สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การะเหนี่ยวนำและ การคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูง

นายณัฐพล ทรัพย์เกิด
นายธนวัช สุจริตวรกุล

วศ.
จ6342 ก
2547

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 61824
วัน,เดือน,ปี 21 ก.ค. 2549

b 11603582
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Induction and Selection of Mutants of *Aspergillus fumigatus* for Enchancing Thermotorelant Xylanase Production

Mr.Nattapol Sapkoet

Mr.Thanawat Sutjaritvarakul

A Special Project Submitted in Fulfillment of Requirement

For the degree of Bachelor of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การเหนี่ยวนำ และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูง

โดย นายณัฐพล ทรัพย์เกิด รหัส 44050170

นายธนวัช สุจริตวรกุล รหัส 44050176

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ			ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.ดร.พรรณี	ฐิตาภิชัต	
กรรมการ	รศ.สุขใจ	ชูจันทร์	
กรรมการ	ผศ.อารี	ฤทธิบูรณ์	

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง	การเหนี่ยวนำและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูง
นักศึกษา	นายณัฐพล ทรัพย์เกิด รหัสนักศึกษา 44050170
	นายธนวัช สุจริตวรกุล รหัสนักศึกษา 44050176
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2547
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	-

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกและการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ที่ทนอุณหภูมิสูงได้มากขึ้น ตัวเหนี่ยวนำที่ใช้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์คือ *N*-nitroso-*N*-methylurea (NMU) ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมงร่วมกับการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ในการคัดเลือกจะเริ่มต้นที่การศึกษาระยะเวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลตและอัตราการเจือจางสปอร์ที่ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ร้อยละ 1-5 โดยมีจำนวนสปอร์เริ่มต้นประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือระยะเวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเท่ากับ 2 นาที และทำการเจือจางสปอร์ให้มีความเข้มข้น 10^{-2} สปอร์ต่อมิลลิลิตรและบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากการทดลองสามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้ 52 สายพันธุ์ เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพ การวิเคราะห์เชิงปริมาณทำโดยการนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน มาทดสอบการย่อยไซแลนของเอนไซม์ ไซลาเนสในอาหารแข็งที่มีไซแลนร้อยละ 1 โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส จากการทดลองได้สายพันธุ์กลาย 14 สายพันธุ์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) จากนั้นนำสายพันธุ์กลายทั้ง 14 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ดั้งเดิมมาทำการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เพื่อวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ผลจากการวิจัยพบว่ามี 11 สายพันธุ์กลายที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Selection and Induction of Mutants of *Aspergillus fumigatus* for Enhancing Thermotorelant Xylanase Production		
Name of Students	Mr. Nattapol	Sapkoet	44050170
	Mr. Thanawat	Sutjaritvarakul	44050176
Special Project Advisor	Assist. Prof.Aree	Littiboon	
Special Project Co-advisor	-		
Department	Applied Biology		
Academic	2004		

Abstract

In selection and induction of mutants of *Aspergillus fumigatus* for enhancing thermotorelant xylanase production, 1000 μg/ml of *N*-nitroso-*N*-methylurea (NMU) was added to the spores for 1 hour before exposed to ultraviolet. The first selection study was to find out the UV exposure time and the rate of spore dilution in order to get 1-5% survival while the initial concentration of the spores was 10^6 spores/ml. It was found that 2 min exposure and 10^{-2} spore dilution at 50°C incubation gave the required result. Fifty-two mutants were selected for quantitative and qualitative determination by measuring clear zones of enzyme degradation in a agar medium containing 1% xylan as carbon source. The results were that 14 mutants had bigger clear zones than those of the wild type. When evaluation of xylanase activity by using dinitrosalicylic acid was performed, 11 out the 14 mutants gave higher xylanase activity than the wild type.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกะรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้ถูกจัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ และเสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยบุคคลที่ให้ความช่วยเหลือและ สนับสนุนหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาและกรรมการโครงงานพิเศษที่ให้โอกาสและความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง ในการให้คำปรึกษาระหว่างทำโครงงานพิเศษ ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต ประธานกรรมการและ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ กรรมการโครงงานพิเศษ ที่ให้ความช่วยในด้านคำปรึกษาและข้อมูลในการนำเสนอโครงงานพิเศษ

สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ เพื่อนๆ และน้องๆทุกคนที่ให้การสนับสนุนและเป็นส่วนหนึ่งให้ความสำเร็จของโครงงานพิเศษนี้

นายณัฐพล ทรัพย์เกิด
นายธนวัช สุจริตวรกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	39
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์การทดลอง	41
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	49
เอกสารอ้างอิง	
ภาคผนวก	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงความสามารถในการหมักของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆโดยการผ่าน xylanolytic enzyme system	9
ตารางที่ 2	แสดงอิทธิพลของตัวลดแรงตึงผิวและกรดไขมันที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เบตาไซโลซิเดส	27
ตารางที่ 3	สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆเพื่อสร้างเอนไซม์ไซลาเนส	29
ตารางที่ 4	ขั้นตอนการฟอกกระดาษ	32
ตารางที่ 5	การแปรสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรมโดยกรรมวิธีต่างๆ	36
ตารางที่ 6	แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ที่ผ่านการทรีตด้วย NMU ร่วมกับการฉายแสงอัลตราไวโอเลต	41
ตารางที่ 7	แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 52 สายพันธุ์	43
ตารางที่ 8	แสดงผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์	47
ตารางภาคผนวกที่ 1	วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอัตราส่วนของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์กลายต่างๆเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	โครงสร้างของไซแลน	4
รูปที่ 2	ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในเนื้อไม้อ่อน	4
รูปที่ 3	ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในเนื้อไม้แข็ง	5
รูปที่ 4	โครงสร้างของไซแลนที่ได้จากพืชและแสดงบริเวณที่เข้าจับของเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมใน xylanolytic enzyme system โดยจุลินทรีย์	7
รูปที่ 5	แสดงลักษณะการย่อยสลายไซแลนโดย *Cryptococcus albidus*	8
รูปที่ 6	แสดงโครงสร้างของพืชที่มีส่วนประกอบหลักเป็นเซลลูโลส(cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellose) และลิกนิน(lignin)	10
รูปที่ 7	Birchwood ที่นำมาใช้ในการผลิตไซแลน	11
รูปที่ 8	แสดงลักษณะเชื้อ *Aspergillus* sp.	14
รูปที่ 9	แสดงภาพ *Aspergillus fumigatus*	15
รูปที่ 10	แสดงขั้นตอนโดยรวมของการเกิดมิวเตชั่น	16
รูปที่ 11	แสดงการเกิดไทมีน ไดเมอร์	22
รูปที่ 12	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* โดยผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้ NMU ร่วมกับการฉายแสงอัลตราไวโอเลต	42
รูปที่ 13	ตัวอย่างลักษณะวงใสรอบโคโลนี	46
รูปภาคผนวกที่ 1	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

จากการศึกษาพบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ โดยเอนไซม์ไซลาเนสสามารถฟอกสีกระดาษ จึงเป็นประโยชน์ต่อโรงงานอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ โดยทั่วไปแล้วโรงงานผลิตกระดาษจะใช้สารเคมีในการฟอกกระดาษเช่น คลอรีน เนื่องจากคลอรีนมีราคาถูก แต่มีผลกระทบต่อร่างกายและเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม จึงนำวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการฟอกสีและนำเอนไซม์ไซลาเนสมาใช้แทนสารเคมีได้ในบางส่วน ทำให้ความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมมีน้อยลง

ดังนั้นโครงงานนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อเพิ่มประมาณเอนไซม์ไซลาเนส โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ที่แยกได้จากดินในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย และสามารถเจริญที่อุณหภูมิสูง (45 องศาเซลเซียส) (เรวดี ปรีบัว, 2547) และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูงได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type)

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อ *Aspergillus fumigatus* โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตและการใช้สารเคมีร่วมกัน
2. เพื่อศึกษาความสามารถของการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูงของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ของสายพันธุ์กลาย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์แท้
3. เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Aspergillus fumigatus*

1.3 ขอบเขตโครงงานพิเศษ

1. เหนี่ยวนำให้เชื้อ *Aspergillus fumigatus* เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีร่วมกับการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (UV)
2. คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีความคงตัวและมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูงได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารแข็งและอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงกว่าสายพันธุ์กลาย
2. ได้เชื้อสายพันธุ์กลายทนร้อน ที่มีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้งานได้ดีขึ้น
3. เป็นแนวทางในการวิจัยขั้นสูงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ไซแลน (xylan) เป็นส่วนประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในเซลล์พืช โดยยึดเกาะกับโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่น ด้วยพันธะนัน-โควาเลนท์ (non- covalent) และพันธะไฮโดรเจนกับส่วนของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสพบได้ตามธรรมชาติทั้งไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน รวมทั้งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด รำข้าว เป็นต้น นอกจากนั้นยังพบได้จากอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ (Biely, 1985) ปริมาณ และโครงสร้างจะแตกต่างกันจากแหล่งที่มาเช่น ในไม้เนื้อแข็งพบว่ามีไซแลนมากกว่าร้อยละ 30 ของน้ำหนักแห้ง ในไม้เนื้ออ่อนพบว่ามีไซแลนมากกว่าร้อยละ 80 ของน้ำหนักแห้ง ในไม้ล้มลุกและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรพบว่ามีไซแลนเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 20-40 ของน้ำหนักแห้ง

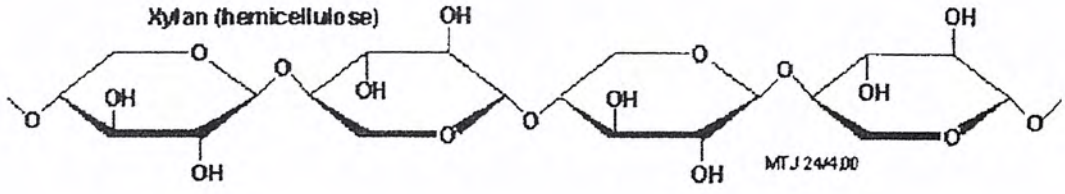
วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรประกอบด้วยพลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิดคือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส(hemicellose) และลิกนิน(lignin) โดยเซลลูโลส(cellulose) เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อด้วยพันธะบีตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4-glucosidic) ที่เป็นสายตรง (linear polymer) มีสูตรทั่วไปคือ (CHO) พบในปริมาณร้อยละ 30-50 ของน้ำหนักแห้ง เฮมิเซลลูโลส (hemicellose) เป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตสและน้ำตาลเฮกโซสได้แก่ กลูแคน (glucan) แมนแนน (mannan) และไซแลน (xylan) โดยมีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทพอลีฟีโนลิก (polyphinolic) เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ มักห่อหุ้มชั้นเซลลูโลสไว้ (Wong and Saddler และคณะ.,1988)

1. ไซแลน

1.1 โครงสร้าง และลักษณะของไซแลน

ไซแลนเป็นพอลิแซคคาไรด์ของน้ำตาลดี– ไซโลส (D-xylose) ที่เป็นส่วนประกอบทั้งในไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลซิดิก (β-1,4-xylosidic) เป็นสายหลัก (backbone) และมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นหรือโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆมาเชื่อมโยงเป็นสายโซ่กิ่งยกเว้นไซแลนในพืชบางชนิด เช่น หญ้าเอสปาโต (esparto grass) ลำต้นของใบยาสูบ (tobacco stalk) จะมีโครงสร้างที่ไม่มีโซ่กิ่งของไซแลนอาจประกอบด้วยหมู่อะราบิโนซิล (arabinosyl) กลูคูโรนิล(glucuronyl) หรือ อะเซททิล (acetyl) โครงสร้างของไซแลนแสดงในรูปที่ 1

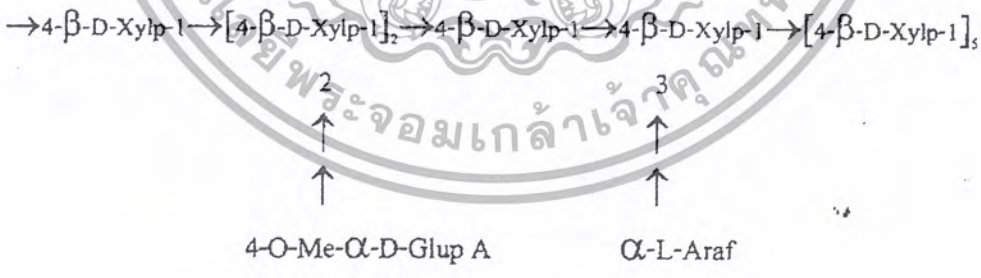
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 โครงสร้างของไซแลน

ที่มา: www.biosite.dk/(2000)

ไซแลนที่พบในส่วนเฮมิเซลลูโลสของไม้เนื้ออ่อนส่วนใหญ่จะเป็นอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (arabinoglucuronoxylan) มีสายหลักเป็นบีตา-1,4-ดี-ไซโลไพราโนซิล (β-1,4-D-xylopyranosyl) ที่มี 4-โอ-เมทธิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด (4-O-methyl-α-D-glucuronic acid) เชื่อมต่อที่ O ตำแหน่งที่ 2 และมีแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนส (α-L-arabinofuranose) เชื่อมต่อที่ O ตำแหน่งที่ 3 ดังแสดงในรูปที่ 2 จำนวนหน่วยไซโลสที่มาเชื่อมต่อกัน (degree of polymerization) อยู่ในช่วง 70-130 หน่วย



รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน

ที่มา: Biely (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซแลนที่พบในส่วนเฮมิเซลลูโลสของไม้เนื้อแข็งส่วนใหญ่มักเป็นกลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) มีสายหลักที่ประกอบด้วย บีตา-ดี-ไซโลไพราโนส(β-D-xylopyranose)เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ บีตา-1,4-ไซโลซิดิก และมีหมู่อะเซททิล (acetyl) เป็นสายโซ่กิ่งทุกๆ 7-10 หน่วย ของสายหลักที่ตำแหน่ง โอ-2 หรือ โอ-3 ส่วน โอ-4-เมทธิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด (4-O-methyl-α-D-glucuronic) เชื่อมต่อด้วยพันธะ บีตา-1,2 ประมาณทุกๆ10 หน่วยของไซแลน ดังแสดงในรูปที่ 3 จำนวนที่มาต่อกันอยู่ในช่วง 150-200 หน่วย

รูปที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง
ที่มา: Biely (1985)

เนื่องจากองค์ประกอบหลักของไซแลนคือน้ำตาลดี-ไซโลส(D-xylose) เป็นสารให้รสหวาน สามารถเรียกอีกอย่างว่า wood sugar ที่มีสูตรทางเคมี CHO มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 150.13 มักไม่พบในรูปของมอนอเมอร์ (monomer) มีจุดหลอมเหลวที่ 144-145 องศาเซลเซียส สามารถนำน้ำตาลชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายเช่น ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ผลิตเชื้อเพลิงเช่น เอทธานอล บิวธานอลและไซลิทอล เป็นต้น (Biely ,1985)

1.2 การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถย่อยสลายโดยการใช้สารเคมี (chemical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์(enzyme hydrolysis) หรือการใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน

1.2.1 การย่อยสลายไซแลนโดยใช้สารเคมี สามารถทำได้ 2 วิธีคือ

1.2.1.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด

การย่อยสลายไซแลนด้วยกรดเพื่อผลิตน้ำตาลไซโลสเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรุนแรงและไม่เฉพาะเจาะจงทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่บริสุทธิ์เกิดผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภัณฑ์ที่เป็นพิษเช่น เฟอฟูรัล ซึ่งมีผลต่อการนำไปเลี้ยงจุลินทรีย์ และยังต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนทานต่อความเป็นกรดและอุณหภูมิที่สูงได้

1.2.1.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง

การย่อยสลายไซแลนด้วยด่างมักใช้ในอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ ในขั้นตอน Kraft cooking ซึ่งจะนำชิ้นของเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นเพื่อให้เปลือกเปื่อยยุ่ย และกำจัดลิกนินที่อยู่ในชั้นลิกโนเซลลูโลสออกบางส่วน หลังจากนั้นจะนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีกระดาษ โดยใช้สารเคมีที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบเช่น คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide) ก๊าซคลอรีน (Cl_2) เป็นต้น ที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดเป็นด่างไม่ต่ำกว่า 10 (pH 10) แต่ทำให้เกิดสารพิษพวกไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบคลอไรด์ที่เป็นพิษชนิดอื่นๆอีกด้วย

1.2.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะกว่าการใช้สารเคมีในการย่อยสลายเนื่องจากสภาวะที่ใช้เป็นกลาง นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษและสารเคมีตกค้าง ทำให้สามารถนำน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปใช้ผลิตภัณฑ์อื่นๆต่อไป เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประการ เช่น ใช้ในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษ ใช้ในการลดความของอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมอาหาร (Wong and Saddler, 1988) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเบตา-1,4 ของสายหลักให้ได้น้ำตาลไซโลสมีอยู่ 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ

1. เอนโดไซลาเนส (endo-xylanase)หรือ (1,4-β-D-xylanxylanohydrolase,EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายแบบสุ่ม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่ากลไกแบบเอนโด (endo-mechanism) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นไซโลส และโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ

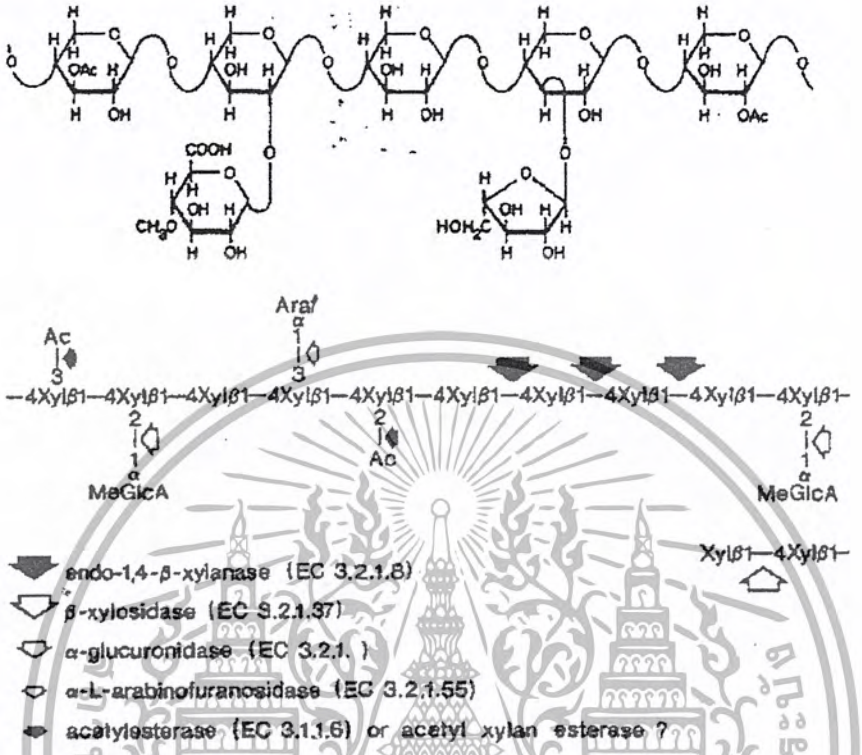
2. เบตาไซโลซิเดส (β-xylosidase) หรือ (1,4-β-D-xylan-xylohydrolase,EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้ย่อยสลายทีละ 1 หน่วย จากด้านปลายนอน-รีดิวซ์ (non-reducing end) เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่ากลไกแบบเอคโซ (exo-mechanism) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นไซโลส

