

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลลาเนสของ
เชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus*



เลขหมู่.....61823
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....21 ก.ค. 2549



โครงการพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Optimization of xylanase production by the thermotolerant *Aspergillus fumigatus*



A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Biotechnology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2004

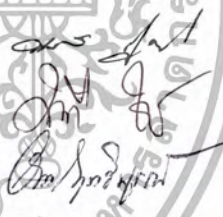
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลลาเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง
Aspergillus fumigatus

นักศึกษา นางสาวกนกวรรณ จันทบาล
นายชนพล ธรรมประทีป
นายธีรศักดิ์ เพียรสิริรัตน์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.อารี ฤทธิบุรณ์

ภาควิชา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.พรรณี จิตาภิชาติ	
กรรมการ ผศ.มารีสา จาตุพรพิพัฒน์	
กรรมการ ผศ.อารี ฤทธิบุรณ์	

.....
(.....)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง <i>Aspergillus fumigatus</i>	
โดย	นางสาวกนกวรรณ	จันทบาล
	นายธนพล	ธรรมประทีป
	นายธีรศักดิ์	เพียรสิริรัตน์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
ปีการศึกษา	2547	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.อารี	กฤษนิรุฒ

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสจากเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus* ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว และใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน ในการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเริ่มต้น คือ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 และให้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตรอาหารเท่ากับ 50 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสของเชื้อราชนิดนี้ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด ประกอบด้วยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ร้อยละ 0.2 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 และแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0.03 เมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นร้อยละ 3.0 สำหรับชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ การใช้เปปโตनที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับร้อยละ 0.15 และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุด โดยจะทำให้เชื้อให้กิจกรรมไโซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 80.436 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Special Project Title	Optimization of xylanase production by the thermotolerant <i>Aspergillus fumigatus</i>	
Name	Miss Kanokwon	Janthabal
	Mr. Thanapol	Thammapratip
	Mr. Theerasak	Piansirirat
Department	Applied Biology	
Program	Biotechnology	
Academic Year	2004	
Special Project Advisor	Asst.Prof. Aree Rittiboon	

Abstract

Fermentable conditions for xylanase production by a thermotolerant wild strain of *Aspergillus fumigatus* were optimized in submerged cultures by various agricultural wastes as the carbon source. Various nitrogen sources and pH on medium were studied. The initial pH and spores was 6.0 and 10^6 spores/ml, respectively in a 250 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml medium. Cultivation was made on a rotary shaker at 200 rpm, 30 °C for 5 days.

The best medium contained 0.2% (w/v) KH_2PO_4 , 0.1% (w/v) MgSO_4 and 0.03% (w/v) CaCl_2 . In the best medium, 3% corn cobs was suitable as carbon source. For nitrogen sources, it was found that 0.15% peptone at initial pH 7.0 gave the highest xylanase activity of 80.43 U/ml.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.อารี ฤทธิบุรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษา ระหว่างการค้นคว้าวิจัยและการเขียน โครงการงานพิเศษฉบับนี้ รวมถึงการตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.พรรณี จิตาภิชิต และ ผศ.มารีสา จาตุพรพิพัฒน์ ที่เป็น คณะกรรมการในโครงการพิเศษ และช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษให้มีความสมบูรณ์ มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องบดอาหารสัตว์ในการ บดขังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และขานอ้อย เพื่อใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณพี่ๆนักศึกษานิเทศศาสตร์โทภาควิชาชีววิทยายุทธศาสตร์ที่ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือในการทำโครงการพิเศษนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง และขอขอบคุณเพื่อนๆและทุก ท่านที่ไม่ได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจในการศึกษามาตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงการพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นางสาวกนกวรรณ จันทบาล

นายธนพล ธรรมประทีป

นายธีรศักดิ์ เพียรสิริรัตน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	1
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	24
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	28
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	49

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	4
2.2	การผลิตเอนไซม์ไซทานเนสและเซลลูเลสโดยจุลินทรีย์ บางชนิดในสภาวะอาหารเหลว	18



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของไซเลนซึ่งแสดงความแตกต่างของกลุ่มแทนที่กับตำแหน่งที่จับ	6
2.2 การทำงานของกลุ่มเอนไซม์ในการย่อยสลายไซเลน	8
2.3 การเจริญของ <i>Aspergillus fumigatus</i> บนอาหาร Czapexdow agar เมื่อบ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน	9
4.1 ผลของสูตรอาหาร Singh, et. al. (1998) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา <i>Aspergillus fumigatus</i>	29
4.2 ผลของสูตรอาหาร Ikura and Horikoshi (1987) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา <i>Aspergillus fumigatus</i>	30
4.3 ผลของสูตรอาหาร Carter และ Bull (1969) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของ เชื้อรา <i>Aspergillus fumigatus</i>	31
4.4 ผลของความเข้มข้นของขี้ข้าวโพดที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา <i>Aspergillus fumigatus</i>	31
4.5 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา <i>Aspergillus fumigatus</i>	33
4.6 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเปปโตนเพียงอย่างเดียวที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา <i>Aspergillus fumigatus</i>	34
4.7 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนยีสต์สกัดผสมกับเปปโตนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา <i>Aspergillus fumigatus</i>	35
4.8 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา <i>Aspergillus fumigatus</i>	36

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหลายชนิด เช่น กากเมล็ดฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว ชังข้าวโพด เปลือกเมล็ดธัญพืช ซึ่งถือเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีมากในธรรมชาติ โดยประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) แต่ก่อนที่ได้ถูกนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ ปุ๋ย ทำให้ได้ผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจไม่เต็มที่ ในปัจจุบันวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยไซแลน (xylan) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายในกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เอนไซม์ไซแลเนส (xylanase) ซึ่งเอนไซม์ไซแลเนสสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมได้หลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น จึงเป็นการลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมที่ใช้ในอุตสาหกรรมเหล่านี้ และลดต้นทุน ลดการใช้ไซแลนบริสุทธิ์จากแหล่งอื่นที่มีราคาแพง

จากการศึกษาวิจัยพบว่า *Aspergillus fumigatus* สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลเนสโดยใช้สารลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด และมีคุณสมบัติในการทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง เพื่อให้การผลิตเอนไซม์ไซแลเนสมีประสิทธิภาพสูงสุด โครงการพิเศษนี้จึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์และเปรียบเทียบสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสเพื่อจะนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านต่างๆต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus* ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น โดยคัดเลือกสภาวะที่เชื้อผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้สูงสุดและผลิตเซลลูเลสได้ต่ำสุดหรือไม่มีการผลิต

1.2.2 ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีราคาถูกแทนการใช้ไซแลน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ทดสอบสูตรอาหาร 3 สูตร ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยใช้ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพดและชานอ้อยความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และทำการคัดเลือกสูตรอาหารและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมมาแปรผันความเข้มข้นร้อยละ 1.0 , 2.0 , 3.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และนำแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกมาแปรผันความเข้มข้นร้อยละ 0.05 , 0.10 , 0.15 , 0.20 , 0.25

1.3.3 ศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกัน คือ 4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.0 , 8.0 , 9.0 , 10.0

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1.4.1 คัดเลือกสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์ไโซลานอส

เลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร (ภาคผนวก ก) โดยมีขี้ข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ขนอ้อย ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอนในแต่ละสูตรอาหาร โดยเติมอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในเออร์เลนไมเยอร์ฟลาสก์ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.0 ทำการฆ่าเชื้อ เดิมสารละลายสปอร์ที่ผ่านการนับสปอร์ให้ได้จำนวน 10^6 สปอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาเลี้ยงในสภาวะเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สุ่มเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการเก็บในวันที่ 2 , 3 , 4 , 5 และนำตัวอย่างมาทำการแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำส่วนโสมมาวัดพีเอชและนำมาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานอสและเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก ข)

1.4.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

1.4.2.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนโดยใช้ขี้ข้าวโพด เปลือกข้าวโพดและขนอ้อย ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานอสสูงสุดและให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุด

1.4.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยนำแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือก (ข้อ 1.4.2.1) มาแปรผันความเข้มข้นร้อยละ 1.0 , 2.0 , 3.0

1.4.3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

1.4.3.1 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนโดยกำหนดให้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากัน คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.0612 และทำการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานอสสูงสุดและให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุด

1.4.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนนำแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือก (จากข้อ 1.4.3.1) มาทำการแปรผันความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 , 0.10 , 0.15 , 0.20 , 0.25

1.4.4 ศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไโซลานอส

1.4.4.1 ศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกันคือ 4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.0 , 8.0 , 9.0 , 10.0 โดยใช้สูตรอาหารที่คัดเลือก (จากข้อ 1.4.1) มาทำการปรับพีเอชก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสและสภาวะที่เชื้อราทนอุณหภูมิสูงสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้สูงสุด โดยผลิตเอนไซม์เซลลูเลสน้อยที่สุดหรือไม่มีการผลิต

1.5.2 เพื่อเป็นแนวทางในการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่มีราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอนแทนไซแลนซึ่งมีราคาแพง



บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ของเสียอินทรีย์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นสารพวกลิกโนเซลลูโลสซึ่งประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่สำคัญคือ เซลลูโลสร้อยละ 40-50 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 30-40 และลิกนินร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง (Swaroop Rani, 2000) อยู่รวมกันในผนังเซลล์ ซึ่งจะมีปริมาณแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด สรีระวิทยาของพืช สิ่งแวดล้อมในการเจริญ อายุ เนื้อเยื่อ (ดังตารางที่ 2.1) ได้มีการวิจัยการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์อย่างกว้างขวาง เพราะว่ามีผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายมีความสำคัญในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเชื้อเพลิงเคมี อาหารและอาหารสัตว์

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	เฮมิเซลลูโลส	เซลลูโลส	ลิกนิน
ชานอ้อย	22	33	14
ใบอ้อย	26	36	10
ชังข้าวโพด	35	45	15
เปลือกข้าวโพด	39.6	43.8	14.3
กาบข้าวโพด	28	32	13
ดอข้าวโพด	25	35	35
ฟางข้าว	24	32	13
ฟางข้าวฟาง	30	31	11
ฟางข้าวไธด	25	49	14-22
ฟางข้าวสาธิต	20	40	15
รำข้าวสาธิต	28	36	20
จีเลื้อย	14	55	21
เกลบ	15	36	19

ที่มา : Benber and Benedito de Barder, (1974) ; Jackson, (1977) ; Bisaria, (1991) ; Gupta and Madamwar, (1997) ; Kuhud, (1999)

2.2 เซลลูโลส

เซลลูโลส ($C_6H_{10}O_5$)_n ประกอบด้วยพอลิเมอร์โซ่ตรงของดี-กลูโคไพราโนส (D-glucopyranose) ต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4- glycosidic) ประมาณ 3,000-15,000 โมเลกุล เป็นพอลิเมอร์ของโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสชนิดเดียว (homopolysaccharide) โครงสร้างของเซลลูโลสแข็งแรงและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำเนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสที่เรียงกันอยู่เป็นมัดๆ (fibril) เซลลูโลสไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ สารละลายต่างและกรดที่อุณหภูมิห้อง (Jackson , 1977 ; Marsden and Gray, 1986) แต่ละลายในสารละลายกรดเข้มข้น

2.2.1 เอนไซม์เซลลูเลส

1. เอนโดกลูคาเนส (Endo-1,4- β -glucanase ; E.C. 3.2.1.14) ทำหน้าที่ตัดพันธะเบต้า-1,4 แบบสุ่มระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสเมื่อมีพันธะเบต้า-1,4 เท่านั้นในสายโซ่ตรงของกลูโคส
2. เซลโลไบโอไฮโดรเลส (cellobio-hydrolase ; E.C. 3.2.1.91) ทำหน้าที่ตัดเซลโลไบโอส ซึ่งเกิดจากน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4 ด้านปลายสายที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์
3. เบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase ; E.C. 3.2.1.21) ทำหน้าที่ตัดสายโซ่ตรงของ 2, 3 หรือ 4 เบต้า-1,4-กลูโคสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสโมเลกุลเดียว

2.3 เฮมิเซลลูโลส

เป็นพอลิเมอร์โมเลกุลสั้นและมีกิ่งก้านมากทำให้โครงสร้างไม่เป็นระเบียบ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลมากกว่าหนึ่งชนิด (heteropolysaccharide)

