

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษทางชีวภาพจากเชื้อราเอนโดไฟต์



นางสาวบงกช วงษ์ปาน  
นางสาวปวีณา พวงศรี  
นายเอกชัย รัตนเลิศนภาวงศ์

2/พ  
2/11/3/ก  
2547

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 61828  
วัน,เดือน,ปี 21 ก.ค. 2549

11603690  
.b.....  
.i.....

ปัญหาพิเศษ/โครงการพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต  
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์  
คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## **Production of biopulping enzymes from endophytic fungi**



**Miss Bongkod Wongpan**  
**Miss Paweena Puangsri**  
**Mr. Eakgachai Rattanaeusnapawong**

**A Special Project Submitted in Partial 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 2004**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**โครงการพิเศษเรื่อง** การผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษทางชีวภาพจากเชื้อราเอนโดไฟต์  
**นักศึกษา** นางสาวบงกช วงษ์ปาน  
 นางสาวปวีณา พวงศรี  
 นายเอกชัย รัตนเลิศนภาวงศ์  
**ภาควิชา** ชีววิทยาประยุกต์  
**สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ  
**อาจารย์ที่ปรึกษา** อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์ ไอชิ่งเกริช  
**อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** ผศ.อารี ฤทธิบุญรณ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

| คณะกรรมการตรวจสอบ                            | ลายมือชื่อ   |
|--|--|
| ประธานกรรมการ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล             |   |
| กรรมการ อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์ ไอชิ่งเกริช |   |
| กรรมการ ผศ. อารี ฤทธิบุญรณ์                  |  |

.....  
 รองศาสตราจารย์ ดร. นวพร นน  
 (รองศาสตราจารย์ ดร. นวพร นน)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

|                      |   |
|----------------------|---|
| โครงการพิเศษ         | การผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษทางชีวภาพจากเชื้อราเอนโคไฟต์        |
| นักศึกษา             | นางสาวบงกช วงษ์ปาน<br>นางสาวปวีณา พวงศรี<br>นายเอกชัย รัตนเลิศนภาวงศ์ |
| ภาควิชา              | ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์                                       |
| สาขาวิชา             | เทคโนโลยีชีวภาพ   |
| ปีการศึกษา           | 2547  |
| อาจารย์ที่ปรึกษา     | อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์ ไอชิงเกริช                                   |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | ผศ. อารี ฤทธิบุรณ์  |

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อราเอนโคไฟต์จากใบลำควนและใบกระทิงในจังหวัดเชียงใหม่ มาผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษ จำนวนทั้งหมด 62 ไอโซเลต โดย 34 ไอโซเลตมาจากใบลำควน และอีก 28 ไอโซเลตมาจากใบกระทิง เมื่อนำทุกไอโซเลตมาทำการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษบนอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพด บดความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อรา K-37 มีอัตราส่วนการสร้างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี มากที่สุดเท่ากับ 3.33 แตกต่างจากไอโซเลตอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อนำเชื้อรา K-37 มาทำการวิเคราะห์และจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็น *Acromonium sp.* เมื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษ พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไซลันเนสได้ทั้งในสถานะเขย่า 5,102.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสถานะนิ่ง 1,928.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์แลคเคสและเปอร้ออกซิเดสบนอาหารแข็งที่มีกรดแทนนิกร้อยละ 0.5 ไม่พบการผลิตเอนไซม์แลคเคสและเปอร้ออกซิเดสแต่อย่างใด เมื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลันเนสโดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าการเลี้ยงเชื้อรา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 4 ในสถานะเขย่า เป็นระยะเวลา 6 วัน สามารถผลิตเอนไซม์ไซลันเนสได้สูงสุดในวันที่ 4 มีค่าเท่ากับ 6,831.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างจากสภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 15, 45 องศาเซลเซียส และพีเอช 3, 5, 6, 7, 8, 9 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>Special Project Title</b>      | Production of biopulping enzymes from endophytic fungi                             |
| <b>Name</b>                       | Miss Bongkod Wongpan<br>Miss Paweena Puangsri<br>Mr. Eakgachai Rattanaleusnapawong |
| <b>Department</b>                 | Applied Biology Faculty of Science   |
| <b>Program</b>                    | Biotechnology  |
| <b>Academic Year</b>              | 2004   |
| <b>Special Project Advisor</b>    | Mrs. Kulwadee Tongpubesra  |
| <b>Special Project Co-advisor</b> | Assist. Prof. Aree Rittiboon   |

### ABSTRACT

The endophytic fungi from Chiangmai, 34 isolates from Lumduan leaves and 28 isolates from Krating leaves, were investigated for biopulping enzymes production. All isolates were selected for biopulping enzymes activity on xylan medium agar containing 0.1% corn stover. The highest ratio of clear zone and colony size was obtained by isolate K-37 as 3.33, thus significantly different from that by other isolates, at 95% confidence. Endophytic fungus K-37 isolate was then morphologically identified as *Acremonium* sp. This isolate could produce enzyme xylanase in both shake flask culture and static culture as 5,102.4 and 1,928.5 unit/ml, respectively. However, neither laccase nor peroxidase activity could be produced on 0.5% tannic agar. The study of optimum conditions for cultivating K-37 on xylan medium carried out xylanase production containing 0.1% corn stover. The highest xylanase activity by *Acremonium* K-37 was 6,831.4 unit/ml when it was cultivated as shake flask culture for 4 days at 200 rpm, 30 °C and initial pH 4.0, which was significantly different from that at 15 and 45 °C and initial pH 3.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0 but not significantly different from that at room temperature, at 95% confidence.

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์ ไอชิงเกริช เป็นอย่างยิ่งที่ได้ให้โอกาส คำแนะนำ แนวทางในการค้นคว้าวิจัย การทำวิจัย การเขียนโครงการพิเศษฉบับนี้ รวมทั้งการ ตรวจสอบแก้ไขโครงการพิเศษนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ การให้คำแนะนำปรึกษาต่างๆ อย่าง ไม่ว่าจะเป็น เป็นเรื่องใดก็ตามตลอดมา

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบุรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาพร้อมเป็นอย่างสูง ที่ได้ ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในทุก ๆ เรื่อง อีกทั้งยังเอื้อเฟื้อให้ความช่วยเหลือเรื่องอุปกรณ์และ สารเคมี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล ประธานคณะกรรมการสอบโครงการ พิเศษที่ได้ช่วยตรวจสอบแก้ไขในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพรักยิ่ง สำหรับคำแนะนำ และกำลังใจ ในการศึกษาและทำโครงการพิเศษ ทั้งหมดนี้เป็นแรงผลักดันให้สามารถผ่านพ้นปัญหาต่างๆ ได้

สุดท้ายขอขอบคุณอาจารย์ พี่นักศึกษาปริญญาโท และเพื่อนทุกท่านที่มีได้กล่าวมา ณ ที่นี้ ที่ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ การดูแลเอาใจใส่ รวมทั้งกำลังใจในการศึกษาวิจัยมาโดยตลอด

บงกช วงษ์ปาน

ปวีณา พวงศรี

เอกชัย รัตนเลิศนภาวงศ์

## สารบัญ

|  | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย  | ก    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ   | ข    |
| กิตติกรรมประกาศ  | ค    |
| สารบัญ   | ง    |
| สารบัญตาราง  | ฉ    |
| สารบัญรูป  | ญ    |
| บทที่ 1 บทนำ   | 1    |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ  |      |
| 2.1 กระบวนการผลิตกระดาษ  | 3    |
| 2.2 องค์ประกอบของเนื้อไม้ที่ใช้เป็นเยื่อกระดาษ                         | 7    |
| 2.3 ไซเลน  | 10   |
| 2.4 การผลิตกระดาษด้วยวิธีทางชีวภาพ                                     | 14   |
| 2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการฟอกกระดาษ                                 | 16   |
| 2.6 การผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ           | 25   |
| 2.7 เชื้อราเอนโดไฟต์กับการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษ                         | 25   |
| 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษจากเชื้อราเอนโดไฟต์ | 28   |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย   |      |
| 3.1 จุลินทรีย์   | 29   |
| 3.2 อุปกรณ์  | 29   |
| 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี   | 30   |
| 3.4 วิธีการทดลอง   | 30   |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล   |      |
| 4.1 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากใบลำควนและใบกระทิง                   | 33   |
| 4.2 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษ                 | 36   |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

|  | หน้า |
|--|------|
| 4.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลคเตสและเปอร้ออกซิเดส  | 47   |
| 4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษของเชื้อรา<br>เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ | 48   |
| บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ  | 60   |
| เอกสารอ้างอิง  | 62   |
| ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์   | 67   |
| ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์   | 69   |
| ภาคผนวก ค ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษ  | 72   |
| ภาคผนวก ง การคำนวณทางสถิติ   | 87   |

## สารบัญตาราง

|              |  | หน้า |
|--------------|--|------|
| ตารางที่ 2.1 | ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลาลเนสทางการค้า  | 17   |
| ตารางที่ 2.2 | ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส   | 25   |
| ตารางที่ 4.1 | ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากใบลำควน  | 33   |
| ตารางที่ 4.2 | ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากใบกระทิง   | 35   |
| ตารางที่ 4.3 | ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟต์ ที่แยกได้จากใบลำควน เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดบดความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5.0 เป็นระยะเวลา 3 วัน                                 | 37   |
| ตารางที่ 4.4 | ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟต์ ที่แยกได้จากใบกระทิง เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดบดความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5.0 เป็นระยะเวลา 3 วัน                                | 39   |
| ตารางที่ 4.5 | การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ ไซลาลเนส เซลลูเลส แลคเคส และเปอร็อกซิเดส ในเชิงปริมาณของเชื้อราเอนโดไฟต์ ทั้งสองไอโซเลตที่คัดเลือกได้ เมื่อเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน | 42   |
| ตารางที่ 4.6 | การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนส ในเชิงปริมาณของเชื้อรา <i>Acremonium</i> sp. K-37 เมื่อเลี้ยงเชื้อรา ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน  | 50   |
| ตารางที่ 4.7 | การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนส ในเชิงปริมาณของเชื้อรา <i>Acremonium</i> sp. K-37 เมื่อเลี้ยงเชื้อรา ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 6 วัน ในช่วงพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ 3 ถึง 9                         | 55   |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

|  | หน้า |
|--|------|
| <p><b>ตารางที่ 4.8</b> การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส ในเชิงปริมาณของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 เมื่อเลี้ยงเชื้อรา ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบด ร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 4 เป็นระยะเวลา 6 วัน ในอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงที่ 15, 30 และ 45 องศาเซลเซียส</p> | 58   |
| <p><b>ตารางที่ ค1</b> ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 9 วัน</p>   | 72   |
| <p><b>ตารางที่ ค2</b> ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่ง เป็นระยะเวลา 9 วัน</p>   | 73   |
| <p><b>ตารางที่ ค3</b> ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา L-252/2 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 9 วัน</p>  | 74   |
| <p><b>ตารางที่ ค4</b> ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา L-252/2 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่ง เป็นระยะเวลา 9 วัน</p>  | 75   |
| <p><b>ตารางที่ ค5</b> ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน พีเอช 3</p>                                     | 76   |
| <p><b>ตารางที่ ค6</b> ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน พีเอช 4</p>                                     | 77   |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

|  | หน้า |
|--|------|
| <p>ตารางที่ ค7    คำกิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน</p> <p>พีเอช 5</p>  | 78   |
| <p>ตารางที่ ค8    คำกิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน</p> <p>พีเอช 6</p>  | 79   |
| <p>ตารางที่ ค9    คำกิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน</p> <p>พีเอช 7</p>   | 80   |
| <p>ตารางที่ ค10    คำกิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน</p> <p>พีเอช 8</p> | 81   |
| <p>ตารางที่ ค11    คำกิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน</p> <p>พีเอช 9</p> | 82   |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

|   | หน้า |
|---|------|
| <p>ตารางที่ ค12    กิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอช 4 เป็นระยะเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส</p> | 83   |
| <p>ตารางที่ ค13    กิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอช 4 เป็นระยะเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส</p> | 84   |
| <p>ตารางที่ ค14    กิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอช 4 เป็นระยะเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส</p> | 85   |
| <p>ตารางที่ ค15    แสดงค่าการเจริญของเชื้อรา <i>Acremonium</i> sp. K-37 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 9 วัน</p>                               | 86   |

## สารบัญรูป

|  | หน้า |
|--|------|
| รูปที่ 2.1 กระบวนการผลิตกระดาษ   | 6    |
| รูปที่ 2.2 สามโครงสร้างหลักของลิกนิน   | 8    |
| รูปที่ 2.3 การแตกออกแบบอัลคาไลน์ของพันธะ $\alpha$ -aryl ether ในหน่วยของสารประกอบฟีนอลเอริลโพรเพน  | 8    |
| รูปที่ 2.4 การแตกแบบซัลไฟโดไลติกของพันธะ $\beta$ -aryl ether ในหน่วยของสารประกอบฟีนอลเอริลโพรเพน และเปลี่ยนรูปไปเป็นอินอล-อีเธอร์                | 9    |
| รูปที่ 2.5 การแตกแบบอัลคาไลน์ของพันธะ $\beta$ -aryl ether ในหน่วยของสารประกอบฟีนอลเอริลโพรเพน  | 10   |
| รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan ในพืชล้มลุกและพืชตระกูลหญ้า  | 11   |
| รูปที่ 2.7 โครงสร้างของไซแลนซึ่งแสดงความแตกต่างของกลุ่มแทนที่ของตำแหน่งที่จับ  | 12   |
| รูปที่ 2.8 ส่วนประกอบของ arabino-4-o-methyl-glucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้ออ่อน) ตัวเลขแสดงถึงโซ่กิ่งต่างๆ สร้างพันธะกับคาร์บอนอะตอม             | 13   |
| $\alpha$ -Arf : $\alpha$ -Arabinofuranose; $\alpha$ -4-O-Me-GlcA ; $\alpha$ -4-O-methylglucuronic acid   | 13   |
| รูปที่ 2.9 ส่วนประกอบของ O-acetyl-4-O-methyl-glucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้อแข็ง) ตัวเลขแสดงถึงตำแหน่งโซ่กิ่งชนิดต่างๆ สร้างพันธะกับคาร์บอนอะตอม | 13   |
| Ac : Acetyl group ; $\alpha$ -4-O-Me-GlcA : $\alpha$ -4-O-methylglucuronic acid  | 13   |
| รูปที่ 2.10 (A) การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซแลน   |      |
| Ac : Acetyl group ; $\alpha$ -Arf : $\alpha$ -Arabinofuranose; $\alpha$ -4-O-Me-GlcA ; $\alpha$ -4-O-methylglucuronic acid                       |      |
| (B) การย่อยสลายไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยเบต้าไซโลซิเดส   | 20   |
| รูปที่ 2.11 กลไกการทำงานของลิกนินเปอร์ออกซิเดส (OX = สารตัวกลางในสถานะออกซิไดส์)   | 21   |

## สารบัญรูป (ต่อ)

|  | หน้า |
|--|------|
| รูปที่ 2.12 กลไกการทำงานของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสออกซิไดส์ Mn(II) ไปเป็น Mn(III) Mn(III) จะทำปฏิกิริยาต่อกับมาโลเนต (malonate) ได้เป็น สารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลเหลืออยู่ในลิกนินได้ (OX = สารตัวกลางในสภาวะออกซิไดส์)  | 22   |
| รูปที่ 2.13 (A) กลไกของแลคเคส<br>(B) กลไกของแลคเคสผ่านสารตัวกลาง(OX = สารตัวกลางในสภาวะออกซิไดส์)  | 23   |
| รูปที่ 4.1 (ซ้าย) ลักษณะโคโลนิของเชื้อราเอนโดไฟต์ K-37 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนย้อมด้วยสีคองโกเรด<br>(ขวา) หลังย้อมสี คองโกเรด และล้างออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ จะปรากฏวงใสรอบโคโลนีขึ้น   | 41   |
| รูปที่ 4.2 (ซ้าย) ลักษณะโคโลนิของเชื้อราเอนโดไฟต์ L-252/2 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้องก่อนย้อมด้วยสีคองโกเรด<br>(ขวา) หลังย้อมสีคองโกเรด และล้างออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ จะปรากฏวงใสรอบโคโลนีขึ้น  | 41   |
| รูปที่ 4.3 (ซ้าย) ลักษณะการเจริญของเชื้อราเอนโดไฟต์ K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสถานะนิ่ง<br>(ขวา) ลักษณะการเจริญของเชื้อราเอนโดไฟต์ K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสถานะเขย่า (200 รอบต่อนาที) | 44   |

## สารบัญรูป (ต่อ)

|   | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 4.4 (ซ้าย) ลักษณะการเจริญของเชื้อราเอนโดไฟต์ L-252/2 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสถานะนิ่ง   |      |
| (ขวา) ลักษณะการเจริญของเชื้อราเอนโดไฟต์ L-252/2 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสถานะเขย่า (200 รอบต่อนาที)   | 44   |
| รูปที่ 4.5 (ซ้าย) โคลโลนี และ (ตรงกลางและขวา) เซลล์ผลิตสปอร์ ของ <i>Acremonium</i> sp. K-37   | 45   |
| รูปที่ 4.6 ลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา <i>Acremonium</i> sp. ที่ประกอบด้วย conidiophores, phialides และ conidia; Bar = 10 ไมโครเมตร  | 46   |
| รูปที่ 4.7 (ซ้าย) โคลโลนีของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp.K-37 บนอาหารแข็งที่เติม มอลต์สกัด ร้อยละ 1.5 และกรดแทนนิกร้อยละ 0.5 เป็นระยะเวลา 4 วัน หลังจากการย้อมด้วยไซริงกัลดาซินไม่เกิดสีชมพู          |      |
| (ขวา) โคลโลนีของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp.K-37 บนอาหารแข็งที่เติมเพียงกรดแทนนิกร้อยละ 0.5 เป็นระยะเวลา 4 วัน ไม่เกิดวงสีน้ำตาลรอบโคลโลนี   | 47   |
| รูปที่ 4.8 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อรา <i>Acremonium</i> sp. K-37 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้องในสถานะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 9 วัน | 48   |
| รูปที่ 4.9 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 เป็นเวลา 9 วัน ในสถานะเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที                    | 49   |
| รูปที่ 4.10 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 เป็นเวลา 9 วัน ในสถานะนิ่ง                                      | 50   |

## สารบัญรูป (ต่อ)

|             | หน้า  |    |
|-------------|---|----|
| รูปที่ 4.11 | กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 เป็นเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 3  | 51 |
| รูปที่ 4.12 | กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 เป็นเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 4  | 52 |
| รูปที่ 4.13 | กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 เป็นเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 5  | 52 |
| รูปที่ 4.14 | กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 เป็นเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 6  | 53 |
| รูปที่ 4.15 | กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 เป็นเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า(200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 7   | 53 |
| รูปที่ 4.16 | กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 เป็นเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 8  | 54 |
| รูปที่ 4.17 | กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 เป็นเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 9  | 54 |
| รูปที่ 4.18 | กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 เป็นเวลา 6 วัน พีเอช 4 ใน สภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส | 56 |

## สารบัญรูป (ต่อ)

|  | หน้า |
|--|------|
| รูปที่ 4.19 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 เป็นเวลา 6 วัน พีเอช 5 ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส | 57   |
| รูปที่ 4.20 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ <i>Acremonium</i> sp. K-37 เป็นเวลา 6 วัน พีเอช 5 ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส | 57   |

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ

อุตสาหกรรมกระดาษเป็นการนำเซลลูโลสในเนื้อไม้มาผลิตเป็นเยื่อกระดาษ องค์ประกอบหลักในเนื้อไม้ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Burdette, 1988) เซลลูโลสจะนำไปใช้ผลิตเป็นเยื่อกระดาษ และลิกนิน ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลจะถูกสกัดออก โดยใช้สารเคมีพวก oxidizing agent เช่น คลอรีนและคลอรีนไดออกไซด์ ร่วมกับสารละลายต่าง (Buchert และคณะ, 1994)

ปัจจุบันพบว่าการใช้สาร oxidizing agent จะทำให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการใช้สารคลอรีน ทำให้เกิดสาร adsorbable organic halogen (AOX) ซึ่งเป็นสารที่ย่อยสลายได้ยากมาก ในธรรมชาติ ดังนั้นเพื่อเป็นการลดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมที่เกิดจากการฟอกสีเยื่อกระดาษ จึงได้มีการนำเทคโนโลยีด้านเอนไซม์เข้ามาช่วย โดยมีการใช้เอนไซม์ไซลาลเนส ในการแปรสภาพเยื่อกระดาษ โดยเพิ่มรูพรุนของเยื่อกระดาษและทำให้ลิกนินในเยื่อกระดาษมีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น ทำให้สารเคมีที่ใช้ในการฟอกสีเข้าไปสกัดลิกนินออกได้ง่าย เป็นการลดการใช้สารเคมีลง (Tolan, 1996)

การผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการฟอกกระดาษ จำเป็นต้องคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก ส่วนใหญ่นิยมใช้เชื้อราในการผลิต จากการศึกษาของ Chauvet และคณะ ในปี 1987 พบว่าเอนไซม์ไซลาลเนสจากเชื้อรา *Sporotrichum dimorphosporum* สามารถทำให้แรงยึดระหว่างผนังเซลล์ที่อ่อนลงและลดการใช้สารเคมีในการฟอกกระดาษ จากการศึกษาของ Suto และคณะ (2001) พบว่า เชื้อราเอนโดไฟต์ (endophyte) สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้ ซึ่งถ้ามีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกกระดาษ จะเป็นการลดการใช้สารเคมีและพลังงานในการต้มเยื่อกระดาษลง

จากความเป็นไปได้นี้ เราจึงทำการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากใบของต้นลำดวนและต้นกระทิงในจังหวัดเชียงใหม่ เพื่อหาเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ฟอกกระดาษได้ เพื่อเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมในประเทศไทยต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ทำการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากใบของต้นลำดวนและต้นกระทิงในจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 62 สายพันธุ์ ที่จะสามารถผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษได้

1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพและกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษจากเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้

1.2.3 เปรียบเทียบหาสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษได้

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 คัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษได้ โดยนำมาเลี้ยงลงบนอาหารแข็งไซแลน แล้วสังเกตวงใสที่เกิดขึ้นจากการผลิตเอนไซม์ที่สามารถฟอกกระดาษของเชื้อรา

1.3.1 นำเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถฟอกกระดาษ ในอาหารแข็งมาเลี้ยงลงในอาหารเหลวไซแลน เพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส เซลลูเลส และฟีนอลออกซิเดสและแลคเคส

1.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษ โดยจะเปรียบเทียบดังนี้

1.3.2.1 สภาวะการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวแบบนิ่งและแบบเขย่า

1.3.2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

1.3.2.3 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 นำเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ ร่วมกับเทคนิคทางเคมีซึ่งในกระบวนการฟอกกระดาษในประเทศไทยจะเป็นแบบปราศจากธาตุคลอรีน (Elemental Chlorine Free Bleaching Process; ECF) จากการประยุกต์ใช้ทำให้น้ำทิ้งจากโรงงานมีปริมาณสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมจากกระบวนการผลิต ทำให้ประหยัดพลังงานในขั้นตอนการต้มเยื่อกระดาษลง

1.4.2 ลดปริมาณสารประกอบคลอรีนที่ใช้ในการฟอกกระดาษ

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและหลักการ

#### 2.1 กระบวนการผลิตกระดาษ (Burdette และคณะ, 1988)

เป็นการนำเส้นใยเซลลูโลสจากทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งมาผ่านกระบวนการฟอกกระดาษ เพื่อให้ได้เยื่อเซลลูโลสไปผลิตกระดาษ กระบวนการฟอกกระดาษสามารถใช้กระบวนการทางกล (Mechanical pulping) กระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ กระบวนการฟอกกระดาษมีขั้นตอนดังนี้

##### 2.1.1. ปอกเปลือก (debarking)

กระบวนการเริ่มจากตัดไม้ ปอกเปลือกออก นำแต่เนื้อไม้มาใช้ในขั้นต่อไป

##### 2.1.2. ตัดไม้เป็นชิ้นเล็กๆ (chipping)

ก่อนที่จะแปรสภาพเป็นเยื่อกระดาษ จะตัดไม้เป็นชิ้นเล็กๆ มีขนาดใหญ่ที่หมุนเป็นวงจะตัดไม้เป็นชิ้นเล็กๆ

##### 2.1.3. การผลิตเยื่อกระดาษ (pulping)

ขั้นตอนนี้จะเป็นการแยกเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสออกจากลิกนิน และกำจัดเรซินและน้ำมันที่อยู่ในไม้ออก ขั้นตอนนี้มีความสำคัญเนื่องจากเส้นใยที่เหลืออยู่จะถูกนำมาผลิตเป็นกระดาษ กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการหลัก คือ

###### 2.1.3.1 กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษทางเคมี

กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษทางเคมีจะได้เส้นใยเซลลูโลสที่บริสุทธิ์มาก แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ กระบวนการฟอกกระดาษแบบซัลไฟต์ จะใช้สารละลายโซเดียมไบซัลไฟต์ ในการต้มเยื่อกระดาษ และกระบวนการฟอกกระดาษแบบคราฟต์ จะใช้สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ในการต้มเยื่อกระดาษ

###### 2.1.3.2 กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษด้วยวิธีทางกล (Mechanical pulping)

กระบวนการเริ่มด้วยการปอกเปลือกด้วยหินบดหรือโลหะจานหมุน เพื่อผลิตเป็นเยื่อกระดาษ ซึ่งมีทั้งข้อดีและข้อเสีย ผลผลิตของเยื่อกระดาษที่ใช้ได้มีสูง แต่ได้กระดาษที่มีคุณภาพต่ำซึ่งไม่ร้อยละ 95 จะถูกเปลี่ยนเป็นเยื่อกระดาษ เทียบกับวิธีทางเคมีซึ่งได้เพียงร้อยละ 45-50 เท่านั้น แต่คุณภาพของกระดาษที่ได้จากวิธีทางกลต่ำกว่าวิธีเคมีเนื่องจาก วิธีทางกลใช้พลังงานในการแปรสภาพ ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่สูงเท่าวิธีทางเคมี จึงยังมีลิกนินและเรซินหลงเหลืออยู่ในเยื่อ