นอกจากนี้การย่อยไซแลนให้สมบูรณ์ต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่นๆด้วยเช่น

- α-L-arabinosidase , E.C. 3.2.1.55
- α-D-glucuronosudase , E.C. 3.2.1.
- acetyl(xylan)esterase , E.C. 3.1.1.6

บริเวณที่เอนไซม์ที่มีส่วนร่วมใน xylanolytic enzyme system เข้าจับและทำปฏิกิริยาโดยจุลินทรีย์แสดงดังรูปที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

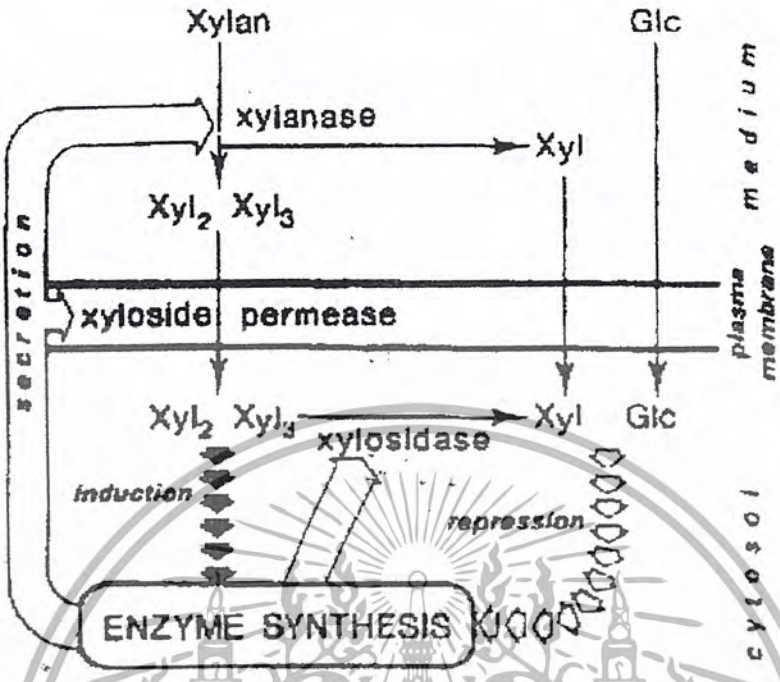


รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของไซแลนที่ได้จากพืชและ แสดงบริเวณที่เข้าจับของเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมใน xylanolytic enzyme system โดยจุลินทรีย์

ที่มา: Biely (1985)

Biely และ Petrakova (1989) ศึกษารูปแบบการย่อยสลายไซแลนด้วยไซลาเนสและเบตา-ไซโลซิเดสของยีสต์ *Cryptococcus albidus* พบว่าเชื้อจะปลดปล่อยเอนไซม์ไซลาเนสออกมาภายนอกเซลล์ย่อยไซแลนให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ จากนั้นนำโอลิโกแซคคาไรด์เข้าสู่เซลล์โดยวิธีแอคทีฟทรานสปอร์ต (active transport) จากนั้นเบตา-ไซโลซิเดสภายในเซลล์จะทำงานต่อเพื่อย่อยให้เกิดน้ำตาลไซโลส ซึ่งจุลินทรีย์จะนำไปใช้ต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่5 แสดงลักษณะการย่อยสลายไซแลนโดยเชื้อ *Cryptococcus albidus*

ที่มา: Biely (1985)

กระบวนการย่อยสลายไซแลนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆนี้ จะเรียกว่า xylanolytic enzyme system เกิดในกระบวนการหมัก โดยเกิดจากการสลายแขนงของหมู่อะเซทิล โครงสร้างของไซแลนโดยใช้เอนไซม์ในการไฮโดรไลซิส ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ endo-1,4-β-xylanase และ β-xylosidase ไฮโดรไลต์ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ไปเป็นดี-ไซโลส

1.3 กลไกการย่อยสลายลิกนิน

กลไกการย่อยสลายลิกนินคือ เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกันไป แต่โดยหลักแล้วมีวิธีการย่อยคล้ายกัน คือ เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเหมือนกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่กระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) เอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินประกอบด้วยส่วน iron porphyrin complex หรือที่เรียกว่า ฮีม (heme) เมื่อออกซิไดซ์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วเปลี่ยนเป็นสารออกซิไดซ์ซิ่ง (oxidizing agent) สามารถดึงอิเลคตรอนออกจาก phenolic ring ของลิกนินทำให้พอลิเมอร์ของลิกนินแตกตัว ซึ่งผลจะปรากฏชัดเมื่อระดับความเป็นกรดเป็นด่างเหมาะสม และมีผลต่อการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ทำให้ปริมาณของเซลลูโลสลดลง เช่นเดียวกับปริมาณลิกนิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงความสามารถในการหมักของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆโดยการผ่าน xylanolytic enzyme system

จุลินทรีย์	การหมัก	เอกสารอ้างอิง
Aureobasidium pullulans	xylose --> ethanol[a]	B
Candida shehatae	xylose --> ethanol[a]	B
Clostridium thermocellum	xylan --> ethanol, acetate, lactate	10, 41
Clostridium thermohydrosulfuricum	xylan --> ethanol	10
Clostridium thermosaccharolyticum	xylan --> ethanol	41
Cryptococcus albidus	xylan --> triglycerides	42
Fusarium oxysporum	xylose --> ethanol[a]	43
Monilia sp.	xylan --> ethanol	30
Neurospora crassa	xylan --> ethanol	44
Pichia stipitis	xylan --> ethanol	b
Thermoanaerobacter ethanolicus	xylan --> ethanol, acetate, lactate	10
Thermoanaerobium brockii	xylan --> ethanol, acetate, lactate	10

a = ยังไม่มีการวิจัยการใช้ไซแลนเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอล

b = H. Lee, P. Biely และ H. Schneider ยังไม่ได้รับการตีพิมพ์

ที่มา: Biely (1985)

1.4 แหล่งที่พบไซแลน

พบได้ทั่วไปในเซลล์พืชทุกชนิด ซึ่งโครงสร้างของเซลล์พืชจะประกอบไปด้วยส่วนประกอบหลัก 3 ส่วนได้แก่ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellose) และลิกนิน (lignin) โดยไซแลนจะเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส ดังแสดงในรูปที่ 6

ไซแลนจึงสามารถพบได้ในพืชทุกชนิด แต่ปริมาณในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามโครงสร้างของการเจริญและ สภาพแวดล้อม โดยส่วนใหญ่ใช้ไซแลนจากพืชไม่กี่ชนิด ได้แก่ ไซแลนจากโอ๊ค และไซแลนจาก Birchwood ซึ่งลักษณะลำต้นของ Birchwood แสดงดังรูปที่ 7

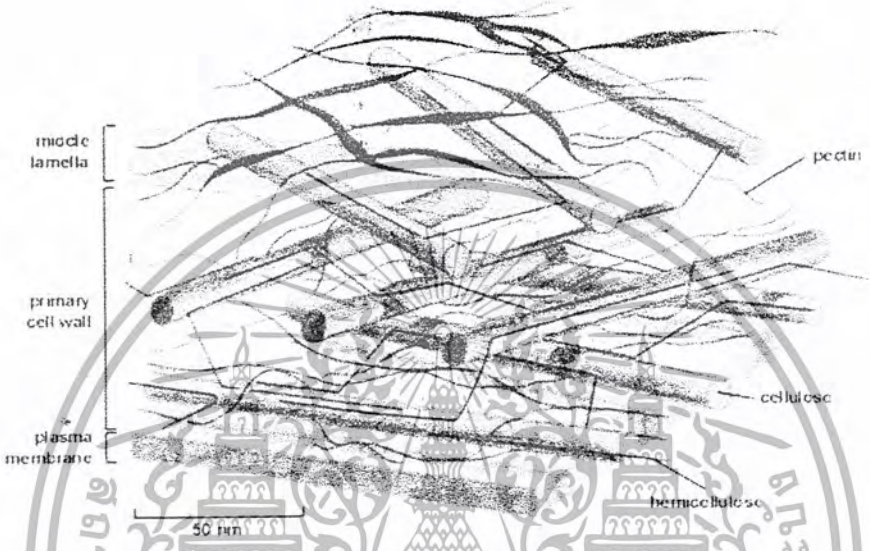
1.5 ประโยชน์ของไซแลน

1.5.1 ใช้ในกระบวนการหมักสำหรับผลิตเชื้อเพลิง เช่น เอทธานอล (Biely ,1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5.2 ใช้ในการผลิตสารเคมี เช่นสารทำละลาย กรดอินทรีย์ เป็นต้น (Biely ,1985)

1.5.3 เป็นส่วนประกอบในอาหารของคนและสัตว์ ได้แก่ อาหารเสริมโปรตีน และอาหารเสริมเส้นใย (Biely ,1985)



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของพืชที่มีส่วนประกอบหลักเป็น เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellose) และลิกนิน (lignin)

ที่มา: www.enzymes.co.uk/Basics/cell_wall.gif(2000)

2.เอนไซม์ไซลาเนส (xylanase)

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยไซแลน (xylan)ได้ เช่น *Aspergillus fumigatus* , *Aspergillus niger* ,*Humicola lanuginosa* เอนไซม์ที่สร้างจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดี เช่น นำมาย่อยสารคาร์โบไฮเดรต ที่เป็นองค์ประกอบหลักจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคสและไซโลสได้ ส่วนวัสดุหมักที่เหลือหลังจากแยกเอนไซม์ออกไปยังสามารถนำไปเป็นอาหารสัตว์ได้อีกด้วย

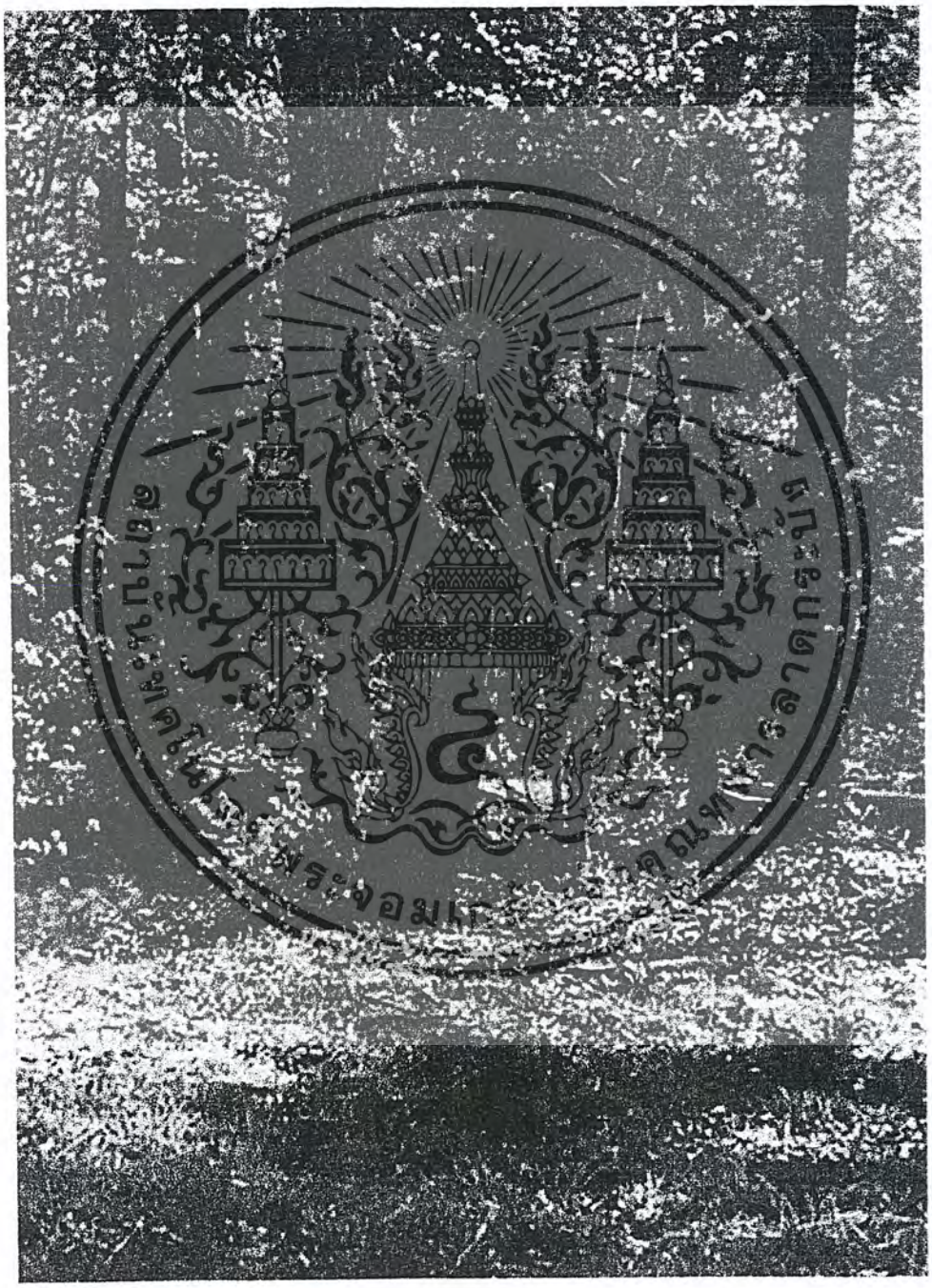
คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

1. ผลของอุณหภูมิต่อเอนไซม์

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสค่อนข้างแปรผัน โดยขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนมากสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีในช่วง 50-60 องศาเซลเซียสและช่วงอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์คือ 30-35 องศาเซลเซียส เช่น *Cellulomonas uda*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเจริญ และผลิตไซลาเนสได้ที่ 30 องศาเซลเซียส (Rapp and Wangner, 1986) แต่ก็มีตุลินทรีย์บางกลุ่มเช่น รา แอคติโนมัยซิส หรือแบคทีเรีย ที่สามารถเจริญในอุณหภูมิสูง และสามารถสร้างไซลาเนสได้ดีที่อุณหภูมิสูง และสามารถสร้างไซลาเนสได้อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส



รูปที่ 7 ต้น Birchwood ที่นำมาใช้ในการผลิตไซแลน

ที่มา: www.trailtree.com/ (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น *Diotyoglomus sp.* B1 และ *Rhodothermus marinus* สามารถเจริญและสามารถสร้างไซลาเนสได้ดีที่อุณหภูมิ 68 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Ratto,และคณะ, 1994)

Gomes และคณะ (1992) รายงานถึงระดับความเหมาะสมของอุณหภูมิต่อการผลิตไซลาเนส สูงสุดที่ 32, 34 และ 38 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

2. ผลของความเป็นกรดด่างต่อเอนไซม์

เอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีค่าความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็นกลางถึงด่าง ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน รามักเจริญได้ดีที่ความเป็นกรดด่างต่ำเช่น *Aspergillus* AANTG 19 และ *Thermoascus aurantiacus* เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4 (Smith and Wood, 1994) (Gomes และคณะ, 1994) แอคติโนมัยซิสสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง

3. เชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์

ในการใช้จุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอนไซม์จะต้องมีจุลินทรีย์ซึ่งสามารถให้เอนไซม์ตามต้องการได้ก่อน โดยจุลินทรีย์ที่ใช้มักจะมีการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ จนจัดเป็นสายพันธุ์มาตรฐาน (standard strain) โดยทั่วไปมักเป็นพวก mesophile เพราะจะได้เอนไซม์ที่สามารถทำงานที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส (เอนไซม์เหล่านี้มักไม่ทนความร้อนสูงเกินกว่า 50 องศาเซลเซียส) แต่บางครั้งพบว่าเอนไซม์ที่จะนำไปใช้ประโยชน์โดยเฉพาะทางด้านโรงงานอุตสาหกรรม จำเป็นต้องทนความร้อน และทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ จุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งเอนไซม์ดังกล่าว จึงควรเป็นพวก thermophile เช่น β-amylase จากเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* เจริญที่ 55 องศาเซลเซียส ทนความร้อนถึง 80 องศาเซลเซียส จะเห็นว่า การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบกว่าจากสิ่งมีชีวิตชั้นสูงในด้านสามารถนำไปใช้ในปฏิกิริยาที่ขึ้นกับอุณหภูมิต่างๆ นอกจากนี้ยังเจริญเร็ว วิธีการเพาะเลี้ยงไม่ยุ่งยาก และง่ายต่อการควบคุม การผลิตเอนไซม์ จึงมีแนวโน้มที่จะอาศัยจุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นความก้าวหน้าอย่างหนึ่งทาง เทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) ที่พยายามใช้สิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด เพื่อแก้ปัญหาต่าง ๆ ทั้งในด้านการผลิต การกำจัดของเสีย รวมทั้งการนำของเสียเหล่านั้นกลับมาใช้ประโยชน์อีกแต่การใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ก็มีข้อเสีย เช่น ต้องคอยระวังการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นขณะเพาะเลี้ยงหรือเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ที่อาจมีผลกระทบต่อการผลิต (Davis and Dulbecco, 1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 form-genus *Aspergillus*

การจัดหมวดหมู่ของ form-genus *Aspergillus* (วิจัย, 2546)

Division	: EUMYCOTA
Subdivision	: ASCOMYCOTINA
Class	: PLECTOMYCET
Order	: EUROTIALES
Family	: EUROTIACEAE

