.00	1.4105	13.5568	.921	-31.7618	34.5828
	2.50	4.0625	13.5568	.775	-29.1098	37.2348

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข32 (ต่อ)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95%	
(I) ความเข้มข้น	(J) ความเข้มข้น				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
0.70	0.40	2.8945	13.5568	.838	-30.2778	36.0668
	0.500	-1.1638	12.3756	.928	-31.4459	29.1182
	0.60	2.4080	13.5568	.865	-30.7643	35.5803
	1.00	-20.5190	13.5568	.181	-53.6913	12.6533
	1.50	-4.8290	13.5568	.734	-38.0013	28.3433
	2.00	3.8185	13.5568	.788	-29.3538	36.9908
	2.50	6.4705	13.5568	.650	-26.7018	39.6428
1.00	0.40	23.4135	13.5568	.135	-9.7588	56.5858
	0.500	19.3552	12.3756	.169	-10.9269	49.6372
	0.60	22.9270	13.5568	.142	-10.2453	56.0993
	0.70	20.5190	13.5568	.181	-12.6533	53.6913
	1.50	15.6900	13.5568	.291	-17.4823	48.8623
	2.00	24.3375	13.5568	.123	-8.8348	57.5098
	2.50	26.9895	13.5568	.094	-6.1828	60.1618
1.50	0.40	7.7235	13.5568	.590	-25.4488	40.8958
	0.500	3.6652	12.3756	.777	-26.6169	33.9472
	0.60	7.2370	13.5568	.613	-25.9353	40.4093
	0.70	4.8290	13.5568	.734	-28.3433	38.0013
	1.00	-15.6900	13.5568	.291	-48.8623	17.4823
	2.00	8.6475	13.5568	.547	-24.5248	41.8198
	2.50	11.2995	13.5568	.436	-21.8728	44.4718

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข32 (ต่อ)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95%	
(I) ความเข้มข้น	(J) ความเข้มข้น				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
2.00	0.40	-.9240	13.5568	.948	-34.0963	32.2483
	0.500	-4.9823	12.3756	.701	-35.2644	25.2997
	0.60	-1.4105	13.5568	.921	-34.5828	31.7618
	0.70	-3.8185	13.5568	.788	-36.9908	29.3538
	1.00	-24.3375	13.5568	.123	-57.5098	8.8348
	1.50	-8.6475	13.5568	.547	-41.8198	24.5248
	2.50	2.6520	13.5568	.851	-30.5203	35.8243
2.50	0.40	-3.5760	13.5568	.801	-36.7483	29.5963
	0.50	-7.6343	12.3756	.560	-37.9164	22.6477
	0.60	-4.0625	13.5568	.775	-37.2348	29.1098
	0.70	-6.4705	13.5568	.650	-39.6428	26.7018
	1.00	-26.9895	13.5568	.094	-60.1618	6.1828
	1.50	-11.2995	13.5568	.436	-44.4718	21.8728
	2.00	-2.6520	13.5568	.851	-35.8243	30.5203

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข33 ตารางเปรียบเทียบพีเอชของอาหารเริ่มต้นเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

	ผลรวมกำลังสอง	ระดับชั้นแห่งความอิสระ	ค่าเฉลี่ยของความแปรผัน	ค่าสถิติของการแจกแจงของตัวแปรสุ่ม	นัยสำคัญ
ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม	83.362	5	16.672	.184	.958
ความแตกต่างภายในกลุ่ม	544.169	6	90.695		
ผลรวม	627.531	11			

ตารางภาคผนวกที่ ข34 ตารางเปรียบเทียบพีเอชของอาหารเริ่มต้นเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LEAST SIGNIFICANT DIFFERENCE (LSD)

		การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95%	
(I) พีเอช	(J) พีเอช				ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
3	4	-5.5340	9.5234	.582	-28.8369	17.7689
	5	-4.0135	9.5234	.688	-27.3164	19.2894
	6	-7.3585	9.5234	.469	-30.6614	15.9444
	7	-5.6555	9.5234	.574	-28.9584	17.6474
	8	-.9425	9.5234	.924	-24.2454	22.3604
4	3	5.5340	9.5234	.582	-17.7689	28.8369
	5	1.5205	9.5234	.878	-21.7824	24.8234
	6	-1.8245	9.5234	.854	-25.1274	21.4784
	7	-.1215	9.5234	.990	-23.4244	23.1814
	8	4.5915	9.5234	.647	-18.7114	27.8944

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข34 (ต่อ)

(I) พีเอช	(J) พีเอช	การแจกแจงผลต่างของค่าเฉลี่ย (I-J)	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	นัยสำคัญ	ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 95%	
					ค่าขีดจำกัดล่าง	ค่าขีดจำกัดบน
5	3	4.0135	9.5234	.688	-19.2894	27.3164
	4	-1.5205	9.5234	.878	-24.8234	21.7824
	6	-3.3450	9.5234	.737	-26.6479	19.9579
	7	-1.6420	9.5234	.869	-24.9449	21.6609
	8	3.0710	9.5234	.758	-20.2319	26.3739
6	3	7.3585	9.5234	.469	-15.9444	30.6614
	4	1.8245	9.5234	.854	-21.4784	25.1274
	5	3.3450	9.5234	.737	-19.9579	26.6479
	7	1.7030	9.5234	.864	-21.5999	25.0059
	8	6.4160	9.5234	.526	-16.8869	29.7189
7	3	5.6555	9.5234	.574	-17.6474	28.9584
	4	.1215	9.5234	.990	-23.1814	23.4244
	5	1.6420	9.5234	.869	-21.6609	24.9449
	6	-1.7030	9.5234	.864	-25.0059	21.5999
	8	4.7130	9.5234	.638	-18.5899	28.0159
8	3	.9425	9.5234	.924	-22.3604	24.2454
	4	-4.5915	9.5234	.647	-27.8944	18.7114
	5	-3.0710	9.5234	.758	-26.3739	20.2319
	6	-6.4160	9.5234	.526	-29.7189	16.8869
	7	-4.7130	9.5234	.638	-28.0159	18.5899

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้