กระดาษ กระบวนการบดจะทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกเมื่อมีการฉีกขาด ลดความแข็งแรงของกระดาษลง กระดาษที่ได้จะมีเส้นใยที่อ่อนและมีปริมาณลิกนินสูง ซึ่งทำให้กระดาษมีสีเข้ม ผลิตภัณฑ์กระดาษที่ได้จึงมักไปใช้ผลิตเป็นกระดาษหนังสือพิมพ์ สมุดโทรศัพท์และการใช้งานที่ไม่จำเป็นต้องใช้กระดาษที่มีคุณภาพสูงนัก

#### 2.1.4. การฟอกกระดาษ (bleaching)

ขั้นตอนนี้มีความสำคัญมาก การฟอกกระดาษนี้จะกำจัดสิ่งเจือปนและทำให้เยื่อกระดาษสะอาด การฟอกกระดาษกำจัดลิกนิน ซึ่งเป็นสิ่งเจือปนอยู่ในเส้นใยออกกระบวนการทางเคมีใช้ก๊าซคลอรีนและคลอรีนไดออกไซด์เพื่อฟอกเยื่อกระดาษ การฟอกกระดาษทางกลใช้เปอร์ออกไซด์และก๊าซคลอรีนกำจัดลิกนินที่เหลืออยู่เกือบหมด ขณะที่คลอรีนไดออกไซด์จะฟอกลิกนินที่ยังค้างอยู่ให้ขาวขึ้น

การสกัดเส้นใยเซลลูโลสที่ทำโดยวิธีทางกล ซึ่งปรับปรุงให้กระดาษมีคุณภาพดีขึ้นโดยการใช้ความร้อนและสารเคมี (thermochemical pulping) แม้ว่าวิธีการนี้จะได้ผลดี แต่ก็สิ้นเปลืองพลังงานเป็นอันมาก ส่วนวิธีการฟอกกระดาษด้วยวิธีทางเคมีนั้นเป็นการละลายลิกนิน ออกจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส วิธีการทางเคมีแบบแรกที่มีใช้กันในปัจจุบันคือ กระบวนการฟอกกระดาษแบบคราฟท์ (kraft process) ซึ่งต้มขึ้นไม้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมซัลไฟด์ แบบที่สองคือกระบวนการฟอกกระดาษแบบซัลไฟด์ ต้มขึ้นไม้ในสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ ปกติผลผลิตที่ได้จากกระบวนการฟอกกระดาษทางเคมีจะน้อยกว่ากระบวนการฟอกกระดาษทางกลเนื่องจากการย่อยสลายเซลลูโลสไปบางส่วน อุปสรรคอีกอย่างหนึ่งของกระบวนการฟอกกระดาษทางเคมีคือ มีการปล่อยสารเคมีที่เป็นอันตรายจำนวนมากสู่สิ่งแวดล้อม (Samook, 1989)

#### 2.1.5. การผลิตกระดาษ

เครื่องผลิตกระดาษแบ่งออกเป็นสี่ส่วน เริ่มจากขั้นตอนที่เรียกว่า การเตรียมสต็อก (stock preparation) ระหว่างการเตรียมสต็อก จะนำเส้นใยไม้มาผสมกับน้ำ จากนั้นจะระบายน้ำออก เมื่อระบายน้ำออกแล้ว จะเกิดร่างแหของเส้นใย ส่วนที่สองคือ การกด กระดาษจะถูกกดอยู่ระหว่างลูกกลิ้งกับเฟลต์ (felt, แผ่นเส้นใยไบนลอนและโพลีเอสเตอร์) เป็นการกำจัดน้ำออกจากกระดาษ หลังจากส่วนกดกระดาษแล้วยังคงมีน้ำเหลืออยู่ในกระดาษร้อยละ 40-50 ส่วนที่สามคือ ส่วนทำแห้ง เครื่องทำแห้งจะกำจัดน้ำออกได้มากกว่า เมื่อผ่านขั้นตอนนี้จะเหลือน้ำอยู่ร้อยละ 2-6 ในเครื่องทำกระดาษที่มีคุณภาพสูงจะเคลือบกระดาษด้วยแป้งและธาตุต่างๆ เพื่อเพิ่มความสว่างให้กับกระดาษ และทำให้กระดาษแข็งแรงและเรียบเนียนขึ้น จากนั้นจะทำกระดาษให้แห้งอีกครั้งในส่วนที่สี่ (after-dryer section) สุดท้ายก็จะเป็นการเข้าม้วนกระดาษเป็นม้วนใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.6. การเคลือบกระดาษ (blade coater)

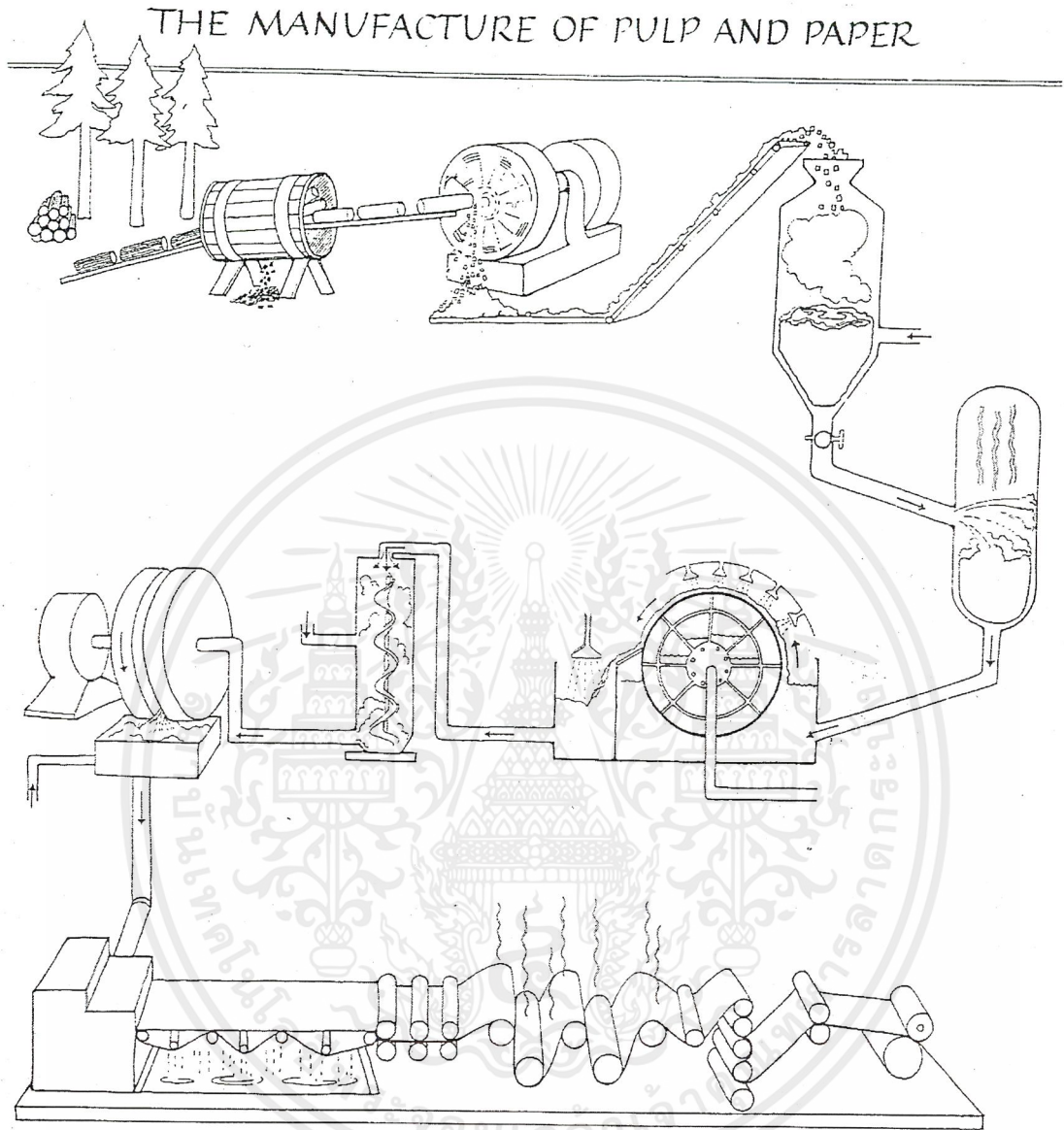
สำหรับกระดาษเคลือบ ใบบิดเคลือบกระดาษ (blade coater) จะเคลือบกระดาษเป็นชั้นบางๆ โดยกระดาษจะกลิ้งผ่านใบบิดเพื่อเคลือบผิวกระดาษ การเคลือบที่แตกต่างกันทำให้ได้กระดาษที่มีคุณภาพดีเหมาะแก่การพิมพ์

### 2.1.7. การบดให้เรียบและเงา (supercalender)

ขั้นตอนนี้จะทำให้กระดาษเป็นเงามันและเรียบเนียน เครื่อง supercalender ประกอบด้วยลูกกลิ้งขนาดใหญ่หลายอัน กระดาษจะผ่านลูกกลิ้งภายใต้แรงกดสูงและทำให้กระดาษร้อนขึ้น จากนั้นจะตัดกระดาษออกเป็นม้วนเล็ก

### 2.1.8. การทำกระดาษเป็นแผ่น (sheet converting)

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการทำกระดาษ ม้วนกระดาษจะถูกตัดออกเป็นแผ่น ขณะที่บางส่วนจะบรรจุทั้งม้วนเพื่อการขนส่งต่อไป



รูปที่ 2.1 กระบวนการผลิตกระดาษ

ที่มา : Burdette และคณะ (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

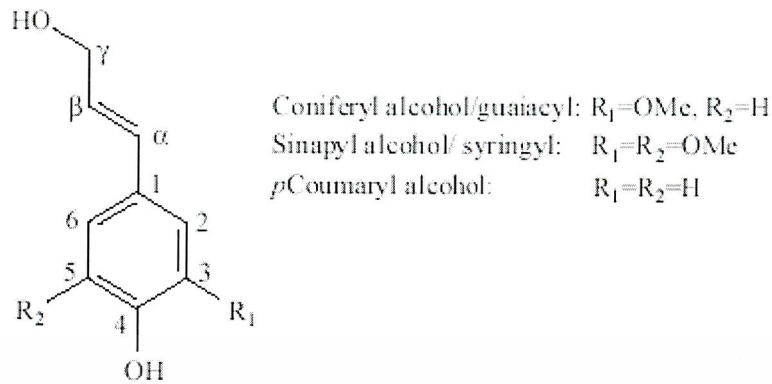
## 2.2 องค์ประกอบของเนื้อไม้ที่จะนำมาผลิตกระดาษ (ถัดมา, 2547)

โพลีแซกคาไรด์ที่พบที่ผนังเซลล์ของเนื้อไม้ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 9 ชนิด คือ ชนิดที่มีคาร์บอน 6 อะตอม จำนวน 7 อะตอม คือ กลูโคส กาเล็กโทส แมนโนส ฟิวโคส แรมโนส กรดกาเล็กทูโรนิก และกรดคลูคูโรนิก และชนิดที่มีคาร์บอน 5 อะตอม จำนวน 2 ชนิด คือ ไซโลส และอะราบิโนส น้ำตาลเหล่านี้อาจเชื่อมต่อกันเป็นพอลิเมอร์สายตรงหรือมีกิ่งก้าน อยู่ในโครงสร้างของผนังเซลล์ ซึ่งแต่ละชนิดมีโครงสร้างทางเคมีดังนี้

**2.2.1 เซลลูโลส** ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสจำนวนมากมาต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก โดยแต่ละโมเลกุลของเซลลูโลสเชื่อมติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยเซลลูโลสประมาณ 40-70 โมเลกุล เชื่อมรวมกันกลายเป็นไมโครไฟบริล หน้าที่ที่สำคัญของเซลลูโลสเกี่ยวข้องกับความแข็งแรงและความทนแรงดึง รวมทั้งป้องกันเซลล์ขณะที่มีการยืดขยายขนาดเซลล์ (elongation)

**2.2.2 เฮมิเซลลูโลส** มี 2 ชนิด คือ ไซโลกูแคนและไซเลน ไซโลกูแคนเป็นโครงสร้างที่มีไซโลสเป็นแกน และมีสายน้ำตาลไซโลสจับด้านข้างเป็นส่วนใหญ่ ส่วนไซเลน มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลไซโลสเป็นแกน และมีน้ำตาลไซโลส กาแลคโตส และอะราบิโนส จับที่ด้านข้างของแกน

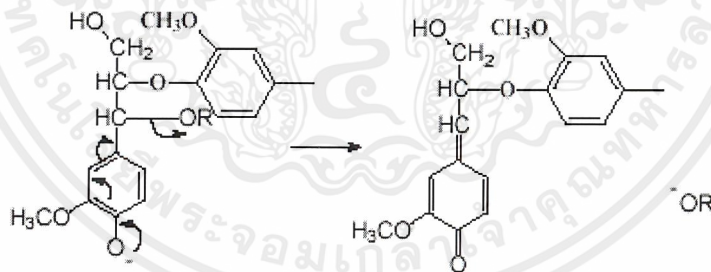
**2.2.3 ลิกนิน** เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสามมิติ เป็นสารเฮเทอโรโพลีเมอร์ ที่ประกอบด้วยหน่วยของฟีนิลโพรเพน ซึ่งเป็นสารประกอบที่เป็นโครงสร้างของพืชชั้นสูง อาจพบลิกนินในน้ำหนักแห้งของต้นไม้ถึงร้อยละ 25 ลิกนินถูกสังเคราะห์ขึ้นอย่างสุ่มจาก coniferyl, p-coumaryl และ sinapyl alcohol precursors (Tuor, 1995) แสดงดังรูปที่ 2.2 เนื่องจากลิกนินเป็นโพลีเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ การย่อยสลายจึงเกิดขึ้นภายนอกเซลล์ ลิกนินจะไม่ย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้อากาศ (anaerobic condition) พันธะระหว่างคาร์บอนอะตอม (C-C) และพันธะอีเธอร์ ซึ่งเชื่อมแต่ละหน่วยย่อย (subunit) จะย่อยสลายผ่านกลไกการออกซิเดชัน (Yaver, 1996)



### รูปที่ 2.2 สามโครงสร้างหลักของลิกนิน

ที่มา : Chakar และ Ragauskas (2004)

ปฏิกิริยการย่อยสลายระหว่างกระบวนการฟอกกระดาษ เป็นการแตกออกของพันธะ  $\alpha$ -aryl ether และ  $\beta$ -aryl ether (Gierer, 1980,1985) พันธะ  $\alpha$ -aryl ether ที่เชื่อมกันอยู่ในหน่วยของสารประกอบฟีนอลนั้นพร้อมที่จะแตกออก โดยเปลี่ยนจากสารประกอบฟีนอลไปเป็นสารตัวกลางควิโนนเมทาไทด์ (quinine methide) แสดงดังรูปที่ 2.3



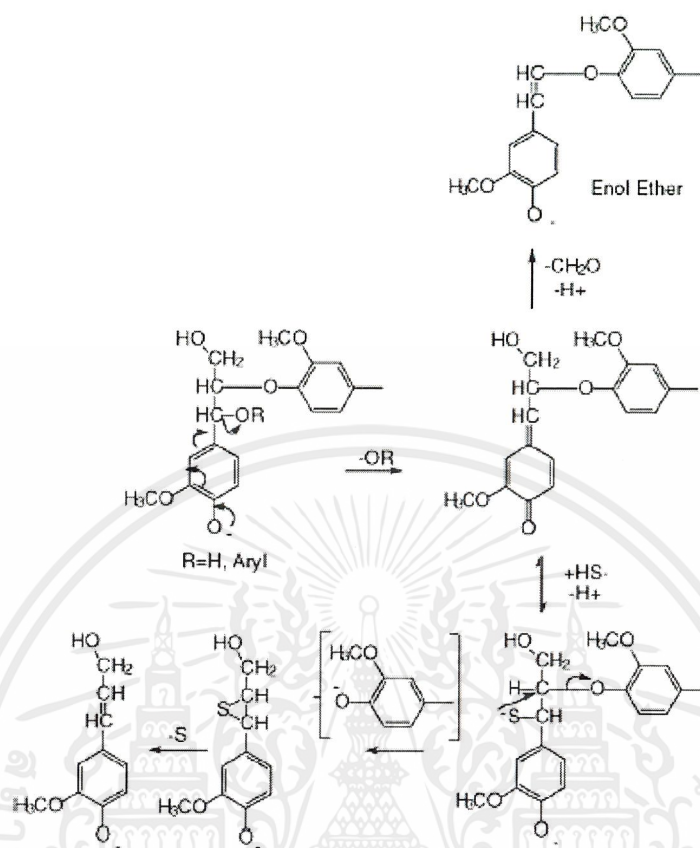
### รูปที่ 2.3 การแตกออกแบบอัลคาไลน์ของพันธะ $\alpha$ -aryl ether ในหน่วยของสารประกอบฟีนอลเอริล โพรเพน

ที่มา : Gierer (1970,1980,1982,1985)

หน่วยของสารประกอบฟีนอล สามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นสารตัวกลางควิโนนเมทาไทด์ ถ้าหมู่ที่หลุดออกเป็นคาร์บอนที่ตำแหน่งแอลฟา ปฏิกิริยาจะดำเนินไปโดยการเติมไอออนไฮโดรซัลไฟด์ ซึ่งทำให้ได้ เบนซิลเมอร์แคปไทด์ (benzyl mercaptide) จากนั้นเข้าทำปฏิกิริยากับคาร์บอนที่ตำแหน่งเบต้า ได้สารตัวกลางธิอริเรน (thiirane) และกำจัดหมู่  $\beta$ -aryloxy แสดงดังรูปที่

### 2.4

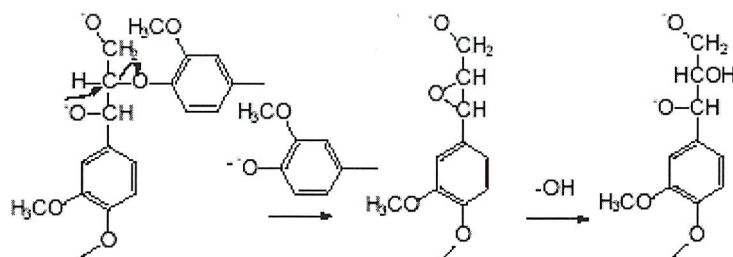
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 2.4** การแตกแบบซัลไฟโดไลติกของพันธะ  $\beta$ -aryl ether ในหน่วยของสารประกอบฟีนอลเอริลโพรเพน และเปลี่ยนรูปไปเป็นอินอล-อีเธอร์

ที่มา : Gierer (1970,1980,1982,1985)

ในอีกทางหนึ่งสารตัวกลางควิโนนเมทาไทด์ยังสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอินอล-อีเธอร์ที่คงตัวในสถานะที่เป็นค่า โดยกำจัดส่วนปลายที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีเมทิล เช่น ฟอรั่มอลดีไฮด์ (Gellerstedt และ Lindfors, 1991 ; Pasco และ suckling, 1994) การแตกออกของพันธะ  $\beta$ -aryl ether ในหน่วยของสารประกอบที่ปราศจากฟีนอล เกี่ยวข้องกับการเข้าทำปฏิกิริยาของหมู่ไฮดรอกซีไอออน ที่เกาะกับคาร์บอนตำแหน่งแอลฟาและแกมมา แสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การแตกแบบอัลคาไลน์ของพันธะ  $\beta$ -aryl ether ในหน่วยของสารประกอบฟีนอลเอริล โพรเพน

ที่มา : Gierer (1980,1982,1985)

### 2.3 ไซแลน

ไซแลนเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งในหลายชนิดที่พบในผนังเซลล์พืชไม้เนื้ออ่อนประมาณร้อยละ 2 ถึง 7 พบในไม้เนื้อแข็งพบประมาณร้อยละ 15 ถึง 30 และพบในไม้ล้มลุกพบมากกว่าร้อยละ 30 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (Wong และคณะ, 1998 ; whistler และ Richard, 1970) ไซแลนมีโครงสร้างหลักเป็นเบต้า-ดี-ไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4-glycosidic และมีสายโซ่กิ่งเป็นพวก acetyl, 4-O-methyl-D-glucosyl และ L-arabinofuranosyl group ดังรูปที่ 2.7

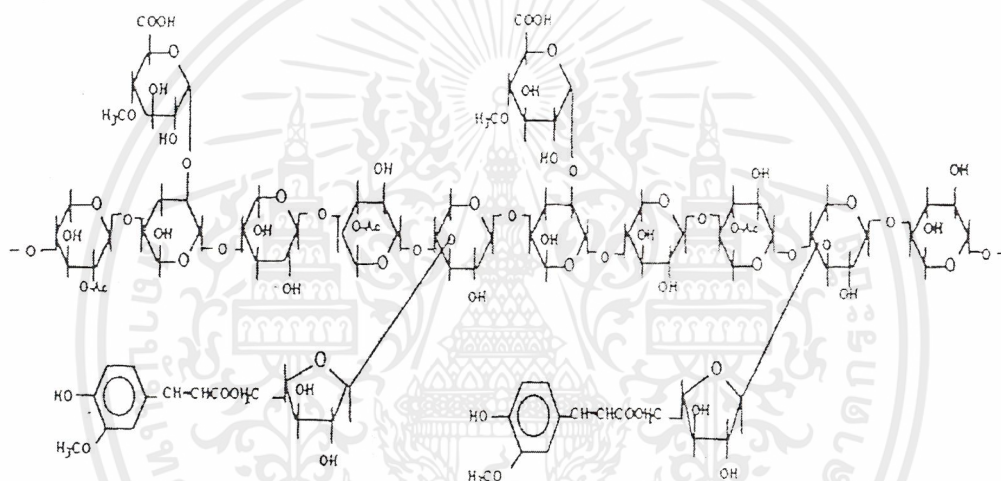
ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนได้แก่ arabino-4-O-methyl-glucuronoxylan (รูปที่ 2.8) 4-O-methylglucuronic acid สร้างพันธะ  $\alpha$ -1,2 glycosidic bond ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนไม่พบหมู่อะซิทิลและพบว่ามีส่วนของไซโลส ต่อ 4-O-methylglucuronic acid ต่อ arabinose เท่ากับ 8 ต่อ 1.6 ต่อ 1

ไซแลนในไม้เนื้อแข็งได้แก่ O-acetyl-4-O-methyl-glucuronoxylan (รูปที่ 2.9) ไซแลนในไม้เนื้อแข็งจะมีอัตราส่วนของไซโลส ต่อ 4-O-methylglucuronic acid ต่อ acetic acid เท่ากับ 10 ต่อ 1 ต่อ 7 โดยที่ไซแลนในไม้เนื้อแข็งมีหมู่อะซิทิลเชื่อมต่อกับไซโลสในสายโครงสร้างหลักที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ถึง 3 อยู่เป็นจำนวนมาก และทุกๆ 10 โมเลกุลของไซโลสพบ 4-O-methylglucuronic acid เชื่อมต่อกับไซโลสที่ตำแหน่ง 2 ของไซโลส

ไซแลนในไม้ล้มลุกและพืชตระกูลหญ้าได้แก่ O-acetyl-arabino-4-O-methyl-glucuronoxylan (รูปที่ 2.6) ไซแลนในไม้ล้มลุกมีโซ่กิ่งเป็น 4-O-methylglucuronic acid น้อยกว่าในไม้เนื้อแข็ง โดยส่วนใหญ่เป็น L-arabinofuranosyl group ซึ่งเชื่อมต่อกับไซโลสในโครงสร้างหลักที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 หรือทั้งสองตำแหน่ง นอกจากนั้นพบหมู่อะซิทิล ร้อยละ 2 ถึง

5 เชื่อมกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ในน้ำตาลไซโลสของโครงสร้างหลัก และมี arabinosyl sidechain และมี *p*-coumarosyl ประมาณร้อยละ 6 และ 3 ตามลำดับ (Viilkari และคณะ, 1993)

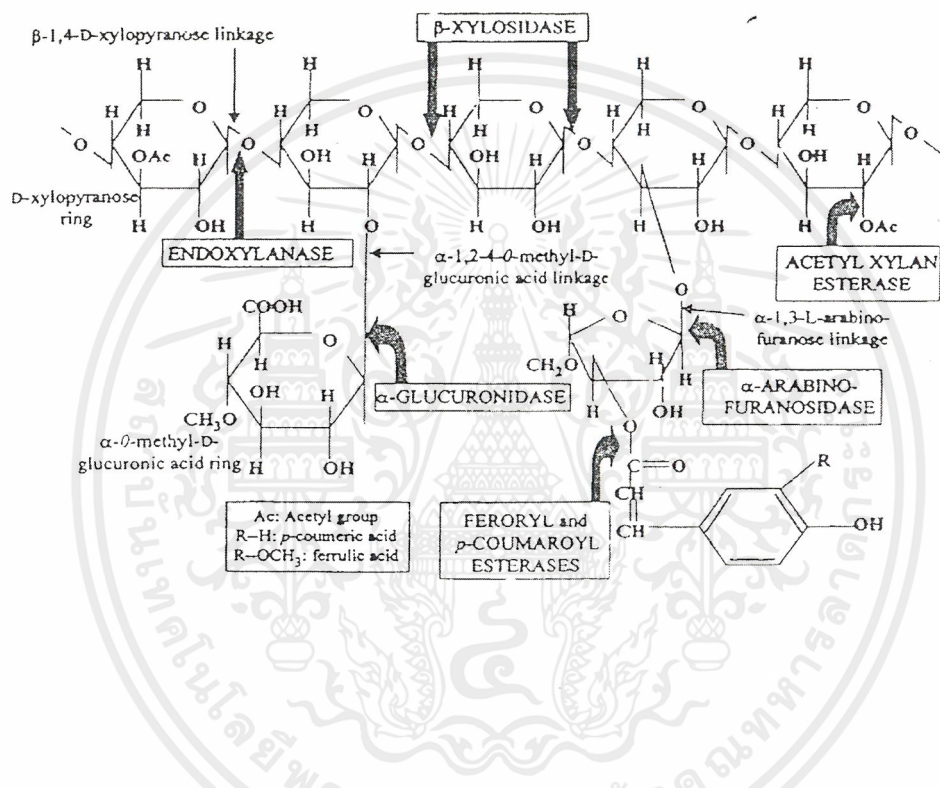
จากการที่เอนไซม์ไซลานเนสสามารถย่อยสลายไซแลนซึ่งอยู่ระหว่างเซลลูโลสและลิกนิน ดังนั้นลิกนินจึงหลุดออกเป็นอิสระ ทำให้ง่ายแก่การกำจัดออกในขั้นตอนการฟอกกระดาษต่อไป (Turner และคณะ 1992; Pham และคณะ, 1995)