Class PLECTOMYCETES

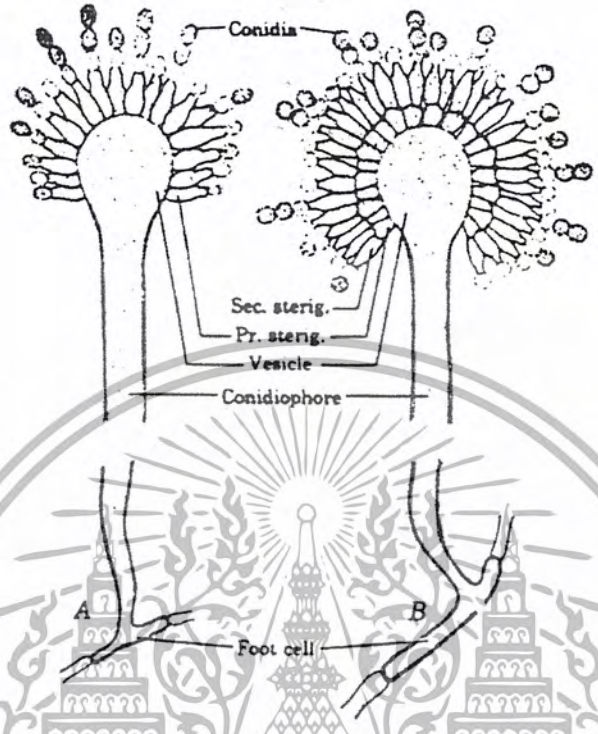
Fennell, D.I. 1973 แบ่งรา Class นี้ออกเป็น order Eurotiaceae ซึ่งเป็น saprobe ที่พบได้ทั่วไปบนเศษซากพืชและสัตว์ บาง species อาจเป็นสาเหตุของโรคพืช โรคผิวหนัง และโรคอื่นๆ ของคนและสัตว์ ส่วนบางพวกก็ผลิตสารปฏิชีวนะใช้เป็นยารักษาโรค สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิช่วงกว้าง บางชนิดทนร้อนได้ดี (thermotolerant) การสืบพันธุ์แบบใช้เพศส่วนใหญ่เป็นแบบ homotallic สามารถสร้าง ascocarp ได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับในที่นี้จะกล่าวรายละเอียดเฉพาะ form-genus *Aspergillus* เท่านั้น

ราใน form-genus *Aspergillus* มีความใกล้เคียงกับ *Penicillium* มาก conidium ที่สร้างเป็นแบบ conidiospore ก้าน conidiophore ไม่แตกแขนง มีกำเนิดมาจากเซลล์ที่มีผนังหนาของ somatic hypha เรียกว่า foot cell ส่วนปลายก้าน conidiophore โป่งเป็น vesicle ซึ่งมีรูปร่างได้หลายแบบรอบๆ vesicle เป็นที่กำเนิดของ phialide โดยตรง หรือในบาง species สร้างก้าน metula บน vesicle แล้วทำให้เกิด phialide (secondary sterigma) บน metula (primary sterigma) โครงสร้างของ *Aspergillus sp.* แสดงดังรูปที่ 8

Aspergillus sp. เป็นเชื้อที่มีถิ่นที่อยู่กว้างขวางทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อนในอากาศทุกแห่งมีโคนีเดียของเชื้อราชนิดนี้อยู่นอกจากนี้ยังพบมากบนพื้นดิน เจริญได้บนอินทรีย์วัตถุได้แทบทุกชนิด ซึ่งก่อให้เกิดทั้งผลดี และผลเสียโดยเฉพาะในเขตร้อน เชื้อ *Aspergillus* ทำให้เครื่องหนังเช่น กระเป๋า รองเท้า ตลอดจนเสื้อผ้าเสียหาย *Aspergillus fumigatus* , *A. niger* , *A. flavus* และสายพันธุ์อื่นๆทำให้เกิดโรค Aspergillosis ซึ่งมีลักษณะอาการคล้ายวัณโรค บางชนิดทำให้หูอักเสบได้ รูปลักษณะเชื้อ *A. fumigatus* แสดงดังรูปที่ 9

เนื่องจากเชื้อ *Aspergillus sp.* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด ที่มีประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมเบียร์และอุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



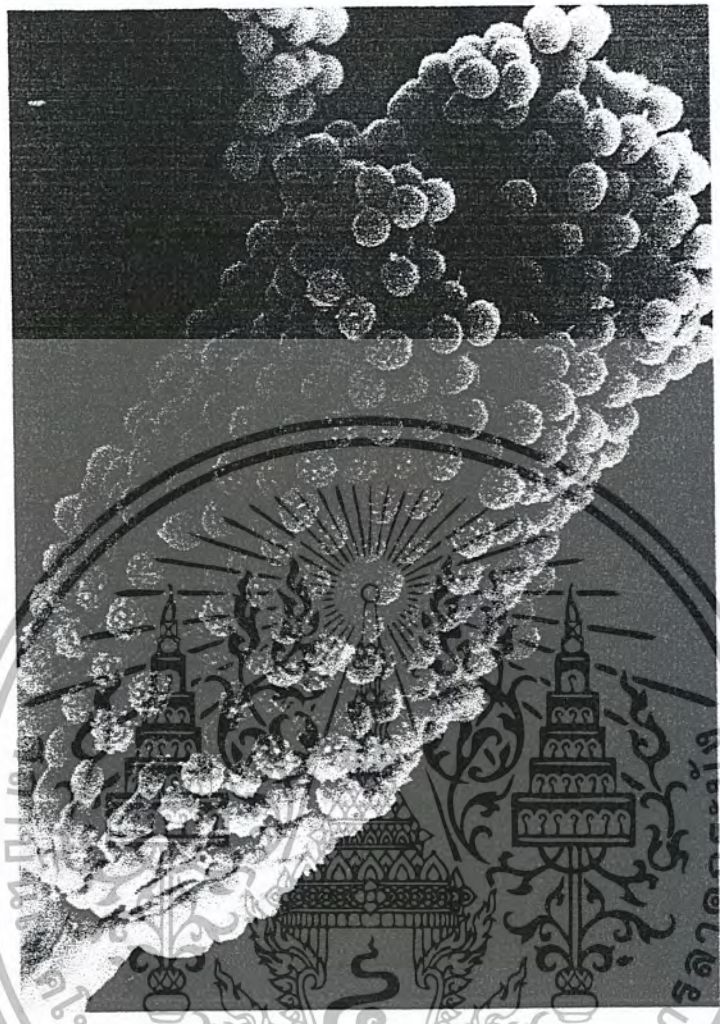
รูปที่ 8 โครงสร้างและส่วนประกอบของเชื้อ *Aspergillus* sp.
ที่มา: วิจัย ,2546

4. การทำการกลายพันธุ์

4.1 ประวัติของการศึกษาเกี่ยวกับมิวเตชั่น

มีความเชื่อว่าความแปรปรวนทั้งหลายที่เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตจนถึงกับได้พวกใหม่หรือพันธุ์ใหม่อันเรียกว่า sports นั้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทีละเล็กละน้อยแบบค่อยไปจนกระทั่งถึงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 Hugo De Vires นักพฤกษศาสตร์ชาวเนเธอร์แลนด์ได้พบความจริงซึ่งแตกต่างจากข้อเสนอของ Darwin ทั้งนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงในสิ่งมีชีวิตอาจเกิดขึ้นอย่างฉับพลันทันทีและพืชหรือสัตว์สามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ เรียกการเปลี่ยน แปลงในลักษณะนี้ว่า มิวเตชั่น ซึ่งมีขั้นตอนโดยรวมดังรูปที่ 10 คือการแสดงขั้นตอนโดยรวมของการเกิดมิวเตชั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 แสดง conidial head ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus*

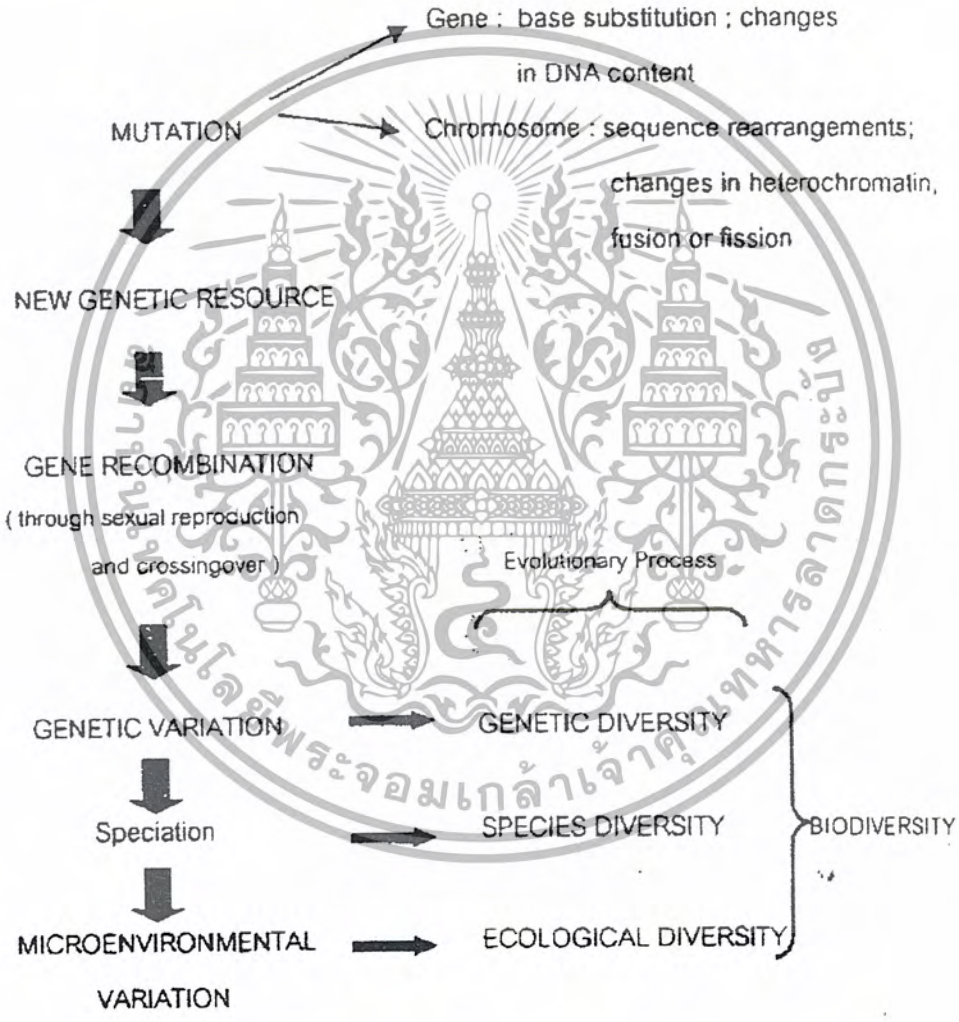
ที่มา: http://www.cqfb.fct.unl.pt/qoa/Aspergillus%20fumigatus.jpg

มิวเตชั่นคืออะไร

มิวเตชั่น หมายถึง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับหน่วยควบคุมลักษณะ เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ฉับพลันและพืชหรือสัตว์สามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงอันนี้จะรวมไปถึงการเพิ่มขึ้น หรือขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม แต่คำว่า มิวเตชั่นในปัจจุบันมักจะหมายความถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนจากสภาพหนึ่งไปยังอีกสภาพหนึ่ง ดังนั้นอาจเรียกการเปลี่ยนแปลงอันนี้ว่า "gene หรือ point mutation" ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของดีเอ็นเอ คือ นิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งเข้าไปแทนที่นิวคลีโอไทด์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง การ

เอกสารนี้เป็นกรรมสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้ามมิให้ผู้ใดนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอาจเกี่ยวข้องกับลักษณะรูปร่างทั่วไป หรือเกี่ยวกับลักษณะทางสรีระ หรือทางชีวเคมีหรือลักษณะทางพฤติกรรมของสปีชีส์ มิวเตชั่นเป็นสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิตและเป็นกลไกสำคัญอันดับแรกที่ทำให้เกิดความแตกต่างแปรผันในองค์ประกอบทางพันธุกรรม (genetic variation) อันเป็นพื้นฐานที่จะเป็นสำหรับกระบวนการ



รูปที่ 10 แสดงขั้นตอนโดยรวมของการเกิดมิวเตชั่น

ที่มา : Gerald (1973)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

4.2 ชนิดของมิวเตชั่น

ชนิดของมิวเตชั่นที่ศึกษากันมักเป็นพวกที่แสดงออกมาให้เห็นในรูปของลักษณะอย่างชัดเจน ตัวอย่างของมิวเตชั่น ได้แก่ ลักษณะตาสีขาว ปีกสั้น ปีกกุด ฯลฯ ของแมลงหวี่ ดังนั้นเราจึงเรียกมิวเตชั่นดังกล่าวว่าเป็นพวก "สังเกตได้ (visible)" ซึ่งมีอยู่ราวร้อยละ 1 ของมิวเตชั่นทั้ง หมด และไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่สิ่งมีชีวิตมากนัก แต่มิวเตชั่นส่วนใหญ่คือราวร้อยละ 80 ได้แก่พวก "แสดงผลในทางเสื่อม (detrimental)" ซึ่งไม่อาจตรวจผลได้แน่ชัด แต่เข้าใจว่ากระทบกระเทือนต่อการเจริญเติบโตของพืชและสัตว์ได้อย่างมาก ในมิวเตชั่นชนิดนี้ยีนที่เปลี่ยนไปแต่ละยีนก่อผลเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อรวมผลของทุกยีนก็จะรุนแรงขึ้น มิวเตชั่นอีกพวกหนึ่งคือพวก "ก่อผลถึงตาย (lethal)" ซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ19 ถ้าอยู่ในสภาพ homozygous มิวเตชั่นชนิดนี้จะกระทบกระเทือนต่อขบวนการทางสรีระจนพืชหรือสัตว์ไม่อาจมีชีวิตอยู่ได้

ในสิ่งมีชีวิตพวก monohaploid หรือ haploid เช่น เชื้อราที่เป็น recessive lethal จะก่อผลถึงตายในสิ่งมีชีวิตพวกนี้มียีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงอีกประเภทหนึ่งซึ่งไม่ผลถึงตาย เราเรียกยีนนี้ว่า conditional lethal ตัวอย่างเช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิดของเชื้อรา *Neurospora* อาจเปลี่ยนไปจากเดิม เราเรียกยีนที่เปลี่ยนไปนี้ว่า conditional lethal ทั้งนี้เชื้อราที่มียีนนั้นจะไม่เจริญหรือขยายพันธุ์ใน minimal medium แต่กลับเจริญตามปกติเมื่อเสริมกรดอะมิโนบางชนิดลงไปใน selective medium ซึ่งมิวเตชั่นสามารถเกิดขึ้นได้ 2 วิธี คือ

1. มิวเตชั่นที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (spontaneous mutation)

มิวเตชั่นชนิดนี้เป็นผลมาจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิที่มีอยู่ในธรรมชาติกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาทัวโทเมอริกชิฟท์ (tautomeric shift) หรือการก่อให้เกิดการแตกตัวของไอออน (ionization) ในโมเลกุลของเบสในดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสในสายพอลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (ประดิษฐ์, 2543) มิวเตชั่นที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีอัตราต่ำมากอัตราโดยเฉลี่ยประมาณ 10^{-5}-10^{-6} เซลล์ต่อรุ่นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม โดยแตกต่างกันออกไปตามตำแหน่งและชนิดของยีนและอาจแล้วแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต (ประดิษฐ์, 2543) ยีนมิวเตชั่นอาจเกิดในทางไปข้างหน้า (forward mutation : A --> a) คือ ลักษณะปกติเปลี่ยนแปลงไปเป็นลักษณะกลาย หรืออาจเกดขึ้นในทางกลับ กัน (back mutation : a --> A) คือ จากมิวแตนท์ยีนเปลี่ยนแปลงกลับไปเป็นยีนปกติตามเดิม (วิสุทธิ์,2533) อย่างไรก็ดีนับว่าเป็นมิวเตชั่นที่มีความสำคัญซึ่งก่อให้เกิดวิวัฒนาการขึ้นในสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ายีนแทบทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ เคยผ่านการเปลี่ยนแปลงโดยมิวเตชั่นมาแล้วในอดีต จากการคัดเลือกอันเข้มงวดในธรรมชาติยีนซึ่งก่อผลในทางเสื่อมก็ค่อยๆ หายไปจากหมู่ประชาการของพืชและสัตว์ เมื่อปราศจากมิวเตชั่นในธรรมชาติแล้วก็แทบจะกล่าวได้ว่าสิ่งมีชีวิตไม่อาจดำรงเผ่าพันธุ์หรือมีวิวัฒนาการมาจนถึงทุกวันนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
61824

จากการศึกษาอัตราของมิวเตชั่นของยีนต่างๆของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงของยีนไปยังสภาพอื่น และการเปลี่ยนแปลงกลับสู่สภาพเดิมมีอัตราการเกิดไม่เท่ากัน นอกจากนั้นยีนของพืชและสัตว์ชั้นสูงมีอัตรามิวเตชั่นสูงกว่ายีนของแบคทีเรียและไวรัส

2. มิวเตชั่นที่เกิดจากการกระตุ้น (induced mutation)

นอกจากจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแล้ว มิวเตชั่นก็อาจจะถูกทำให้เกิดได้โดยใช้วิธีการกระตุ้น โดยได้เริ่มใช้รังสีเอกซ์ (X-rays) เพื่อกระตุ้นให้เกิดมิวเตชั่นในแมลงหวี่ พบว่าอัตราของมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นจะสูงกว่าพวกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติถึงราว 150 เท่า ต่อมาได้พบว่ารังสีเอกซ์นี้ได้ก่อให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) โดยการใช้รังสีเอกซ์มักจะก่อผลทางเสื่อม และมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นก็คงมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม บางยีนอาจถูกทำลายก็ได้ หรือบางส่วนของโครโมโซมอาจขาดหายไป

4.3 สิ่งที่ทำให้เกิดมิวเตชั่น (mutagens)

1. สิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่ อุณหภูมิ รังสีต่างๆ

อุณหภูมิ จากการทดลองเลี้ยงแมลงหวี่ในอุณหภูมิต่างๆกัน พบว่ายีนด้อยที่ทำให้การตายบนโครโมโซม X (sex linked recessive lethal gene) ในอัตราที่แตกต่างกัน ดังนี้

อุณหภูมิ	14	องศาเซลเซียส เกิด	0.87	เปอร์เซ็นต์
อุณหภูมิ	22	องศาเซลเซียส เกิด	0.188	เปอร์เซ็นต์
อุณหภูมิ	28	องศาเซลเซียส เกิด	0.325	เปอร์เซ็นต์