เมื่อสกัดหรือแยกส่วนที่ได้จากพืชด้วยคั่งเจือจางทำให้สามารถจำแนกชนิดของเฮมิเซลลูโลสได้โดยขึ้นกับชนิดของน้ำตาลส่วนใหญ่ที่ประกอบ (Schulze, 1981) ซึ่งน้ำตาลส่วนใหญ่ ได้แก่ ดี-กลูโคส (D-glucose) ดี-แมนโนส (D-mannose) แอล-อะราบินโนส (L-arabinose) กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) และดี-ไซโลส (D-xylose) (Swaroop Rani, 2000) ต่อกันด้วยพันธะ β -1,4- glycosidic ทำให้สามารถแบ่งชนิดเฮมิเซลลูโลสได้เป็นไซแลนซึ่งประกอบด้วยดี-ไซโลสเป็นมอนอเมอร์หลักและสายแอล-อะราบินโนส กาแลคแทน (galactan) ที่ประกอบด้วยดี-กาแลคโตสเป็นมอนอเมอร์หลัก แมนแนน (mannan) ประกอบด้วยแมนโนสเป็นมอนอเมอร์หลัก และอะราบินแนน (arabinan) เกิดขึ้นจากแอล-อะราบินโนส เป็นมอนอเมอร์หลัก

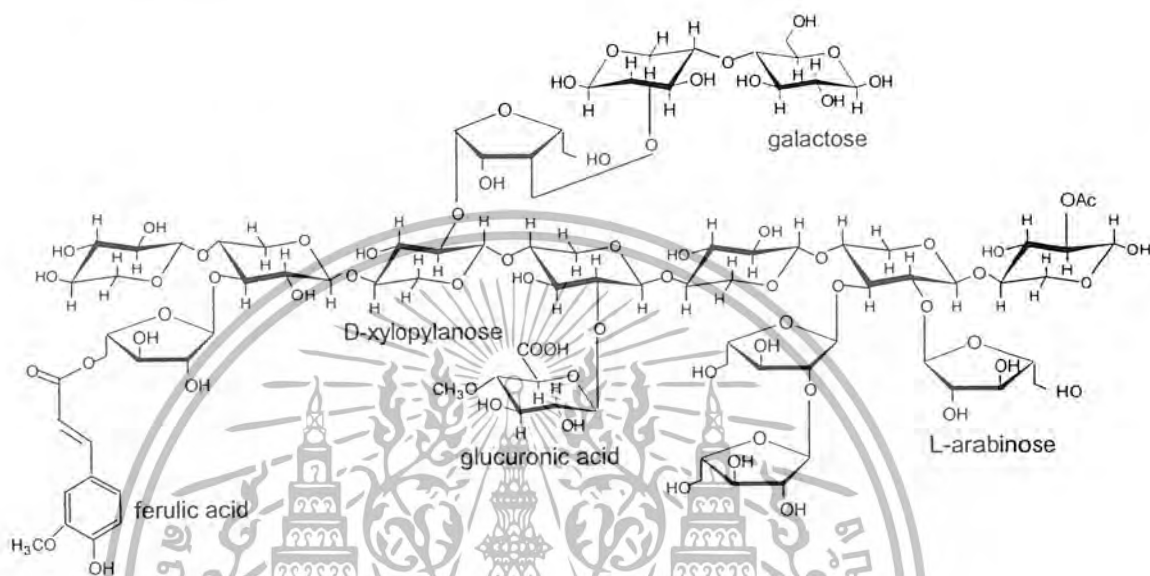
2.3.1 ไซแลน

ไซแลนเป็นส่วนประกอบสำคัญของเฮมิเซลลูโลส ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะเบต้า -1,4 เป็นสายหลัก (backbone) ส่วนใหญ่ไซแลนมีโครงสร้างเป็นกิ่งก้าน (ดังรูปที่ 2.1)

ไซแลนที่ได้จากพืชประกอบด้วยแอล-อะราบินโนสปริมาณมาก ดังนั้นจึงเรียกได้อีกชื่อว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะราบิโนไซแลน (arabinoxylan) ในทางตรงกันข้ามไซแลนที่ได้จากไม้เนื้อแข็งมักเรียกว่า กลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) เนื่องจากมีจำนวนของกรดกลูคูโรนิกมากต่อเป็นกึ่งก้านกับสายหลัก (Ronald, 2001)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไซแลนซึ่งแสดงความแตกต่างของกลุ่มแทนที่กับตำแหน่งที่จับ

ที่มา : คัดแปลงจาก <http://www.adisisonorthamerica.com/rovabioguide/versatility.asp> และ

Ronald, (2001)

อะราบิโนสเชื่อมต่อกับสายหลักของไซแลนด้วยพันธะ α -1,2 หรือ α -1,3 ทั้งแบบต่อเนื่องและเป็นโซ่กิ่งสั้นๆ โซ่กิ่งนี้สามารถเชื่อมต่อกับไฮโลสอิดระได้ด้วยพันธะ β -1,2 ของอะราบิโนส และกาแลคโตสสามารถเชื่อมต่อกับอะราบิโนสด้วยพันธะ β -1,5 หรือต่อกับไฮโลสโดยพันธะ β -1,4 โดยหมู่อะซิติล (acetyl) จะปรากฏที่ออกซิเจนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ของไฮโลสในสายหลัก กรดกลูคูโรนิกและ 4-O-methyl ether จะต่อกับสายหลักโดยพันธะ α -1,2 ในทางตรงกันข้าม หมู่อะโรมาติก (feruloyl และ *p*-coumaroyl) ต่อกับออกซิเจนตำแหน่งที่ 5 ที่ปลายของอะราบิโนส (Ronald, 2001)

2.3.2 คุณสมบัติของไซแลน (Whistler, 1950)

1. ไซแลนที่ไม่มีหมู่อะซิติลจะไม่ละลายในน้ำแต่ละลายได้ในสารละลายต่างและถูกย่อยสลายด้วยกรดได้ง่าย
2. ไซแลนที่มีหมู่อะซิติลถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ไชเลนที่มีหมู่อะซิติลถูกสกัดได้ด้วยน้ำร้อนและละลายในน้ำได้ดี
4. สารละลายไชเลน ไม่สามารถย่อยได้ตามหลักของ Fehling's solution ซึ่งเป็นสารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของอัลดีไฮด์
5. สารละลายไชเลนมีค่า optical rotation เป็นลบอย่างมากซึ่งมีระยะจาก $[\alpha]_D^{20} - 78.2$ ถึง 109.5 องศาเซลเซียส

ไชเลนของไม้เนื้ออ่อนจะมีโซ่กิ่งที่เป็นกรมากกว่าไชเลนของไม้เนื้อแข็งในกรณีของไชเลนในไม้เนื้ออ่อนจะมีกรดอยู่ 1 หน่วยต่อ ดี-ไซโลส 5-6 หน่วย ในขณะที่ไชเลนของไม้เนื้อแข็งจะมีกรด 1 หน่วยต่อ ดี-ไซโลส 9-12 หน่วย โดยปกติไม้เนื้อแข็งจะปรากฏหมู่อะซิติล 1 หมู่ที่ไซโลสหน่วยที่ 2 ในสายหลักของไชเลน และปฏิกิริยา acetylation ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ออกซิเจนตำแหน่งที่ 3 แทนที่จะเป็นออกซิเจนตำแหน่งที่ 2 (Biely, 1985)

2.3.3 กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไชเลน (ดังรูปที่ 2.2)

แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลัก

1.1 เอนโด-1,4-เบต้า-ไซลานเนส (Endo-1,4- β -xylanase ; E.C. 3.2.1.8) ทำหน้าที่ตัดสายตรงของหน่วยเบต้า-1,4-ไซโลส อย่างสุ่มได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโล-โอลิโกแซคคาไรด์และไซโลไบโอส

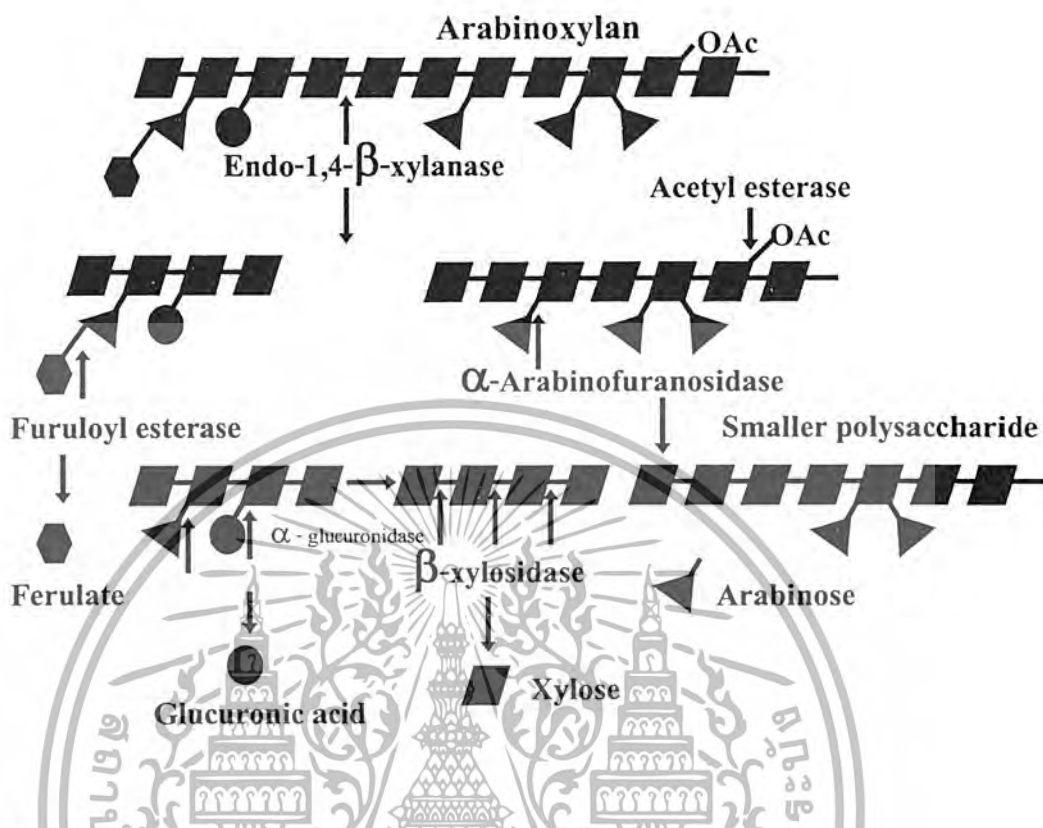
1.2 เบต้า-ไซโลซิเดส (β -xylosidase ; E.C. 3.2.1.37) ทำหน้าที่ตัดสายตรงของไซโล-โอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆที่ประกอบด้วย 2, 3 หรือ 4 หน่วยของเบต้า-1,4-ไซโลส และไซโลไบโอสจากปลายสายที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส

2. กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายสายโซ่กิ่ง

2.1 แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟูรานอไซด์ (α -L-arabinofuranosidase ; E.C. 3.2.1.55) ทำหน้าที่ตัดพันธะระหว่างอะราบินโนสและไซโลส แต่ตัดได้เมื่อไซโลสถูกแทนที่ด้วยหน่วยแทนที่หน่วยเดียวเท่านั้น

2.2 แอลฟา-กลูคูโรนิเดส (α -Glucuronidase ; E.C. 3.2.1.139) ทำหน้าที่ตัดส่วนของกรดกลูคูโรนิก และ 4-O-methyl ether จากไชเลน แอลฟา-กลูคูโรนิเดสมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อโอลิโกแซคคาไรด์เป็นสับสเตรต ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้สับสเตรตที่เป็นพอลิเมอร์จะพบว่าไม่มีกิจกรรมต่ำหรือไม่มีเลย (Biely, et. al. 2000 and Vries, et. al. 1998)

2.3 อะซิติล เอสเทอเรส (acetyl esterase ; E.C. 3.1.1.6) ทำหน้าที่กำจัดหมู่ O-acetyl residue จากออกซิเจนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ของไซโลสในสายหลัก



รูปที่ 2.2 การทำงานของกลุ่มเอนไซม์ในการย่อยสลายไซแทน

ที่มา: ดัดแปลงจาก <http://www.adisseeonorthamerica.com/rovabioguide/versatility.asp>