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

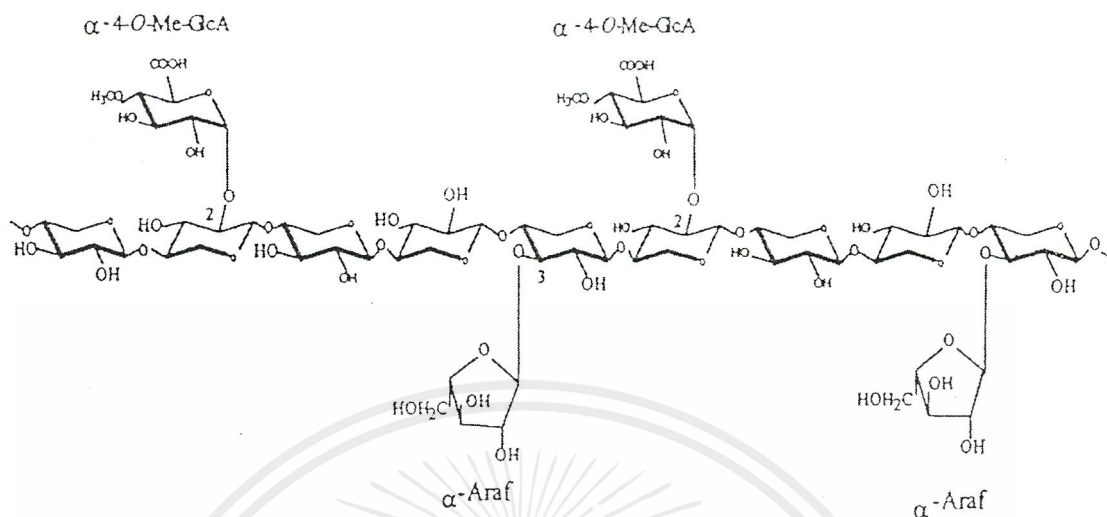
ที่มา : Coughlan และ Hazlewood (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของไซแลนซึ่งแสดงความแตกต่างของกลุ่มแทนที่ของตำแหน่งที่จับที่มา: Beg และคณะ (2001)

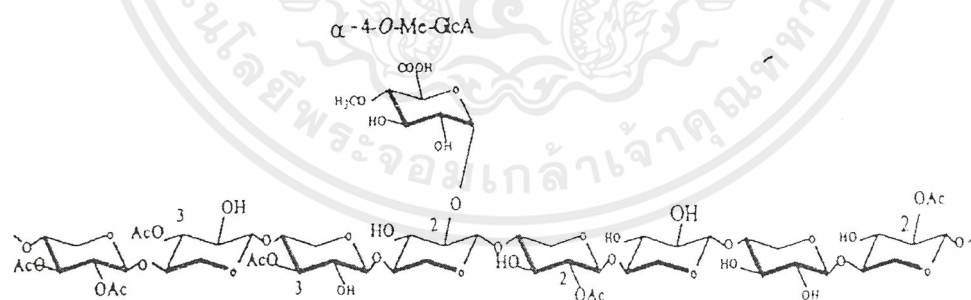
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 2.8** ส่วนประกอบของ arabino-4-o-methyl-glucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้ออ่อน) ตัวเลขแสดงถึงโซ่กิ่งต่างๆ สร้างพันธะกับคาร์บอนอะตอม

$\alpha$ -Araf :  $\alpha$ -Arabinofuranose;  $\alpha$ -4-O-Me-GlcA ;  $\alpha$ -4-O-methylglucuronic acid

ที่มา : Viilkari และคณะ (1993)



**รูปที่ 2.9** ส่วนประกอบของ O-acetyl-4-O-methyl-glucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้อแข็ง) ตัวเลขแสดงถึงตำแหน่งโซ่กิ่งชนิดต่างๆ สร้างพันธะกับคาร์บอนอะตอม

Ac : Acetyl group ;  $\alpha$ -4-O-Me-GlcA :  $\alpha$ -4-O-methylglucuronic acid

ที่มา : Viilkari และคณะ (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 การผลิตกระดาษด้วยวิธีทางชีวภาพ (Scott และคณะ, 2000)

กระบวนการฟอกกระดาษทางชีวภาพ เป็นการทำปฏิกิริยาของไม้ หรือวัตถุดิบที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ กับเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยลิกนิน ก่อนนำชิ้นไม้นั้นมาเข้าสู่กระบวนการฟอกกระดาษเชิงกล (mechanical pulping) เพื่อผลิตกระดาษต่อไป กระบวนการฟอกกระดาษทางชีวภาพจะลดปริมาณการใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมจากกระบวนการฟอกกระดาษทางเคมีดังกล่าวได้ และยังสามารถลดพลังงานที่ใช้ในกระบวนการฟอกกระดาษด้วย นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มปริมาณเยื่อเซลลูโลส เนื่องจากสามารถลดปริมาณเส้นใยเซลลูโลสที่ถูกทำลายระหว่างกระบวนการฟอกกระดาษทางเคมี

กระบวนการฟอกกระดาษในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มขึ้นในอนาคต ในขณะที่วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหายากขึ้น กระบวนการฟอกกระดาษทางกลแม้ว่าจะให้ปริมาณผลผลิตที่สูงก็ตาม แต่ก็ใช้พลังงานมากและให้ปริมาณผลผลิตที่ต่ำกว่าการฟอกกระดาษทางเคมี กระบวนการฟอกกระดาษแบบกราฟท์ จึงถูกนำมาใช้ร่วมกับกระบวนการฟอกกระดาษทางกล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพความแข็งแรงของกระดาษ แต่ก็ยังทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น จากข้อเสียเหล่านี้จึงเป็นการข้จำกัดในการใช้กระบวนการฟอกกระดาษทางกลในอุตสาหกรรมกระดาษ ทำให้มีการพัฒนากระบวนการฟอกกระดาษขึ้นโดยการนำกระบวนการฟอกกระดาษทางชีวภาพมาใช้ร่วมกับวิธีการฟอกกระดาษเชิงกล (Biomechanical pulp) คือ การทำปฏิกิริยาของวัตถุดิบที่มี ลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบกับเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยลิกนิน ก่อนเข้าสู่กระบวนการฟอกกระดาษทางกล ซึ่งเป็นไปได้ที่จะแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ (Kirk และคณะ, 1993 ; Akhtar, Blanchette และ Kirk , 1997 ; Akhtar และคณะ 1998 ; Scott และคณะ 1998 ; Akhtar และคณะ, 1999) โดยมีการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมกับกระบวนการฟอกกระดาษทางชีวภาพ เช่นการลงเชื้อ ขนาดของชิ้นไม้ ชนิดไม้ การเตรียมชิ้นไม้ การบ่ม เวลาของการบ่ม การให้อากาศ และอาหาร และที่สำคัญที่สุดคือ การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในกระบวนการดังกล่าวเพื่อให้ได้คุณสมบัติตามที่ต้องการ การหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ นั้นจะทดสอบและวัดโดยดูจากคุณภาพของกระดาษที่ได้ในด้านต่างๆ เช่น ความเหนียว ความแข็งแรง ความสว่างของกระดาษ พลังงานที่ใช้ รวมทั้งสารเคมีที่ต้องใช้ในกระบวนการอีกด้วย เชื้อราที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการฟอกกระดาษทางชีวภาพ ในประเทศสหรัฐอเมริกา มี 2 สายพันธุ์ คือ *Ceriporiopsis subvermispora* และ *Phlebia subserialis* ซึ่งคัดเลือกมาจากเชื้อรากว่า 600 สายพันธุ์ ได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกกระดาษ โดยไม้ที่นำไปใช้เป็นวัตถุดิบ คือ สายพันธุ์ ยูคาลิปตัส เมื่อเติมเชื้อราลงไปบนเยื่อไม้แล้ว เชื้อราจะเจริญเป็นเส้นใยบนเยื่อไม้ โดยปกติแล้วเยื่อไม้จะมีการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรียอื่นๆ อยู่แล้ว จึงควรมีการฆ่าเชื้อเหล่านี้เพื่อป้องกันไม่ให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดการยับยั้งหรือขัดขวางกระบวนการฟอกกระดาษทางชีวภาพ การฆ่าเชื้อที่ผิวเชื้อไม้ไม่สามารถทำได้โดยใช้ไอน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นจึงทำให้เชื้อไม้เย็นในการเติมเชื้อนั้นได้มีการทดลองเพื่อลดปริมาณหัวเชื้อ (inoculum) ในกระบวนการฟอกกระดาษทางชีวภาพ จากที่เคยใช้ 3 กิโลกรัม เป็น 5 กรัม ต่อไม้ 1 ตัน หรือน้อยกว่านั้น ซึ่งสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ นอกจากนี้ยังสามารถลดต้นทุนการผลิตอีกทางหนึ่งได้ โดยการใช้อาหารจากวัสดุเหลือทิ้ง เช่น น้ำแช่ข้าวโพดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งสามารถหาได้ง่ายในประเทศสหรัฐอเมริกา มาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแก่ราเพื่อทำเป็นหัวเชื้อสำหรับการลงเชื้อในระดับต่อไป นอกจากการหาสภาวะที่เหมาะสมแก่กระบวนการฟอกกระดาษทางชีวภาพแล้ว ยังต้องพัฒนาถึงเรื่องกระบวนการทางวิศวกรรม การพัฒนา และการขยายกำลังการผลิต โดยจะมุ่งเน้นไปที่ การทำให้เชื้อไม้มีสภาพที่เหมาะสมแก่การผลิต การบ่ม ความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ การให้ไอน้ำร้อน การทำให้เย็น การลงเชื้อ เป็นต้น

ขั้นตอนการฟอกกระดาษจะเริ่มด้วยการให้ไอน้ำร้อนแก่เชื้อไม้เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในเชื้อไม้ และทำให้เย็นลงเนื่องจากเชื้อไม้มีอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงลงเชื้อรา *Ceriporopsis subvermispora* ลงบนเชื้อไม้ ในขั้นตอนการลงเชื้อหัวเชื้อที่ใช้จะประกอบไปด้วย เชื้อรา น้ำแช่ข้าวโพด น้ำ ซึ่งต้องทำการผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันก่อน โดยหัวเชื้อที่ใช้ควรมีสัดส่วนที่เหมาะสมและมีความชื้นที่พอเหมาะกับเชื้อไม้ จากนั้นจึงเป็นขั้นตอนการปล่อยให้ราเจริญบนเชื้อไม้ โดยควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น การให้อากาศ และความชื้นของเชื้อไม้ให้มีความเหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อรา เช่น กระบวนการฟอกกระดาษทางชีวภาพที่ใช้เชื้อไม้ปริมาณ 1 ตัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส ในช่วงของการบ่มจะมีการให้อากาศโดยใช้แรงดันอากาศผ่านเข้าไปภายในกองไม้เพื่อควบคุม อุณหภูมิ ความชื้น นอกจากนี้ยังลดความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อราอีกด้วย หลังจากการลงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะทำการหยุดการเจริญของเชื้อราและหยุดกระบวนการฟอกกระดาษทางชีวภาพ

ผลที่ได้ในเชิงการค้าพบว่ากระบวนการฟอกกระดาษทางชีวภาพสามารถมีกำลังการผลิตต่อเชื้อไม้ 200 ถึง 2000 ตันต่อวัน กระบวนการฟอกกระดาษทางชีวภาพสามารถลดการใช้พลังงานได้ถึงร้อยละ 30 และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพที่ดีขึ้น ผลจากการทำกระบวนการฟอกกระดาษจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีคล้ำมากกว่ากระบวนการฟอกกระดาษวิธีเก่า เนื่องจากไม่มีการทำปฏิกิริยากับเชื้อไม้ด้วยสารเคมีก่อน แต่ให้เชื้อไม้อยู่ในสภาพที่พร้อมแก่การฟอกกระดาษหรือง่ายต่อการฟอกกระดาษด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะทำได้กระดาษที่มีความสว่างขึ้น ซึ่งเชื้อไม้ที่ได้ภายหลังจากกระบวนการฟอกกระดาษทางชีวภาพจะมีความอ่อนนุ่ม ยุ่มมากขึ้น (Scott และ Swaney, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการฟอกกระดาษ

### 2.5.1 ไซลาลินไลติกเอนไซม์ (Kormelink และคณะ, 1993)

ไซลาลินไลติกเอนไซม์ (Xylanolytic enzymes) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเฮมิเซลลูโลสและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตกระดาษได้

โดยทั่วไปแล้วการฟอกสีเยื่อกระดาษทำได้โดยใช้สารเคมีพวก oxidizing agent ร่วมกับสารละลายที่เป็นด่างเข้าไปสกัดลิกนิน ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลออก แต่พบว่าการใช้สาร oxidizing agent จะทำให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมเนื่องจากการใช้สารคลอรีนทำให้เกิด absorbable organic halogen (AOX) ซึ่งเป็นสารที่ย่อยสลายได้ยากมากในธรรมชาติ ดังนั้นเพื่อเป็นการลดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมที่เกิดจากการฟอกสีเยื่อกระดาษ จึงได้มีการนำเทคโนโลยีด้านเอนไซม์เข้ามาช่วย โดยมีการใช้เอนไซม์ไซลาลินในการแปรสภาพเยื่อกระดาษในขั้นตอนแรก (prebleaching) ซึ่งมีรายงานการใช้ครั้งแรกในปี 1986 และมีการนำไปใช้กับโรงงานเยื่อกระดาษครั้งแรกในปี 1991 (Tolan, 1996) การใช้เอนไซม์ไซลาลินในการแปรสภาพเยื่อกระดาษจะเป็นการเพิ่มรพูนของเยื่อกระดาษและทำให้ลิกนินในเยื่อกระดาษมีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น (flexibility) จึงทำให้สารเคมีที่ใช้ในการฟอกสีเข้าไปสกัดลิกนินออกได้ง่ายขึ้น เป็นการลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ไซลาลินในการแปรสภาพเยื่อกระดาษยังช่วยเพิ่มค่าความสว่าง จากการศึกษาของ Tolan และคณะ (1996) ได้สำรวจการใช้เอนไซม์ไซลาลินในโรงงานเยื่อกระดาษในประเทศแคนาดาพบข้อดีหลายประการในการใช้เอนไซม์ในการแปรเยื่อกระดาษขั้นแรก คือ ประหยัดสารเคมี ลดปริมาณสาร AOX ปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้ง เพิ่มค่าความสว่างและเพิ่มค่าการต้านทานแรงฉีก เป็นต้น

นอกจากนั้นไซลาลินไลติกเอนไซม์ยังสามารถประยุกต์ใช้ประโยชน์อื่นๆ เช่น ใช้ในการสกัดน้ำผลไม้ กลิ่น เครื่องเทศ น้ำมันและสี ใช้ในกระบวนการการทำให้น้ำผลไม้และไวน์ใส ในผลิตภัณฑ์ไซแลนแปรรูป (modified xylan) ใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณในผลิตภัณฑ์อาหาร ปรับปรุงแป้งจากธัญพืชเพื่อเพิ่มปริมาณและลักษณะสัมผัส ปรับปรุงคุณภาพอาหารสัตว์และใช้ในการฟอกเยื่อเพื่อผลิต viscose rayon, cellulose ester และ cellulose ethers (Coughlan และ Hazlewood, 1993) การประยุกต์ใช้ไซแลนกับผลิตภัณฑ์ทางการค้ามีหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลานเนสทางการค้า

| ผู้ผลิต  | ชื่อผลิตภัณฑ์   | การประยุกต์ใช้                                       |
|--|---|--|
| Alko Rajamaki , Finland                        | Ecopulp   | การฟอกสีเยื่อกระดาษ                                  |
| Sandoz, Charlotte, N.C. and Basle, Switzerland | Catazyme  | การฟอกสีเยื่อกระดาษ                                  |
| Clariant, UK                                   | Catazyme HS 10, Catazyme HT, Catazyme SR 10, Catazyme Ps10 , Catazyme 9407 E, Catazyme NS10 , Catazyme MP | การฟอกสีเยื่อกระดาษ                                  |
| Genercor, Finland ; Ciba Giegy, Switzerland    | Irgazyme 40-4X/ Albazyme 40-4X, Irgazyme-10A , Albazyme-10A<br>Mulifect xylanase                          | การฟอกสีเยื่อกระดาษ<br>ผลิตภัณฑ์เบเกอร์รี่           |
| Voest Alpine, Austria                          | VAI Xylanase  | การฟอกสีเยื่อกระดาษ                                  |
| Novo Nordisk, Denmark                          | Pulpzyme HA, Pulpzyme HB, Pulpzyme HC<br>Biofeed Beta, Biofeed Plus<br>Ceremix                            | การฟอกสีเยื่อกระดาษ<br>อาหารสัตว์<br>ผลิตภัณฑ์เบียร์ |
| Bicon India, Bangalore                         | Bleachzyme F  | การฟอกสีเยื่อกระดาษ                                  |
| Rohn Enzyme OY ; Primalco , Finland            | Ecopulp X-100, Ecopulp X-200, Ecopulp X-200/400, Ecopulp TX-100, Ecopulp TX-200, Ecopulp XM               | การฟอกสีเยื่อกระดาษ                                  |
| Meito Sankyo, Nogaya Japan                     | Xylanase  | งานวิจัย   |
| Rohm, Germany                                  | Rholase 7118  | ผลิตภัณฑ์อาหาร                                       |
| Thomas Swan, UK                                | Ecozyme   | การฟอกสีเยื่อกระดาษ                                  |
| Enzyme Development, USA                        | Enzeko xylanase   | ผลิตภัณฑ์เบเกอร์รี่และอาหารสัตว์                     |

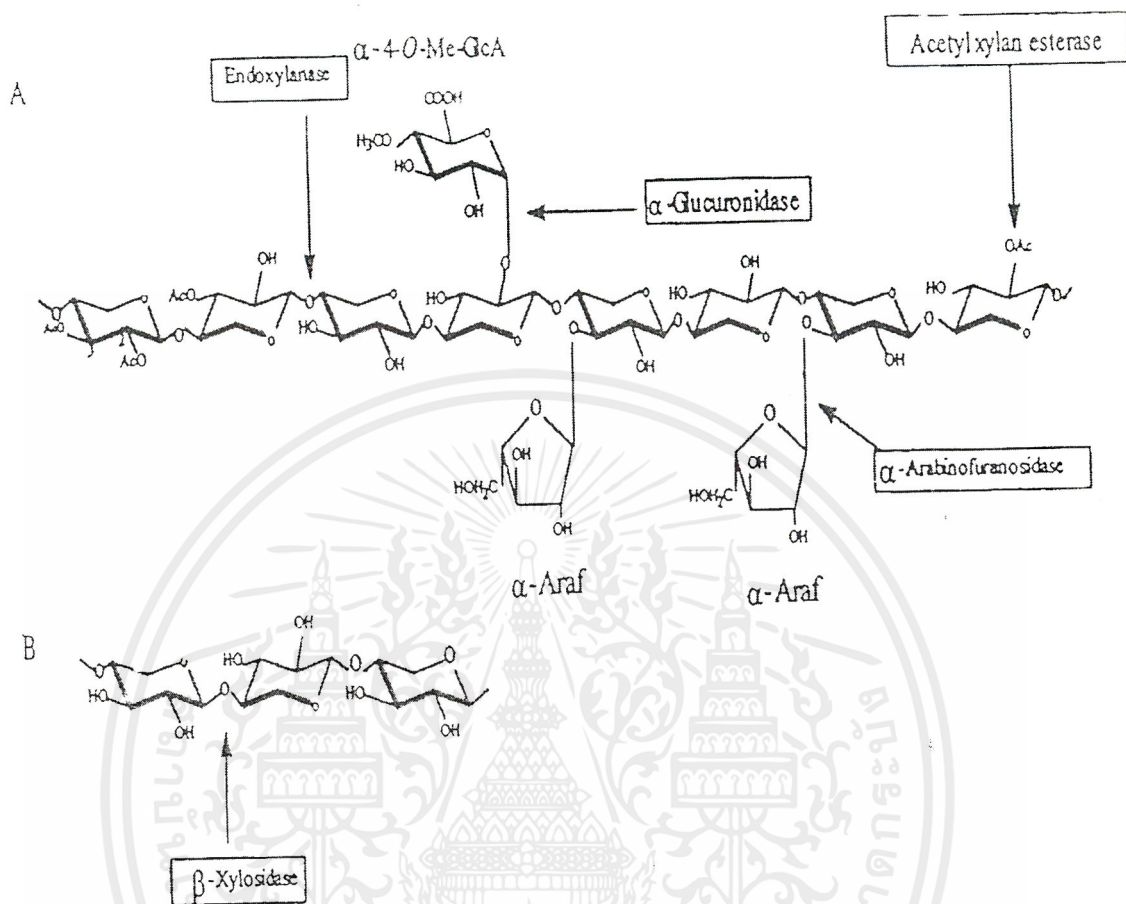


และสาขาของ arabinan (2) endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.99) โดยมีผลเฉพาะต่อ arabinan ที่เป็นเส้นตรงเท่านั้น และพบว่าการทำงานร่วมกันของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟูรานอซิเดสกับไซลานเนสทำให้ได้ไซโลส ไซโลไบโอสและอะราบินอส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนเพิ่มขึ้น

**2.5.1.2.2 แอลฟา-กลูคูโรนิเดส ( $\alpha$ -glucuronidase, EC 3.2.1.139)** ย่อยสลาย  $\alpha$ -1,2 linkage ระหว่างไซโลสและ D-glucuronic acid หรือ 4-O-methyl ether ที่พบในกลูคูโรโนไซแลน ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์แอลฟา-กลูคูโรนิเดสขึ้นอยู่กับแหล่งของเอนไซม์

**2.5.1.2.3 อะซิทิลไซแลนเอสเตอเรส (acetylxylylan esterase, EC 3.1.1.6)** ย่อยสลายพันธะระหว่าง O-acetyl residue ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ในสายของ acetylxylylan

เนื่องจากไซแลนมีโครงสร้างที่ซับซ้อน การย่อยสลายให้สมบูรณ์จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันในกลุ่มของไซลาโนไลติกเอนไซม์หลายชนิดเข้าช่วยในการทำปฏิกิริยา (รูป 2.10) ซึ่งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลักได้แก่ เอนโดไซลานเนสและเบต้า-ไซโลซิเดส ส่วนเอนไซม์ที่ย่อยสลายส่วนที่เป็นกิ่งก้านได้แก่ แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟูรานอซิเดส แอลฟา-กลูคูโรนิเดสและอะซิทิลไซแลนเอสเตอเรส ระบบของเอนไซม์ไซลานเนสจะมีเอนไซม์หลายชนิดเกี่ยวข้อง พบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีหน้าที่โดยเฉพาะในการย่อยสลายไซแลน มีการรายงานว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกที่ซับซ้อนได้ เช่น *Penicillium purpurogenum* (Belancic และคณะ, 1995) , *Melanocarpus albomyces* IIS 68 (Sarawat และ Bisaria, 1997) ยังมีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติก โดย Haltrich และคณะ (1994) รายงานว่า *Sclerotium rolfsii* ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส รวมทั้งมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในการย่อยสลายไซแลนไปเป็นไซโลส



**รูปที่ 2.10** (A) การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซเลน  
 Ac : Acetyl group ;  $\alpha$ -Araf :  $\alpha$ -Arabinofuranose;  $\alpha$ -4-O-Me-GlcA ;  $\alpha$ -4-O-methylglucuronic acid

(B) การย่อยสลายไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยเบต้าไซโลซิเดส

ที่มา : Sunna และ Antranikian (1997)

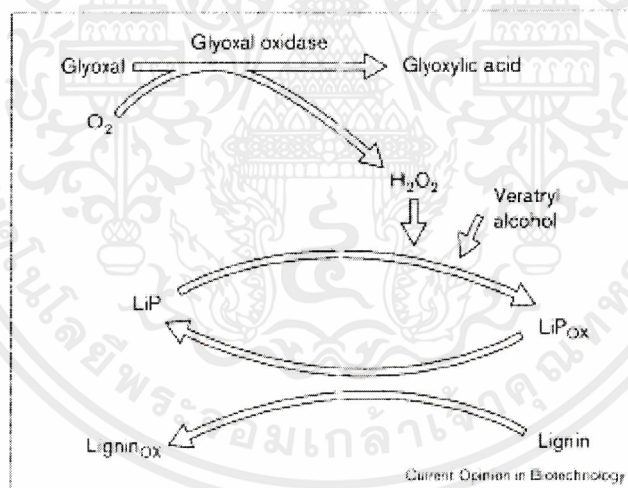
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5.2 ลิกนินโกลิติกเอนไซม์ (Breen และ Singleton , 1999)

เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายลิกนิน แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ

### 2.5.2.1 ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (E.C.1.11.1.7) เป็นไกลโคโปรตีนที่มีฮีมเป็นองค์ประกอบ ที่ผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolism) ของ white rot fungi เมื่อเกิดการขาดแคลนไนโตรเจน ลิกนินเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวออกซิไดส์อย่างรุนแรง มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของฟีนอลและอะโรมาติกเอมีน อะโรมาติกอีเธอร์ และโพลีไซคลิกเอมีนไฮโดรคาร์บอน ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจะถูกออกซิไดส์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก่อนเพื่อเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางที่ขาดอิเล็กตรอน 2 ตัว เรียกว่า compound I จากนั้น compound I ออกซิไดส์สับสเตรทด้วย 1 อิเล็กตรอน ได้เป็น compound II แล้วรับอิเล็กตรอน 1 ตัวจากสับสเตรทอีกครั้ง แล้วเอนไซม์จะกลับสู่สภาวะปกติ (Collin และคณะ, 1997) กลไกการทำงานของลิกนินเปอร์ออกซิเดส แสดงดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 กลไกการทำงานของลิกนินเปอร์ออกซิเดส (OX = สารตัวกลางในสถานะออกซิไดส์)

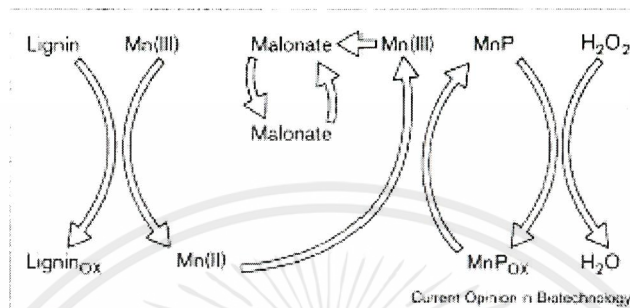
ที่มา : Breen และ Singleton (1999)