รังสีและแสงเป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ สามารถแบ่งแสงและรังสีตามช่วงความยาวคลื่นออกเป็นพวกๆ ดังนี้

10^{-4}-10^{-1}	ซม.	คลื่นวิทยุ
10^{-2}-10^{-3}	ซม.	แสงอินฟาเรด (infrared)
10^{-4}	ซม.	แสงที่มองเห็น
10^{-5}-10^{-6}	ซม.	แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet)
10^{-7}-10^{-8}	ซม.	รังสีเอกซ์ (X-rays)
10^{-9}-10^{-10}	ซม.	รังสีแกมมา (gamma rays)
10^{-11}	ซม.	รังสีคอสมิค (cosmic rays)

คลื่นวิทยุ แสง และรังสี คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นขนาดต่างๆกัน คลื่นวิทยุมีช่วงคลื่นที่ยาวมาก คือมีความยาวระหว่าง 10^{-4}-10^{-1} ซม. แสงที่เรามองเห็นมีช่วงคลื่น 10 เซนติไมครอน คลื่นที่มีช่วงสั้นกว่านี้ เช่น แสงอัลตราไวโอเลต รังสีเอกซ์ จัดว่าเป็นคลื่นที่มีพลังงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูง เหตุนี้เมื่อช่วงคลื่นยิ่งสั้นลงพลังงานก็ยิ่งสูงขึ้น การที่แสงบางอย่างและรังสีมีพลังงานสูงนี่เอง ทำให้สามารถแทรกซึมวัตถุและก่อผลให้เกิดมิวเตชั่นในสิ่งมีชีวิต เราอาจแยกคลื่นไฟฟ้าและพลังงานในรูปมวล (จากสารที่อาจแผ่รังสี (radioactive isotope)) ออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ

รังสี (ionizing radiation)

รังสีคือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหรือพลังงานในรูปมวลที่มีพลังงานสูงเมื่อกระทบเป้าแล้วจะทำให้มีการผลิตไอออน (ions) และรังสีนี้จัดเป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมสูง

รังสีมีอยู่หลายชนิดด้วยกันแต่ละชนิดอาจมีแหล่งที่เกิดและแรงแทรกซึมแตกต่างกัน รังสีเหล่านี้ ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีคอสมิค รังสีแอลฟา รังสีเบตาและนิวตรอน รังสีบางชนิดในจำนวนนี้ได้จากการแผ่รังสีของธาตุที่อาจแผ่รังสีได้ (radioactive elements) เช่นรังสีแอลฟา ซึ่งประกอบด้วยโปรตอนและนิวตรอน และรังสีเบตา ซึ่งประกอบด้วยอิเลคตรอน เป็นต้น

รังสีทำให้เกิดมิวเตชั่นโดยวิธีการที่ทำให้เกิดไอออน ทั้งนี้เมื่อรังสีวิ่งไปกระทบกับอะตอมของวัตถุจะทำให้อะตอมนั้นยิงอิเลคตรอนออกไป หลังจากสูญเสียอิเลคตรอนไปแล้ว ทั้งนี้เพราะมีโปรตอนมีอิเลคตรอนอยู่ 1 หน่วยนั่นเอง ดังนั้นอิเลคตรอนที่ถูกยิงออกไปจะถูกจับไว้โดยอะตอมข้างเคียง จึงทำให้อะตอมนั้นกลายเป็นไอออนที่มีประจุลบ โดยเหตุนี้เองไอออนจึงเกิดเป็นคู่ๆเสมอ รังสีอาจก่อให้เกิดมิวเตชั่นได้หลายวิธี เช่น เมื่อไอออนนั้นอยู่ในส่วนของยีน การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดกับไอออนนั้นก็ทำให้ยีนเปลี่ยนสภาพไป ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือ รังสีอาจทำให้น้ำที่อยู่ภายในเซลล์ผลิตไอออนของไฮโดรเจน (H^+) และกลุ่มไฮดรอกซิล (OH^-) แล้ว H^+ จะรวมตัวกับออกซิเจนได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา คือ อาจทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ โปรตีน หรือโครโมโซมก็ได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับโครโมโซมก็จะทำให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซมหรือมิวเตชั่นของยีนได้

$$H_2O \longrightarrow H^+ + OH^-$$

ในที่ที่มีออกซิเจน ไฮโดรเจนอะตอมที่เกิดจากโมเลกุลของน้ำจะเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ง่าย ดังปฏิกิริยา

$$H + O_2 \longrightarrow H_2O$$

$$H_2O + H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

$$2H_2O \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

แสง (nonionizing radiation)

แสง คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีพลังงานไม่สูงพอที่จะทำให้มีการผลิตไอออนและเป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมต่ำ ทั้งนี้เพราะพลังงานที่มีอยู่นั้นค่อนข้างต่ำ ดังนั้นเราเรียกคลื่นพวกนี้ว่าแสง แสงที่อาจเกิดมิวเตชั่น ได้แก่ แสงอัลตราไวโอเลต (UV) แสงชนิดนี้มีช่วงคลื่นยาวกว่ารังสีเอกซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเนื่องจากมีพลังงานต่ำนี่เอง แสงอัลตราไวโอเลตจึงมีแรงแทรกซึมน้อย และไม่อาจแทรกซึมผ่านส่วนของร่างกายที่มีความหนาแน่นสูงๆ ดังนั้นจึงมักใช้กับส่วนเล็กๆของพืช เช่น อาจใช้กับอับละอองเกสร เป็นต้น หรือใช้กับบางส่วนของไข่แมลงหวี่และมักใช้ได้ผลดีกับเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส แสงอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในส่วนของโพลาร์แคป (pola cap) ของไข่แมลงหวี่ รังสีอัลตราไวโอเลตอาจจะทำให้โครโมโซมผิดปกติ แต่ประสิทธิภาพน้อยกว่ารังสีเอกซ์

เนื่องจากรังสีอัลตราไวโอเลตไม่ทำให้มีการผลิตไอออน ดังนั้นมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นก็เนื่องมาจากการที่เซลล์ดูดแสงเข้าไปโดยตรง ส่วนของเซลล์ที่ดูดแสงได้ดี คือ กรดนิวคลิอิกหรืออาจกล่าวลงไปให้แน่ชัดได้อีกว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเบส โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ไพริมิดีนนั่นเอง เมื่อเบสกระทบกับแสงอัลตราไวโอเลตก็จะทำให้คุณสมบัติในการจับเกาะของพันธะ (bond) เปลี่ยนไป คือ ทำให้มีการจับเกาะระหว่างเบสชนิดเดียวกัน เบสที่จับเกาะกันนี้เรียกว่าเป็น ไดเมอร์ (dimmer) การจับเกาะที่เกิดขึ้นง่ายที่สุด คือการจับเกาะระหว่างไทมีน (thymine) ซึ่งทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) (รูปที่ 11) ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนในเส้นนิวคลีโอไทด์เส้นเดียวกัน ก็จะมีการขัดขวางไม่ให้ดีเอ็นเอแบ่งตัว ถ้ามีการจับเกาะกันระหว่างไทมีนของเส้นตรงกันข้ามก็จะทำให้คุณสมบัติในการจับคู่ของไทมีนและอะดีนีน (thymine กับ adenine : T-A) เปลี่ยนไป ดังนั้นทำให้ไทมีนไปจับกับกัวนีน ซึ่งจะยังผลให้ T-A เปลี่ยนเป็น T-G ซึ่งจัดเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบทรานซิชัน (transition) ส่วนไดเมอร์ชนิดอื่นที่พบคือ ไซโตซีนไดเมอร์ (cytosine dimmer :C-C) เกิดขึ้นน้อยกว่าพวกแรก ไดเมอร์ชนิดนี้ก่อให้เกิดมิวเตชั่นโดยการที่ NH_2 ถูกขับออกไปจึงทำให้ได้ยูราซิลไดเมอร์(uracil dimer : U-U) แต่ยูราซิลจะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับไทมีน ดังนั้นจึงทำให้ C-G เปลี่ยนเป็น A-T

ผลของแสงอัลตราไวโอเลตที่มีต่อสิ่งมีชีวิตก็คือ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในโครโมโซมและยีน (gene mutation) เช่นเดียวกับการใช้รังสีเอกซ์ แต่มีรายงานว่าในขนาดการใช้ที่อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนได้เท่ากันนั้น รังสีเอกซ์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมได้มากกว่า คุณสมบัติอีกประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลตก็คือ แสงที่มีช่วงคลื่นต่างกันจะมีผลทางมิวเตชั่นไม่เท่ากัน ช่วงคลื่นที่มีผลในทางมิวเตชั่นดี คือ พวกที่ดีเอ็นเอสามารถดูดซับเอาไว้ได้มาก แสงอัลตราไวโอเลตไม่สามารถผ่านแก้วได้แต่สามารถทำลายสายตาได้ (Gerald, 1973)

ผลของมิวเตชั่นจากการให้แสงอัลตราไวโอเลตจะไม่สอดคล้องกับทฤษฎีการกระทบเป้า (target theory) ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ (dosage) และอัตรามิวเตชั่นจะไม่เป็นแบบเส้นตรง แต่จากการทดลองกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ปรากฏว่าได้กราฟเส้นโค้งหลายๆแบบ เช่นนี้แล้วก็แสดงว่ามิวเตชั่นย่อมเกิดจากการกระทบกับเป้าหมายหลายๆครั้ง ซึ่งการฉายแสงอัลตราไวโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลตเป็นวิธีการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้กับเชื้อรา (ชวนพิศ, 2536) ซึ่งความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์จะใกล้เคียงกับการแผ่รังสีอัลตราไวโอเลต ความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์สามารถคำนวณได้อัตราการอยู่รอดของจำนวนโคโลนีภายหลังการฉายแสง ถ้าให้แสงอัลตราไวโอเลตสูงขึ้นจะทำให้อัตราการกลายและอัตราการตายเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงให้อัตราการกลายพันธุ์สัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของจุลินทรีย์ภายหลังได้รับแสงอัลตราไวโอเลต (Gerald, 1973)

ผลอันน่าสนใจประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลตก็คือ การเกิด photoreactivation คือ ผลของการใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะบรรเทาลงหรือหมดไป เมื่อให้เซลล์ถูกกับแสง (visible light) และได้มีการค้นพบถึงความผิดปกติที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายของแสงอัลตราไวโอเลต กล่าวคือแสงอัลตราไวโอเลตที่มองเห็นด้วยตาเปล่าสามารถทำให้เซลล์เปลี่ยนไปจากสภาพเดิมได้ (Gerald, 1973) ปรากฏการณ์เช่นนี้ได้มีการพบในแบคทีเรียและไวรัส ทั้งนี้เกิดจากการที่มีเอนไซม์บางชนิดเข้าไปตัดให้ไทมีนในไทมีนไดเมอร์แยกออกจากกัน และทำให้ดีเอ็นเอกลับคืนสู่สภาพเดิม การซ่อมดีเอ็นเอ หรือการทำให้มิวเตชั่นเปลี่ยนกลับ โดยขบวนการที่กล่าวมานี้จะเกิดได้ดีในแสงสีน้ำเงิน อย่างไรก็ดียังมีการพบว่าใน *E. coli* นั้นอาจมีการขจัดไดเมอร์โดยวิธี dark reactivation ซึ่งหมายถึงว่าปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นโดยไม่ต้องการแสง (visible light) การขจัดแบบนี้พบว่าเกิดจากการที่มีเอนไซม์บางอย่างไปตัดไดเมอร์จากดีเอ็นเอทิ้ง แล้วจะมีนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าไปแทนที่ในส่วนนั้น

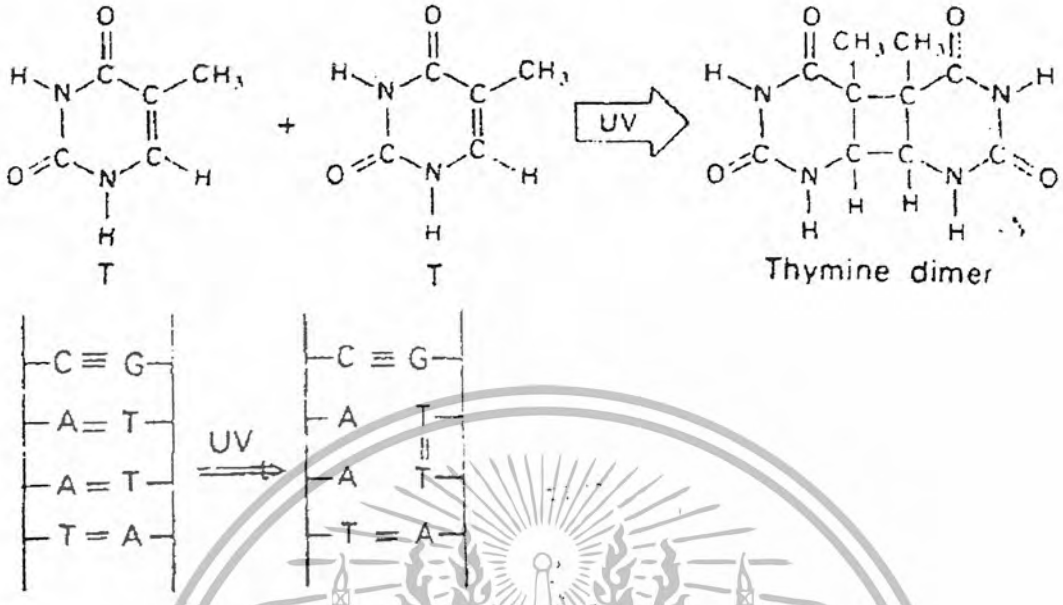
การแสดงออกของยีนที่เกิดความล่าช้า เนื่องมาจากปัจจัยต่างหลายปัจจัยมีดังต่อไปนี้

1. การกลายพันธุ์ของยีนไม่สามารถเกิดได้ทันทีหลังได้รับแสงอัลตราไวโอเลต
2. ยีนที่จะกลายพันธุ์ต้องใช้เวลามากกว่าปกติเพื่อให้เกิด metabolic activity ก่อนที่จะเกิดการกลายพันธุ์ต่อไป
3. การแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์จะเกิดขึ้นช้ากว่าปกติ

2. สิ่งก่อการกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen)

ระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามค้นคว้าเพื่อหาว่าสารเคมีชนิดใดที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชและสัตว์ จนทราบว่าสารเคมีเป็นจำนวนมากที่เป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น กรดไนตรัส (nitrous acid) ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Aspergillus* spp. มีรายงานพบว่าสารไนโตรเจน มัสตาร์ด และซัลเฟอร์มัสตาร์ด สามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ได้ ทั้งนี้สารฟอมัลดีไฮด์(formaldehyde) ไดเอธิลซัลเฟต (diethylsulfate) ไดอะโซมีเทน (diazomethane) และสารประกอบอื่นๆก็เป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และมีผลรุนแรงต่อผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีสารบางชนิดที่ก่อให้เกิดมะเร็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 แสดงการเกิดไทมีนไดเมอร์

ที่มา : Gerald (1973)

อย่างไรก็ตามสารเคมีบางชนิดอาจจะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง แต่จะไม่ผลต่อสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง สารเคมีบางชนิดอาจจะมีผลในช่วงที่มีการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตหรือมีผลเฉพาะในเพศใดเพศหนึ่งเท่านั้น เช่น สารฟอมัลดีไฮด์จะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ตัวผู้ระยะที่เป็นตัวหนอน แต่จะไม่มีผลต่อตัวเมียระยะที่เป็นตัวหนอน นอกจากนี้สารเคมีแต่ละชนิดก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีนแต่ละตำแหน่งด้วยความถี่ที่แตกต่างกัน

มีรายงานว่าสารแมงกานีสคลอไรด์ (manganese chloride) สามารถชักนำให้แบคทีเรียที่ต้องการสารอาร์จีนีน (arginine-requiring mutant) เปลี่ยนแปลงเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์แท้ได้ด้วยความถี่ 1720 x 10^{-8} และชักนำให้แบคทีเรียที่ต้องการสารฟีนิลอะลานีน (phenylalanine-requiring mutant) เปลี่ยนแปลงเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ได้ด้วยความถี่ 1.1 x 10^{-7}

4.4 การนำไปใช้

นอกจากมิวเตชั่นจะเป็นกลไกสำคัญทำให้เกิดความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมและเป็นรากฐานสำคัญของกระบวนการวิวัฒนาการแล้ว มิวเตชั่นยังเป็นปัจจัยสำคัญในการศึกษาพันธุศาสตร์และการผสมพันธุ์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สัตว์และพันธุ์พืชที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ทั้งพวกพืชสวน พืชไร่ และพวกไม้ประดับต่างๆ ซึ่งเป็นที่นิยมกันอยู่โดยทั่วไปในปัจจุบัน การชักนำให้เกิดยีนมิวเตชั่นในสัตว์ โดยเฉพาะแมลงหวี่ที่เป็นพาหะนำโรคหรือแมลงศัตรูพืชนับว่าเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์อย่างมากในการคัดเลือกพันธุ์แมลงเพื่อผลประโยชน์ทางการควบคุม หรือกำจัดแมลงพาหะ หรือแมลงศัตรูพืชนั้นๆ โดยวิธีการทางพันธุศาสตร์

การศึกษามิวเตชั่นควบคู่กับการคัดเลือกพันธุ์ในพวกจุลินทรีย์มีประโยชน์อย่างยิ่งในทางอุตสาหกรรมบางประเภทที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของพวกจุลินทรีย์ อันได้แก่การผลิตยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลิน สตรปโตไมซิน การคัดเลือกพันธุ์ไรโซเบียมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเหล่านี้ เป็นต้น จากรายงานของ Anwar และคณะ (1996) พบว่าจากการใช้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อก่อให้เกิดการกลายกลับ *Penicillium purpurogenum* สามารถต้านการยับยั้งแบบคะตะบอไลต์ (catabolite reprssion) ในกระบวนการผลิตได้และยังพบว่าสายพันธุ์กลายของ *Penicilium camebertii* สามารถผลิตกรดไซโคลเปียโซนิก (cyclopiazonic acid : CA) ได้ปริมาณมากขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์แท้ และเส้นใยของเชื้อชนิดนี้สามารถนำมาผลิตไวท์ชีส (white cheese) ได้

Singh และคณะ (1991) ได้ทำการทดลองกลายพันธุ์ *Fusarium oxysporum* เป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์ใหม่ 4 สายพันธุ์โดยเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์ *Monilia brunnea* 1362 โดยใช้ไซแลนจากผิวของมันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ 28.5 อินเตอร์เนชันแนลยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลามากกว่า 72 ชั่วโมงของการหมัก