2.4 ลิกนิน

ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ที่ซับซ้อนและมีความแข็งแรงทนทานต่อการย่อยสลายเนื่องจากสังเคราะห์ขึ้นได้จากหน่วยฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid) ซึ่งเกิดจากการจับกันเป็นโมเลกุลใหญ่ของ p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol (Sjostrom, 1981) หน่วยย่อยเหล่านี้จะจับตัวกันเป็นโครงสร้าง 3 มิติ โดยสร้างพันธะเอสเทอร์ (C-O-C) นอกจากนี้พันธะคาร์บอน (C-C) ทำให้ลิกนินทนต่อการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่าง โดยทั่วไปพบลิกนินในส่วนมิดเซลลามลลา (middle lamella) ทำให้ห่อหุ้มส่วนของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเอาไว้ เป็นผลให้การย่อยสลายของทั้งสองเกิดได้ช้าและปริมาณต่ำ

2.5 ลักษณะสำคัญของ *Aspergillus fumigatus*

เป็นฟังไจ (fungi) ที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและทนอุณหภูมิสูงได้ดี (สูงถึง 57 องศาเซลเซียส) พบได้ทั่วโลก สามารถแยกได้จากอากาศ พืช อาหารสัตว์ ดิน และกากของเสียจากการบำบัดน้ำเสีย ฯลฯ ลักษณะโคโลนีมีสีขาวในระยะแรกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวออกเป็นสีน้ำเงินเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างเป็นเส้นใยเรียกว่า ไฮฟา (hypha) แบบมีผนังกัน โคโคนิโอฟอร์ (conidiophore) หรือ สท็อก (stalk) ยาว 250-300 ไมโครเมตร กว้าง 16.6-18.8 ไมโครเมตรขึ้นจากฟุตเซลล์ (foot cell) ซึ่งเป็นเซลล์มัชชีเลียมพิเศษมีขนาดใหญ่ผนังหนา ส่วนปลายจะโป่งออกเป็นรูปคล้ายช้อน จนกระทั่งคล้ายรูปผลแพร์เรียกว่า vesicle ฟิไลด์ (phialide) ซึ่งทำหน้าที่สร้างคอนนิตีเดียสั้น โคนิตีเดีย (conidia) รูปร่างกลมจนกระทั่งเป็นรูปไข่ ยาว 2.3-2.5 ไมโครเมตร (Stevenson, 1975; Beneke and Roger, 1980; Klich, et. al. 1996)



รูปที่ 2.3 การเจริญของ *A. fumigatus* บนอาหาร Czapek-Dox agar เมื่อบ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ที่มา : <http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/asp-fu.htm>

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไโซลาเนสโดยการหมัก

การศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์เป็นสิ่งจำเป็น นั่นคือในการผลิตเอนไซม์ควรเตรียมวัตถุดิบและสิ่งแวดล้อมให้มีสภาพที่เหมาะสมซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่จะระบุว่าจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพหรือไม่ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แตกต่างกัน ในสภาพที่ไม่เหมาะสมจุลินทรีย์จะมีระยะ lag phase ยาวขึ้นและใช้เวลาในการแบ่งตัวนานขึ้นซึ่งทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง

2.6.1 สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิตเอนไซมนั้นประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติ และจุลินทรีย์ที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์ ปกติจุลินทรีย์ตามธรรมชาติจะมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ต่ำ เพื่อให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม จึงได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ต่างๆจำนวนมาก ซึ่งการปรับปรุงสายพันธุ์มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การใช้รังสีต่างๆ ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีแกมมา เป็นต้น การใช้สารเคมี ได้แก่ สารพวก alkylating agent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(เช่น ethyl methanesulphonate) เป็นต้น การใช้รังสีร่วมกับการใช้สารเคมีและการสอดแทรกดีเอ็นเอ ซึ่งการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ (ดังตารางที่ 2.2)

2.6.2 แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อสังเคราะห์พลังงานและเป็นส่วนของผนังเซลล์ ซึ่งเป็นสิ่งแวดล้อมภายในที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจุลินทรีย์สามารถใช้ได้หมด ส่วนแหล่งคาร์บอนที่มีโมเลกุลซับซ้อน เช่น เพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ฯลฯ มีจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้ได้ และเนื่องจากราคาของสับสเตรตมีบทบาทต่อต้นทุนที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลส ดังนั้นจึงมีการนำสับสเตรตที่ราคาถูก โดยเฉพาะวัตถุดิบที่มีลิกโนเซลลูโลสซึ่งไม่ละลายน้ำเป็นองค์ประกอบ เช่น ชังข้าวโพด เปลือกข้าวสาลี รำข้าวสาลี ฟางข้าว เป็นต้น ไปใช้ประโยชน์สำหรับการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลส (Kesker, 1992 ; Kuhud et. al., 1999 ; Beg et. al., 2000a and Gupta et. al., 2001)

Veridiana, et. al. (2002) รายงานว่าการใช้ชังข้าวโพดความเข้มข้นร้อยละ 3.0 เป็นสับสเตรตและที่อุณหภูมิสูง 42 องศาเซลเซียสในการเลี้ยง *A. fumigatus* สายพันธุ์ที่ทนร้อน เป็นเวลา 72 ชั่วโมงจะให้กิจกรรมของเบต้า-ไฮโดรไลเอสสูงที่สุดเท่ากับ 45.40 ± 3.10 หน่วยต่อมิลลิกรัม

Antony, et. al. (2002) ศึกษาการผลิตเอนไซม์จาก *A. fumigatus* ARI ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทนค้างเจริญได้ดีในอาหารที่ประกอบด้วยสับสเตรตพวกลิกโนเซลลูโลสราคาถูก โดยผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสสูงสุดเท่ากับ 30 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นสับสเตรต ในขณะที่เดียวกันผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสได้ในระดับต่ำเท่ากับ 17 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อใช้รำข้าวสาลีและชานอ้อย อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า *A. fischeri* และ *Cephalosporium* spp. ผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสได้ในระดับสูงเมื่อใช้รำข้าวสาลีเมื่อเปรียบเทียบกับฟางข้าวและชานอ้อย (Bansod et. al. 1993; Chande Raj et. al. 1995)

Kitpreechavanich (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสของ *A. fumigatus* 4-45-IF ในอาหารแห้งเมื่อความชื้นเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 81 พบว่าฟางข้าวให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรไลสสูงสุดเท่ากับ 545 หน่วยต่อมิลลิกรัม โดยเปรียบเทียบกับการใช้ ชานอ้อย ชังข้าวโพด และรำข้าวสาลี

Singh, et. al. (1995) รายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้นรำข้าวสาลีจากร้อยละ 1.0 เป็นร้อยละ 3.0 ทำให้การผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสและเอนไซม์เบต้า-ไฮโดรไลเอสโดยเชื้อ *Fusarium oxysporum* NTG-19 เพิ่มขึ้น

Stewart, et. al. (1983) ศึกษาการใช้เชื้อแห้งเป็นสับสเตรดในสภาวะอาหารเหลวในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของ *A. fumigatus* ATCC 46324 พบว่าให้กิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 900 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Wase, et. al. (1985) พบว่าฟางข้าวบดความชื้นร้อยละ 4.0 เป็นสับสเตรดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจาก *A. fumigatus* IMI 255091 โดยให้กิจกรรมสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 68.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Purkathofer, et. al. (1993) ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจาก *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นสับสเตรด พบว่าซังข้าวโพดให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 1950 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งนอกจากซังข้าวโพดจะประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่สำคัญแล้วยังประกอบด้วยสารอาหารอื่นๆ ได้แก่ แหล่งไนโตรเจน วิตามิน แร่ธาตุ เป็นต้น จึงช่วยส่งเสริมให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น

Lenartovicz, et. al. (2003) ได้ศึกษาและเปรียบเทียบการใช้วัสดุเหลือทิ้งพวกกลีโคโนเซลลูโลสหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส โดย *A. fumigatus* ในสภาวะ อาหารเหลว ความชื้นร้อยละ 2.0 และ 3.0 พบว่าเมื่อใช้ซังข้าวโพด ความชื้นร้อยละ 3.0 เป็นแหล่งคาร์บอนจะให้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดสสูงสุดเท่ากับ 45.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.6.3 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์ใช้สารประกอบไนโตรเจนในการเจริญเติบโต จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจนได้แตกต่างกัน โดยไนโตรเจนจะเป็นส่วนประกอบหนึ่งของโปรตีน ไซโตพลาสซึม ผนังเซลล์และเอนไซม์ต่างๆ แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ ได้แก่ แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น ยูเรีย เก็ดมอมโมเนีย โซเดียมไนเตรท เป็นต้น และแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น เปปโตน ยีสต์สกัด ทรีปโตน เป็นต้น

การใช้เปปโตนและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ของจุลินทรีย์ (Haltrich et. al., 1993 ; Purkathofer et. al., 1993a)

Kuhud; et. al. (1998) จากการศึกษาเรื่องการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดย *F. oxysporum* สายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูง พบว่าเปปโตนกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีที่สุด โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 20.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามการเติมแหล่งไนโตรเจนยีสต์สกัดผสมเปปโตนมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสไม่แตกต่างจากการใช้เปปโตนเพียงชนิดเดียว

Abdel-Sater, et. al. (2001) ศึกษาเชื้อราที่ย่อยสลายไขมันและกิจกรรมของกลุ่มเอนไซม์ไลเปสในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรม พบว่าไขมันในเตรตและเปปโตนเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ของ *Trichoderma harzianum* โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 54 และ 52 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแอมโมเนียมซัลเฟตให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่ำสุดเท่ากับ 42 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Qinnghe, et. al. (2004) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดย *Pleurotus ostreatus* ได้มีการทดสอบแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์หลายชนิด สรุปได้ว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มีผลต่อการผลิตเอนไซม์มากกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ โดยเปปโตน > เนื้อสัตว์ > ยีสต์สกัด > ทรีปโตน > แอมโมเนียมไนเตรต > แอมโมเนียมซัลเฟต > แอมโมเนียมฟอสเฟต ตามลำดับ

Barkir, et. al. (2001) ศึกษาการผลิตการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและลักษณะทางชีวเคมีของเบต้า-1,4-ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* พบว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็นสิ่งสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส จากผลการทดลองสรุปได้ว่า อาหารที่ประกอบด้วยขี้ข้าวโพดร้อยละ 3.0-9 ต่อถั่วเหลืองร้อยละ 1.0 และแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1.0 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 23.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.6.4 แร่ธาตุ

จุลินทรีย์ใช้แร่ธาตุหลายชนิดในกระบวนการเมแทบอลิซึม เช่น โปแตสเซียม แมกนีเซียม เหล็ก เป็นต้น ซึ่งในกระบวนการไกลิโคไลซิส แมกนีเซียมและสังกะสีถูกใช้เป็นโคเอนไซม์ ส่วนในกระบวนการเครบส์ไซเคิล (Kreb's cycle) นั้น แมงกานีส แมกนีเซียมและเหล็กถูกใช้เป็นโคเอนไซม์

Wong, et. al. (1988) จากการศึกษาพบว่า FeSO_4 และ CaCl_2 ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของ *Aspergillus* spp. และพบว่า CuSO_4 , MnSO_4 และ AgNO_3 กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ การเติม EDTA จะช่วยกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ได้เล็กน้อยเนื่องจากอาจจะเป็นตัวกำจัดไอออนของโลหะ(chelating agent) ออกจากสารละลายเอนไซม์ (Antony; et. al., 2002) การเพิ่ม Co^{+} , Zn^{+} และ Cd^{+} ช่วยเพิ่มการยึดเกาะของเอนไซม์ไลเปสกับไขมันที่ไม่สามารถละลายน้ำ (Ratanakhanokchai, et. al. 1999)