### 2.5.2.2 แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (E.C.1.11.1.13) พบมากใน white rot fungi เช่นเดียวกับลิกนินเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีฮีมเป็นองค์ประกอบ ซึ่งการทำงานต้องอาศัยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีรายงานการพบเอนไซม์ชนิดนี้ครั้งแรกในเชื้อ *Phanerochaete*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*chrysosporium* เมื่อมี Mn(II) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัวด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้สารตัวกลางไลพอกซีเรดิคอล ซึ่งสามารถออกซิไดส์สารประกอบลิกนินต้นแบบที่ปราศจากฟีนอลได้ (Kirk และ Cullen, 1998) แสดงดังรูปที่ 2.12



**รูปที่ 2.12** กลไกการทำงานของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสออกซิไดส์ Mn(II) ไปเป็น Mn(III) Mn(III) จะทำปฏิกิริยากับมาโลเนต (malonate) ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลที่เหลืออยู่ในลิกนินได้ (OX = สารตัวกลางในสถานะออกซิไดส์)

**ที่มา :** Kirk และ Cullen (1998) ; Archibald และคณะ (1997)

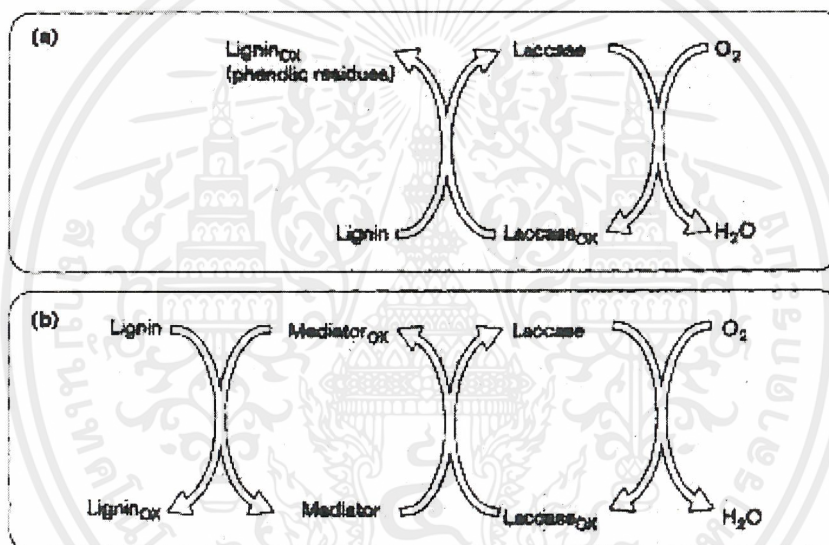
### 2.5.2.3 แลคเคส (Breen และ Singleton, 1999)

เอนไซม์แลคเคส (benzenediol : oxygen oxidoreductases, E.C.1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบหลายอะตอม สามารถออกซิไดส์สารประกอบฟีนอล แลคเคสรีดิวส์โมเลกุลของออกซิเจนได้เป็นน้ำพร้อมกับการออกซิเดชันของสับสเตรทอะโรมาติก 1 อิเล็กตรอน

แลคเคสพบได้ในพวกเห็ดราหลายชนิด โดยเฉพาะแต่ในคลาสเบซิไดโอมัยซิติส (Bollag และ Leonwicz, 1984) ยังพบในพืชซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์ลิกนิน แลคเคสเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์มาก ซึ่งนอกจากจะใช้ในกระบวนการฟอกกระดาษแล้ว ยังใช้ในการกำจัดพิษของน้ำเสีย ใช้ล้างส่วนประกอบต่างๆ ใช้กำจัดสารประกอบฟีนอลจากไวน์ และใช้ในกระบวนการทรานส์ฟอร์มเมชันเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะและสเตอรอยด์ (Luisa และคณะ, 1996) *P. chrysosporium* อาจเป็นเชื้อราที่ผลิตลิกนิน โนโลติกเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด แต่ก็มีกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสในปริมาณต่ำและถูกยับยั้งโดยกลูโคส (Eggert และคณะ, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แลคเคสเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารประกอบฟีนอลของลิกนินหรือเมื่อมีสารตัวกลาง (mediator) ซึ่งเป็นสับสเตรทร่วม (co-substrate) อยู่ในปฏิกิริยาก็สามารถทำปฏิกิริยากับสับสเตรทได้หลายชนิด สารตัวกลางที่ถูกอ้างอิงถึงบ่อยที่สุดคือ 2,2'-azinobis-(3)-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate (ABTS) ทำหน้าที่เป็นสารช่วยในการออกซิไดส์ลิกนิน (lignin-oxidizing agent) แลคเคสที่บริสุทธิ์จะไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับผนังเซลล์ที่ยังสมบูรณ์อยู่ (Eggert และคณะ, 1996) กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคส แสดงดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 (A) กลไกของแลคเคส  
(B) กลไกของแลคเคสผ่านสารตัวกลาง (OX = สารตัวกลางในสถานะออกซิไดส์)

ที่มา : Breen และ Singleton (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.5.3 เอนไซม์เซลลูเลส (Enari, 1983)

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีน มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตต่อโปรตีนเท่ากับ 1:1 ละลายน้ำได้ ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ หรือโลหะอื่นๆ ในการเข้าทำปฏิกิริยา เป็นเอนไซม์เชิงซ้อน ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม ดังนี้

#### 2.5.3.1 เอนโดกลูคาเนส (1,4-beta-D-Glucanohydrolase : EC 3.2.1.4)

ทำหน้าที่ย่อย beta-1,4-glucosidic linkage แบบสุ่มได้กลูโคส เซลโลไบโอส เซลโลไตรโอส ไม่ย่อยเซลโลไบโอสแต่ย่อยเซลโลเดรกซ์ตริน (CMC) และไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (HEC) และสามารถย่อยเซลลูโลสรูปผลึก (Crystalline cellulose) ได้ด้วย ความจำเพาะของเอนไซม์ไม่สูงนัก วิเคราะห์เอนไซม์โดยใช้ เซลโลเดรกซ์ตริน และไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส เป็นสับสเตรท

#### 2.5.3.2 เซลโลไบโอไฮดรเลส (1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase : EC

3.2.1.9) ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้าน non-reducing end ของเส้นสายได้เซลโลไบโอส การวิเคราะห์เอนไซม์นี้ใช้สำลี อวิเซล และ Amorphous cellulose เป็นสับสเตรท

#### 2.5.3.3 เบต้า-กาแลคโตซิเดส (Beta-D-glucohydrolase : EC 3.2.1.21) ทำ

หน้าที่ย่อยเซลโลไบโอส และเซลโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Cellooligosaccharide) ได้กลูโคสแต่ไม่ย่อยเซลลูโลสหรือเซลโลเดรกซ์ตริน วิเคราะห์เอนไซม์นี้โดยใช้เซลโลไบโอส-พี-ไนโตรฟีนิล-เบต้า-ดี-กลูโคไซด์ (Cellobiose-p-nitrophenyl-beta-D-glucoside) หรือซาลิซิน (Salicin) เป็นสับสเตรท

### 2.5.4 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องอื่นๆ

Rogalski และคณะ (1985) รายงานว่านอกจากเอนไซม์กลุ่มหลัก 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มไซลาโนไลติกเอนไซม์ และลิกนินโนไลติกเอนไซม์ เพื่อให้การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสสมบูรณ์ยิ่งขึ้นจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์อีกหลายชนิด ได้แก่

1. ดี-กาแลคตาเนส เอนไซม์กลุ่มนี้ย่อย ดี-กาแลคแตน และแอล-อะราบีโน-ดี-กาแลคแตน
2. ดี-แมนนาเนส เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยพันธะ (1→4) เบต้า-ดี-แมนนาโนไพราโนซิลของ ดี-แมนแนน ดี-กลูโค-ดี-แมนแนน และดี-กาแลคโต-ดี-แมนแนน
3. อะซิทิเลสเตอเรส ในโครงสร้างหลักของเฮมิเซลลูโลสตรงตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 และ 3 ของสายพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลสจะมีกลุ่มของอะซิทิเลกาอยู่ ในการย่อยอะซิทิล ออกจากสายพอลิเมอร์ของไซโลสจำเป็นต้องใช้เอนไซม์เอสเตอเรสเข้าช่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 การผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

เอนไซม์ไซลานเนสพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ แอคติโนมัยซีท โปรโตซัว พืช แมลงและสัตว์ทะเลบางชนิด ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนส แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

| แบคทีเรีย  | เชื้อรา  | ยีสต์  |
|--|--|--|
| <i>Bacillus circulans</i> (Ratto; Poutanen และ Viikari, 1992)                | <i>Aspergillus niger</i><br><i>Aspergillus flavus</i> และ<br><i>Trichoderma harzianum</i><br>(Abdel-Sater และ El-Said, 2001) | <i>Sporotrichum pruinosum</i> และ<br><i>Arthrographis</i> sp.<br>(Okeke และ Obi, 1995) |
| <i>Microcococcus</i> sp. (Saxena ; Bahadur และ Varma, 1991)                  | (Abdel-Sater และ El-Said, 2001)  |  |
| <i>Streptomyces roseiscleroticus</i> NRRL-B-1109 (Grabski และ Jeiries, 1991) | <i>Acremonium</i> sp. และ<br><i>Acremonium strictum</i><br>(Abdel-Sater และ El-Said, 2001)                                   | <i>Aureobasidium pullulans</i><br>(Christov และ Prior, 1994)                           |

## 2.7 เชื้อราเอนโดไฟต์กับการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษ (Isaac, 1992)

เชื้อราเอนโดไฟต์ หมายถึง เชื้อราซึ่งเกือบทั้งหมดอาศัยอยู่ในใบหรือลำต้นของพืชที่มีสุขภาพดี โดยไม่ทำให้พืชที่มันอาศัยอยู่เป็นโรค ไม่ก่อให้เกิดสัญญาณของการติดเชื้อ คำว่าเอนโดไฟต์ ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกโดย De Bary (1866) เพื่อแยกเชื้อราซึ่งบุกรุกและอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช จากเชื้อราอีพิไฟต์ (epiphyte) ซึ่งเป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ผิวนอกของพืช ส่วนเชื้อราไมคอร์ไรซา ที่อาศัยอยู่ทั้งในและนอกเนื้อเยื่อพืชไม่จัดเป็นพวกเอนโดไฟต์

จากการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟต์ พบว่าหลายสายพันธุ์สามารถเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol) ต่อแมลงที่เป็นศัตรูของหญ้า และยังมีกรค้นพบว่าหลายสายพันธุ์สามารถผลิตสารพิษภายในเนื้อเยื่อพืชได้ (Clay, 1986) จากการค้นพบนี้ทำให้ทราบว่า เอนโดไฟต์ เป็นเชื้อก่อโรคแฝง (latent pathogen) หรือเป็นตัวอย่างของเชื้อราที่มีความเกี่ยวข้องกับพืชจากแบบปรสิตไปจนถึงแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชพอาศัยที่ต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ (mutualism) (Clay, 1988) อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์หลายแบบระหว่างพืชเจ้าบ้านและเชื้อราเอนโดไฟต์ยังอยู่ในระหว่างการศึกษาค้นคว้าต่อไป

### 2.7.1 การตรวจสอบและการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์ (Isaac, 1992)

การศึกษาในปัจจุบันให้ความสนใจเชื้อราเอนโดไฟต์ในหญ้า ไม้พุ่ม และต้นสน มีรายงานว่าพืชหลายชนิดสามารถเป็นพืชเจ้าบ้านให้กับเชื้อราเอนโดไฟต์ และพืชเพียงชนิดเดียวก็ยังเป็นเจ้าบ้านให้กับเชื้อราเอนโดไฟต์หลายชนิดในเวลาเดียวกันอีกด้วย (Petrini, 1986) การเจริญของเชื้อราเอนโดไฟต์ในพืชเจ้าบ้านไม่มีผลต่อลักษณะของพืช และเรายังไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์ได้เมื่ออาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช เชื้อราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่จัดอยู่ในคลาสแอสโคมัยซิติสและคิวเทอโรมัยซิติส พบอยู่ในคลาสเบซิดิโอมัยซิติสเล็กน้อย และน้อยมากในคลาสโอโอมัยซิติส

การแยกและระบุชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์ จะต้องทำการฆ่าเชื้อที่ผิวของเนื้อเยื่อพืชอย่างระมัดระวัง แล้วบ่มไว้ในอาหารที่ช่วยในการแยกแยะและการสร้างสปอร์ตามลำดับ จากนั้นจึงสามารถระบุชนิดได้ และในบางครั้งก็ยากที่จะกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเชื้อรา และยากที่จะแน่ใจได้ว่าสปอร์หรือเส้นใยจะไม่ไช่เชื้อที่หลุดรอดจากการฆ่าเชื้อที่ผิวของเนื้อเยื่อ (Petrini, 1986) เชื้อราอิมโฟไฟต์บางชนิดสามารถแทรกเข้าไปภายในเนื้อเยื่อพืชเจ้าบ้านได้ นอกจากนี้เชื้อราเอนโดไฟต์บางชนิดก็ยังสามารถอยู่ที่ผิวของพืชเหมือนกับพวกอิมโฟไฟต์ได้ในบางสภาวะ เอนโดไฟต์ส่วนใหญ่สร้างสปอร์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง และในบางสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตช้า ต้องการเวลาในการเจริญเป็นเวลาหลายเดือน เส้นใยมัยซีเลียมอยู่บนเนื้อเยื่อพืชที่หนาและมีลิกนิน ทำให้ยากที่จะตรวจสอบได้โดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถึงแม้ว่าเทคนิคเฟลตติงจะช่วยในการเจริญบนผิวหน้าอาหารก็ตาม จึงได้มีการนำเทคนิคสมัยใหม่มาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อราของพืช เช่น การตรวจสอบหาเชื้อรา *Epichloe typhina* ในต้นหญ้าทอลเฟสคิว (tall fescue) โดยใช้วิธี enzyme linked immuno absorbent assays (ELISA) (Johnson และคณะ, 1982)

แม้ว่าการตรวจสอบเชื้อราเอนโดไฟต์จะมีข้อจำกัด แต่จากหลักฐานชี้ว่าเอนโดไฟต์มีวิวัฒนาการมาจากเชื้อราก่อโรคพืช เอนโดไฟต์หลายชนิดมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง ตัวอย่างเช่น *Acremonium coenophialum* ในหญ้า *Epichloe typhina* (Sherwood-Pike และคณะ, 1986) ความแตกต่างระหว่างเชื้อราเอนโดไฟต์กับเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคมักไม่ชัดเจน สายพันธุ์ที่ก่อโรคบางสายพันธุ์ อาจมีช่วงระยะเวลาที่เจริญเป็นเอนโดไฟต์อยู่ในพืชเจ้าบ้านนาน ก่อนที่พืชจะปรากฏอาการของโรค นอกจากนี้ความต้องการอาหารสำหรับการเจริญของเอนโดไฟต์สามารถบ่งชี้ว่าการใช้วัตถุดิบที่มีอยู่อย่างจำกัดเป็นลักษณะหนึ่งของสายพันธุ์ก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7.2 ผลของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อสิ่งมีชีวิต

### 2.7.2.1 ผลต่อพืชเจ้าบ้าน (Isaac, 1992)

เชื้อราเอนโดไฟต์หลายชนิด สามารถอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชเจ้าบ้าน โดยไม่ทำให้เกิดโรค โดยเส้นใยเชื้อราจะแทงทะลุระหว่างเซลล์พืชหรืออาจเจริญอยู่ในเซลล์ และได้รับสารอาหารผ่านการสัมผัสกับเซลล์เจ้าบ้าน แต่ไม่พบโครงสร้างที่ใช้ในการหาอาหารของ เชื้อราชนิดนี้ บางครั้ง จะพบเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้าง 10-15 ไมโครเมตร และอาจผิดรูปร่างไป หรือเป็นกระเปาะ และในบางกรณีมีปริมาณชีวมวลของเชื้อราอยู่ในเนื้อเยื่อเซลล์เจ้าบ้าน มาก เชื้อราเอนโดไฟต์จะไม่ทำให้พืชเกิดโรค แต่ทำให้เจ้าบ้านเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทาง กายภาพซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถให้พืชอยู่รอดได้ดีและมีความแข็งแรงมากขึ้น ทำให้พืชสามารถ ต้านทานโรคได้ดี บางกรณี พืชที่ติดเชื้อราเอนโดไฟต์จะทนต่อน้ำท่วมและสามารถฟื้นตัวได้เร็วกว่า พืชที่ไม่ติดเชื้อ (Belesky และคณะ, 1987) มีรายงานการสร้างสารทุติยภูมิของเชื้อราเอนโดไฟต์ ได้แก่ อัลคาลอยด์และสารปฏิชีวนะ ซึ่งมีผลต่อพวกวัชพืชหลายชนิด เอนโดไฟต์จึงน่าจะเป็นตัว ช่วยให้มีการสร้างสารเคมีขึ้นมาป้องกันตัวเองในพืช (Porter และคณะ, 1985)

เชื้อราเอนโดไฟต์ในหลัาจะคงอยู่ในพืชเจ้าบ้านในช่วงการสืบพันธุ์ และ จะไม่สร้างโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ (fruiting body) แต่จะแผ่ขยายเส้นใยไฮฟา (hyphae) โดย สร้างไฮฟาเข้าไปในรังไข่ของพืชเจ้าบ้าน และงอกอยู่ในเมล็ด สปีชีส์เหล่านี้จะไม่ทำอันตรายต่อพืช เจ้าบ้าน แต่มักสร้างสารพิษซึ่งมีผลในการป้องกันไม่ให้ศัตรูตัวมากินพืช นอกจากนั้นในบางกรณี การติดเชื้อราเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อรังไข่ อาจสามารถฆ่าเชื้อที่เป็นอันตรายภายในพืชเจ้า บ้านได้ด้วย

การอยู่ร่วมกันอีกแบบหนึ่ง เป็นการปรับเปลี่ยนโดยเอนโดไฟต์บางชนิด เพื่อให้สามารถอยู่ร่วมกันกับพืชได้ การอยู่ร่วมกันแบบนี้เอนโดไฟต์จะแพร่กระจายในเนื้อเยื่อพืช เป็นบางจุด และอาจมีผลต่อพืชเมื่อพืชมีอายุมาก เอนโดไฟต์จะไปชะลอความแก่ของเนื้อเยื่อพืช โดยเข้าแทรกวิถีเมตาบอลิซึมในบริเวณที่ไวต่อการตอบสนองเมื่อพืชเกิดความเครียดขึ้น

### 2.7.2.2 ผลต่อแมลง (Isaac, 1992)

สาเหตุหลักที่ทำให้มีผู้สนใจศึกษาเชื้อราเอนโดไฟต์เนื่องมาจากแมลง ศัตรูพืชที่กินหลัาเป็นอาหาร การที่พืชติดเชื้อราเอนโดไฟต์ทำให้นเนื้อเยื่อพืชมีรสชาติเปลี่ยนไป แมลงจึงหลีกเลี่ยง นอกจากนี้เนื้อเยื่อพืชที่ติดเชื้อ อาจสร้างสารพิษที่มีผลต่อแมลงทำให้ตัวอ่อน เจริญและพัฒนาไม่สมบูรณ์ เป็นหมันหรือตาย และยังมีผลกระทบต่อประชากรของแมลงด้วย

มีแมลงหลายสปีชีส์ที่ได้รับผลกระทบจากหญ้าที่ติดเชื้อราเอนโดไฟต์ ได้แก่ จิ้งหรีด เพลี้ย หนอน และแมงช้าง จากข้อมูลต่างๆ เหล่านี้ Clay (1989) จึงเสนอว่าเชื้อราเอนโดไฟต์อาจเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่เหมาะสมในการป้องกันพืชตระกูลหญ้า ซึ่งจากการศึกษาทั้งในพื้นที่และห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่า การเสียหายของหญ้าจากแมลงมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อราเอนโดไฟต์ของพืช

### 2.7.2.3 ผลต่อปลูสัตว์ (Isaac, 1992)

เชื้อราเอนโดไฟต์ในหญ้าเป็นสาเหตุการตายของปลูสัตว์ เช่น ปลูสัตว์ที่กินหญ้าทอลเฟสคิว (tall fescue; *Festuca arundinacea*) ที่ติดเชื้อรา จะมีอาการน้ำหนักลด อุนหภูมิร่างกายสูง พิกการ เนื้อตายหรือเป็นแผลเรื้อรัง และอาจต้องตัดอวัยวะบางส่วนทิ้ง

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ฟอกกระดาษจากเชื้อราเอนโดไฟต์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ฟอกกระดาษจากเชื้อราเอนโดไฟต์ยังมีจำนวนน้อย เนื่องจากเชื้อราเอนโดไฟต์นั้น เป็นที่รู้จักกันในการผลิตสารที่ช่วยป้องกันอันตรายให้แก่พืชเจ้าบ้าน (Bacon และคณะ, 1977; Clay, 1989) มีรายงานว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ *Acremonium* sp. ที่แยกได้จากต้น *Taxus baccata* สามารถผลิต leucinostatin A ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม (Strobel และคณะ, 1997) นอกจากนี้เชื้อราเอนโดไฟต์บางชนิดสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Ju และคณะ, 1998; Lu และคณะ, 2000; Rodrigues และคณะ, 2000)

ในปี 2002 Suto และคณะ ได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์เอนโดไฟต์เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส จากเชื้อราเอนโดไฟต์ 169 ไอโซเลต และแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 81 ไอโซเลตที่คัดแยกมาจากพืช 14 ชนิด พบว่ามีเชื้อรา 155 ไอโซเลต (ร้อยละ 91.7) และแบคทีเรีย 52 ไอโซเลต (ร้อยละ 64) มีการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส จากเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด 0.191 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากความเป็นไปได้นี้เราจึงนำเชื้อราเอนโดไฟต์มาศึกษา เพื่อหาเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษต่อไป

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ได้จากการคัดแยกเชื้อราเอนโคไฟต์จากต้นลำดวนและต้นกระทิงจากจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 62 ไอโซเลต โดยได้จากต้นลำดวนจำนวน 34 ไอโซเลต และจากต้นกระทิงจำนวน 28 ไอโซเลต

#### 3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 กล้องจุลทรรศน์ ของบริษัท Olympus optical, Japan
- 3.2.2 เครื่องกวนระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น MS 115 ของบริษัท Scientific industries, Inc.
- 3.2.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV1601 ของบริษัท Shimadzu
- 3.2.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow) ของบริษัท International Scientific Supply
- 3.2.5 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น 1375 FX ของบริษัท Sheldon Manufacturing. Inc
- 3.2.6 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Innova 4330 ของบริษัท Scientific Promotion
- 3.2.7 เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) รุ่น Z 383K ของบริษัท Hermle Labortechnik, Germany
- 3.2.8 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น Tomy NS 325 ของบริษัท Tomy-seiko
- 3.2.9 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Memmert ของบริษัท United Instrument
- 3.2.10 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น PG 803 ของบริษัท United Instrument
- 3.2.11 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง รุ่น PG 803 ของบริษัท Mettler-Todedo, Thailand
- 3.2.12 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Mettler-Todedo, Thailand
- 3.2.13 เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) ของบริษัท Scientific industries, Inc.
- 3.2.14 ไมโครปิเปต (micropipette) ของบริษัท Brand, Germany
- 3.2.15 เครื่องแก้วต่างๆ ของบริษัท Pyrex

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 3.3.1 อาหารสูตร Potato dextrose agar เป็นอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อรา (ภาคผนวก ก)
- 3.3.2 อาหารสูตร Czapek Dox medium เป็นอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อรา (ภาคผนวก ก)
- 3.3.3 อาหารแข็งสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ในเชิงคุณภาพ (ภาคผนวก ก)
- 3.3.4 อาหารเหลวสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส เซลลูเลส ฟีนอลออกซิเดส และ แลคเคส ในเชิงปริมาณและใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้ (ภาคผนวก ก)
- 3.3.5 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์ไซลานเนส เซลลูเลส ฟีนอลออกซิเดส และแลคเคส
- 3.3.6 สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข)
- 3.3.7 สีกองโกเรด สำหรับย้อมวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ

### 3.4 วิธีการทดลอง

- 3.4.1 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษ  
ทำการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์โดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษที่เชื้อราผลิตได้

#### 3.4.1.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษจากการเกิดวงใสรอบโคโลนี

ถ่ายเชื้อราเอนโดไฟต์จำนวนทั้งหมด 62 ไอโซเลต ที่มีอายุ 3 วัน โดยใช้คอร์ก บอเรียร์ (Cork borer) เลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดบด ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน แล้วบันทึกผลโดยวัดขนาดของโคโลนีที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการย้อมสีด้วยสีกองโกเรด ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ท่วมอาหารวุ้นเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสีทิ้งและรดทับด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งและวัดขนาดของวงใสรอบโคโลนีที่เกิดขึ้น นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี คัดเลือกเชื้อที่มีอัตราส่วน

ระหว่างวงโคจรของโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมากที่สุดมา 2 ไอโซเลต เพื่อนำมาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส เซลลูเลส ฟีนอลออกซิเดส และแลคเคส ต่อไป

### 3.4.1.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษ

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้ 2 ไอโซเลต ในอาหารแข็ง Czapek Dox medium เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วถ่ายเชื้อโดยใช้คอร์ก บอเรอร์ จำนวน 5 ชิ้น ใสลงในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน ที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1.0 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งในสถานะนิ่ง และสถานะเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวัน โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส ตามวิธีของ Tang และคณะ (1987) เอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mandels และ Weber (1969) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และ แลคเคส ตามวิธีของ Szklarz และคณะ (1989) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส เซลลูเลส ฟีนอลออกซิเดส และ แลคเคส จากเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราทั้งสองไอโซเลต แล้วเลือกเชื้อราที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส ฟีนอล ออกซิเดส และ แลคเคส สูงสุด ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