ความเจริญก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพเพื่ออำนวยความสะดวกสบายในรูปแบบต่างๆแก่มนุษย์โดยไม่ใช้ความระมัดระวังให้ดีแล้ว จะส่งผลกระทบย้อนกลับมาให้โทษมนุษย์อย่างไม่มีทางหลีกเลี่ยง ดังจะเห็นว่าโครงการปฏิรูปปรมาณู รังสีเอกซ์ และแสงอัลตราไวโอเลตที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมและการแพทย์ เครื่องรับโทรทัศน์สี สารถั่มมันตรังสี รวมทั้งพวกสารเคมีกันบูดในอาหาร สีย้อมผ้า ใยพลาสติก เป็นต้น ซึ่งล้วนแล้วแต่ให้คุณอนันต์ แต่อาจเป็นโทษมหันต์ได้ถ้าหากใช้ไม่ถูกต้องตามหลักวิชาการ

ดังนั้นปัจจัยที่มีฤทธิ์ชักนำให้เกิดมิวเตชั่นในสิ่งมีชีวิตทั่วไป รวมทั้งในคนจึงมีบทบาทอย่างยิ่งต่อสังคมมนุษย์ทั้งในปัจจุบันและอนาคต เพราะมิวแตนท์ยีนที่เกิดขึ้นส่วนมากเป็นยีนไม่ดีและบางกรณีอาจเป็นอันตรายต่อชีวิตไม่ว่ายีนนั้นมีสมบัติเด่นหรือด้อยก็ตาม หรืออาจเป็นยีนที่เป็นต้นเหตุของโรคทางกรรมพันธุ์ต่างๆที่สามารถถ่ายทอดกระจายไปในกลุ่มยีนของมนุษย์ต่อไปอย่างไม่หยุดยั้ง อันจะเป็นภาระต่อเศรษฐกิจและสังคมของมนุษยชาติที่มีราคาแพงและหลีกเลี่ยงไม่พ้น ยิ่งไปกว่านั้นนักวิทยาศาสตร์ยังพบข้อมูลที่แสดงว่าปัจจัยต่างๆดังกล่าว นอกจากสามารถชักนำให้เกิดมิวเตชั่นได้แล้วก็ยังอาจเป็นต้นเหตุของโรคมะเร็งอีกด้วย กระนั้นก็ตามโทษที่อาจเกิดจากปัจจัยต่างๆเหล่านี้ ถ้ารุนแรงขนาดถึงแก่ชีวิตก็ยังคงไม่โหดร้ายไปกว่าตัวการที่ทำให้เกิดมิวแตนท์ยืนเลว ซึ่งอาจถ่ายทอดต่อไปในกลุ่มประชากร และสร้างปัญหาให้แก่สังคมมนุษย์ในระยะยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การผลิตเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์

5.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์

1. แหล่งคาร์บอน

Chachal (1985) เลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesei* QMYI ในอาหารเหลว โดยใช้ความเข้มข้นของฟางข้าวสาลีต่างกัน คือ ร้อยละ1.0 (เซลลูโลส ร้อยละ0.4) และ ร้อยละ5.0 (เซลลูโลส ร้อยละ2.0) พบว่ากิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดในฟางข้าวสาลี ร้อยละ1.0 เท่ากับ 1.65 ยูนิต/มิลลิลิตร ได้ผลผลิตของเซลลูเลสเท่ากับ 412 ยูนิต/กรัมเซลลูโลส และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟางข้าวเป็นร้อยละ 5.0 เวลาในการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 7 เป็น 11 วัน กิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเป็น 6.0 ยูนิต/มิลลิลิตร แต่ผลผลิตของเซลลูเลสลดลงเป็น 300 ยูนิต/กรัมเซลลูโลส ซึ่งการลดลงของผลผลิตอาจเนื่องจากการถ่ายเทมวลสารเกิดขึ้นน้อยในสารละลายที่เข้มข้นมาก

Debeau และคณะ (1987) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Chaetomium cellulolyticum* เพื่อทำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้ไซแลนร้อยละ1 เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด 15.6 อินเตอร์เนชันแนลยูนิตต่อมิลลิลิตร ภายหลังเวลา 30 ชั่วโมงของการหมัก

ส่วนการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ชักนำการสร้างเบตาไซโลซิเดสที่มีผู้ศึกษาไว้ เช่น Ghosh และ Kunda (1980) พบว่า Tamarind (Tamarindus indica) Kernel Polysaccharide (TKP) สามารถชักนำการสร้างไซโลซิเดสของ *Aspergillus terreus* เป็นอย่างดี โดยการใช้ TKP ร้อยละ2.5 ซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมเท่ากับ 2.32 ยูนิต/มิลลิลิตร ในขณะที่ใช้ไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่ากิจจกรรมเพียง 0.85 ยูนิต/มิลลิลิตร

นอกจากนี้ Smith และ Wood (1991) พบว่าสามารถใช้ ball-milled oat straw เพื่อเลี้ยง *Aspergillus awamori* AANTG43 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบตาไซโลซิเดสเท่ากับ 3.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนในประเทศไทยมีรายงานล่าสุดโดยอัญชลิดา (1999) ได้ทำการทดลองใช้ส่วนที่เหลือจากผลผลิตทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้ฟางข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีความสัมพันธ์ของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดถึงประมาณร้อยละ 100

จากรายงานที่มีผู้ได้ทำการทดลองมาก่อนเหล่านี้ทำให้ทราบว่า แหล่งคาร์บอนสามารถได้จากวัตถุดิบต่างๆ และทราบว่าในช่วงหลังการทดสอบแหล่งคาร์บอน นิยมใช้ส่วนที่เหลือจากผลผลิตทางการเกษตรซึ่งให้ผลผลิตเอนไซม์ในปริมาณค่อนข้างสูง อีกทั้งยังลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แหล่งไนโตรเจน

Joglkar และ Karanth (1984) เลี้ยง *Aspergillus funiculosum* UV-49 ในอาหารเหลว พบว่า ยูเรียและ $NaNO_3$ (ไนโตรเจน 0.5 กรัม/ลิตร) ดีกว่า $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4NO_3 และดีกว่าเคซีนและเปลือกถั่วลิสง หากเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนมากกว่า 0.5 กรัม/ลิตร พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ไนโตรเจนอนินทรีย์ ส่วนการใช้ไนโตรเจนอินทรีย์กิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 1.0-1.2 กรัม/ลิตร อย่างไรก็ตามการเพิ่มไนโตรเจนเป็นการเพิ่มต้นทุน และไนโตรเจนมากกว่า 2 กรัม/ลิตร จะเพิ่มปัญหาคือทำให้ค่าพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูง ซึ่งไม่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

Gomes และคณะ (1989) ศึกษาผลแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Gliocoadium virens* พบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ดีที่สุดคือ แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) เข้มข้นร้อยละ 0.2 อาจเนื่องมาจากมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ และถ้าความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 4.0 จะยับยั้งการผลิตเอนไซม์

3. เกลือแร่

Desrochers และคณะ (1981) ทดสอบผลของความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ที่ร้อยละ 0.13, 0.20 และ 0.27 ต่อการผลิตเอนไซม์เบตากลูโคซิเดสของเชื้อ *Schizophyllum commune* พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ ร้อยละ 0.20

Gomes และคณะ (1989) พบว่าความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ที่เพิ่มการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Gliocoadium virens* คือ ร้อยละ 1.0

4. พีเอช

พีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การหมักในระยะแรกพีเอชของการเลี้ยงเชื้อเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชเปลี่ยนแปลง อาจเกิดการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารประกอบที่เป็นด่างอื่นๆออกมา หรือมีการย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์ขึ้น เป็นผลให้ค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหาร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพีเอชอย่างช้าๆ บัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. อุณหภูมิ

ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน ในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทลงสู่อาหาร ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง จุลินทรีย์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ ดังนั้นในกระบวนการหมักต่างๆจึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างเอนไซม์ไซลาเนสส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส แต่ก็มีจุลินทรีย์บางกลุ่ม เช่น รา แอคติโนไมซิส หรือแบคทีเรียที่สามารถเจริญในที่อุณหภูมิสูงและสามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้ จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40-46 องศาเซลเซียส

6. ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยการเลือกใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจะช่วยให้ได้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ต้องการ และยังลดปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่อาจต้องสูญเสียไปอย่างไม่จำเป็น

Dubeau และคณะ(1987) ได้ทำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Chaetomium cellulolyticum* โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบ/นาที

Smith และ Wood (1991) ได้ทำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus awamori* โดยทดลองใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นตั้งแต่ 10^4-10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่าการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากกว่า 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณน้อย ส่วนการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณสูง และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

Singh และคณะ (1995) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์กลายของ *Fusarium oxysporum* เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในปริมาณมาก โดยในการทดลองใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10^5 - 10^6สปอร์/มิลลิลิตร ทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณสูงพอสมควร

อัญชลิดา (1999) ทำการศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้ส่วนเหลือทิ้งจากผลผลิตทางการเกษตรด้วยกระบวนการหมักแบบแข็งโดยเลือกปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ $1.2x10^5$สปอร์ต่อกรัมของฟางข้าวเจ้า พบว่าจะให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนส $16.8x10^4$ ยูนิต/กรัมของฟางข้าวเจ้า ภายหลังทำการบ่มเป็นเวลา 6 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. สารลดแรงตึงผิวและกรดไขมัน

สารลดแรงตึงผิวและกรดไขมันนิยมถูกเติมลงไปด้วยสารลดแรงตึงผิวและกรดไขมันเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากทั้งสารลดแรงตึงผิวและกรดไขมันสามารถช่วยเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ไซลาเนสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา ส่วนใหญ่ผู้ที่ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสก็จะมีการเติมสารทั้ง 2 ชนิด

Dubeau และคณะ (1987) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Chaetomium cellulolyticum* ได้มีการเติมทวีน 80 (Tween-80) ร้อยละ 0.05 ซึ่งเป็นตัวลดแรงตึงผิวลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนส 15.6 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิม 1.6 เท่า

Deshpande และคณะ(1987)ได้ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของกรดไขมันที่มีผลต่อ *Penicillium funiculosum* และสายพันธุ์กลาย โดยทำการทดสอบเติมกรดไขมันชนิดต่างๆลงไปร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้เอนไซม์ชนิดต่างๆในปริมาณที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังทำการเติมทวีน 80 ร้อยละ 0.1 ลงไป จะช่วยเพิ่มปริมาณเอนไซม์ชนิดต่างๆถึง 1.5-2.0 เท่า

Singh และคณะ (1995) ได้ทำการเติมสารลดแรงตึงผิวและกรดไขมันลงในอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Fusarium oxysporum* NTG-19 โดยมีการทดลองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าการเติมน้ำมันมะกอกร้อยละ 0.2 จะช่วยให้มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงถึง 53 ยูนิต/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงอิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวและกรดไขมันที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เบตาไซโลซิเดส

สารเติม	ความเข้มข้น (%)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส(ยูนิต/มิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบตาไซโลซิเดส(ยูนิต/มิลลิลิตร)
ไม่เติม	-	38.8	9.3
Tween-80	0.1	40.8	10.8
	0.2	44.2	11.5
	0.3	43.5	11.8
Olive oil	0.1	44.7	11.9
	0.2	53.0	13.4
	0.3	53.0	13.9

ที่มา : Singh และคณะ (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.การให้อากาศ

การเจริญของจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนวัตถุดิบหรือสารอาหารใดๆไปเป็นผลิตภัณฑ์ อาจเกิดขึ้นได้ในสภาพที่มีอากาศหรือไร้อากาศ ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการหมักและชนิดของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสเป็นกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศ วิธีที่จะทำให้จุลินทรีย์ได้รับอากาศเพียงพอ ทำได้โดยการให้อากาศระหว่างการหมัก ซึ่งต้องควบคุมให้พอเหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ จะมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ จำนวนรอบของการเขย่าหรือการกวน และปริมาตรของสารอาหารต่อปริมาตรของถังหมัก

9.ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างเอนไซม์ไซลาเนสนั้น พบว่าจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียจะใช้เวลาในการเจริญและสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดที่เวลาประมาณ 2-3 วัน แต่เชื้อราต้องใช้เวลาในการเจริญและสร้างเอนไซม์สูงสุดที่เวลาประมาณ 4-10 วัน

Joglekar และคณะ (1984) ได้เลี้ยง *Penicillium funiculsum* ในถังหมัก พบว่าการเจริญจะเกิดขึ้นรวดเร็วในถังหมัก และมีผลให้เกิดมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นหนาแน่นภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นตามเวลาและมีค่าสูงสุดที่ 72-96 ชั่วโมง โดยจะให้ค่าเอกโซเบตากลูโคซิเดส (exo-β-glucosidase) และเบตากลูโคซิเดส ภายใน 72 ชั่วโมงเป็น 3.26 และ 9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Gomes และคณะ (1989) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Gliocodium virens* ในฟลาส์กเพื่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้สับสเตรทเป็นฟางข้าวสาลีที่ผ่านการแปรสภาพด้วยไอน้ำ พบว่าเริ่มมีการผลิตเอนไซม์ภายใน 24 ชั่วโมงของการบ่ม การเปลี่ยนแปลงพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังการบ่ม 1 บ่ม และลดลงในวันที่ 2 และ 3 ไมซีเลียมจะเกิดการสลายตัวเอง (autolysis) ปลดปล่อยเอนไซม์ลงสู่อาหาร พีเอชเพิ่มขึ้น ระยะเวลาการปรับตัว (lag phase) ของเชื้อลดลง การใช้แอมโมเนียและการลดลงของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (ลิกโนเซลลูโลสกับไมซีเลียม) ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก และลดลงช้ามากหรือหยุดในช่วงที่มีการเจริญคงที่ และการใช้ลิกโนเซลลูโลสก็ช้าด้วย ซึ่งอาจเนื่องมาจากการมีน้ำตาลอิสระ ทำให้เกิดการยับยั้งหรือเนื่องจากการขาดสารอาหารในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ได้ค่า Fpase, beta-glucosidase และไซลาเนสเท่ากับ 0.33, 1.52 และ 30.45 ยูนิต ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงในถังหมักได้ 0.25, 0.77 และ 24.4 ยูนิต ตามลำดับ

สภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆแสดงดังตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆเพื่อสร้างเอนไซม์ไซลาเนส

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (°C)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (วัน)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus sp. AANG19	4	35	4-7	Smith and Wood, 1991b
Aspergillus fumigatus	-	40	5	Kitpreechavanich et al.,1986
Aspergillus niger	5.5	30	3	John et al., 1979
Aspergillus ochraces	6.5	30	6-14	Biswas et al.,1987
Aspergillus terreus	4.8-4.9	30	7	Ghosh and Kunda, 1980
Bacillus circulan	8.0-8.5	30	2-3	Ratto et al., 1992
Butyrivibrio fibrisolven	6.8-7.0	37	2	Sewell et al., 1988
Dictyoglomus sp. B1	7.0	68	3	Ratto et al., 1994
Celllomonas uda	7.0	30	5	Rapp and Wagner. 1986
Penicillium wortmanni	5.4	30	5	Matsuo et al., 1987
Rhodobacter marinus	7.1	65	2	Dahlberg et al., 1993
Rhoderthesmus marinus	7.1	65	1	Dahlberg et al., 1993
Streptomyces sp. T7	7.0	50	3	Ross et al., 1992
Thermoascus aurantiacus	5.0-5.5	45	8	Gomes et al., 1994
Thermoascus aurantiacus	4.0	50	-	Gomes et al., 1994
Thermomonospora fusca	8.0	50	3	Bechmann and McCarthy, 1989
Thermomonospora fusca BD25	7.0	50-55	2-4	Trigo and Ball, 1994
Thermomonospora strain LL	7.6	55	2	Ristroph and Humphreyt, 1985
Thermomyces lanufinosa	-	50	5-6	Gomes et al., 1993

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การนำเอนไซม์ไซลาเนสไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม

6.1 การผลิตกระดาษ

การผลิตกระดาษมีหลายวิธี การที่จะใช้วิธีใดขึ้นกับว่าเยื่อกระดาษที่ได้นำไปทำกระดาษชนิดใด นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ กรรมวิธีที่ใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษ แบ่งตามกรรมวิธีใหญ่ๆดังนี้

1. กรรมวิธีใช้กำลังกล (mechanical process) วิธีใช้แรงอัดอัดท่อนไม้ที่ปลอกเปลือกแล้วให้สัมผัสหินบด (grinding stone) ซึ่งผิวหน้าของหินบดมีลักษณะมีคมเช่นเดียวกับหินลับมีด ไม้จะถูกบดออกมาเป็นชิ้นเล็กๆ เครื่องจักรที่ใช้ผลิตเยื่อชนิดนี้ เรียกว่า เครื่องบด (grinder) เนื่องจากขณะที่ไม้ถูกฝนอยู่นั้น จะมีความร้อนที่เกิดจากการเสียดสี อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส จึงจำเป็นต้องพ่นน้ำให้เป็นละอองอยู่ตลอดเวลา และส่วนหนึ่งของหินบดจะหล่ออยู่ในอ่างน้ำ เยื่อที่ถูกบดออกมาจะอยู่ในอ่างนี้ และจะถูกระบายออกจากอ่างน้ำตลอดเวลา การผลิตโดยวิธีนี้ให้ผลผลิตสูงมากถึงร้อยละ 90-95 ของน้ำหนักไม้ที่เป็นวัตถุดิบ แต่คุณสมบัติของกระดาษที่ได้จากการผลิตเยื่อกระดาษวิธีนี้มีคุณภาพต่ำ จึงใช้เป็นส่วนผสมในการทำกระดาษบางประเภท จะให้คุณสมบัติด้านทึบแสง เส้นใยเดี่ยวซึ่งไม่ค่อยสมบูรณ์อาจมีการแตกขาดและยังคงมีลิกนินตกค้างอยู่มาก ทำให้พันธะระหว่างเส้นใยต่ำ ไม่เหมาะที่จะนำไปทำกระดาษที่ต้องรับแรงดึงสูง แต่มีราคาสูง เช่น กระดาษห่อกล่องใส่ของซึ่งไม่จำเป็นต้องเก็บไว้นานๆ