2.6.5 อุณหภูมิ

จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิในช่วงกว้าง ความร้อนสามารถถ่ายโอนผ่านผนังเซลล์ได้อย่างอิสระและมีผลโดยตรงต่อเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ในระหว่างการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์จะมีความร้อนเกิดขึ้น และถ่ายเทลงสู่อาหารเมื่ออุณหภูมิสูงจนถึงระดับหนึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ จึงต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khanna; et. al. (1993) ศึกษาการผลิต การคัดแยกและการทำให้เอนไซม์ไซลานเนสบริสุทธิ์จาก *Aspergillus* sp. PK-7 จากการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 10.6 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Bailey and Vikari (1993) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดย *A. fumigatus* VTT-D-82195 และ *A. oryzae* VTT-D-85248 บนอาหารที่มีไซเลนเป็นองค์ประกอบ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราทั้งสองเท่ากับ 29 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Singh, et. al. (1995) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดย *F. oxysporum* NTG-19 สายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูง ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 53.0 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Costa-Ferreira, et. al. (1994) ศึกษาการผลิตกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซเลนโดย *A. oryzae* ที่ถูกคัดเลือก จากการทดลองพบว่าเชื้อราที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.6.6 พีเอช

พีเอชเป็นสิ่งแวดล้อมภายนอกที่สัมพันธ์กับอาหารและเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส การเจริญเติบโตและการทำลายจุลินทรีย์ จุลินทรีย์จะมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญหรือการผลิตเอนไซม์เรียกว่าพีเอชเหมาะสม (optimum pH) พีเอชของอาหารมีอิทธิพลต่อการซึมผ่านของผนังเซลล์ พีเอชที่มีค่าสูงหรือต่ำจะทำให้ความสามารถของกรดหรือเบสที่อยู่ในสภาพที่มีโมเลกุลไม่แตกตัวซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ ทำให้พีเอชภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง

เนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักมีการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนและโปรตีนเกิดขึ้น ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่นๆออกมา (สมใจ ศิริโชค, 2537) ทำให้พีเอชอาจมีการเปลี่ยนแปลงจนถึงระดับที่จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้น้อยลง เพราะฉะนั้นการควบคุมพีเอชในการหมักให้อยู่ในระดับคงที่เป็นสิ่งที่จำเป็นซึ่งอาจใช้สูตรอาหารที่มีความเป็นบัฟเฟอร์ เช่น เติมน้ำเกลือเค็มคาร์บอเนตหรือฟอสเฟต

Laura, et. al. (1997) การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสซึ่งคงตัวที่อุณหภูมิสูงโดยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* ที่ทนร้อน พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 6.5 เมื่ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมคือ 4.3

Bailey and Poutanen (1989) ศึกษาการผลิตกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซเลนโดย *A. fumigatus* VTT-D-82195 พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของมีค่าสูงสุดเมื่อพีเอชเท่ากับ 4.8 โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 336 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wang, et. al. (1994) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของ *Aspergillus* sp. G-393 พบว่าที่พีเอช 7.0 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 4.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Hop, et. al. (1994) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดย *Thermomyces lanuginosus* RT9 ซึ่งพีเอชที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วง 5.0-8.0 พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 6.6 เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

2.6.7 ปัจจัยอื่นๆ

ในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยไซเลนโดย *A. terreus* ใช้ไซเลน ไซโลไบโอสหรือดี-ไซโลส เป็นสับสเตรทในการเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น แต่ทว่าเมื่อใช้เซลลูโลสหรือเซลโลไบโอส จะเกิดการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส (Hrmova, et. al. 1989) จลนพลศาสตร์ของการปลดปล่อยเอนไซม์ไซลานเนสจากจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรทที่ใช้เป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลานเนส ตลอดระยะเวลาการหมักหากมีการใช้ประโยชน์จากตัวเหนี่ยวนำที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ ให้หมักลงอย่างช้าๆ ซึ่งเป็นการเพิ่มระยะเวลาการหมัก ทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงขึ้น (Purkarthofer and Steiner, 1995)

การเติมสารลดแรงตึงผิว เช่น Tween 80 พบว่ามีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา จากการศึกษารายงานของแรงตึงผิวที่ใช้เป็นตัวกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ของ Reese and Maguire (1969) พบว่าเมื่อเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของ *A. fumigatus* ในสภาวะอาหารเหลวเพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม Tween 80

เนื่องจากกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนสเป็นกระบวนการที่ต้องการอากาศ ผลของแรงเฉือนและแรงทางกายภาพมีผลต่อเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย การเปลี่ยนแปลงของสัณฐานวิทยาและการแตกหักของไฮฟา รวมทั้งการเกิดรูวักภายในเซลล์ (Thomus, 1990) เพราะฉะนั้น การควบคุมการให้อากาศและความเร็วรอบในการเขย่าจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะมีผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ โดยปกติความเร็วรอบในการเขย่าที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์หรือการเจริญของเชื้อราอยู่ในช่วง 100-220 รอบต่อนาที

Haltrich, et. al. (1996) การเพิ่มพื้นที่ผิวของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ใช้เป็นสับสเตรทด้วยการบดจะทำให้มีการปลดปล่อยน้ำตาลที่ละลายได้ (soluble sugar) อย่างช้าๆ ซึ่งมีประโยชน์ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

Sugden and Bhat (1994) การลดขนาดของอนุภาคของฟางข้าวบาเลย์หรือข้าวสาลี 2-3 จนกระทั่ง 0.20-0.25 มิลลิเมตร ซึ่งใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดย *Sporotrichum thermophile* พบว่ามีผลในทางลบต่อปริมาณเอนไซม์ที่ได้ ในขณะที่การผลิตชีวมวลสูงขึ้นประมาณร้อยละ 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลานเนส

เนื่องจากคุณสมบัติและความอุดมสมบูรณ์ของไซเลนในธรรมชาติ การใช้เอนไซม์ไซลานเนส จึงเป็นกระบวนการที่สำคัญในการประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ส่วนใหญ่ใช้เอนไซม์นี้ในการประยุกต์ใช้ที่มีัญพืชเป็นส่วนประกอบ เช่น อุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (Wong, et. al. 1992 and Bhat, 2000) เอนไซม์ไซลานเนสนี้ใช้ในการปรับปรุงกระบวนการคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้ายโดยการย่อยสลายและปรับปรุงปริมาณ (อะราบิโน) ไซเลน

2.7.1 การใช้เอนไซม์ไซลานเนสในการทำขนมปัง

การใช้เอนไซม์ไซลานเนสในการทำขนมปังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการขยายตัวของโด (dough) เช่น เวลาในการขยายตัว ความหนาแน่น การขยายตัว และการทนทานต่อการสลายตัว การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สามารถเห็นได้ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของขนมปัง ซึ่งเป็นการปรับปรุงของปริมาณของก้อนขนมปังและโครงสร้างของขนมปัง (Rouau et. al., 1993 ; Poutanen et. al., 1997 ; Rouau et. al., 1994 ; Maat et. al., 1992 ; Hillhorst et. al., 1999 ; Courtin et.al., 2001 and Sorensen et. al., 2003)

หน้าที่ของเอนไซม์ไซลานเนสเกี่ยวข้องกับความสามารถในการละลายของอะราบิโน-ไซเลนที่มีน้ำในโมเลกุล (water-unextractable arabinoxylan) และการเปลี่ยนแปลงความหนืดของโด (Rouau et. al., 1994 ; Courtin et. al., 2002 and McCleary et. al., 1986) เอนไซม์ไซลานเนสทำหน้าที่ย่อยสลาย (hydrolyse) อะราบิโนไซเลนที่ไม่มีการดึงน้ำออกได้มากกว่าอะราบิโนไซเลนที่มีการสกัดน้ำออก (waer-extractable arabinoxylan) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงและความสามารถในการละลายของอะราบิโนไซเลนก็มีผลต่อการย่อยสลาย (Maat, et. al. 1992) เอนไซม์ไซลานเนสจะทำให้โดเหนียวและอ่อนตัวเนื่องจากการสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะของน้ำ (water holding capacity)

2.7.2 การใช้เอนไซม์ไซลานเนสในอาหารสัตว์

ัญพืชเป็นส่วนผสมหลักในอาหารของสัตว์ปีก อย่างไรก็ตามพบอะราบิโนไซเลนในอาหารสัตว์ซึ่งมีข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ และข้าวสาลี เป็นส่วนประกอบ รู้กันว่าทำให้เกิดผลกระทบจากการต่อต้านอาหาร (anti-nutritive) ในอาหารที่ใช้เลี้ยงไก่ เนื่องจากคุณสมบัติของอะราบิโนไซเลนต่อการเพิ่มความหนืด ในสัตว์ปีกการเพิ่มความหนืดนี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในลำไส้ซึ่งเป็นที่ดูดซึมสารอาหารจะทำให้เวลาในการย่อยลดลง (Choct, et. al. 1988) การแพร่ของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยอาหารลดลง (Pettersson; et. al. 1988) ซึ่งจะทำให้การใช้อาหารสัตว์ไม่มีประสิทธิภาพและการ

เจริญเติบโตของสัตว์ปีกลดลง การใช้เอนไซม์ไซลานเนสในอาหารสัตว์ทำให้ลดผลกระทบจากการต่อต้านอาหารโดย อะราบีโนไซเลนและความหนืดของอาหารสัตว์

ประโยชน์ของการเติมเอนไซม์ไซลานเนสทำให้เกิดการย่อยสลายผนังเซลล์ของธัญพืช เพิ่มการใช้สารอาหารให้ง่ายขึ้น หรือปลดปล่อยชิ้นส่วนไซเลนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Bedford, 2003) การเติมเอนไซม์ไซลานเนสมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสัตว์น้อยมาก (Graham, 1992) เอนไซม์จะช่วยแก้ปัญหาคับขี้และการขับถ่ายและปัญหาการกำจัดของเสียโดยการลดปริมาณน้ำของมูลสัตว์ (Bhat, 2000 and Graham, 1992) ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อม

2.7.3 การแยกแป้งกลูเตน (gluten starch)

เอนไซม์ไซลานเนสมีความสำคัญและช่วยกระบวนการในอุตสาหกรรมการแยกแป้งกลูเตนออกจากข้าวสาลี (Weegles et. al., 1992 and Christopherson et. al., 2001) การใช้เอนไซม์ไซลานเนสช่วยเพิ่มผลผลิตของแป้งกลูเตนให้สูงขึ้นและปรับปรุงคุณภาพของกลูเตน (Christopherson, et. al. 2001) การปรับปรุงผลผลิตของกลูเตนโดยการลดความหนืด ซึ่งเป็นผลมาจากการย่อยสลายบางส่วนของอะราบีโนไซเลนที่มีการสกัดน้ำออก (Redgewell, et. al. 1997)

2.7.4 การผลิตเบียร์

การเติมเอนไซม์ไซลานเนสช่วยลดความหนืดของเบียร์ที่คั้นแล้วแต่ยังไม่ได้หมักหรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า น้ำเวิร์ท (wort) เพื่อลดความข้นของเบียร์ (Debyser et. al., 1997 ; Vietor et. al., 1993 ; Ducroo and Frelon, 1989 ; Cach et. al., 1995 ; Coote and Kirsop, 1976) เนื่องจากเอนไซม์ไซลานเนส ช่วยลดความหนืดและความสามารถในการขี้นเกาะของน้ำของอะราบีโนไซเลนทำให้เพิ่มอัตราในการกรองและการป้องกันการสกรบกบนแผ่นเมมเบรน (filtration membrane)

2.7.5 การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

เอนไซม์ไซลานเนสมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติของอาหารที่ประกอบด้วยธัญพืช โดยช่วยปรับปรุงปริมาณเส้นใย (fiber) เส้นใยที่สามารถละลายน้ำได้จะมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น ช่วยลดระดับของคอเลสเตอรอลในน้ำเลือดซึ่งช่วยลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและโรคเบาหวาน (Haskell, et. al. 1992 and Glore, et. al. 1994) เนื่องจากเอนไซม์ไซลานเนสมีความสำคัญต่อระดับการละลายได้ของอะราบีโนไซเลนในขนมปัง (Laurikainen; et. al. 1994) นอกจากนี้ชิ้นส่วนเล็กๆ ของอะราบีโนไซเลนเป็นผลมาจากการย่อยด้วยกลุ่มเอนไซม์ไซลานเนสยังมีผลต่อสุขภาพในมนุษย์อีกด้วย (Campbell, et. al. 1997)