### 3.4.2 การศึกษาสถานะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษ

#### 3.4.2.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ ในสถานะนิ่งกับสถานะเขย่า

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้มา 1 ไอโซเลต ที่มีอายุ 3 วัน บนอาหาร Czapek Dox medium มาถ่ายเชื้อโดยใช้คอร์ก บอเรอร์ จำนวน 5 ชิ้น ใสลงในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน ที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1.0 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทั้งในสถานะนิ่งและสถานะเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวัน โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส ตามวิธีของ Tang และคณะ (1987) เอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mandels และ Weber (1969) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และแลคเคสตามวิธีของ Szklarz และคณะ (1989) แล้วเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส เซลลูเลส ฟีนอลออกซิเดส และแลคเคส แล้วเลือกสถานะที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส ฟีนอลออกซิเดส และแลคเคส สูงสุด ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

### 3.4.2.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ที่พีเอชเริ่มต้นต่างๆ กัน

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้มา 1 ไอโซเลต ที่มีอายุ 3 วัน บนอาหาร Czapek Dox medium มาถ่ายเชื้อโดยใช้คอร์ก บอเรอร์ จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน ที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1.0 โดยทำการแปรผันพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวัน โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนส ตามวิธีของ Tang และคณะ (1987) เอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mandels และ Weber (1969) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และแลคเคส ตามวิธีของ Szklarz และคณะ (1989) แล้วเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนส เซลลูเลส ฟีนอลออกซิเดส และแลคเคส แล้วเลือกสภาวะที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนส ฟีนอลออกซิเดส และแลคเคส สูงสุด ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

### 3.4.2.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิเริ่มต้นต่างๆ กัน

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้มา 1 ไอโซเลต ที่มีอายุ 3 วัน บนอาหาร Czapek Dox medium มาถ่ายเชื้อโดยใช้คอร์ก บอเรอร์ จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน ที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1.0 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 15, 30 และ 45 องศาเซลเซียสในสภาวะเขย่าโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวัน โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนส ตามวิธีของ Tang และคณะ (1987) เอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mandels และ Weber (1969) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และแลคเคสตามวิธีของ Szklarz และคณะ (1989) แล้วเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนส เซลลูเลส ฟีนอลออกซิเดส และแลคเคส

### 3.4.3 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง โดยวิธี ANOVA จากนั้น เมื่อมีความแตกต่างกันในแต่ละชุดทดลอง เปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละชุดการทดลองด้วย Student-Newman-Kuel test ซึ่งการคำนวณทางสถิติดังกล่าวใช้โปรแกรม Sigstat เวอร์ชัน 1.01 จากบริษัท Jandel Corporation จำกัด

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากใบลำควนและใบกระทิง

ผลจากการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากใบลำควนและใบกระทิงในจังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วในอาหารแข็ง Czapek Dox medium ที่อุณหภูมิห้อง สามารถคัดเลือกเชื้อราได้ทั้งหมด 62 ไอโซเลต ในนั้นมี 34 ไอโซเลตที่มาจากใบลำควน และอีก 28 ไอโซเลตมาจากใบกระทิง ซึ่งแต่ละไอโซเลตก็จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2

#### ตารางที่ 4.1 ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากใบลำควน

| ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ | ลักษณะภายนอกของเชื้อราเอนโดไฟต์                  |
|-------------------------|--|
| L-277/3                 | เส้นใยสีขาวเหลือง สปอร์สีน้ำตาล                  |
| L-109/2                 | เส้นใยสีขาวไม่ฟู มีขอบสีขาว เจริญติดผิวหน้าอาหาร |
| L-316                   | เส้นใยเป็นปุยสีขาวเหลือง                         |
| L-203                   | เส้นใยสีขาว สปอร์สีดำ                            |
| L-210                   | เส้นใยเป็นปุยสีขาว                               |
| L-192/3                 | เส้นใยเป็นปุยสีขาว                               |
| L-152                   | เส้นใยเป็นปุยสีขาว                               |
| L-348                   | เส้นใยสีขาวฟู                                    |
| L-252/2                 | เส้นใยผิวเรียบเจริญติดผิวหน้าอาหาร สีขาวครีม     |
| L-310/2                 | เส้นใยสีขาว                                      |
| L-129                   | เส้นใยปุยสีขาว                                   |
| L-140                   | เส้นใยปุยสีขาว                                   |
| L-125                   | เส้นใยฟูเป็นปุยสีขาว                             |
| L-130/1                 | เส้นใยปุยสีขาว                                   |
| L-304                   | เส้นใยสีขาวเจริญติดผิวหน้าอาหาร                  |
| L-313                   | เส้นใยเป็นปุยสีขาวเส้นสั้นๆ                      |
| L-151                   | เส้นใยเป็นคุ่มสีขาว                              |
| L-216                   | เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวดำเทา                    |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1(ต่อ) ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากใบลำควน

| ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ | ลักษณะภายนอกของเชื้อราเอนโดไฟต์                        |
|-------------------------|--|
| L-192/2                 | เส้นใยสีขาว  |
| L-192/1                 | เส้นใยฟูสีขาว  |
| L-109/1                 | เส้นใยสีขาวนวลไม่ฟู                                    |
| L-255                   | เส้นใยไม่ฟู สีน้ำตาลอ่อน                               |
| L-398                   | เส้นใยสีขาวนวลไม่ฟู                                    |
| L-244                   | เส้นใยสีขาวเส้นสั้นๆเจริญติดผิวหน้าอาหาร               |
| L-153                   | เส้นใยเป็นคุ่มสีขาว                                    |
| L-358                   | เส้นใยสีขาวฟู  |
| L-211                   | เส้นใยสีขาวเป็นปุย เจริญติดผิวหน้าอาหาร                |
| L-154/2                 | เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวเหลือง                         |
| L-303                   | เส้นใยสีขาวนวลเส้นสั้นๆเจริญติดผิวหน้าอาหาร            |
| L-380                   | เส้นใยสีน้ำตาลเจริญติดผิวหน้าอาหารคล้ายก้ามหยา         |
| L-288                   | เส้นใยสีน้ำตาลเส้นสั้นๆเจริญติดผิวหน้าอาหาร            |
| L-376                   | เส้นใยสีขาวนวลเส้นสั้นๆเจริญติดผิวหน้าอาหาร            |
| L-353                   | เส้นใยสีน้ำตาลเข้มและอ่อนสลับกันเป็นแฉกเจริญติดผิวหน้า |
| L-371/2                 | อาหารคล้ายก้ามหยา                                      |
| L-371/2                 | เส้นใยสีน้ำตาลเข้มและอ่อนสลับกันเป็นวงเจริญติดผิวหน้า  |
| L-371/2                 | อาหารคล้ายก้ามหยา                                      |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากใบกระทิง

| ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ | ลักษณะภายนอกของเชื้อราเอนโดไฟต์                      |
|-------------------------|--|
| K-82                    | เส้นใยเป็นปุยสีขาวฟู                                 |
| K-84                    | เส้นใยปุยสีขาวไม่ฟู                                  |
| K-23                    | เส้นใยสีขาวนวลฟู                                     |
| K-44                    | เส้นใยสีขาวฟู  |
| K-62                    | เส้นใยสีขาวเส้นสั้นๆ เจริญติดผิวหน้าอาหาร            |
| K-52                    | เส้นใยสีขาวไม่ค่อยฟู                                 |
| K-50                    | เส้นใยเป็นปุยสีขาว เจริญขึ้นด้านบนไม่แผ่ไปด้านข้าง   |
| K-70                    | เส้นใยสีขาวเส้นสั้นๆ                                 |
| K-37/2                  | เส้นใยสีน้ำตาลมีขอบสีขาว เจริญติดผิวหน้าอาหาร        |
| K-158                   | เส้นใยสีขาวนวลเส้นสั้นๆเจริญติดผิวหน้าอาหาร          |
| K-208                   | เส้นใยเป็นปุยสีขาว เจริญขึ้นด้านบนไม่แผ่ไปด้านข้าง   |
| K-186                   | เส้นใยสีขาวไม่ค่อยฟู                                 |
| K-74                    | เส้นใยสีขาวไม่ค่อยฟู เจริญขึ้นด้านบนไม่แผ่ไปด้านข้าง |
| K-52/1                  | เส้นใยสีน้ำตาลอมเขียวมีขอบสีขาว เจริญติดผิวหน้าอาหาร |
| K-60                    | เส้นใยสีขาวนวลฟู                                     |
| K-37                    | เส้นใยเป็นปุยสีขาว                                   |
| K-138                   | เส้นใยสีขาวไม่ค่อยฟู                                 |
| K-42                    | เส้นใยสีขาวไม่ค่อยฟู                                 |
| K-183                   | เส้นใยสีขาวเส้นสั้นๆ                                 |
| K-153                   | เส้นใยสีขาวไม่ค่อยฟู                                 |
| K-76                    | เส้นใยสีขาวไม่ฟู                                     |
| K-200                   | เส้นใยเป็นปุยสีขาว                                   |
| K-53/1                  | เส้นใยสีขาวไม่ค่อยฟู                                 |
| K-53/2                  | เส้นใยเป็นปุยสีขาวฟู                                 |
| K-54                    | เส้นใยสีขาวไม่ค่อยฟู                                 |
| K-28                    | เส้นใยสีขาวไม่ค่อยฟู                                 |
| K-75                    | เส้นใยสีขาวไม่ค่อยฟู                                 |
| K-66                    | เส้นใยสีขาวไม่ค่อยฟู                                 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษ

### 4.2.1 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษสูงที่สุดในเชิงคุณภาพ

ผลของการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนสสูงสุดในเชิงคุณภาพของเชื้อราที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 62 ไอโซเลต โดยเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ ในอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดบด ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง พีเอชเริ่มต้น 5.0 เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการสร้างเอนไซม์ไซลาลเนส โดยสังเกตได้จากวงใสรอบโคโลนีเมื่อทดสอบโดยย้อมสีคองโกเรด ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 4.3 และ 4.4



ตารางที่ 4.3 ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบลำควน เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดบด ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5.0 เป็นระยะเวลา 3 วัน

| ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ | ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร) | ขนาดของวงใสรอบโคโลนี (เซนติเมตร) | ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|---|
| L-277/3                 | 1.87                      | 3.30                             | 1.76 <sup>c</sup>                                       |
| L-190/2                 | 2.01                      | 3.53                             | 1.76 <sup>c</sup>                                       |
| L-316                   | 2.02                      | 3.02                             | 1.50 <sup>j</sup>                                       |
| L-203                   | 1.72                      | 2.09                             | 1.22 <sup>s</sup>                                       |
| L-210                   | 2.13                      | 3.42                             | 1.60 <sup>g</sup>                                       |
| L-192/3                 | 2.83                      | 3.87                             | 1.37 <sup>m</sup>                                       |
| L-152                   | 1.87                      | 2.33                             | 1.24 <sup>f</sup>                                       |
| L-348                   | 2.43                      | 3.08                             | 1.27 <sup>p</sup>                                       |
| L-252/2*                | 1.03                      | 2.99                             | 2.90 <sup>a</sup>                                       |
| L-310/2                 | 1.42                      | 2.34                             | 1.65 <sup>f</sup>                                       |
| L-129                   | 2.27                      | 3.26                             | 1.43 <sup>l</sup>                                       |
| L-140                   | 2.50                      | 2.68                             | 1.07 <sup>w</sup>                                       |
| L-125                   | 3.27                      | 4.00                             | 1.22 <sup>s</sup>                                       |
| L-130/1                 | 2.72                      | 3.42                             | 1.26 <sup>q</sup>                                       |
| L-304                   | 1.90                      | 2.42                             | 1.27 <sup>p</sup>                                       |
| L-313                   | 2.40                      | 3.11                             | 1.30 <sup>o</sup>                                       |
| L-151                   | 1.88                      | 2.14                             | 1.14 <sup>t</sup>                                       |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3(ต่อ) ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟต์ ที่แยกได้จากใบลำควน เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีซัง ข้าวโพดบด ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5.0 เป็นระยะเวลา 3 วัน

| ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ | ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร) | ขนาดของวงใสรอบโคโลนี (เซนติเมตร) | ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|---|
| L-211                   | 2.28                      | 3.26                             | 1.43 <sup>l</sup>                                       |
| L-216                   | 1.80                      | 3.03                             | 1.68 <sup>c</sup>                                       |
| L-192/2                 | 2.15                      | 3.07                             | 1.43 <sup>l</sup>                                       |
| L-192/1                 | 4.25                      | 4.86                             | 1.14 <sup>t</sup>                                       |
| L-109/1                 | 1.76                      | 2.37                             | 1.35 <sup>n</sup>                                       |
| L-255                   | 3.04                      | 3.47                             | 1.14 <sup>t</sup>                                       |
| L-398                   | 2.25                      | 3.38                             | 1.50 <sup>j</sup>                                       |
| L-244                   | 2.26                      | 3.47                             | 1.54 <sup>h</sup>                                       |
| L-153                   | 1.03                      | 2.3                              | 2.23 <sup>b</sup>                                       |
| L-358                   | 2.18                      | 3.22                             | 1.48 <sup>k</sup>                                       |
| L-154/2                 | 3.45                      | 3.83                             | 1.11 <sup>u</sup>                                       |
| L-303                   | 2.88                      | 3.14                             | 1.09 <sup>v</sup>                                       |
| L-380                   | 4.25                      | 4.72                             | 1.11 <sup>u</sup>                                       |
| L-288                   | 3.86                      | 4.00                             | 1.03 <sup>x</sup>                                       |
| L-376                   | 2.97                      | 3.75                             | 1.26 <sup>q</sup>                                       |
| L-353                   | 2.64                      | 4.04                             | 1.53 <sup>i</sup>                                       |
| L-371/2                 | 2.26                      | 3.89                             | 1.72 <sup>d</sup>                                       |

\* หมายถึง ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีอัตราส่วนของขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี สูงสุด

ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.4 ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟต์ ที่แยกได้จากใบกระทิง เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดบด ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5.0 เป็นระยะเวลา 3 วัน

| ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ | ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร) | ขนาดของวงใสรอบโคโลนี (เซนติเมตร) | ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|---|
| K-153                   | 2.74                      | 3.33                             | 1.22 <sup>w</sup>                                       |
| K-76                    | 1.43                      | 3.40                             | 2.38 <sup>b</sup>                                       |
| K-200                   | 2.63                      | 3.97                             | 1.51 <sup>k</sup>                                       |
| K-53/1                  | 3.29                      | 4.38                             | 1.33 <sup>s</sup>                                       |
| K-53/2                  | 3.63                      | 3.8                              | 1.05 <sup>y</sup>                                       |
| K-54                    | 2.84                      | 3.83                             | 1.35 <sup>r</sup>                                       |
| K-28                    | 1.90                      | 2.72                             | 1.43 <sup>o</sup>                                       |
| K-75                    | 2.83                      | 4.09                             | 1.44 <sup>n</sup>                                       |
| K-66                    | 2.53                      | 4.13                             | 1.65 <sup>g</sup>                                       |
| K-84                    | 2.75                      | 4.07                             | 1.48 <sup>m</sup>                                       |
| K-37*                   | 0.95                      | 3.16                             | 3.33 <sup>a</sup>                                       |
| K-138                   | 2.34                      | 3.77                             | 1.61 <sup>h</sup>                                       |
| K-42                    | 2.54                      | 3.98                             | 1.56 <sup>i</sup>                                       |
| K-82                    | 3.50                      | 4.28                             | 1.22 <sup>w</sup>                                       |
| K-23                    | 1.85                      | 2.82                             | 1.53 <sup>j</sup>                                       |
| K-44                    | 3.78                      | 3.64                             | 0.96 <sup>z</sup>                                       |
| K-62                    | 2.63                      | 3.33                             | 1.26 <sup>v</sup>                                       |
| K-52                    | 1.92                      | 2.44                             | 1.27 <sup>u</sup>                                       |
| K-50                    | 3.01                      | 3.99                             | 1.32 <sup>t</sup>                                       |
| K-70                    | 2.77                      | 4.13                             | 1.49 <sup>l</sup>                                       |
| K-37/2                  | 2.30                      | 3.86                             | 1.67 <sup>f</sup>                                       |
| K-158                   | 2.23                      | 3.12                             | 1.39 <sup>p</sup>                                       |

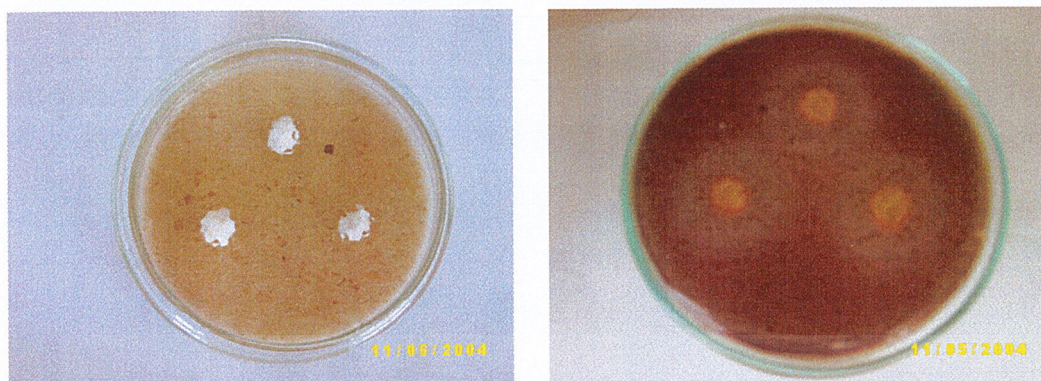
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4(ต่อ) ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟต์ ที่แยกได้จากใบกระทิง เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดบด ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5.0 เป็นระยะเวลา 3 วัน

| ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์ | ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร) | ขนาดของวงใสรอบโคโลนี (เซนติเมตร) | ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|---|
| K-186                   | 2.84                      | 3.45                             | 2.21 <sup>d</sup>                                       |
| K-74                    | 2.63                      | 3.11                             | 1.18 <sup>x</sup>                                       |
| K-52/1                  | 3.29                      | 4.48                             | 1.36 <sup>q</sup>                                       |
| K-60                    | 2.55                      | 4.23                             | 1.65 <sup>g</sup>                                       |
| K-183                   | 1.70                      | 3.55                             | 2.09 <sup>c</sup>                                       |
| K-208                   | 1.43                      | 3.28                             | 2.29 <sup>c</sup>                                       |

\* หมายถึง เชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีอัตราส่วนของขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี สูงสุด  
ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดลองทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีอัตราส่วนของขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุดได้สองไอโซเลต คือ K-37 ซึ่งได้จากใบต้นกระทิงในฤดูหนาว และ L -252/2 ซึ่งได้จากใบต้นลำควนในฤดูฝน ที่มีอัตราส่วนเท่ากับ 3.33 และ 2.90 ตามลำดับ ลักษณะของโคโลนีและวงใสที่ปรากฏหลังจากย้อมสีของโคเรดของทั้งสองไอโซเลตแสดงดังรูปที่ 4.1 และ 4.2



**รูปที่ 4.1** (ซ้าย) ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟต์ K-37 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนย้อมด้วยสียคองโกเรด  
(ขวา) หลังย้อมสียคองโกเรด และล้างออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ จะปรากฏวงใสรอบโคโลนีขึ้น



**รูปที่ 4.2** (ซ้าย) ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟต์ L-252/2 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนย้อมด้วยสียคองโกเรด  
(ขวา) หลังย้อมสียคองโกเรด และล้างออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ จะปรากฏวงใสรอบโคโลนีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.2 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษในเชิงปริมาณของเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งสองไอโซเลตที่คัดเลือกได้

การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส เซลลูเลส แลคเคส และ เปอร์ออกซิเดส ในเชิงปริมาณของเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งสองไอโซเลตที่คัดเลือกได้ เพื่อคัดเลือกไอโซเลตและสภาวะในการเลี้ยงที่เหมาะสมก่อนนำไปเลี้ยงในสภาวะต่างๆ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบด ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่ง (static cultivation) และสภาวะเขย่า (shake flask cultivation) ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส และเซลลูเลส ในเชิงปริมาณของเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งสองไอโซเลตที่คัดเลือกได้ เมื่อเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน

| ไอโซเลตเชื้อราเอนโดไฟต์<br>สภาวะที่ใช้เลี้ยง | ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซ<br>ลานเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) | ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลู<br>เลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) |
|--|--|--|
| K-37 สภาวะเขย่า                              | 5,102.4 <sup>a</sup>                                 | 105.5 <sup>c</sup>                                   |
| L-252/2 สภาวะเขย่า                           | 3,119.5 <sup>b</sup>                                 | 132.5 <sup>d</sup>                                   |
| K-37 สภาวะนิ่ง                               | 1,928.5 <sup>c</sup>                                 | 23.9 <sup>f</sup>                                    |
| L-252/2 สภาวะนิ่ง                            | 465.5 <sup>c</sup>                                   | 24.2 <sup>f</sup>                                    |

ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดลองที่ได้ทำให้เราทราบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือก สามารถเจริญได้ดีและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูง ทำให้สามารถคัดเลือกไอโซเลตที่ผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษสูงสุด 1 ไอโซเลต คือ K-37 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส สูงที่สุดเท่ากับ 5,102.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เชื้อราเอนโดไฟต์จากการศึกษาของ Suto และคณะ (2001) มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคือ 0.191 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

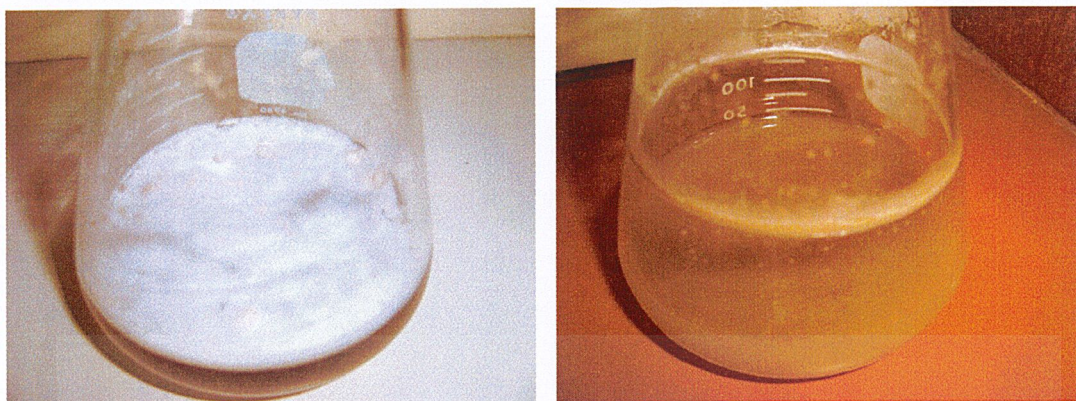
จากการสังเกตลักษณะของซังข้าวโพดบดที่เป็นส่วนประกอบในอาหารซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.3 และ 4.4 แสดงให้เห็นว่าในสภาวะเขย่า ไอโซเลต K-37 มีการเจริญเติบโตเป็นเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดียวกันกับอาหารที่มีลักษณะขุ่น ที่เกิดจากซังข้าวโพดบดถูกย่อยด้วยเอนไซม์จนเปื่อยยุ่ย ส่วนไอโซเลต L-252/2 มีการเจริญคล้ายเม็ดสาหร่าย (pellet) อยู่ในอาหารที่มีลักษณะใส และพบว่าซังข้าวโพดมีการเปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อย ส่วนในสถานะนิ่ง ไอโซเลต K-37 มีการเจริญของเส้นใยสีขาวแผ่เต็มผิวหน้าอาหาร และไอโซเลต L-252/2 มีการเจริญของเส้นใยแผ่ออกมาตามเส้นรัศมีของวงกลมและมีซังข้าวโพดเกาะที่ปลายเส้นใยเป็นกลุ่มก้อน แต่ในสถานะนี้ทั้งสองไอโซเลตผลิตเอนไซม์ได้ไม่มากนัก เมื่อเทียบกับในสถานะเขย่า ดังนั้น เราจึงเลือกไอโซเลต K-37 มาศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



- รูปที่ 4.3** (ซ้าย) ลักษณะการเจริญของเชื้อราเอนโคไฟต์ K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบด ร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสถานะนิ่ง
- (ขวา) ลักษณะการเจริญของเชื้อราเอนโคไฟต์ K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบด ร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสถานะเขย่า (200 รอบ ต่อนาที)

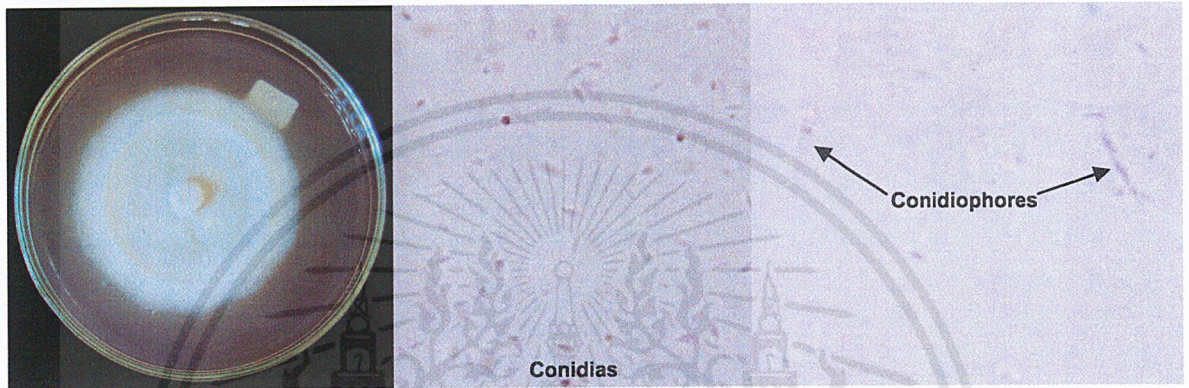


- รูปที่ 4.4** (ซ้าย) ลักษณะการเจริญของเชื้อราเอนโคไฟต์ L-252/2 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพด บดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสถานะนิ่ง
- (ขวา) ลักษณะการเจริญของเชื้อราเอนโคไฟต์ L-252/2 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพด บดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสถานะเขย่า (200 รอบต่อนาที)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.3 การรายงานผลการวิเคราะห์และจำแนกเชื้อราเอนโดไฟต์

เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟต์ K-37 ไปวิเคราะห์และจำแนก โดยห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า K-37 คือ *Acremonium* sp. ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 โคโลนี (ซ้าย) และเซลล์ผลิตสปอร์ (ตรงกลางและขวา) ของ *Acremonium* sp. K-37