2. กรรมวิธีทางเคมี (chemical process) วิธีนี้ใช้สารเคมีบางชนิดละลายลิกนินที่ทำหน้าที่เป็นกาวเชื่อมเซลล์ของไม้เข้าด้วยกัน ทำให้แต่เซลล์ของไม้แยกหลุดออกจากกัน กรรมวิธีทางเคมีนี้แบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆดังนี้

2.1 กรรมวิธีซัลไฟต์ (sulphite process) กรรมวิธีนี้เกิดขึ้นครั้งแรกในยุโรป เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีนี้ เรียกว่า เยื่อกระดาษซัลไฟต์ (sulphite pulp) สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ นำมาละลายในน้ำที่มีด่างบางตัวละลายอยู่ เบสที่ใช้ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม แอมโมเนีย หรือโซเดียม ซึ่งซัลเฟอร์ไดออกไซด์ละลายอยู่ในน้ำในสภาพกรดซัลฟูริก การใช้ด่างแต่ละตัวค่าพีเอชของน้ำยาที่ได้แตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้ได้พีเอชของน้ำยาที่ต้องการ จึงจำเป็นต้องเลือกด่างที่เหมาะสม ในการย่อยกระดาษนั้นชิ้นไม้จะถูกลำเลียงลงสู่ถังย่อยพร้อมด้วยน้ำยาสำหรับย่อย จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง แล้วแต่ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ วิธีการต้มและชนิดของถังย่อย ลิกนินในไม้จะรวมกับไฮโดรเจนซัลไฟต์เกิดเป็นลิกโนซัลโฟเนทซึ่งละลายน้ำได้ จึงทำให้ไฟเบอร์ของไม้แยกหลุดออกจากกันเป็นชิ้นไม้ เมื่อถูกย่อยดีแล้วน้ำยาจะถูกระบายออกจากถังย่อยและบางครั้งยังสามารถนำกลับไปใช้ได้อีก สำหรับชิ้นไม้จะถูกระบายออกจากถังย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การร่อนเยื่อ (screening) ชิ้นไม้ที่ย่อยแล้วจะถูกล้างด้วยน้ำเพื่อเอาน้ำยาออกและกรองด้วยตะแกรงแบบต่างๆ เพื่อเอาส่วนที่เป็นตาไม้ซึ่งไม่ถูกย่อย หรือสิ่งสกปรกต่างๆออก การกรองทำหลายขั้นตอนด้วยกัน เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสกปรกเจือปนอยู่ เยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีซัลไฟต์มีสีค่อนข้างจากเกือบเป็นสีขาว สามารถนำไปทำเป็นกระดาษบางประเภทได้เลย เช่น กระดาษหนังสือพิมพ์รายวัน รายปักษ์ โดยเฉพาะเยื่อกระดาษที่ทำจากไม้ที่มียาง ได้แก่ ไม้สน สำหรับคุณสมบัติของเยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีอื่นก็คือ เมื่อนำไปทำกระดาษแล้วให้ความแข็งแรงกว่าเยื่อกระดาษที่ได้จากวิธีกล แต่ผลผลิตที่ได้ประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักไม้ที่ใช้

2.3 กรรมวิธีโซดา (soda process) เป็นกรรมวิธีทางเคมีวิธีแรกที่ค้นพบ และนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมโดยชาวอังกฤษ กรรมวิธีนี้ใช้สารเคมีที่สำคัญ คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรรมวิธีนี้ย่อยไม้เนื้อแข็งได้ดีกว่าไม้เนื้ออ่อน เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีนี้ให้ผลผลิตน้อยคือ ประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักไม้ที่ใช้ และความแข็งแรงของเยื่อเมื่อนำมาทำกระดาษค่อนข้างต่ำ ต่ำกว่าเยื่อที่ได้โดยวิธีซัลเฟต และมีสีน้ำตาลคล้ำ แต่อาจทำให้ขาวได้โดยการฟอกสี การย่อยเยื่อกระดาษจะย่อยในถัง ปริมาณสารเคมีที่ใช้คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 15-20 ต่อน้ำหนักแห้งของไม้ อุณหภูมิที่ใช้ 160-170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้และผลผลิตที่ต้องการ

กระบวนการฟอกกระดาษ

สำหรับขั้นตอนการฟอกเยื่อมีจุดประสงค์เพื่อกำจัดลิกนินออกไป ซึ่งทำให้เยื่อมีความขาวสว่างมากขึ้นโดยใช้สารเคมีทำปฏิกิริยากับลิกนินในเนื้อไม้ การฟอกสีเยื่อประกอบด้วยหลายขั้นตอน มีชื่อเรียกตามสารเคมีที่ใช้ในการฟอก และเรียงตามลำดับตัวอักษรตัวแรกของแต่ละขั้นตอนโดยสารเคมี สัญลักษณ์ และชื่อขั้นตอนการฟอกต่างๆดังตารางที่ 4

ตัวอย่างของขั้นตอนการฟอก เช่น CEH, CEDED, CEDEP, CEOP ซึ่งทางโรงงานจะเลือกวิธีการฟอก โดยพิจารณาจากชนิดของกระดาษที่ต้องการผลิต มีความจำเป็นอย่างมากในการเลือกวิธีการฟอกให้เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อคุณภาพของเยื่อ และลดต้นทุนการผลิตให้น้อยที่สุด

เยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ฟอกจะมีสีคล้ำ โดยเฉพาะเยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีซัลเฟตและโซดา การนำไปใช้จำเป็นต้องฟอกสีก่อน เว้นแต่ในกระดาษบางชนิดที่ถือว่าสีมีความสำคัญเป็นอันดับรองๆลงมา จึงไม่จำเป็นต้องฟอกสีก่อน เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีซัลไฟต์ปกติสีจะจางค่อนข้างขาว และที่ได้โดยวิธีกลเหมือนสีของไม้ที่ใช้ แต่เนื่องจากว่ามีสารที่ให้สีต่างๆปนอยู่ เช่นแทนนิน ลิกนิน เรซิน ดังนั้นเมื่อทำเป็นกระดาษแล้วเมื่อเก็บไว้นานๆ หรือถูกแสงแดดสีจะเปลี่ยนไป ซึ่งเยื่อกระดาษชนิดนี้เหมาะสำหรับใช้ทำกระดาษหนังสือพิมพ์ หนังสือคุณภาพต่ำหรือกระดาษห่อของ การฟอกสีเยื่อกระดาษมีหลักในการพิจารณาขั้นตอนใหญ่ๆ คือ ถ้าฟอกนั้นต้องเอา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิกนินและสารให้สีต่างๆออกจากกระดาษ ในกระณีนี้จะฟอกเยื่อกระดาษที่มีลิกนินปนอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ถ้าเยื่อกระดาษที่มีลิกนินเหลืออยู่มากก็ไม่เป็นการประหยัด การเอาลิกนินออกจากไม้ทำได้โดยใช้เทคนิคในการต้ม (cook) ไม้ดีกว่าการฟอก

ตารางที่ 4 ขั้นตอนการฟอกกระดาษ

สารเคมี	สัญลักษณ์	ชื่อเรียกขั้นตอนการฟอก
คลอรีน	C	ขั้นตอนคลอริเนชั่น (chlorination stage)
โซเดียมไฮดรอกไซด์	E	ขั้นแอกแทรกชั่น (extraction stage)
แคลเซียมไฮโปคลอไรด์	H	ขั้นไฮโปคลอไรด์ (hypochlorite stage)
คลอรีนไดออกไซด์	D	ขั้นคลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide stage)
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	P	ขั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide stage)
ออกซิเจน	O	ขั้นออกซิเจน (oxygen stage)
โอโซน	Z	ขั้นโอโซน (ozone stage)

การใช้ไซแลนย่อยเฮมิเซลลูโลสในการฟอกกระดาษ จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้สารเคมีในขั้นตอนการกำจัดลิกนินออกจากเยื่อกระดาษ (Viikari และคณะ., 1986) วิธีการที่ใช้เอนไซม์นี้จะทำให้ได้กระดาษที่มีค่าความขาวสว่างสูงมากขึ้น หรือลดการใช้สารเคมีในการฟอกสีและลดสารพิษที่จะตกค้างในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะสามารถลดปริมาณการใช้ก๊าซคลอรีน ซึ่งเป็นสาเหตุในการทำให้เกิดสารพิษจำพวกสารประกอบคลอรีน

Wong และคณะ (1997) ทดสอบผลของเอนไซม์ไซลาเนสในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษด้วยเปอร์ออกไซด์ โดยใช้เอนไซม์เข้าช่วยในการฟอกกระดาษจากต้นไม้ 3 ชนิดคือ Douglas-fir Westernhemlock และ Trebling Aspen โดยเพิ่มกระบวนการฟอกด้วยไซลาเนสก่อนหรือหลังการฟอกด้วยเปอรืออกไซด์ พบว่าเยื่อทุกชนิดมีค่าความขาวสว่างสูงสุด คาดว่าการใช้เอนไซม์จะมีผลส่งเสริมการฟอกเยื่อด้วยเปอร์ออกไซด์ให้ได้ผลดียิ่งขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไซลาเนสหลังเปอร์ออกไซด์ มีลิกนินและโครโมฟอร์ละลายออกจากเยื่อน้อยกว่า แต่ก็ยังได้ค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษเท่ากันหรือมากกว่าการใช้ไซลาเนสกับเปอร์ออกไซด์ เมื่อเทียบกับเยื่อที่ยังไม่ฟอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Christov และ Prior (1994) ทดสอบโดยใช้เอนไซ (crude enzyme) จาก *Aureobasidium pullusans* ในการกำจัดเพนโตซานจากเยื่อซัลไฟต์ที่ไม่ผ่านการฟอก พบว่าเมื่อมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาที่ใช้ในการฟอก จะทำให้ปริมาณเพนโตซานและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในเยื่อลดลง แสดงว่าปริมาณเฮมิเซลลูโลสในเยื่อกระดาษลดน้อยลงด้วย ในการทดสอบการใช้เอนไซม์ร่วมกับด่างในการฟอกเยื่อ จะช่วยกำจัดเพนโตซานออกจากเยื่อได้มากกว่าการใช้เอนไซม์เพียงอย่างเดียว โดยการใช้เอนไซม์ 450 ยูนิตต่อเยื่อ 1 กรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อฟอกเยื่อต่อด้วยด่าง ทำให้ประมาณเพนโตซานลดลงร้อยละ 35 ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงร้อยละ 30 การย่อยด้วยเอนไซม์จะได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นไซโลส ขณะที่กระบวนการสกัดด้วยด่างจะได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นไซโลไบโอส

การใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ มีจุดมุ่งหมายเพื่อลดการใช้พลังงานในการผลิตเยื่อกระดาษ ปรับปรุงสมบัติการให้น้ำไหลผ่านในการทำกระดาษรีไซเคิล เพิ่มความสามารถในการบดเยื่อกระดาษและปรับปรุงคุณภาพของเส้นใย การผลิตกระดาษแบบวิธีกลจะได้ปริมาณเยื่อมากแต่ยังคงเหลือลิกนินและเฮมิเซลลูโลสอยู่ในเยื่อเกือบทั้งหมด (Saddler, 1993) ได้ศึกษาบทบาทของไซแลน เพื่อปรับปรุงคุณภาพเยื่อกระดาษโดยใช้ไซลาเนสจาก *Sporotrichum dimorphosporum* ฟอกเยื่อกระดาษ จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่าเยื่อที่ผ่านไซลาเนสจะมีความยืดหยุ่นดี บ่งชี้ว่าเกิดจากมีการเปลี่ยนแปลงภายในเส้นใยของเยื่อ นอกจากนี้พบวาเยื่อกระดาษมีค่าการดูดน้ำเพิ่มขึ้น เนื่องจากเส้นใยพองตัวดี แม้ว่าการใช้เอนไซม์ในกระบวนการทำกระดาษจะไม่ให้ผลของการลดปริมาณเฮมิเซลลูโลสออกจากเยื่อมากนัก อาจลดไซแลนจากเยื่อกระดาษแอสเพนได้ประมาณร้อยละ 10-20 ขณะที่กระดาษซัลไฟต์จากไม้เนื้อแข็งอื่นๆมีการลดลงของไซแลนเพียงร้อยละ 3.5-4.0 เท่านั้น (Paice และ Jurasek, 1984) แต่การใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพก็ยังมีความสนใจในด้านการลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย และได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยจากสารเคมี

เนื่องจากโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษส่วนใหญ่ใช้คลอรีนในการฟอกสีกระดาษ เพราะมีราคาถูกแต่มีผลค้างเคียงมากมาย โดยโรงงานที่ใช้คลอรีนฟอกสีกระดาษจะถ่ายเทสารไดออกซิน (dioxin) ซึ่งไดออกซินจะไปจับกับดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตทำให้เกิดอาการปวดตามข้อ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่ทำงานตามปกติทั้งยังมีผลให้ตัวอ่อนของสัตว์เป็นโรคบวม และยังมีการวิจัยพบสารไดออกซินในน้ำนมมารดาอีกด้วย ทั้งนี้ยังมีการใช้สารประกอบคลอรีนในรูปที่สลายตัวได้ง่าย คือ สารเคมีคลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide, ClO_2) เป็นก๊าซที่มีสีเหลืองแดง ซึ่งมีผลในการฟอกสีมากกว่า 2 เท่าของคลอรีน ปัจจุบันนี้เพื่อให้ได้เยื่อกระดาษที่ขาว และมีความบริสุทธิ์มากขึ้น จึงใช้สารเคมีหลายเคมีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ คลอรีน โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไฮโปคลอไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอรีนไดออกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ขั้นตอนในการฟอกสีตลอดจนสภาวะต่างๆในการฟอกสีที่แตกต่างกันไป โดยคำนึงถึงความสะอาดของเยื่อได้ และเยื่อได้รับความเสียหายเนื่องจากการฟอกน้อยที่สุด

การผลิตเยื่อและการฟอกสีโดยกระบวนการทางเคมีนั้น ถึงแม้จะมีข้อดี คือได้เยื่อที่มีคุณภาพสูงภายในระยะเวลาสั้นๆ แต่ต้องอาศัยเงินทุนจำนวนมหาศาลในแง่ของเครื่องจักรและสารเคมี นอกจากนี้พบว่ามีสารพิษที่เกิดจากกระบวนการทั้งสองออกมามาก

นอกจากกระบวนการข้างต้น จะเห็นได้ว่าลิกนินถูกสกัดออกมาจะอยู่ในรูปของคลอโร-ลิกนิน (chlorolignin) และคลอริเนต ฟีนอล (chlorinated phenol) สารดังกล่าวจะออกมากับน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกเยื่อ และสาร chlorinated phenol และguaiacols เป็นสารที่มีพิษจากกระบวนการผลิตเยื่อเช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่น ในน้ำทิ้งที่ออกมาจากขั้นตอนแรกของวิธีการสกัดด้วยด่างจะมีสารพวกคลอรีนที่เป็นสารอินทรีย์มากมาย ซึ่งมี chlorinated phenol เป็นสารประกอบหลัก และมีความจำเป็นต้องมีการบำบัดก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งหากไม่มีการบำบัดสารประกอบดังกล่าวอาจมีความเป็นพิษต่อสิ่งชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำ และอาจก่อให้เกิดมลภาวะทางน้ำตามมาอีกด้วย ปัญหาของสีในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษก็เป็นปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งซึ่งเกิดจาก 3 กระบวนการที่แตกต่าง คือการผลิตโดยกระบวนการเคมี การฟอกสีเยื่อกระดาษและการผลิตกระดาษสี กระบวนการฟอกสีจะผลิตสีออกมาปริมาณมากกว่ากระบวนการทำเยื่อกระดาษ โดยมีผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อน้ำ คือสีจะขัดขวางการผ่านของแสงอาทิตย์ซึ่งมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำให้ลดปริมาณสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ เกิดปัญหากับกระบวนการต่างๆในอุตสาหกรรม ค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียสูง สีที่มีโลหะไอออนปน เช่น เหล็ก หรือทองแดงจะไปขัดขวางกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตในสายใยอาหาร

ตามมาตรฐานกระทรวงอุตสาหกรรมกำหนดไว้ว่า น้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงานฟอกสีต้องมีสารแขวนลอยไม่มากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าบีโอดี (BOD) ที่ 20 องศาเซลเซียส เวลา 5 วันไม่มากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และสีที่ใช้ในกระบวนการผลิตต้องมีโลหะหนักจำพวกตะกั่ว ปรอท แคดเมียม(+6) เป็นสารประกอบ หรือต้องเป็นสีที่ได้รับการรับรองตามกฎเกณฑ์ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทย หรือหน่วยงานที่รับผิดชอบของประเทศต่างๆ หรือโครงการฉลากสีเขียวของประเทศต่างๆ

จากปัญหาข้างต้นอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษดังกล่าว อาจมีแนวทางใหม่ให้เลือกอาทิเช่น แนวทางการนำเทคโนโลยีการฟอกเยื่อกระดาษด้วยวิธีทางชีวภาพเข้ามาเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการฟอกเยื่อด้วยวิธีทางเคมี นับว่าเป็นประโยชน์อย่างมากเพราะสามารถลดต้นทุนการผลิตและไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ ในสมัยก่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การนำเอนไซม์จากจุลินทรีย์มาใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษมีขอบเขตจำกัด เช่น ต้องมีการดัดแปลงแป้งดิบ อย่างไรก็ตามการประยุกต์เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษก็ยังการศึกษากันอย่างมากในปัจจุบัน

6.2 การแปรสภาพ (Pretreatment) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ในการปรับปรุงคุณค่าทางอาหารของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร มีหลายวิธีที่จะนำมาปรับปรุงเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร ปริมาณการกิน และการย่อยได้สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องแบ่งออกเป็นวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ

วิธีการแปรสภาพต่างๆ ได้แก่ การบดเป็นการทำให้อนุภาคของลิกเซลลูโลสมีขนาดเล็กลง เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวและลดปริมาณเซลลูโลสรูปผลึก วิธีทางเคมีโดยใช้ด่างหรือตัวทำละลาย (Viikari และคณะ., 1994) สกัดหรือแยกเฮมิเซลลูโลส หรือการใช้ไอน้ำอุณหภูมิ 120-180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีถึง 2 ชั่วโมง ซึ่งการแปรสภาพด้วยวิธีการให้ความร้อนนี้จะทำให้ไซแลน และไซโลสออกจากวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสละลายในน้ำเพิ่มขึ้นร้อยละ 8 แต่ภายใต้ไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและใช้เวลานานจะทำให้ไซโลสเปลี่ยนเป็นเฟอฟิวรอล (furfural) ส่วนไซแลนจะสามารถนำไปใช้เป็นสับสเตรททางเคมี ชีวเคมี หรือกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตภัณฑ์ต่างๆจากกระบวนการหมัก เช่น การใช้กระบวนการที่ใช้ความร้อนในสภาวะที่มีน้ำ (Hydrothermolysis) จะได้ของเหลวเรียกว่า ไฮโดรเสท (hydrolysate) ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส รวมทั้งส่วนของลิกนินที่ละลายได้เช่น Conifer alcohol, Syringa aldehyde, 4-hydroxybenzoic acid, Vanillin และ furfural เป็นต้น ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมากน้อยแค่ไหนขึ้นกับชนิดของพวกลิกโนเซลลูโลส ส่วนของแข็งที่เหลือจะมีเพียงเซลลูโลสและลิกนินซึ่งสามารถย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งกรรมวิธีต่างๆในการแปรสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรมแสดงดังตารางที่ 5

นอกจากการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมแล้วยังมีการใช้เอนไซม์ไซลาเนส (Wong และคณะ., 1998) ดังนี้คือ

1. กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (Bioconversion)

กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสให้เป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาล ซึ่งอาจเป็นวัตถุดิบในการหมักต่อไป

Saddler และคณะ (1985) ใช้เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำหรือตัวทำละลายจากเนื้อไม้แอสเพน (aspen) มาเป็นสับสเตรท และย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma* sp. E58 พบว่าได้น้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นน้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลักมากกว่าร้อยละ 50 โดยเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทธานอล-เบนซิน ให้ปริมาณน้ำตาลใกล้เคียงกับไซแลนทางการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 การแปรสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยกรรมวิธีต่างๆ

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

และมากกว่าการใช้เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยกรดอ่อนก่อนการใช้ไอน้ำ และการย่อยเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยกรดอ่อนก่อนการใช้ไอน้ำ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการสกัดที่ไม่ใช้กรดก่อนการใช้ไอน้ำ

Viikari และคณะ (1994) สกัดไซแลนจาก pine kraft pulp ที่สกัดด้วยโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 1.32 โมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซไนโตรเจน และทำให้เข้มข้นโดยการระเหยให้เหลือปริมาตรเพียงครึ่งหนึ่ง จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยสารละลายผสมของเอทธานอลและกรดอะซิติก แล้วล้างด้วยเอทธานอลและอีเทอร์ เมื่อทดลองใช้ไซแลนที่สกัดได้และที่สกัดได้จาก brich kraft pulp ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นสับสเตรทในการย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma reesei* C-30 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง พบว่าไซแลน (พีเอช 9.0) ย่อยไซแลนจาก brich kraft pulp ได้ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 52 ซึ่งมากกว่าค่าที่ได้จากการใช้ไซลาเนส (พีเอช 5.5) ถึง 2 เท่า โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส ส่วนการย่อยไซแลนจาก pine kraft pulp พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ที่ใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 55) สำหรับคุณสมบัติการละลายน้ำ พบว่าไซแลนจาก brich kraft pulp ละลายน้ำได้ร้อยละ 1 และไซแลนจาก pine kraft pulp ละลายได้ร้อยละ 20 เนื่องจากมี arabinose side-group ในส่วนแกนกลาง (backbone) ของไซแลนอยู่สูง และมีพอลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) ต่ำ

2. Biopulping

ในอดีตกระบวนการทำกระดาษจะใช้เชื้อราในการย่อยสลายเนื้อไม้ เพราะสามารถช่วยลดต้นทุนด้านพลังงานในกระบวนการฟอก (refining) อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ไซลาเนสจะช่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลดระยะเวลาในกาย่อยสลายเนื้อไม้ ให้ได้เยื่อไม้ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ เนื่องจากสารละลายของเนื้อเยื่อไม้มีเฮมิเซลลูโลส ซึ่งระหว่างการให้ความร้อนหรือในสภาวะที่เป็นด่างไซแลนบางส่วนละลายออกมาในลักษณะสายสั้นๆตกตะกอนอยู่บนผิวไมโครไฟบิล (microfibril) ของเซลลูโลส (Ratto และคณะ., 1994) จึงมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการฟอกเนื้อเยื่อไม้สำหรับทำเยื่อกระดาษ เพื่อลดการใช้สารเคมี เช่น คลอรีน โดยเอนไซม์จะไปย่อยไซแลนที่ตกตะกอนเหล่านั้น Christov และ Prior (1993) ใช้เอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเชื้อ *Aureobasidium pullulan* NRRL Y-2311-1 ที่มีกิจกรรม 1500 ยูนิตต่อกรัม (เตรียมสารละลายเอนไซม์ในซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.5) ย่อยสารละลายเยื่อไม้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่บ่ม และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นโดยย่อยได้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อไม้ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในช่วงเวลาต่างๆส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส

3. กระบวนการอื่นๆ

เอนไซม์ทำให้น้ำผลไม้ใส ช่วยในการย่อยอาหารสัตว์ซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าของอาหารสัตว์ มีการใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการเตรียมวัตถุดิบในการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ใช้ศึกษาคุณสมบัติของโพลีแซคคาไรด์และผนังเซลล์พืช (Wong และคณะ., 1988) และประยุกต์ใช้ในการสกัดน้ำมันปาล์ม เช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนส โดยใช้ในอัตรา 200-1000 กรัมต่อตัน ที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง เพื่อแปรสภาพเนื้อเยื่อพืชก่อนนำไปสกัดด้วยกระบวนการที่ใช้น้ำปริมาณน้อย และแยกน้ำมันด้วยการหมุนเหวี่ยงในกระบวนการขั้นต่อไป นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันและน้ำทิ้ง โดยลดปริมาณเนื้อเยื่อของพืชที่มีโมเลกุลสูง ซึ่งทำให้เกิดความหนืดหรือข้น เช่น กลูแคน เฮมิเซลลูโลส เซลลูดลส และเพคติน ทำให้การแยกน้ำมันในขั้นตอนการทำให้ใส (clarification) ดีขึ้น

งานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

Ramesh และคณะ (2000) ได้ทำการนำสายพันธุ์กลายของเชื้อ *Fusarium oxysporum* มาเลี้ยง พบว่าที่พีเอช 3.0-3.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 46.2 ยูนิต แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อนี้อยู่ที่ 55 องศาเซลเซียส

Amita และคณะ (2003) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าได้ผลผลิตเอนไซม์เท่ากับ 210 ยูนิตต่อมิลลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่เมื่อทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต จะทำให้เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alain และคณะ (1993) ได้ทำการกลายพันธุ์เชื้อ *Streptomyces lividans* เพื่อให้ทนต่ออุณหภูมิสูง พบว่าสายพันธุ์กลายที่ได้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้นานกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ มี half-life ของเอนไซม์สูงสุดโดยมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 40 นาที

Mikhailova และคณะ (1996) ได้ทำการแยกสายพันธุ์กลายของเชื้อ *Aspergillus alliaceus* NMU-1-27 จากสายพันธุ์อื่นๆ โดยวิธีการวิเคราะห์อัตราการสังเคราะห์จำเพาะของเอนไซม์ endopolygalactosidase และ exopolygalacturonases พบว่าสายพันธุ์กลายจะมีอัตราการสร้างเอนไซม์จำเพาะมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆอยู่ 2.9 และ 1.7 เท่า ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 3-4 วัน เพื่อให้เกิดสปอร์เต็มที่ จากนั้นเตรียมสารละลายสปอร์ โดยการเติมน้ำกลั่นที่มีโซเดียวคลอไรด์ ร้อยละ 0.85 และ ทวีน 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 (Singh และคณะ, 1995) กรองเส้นใยออกด้วยแผ่นกรองซินเทอร์กลาส (sinter glass) และนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี

การเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีร่วมกับแสงอัลตราไวโอเลต โดยนำสารละลายสปอร์ 10 มิลลิลิตร มาผ่านการทรีตด้วยสารเคมี *N*-Nitroso-*N*-methylurea (NMU) ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำเกลือ 2-3 ครั้งและนำไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 2 , 5, 8 และ 10 นาที เมื่อครบตามเวลา นำมาเข้าตู้มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมงการทำการทดลองในข้อ 2 จะมีชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการเหนี่ยวให้เกิดการกลายพันธุ์ 1 ชุด

3. การหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ

โดยการ spread plate เชื้อในอัตราการเจือจางที่เหมาะสม (ให้มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 100-300 โคโลนี) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดและ หาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและ คัดเลือกเชื้อที่ผ่านการทรีตด้วยสารเคมีร่วมด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดร้อยละ 1

3. การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามรถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารแข็งและอาหารเหลว

โดยการนำสารละลายสปอร์ที่ทรีตร่วมกับสารเคมีและแสงอัลตราไวโอเลต รวมทั้งชุดควบคุมปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรมาทำการ spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยเปปโตน (0.3%) ,KH_2PO_4 (0.2%) , $MgSO_4$ (0.1%) , $CaCl_2$ (0.1%) , ยีสต์สกัด (0.3%) เติมแหล่งคาร์บอนเป็นไซแลนร้อยละ 1 เติมวุ้นความเข้มข้นร้อยละ 16-18 และเติม sodium tauroglucocholate (เป็นตัวยับยั้งการเจริญของโคโลนี) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Singh และคณะ,1995) บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเกิดโคโลนี (1-2 วัน) ถ้ามีวงใสเกิดขึ้น ให้ย้ายโคโลนีลงอาหาร PDA เลี้ยงไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 3-4 วัน ให้เกิดสปอร์และ เก็บในตู้เย็น เมื่อได้สายพันธุ์กลายในปริมาณที่มากเพียงพอแล้ว จึงนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ดังนี้คือนำสายพันธุ์กลายมาเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15-20 นาที เก็บส่วนใสเพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณ(วัดวงใสรอบโคโลนี) และ เชิงคุณภาพ(ในรูปกิจกรรมของเอนไซม์) (Tang และคณะ, 1987)

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอัตราส่วนของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์กลายต่างๆเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมใช้โปรแกรม SPSS โดยวิธีของ DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด

ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ที่ผ่านการทรีตด้วย NMU ร่วมกับการฉายแสงอัลตราไวโอเลต

สายพันธุ์	ระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (นาที)	ค่าการเจือจาง (dilution)	จำนวนโคโลนี	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (%)
สายพันธุ์ดั้งเดิม[1]	-	10^{0}	UC	-
		10^{-1}	UC	-
		10^{-2}	278	-
		10^{-3}	197	-
สายพันธุ์กลาย[2]	2	10^{0}	68	-
		10^{-1}	29	-
		10^{-2}	9	3.24
	5	10^{0}	3	-
		10^{-1}	1	-
		10^{-2}	1	0.36
	8	10^{0}	0	-
		10^{-1}	0	-
		10^{-2}	0	0
	10	10^{0}	0	0
		10^{-1}	0	0
		10^{-2}	0	0

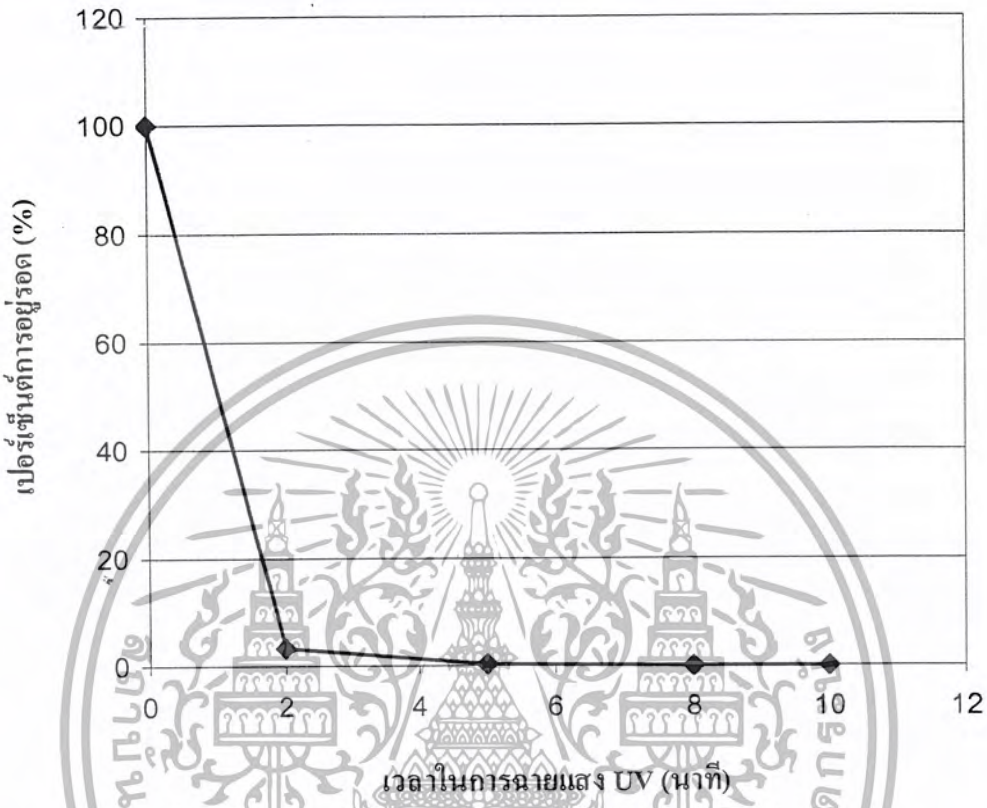
หมายเหตุ 1 = ไม่ผ่านการชักนำด้วย NMU

2 = ผ่านการชักนำด้วย NMU เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

UC = มีจำนวนโคโลนีมากจนไม่สามารถนับได้

- = ไม่สามารถคำนวณได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* โดยผ่านการชักนำให้เกิด การกลายพันธุ์โดยใช้ NMU ร่วมกับการฉายแสงอัลตราไวโอเลต

ในการเลือกระยะเวลาที่ทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลต จะเลือกระยะเวลาที่ทำให้เชื้อมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ร้อยละ 1-5 ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้จะอยู่ที่ระยะเวลาการฉายแสงที่ 2 นาที และทำการเจือจางที่ 10^{-2}

ชนัญญาและคณะ (2545) ทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus* sp. ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต พบว่าการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 12 นาทีทำให้มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 10

เมื่อทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้ว ได้ทำการเก็บโคโลนีของสายพันธุ์กลายทั้งหมด 52 โคโลนี นำไปเลี้ยงในอาหาร PDA จนเชื้อเจริญเต็มที่ จากนั้นนำแต่ละสายพันธุ์กลายไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีไซแลนร้อยละ 1 (Singh และคณะ., 1995) หลังจากนั้นทำการเก็บเชื้อนำไปปั่นเหวี่ยง เก็บเฉพาะส่วนใส (สารละลายเอนไซม์) เพื่อนำไปวิเคราะห์ขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวัดขนาดวงใส

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์มาหยอดลงในอาหารแข็งที่ประกอบด้วยไซแลนร้อยละ 1 ที่เจาะเป็นหลุม (Singh และคณะ., 1995) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย้อมสีด้วยคองโกเรด (congo red) แล้วทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (การวัดเชิงปริมาณ) ได้ดังนี้

ตารางที่ 7 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีของสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ กลาย 52 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (เซนติเมตร)
สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type)	2.62
สายพันธุ์กลายที่	
1	2.60
2	1.90
3	2.02
4	2.55
5	2.53
6	2.54
7	2.50
8	2.90
9	2.95
10	2.72
11	2.39
12	2.48
13	2.52
14	2.39
15	2.53
16	1.87
17	2.66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 (ต่อ) แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย 52 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (เซนติเมตร)
18	2.61
19	2.69
20	2.51
21	2.09
22	2.05
23	2.72
24	2.62
25	2.69
26	2.65
27	2.65
28	2.70
29	2.54
30	3.15
31	2.71
32	2.62
33	2.81
34	2.93
35	3.03
36	2.60
37	3.04
38	2.40
39	3.09
40	2.94
41	2.59
42	2.98
43	3.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 (ต่อ) แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 52 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (เซนติเมตร)
44	3.05
45	2.71
46	3.08
47	2.51
48	2.50
49	2.54
50	2.60
51	2.49
52	2.71

จากผลการทดลองการวัดขนาดวงใส พบว่าสายพันธุ์กลายที่ได้มีทั้งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ใหญ่กว่าและเล็กกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม สายพันธุ์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่าแสดงว่ามีความเข้มข้นของเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่า

ในงานวิจัยของวิธัญญาและคณะ (2546) ทำการกลายพันธุ์เชื้อ *Aspergillus fumigatus* ด้วยวิธีเดียวกันนี้และมีการศึกษาอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี พบว่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูง (ขนาดวงใสรอบโคโลนีใหญ่ ขนาดโคโลนีเล็ก) แสดงถึงว่ามีความเข้มข้นของเอนไซม์ไซลาเนสสูง

จากนั้นได้ทำการเลือกเฉพาะสายพันธุ์กลายที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร ซึ่งมีอยู่ 14 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่ 8, 9, 17, 26, 30,34, 35, 37, 39, 40, 42, 43, 44 และ 46 จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ของทั้ง 14 สายพันธุ์ ไปทำการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่13 ตัวอย่างลักษณะวงใสรอบโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ของสายพันธุ์กลายทั้ง 14 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ดั้งเดิมมาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้วิธี DNS method (Tang และคณะ., 1987) ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

สายพันธุ์	ปริมาณน้ำตาลในสารละลายเอนไซม์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เอนไซม์ย่อยได้ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	0.098	0.424	4.342^{ef}
สายพันธุ์กลายที่			
8	0.105	0.471	4.862^{cd}
9	0.106	0.415	4.116^{f}
17	0.100	0.488	5.169^{bc}
26	0.102	0.450	4.636^{de}
30	0.086	0.450	4.849^{cd}
34	0.104	0.449	4.596^{de}
35	0.100	0.499	5.315^{b}
37	0.091	0.429	4.503^{def}
39	0.092	0.521	5.715^{a}
40	0.101	0.414	4.170^{f}
42	0.102	0.456	4.716^{de}
43	0.090	0.398	4.103^{f}
44	0.089	0.434	4.595^{de}
46	0.084	0.514	5.728^{a}