2.7.6 กระดาษและเนื้อเยื่อไม้

เอนไซม์ไซลานเนสถูกนำมาเข้าสู่อุตสาหกรรมกระดาษและเนื้อเยื่อไม้เมื่อ 20 ปีมาแล้ว (Beg, et. al. 2001) Viikari, et. al. (1986) เป็นคนแรกที่เสนอรายละเอียดการบำบัด (treatment) เนื้อเยื่อไม้ด้วยเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) และเอนไซม์ไซลานเนสมีชื่อเสียงอย่างมากในการลดความต้องการในการใช้คลอรีนเพื่อการฟอกสี เอนไซม์ไซลานเนสนี้จะทำให้ไซแลนแตกหักภายในส่วนเมทริก(matrix) ของเนื้อเยื่อไม้ (Paice, et. al. 1992) ทำให้โครงสร้างระหว่างเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ที่เชื่อมต่อกันแน่นเปิดออกอย่างพอเพียง ซึ่งจะช่วยให้สารเคมีที่ใช้ฟอกสีเข้าไปทำปฏิกิริยาต่อส่วนที่เหลือของลิกนินได้ดี (Clark et. al., 1991 ; Clarke et. al., 1997 ; Harris et. al., 1997 ; Wong et. al., 1997 and Suurnakki et. al., 1997) เอนไซม์ไซลานเนสสามารถเกิดปฏิกิริยากับไซแลนที่เกิดขึ้นใหม่และปลดปล่อยลิกนินในภายหลัง (Patel, et. al. 1993)

2.7.7 ัญพืชที่ใช้เป็นเชื้อเพลิง ของเสียจากการเกษตรและการป่าไม้

ในแต่ละปีสูญเสียค่าขนส่งชีวมวลจากธัญพืชที่ใช้เป็นเชื้อเพลิง ของเสียที่เหลือจากการเกษตรและการป่าไม้อย่างมากจึงมีการใช้เอนไซม์ไซลานเนสให้เป็นประโยชน์ คือเอนไซม์ไซลานเนส สามารถใช้เพื่อเปลี่ยนไซแลนไปเป็นไซโลสในของเสียที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ (Rani and Nand, 1996) เอนไซม์ไซลานเนสรวมกับเอนไซม์อื่นๆ เช่น แมนแนนเนส (mannanase) ลิกนินเนส (ligninase) ไซโลซิเดสและอื่นๆ สามารถใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น เอทานอลและไซลิทอลจากชีวมวลของพืช (Dominguez , 1998 ; Kuhud and Singh, 1993 and Galbe and Zacchi , 2002) กระบวนการชีวภาพของการผลิตเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงต้องการการแยกลิกนินออกจากลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เพื่อปลดปล่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส แล้วจึงทำการดีพอลิเมอร์ไรซ์ (depolymerisation) พอลิเมอร์ของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate polymer) เพื่อผลิตน้ำตาลอิสระ (free sugar) ซึ่งใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล (Lee, 1997)

ตารางที่ 2.2 การผลิตเอนไซม์ไซลันเนสและเซลลูเลสโดยจุลินทรีย์บางชนิดในสภาวะอาหารเหลว (submerged cultivation)

Organism	Substrate	Cultivation condition	Xylanase	Cellulase	Reference
			Activitu (IU/ml)	CMCase (IU/ml)	
<i>Arthrographis</i> sp. strain F4	Cellulose 10 g/l	Shake flask, pH 5.5 30°C , 72 h	8.95	13.37	(Okeke & Obi , 1993)
<i>Aspergillus</i> <i>awamori</i> VTT-D-75028	Wheat bran 30 g/l	Fermentation, pH 5.5 30°C , 96 h	12.0	3.2	(Poutanen et al., 1987)
<i>A. awamori</i> AANTG 43	Oat straw 20 g/l	4-1 Fermentation, pH 4.0 30°C , 50 h	820(97)	N/A	(Smith & Wood , 1991b)
	Glucose 5 g/l+ oat spelt xylan 10 g/l	Shake flask, 30°C , 7 days	1159(132)	N/A	(Smith & Wood , 1991a)
<i>A. fischeri</i> Fxn1	Wheat bran 5 g/l	Shake flask, pH 9.5 30°C , 60 h	45	<0.01	(Chandra Raj & Chandra, 1995)
<i>A. foetidus</i> VTT-D-71002	Solka Floc 30 g/l+BMX 5 g/l	Shake flask, pH 4.8 30°C , 7 days	276	N/A	(Bailey & Poutanen, 1989)
<i>A. nidulans</i> CECT 2544	Oat spelt xylan , 10 g/l	Shake flask, 37°C , 48 h	9.75	N/A	(Fernfindez-Espinar et al., 1992)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Organism	Substrate	Cultivation condition	Xylanase	Cellulase	Reference
			Activity (IU/ml)	CMCase (IU/ml)	
<i>A. niger</i> CCMI 850	birchwood xylan 40 g/l	Shake flask, 30°C, 10 days	66	ND	(Costa-Ferreira <i>et al.</i> , 1994)
<i>A. niger</i> KKS	rice straw, 10 g/l	300-ml bubble column fermentation, immobilized, cells, pH 7.0, 30°C, 6 days	138	1.2	(Kang <i>et al.</i> , 1995)
<i>A. niger</i> NRCC 401127	wheat bran, 10 g/l	shake flask, 30°C, 96 h	27.1	N/A	(Johnson <i>et al.</i> , 1989)
<i>A. ochraceus</i> NG-13	xylan, 6 g/l	shake flask, pH6.5, 28°C, 6 days	120	N/A	(Biswas <i>et al.</i> , 1990)
	sugarcane bagasse, 6 g/l	shake flask, pH6.5, 28°C, 7 days	46.0	N/A	(Biswas <i>et al.</i> , 1990)
<i>A. sydowii</i> MG 49	oat spelt xylan, 0.1 g/l	static culture, pH4.0, 30°C, 4 days	3.64	ND	(Ghosh <i>et al.</i> , 1993)
<i>A. terreus</i> F-413	beechwood xylan, 10 g/l	shake flask, 30°C, 8 days	2.73	0.07	(Hrmova <i>et al.</i> , 1989)
	cellulose, 10 g/l	shake flask, 30°C, 8 days	2.51	3.94	(Hrmova <i>et al.</i> , 1989)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Organism	Substrate	Cultivation condition	Xylanase	Cellulase	Reference
			Activity (IU/ml)	CMCase (IU/ml)	
<i>A. terreus</i> VTT-D-82209	Solka Floc 30 g/l +BMX 5 g/l	shake flask, pH 4.8 , 30 °C , 7 days	156	N/A	(Bailey & Poutanen, 1989)
<i>Cephalosporium</i> sp. NCL 87.11.9	wheat bran, 50 g/l	shake flask, pH 5, 28 °C , 96 h	36.2	0.05	(Bansod <i>et al.</i> , 1993)
<i>Chaetomium</i> <i>globosum</i> II-Ch.g./5	wheat bran, 30 g/l	shake flask, pH 4.8, 30 °C, 9 days	65.3	1.5	(Wiacek-Zychlinska <i>et al.</i> , 1992)
<i>Fusarium oxysporum</i> NTG-19	wheat bran, 30 g/l	shake flask, pH 5.0, 30 °C 120 h	53.0	N/A	(Singh <i>et al.</i> , 1995)
<i>F. oxysporum</i> VTT-D-80134	wheat bran, 30 g/l	laboratory fermentation, pH 5.5, 30°C, 120 h	3.7	0.7	(Poutanen <i>et al.</i> , 1987)
<i>Gliocladium virens</i>	wheat straw, 20 g/l	3-l fermentation, pH 5.0, 30°C, 39 h	24.0	N/A	(Gomes <i>et al.</i> , 1989a)
<i>Penicillium</i> <i>janthinellu</i> 87M-115	sugarcane bagasse hydrolyzate 23 g/l total sugars	shake flask, pH 5.8, 30°C, 96 h	36.8	0.35	(Milagres & Duran, 1992)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Organism	Substrate	Cultivation condition	Xylanase	Cellulase	Reference
			Activity (IU/ml)	CMCase (IU/ml)	
<i>Penicillium purpurogenum</i>	wheat straw, 10 g/l	shake flask, pH 5.5, 28°C, 12 days	10.4	5.9	(Steiner <i>et al.</i> , 1994)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 32629	oat spelt xylan, 10 g/l	shake flask, pH 6.0, 37°C, 48 h	19.6	N/A	(Brana-Castillo & Berry, 1992)
<i>Rhizoctonia solani</i>	barley leaf cell wall preparation, 20 g/l	shake flask, 28°C, 8 days	20.0	N/A	(Peltonen, 1995)
<i>Rhizomucor pusillus</i> MH3	birchwood xylan, 10 g/l	shake flask, pH 5.2, 55°C, 6-7 days	205	N/A	(Hoq & Deckwer, 1995)
<i>Schizophyuum commune</i> ATCC 38548	black spruce sawdust, 40 g/l	10-1 fermentation, pH 3.9, 30°C, 9 days	0.37	N/A	(Paice <i>et al.</i> , 1978)
<i>S. radiatum</i> CMI 90347	wheat straw, steam exploded, 10 g/l	2.1-1 fermentation, 25°C, 6 days	5.7	2.3	(Cavazzoni <i>et al.</i> , 1989)
<i>Termitomyces clypeatus</i>	oat spelt xylan, 10 g/l	shake flask, pH 5.0, 30°C, 8 days	20	N/A	(Sinha & Sengupta, 1995)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Organism	Substrate	Cultivation condition	Xylanase	Cellulase	Reference
			Activity (IU/ml)	CMCase (IU/ml)	
<i>Sporotnchum thermophile</i> IIS 72	barley straw, 10 g/l	shake flask, 50°C, 6 days	1.4	0.49	(Sugden & Bhat, 1994)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> C436	oat spelt xylan, 10 g/l	shake flask, 45°C, 10 days	575.9	8.7	(Yu <i>et al.</i> , 1987)
<i>T. aurantiacus</i> BT 2079	wheat straw, steamed, 32.4 g/l	shake flask, 45°C, 10 days	321	11.6	(Gomes <i>et al.</i> , 1994b)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> DSM 5826	corn cobs, 31.2 g/l	30-l fermentation, pH 7.5, 50°C, 118 h	1950	ND	(Purkarthofer <i>et al.</i> , 1993b)
<i>T. lanuginosus</i> RT9	birchwood xylan, 20 g/l	10-l fermentation, pH 6.5, 50°C, 34h	1418	ND	(Hoq <i>et al.</i> , 1994)
<i>Thielavia terrestris</i> 255B	oat spelt xylan, 10 g/l	shake flask, 44°C, 64 h	36	0.65	(Gilbert <i>et al.</i> , 1992)
<i>Thielaviopsis Basicola</i>	rice straw, 20 g/l	shake flask, 30°C, 9 days	34	N/A	(Ghosh & Deb, 1988)
<i>Trichoderma Lignorum</i>	arabinoxylan, 15 g/l	8-l fermentation, pH 5.2, 29°C, 75 h	123	N/A	(John & Schmidt, 1988)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Organism	Substrate	Cultivation condition	Xylanase	Cellulase	Reference
			Activity (IU/ml)	CMCase (IU/ml)	
<i>Trichoderma harzianum</i> E58	aspenwood steam exploded+ water extracted 10 g/l	shake flask, 28°C, 6 days	450	66	(Saddler <i>et al.</i> , 1985)
<i>T. reesei</i> C30	larchwood xylan, 10 g/l	shake flask, 28°C, 6 days	230	9	(Saddler <i>et al.</i> , 1985)
<i>T. reesei</i> MCG-77	wheat straw, steamed, 20 g/l	5-1 fermentation, pH 6.0, 30°C, 60 h	130	N/A	(Doppelbauer <i>et al.</i> , 1987)
<i>T. reesei</i> Rut C-30	beechwood xylan, 30 g/l	10-1 fermentation, pH 7.0, 29°C, 92.5 h	1370	9.0	(Bailey <i>et al.</i> , 1993)
<i>T. viride</i> BT 2169	sulfite pulp, 20 g/l	shake flask, pH 5.5, 33°C, 144 h	190	N/A	(Gomes <i>et al.</i> , 1992)

ที่มา : Dietmar Haltrich et. al. (1997)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุ

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ชั่งข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อย ที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร

3.1.2 จุลินทรีย์

เชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus*

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ไซลาลเนสและเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก ข)