##### 4.2.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Acremonium* sp. K-37 (รูปที่ 4.6)

###### โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

ใยรา (Mycelium) มีความกว้าง 1.0-1.5 ไมโครเมตร มีเซลล์ผลิตสปอร์ (conidias) เป็นรูปทรงกระบอกปลายเรียว เกิดอยู่บนเส้นใย เซลล์ผลิตสปอร์ (conidiophores) มีความกว้าง 1.0-1.5 ไมโครเมตร มีความยาว 7-13 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปกระสวย โยไม่มีสี เกิดต่อกันเป็นสายยาว สปอร์ มีความกว้าง 1.0-1.5 ไมโครเมตร มีความยาว 4-6 ไมโครเมตร เชื้อราเชื้อรามีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเท่านั้น

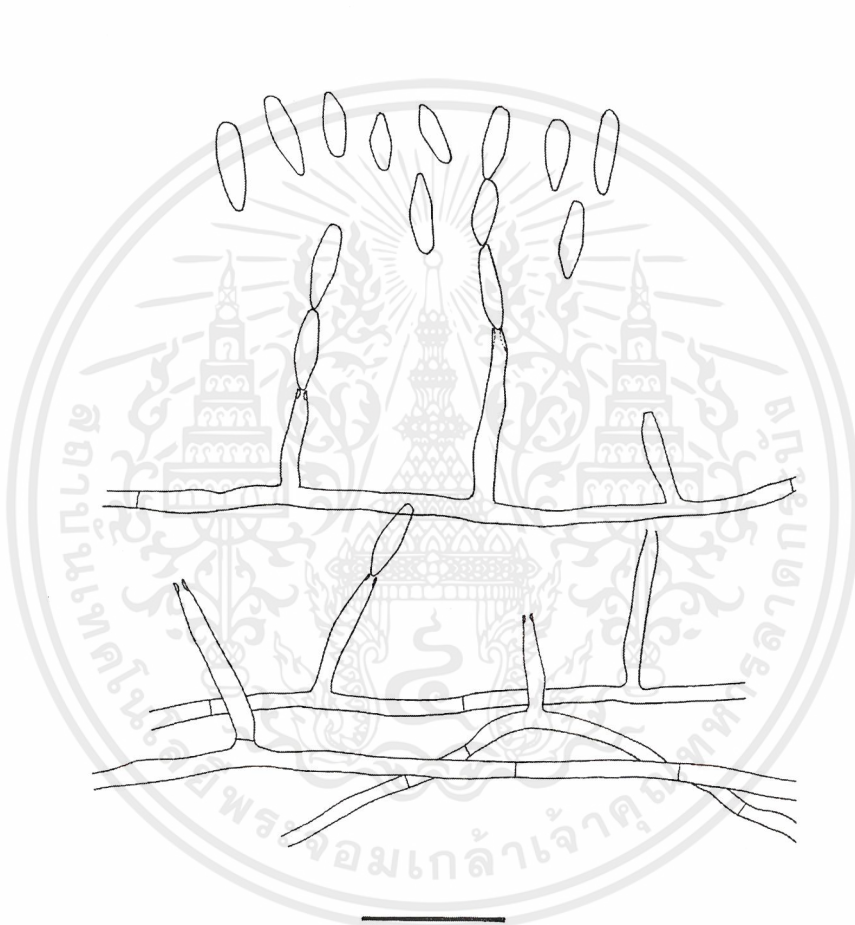
##### 4.2.3.2 การจำแนก

อนุกรมวิธานของเชื้อรา อ้างอิงจาก Domsch และคณะ (1993) จำแนกชนิดเชื้อราชนิดนี้จากลักษณะเซลล์ผลิตสปอร์เป็นรูปทรงกระบอกปลายเรียว เกิดอยู่บนเส้นใย และลักษณะสปอร์ที่มีเซลล์เดียว

##### 4.2.3.3 รายงานการพบเชื้อราสกุลนี้

เชื้อราสกุลนี้มีรายงานการพบอย่างกว้างขวางทั้งจากดิน และเศษซากพืชซึ่งเป็นเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มักพบใน ต้นยู (*Taxus spp.*) และต้นกล้วย (*Musa acuminata*) (Strobel และ Hess 1997) และหญ้าทอลเฟสคิว (tall fescue : *Festuca arundinacea*) (Joost, 1995) รวมทั้งยังมีรายงานการเป็นเอนโดไฟต์ (endophyte) ในหญ้าไรย์ (Ryegrass) หรือ *Lolium perenne* เชื้อราสกุลนี้ออกสารเป็นเอ็กสาร์ทสองวันเวลาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นี่เป็นประโยชน์กับ Ryegrass ในการป้องกันหญ้าชนิดนี้จากการเข้าทำลายของแมลง ไล่เดือนฝอย และโรคพืชชนิดอื่นๆ แต่ก็เกิดอันตรายกับปศุสัตว์ที่มาแทะเล็มจากหญ้านี้จากสารพิษ alkaloid ที่เชื้อราสร้างขึ้น (Latch, 1994) โดยราในกลุ่มนี้บางชนิดชอบความเป็นด่างและมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี



รูปที่ 4.6 ลักษณะ โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *Acremonium* sp. ที่ประกอบด้วย conidiophores, phialides และ conidia; Bar = 10 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและเปอร้ออกซิเดส

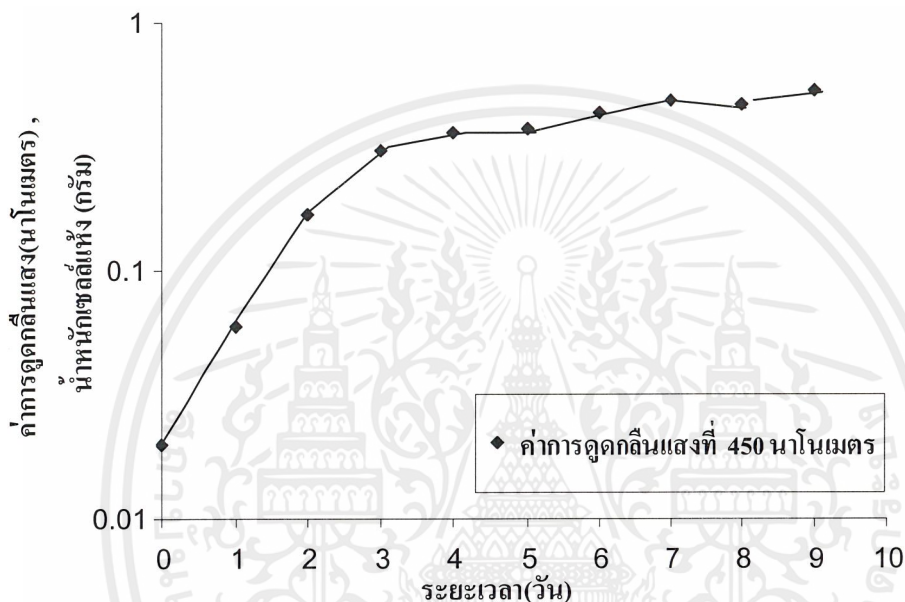
ผลของกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและเปอร้ออกซิเดสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 บนอาหารแข็งที่มีกรดแทนนิกเป็นส่วนผสมร้อยละ 0.5 เป็นระยะเวลา 4 วัน หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผล โดยถ้าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์แลคเคสก็จะเกิดสีชมพูขึ้นเมื่อหยดสารละลายไซริงกัลดาซีน (syringaldazine) และถ้ามีการผลิตเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสจะปรากฏวงสีน้ำตาลรอบโคโลนี แต่จากผลการทดลอง ไม่เกิดสีชมพูเมื่อหยดสารละลายไซริงกัลดาซีนและไม่ปรากฏวงสีน้ำตาลรอบโคโลนีเลย ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.7



- รูปที่ 4.7 (ซ้าย) โคโลนีของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 บนอาหารแข็งที่เติมมอลท์สกัดร้อยละ 1.5 และกรดแทนนิกร้อยละ 0.5 เป็นระยะเวลา 4 วัน หลังจากการย้อมไม่ปรากฏสีชมพูรอบโคโลนี
- (ขวา) โคโลนีของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 บนอาหารแข็งที่เติมกรดแทนนิกร้อยละ 0.5 เป็นระยะเวลา 4 วัน ไม่ปรากฏวงสีน้ำตาลรอบโคโลนี

#### 4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้

##### 4.4.1 รูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์

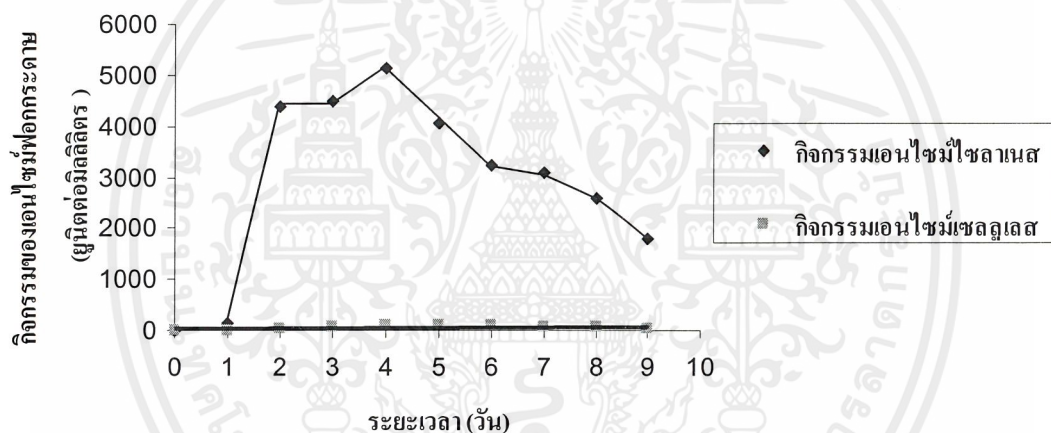


รูปที่ 4.8 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อรา *Acremonium* sp. K-37 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีขังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 9 วัน

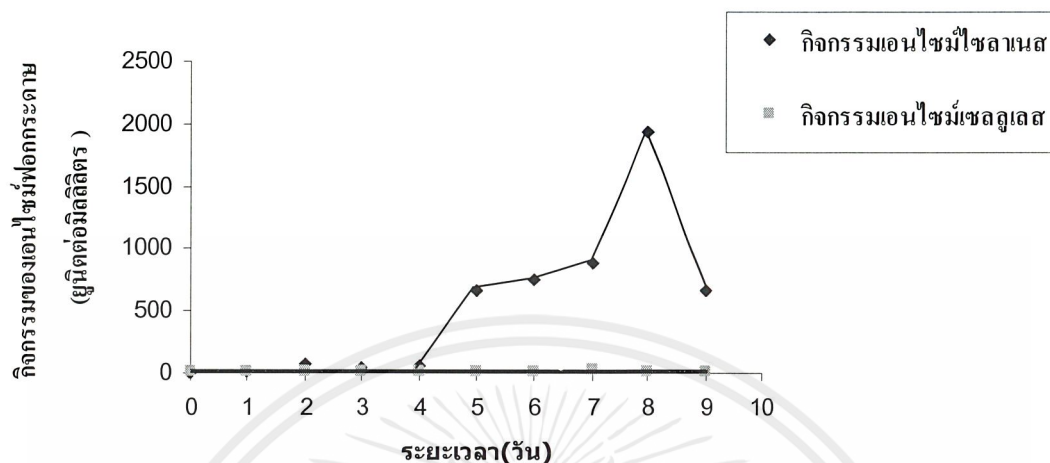
จากรูปที่ 4.8 ซึ่งเป็นกราฟที่ศึกษาการเจริญของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 จากการสังเกตค่าการดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ซึ่งเป็นการตรวจสอบความเข้มข้นของสีจากกลินินที่ถูกสกัดออกมาในน้ำหมัก ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 3 กราฟที่ได้มีลักษณะเป็นเอกซ์โปเนนเชียล ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโตมากที่สุด เมื่อเข้าสู่วันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 เชื้อมีการเจริญคงที่ (stationary phase) จากกราฟแนวโน้มค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ จึงทำให้เรากำหนดระยะเวลาในการเลี้ยงเป็น 6 วัน เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่เชื้อมีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ออกมาในสภาวะที่คงที่

#### 4.4.2 สภาวะการเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลวแบบนิ่งและแบบเขย่าที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษ

ผลของกิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Acremonium* sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 9 วัน ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.10



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานาสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 เป็นระยะเวลา 9 วัน ในสภาวะเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 เป็นระยะเวลา 9 วัน ในสถานะนิ่ง

จากกราฟในรูปที่ 4.9 และ 4.10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสมีค่ามากกว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ทั้งในสถานะนิ่งและเขย่า เราจึงเปรียบเทียบเฉพาะการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส พบว่ากิจกรรมไซลานเนสที่สถานะเขย่า เกิดขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 มีค่าเท่ากับ 5,102.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และที่สถานะนิ่งเกิดขึ้นสูงสุดในวันที่ 8 มีค่าเท่ากับ 1,928.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเมื่อนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในเชิงปริมาณ ของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว ที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน

| ไอโซเลตเชื้อราเอนโคไฟต์<br>สถานะที่ใช้เลี้ยง | ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส<br>(ยูนิตต่อมิลลิลิตร) |
|--|---|
| K-37 สถานะเขย่า                              | 5,102.4 <sup>a</sup>                                |
| K-37 สถานะนิ่ง                               | 1,928.5 <sup>b</sup>                                |

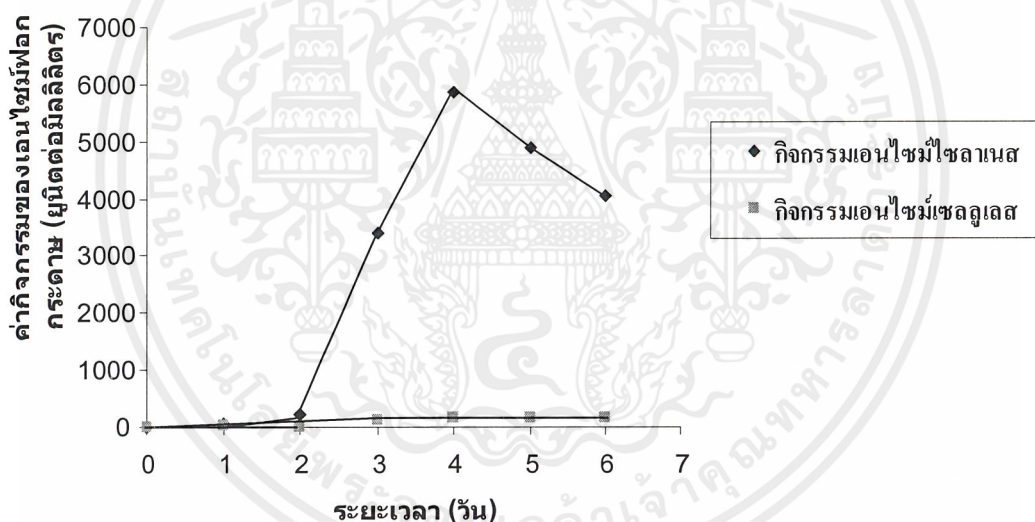
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

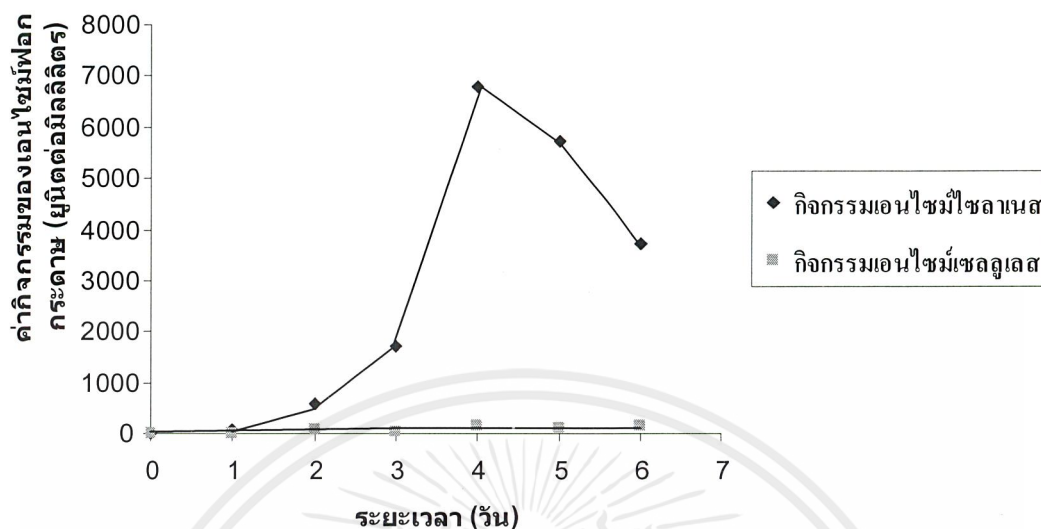
ดังนั้นจากตารางที่ 4.6 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสที่สภาวะเขย่ามีปริมาณมากกว่าที่สภาวะนิ่งอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เราจึงเลือกที่สภาวะเขย่าไปใช้ ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นต่อไป

#### 4.3.2 พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์แบบเขย่าที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษ

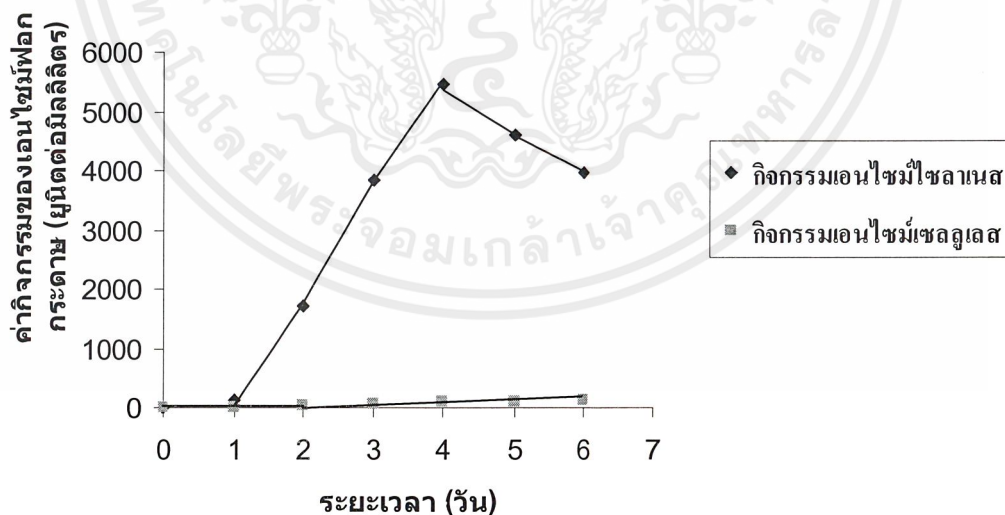
ผลของกิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้องในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน โดยจะทำการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารระหว่าง พีเอช 3 ถึง 9 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.11 ถึง 4.17



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 เป็นระยะเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 3

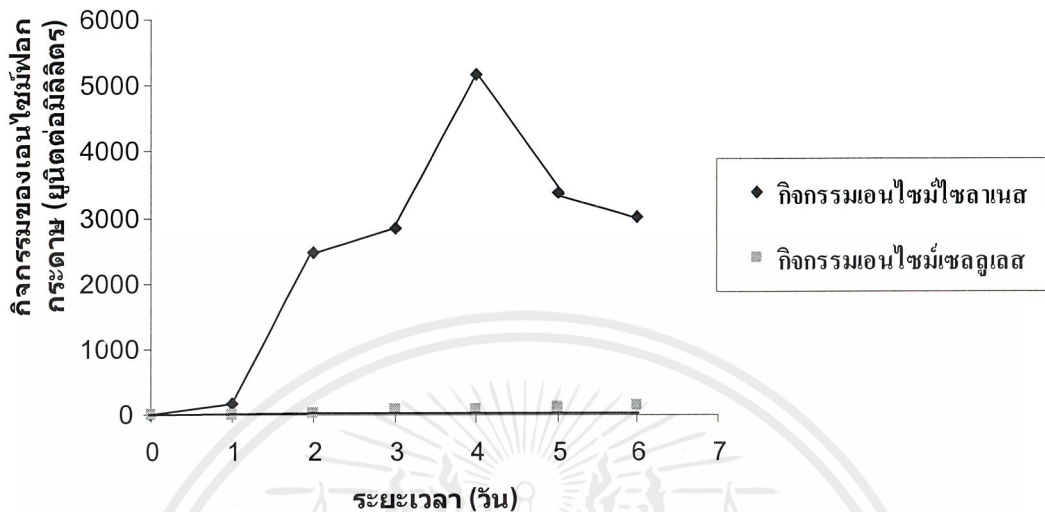


รูปที่ 4.12 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานอสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 เป็นระยะเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 4

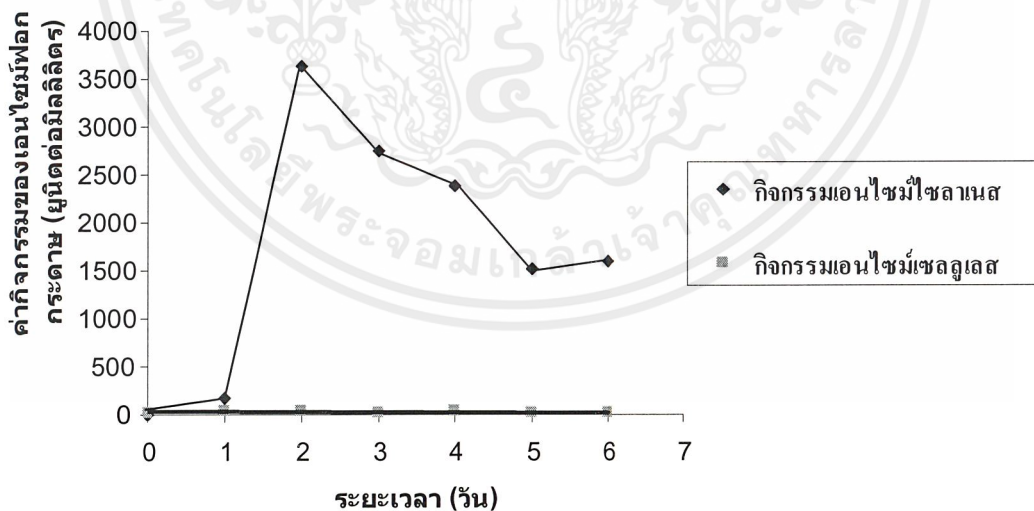


รูปที่ 4.13 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานอสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 เป็นระยะเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

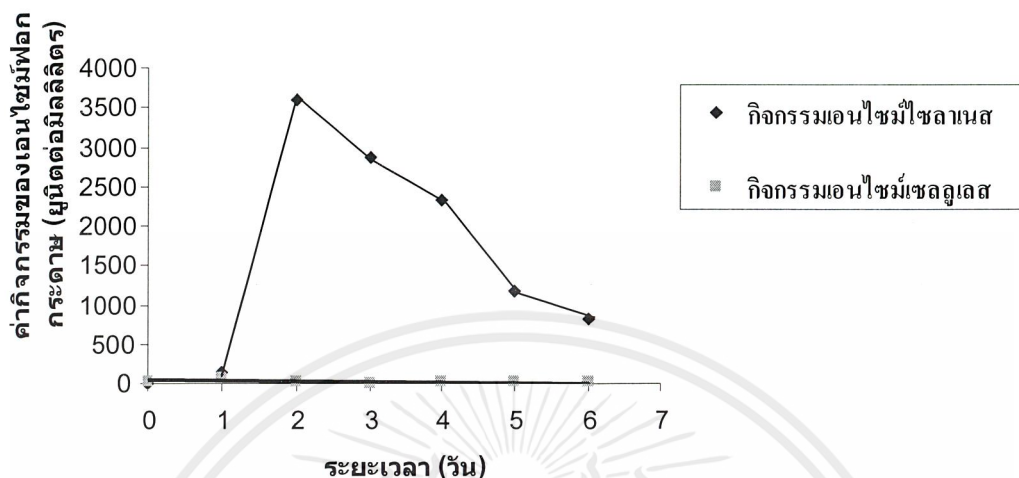


รูปที่ 4.14 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *Acromonium* sp. K-37 เป็นระยะเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 6

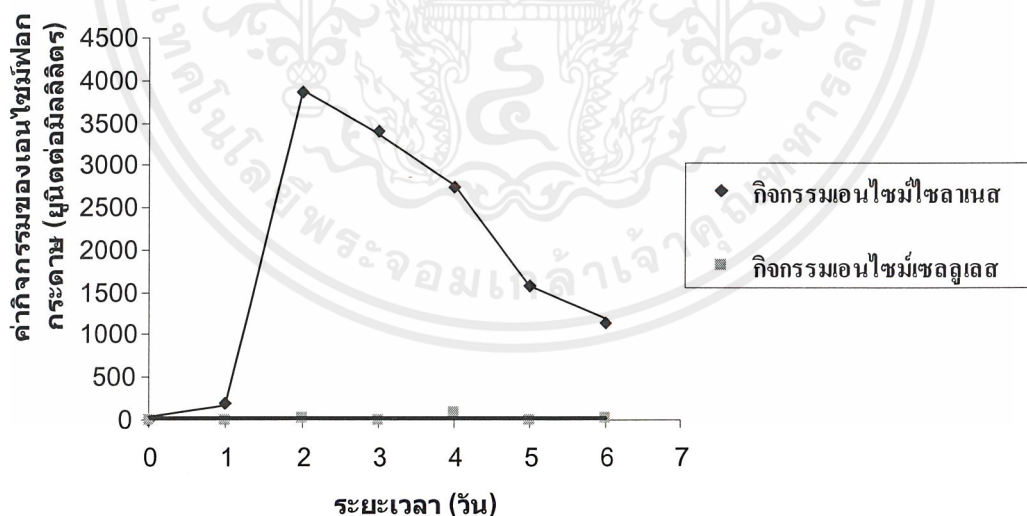


รูปที่ 4.15 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *Acromonium* sp. K-37 เป็นระยะเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิเมตร) ของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 เป็นระยะเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 8



รูปที่ 4.17 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิเมตร) ของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 เป็นระยะเวลา 6 วัน อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอชเริ่มต้น คือ 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟ รูปที่ 4.11 ถึง 4.17 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสมีค่ามากกว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ในทุกพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสที่มีพีเอชเริ่มต้นที่จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 4 ซึ่งพีเอชเริ่มต้นที่เป็นกรดจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าในช่วงพีเอชเริ่มต้นที่เป็นเบส จึงทำให้พีเอชเริ่มต้นที่เป็นกรดเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ และเมื่อนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติในทุกพีเอชได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในเชิง ปริมาณ ของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 เมื่อเลี้ยงเชื้อรา ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 6 วัน ในช่วงพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ 3 ถึง 9