หมายเหตุ ผลการทดลองที่ได้มาจากค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ
ตัวอักษรหลังตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์นั้น จะได้ลักษณะของสายพันธุ์กลายของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ที่แตกต่างกันจำนวนมาก บางสายพันธุ์นั้นอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ปริมาณมากขึ้น บางสายพันธุ์กลายผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้น้อยลง หรือผลิตได้ในปริมาณใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายนั้นจะทำการคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากขึ้น แต่จะสามารถผลิตได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมมากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับว่าในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแต่ละครั้ง จะได้สายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณมากหรือไม่ จากการศึกษาสามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลาย 11 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมสุด ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์กลายสูงสุดเท่ากับ 5.728 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ในงานวิจัยของ Amita และคณะ (2003) สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่สามารถทนและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่อุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส จากเชื้อ *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 โดยมีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 210 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แสดงว่าในงานวิจัยนี้สามารถทำให้เชื้อ *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในปริมาณสูง

Alain และคณะ (1993) สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่สามารถทนอุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส จากทำการกลายพันธุ์เชื้อ *Streptomyces lividans* โดยมีครึ่งชีวิต (half-life) ของเอนไซม์นานกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม แสดงว่าในงานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อ *Streptomyces lividans* ที่มีความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิสูงได้นานกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (% survival) ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้สารเคมีคือ *N*-nitriso-*N*-methylurea (NMU) ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ร่วมกับการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลา 2, 5, 8 และ 10 นาที เพื่อให้มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ 1-5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ 2 นาที ทำการเจือจางสปอร์ของเชื้อที่ 10^{-2} ทำให้ได้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดตามที่ต้องการ จุดประสงค์ที่ต้องทำการคัดเลือกระยะเวลาที่ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ 1-5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อที่จะได้ง่ายต่อการคัดเลือกสายพันธุ์กลายในขั้นตอนต่อไป และถือว่าสปอร์ของเชื้อราที่เหลืออยู่มีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูง หลังจากได้ระยะเวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลตและความเจือจางที่ต้องการแล้ว นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีส่วนประกอบของไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเพื่อให้เชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิสูง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่การสร้างเอนไซม์ไซลาเนส โดยสังเกตจากวงใสรอบโคโลนี จากการทดลองที่ทำการเลือกมาทั้งหมด 52 โคโลนี

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากวงใสโดยนำส่วนใส (สารละลายเอนไซม์) มาทำการหยอดลงบนอาหารแข็งซึ่งประกอบด้วยไซแลนร้อยละ 1 ที่เจาะเป็นรู บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในการย่อยไซแลน (การวิเคราะห์เชิงปริมาณ) จากการทดลองพบว่าสายพันธุ์กลาย 14 สายพันธุ์มีขนาดของวงใสมากกว่าสายพันธุ์ และจากการศึกษาการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ) พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์ดั้งเดิมเท่ากับ 4.342 ยูนิต ซึ่งมีสายพันธุ์กลายที่ทำการวิเคราะห์จำนวน 11 สายพันธุ์ที่มีค่ากิจกรรมมากกว่า แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

ในขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต หลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแล้ว ไม่ควรให้สารละลายสปอร์โดนแสงเนื่องจากจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ photoreactivity หรือ reverse mutation คือทำให้สายพันธุ์กลายนั้นเกิดการเปลี่ยนกลับเป็นเหมือนสายพันธุ์ดั้งเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา วรวิทย์วัฒนะ. 2530. การผลิตไซแลนเนสจากสเตรพโตมัยซีสสายพันธุ์ 42-9. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 7-8 น.

ชนัญญา ทิพย์มงคลศิลป์., นัฐวัฒน์ ชินะโยธิน., อภิวัฒน์ ถึกคุ้ม. 2545. การชักนำการกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อราเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส. ปริญญานิพนธ์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 69 น

ชวนพิศ ดีเอกนามสกุล. 2536. การทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยเชื้อรา, ในวัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ดและสรวง อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ) หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ, เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม เล่มที่ 1, น. 20-33, สมาคมเทคโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ.2543. พันธุศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. น. 237-260

ประเสริฐ สันตินานาเลิศ. 2536. การทำให้เกิดการกลายโดยการใช้แสงอัลตราไวโอเลต, ในวัฒนาลัย ปานปากเกร็ดและสรวง อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ) หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ, เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม เล่มที่ 1, น. 52, สมาคมเทคโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

เรวดี ปรีบัว. 2547. การแยกและการคัดเลือกเชื้อราจากดินในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. ราวิทยาเบื้องต้น, จามจุรีโปรดักท์, กรุงเทพฯ. น. 187.

วิธัญญา ชวเจริญพันธ์., เสาวภา อาศน์ศิลารัตน์., อารยา วงศ์พินิจวโรดม. 2546. การชักนำและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส. ปริญญานิพนธ์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 42 น

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2533. พันธุศาสตร์, เจ้าพระยาระบบการพิมพ์, กรุงเทพฯ. น.127-135.

Adriane, M. F. Milagras., Lynda, S. Lacis and Rolf Alexander Prade. 1993. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. Applied Microbiology. Biotechnology. 45:684-687.

Alain, M., François, S., Dieter K. and Rolf Morosoli. 1993. Increase in catalytic activity and thermostability of the xylanase A of *Streptomyces lividans* 1326 by site-specific mutagenesis. Enzyme and Microbial Technology. 164:20-424.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Amita R. Shah., M. Datta. 2005. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. Process Biochemistry. 40:1763-1771.

Ancharida Svarachorn. 1999. Production of Fungal-Xylanase using Agricultural Waste by Solid State Fermentation. Journal Science Research, Chulalongkorn University. 24:258-270.

Anwar, M. N., Suto, M and Temita, F. 1996. Isolation of *Penicillium purpurogenum* resistant to catabolite repression. Applied Microbiology Biotechnology. 45:684-687.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnology. 3:286-290.

Chahal, D.S. 1985. Solid State Fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. Applied Environmental Microbiology. 49(1):205-210.

Charin Techapun, Suphawat Sinsuwongwat, M. Watanabe, K. Sasaki, N. Poosaran. 2002. Production of cellulase-free xylanase by a thermotolerant *Streptomyces* sp. grown on agricultural waste and media optimization using mixture design and Plackett–Burman experimental design methods. Biotechnology Letters. 24:1437-1442.

Chauhuri, B. K., Vvvi kram Sahai. 1993. Production of cellulase using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on lactose in batch culture. Applied Microbiology Biotechnology. 39:194-196.

Christov, L.P and B. A. Prior. 1994. Enzymatic prebleaching of sulphite pulps. Apllied Microbiology Biotechnology. 42:492-498.

Deshpande, M. V., Srinivasan, M. C. And Deshmukh, S. S. 1987. Effect of fatty acids on cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its mutants. Biotechnology Letter. 9:301-304.

Desrochers, M., Jurasek, L., and Paice, M. G. 1981. High Production of β-Glucosidase in *Schizophyllum commune*: Isolation of the Enzyme and Effect of the Culture Filtrate on Cellulose Hydrolysis. Applied Environmental Microbiology. 41(1): 222–228

Douglas O. Mountfort and Colin G. Orpin. 1994. Anaerobic Fungi Biology, Ecology and Function. Marcel Dekker Publ. Co. Inc., New York. 290 pp.

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

Gerald James Stine. 1973. Laboratory Exercise in Genetics. Macmillan Publishing Co., Inc. New York. : 193-198.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Joglekar, A. V. and Karanth, N. G. 1984. Studies on cellulases production by mutant *Penicillium funiculosum*. Biotechnology and Bioenginerring 26:1079-1084

Kuhad, R. C., Singh, A. 1993. Lignocellulose biotechnology : current and future prospects, Critical Reviews in Biotechnology. 13 : 151-173.

Kuhad, R. C., Singh, A., Tripathi, K. K., sexena, R K. And Eriksson, K. E. L. 1997. Microorganisms as an alternative source of protein. Nutrition Reviews. 55:65-75

Kumar, P. K. R., Singh, A. And Schgerl, K. 1991. Formation of acetic acid from cellulosic materials by *Fusarium oxysporum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 34:570-572.

Mikhailova, R.V., A.G. Lobanok., L.I. Sapunova., Zh. F. Shishko and I.E. Zen kovich. 1996. Selection of a Mutant Strain of *Aspergillus alliaceus* Producing Pectin Hydrolases. Applied Biochemistry and Microbiology. *34:8385.*

Miller, G. L. 1959. Use of dinitosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry. 31:426-428.

Myburgh, J., Prior, B. And Kilian, S. G. 1991. The temperature and pH properties of the extracellular hemicellulose-degrading enzymes of *Aureobasidium pulluuans* NRRL Y2311-1. Process Biochemistry. 26:343-348.

Neville J. Din and John Webster F. O. 1995. Fungal Ecology. Chapman & Hall Publ. Co. Inc., London. 54-58.

Ramesh, C. K., Monica, M. and Ajay Singh. 1997. Optimization of xylanase production by a hyperxylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*. Process Biochemistry. 33:641-647.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sirin A. I. Adham, Ana B. Campelo., Angelina Ramos and Jose A. Gil. 2001. Construction of a Xylanase-Producing Strain of *Brevibacterium lectofermentum* by Stable Integration of an Enginerred *xysA* Gene from *Streptomyces halstedii* JM8. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(12) : 5425-5430.

Svarachorn A. 1999. Production of Fungal-Xylanase using Agricultural Waste by Solid State Fermention. J. Sci. Res. Chula. Univ. 24(1) : 15-20.

Wong, K. K. Y. And Saddler, J. N. 1992. *Trichoderma xylanases*, their properties and application. Critical Reviews in Biotechnology. 12 : 413-435.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารสูตรต่างๆในการเลี้ยงและ เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ก. PDA medium

1.มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
2.เดร็กโทส	20	กรัมต่อลิตร
3.วุ้น	15	กรัมต่อลิตร

ข. Complete medium (Demzin, 1986)

1.มอลโตส(BHD)	40	กรัมต่อลิตร
2.เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
3.มอลล์สกัด(oxoid)	24	กรัมต่อลิตร
4.วุ้น	20	กรัมต่อลิตร

ค. Minimal medium (Demzin, 1986)

1.$NaNO_3$	3	กรัมต่อลิตร
2.KCl	0.5	กรัมต่อลิตร
3.$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
4.$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
5.KH_2PO_4	1	กรัมต่อลิตร
6.กลูโคส	40	กรัมต่อลิตร

ง. Minimal medium agar

ใส่วุ้น 18 กรัมต่อลิตร ใน Minimal medium เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ. อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์

ส่วนที่ 1

1. KH_2PO_4	2	กรัมต่อลิตร
2. $(NH_4)_2HPO_3$	1.4	กรัมต่อลิตร
3. $MgSO_4.7H_2O$	0.3	กรัมต่อลิตร
4. $CaCl_2.2H_2O$	0.3	กรัมต่อลิตร
5. ยูเรีย	0.3	กรัมต่อลิตร
6. โปรตีเอสเปปโตน	0.23	กรัมต่อลิตร
7. Yeast extract	0.1	กรัมต่อลิตร

ส่วนที่ 2 แร่ธาตุผสม

1. $FeSO_4.5H_2O$	5	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร
2. $ZnSO_4.7H_2O$	1.40	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร
3. $MnSO_4.7H_2O$	4.56	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร
4. $CoCl_2$	2.0	กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียมสูตรอาหารต่างๆในการเลี้ยง และการเก็บรักษาจุลินทรีย์

ก.วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์ (PDA medium)

1.ชั่งอาหาร PDA ตามสัดส่วนที่ต้องการ

2.ละลายสารเข้าด้วยกันโดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

3.ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.0

4.บรรจุลงในหลอดฝาเกลียว

5.นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

6.เอียงอาหารในหลอดฝาเกลียวจนกระทั่งวุ้นแข็งโดยวิธีปลอดเชื้อ

ข.วิธีการเตรียมอาหาร Complete medium

1.ละลายสารเข้าด้วยกันโดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

2.ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.0

3.เติมผงวุ้นลงไป ต้มให้ละลาย บรรจุลงในขวดอาหาร

4.นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

5.เทลงในจานเลี้ยงเชื้อโดยวิธีปลอดเชื้อ

ค.วิธีการเตรียมอาหาร Minimal medium

1.ละลายสารเข้าด้วยกันโดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

2.ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.0

3.เติมผงวุ้นลงไป ต้มให้ละลาย บรรจุลงในขวดอาหาร

4.นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

5.เทลงในจานเลี้ยงเชื้อโดยวิธีปลอดเชื้อ

ง.วิธีการเตรียมอาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์

1.แบ่งอาหารออกเป็น 2 ส่วน ละลายสารทั้งหมด ทั้งส่วนที่1(ยกเว้น $(NH_4)_2HPO_3$และ $MgSO_4.7H_2O$) และส่วนที่ 2 (ยกเว้นไซแลน)เข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2.นำส่วนที่ 2 ผสม 0.1 มิลลิลิตรต่อลิตร ในส่วนแรกตามสัดส่วนที่กำหนดไว้

3.ปรับความเป็นกรดด่างด้วย HCl เข้มข้น 1 นอมอลจากนั้นเติมไซแลนร้อยละ 1 และวุ้นลงไป

4.ต้มให้วุ้นละลาย แล้วเติม $MgSO_4.7H_2O$(เพื่อป้องกัน Mg ไปจับทำให้เกิดตะกอน)

5.บรรจุลงในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

6.$(NH_4)_2HPO_3$ที่แยกไว้นำไปกรองจุลินทรีย์ด้วยแผ่นกรองขนาด 0.25 ไมครอน

7.สารจากข้อ 5 ที่ได้พออุ่นๆให้นำไปผสมกับ $(NH_4)_2HPO_3$ ที่กรองจุลินทรีย์แล้ว ตามสัดส่วน

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การตรวจนับสปอร์เชื้อราโดยใช้ Haemacytometer(Petreoff-Hausserchember)

วิธีการตรวจนับสปอร์เชื้อรา

1. เตรียมตัวอย่างที่จะทำการตรวจนับ ถ้าเป็นของเหลวสามารถนำมานับได้ทันที ถ้าเป็นของแข็งต้องนำมาละลายในน้ำกลั่นก่อน เช่น ชั่งสารตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร หรืออาจต้องทำการเจือจาง เนื่องจากมีจำนวนสปอร์มาก
2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงใน Haemacytometer 1-2 หยด โดยหยดลงในด้านข้างของแผ่น cover slip
2. ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า
3. นับจำนวนสปอร์ในแต่ละช่องเล็ก หรือนับช่องใหญ่แล้วนำหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับ นำไปคูณด้วย 4×10^6 จะได้ปริมาณสปอร์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตร

วิธีการคำนวณหาค่า 4×10^6

พื้นที่ 1 ช่องเล็กในช่องใหญ่มีค่า = 0.0025 ตารางมิลลิเมตร

ความลึกระหว่าง cover slip และช่อง = 0.1 มิลลิเมตร

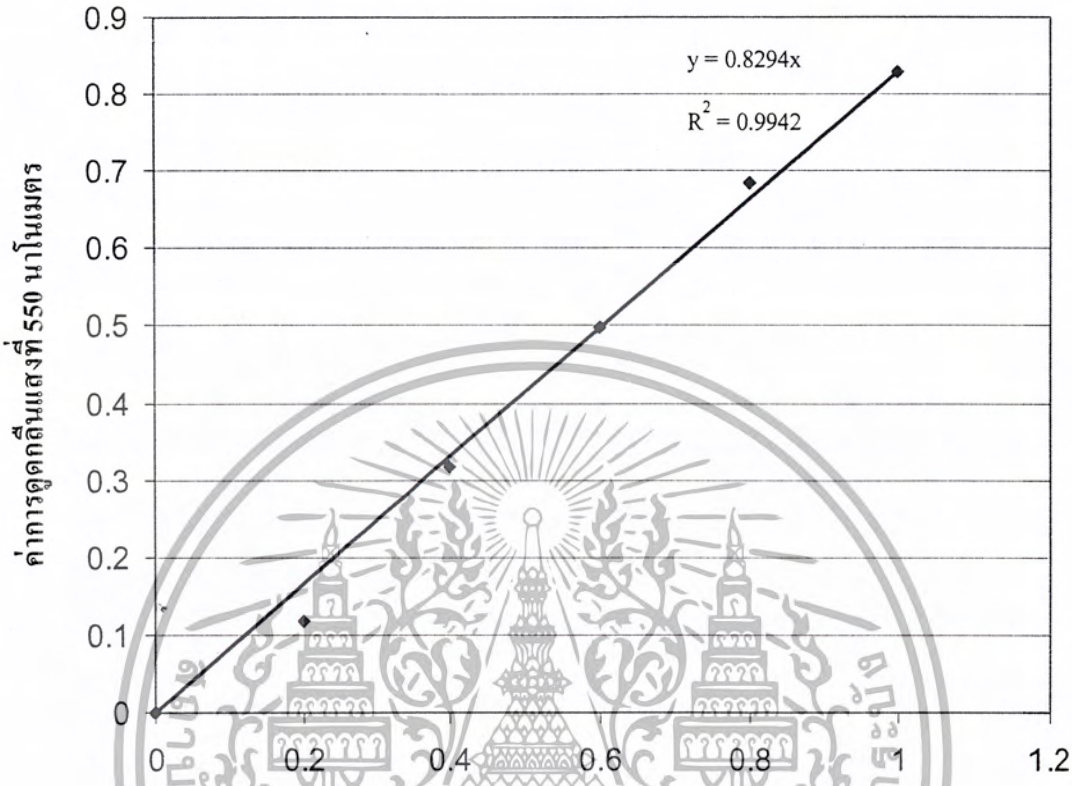
ดังนั้น ปริมาตร 1 ช่องเล็กจะมีค่า = 0.0025 × 0.1 = 0.00025 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ปริมาตร 0.00025 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะมีสปอร์ = Z สปอร์

ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะมีสปอร์ = $Z \times 1000 / 0.00025$ สปอร์

= $Z \times 4 \times 10^6$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ 1 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอัตราส่วนของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์กลายต่างๆเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ACTIVITY

Duncan[a,b]

สายพันธุ์	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
43	3	4.10667					
9	3	4.10800					
40	3	4.16900					
0	3	4.34300	4.34300				
37	3	4.45200	4.45200	4.45200			
34	3		4.58767	4.58767			
44	3		4.59667	4.59667			
26	3		4.63767	4.63767			
42	3		4.71800	4.71800			
30	3			4.84033	4.84033		
8	3			4.86300	4.86300		
17	3				5.16767	5.16767	
35	3					5.31200	
39	3						5.71500
46	3						5.72333
Sig.		.105	.083	.061	.104	.442	.964

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 5.148E-02.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

หมายเหตุ 0 คือ สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้