3.2 อุปกรณ์

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) และกล้องจุลทรรศน์

เครื่องกวนระบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

ตู้อบเชื้อ (Incubator)

ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow)

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 และ 3 ตำแหน่ง

ไมโครปิเปต (Micropipette)

เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อราทนอุณหภูมิสูง (ภาคผนวก ก)

3.3.2 อาหารเหลวสำหรับการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์ ไซลาลเนสและใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลาลเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การเตรียมเชื้อรา

3.4.1 การเลี้ยงเชื้อราเพื่อหามีการสร้างสปอร์

ทำการเชื้อราบนอุณหภูมิสูงจากเชื้อเริ่มต้นนำมาตากลงหลอดอาหาร potato dextrose agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 4 วัน

3.4.2 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา

นำหลอดอาหารที่มีเชื้อรา (จากข้อ 3.4.1) เดมน้ำกลั่นที่ผสมสารละลาย tween 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้ขวดดูดชุดสปอร์ให้กระจายในสารละลาย และนำมาทำการนับสปอร์ของเชื้อ เริ่มต้นให้หมีจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5 การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการเตรียมสูตรอาหารทั้งสามสูตร (ภาคผนวก ก) นำมาบรรจุในเอเลนเมเยอร์ฟลาสก์ (Elenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร (สูตรอาหารละ 3 ฟลาสก์) โดยในแต่ละฟลาสก์บรรจุอาหาร 50 มิลลิลิตร และบรรจุขี้ข้าวโพดความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอชเป็น 6.0 ทำการฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมสารละลายสปอร์เริ่มต้น (จากข้อ 3.4) นำมาเลี้ยงที่สภาวะเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สุ่มเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเก็บในวันที่ 2 , 3 , 4 , 5 นำตัวอย่างที่เก็บมาทำการแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวัดพีเอชและนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุด

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราบนอุณหภูมิสูง

3.6.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อราบนอุณหภูมิสูงในอาหารเหลว (จากข้อ 3.5) แล้วทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ขี้ข้าวโพด เปลือกข้าวโพดและขานอ้อย (ทำการทดลองชนิดละ 3 ข้ำ) บดให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ทำการปรับพีเอชเป็น 6.0 ขึ้นตอนต่อจากนี้ทำตามข้อ 3.5 ทำการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุด และนำแหล่งคาร์บอนที่ได้มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อราบนอุณหภูมิสูงในอาหารเหลวและมีแหล่งคาร์บอนที่มีขนาดไม่เกิน 0.75

มิลลิเมตร (จากข้อ 3.6.1) โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 1.0 , 2.0 , 3.0 (ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ชั่วโมง) ปรับพีเอชเป็น 6.0 ขั้นตอนต่อจากนี้ทำตามข้อ 3.5 ทำการคัดเลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเลสสูงสุดและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุด และนำความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ได้มาใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3.6.3 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลส

ทำการเลี้ยงเชื้อราทนอุณหภูมิสูงในอาหารเหลวที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือก (จากข้อ 3.6.1 และ 3.6.2) โดยทำการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด (yeast extract) ทริปโตน (tryptone) โดยมีชุดควบคุม คือชนิดของแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหาร (เปปโตนผสมกับยีสต์สกัด) เป็นชุดเปรียบเทียบ (ทำการทดลองชนิดละ 3 ชั่วโมง) และกำหนดให้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดเท่ากัน คือความเข้มข้นร้อยละ 0.0612 ทำการปรับพีเอชเป็น 6.0 ขั้นตอนต่อจากนี้ทำตามข้อ 3.5 โดยทำการคัดเลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเลสสูงสุดและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุด และนำชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ได้มาใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3.6.4 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลส

ทำการเลี้ยงเชื้อราทนอุณหภูมิสูงในอาหารเหลวที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (จากข้อ 3.6.1 และ 3.6.2) ชนิดของแหล่งไนโตรเจน (จากข้อ 3.6.3) โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจน ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 , 0.10 , 0.15 , 0.20 , 0.25 โดยมีชุดควบคุม คือความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.0612) ในสูตรอาหารเป็นชุดเปรียบเทียบ (ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ชั่วโมง) ทำการปรับพีเอชเป็น 6.0 ขั้นตอนต่อจากนี้ทำตามข้อ 3.5 โดยคัดเลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเลสสูงสุดและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุด และนำความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ได้มาใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3.6.5 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลส

ทำการเลี้ยงเชื้อราทนอุณหภูมิสูงในอาหารเหลวที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (จากข้อ 3.6.1 และ 3.6.2) ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (จากข้อ 3.6.3 และ 3.6.4) โดยทำการแปรผันพีเอชของอาหารเริ่มต้น ได้แก่ พีเอช 4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.0 , 8.0 , 9.0 และ 10.0 (ทำการทดลองพีเอชละ 3 ชั่วโมง) ทำการปรับพีเอชก่อนการฆ่าเชื้อ ทำการฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ขั้นตอนต่อจากนี้ทำตามข้อ 3.5 โดยคัดเลือกพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเลสสูงสุดและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุด

3.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.7.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส

นำสารละลายเอนไซม์ที่มีความเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำสารละลายไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำสารละลายกรดไคนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที นำมาหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำมาคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส (ภาคผนวก ข)

3.7.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

นำสารละลายเอนไซม์ที่มีความเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethylcellulose ; CMC) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรที่ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำสารละลายกรดไคนโตรซาลิไซลิก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำมาหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำมาคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ข)

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง) แบบ Duncan's new Multiple-Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 11.0

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง

Aspergillus fumigatus

4.1.1 สูตรอาหารและชนิดของแหล่งคาร์บอน

ผลของสูตรอาหารและชนิดแหล่งคาร์บอนซึ่งประกอบด้วยสูตรอาหารของ Singh; et. al. (1998) สูตรอาหารของ Ikura and horikoshi (1987) และอาหารของ Carter and Bull (1969) (ภาคผนวก ก) ที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ ช้างข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และขานอ้อย ที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* จากผลการทดลอง (แสดงดังรูปที่ 4.1) พบว่าเมื่อใช้สูตรอาหารของ Singh, et. al. (1998) (ภาคผนวก ก) และใช้ช้างข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6 เป็นเวลา 5 วัน จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 45.63 หน่วยต่อมิลลิลิตร และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จะสูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น (สูตรอาหารเดียวกัน) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสถิติจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค ดังตารางที่ ค.1)

จากผลการทดลองเมื่อใช้สูตรอาหารของ Ikura and horikoshi (1987) (ภาคผนวก ก) และใช้ช้างข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน นำมาเลี้ยงที่สภาวะเช่นเดียวกันกับสูตรอาหารของ Singh, et. al. (1998) พบว่าจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 31.48 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค ดังตารางที่ ค.2) และเมื่อใช้สูตรอาหารของ Carter and Bull (1969) และช้างข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากับกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 34.79 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค ดังตารางที่ ค.3) ดังนั้นจึงเลือกสูตรอาหารของ Singh, et. al. (1998) เป็นสูตรอาหารที่ใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส โดยใช้ช้างข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus*

จากผลของแต่ละสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อว่ามีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสไม่เท่ากันนั้น อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากชนิดและความเข้มข้นของแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน จากการศึกษาของ Ratabnarakhanokchai, et. al. (1998) พบว่า Fe^{2+} , Ca^{2+} , และ Mg^{2+} มีผลช่วยในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส ดังนั้นสูตรอาหารของ Singh, et. al. (1998) ซึ่งมีแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และแคลเซียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอไรด์ (CaCl_2) ความเข้มข้นร้อยละ 0.03 เป็นองค์ประกอบ โดยความเข้มข้นของแร่ธาตุทั้ง 2 (Ca^{2+} , Mg^{2+}) มีปริมาณมากกว่าสูตรอาหารของ Ikura and horikoshi (1987) และ Carter and Bull (1969) ทำให้ในการเลี้ยงเชื้อราด้วยสูตรอาหารของ Singh, et. al. (1998) เชื้อราจะสามารถสร้างเอนไซม์ไซลานเนสและได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด ยังพบว่า Mn^{2+} มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส ทำให้การใช้สูตรอาหารของ Carter and Bull (1969) ในการเลี้ยงเชื้อราได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสต่ำสุด อาจมีสาเหตุมาจากมีแมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส



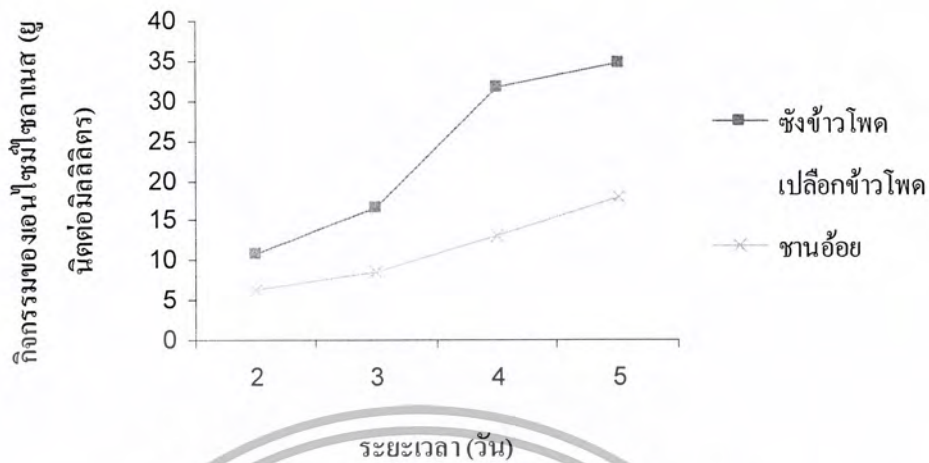
รูปที่ 4.1 ผลของสูตรอาหาร Singh, et. al. (1998) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* เมื่อมีการแปรผันแหล่งคาร์บอน คือ ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และชานอ้อย ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่สภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.0 เป็นระยะเวลา 5 วัน

จากการที่เชื้อรา *Aspergillus fumigatus* สามารถใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีที่สุด อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบภายในของซังข้าวโพดมีเฮมิเซลลูโลสอยู่เป็นจำนวนมาก คือ ร้อยละ 39 และมีลิกนินอยู่ในปริมาณน้อย ซึ่งลิกนินเป็นส่วนที่ย่อยสลายได้ยากเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ (Barder and Benedito de Barder, 1974 ; Kuhad, 1999) อีกทั้งอาจเนื่องจากการเรียงตัวของไซแลนในโครงสร้างของซังข้าวโพดอยู่ในตำแหน่งที่ย่อยสลายได้ง่ายกว่า ส่วนเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนที่สามารถนำไปใช้ได้ดียิ่งที่สุดเมื่อเทียบกับเซลลูโลสและลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของซังข้าวโพด

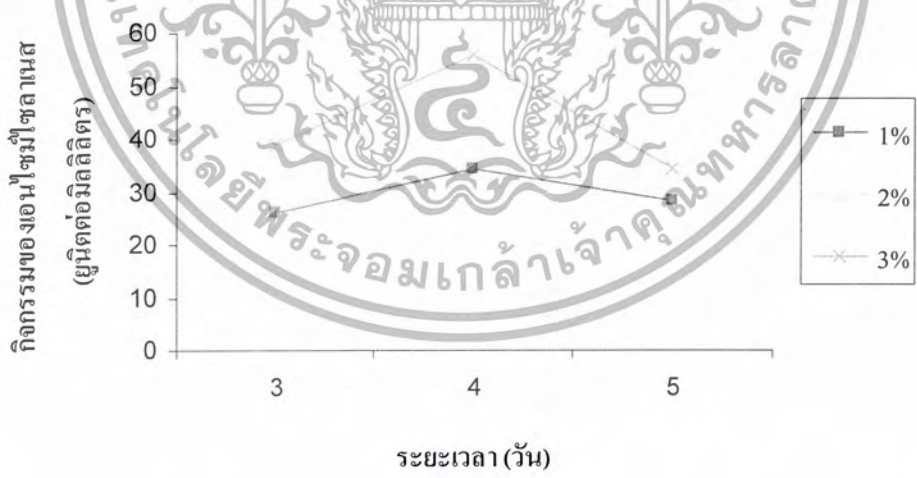
(Kuhad, 1999) ดังนั้นซังข้าวโพดจึงสามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้มากที่สุด ประกอบกับในซังข้าวโพดอาจมีแหล่งของสารอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งไนโตรเจน วิตามิน แร่ธาตุ เป็นต้น ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อราจึงช่วยส่งเสริมให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้มากขึ้น (Purkarthofer, et. al. 1993b) ผลการทดลองที่ได้นี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Purkarthofer, et. al. (1993b) ซึ่งรายงานว่าซังข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์แลนสของเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น และเมื่อใช้ซังข้าวโพดบดความเข้มข้น 31.2 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวปริมาตร 30 ลิตร อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด 1,950 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความสามารถในการผลิต (productivity) เท่ากับ 16,525 ยูนิตต่อลิตรต่อชั่วโมง¹ และยังมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่ามีการใช้สารพวกเฮมิเซลลูโลสหรือพอลิกลูโคสซึ่งเป็นสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ เช่น รำ ข้าวสาลี ฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย เป็นต้น เพื่อเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อรา (Kesker, 1992 ; Kuhad et. al., 1999 ; Beg et. al., 2000a and Gupta et. al., 2001)