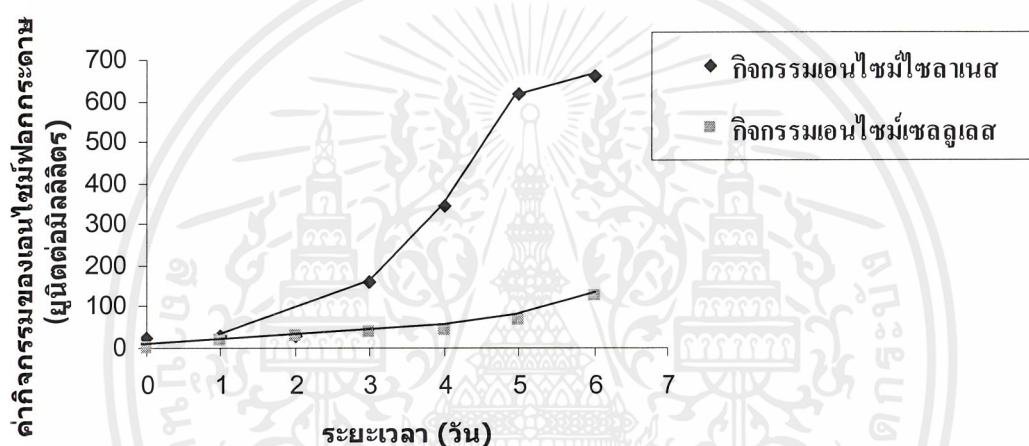
| พีเอช | ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) |
|-------|---|
| 3     | 5,868.12 <sup>b</sup>                         |
| 4     | 6,795.09 <sup>a</sup>                         |
| 5     | 5,457.03 <sup>c</sup>                         |
| 6     | 5,178.94 <sup>d</sup>                         |
| 7     | 3,635.33 <sup>f</sup>                         |
| 8     | 3,609.14 <sup>f</sup>                         |
| 9     | 3,873.12 <sup>c</sup>                         |

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

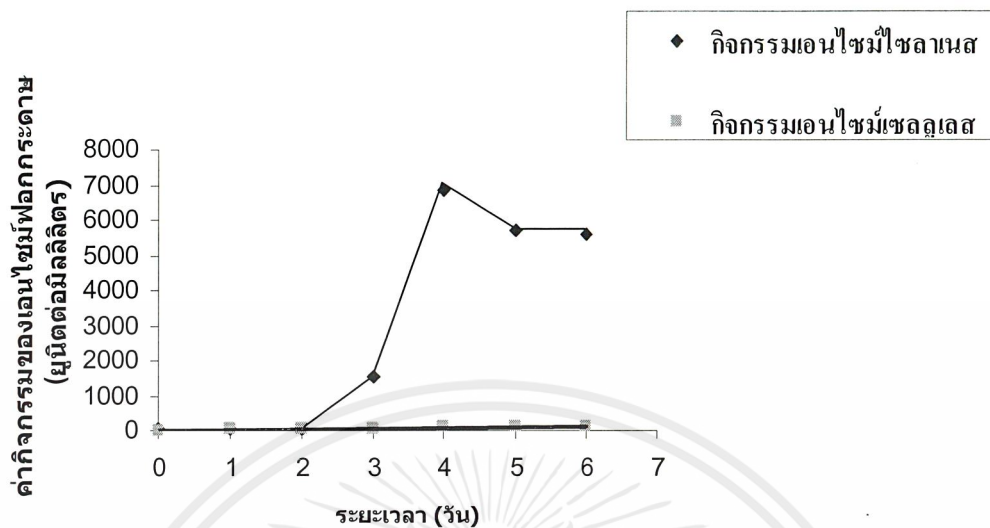
จากผลการทดลองในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ที่พีเอช 4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 มีค่าเท่ากับ 6,795.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเพาะเลี้ยงที่พีเอชต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นเราจึงเลือกพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 ไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นต่อไป

#### 4.3.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์แบบเขย่าที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษ

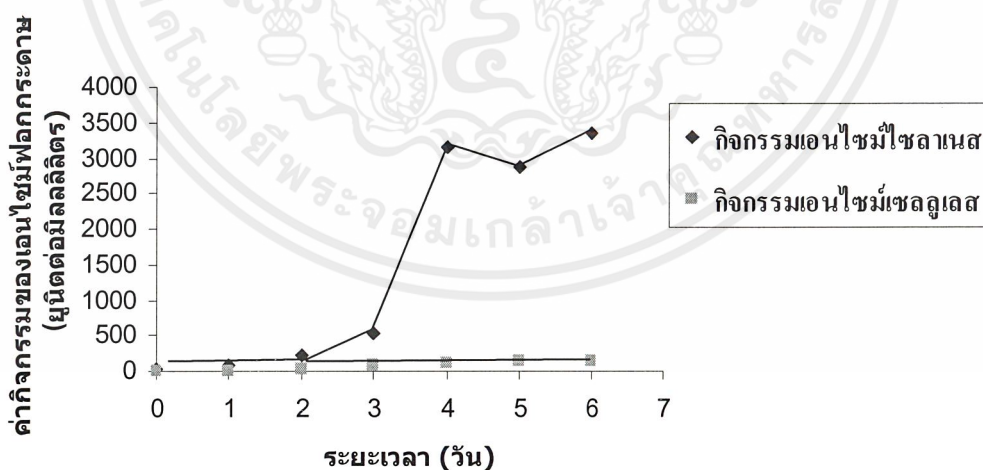
ผลของกิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 4 ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน โดยจะทำการแปรผันอุณหภูมิสำหรับเลี้ยงเชื้อราที่ 15, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.18 ถึง 4.20



รูปที่ 4.18 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไคตินเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 เป็นระยะเวลา 6 วัน พีเอช 4 ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.19 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 เป็นระยะเวลา 6 วัน พีเอช 4 ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.20 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 เป็นระยะเวลา 6 วัน พีเอช 4 ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟ รูปที่ 4.18 ถึง 4.20 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ามากกว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ในทุกอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิสูงกว่าที่อุณหภูมิห้องจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่าที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งที่อุณหภูมิสูงจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 4 ส่วนที่อุณหภูมิต่ำจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 6 เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้เชื้ออยู่ในระยะปรับตัว (lag phase) ต่อสภาพแวดล้อมใหม่นาน เมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิสูงทำให้ต้องใช้เวลาหลายวันในการผลิตเอนไซม์ออกมา จึงแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิสูงกว่าที่อุณหภูมิห้องเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ และเมื่อนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติในทุกอุณหภูมิ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.8

**ตารางที่ 4.8** การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิง ปริมาณของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 เมื่อเลี้ยงเชื้อรา ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 4 เป็นระยะเวลา 6 วัน ในอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงที่ 15, 30 และ 45 องศาเซลเซียส

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) |
|-------------------------|--|
| 15                      | 666.2 <sup>d</sup>                           |
| 30                      | 6,831.4 <sup>a</sup>                         |
| 45                      | 3,415.7 <sup>c</sup>                         |
| อุณหภูมิห้อง            | 6,795.0 <sup>a</sup>                         |

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 6,831.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 15 และ 45 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่จากการเปรียบเทียบกับอุณหภูมิห้อง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้น อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Acremonium* sp. K-37

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการฟอกกระดาษของเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.0 เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้ต้องการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อากาศสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ สภาวะที่ใช้เลี้ยงจึงต้องเป็นสภาวะเขย่า และเชื้อราชนิดนี้เป็นเชื้อราที่สามารถทนต่อสภาพที่เป็นกรดและอุณหภูมิสูงได้ประมาณ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส

จากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ในการเลี้ยงเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 ที่คัดเลือกได้จากใบกระทิง ในจังหวัดเชียงใหม่ เชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปศึกษาในระดับที่สูงขึ้นต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการฟอกกระดาษจากใบกระทิงและลำควน ในจังหวัดเชียงใหม่ สามารถคัดเลือกได้จำนวน 62 ไอโซเลต จากใบลำควน 34 ไอโซเลต ใบกระทิง 28 ไอโซเลต ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันออกไป ในเชื้อราจำนวนนี้มีเชื้อราอยู่ 2 ไอโซเลต คือ L-252/2 และ K-37 ที่มีอัตราส่วนของขนาดวงไซรอปโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมากกว่าสายพันธุ์อื่นเท่ากับ 2.90 และ 3.33 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบความสามารถของเชื้อราต่อการใช้ซังข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งในเชิงคุณภาพและในเชิงปริมาณเปรียบเทียบกับระหว่าง 2 ไอโซเลต พบว่าเชื้อราไอโซเลต K-37 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 5,102.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งแตกต่างจากไอโซเลต L-252/2 ที่มีการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 3,119.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากผลการวิเคราะห์และตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อราเอนโดไฟต์ โดยห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ พบว่าเชื้อราไอโซเลต K-37 เป็นเชื้อราเอนโดไฟต์ในสกุล *Acremonium* sp.

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษพบว่าเชื้อรา *Acremonium* sp. K-37 ที่ได้เจริญเติบโตได้ดีและมีการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษได้ค่อนข้างสูง ในสภาวะเขย่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้เท่ากับ 6,831.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส น้อยมาก ส่วนเอนไซม์แลคเคสและเปอร็อกซิเดสนั้น ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้เลย

จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษนี้บ่งชี้ได้ว่าเชื้อรา *Acremonium* sp. K-37 ที่คัดเลือกได้ เป็นเชื้อราที่ต้องการอากาศในการเจริญ และผลิตเอนไซม์ได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด และสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้อง คุณสมบัติเหล่านี้จึงเหมาะสมต่อการนำ *Acremonium* sp. K37 มาศึกษาในระดับถึงหมักเพื่อให้สามารถนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไปอย่างมีประสิทธิภาพ

### ข้อเสนอแนะ

- 1) การคัดเลือกเชื้อราควรให้ได้เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษจำนวนมาก เพื่อที่จะได้นำเชื้อรามานำมาเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ฟอกกระดาษได้มากขึ้น
- 2) การเลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้โดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร ควรทำการแปรผันชนิดของวัสดุเหล่านี้ให้หลากหลายมากขึ้น เพื่อให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษในปริมาณมากโดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่หาง่ายและราคาไม่แพง
- 3) การเลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว ควรศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ เช่น การเติมสารบางตัวที่ช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ ความเร็วรอบในการเขย่า แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของปริมาณอาหารต่อขนาดพลาสติกที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เป็นต้น นอกจากนี้ควรศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมักด้วย

## เอกสารอ้างอิง

- ลัดดา เอกสมทามาญฐ์. 2547. **ชีววิทยาของเซลล์**. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์. 58-59.
- Andrawis A., Johnson K.A. and Tien M., 1988. "Studies on compound I formation of the lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*." **J. Biol. Chem.** 263 : 1195-1198.
- Akhtar M., Blanchette R.A. and Kirk T.K. 1997. Advance in biochemical engineering/ biotechnology, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 57 : 127.
- Akhtar M., Blanchette R.A., Myers G.C. and Kirk T.K. 1998. "An overview of biomechanical pulping research." In : **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. (R.A. Young and M. Akhtar eds.) : John Wiley and Sons, Inc. New York. pp. 341-383.
- Akhtar M., Horn E.G., Lentz M.J., Scott G.M., Sykis M.S., Kirk T.K. and Swaney R.E. 1999. "Toward commercialisation of biopulping." **Paperage**, February Issue : 17-20.
- Bacon C.W., Porter J.K., Robbins J.D., and Luttrell E.S., 1977. "*Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses." **Appl. Environ. Microbiol.** 34 : 576-581.
- Beg O.K., Kapoor M., Mahajaan L. and Hoondel G.S. 2001. "Microbial xylanases and their industrial applications : a review." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56 : 326-338.
- Belesky D.P., Devine O.J., Pallas Jr J.E. and Stringer W.C. 1987. "Photosynthetic activity of tall fescue as influenced by a fungal endophyte." **Photosynthetica.** 21 : 82-87.
- Buchert J., Tenkanen M., Kantelinen A and Viikari L. 1994. "Application of xylanase in the pulp and paper industry." **Biores. Technol.** 50 : 65-72.
- Chen C.C., Adolphson R., Dean J.F.D., Eriksson K.L., Adam M.W.W. and Westpheling J. 1997. "Release of lignin from Kraft pulp by a hyperthermophilic xylanase from *Thermotoga maritima*." **Enzyme Microb. technol.** 20 : 39-45.
- Chung, N. and Aust, S.D., 1995. "Veratryl alcohol-mediated indirect oxidation of pentachlorophenol by lignin peroxidase." **Arch. Biochem. Biophys.** 322 : 143-148.
- Clay K. 1989. "Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents." **Mycol. Res.** 92 : 1-12.

- Coughlan P.M. and Hazlewood P.M. 1993. "(1,4- $\beta$ -D-xylan degrading enzyme systems : biochemistry, molecular biology and application." **Biotechnol. Appl. Biochem.** 17 : 259-289.
- De Bary A. 1866. **Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten.** Engelmann, Leipzig. 558p.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. 1993. **Compendium of soil fungi.** Vol. I (Reprint). - IHW-Verlag, Eching. 860 p.
- Findlay J.A., Buthelezi S., Lavoie R., Penarodriguez L. and Miller J.D. 1995. "Bioactive isocoumarins and related metabolites from conifer endophytes." **J. Nat. Prod.** 58 : 1759-1766.
- Findlay J.A., Li G.Q. and Johnson J.A. 1997. "Bioactive compounds from an endophytic fungus from eastern larch (*Larix laricina*) needles." **Can. J. Chem.** 75 : 716-719.
- Giere J., 1970. "The reactions lignin during pulping." **Svensk Papperstidning** 18 : 571-596
- Giere J., 1980. "Chemical aspects of kraft pulping." **Wood Sci. Technol.** 14 : 241-266
- Giere J., 1982. "The chemistry of delignification." **Holzforschung** 36 : 43-51.
- Giere J., 1985. "Chemistry of delignification. Part 1. General concept and reactions during pulping." **Wood Sci. Technol.** 19 : 289-312
- Haltrich D., Nidetzky B., Kulbe D.K., Steiner W. and Zupancic S. 1996. "Production of fungal xylanases." **Biores. Technol.** 58 : 137-161.
- Harkin J.M. and Obst J.R. 1973. "Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi." **Experientia.** 29 : 381-387.
- Isaac S. 1992. **Fungal-Plant interactions.** Shapman & Hall, London. pp. 316-327.
- Johnson M.C., Pirone T.P., Siegel M.R. and Varney D.R. 1982. "Detection of *Epichloe typhina* in tall fescue by means of enzyme-linked immuno absorbent assay." **Phytopathol.** 72 : 647-650.
- Joost R.E. 1995. "*Acremonium* in fescue and ryegrass boon or bane? A review." **J. Anim. Sci.** 73 : 881-888.
- Ju H., Zou W.X., Meng J.C. and Tan R.X. 1998. "Bioactive flavonoids from endophyte-infected blue grass (*Poa ampla*)." **J. Agric. Food. Chem.** 46 : 3785-3788.

- Kim Y., Cho N., Eom T. and Shin W. 2002. "Purification and characterization of a laccase from *Cerrena unicolor* and its reactivity in lignin degradation." **Bull. Korean Chem. Soc.** 23(7) : 985-989.
- Kirk T.K., Koning J.W.Jr., Burgess R.R., Akhtar M. et al. 1993. "Biopulping : a glimpse of the future?" Res. Rep. FPL-RP-523, U.S. department of agriculture, Forest products Laboratory Madison, Wisconsin. pp. 74.
- Kormelink F.J.M., Searle-van Leeuwen M.J.F., Wood T.M, and Voragen A.G.J. 1993. "Purification and characterization of three endo-(1,4)- $\beta$ -D-xylanase and one  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus awamori*." **J. Biotechnol.** 27 : 249-265.
- Laisona, M.S.A., Kozulic, B., Meusdoerffer, F. and Fiechter, A., 1987. "Homology among multiple extracellular peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*." **J. Biol. Chem.** 262 : 419-424.
- Latch, G.C.M. 1994. "Influence of *Acremonium* endophytes of perennial grass important." **New Zealand J. Agric. Res.** 37 : 311-318.
- Lobos, S., Larrondo, L., Salas, L., Karahanian, E. and Vicuña, R., 1994. "Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*." **Microbiol.** 140 : 2691-2698.
- Lu H., Zou W.X. Meng J.C., Hu J. and Tan R.X. 2000. "New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp. an endophytic fungus in *Artemisia annua*." **Plant Sci.** 151 : 67-73.
- Mandels M. and Weber J. 1969. "The production of cellulase". 391-398. in Gould R.E. (ed.) Adv. Chem. Ser. Washington, D.C. : **Amer. Chem. Soc.**
- Messner K., Srebotnik E. 1994. "Biopulping : an overview of developments in an environmentally safe paper-making technology." **FEMS Microbiol Rev.** 13 : 351-364.
- Pham P.L., Alric I., Delmas M. 1995. "Incorporation of xylanase in total chlorine free bleaches sequence using ozone and hydrogenperoxide." **Appita J.** 48(3) : 213-217.
- Rodrigues K.F., Hesse M. and Werner C. 2000. "Antimicrobial activities of secondary metabolites product by endophytic fungi from *Spondias mombin*." **J. Basic. Microbiol.** 40 : 261-267.

- Rodriguez R.J. and Yoder O.C. 1987. "Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Gomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*)." **Gene**. 54 : 73-81.
- Scott G.M. and Swaney R.E. 1998. "New technology for papermaking : biopulping economics." **Tappi J.** 81(12) : 153-157.
- Scott G.M., Akhtar M. Lentz M.J. and Swaney R.E. 1998. Engineering, scale-up, and economic aspects of fungal pretreatments of woodships, In **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. (R.A. Young and M. Akhtar eds.) : John Wiley and Sons, Inc. New York. pp. 341-388.
- Scott, S.L., Chen, W.J., Bakac, A. and Espenson, J.H., 1993. "Spectroscopic parameters electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rate of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolone-6-sulfonate) radicals and ions." **J. Phys. Chem.** 97 : 6710-6714.
- Sherwood-Pike M., Stone J.K. and Carrol G.C. 1986. "*Rhabdocline parkerii* a ubiquitous foliar endophyte of Douglas-Fir." **Can. J. Bot.** 64 : 1849-1855.
- Strobel G.A. and Hess W.M. 1997. "Glucosylation of the peptide leucinostatin A, produced by an endophytic fungus of European yew, may protect the from leucinostatin toxicity." **Chem. Biol.** 4 : 529-536.
- Strobel G.A., Torczynski R. and Bollon A. 1997. "*Acremonium* sp. a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*)." **Plant Sci.** 128 : 97-108.
- Suto M., Takebayashi M., Saito K., Tanaka M., Yokota A. and Tomita F. 2002. "Endophytes as producers of xylanase." **J. Biosci. Bioeng.** 93(1) : 88-90.
- Szklarz G.D., Antibus R.K., Sinsabaugh R.L. and Linkins A.E. 1989. "Production of phenoloxidase and peroxidases by wood-rotting fungi." **Mycologia.** 81 : 234-240.
- Tang L.U.L., Yu E.K.C., Luise-Seize G.W. and Saddle J.N. 1987. "Inexpensive rapid procedure for bulk purification of cellulase-free beta-1,4-xylanase for high specific activity". **Biotechnol. Bioeng.** 30 : 96-106.
- Tolan J.S. 1996. "Pulp and paper." 327-338 in Godfrey T. and West S. (Eds.) **Ind. Enzymol.** London : Macmillan Press.
- Turner J.C., Skerker P.S., Burns B.J., Howard J.C., Alonso M.A. and Andies J.L. 1992. "Bleaching of enzyme instant of chlorine-mill trials." **Tappi J.** 75(12) :83-89.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vares, T., Kalsi, M. and Hatakka, A.I., 1995. "Lignin peroxidases, manganese peroxidases and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during the solid state fermentation of wheat straw." **Appl. Environ. Microbiol.** 61 : 3515–3520.

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

#### 1. อาหารสูตร Potato dextrose agar (PDA)

ประกอบด้วย

|                |      |           |
|----------------|------|-----------|
| น้ำต้มมันฝรั่ง | 1000 | มิลลิลิตร |
| น้ำตาลกลูโคส   | 20   | กรัม      |
| วุ้น           | 15   | กรัม      |

วิธีการเตรียม

ต้มมันฝรั่งที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ 200 กรัมในน้ำ 1000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาแต่น้ำ ละลายน้ำตาลกลูโคสและวุ้น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 2. อาหารสูตร Czapek Dox medium

ประกอบด้วย

|                             |      |      |
|-----------------------------|------|------|
| โซเดียมไนเตรด               | 2.0  | กรัม |
| โพแทสเซียมคลอไรด์           | 0.5  | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต | 0.5  | กรัม |
| เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต   | 0.01 | กรัม |
| ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต  | 1.0  | กรัม |
| น้ำตาลซูโครส                | 30   | กรัม |
| วุ้น                        | 13   | กรัม |

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ตามลำดับ ให้ความร้อนด้วยเตาไมโครเวฟเพื่อให้ส่วนประกอบละลายดี จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 3. อาหารสูตรพื้นฐาน (Suto และคณะ 2001)

ประกอบด้วย

|                            |     |      |
|----------------------------|-----|------|
| เปปโตน                     | 3.0 | กรัม |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต | 2.0 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต           | 1.0 | กรัม |
| แคลเซียมคลอไรด์            | 1.0 | กรัม |
| ยีสต์สกัด                  | 3.0 | กรัม |

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนประกอบตามลำดับในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 5.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล แล้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 4. อาหารวุ้นแทนนิก (ร้อยละ)

ประกอบด้วย

|           |     |
|-----------|-----|
| กรดแทนนิก | 0.5 |
| วุ้น      | 2.0 |

วิธีการเตรียม

ละลายกรดแทนนิกและวุ้นในน้ำกลั่น ให้ความร้อนด้วยเตาไมโครเวฟเพื่อให้ส่วนประกอบละลายดี จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 5. การเตรียมซีเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ตามวิธีของ Lillie (1948)

เตรียม stock solution :

- (A) : สารละลายของกรดซิตริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์
- (B) : สารละลายของโซเดียมซีเตรต ( $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ ) 0.05 โมลาร์

วิธีการเตรียม

เติมสารละลายของกรดซิตริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 230 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายของโซเดียมซีเตรต 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 270 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

## ภาคผนวก ข

### วิธีการวิเคราะห์

#### 1. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไพลานีสตามวิธีของ Tang และคณะ (1987)

##### สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย (ร้อยละ)

|  |      |
|--|------|
| 1. ไดโนโตรซาลิไซลิกแอซิด (DNS)                 | 1.0  |
| 2. ฟีนอล                                       | 0.2  |
| 3. โซเดียมโพแทสเซียมทาทเรต                     | 20.0 |
| 4. โซเดียมซัลไฟต์ ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) | 0.05 |
| 5. โซเดียมไฮดรอกไซด์                           | 1.0  |

##### วิธีการเตรียม DNS reagent

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่นตามปริมาณที่ต้องการแล้วจึงเติมโซเดียมโพแทสเซียมทาทเรต ฟีนอล และไดโนโตรซาลิไซลิกแอซิด (DNS) ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ในที่มืด ก่อนใช้ให้เติมโซเดียมซัลไฟต์ ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ DNS reagent

##### วิธีการวิเคราะห์

1. เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายไพลานีสเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
2. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร แล้วต้มในน้ำเดือด 5 นาที
3. ทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำก๊อก
4. เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

(ชุดควบคุม : นำเอนไซม์ไปต้มเดือด 5 นาที แล้วทำการเติมสารละลายไพลานีสแต่ไม่บ่ม โดยเติม DNS reagent ลงไปทันที นำไปต้ม แล้วทำตามวิธีการข้างต้น)

### การคำนวณค่ากิจกรรมไอโซมไชลานเนส

$$\text{ยูนิตต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายไอโซมไชลานเนส}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลไซโลส} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายไอโซมไชลานเนส}}$$

(กรัมต่อโมล)                      (นาที)                      (มิลลิลิตร)

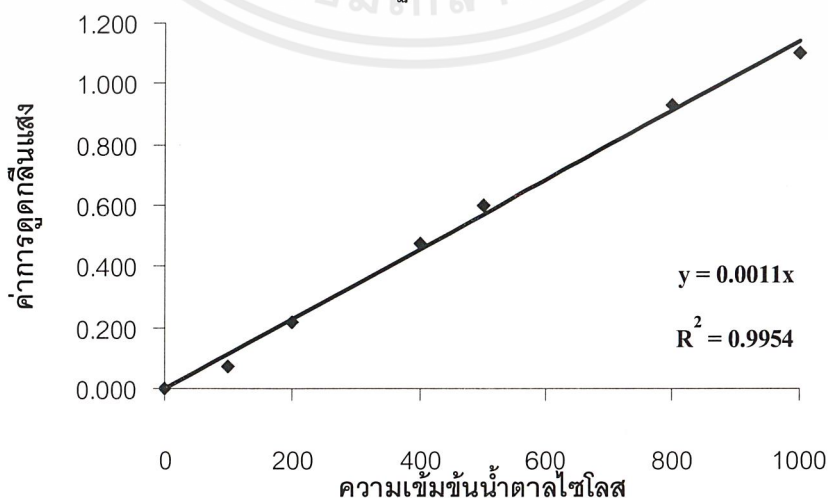
1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณไอโซมไชลานเนสที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

### 1.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลสในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

#### วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส

1. เตรียม stock solution ของไซโลสให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. บีบสารละลายจากข้อ 1 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร (แบบลค์ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทน)
3. เติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร
4. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วทำให้เย็นด้วยน้ำก๊อก
5. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส

กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mandels และคณะ (1969)

เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethylcellulose; CMC) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในซิงเกอร์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลันเนส (ข้อ 1)

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

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

(กรัมต่อโมล)                      (นาที)                      (มิลลิลิตร)