รูปที่ 4.2 ผลของสูตรอาหาร Ikura and Horikoshi (1987) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* เมื่อมีการแปรผันแหล่งคาร์บอน คือ ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และชานอ้อย และทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่สภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.0 เป็นระยะเวลา 5 วัน



รูปที่ 4.3 ผลของสูตรอาหาร Carter and Bull (1969) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลลาเนสของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* เมื่อมีการแปรผันแหล่งคาร์บอน คือ ช้างข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และชานอ้อย และทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.0 เป็นระยะเวลา 5 วัน



รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของช้างข้าวโพดที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลลาเนสของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่สภาวะ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.0 เป็นระยะเวลา 5 วัน

4.1.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

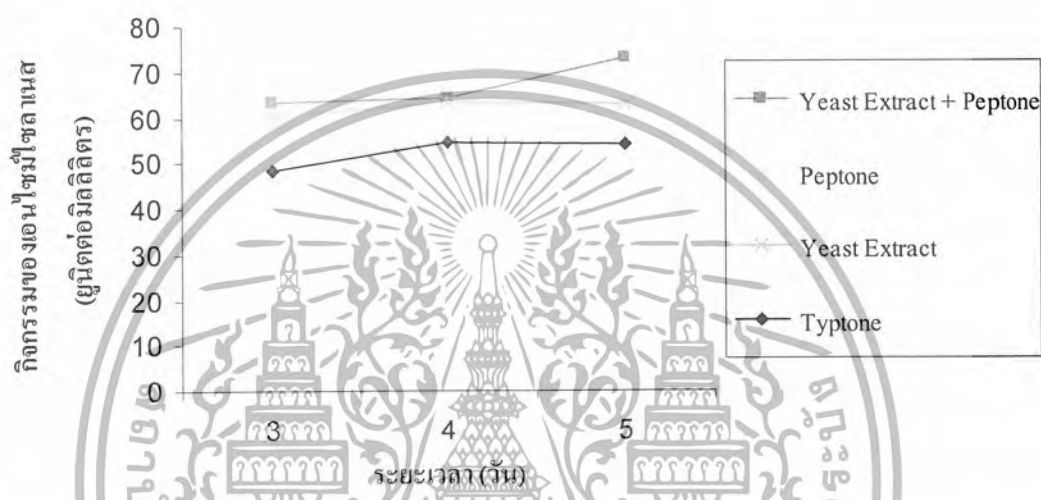
จากผลของการใช้ขังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 , 2.0 และ 3.0 เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ผลการทดลอง (แสดงดังรูปที่ 4.4) พบว่าเมื่อใช้ขังข้าวโพด ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3.0 เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลทำให้เชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 56.031 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นอื่นๆ ที่ใช้ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 (ภาคผนวก ก ดังตารางที่ ก.2)

มีงานวิจัยที่สอดคล้องกับการทดลองนี้โดย Lenartovicz, et al. (2003) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการใช้วัสดุเหลือทิ้งพวกกลีโคไลโนเซลลูโลสหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งแต่ละชนิดใช้ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 และ 3.0 สำหรับการผลิตเอนไซม์เบต้า - ไซโลซิเดส โดย *A. fumigatus* ในการหมักแบบสภาวะอาหารเหลวโดยใช้ขังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้า - ไซโลซิเดสสูงสุดเท่ากับ 45.40 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ Singh, et. al. (1995) รายงานว่าเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของรำข้าวสาลีจากความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เป็นร้อยละ 3.0 พบว่าปริมาณการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส โดยเชื้อ *Fusarium oxysporum* NTG-19 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Purkarthofer and Steiner (1995) มีการรายงานว่าผลศาสตร์ของการปลดปล่อยเอนไซม์ไซลานเนสของจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรตที่ใช้เป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลานเนส หากมีการใช้ประโยชน์จากตัวเหนี่ยวนำที่ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ ให้หมดลงอย่างช้าๆ โดยตลอดระยะเวลาของการหมัก ซึ่งเป็นการทำให้ระยะเวลาของการหมักยาวนานขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงขึ้น

4.1.3 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนซึ่งประกอบด้วยยีสต์สกัดผสมกับเปปโตน เปปโตน ยีสต์สกัด และทริปโตน ที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.0612 ผลการทดลอง (แสดงดังรูปที่ 4.5) พบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด คือยีสต์สกัดผสมกับเปปโตน ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 73.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น แต่เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติกับการใช้เปปโตนเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 (ภาคผนวก ก ดังตารางที่ ก.3) และการใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส 67.75 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกทำการทดสอบโดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนยีสต์สกัดผสมกับเปปโตน และเปปโตนเพียงอย่างเดียวในขั้นตอนต่อไป

จากผลการทดลองนี้ มีรายงานที่สอดคล้องกับผลการทดลองซึ่งสนับสนุนการใช้เปปโตนหรือยีสต์สกัดว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดของจุลินทรีย์ เพื่อใช้ในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเลสให้สูงขึ้น (Haltrich, et. al. 1993 and Purkarthofer, et. al. 1993a) อย่างไรก็ตาม การเติมแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างยีสต์สกัดและเปปโตนมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสไม่แตกต่างจากการใช้เปปโตนเพียงอย่างเดียว



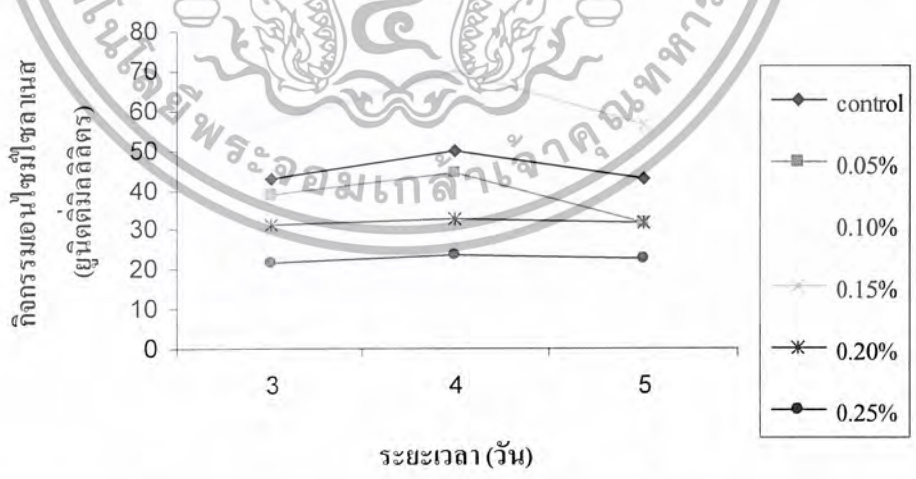
รูปที่ 4.5 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้นของอาหาร 6.0 เป็นระยะเวลา 5 วัน

4.1.4 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเปปโตนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลส

จากผลของการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของการใช้เปปโตนเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.05 , 0.10 , 0.15 , 0.20 , 0.25 ตามลำดับจากผลการทดลอง (แสดงดังรูปที่ 4.6) พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และความเข้มข้นของเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไฮโดรเลสได้สูงสุด คือความเข้มข้นร้อยละ 0.15 ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรเลสเท่ากับ 69.86 ยูนิตต่อมิลลิตร ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Kuhad, et. al. (1998) เรื่องการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสโดย *Fusarium oxysporum* สายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสได้สูง พบว่าการใช้เปปโตนสามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสได้ดีที่สุด

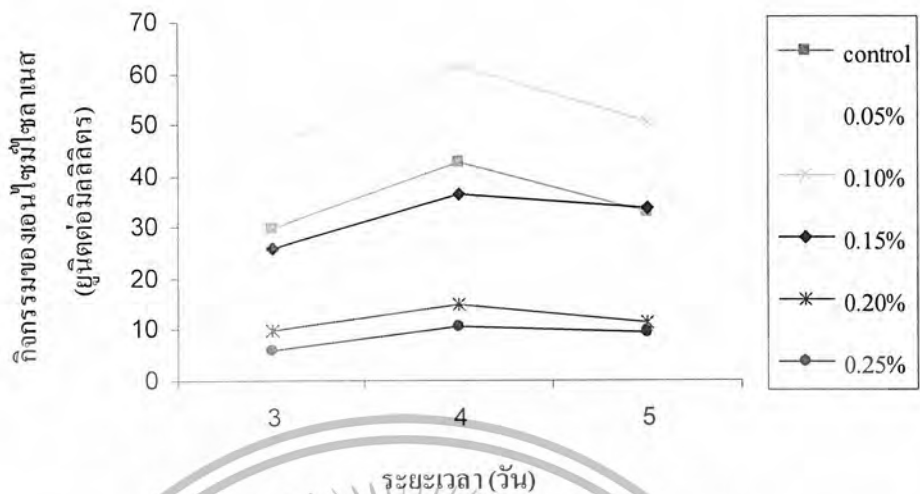
4.1.5 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนยีสต์สกัดผสมกับเปปโตนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

จากผลของการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของการใช้ยีสต์สกัดผสมกับเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 ตามลำดับ จากผลการทดลอง (แสดงดังรูปที่ 4.7) พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และความเข้มข้นของยีสต์สกัดผสมกับเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงสุด คือความเข้มข้นร้อยละ 0.10 ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 61.45 หน่วยต่อมิลลิเมตร ทำการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนยีสต์สกัดผสมกับเปปโตน และเปปโตนอย่างเดียวพบว่า การใช้เปปโตนเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด ซึ่งมากกว่าการใช้ยีสต์สกัดผสมกับเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดย *Pleurotus ostreatus* โดยทดสอบการใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งได้ผลสรุปแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสเรียงจากมากไปน้อย คือ เปปโตน > เนื้อสัตว์ > ยีสต์สกัด > ทริปโตเนน (Qinughe, et. al, 2003) เพราะฉะนั้นจึงเลือกแหล่งไนโตรเจนเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนในการทดลองขั้นต่อไป โดยเลือกเปปโตนที่ให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนร้อยละ 0.15



รูปที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเปปโตนเพียงอย่างเดียวที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *A. fumigatus* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่สภาวะ

เขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.0 เป็นระยะเวลา 5 วัน



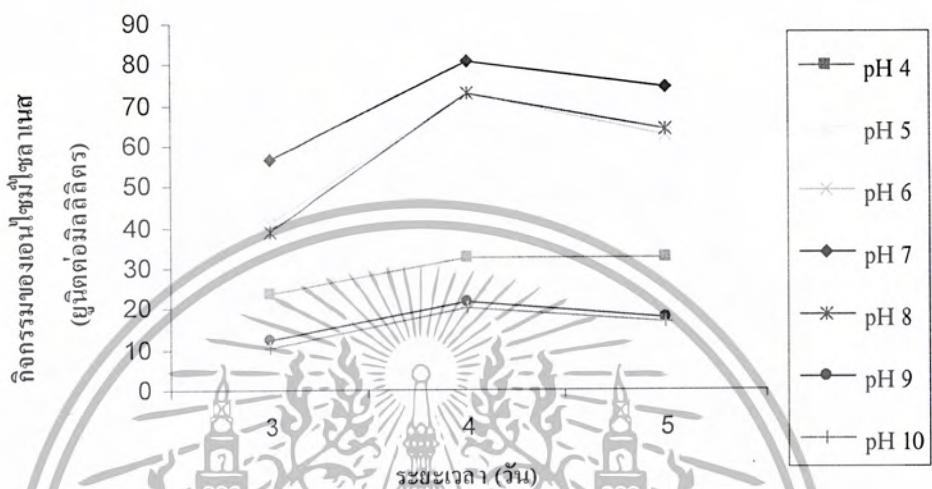
รูปที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนยีสต์สกัดผสมกับเปปโตนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่สภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.0 เป็นระยะเวลา 5 วัน