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นไซโลส

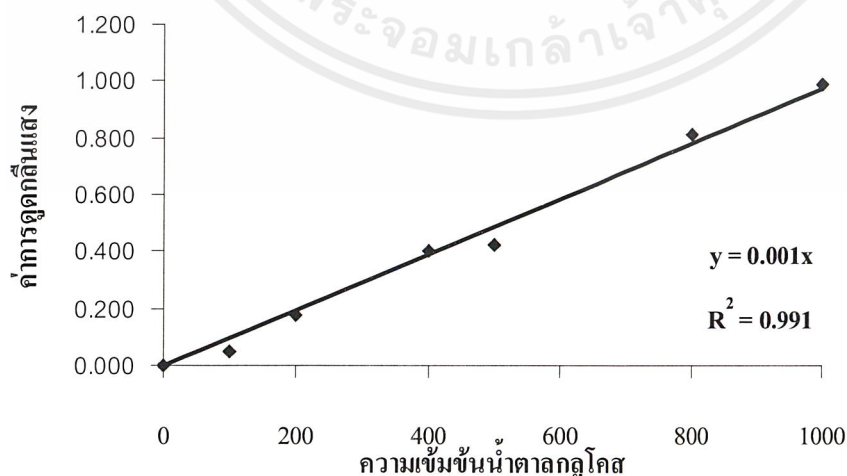
1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

### 2.1.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคสในการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคส

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส (ข้อ 1.1) แต่ใช้สารละลายกลูโคสแทนสารละลายไซโลส นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกลูโคส

กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

ตารางที่ ค1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา K-37 ในอาหารเหลวที่มี  
ซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า  
(200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 9 วัน

| วันที่/ซ้ำ | ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร |
|------------|--------------------|
| 0/1        | 0.00               |
| 0/2        | 0.00               |
| 0/3        | 0.00               |
| 1/1        | 134.21             |
| 1/2        | 113.65             |
| 1/3        | 136.63             |
| 2/1        | 4086.73            |
| 2/2        | 4630.82            |
| 2/3        | 4485.73            |
| 3/1        | 4594.55            |
| 3/2        | 4558.27            |
| 3/3        | 4364.82            |
| 4/1        | 5102.36            |
| 4/2        | 4316.45            |
| 4/3        | 5972.91            |
| 5/1        | 4135.09            |
| 5/2        | 3971.86            |
| 5/3        | 4062.55            |
| 6/1        | 3306.86            |
| 6/2        | 3113.41            |
| 6/3        | 3270.59            |
| 7/1        | 3331.05            |
| 7/2        | 2889.73            |
| 7/3        | 3004.59            |
| 8/1        | 2557.23            |
| 8/2        | 2738.59            |
| 8/3        | 2430.27            |
| 9/1        | 2146.14            |
| 9/2        | 1366.27            |
| 9/3        | 1904.32            |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา K37 ในอาหารเหลวที่มี ซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสถานะนิ่ง เป็นระยะเวลา 9 วัน

| วันที่/ซ้ำ | ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร |
|------------|--------------------|
| 0/1        | 0.00               |
| 0/2        | 0.00               |
| 0/3        | 0.00               |
| 1/1        | 16.93              |
| 1/2        | 15.72              |
| 1/3        | 25.39              |
| 2/1        | 105.19             |
| 2/2        | 67.71              |
| 2/3        | 39.90              |
| 3/1        | 54.41              |
| 3/2        | 33.85              |
| 3/3        | 41.11              |
| 4/1        | 66.50              |
| 4/2        | 85.85              |
| 4/3        | 33.85              |
| 5/1        | 1686.68            |
| 5/2        | 767.77             |
| 5/3        | 683.14             |
| 6/1        | 876.59             |
| 6/2        | 758.10             |
| 6/3        | 634.77             |
| 7/1        | 885.05             |
| 7/2        | 871.75             |
| 7/3        | 904.40             |
| 8/1        | 1946.64            |
| 8/2        | 1916.41            |
| 8/3        | 1928.50            |
| 9/1        | 685.55             |
| 9/2        | 678.30             |
| 9/3        | 631.15             |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา L-252/2 ใน อาหารเหลว ที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะ เขย่า เป็นระยะเวลา 9 วัน

| วันที่/ซ้ำ | ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร |
|------------|--------------------|
| 0/1        | 0.00               |
| 0/2        | 0.00               |
| 0/3        | 0.00               |
| 1/1        | 184.99             |
| 1/2        | 33.85              |
| 1/3        | 321.62             |
| 2/1        | 159.60             |
| 2/2        | 113.65             |
| 2/3        | 154.76             |
| 3/1        | 406.25             |
| 3/2        | 510.24             |
| 3/3        | 177.74             |
| 4/1        | 880.22             |
| 4/2        | 776.24             |
| 4/3        | 920.12             |
| 5/1        | 1493.23            |
| 5/2        | 1378.36            |
| 5/3        | 2091.73            |
| 6/1        | 3119.45            |
| 6/2        | 3252.45            |
| 6/3        | 2932.05            |
| 7/1        | 1084.55            |
| 7/2        | 947.93             |
| 7/3        | 1171.61            |
| 8/1        | 1084.55            |
| 8/2        | 1066.42            |
| 8/3        | 953.97             |
| 9/1        | 951.55             |
| 9/2        | 989.04             |
| 9/3        | 866.92             |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา L-252/2 ใน อาหารเหลว ที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสถานะนิ่ง เป็นระยะเวลา 9 วัน

| วันที่/ซ้ำ | ยูนิตต่อมิลลิลิตร |
|------------|-------------------|
| 0/1        | 0.00              |
| 0/2        | 0.00              |
| 0/3        | 0.00              |
| 1/1        | 50.78             |
| 1/2        | 84.64             |
| 1/3        | 135.42            |
| 2/1        | 100.35            |
| 2/2        | 56.83             |
| 2/3        | 66.50             |
| 3/1        | 78.59             |
| 3/2        | 91.89             |
| 3/3        | 16.93             |
| 4/1        | 171.69            |
| 4/2        | 159.60            |
| 4/3        | 143.88            |
| 5/1        | 465.50            |
| 5/2        | 489.68            |
| 5/3        | 284.14            |
| 6/1        | 380.86            |
| 6/2        | 314.36            |
| 6/3        | 459.45            |
| 7/1        | 276.88            |
| 7/2        | 340.96            |
| 7/3        | 401.42            |
| 8/1        | 234.56            |
| 8/2        | 273.25            |
| 8/3        | 246.65            |
| 9/1        | 177.74            |
| 9/2        | 149.93            |
| 9/3        | 244.24            |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน พีเอช 3

| วันที่/ซ้ำ | ยูนิิตต่อมิลลิลิตร |
|------------|--------------------|
| 0/1        | 0.00               |
| 0/2        | 0.00               |
| 0/3        | 0.00               |
| 1/1        | 91.89              |
| 1/2        | 62.87              |
| 1/3        | 72.55              |
| 2/1        | 245.45             |
| 2/2        | 233.35             |
| 2/3        | 232.15             |
| 3/1        | 3294.77            |
| 3/2        | 3518.45            |
| 3/3        | 3355.23            |
| 4/1        | 5706.91            |
| 4/2        | 6021.27            |
| 4/3        | 5876.18            |
| 5/1        | 4860.55            |
| 5/2        | 4993.55            |
| 5/3        | 4836.36            |
| 6/1        | 4098.82            |
| 6/2        | 4123.00            |
| 6/3        | 3905.36            |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค6 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง ในสถานะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน พีเอช 4

| วันที่/ซ้ำ | ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร |
|------------|--------------------|
| 0/1        | 0.00               |
| 0/2        | 0.00               |
| 0/3        | 0.00               |
| 1/1        | 84.64              |
| 1/2        | 64.08              |
| 1/3        | 79.80              |
| 2/1        | 587.62             |
| 2/2        | 575.53             |
| 2/3        | 635.98             |
| 3/1        | 1577.86            |
| 3/2        | 1825.73            |
| 3/3        | 1716.91            |
| 4/1        | 6819.27            |
| 4/2        | 6916.00            |
| 4/3        | 6650.00            |
| 5/1        | 5779.45            |
| 5/2        | 5706.91            |
| 5/3        | 5755.27            |
| 6/1        | 3760.27            |
| 6/2        | 3699.82            |
| 6/3        | 3699.82            |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๗ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Acronium* sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง ในสถานะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน พีเอช 5

| วันที่/ซ้า | ยูนิตต่อมิลลิลิตร |
|------------|-------------------|
| 0/1        | 0.00              |
| 0/2        | 0.00              |
| 0/3        | 0.00              |
| 1/1        | 131.79            |
| 1/2        | 130.58            |
| 1/3        | 125.75            |
| 2/1        | 1710.86           |
| 2/2        | 1698.77           |
| 2/3        | 1716.91           |
| 3/1        | 3844.91           |
| 3/2        | 3815.89           |
| 3/3        | 3869.09           |
| 4/1        | 5513.45           |
| 4/2        | 5440.91           |
| 4/3        | 5416.73           |
| 5/1        | 4751.73           |
| 5/2        | 4582.45           |
| 5/3        | 4485.73           |
| 6/1        | 4008.14           |
| 6/2        | 3935.59           |
| 6/3        | 3959.77           |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๘ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน พีเอช 6

| วันที่/ซ้ำ | ยูนิิตต่อมิลลิลิตร |
|------------|--------------------|
| 0/1        | 0.00               |
| 0/2        | 0.00               |
| 0/3        | 0.00               |
| 1/1        | 175.32             |
| 1/2        | 180.15             |
| 1/3        | 169.27             |
| 2/1        | 2514.91            |
| 2/2        | 2418.18            |
| 2/3        | 2527.00            |
| 3/1        | 2841.36            |
| 3/2        | 2853.45            |
| 3/3        | 2841.36            |
| 4/1        | 5162.82            |
| 4/2        | 5247.45            |
| 4/3        | 5126.55            |
| 5/1        | 3391.50            |
| 5/2        | 3367.32            |
| 5/3        | 3409.64            |
| 6/1        | 3046.91            |
| 6/2        | 3004.59            |
| 6/3        | 2962.27            |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๑ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Acremonium* sp. K37  
 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง  
 ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน พีเอช 7

| วันที่/ซ้ำ | ยูนิิตต่อมิลลิลิตร |
|------------|--------------------|
| 0/1        | 0.00               |
| 0/2        | 0.00               |
| 0/3        | 0.00               |
| 1/1        | 169.27             |
| 1/2        | 168.06             |
| 1/3        | 178.95             |
| 2/1        | 3603.09            |
| 2/2        | 3705.86            |
| 2/3        | 3597.05            |
| 3/1        | 2780.91            |
| 3/2        | 2738.59            |
| 3/3        | 2732.55            |
| 4/1        | 2351.68            |
| 4/2        | 2424.23            |
| 4/3        | 2381.91            |
| 5/1        | 1505.32            |
| 5/2        | 1583.91            |
| 5/3        | 1481.14            |
| 6/1        | 1553.68            |
| 6/2        | 1626.23            |
| 6/3        | 1596.00            |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Acromonium* sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง ในสถานะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 6 วัน พีเอช 8

| วันที่/ซ้ำ | ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร |
|------------|--------------------|
| 0/1        | 0.00               |
| 0/2        | 0.00               |
| 0/3        | 0.00               |
| 1/1        | 130.58             |
| 1/2        | 130.58             |
| 1/3        | 133.00             |
| 2/1        | 3615.18            |
| 2/2        | 3560.77            |
| 2/3        | 3651.45            |
| 3/1        | 2962.27            |
| 3/2        | 2913.91            |
| 3/3        | 2756.73            |
| 4/1        | 2291.23            |
| 4/2        | 2418.18            |
| 4/3        | 2248.91            |
| 5/1        | 1178.86            |
| 5/2        | 1209.09            |
| 5/3        | 1166.77            |
| 6/1        | 791.95             |
| 6/2        | 767.77             |
| 6/3        | 912.86             |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค11 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นเวลาระยะ 6 วัน พีเอช 9

| วันที่/ซ้า | ยูนิตต่อมิลลิลิตร |
|------------|-------------------|
| 0/1        | 0.00              |
| 0/2        | 0.00              |
| 0/3        | 0.00              |
| 1/1        | 181.36            |
| 1/2        | 200.71            |
| 1/3        | 186.20            |
| 2/1        | 3844.91           |
| 2/2        | 3941.64           |
| 2/3        | 3832.82           |
| 3/1        | 3331.05           |
| 3/2        | 3458.00           |
| 3/3        | 3445.91           |
| 4/1        | 2726.50           |
| 4/2        | 2744.64           |
| 4/3        | 2756.73           |
| 5/1        | 1511.36           |
| 5/2        | 1632.27           |
| 5/3        | 1577.86           |
| 6/1        | 1112.36           |
| 6/2        | 1106.32           |
| 6/3        | 1184.91           |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค12 กิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอช 4 เป็นระยะเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

| วันที่/ซ้ำ | ยูนิิตต่อมิลลิลิตร |
|------------|--------------------|
| 0/1        | 48.36              |
| 0/2        | 19.35              |
| 0/3        | 9.67               |
| 1/1        | 42.32              |
| 1/2        | 24.18              |
| 1/3        | 22.97              |
| 2/1        | 22.97              |
| 2/2        | 38.69              |
| 2/3        | 26.60              |
| 3/1        | 153.55             |
| 3/2        | 166.85             |
| 3/3        | 163.23             |
| 4/1        | 342.17             |
| 4/2        | 369.98             |
| 4/3        | 327.66             |
| 5/1        | 620.26             |
| 5/2        | 616.64             |
| 5/3        | 615.43             |
| 6/1        | 683.14             |
| 6/2        | 666.21             |
| 6/3        | 634.77             |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค13 กิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Acremonium* sp. K37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอช 4 เป็นระยะเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

| วันที่/ซ้ำ | ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร |
|------------|--------------------|
| 0/1        | 47.15              |
| 0/2        | 21.76              |
| 0/3        | 105.43             |
| 1/1        | 20.55              |
| 1/2        | 49.57              |
| 1/3        | 33.85              |
| 2/1        | 68.92              |
| 2/2        | 72.55              |
| 2/3        | 81.01              |
| 3/1        | 1251.41            |
| 3/2        | 1662.50            |
| 3/3        | 1753.18            |
| 4/1        | 6903.91            |
| 4/2        | 6770.91            |
| 4/3        | 6819.27            |
| 5/1        | 5791.55            |
| 5/2        | 5573.91            |
| 5/3        | 5852.00            |
| 6/1        | 5682.73            |
| 6/2        | 5416.73            |
| 6/3        | 5719.00            |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์ฟอกกระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Acremonium* sp. K-37 ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่พีเอช 4 เป็นระยะเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

| วันที่/ซ้ำ | ยูนิิตต่อมิลลิลิตร |
|------------|--------------------|
| 0/1        | 44.74              |
| 0/2        | 10.88              |
| 0/3        | 2.42               |
| 1/1        | 97.94              |
| 1/2        | 94.31              |
| 1/3        | 47.15              |
| 2/1        | 229.73             |
| 2/2        | 236.98             |
| 2/3        | 241.82             |
| 3/1        | 2647.91            |
| 3/2        | 2817.18            |
| 3/3        | 2466.55            |
| 4/1        | 3318.95            |
| 4/2        | 3095.27            |
| 4/3        | 3071.09            |
| 5/1        | 2895.77            |
| 5/2        | 2786.95            |
| 5/3        | 2926.00            |
| 6/1        | 3415.68            |
| 6/2        | 3204.09            |
| 6/3        | 3415.68            |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑15 แสดงค่าการเจริญของเชื้อรา *Acremonium* sp. K-37 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดบดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า (200 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา 9 วัน

| วันที่/ซ้ำ | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร |
|------------|----------------------------------|
| 0/1        | 0.026                            |
| 0/2        | 0.024                            |
| 0/3        | 0.011                            |
| 1/1        | 0.041                            |
| 1/2        | 0.084                            |
| 1/3        | 0.056                            |
| 2/1        | 0.155                            |
| 2/2        | 0.169                            |
| 2/3        | 0.183                            |
| 3/1        | 0.290                            |
| 3/2        | 0.287                            |
| 3/3        | 0.341                            |
| 4/1        | 0.357                            |
| 4/2        | 0.430                            |
| 4/3        | 0.286                            |
| 5/1        | 0.382                            |
| 5/2        | 0.385                            |
| 5/3        | 0.354                            |
| 6/1        | 0.452                            |
| 6/2        | 0.467                            |
| 6/3        | 0.391                            |
| 7/1        | 0.422                            |
| 7/2        | 0.487                            |
| 7/3        | 0.550                            |
| 8/1        | 0.458                            |
| 8/2        | 0.478                            |
| 8/3        | 0.471                            |
| 9/1        | 0.561                            |
| 9/2        | 0.523                            |
| 9/3        | 0.518                            |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

#### One Way Analysis of Variance

Normality Test: Failed (P = 0.0110)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

#### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

| Group        | N | Missing |
|--------------|---|---------|
| K37static    | 3 | 0       |
| K37shake     | 3 | 0       |
| L252/2static | 3 | 0       |
| L252/2shake  | 3 | 0       |

| Group        | Median | 25%    | 75%    |
|--------------|--------|--------|--------|
| K37static    | 1928.5 | 1919.4 | 1942.1 |
| K37shake     | 5102.4 | 4512.9 | 5755.3 |
| L252/2static | 465.5  | 329.5  | 490.4  |
| L252/2shake  | 3119.5 | 2978.9 | 3219.2 |

H = 10.4 with 3 degrees of freedom. (P = 0.0156)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.0156)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

| Comparison                  | Diff of Ranks | p | q    |
|-----------------------------|---------------|---|------|
| K37shake vs L252/2static    | 27.00         | 4 | 4.32 |
| K37shake vs K37static       | 18.00         | 3 | 3.79 |
| K37shake vs L252/2shake     | 9.00          | 2 | 2.78 |
| L252/2shake vs L252/2static | 18.00         | 3 | 3.79 |
| L252/2shake vs K37static    | 9.00          | 2 | 2.78 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

K37static vs L252/2static      9.00                      2                      2.78

Comparison     $P < 0.05$

K37shake vs L252/2static      Yes

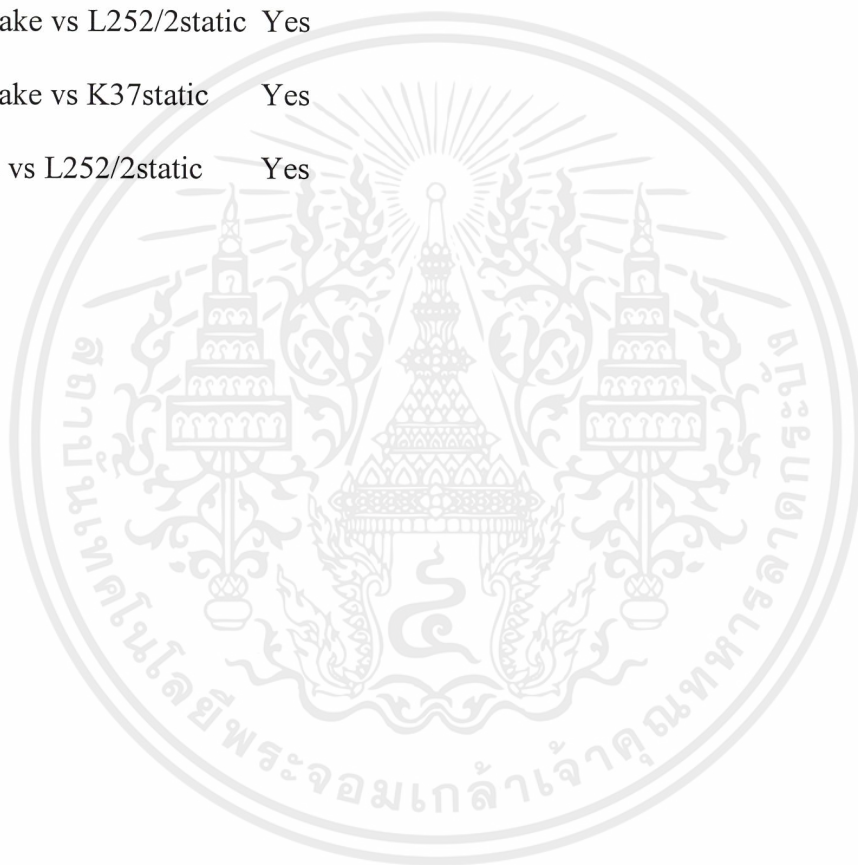
K37shake vs K37static            Yes

K37shake vs L252/2shake      Yes

L252/2shake vs L252/2static    Yes

L252/2shake vs K37static        Yes

K37static vs L252/2static        Yes



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## One Way Analysis of Variance

Normality Test: Passed (P = 0.0502)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.1688)

| Group | N | Missing |
|-------|---|---------|
| pH3   | 3 | 0       |
| pH4   | 3 | 0       |
| pH5   | 3 | 0       |
| pH6   | 3 | 0       |
| pH7   | 3 | 0       |
| pH8   | 3 | 0       |
| pH9   | 3 | 0       |

| Group | Mean   | Std Dev | SEM  |
|-------|--------|---------|------|
| pH3   | 5868.1 | 157.3   | 90.8 |
| pH4   | 6795.1 | 134.6   | 77.7 |
| pH5   | 5457.0 | 50.3    | 29.1 |
| pH6   | 5178.9 | 62.0    | 35.8 |
| pH7   | 3635.3 | 61.2    | 35.3 |
| pH8   | 3609.1 | 45.6    | 26.4 |
| pH9   | 3873.1 | 59.6    | 34.4 |

Power of performed test with alpha = 0.0500: 1.0000

| Source of Variance | DF | SS         | MS        |
|--------------------|----|------------|-----------|
| Between Treatments | 6  | 27704876.1 | 4617479.4 |
| Residual           | 14 | 117289.3   | 8377.8    |
| Total              | 20 | 27822165.5 |           |

| Source of Variance | F     | P       |
|--------------------|-------|---------|
| Between Treatments | 551.2 | <0.0001 |
| Residual           |       |         |
| Total              |       |         |

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 8.46E-016).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

| Comparison | Diff of Means | p | q      |
|------------|---------------|---|--------|
| pH4 vs pH8 | 3186.0        | 7 | 60.289 |
| pH4 vs pH7 | 3159.8        | 6 | 59.793 |
| pH4 vs pH9 | 2922.0        | 5 | 55.293 |
| pH4 vs pH6 | 1616.2        | 4 | 30.583 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

|            |        |   |        |
|------------|--------|---|--------|
| pH4 vs pH5 | 1338.1 | 3 | 25.320 |
| pH4 vs pH3 | 927.0  | 2 | 17.541 |
| pH3 vs pH8 | 2259.0 | 6 | 42.747 |
| pH3 vs pH7 | 2232.8 | 5 | 42.252 |
| pH3 vs pH9 | 1995.0 | 4 | 37.752 |
| pH3 vs pH6 | 689.2  | 3 | 13.042 |
| pH3 vs pH5 | 411.1  | 2 | 7.779  |
| pH5 vs pH8 | 1847.9 | 5 | 34.968 |
| pH5 vs pH7 | 1821.7 | 4 | 34.472 |
| pH5 vs pH9 | 1583.9 | 3 | 29.973 |
| pH5 vs pH6 | 278.1  | 2 | 5.262  |
| pH6 vs pH8 | 1569.8 | 4 | 29.706 |
| pH6 vs pH7 | 1543.6 | 3 | 29.210 |
| pH6 vs pH9 | 1305.8 | 2 | 24.710 |
| pH9 vs pH8 | 264.0  | 3 | 4.996  |
| pH9 vs pH7 | 237.8  | 2 | 4.500  |
| pH7 vs pH8 | 26.2   | 2 | 0.496  |

|            |        |
|------------|--------|
| Comparison | P<0.05 |
| pH4 vs pH8 | Yes    |
| pH4 vs pH7 | Yes    |
| pH4 vs pH9 | Yes    |
| pH4 vs pH6 | Yes    |
| pH4 vs pH5 | Yes    |
| pH4 vs pH3 | Yes    |
| pH3 vs pH8 | Yes    |
| pH3 vs pH7 | Yes    |
| pH3 vs pH9 | Yes    |
| pH3 vs pH6 | Yes    |
| pH3 vs pH5 | Yes    |
| pH5 vs pH8 | Yes    |
| pH5 vs pH7 | Yes    |
| pH5 vs pH9 | Yes    |
| pH5 vs pH6 | Yes    |
| pH6 vs pH8 | Yes    |
| pH6 vs pH7 | Yes    |
| pH6 vs pH9 | Yes    |
| pH9 vs pH8 | Yes    |
| pH9 vs pH7 | Yes    |
| pH7 vs pH8 | No     |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## One Way Analysis of Variance

Normality Test: Passed (P = 0.6088)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.1032)

| Group    | N | Missing |
|----------|---|---------|
| 15oC     | 3 | 0       |
| 30oC     | 3 | 0       |
| 45oC     | 3 | 0       |
| roomtemp | 3 | 0       |

| Group    | Mean   | Std Dev | SEM  |
|----------|--------|---------|------|
| 15oC     | 661.4  | 24.5    | 14.2 |
| 30oC     | 6831.4 | 67.3    | 38.9 |
| 45oC     | 3345.2 | 122.2   | 70.5 |
| roomtemp | 6795.1 | 134.6   | 77.7 |

Power of performed test with alpha = 0.0500: 1.0000

| Source of Variance | DF | SS         | MS         |
|--------------------|----|------------|------------|
| Between Treatments | 3  | 80213249.3 | 26737749.8 |
| Residual           | 8  | 76370.7    | 9546.3     |
| Total              | 11 | 80289620.0 |            |

| Source of Variance | F      | P       |
|--------------------|--------|---------|
| Between Treatments | 2800.8 | <0.0001 |
| Residual           |        |         |
| Total              |        |         |

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 2.01E-012).

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

| Comparison       | Diff of Means | p | q       |
|------------------|---------------|---|---------|
| 30oC vs 15oC     | 6170.0        | 4 | 109.377 |
| 30oC vs 45oC     | 3486.2        | 3 | 61.801  |
| 30oC vs roomtemp | 36.3          | 2 | 0.643   |
| roomtemp vs 15oC | 6133.7        | 3 | 108.734 |
| roomtemp vs 45oC | 3449.9        | 2 | 61.158  |
| 45oC vs 15oC     | 2683.8        | 2 | 47.576  |

| Comparison   | P<0.05 |
|--------------|--------|
| 30oC vs 15oC | Yes    |
| 30oC vs 45oC | Yes    |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

|                  |     |
|------------------|-----|
| 30oC vs roomtemp | No  |
| roomtemp vs 15oC | Yes |
| roomtemp vs 45oC | Yes |
| 45oC vs 15oC     | Yes |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้