4.1.6 พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

จากผลการทดลองที่เอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* โดยทำการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 7.0 ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุดเท่ากับ 80.44 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัม ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวอื่นๆที่ได้ศึกษามา จากผลการทดลอง (แสดงดังรูปที่ 4.8) ยังพบว่าในน้ำหมักมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้น โดยมีค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 6.89, 7.75, 7.90, 8.48, 9.11, 9.22 และ 9.41 ตามลำดับ สมใจ ศิริโชค (2537) จากการทดลองพบว่าในระหว่างการหมักมีการย่อยสลายโปรตีนหรือสารประกอบไนโตรเจนเกิดขึ้น ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างชนิดอื่นๆออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นผลทำให้ค่าพีเอชของอาหารในระหว่างการหมักสูงขึ้น ดังนั้นจึงเลือกค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus*

มีรายงานที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้โดย Wang, et. al. (1994) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของ *Aspergillus* sp. G-393 พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Hop, et. al. (1994) ที่ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของสารอาหารในการหมักต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่ปราศจากเซลล์โดยเชื้อรา *T. lanuginosus* RT9 ในอาหารเปปโตนที่มีไขมันเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งค่าพีเอช

ที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วง 5.0 ถึง 8.0 พบว่าพีเอชเท่ากับ 6.6 เป็นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ซึ่งใกล้เคียงกับค่าพีเอช 7.0



รูปที่ 4.8 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่สถานะเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ เป็นระยะเวลา 5 วัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไโซแลนสโดยเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ในสภาวะอาหารเหลว คือใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราจำนวน 10^6 ต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อราในเออเลนเมเยอร์พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสูตรอาหารของ Singh, et. al. (1998) และใช้ขังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3.0 และใช้เปปโตनที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนร้อยละ 0.15 เป็นแหล่งไนโตรเจน ภายใต้อุณหภูมิที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 7.0 ตามลำดับ โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไโซแลนสนี้ พบว่า *Aspergillus fumigatus* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไโซแลนสสูงสุดเท่ากับ 80.43 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน และวัดค่าพีเอชสุดท้ายของน้ำหมักได้ 8.38

ข้อเสนอแนะ

1. การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว ควรศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ เช่น การควบคุมพีเอช การเติมสารเหนียวน้ำเอนไซม์ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว ความเร็วรอบในการเขย่า อัตราส่วนของปริมาณอาหารต่อขนาดของพลาสติกที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เป็นต้น
2. การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวเป็นระยะเวลามากกว่า 5 วัน เนื่องจากเชื้อราอาจจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไโซแลนสสูงสุด หลังวันที่ 5 ก็ได้ ดังเช่นการทดลองของ Royer and Nakas (1989) ซึ่งรายงานว่า *T. longibranchiatum* ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไโซแลนสสูงสุดเท่ากับ 272 หน่วยต่อมิลลิลิตร ณ วันที่ 6 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวในระดับพลาสติกที่ใช้ Solka Floe เป็นแหล่งคาร์บอนที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แต่ก็มีการศึกษาของ Christakopoulos; et. al. (1996) ได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในอาหารเหลว พบว่าเชื้อให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไโซแลนสสูงสุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยง
3. ควรศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อคาร์บอนว่าอัตราส่วนใดทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไโซแลนสได้ดีที่สุด
4. เนื่องจากขังข้าวโพดที่ผ่านการบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร อาจมีหลายขนาด ตั้งแต่ 0.45 – 0.75 มิลลิเมตร ปะปนกันอยู่ ทำให้ไม่สามารถควบคุมให้ได้ขนาดเดียวกันทุก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุภาคได้ จึงอาจทำให้มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ได้ จึงควรหาวิธีในการทำให้ได้อนุภาคของซังข้าวโพดที่มีขนาดเดียวกันทุกอนุภาค

5. ควรมีการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสโดยการเลี้ยงเชื้อในระดับถึงหมัก

6. การปรับปรุงกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส เช่น การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) หรือการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม อาจทำให้ได้จุลินทรีย์ที่สามารถต้านทานการยับยั้งการผลิตเอนไซม์จากกระบวนการ catabolite repression ซึ่งทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้ดีขึ้น



บรรณานุกรม

- สมใจ ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. สหมิตรออฟเซต. กรุงเทพฯ. 250 หน้า.
- Abdel-Sater, M. A. and El-Said, A. H. M. 2001. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 47 : 15-21.
- Anthony, T., Chandra Raj, K., Rajendran, A. and Gunasekaran, P. 2003. High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. *Enzyme and Microbial Technology*. 32 : 647-654.
- Bailey, M. J. & Poutanen, K. 1989. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 30 : 5-10.
- Bailey, M. J. & Viikari, L. 1993. Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan-based media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9 : 80-84.
- Bakir, U., Yavascaoglu, S., Guvenc, F., Ersayin, A. 2001. An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae* : production, partial purification and biochemical characterization. *Enzyme and Microbial Technology*. 29 : 328-334.
- Bansod, S. M., Dutta-Choudhary, M., Srinivasan, M. C. & Rele, M. V. 1993. Xylanase active at high pH from an alkalotolerant *Cephalosporium* species. *Biotechnology Letter*. 15 : 965-970.
- Bedford, M.R. 2003. Factors influencing the use of enzymes in cereal-based diets, in: Courtin, C.M., Veraverbeke, W., Delcour (Eds.), J.A., Recent Advances in Enzymes in Grain Processing: Proceedings of the 3rd European Symposium on Enzymes in Grain Processing, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56 : 326-338.
- Benber, S. and Benedito de Barder, C. 1974. Basic and Applied Research Needs for Optimizing Utilization of Rice Bran as Food and Feed. *Proceedings of the Rice By-Products Utilization International Conference*. Institute of Agrochemistry and Food

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Technology. Valencia. 4 :1-99.
- Beneke, E. S. & Rogers, A. L. 1980. Medical mycology manual with human mycoses monograph, 4th ed. New York & London: Macmillan Publishing Company & Collier Macmillan Publishers.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnology. 3 : 286-290.
- Biely, P., Vrsanská, M., and Claeysens, M.. 1991. The endo-1,4-beta-glucanase I from *Trichoderma reesei* action on beta-1,4-oligomers and polymers derived from D-glucose and D-xylose. European Journal of Biochemistry. 200:157-163
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances. 18 : 355–383.
- Biely, P. 1993. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In Hemicellulose and Hemicellulases, ed. M. P. Coughlan & G. P. Hazlewood. Portland Press, London. 40 : 29-51.
- Biswas, S. R., Jana, S. C., Mishra, A. K. & Nanda, G. 1990. Production, purification, and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*. Biotechnology and Bioengineering. 35 : 244-251.
- Brafia-Castillo, B. E. & Berry, D. R. 1992. Xylanase biosynthesis by the wood-rotting fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Progress in Biotechnology. 7 : 523-528.
- Campbell Jr, J.M., Fahey, G.C., Wolf, B.W. 1997. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. Journal of Nutrition. 127 : 130–136.
- Cavazzoni, V., Manzoni, M., Parini, C. & Bonferoni, M. C. 1989. D-Xylanase produced by *Schizophyllum radiatum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 30 : 247-251.
- Chandra Raj, K. & Chandra, T. S. 1995. A cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxnl. Biotechnology Letter. 17 : 309-314.
- Christakopoulos P. , Mamma D. , Nerinchx W. , Kekos D. , Macris B.&M., Claeysens,M. 1996. Production and partial characterization of xylanase from *Fusarium oxysporum*. Bioresource Technology. 58:115-119
- Christophersen C., Andersen, E., Jacobsen, T.S., Wagner, P. 1997. Xylanases in wheat separation, Starch/Starke. 49 : 5 – 12.

- Clark, T.A., Steward, D., Bruce, M., McDonald, A., Senior, A., Singh, D. 1991. Improved bleachability of Radiata pine kraft pulps following treatment with hemicellulolytic enzymes. *Appita*. 44 : 389–393.
- Clarke, J.H., Rixon, J.E., Ciruela, A., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P. 1997. Family 10 and family 11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleachability of hardwood and softwood paper pulps. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48 : 177–183.
- Coote, N., Kirsop, B.H. 1976. A haze consisting largely of pentosan. *Journal of the Institute of Brewing*. 82 : 34
- Costa-Ferreira, M., Dias, A., M-imo, C., Morgado, M. J., Sena-Martins, G. & Duarte, J. C. 1994. Xylanolytic enzyme production by an *Aspergillus niger* isolate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 44 : 231–242.
- Courtin, C.M., Roelants, A., Delcour, J.A. 1999. Fractionation-reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in breadmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 : 1870–1877.
- Courtin, C.M., Gelders, G.G., Delcour, J.A. 2001. Use of two endoxylanases with different substrate selectivity for understanding arabinoxylan functionality in wheat flour breadmaking. *Cereal Chemistry*. 78 : 564–571.
- Courtin, C.M., Delcour, J.A. 2002. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science*. 35 : 225–243.
- Debyser, W., Derdelinckx, G., Delcour, J.A. 1997. Arabinoxylan solubilisation and inhibition of the barley malt xylanolytic system by wheat during brewing with wheat wholemeal adjunct: evidence for a new class of enzyme inhibitors. *Journal of American Society of Brewing Chemists*. 55 : 153–156.
- Dominguez, J.M. 1998. Xylitol production by free and immobilised *Debaryomyces hansenii*, *Biotechnology Letter*. 20 : 53–56.
- Doppelbauer, R., Esterbauer, H., Steiner, W., Lafferty, R. M. & Steinmiiller, H. 1987. The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 26 : 485–494.
- Ducroo, P., Frelon, P.G. 1989. Improvement of beer production by the use of α -glucanase-pentosanase from *Diporotrichum dimorphosporum*, *European Brewery Convention*:

- Proceedings of the 22nd Congress, IRL Press, Oxford. pp. 445–452.
- Fengler, A.I., Marquardt, R.R. 1988. Water-soluble pentosans from rye. II. Effects on rate of analysis and on the retention of nutrients by the chick. *Cereal Chemistry*. 65 : 298–302.
- Fernfindez-Espinar, M. T., Ram6n, D., Pifiaga, F. & Vall6s, S. 1992. Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letter*. 91 : 91-96.
- Galbe, M., Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59 : 618–628.
- Ghosh, M., Das, A., Mishra, A. K. & Nanda, G. 1993. *Aspergillus sydowii* MG49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 15 : 703-709.
- Ghosh, V. K. & Deb, J. K. 1988. Production and characterization of xylanase from *Thielaviopsis basicola*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 29 : 44-47.
- Gilbert, M., Breuil, C. & Saddler, J. N. 1992. Characterization of the enzymes present in the cellulase system of *Thielavia terrestris* 255B. *Bioresource Technology*. 39 : 47-154.
- Glore, S.R., Van Treeck, D., Knehans, A.W., Guild, M. 1994. Soluble fiber and serum lipids: a literature review. *Journal of American Dietetic Association*. 94 : 425–436.
- Gomes, J., Gomes, I., Esterbauer, H., Kreiner, W. & Steiher, W. 1989. Production of cellulases by a wild strain of *Gliocladium virens*: optimization of the fermentation medium and partial characterization of the enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31 : 601-608.
- Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W. & Esterbauer, H. 1992. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36 : 701-707.
- Gomes, D. J., Gomes, J. & Steiner, W. 1994. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. *Journal of Biotechnology*. 33 : 87-94.
- Graham, H., Inborr, J. 1992. Application of xylanase-based enzymes in commercial pig and poultry production, in: Visser, J., Beldman, G., Kusters-Van Someren, M.A., Voragen (Eds.), *A.G.J., Xylans and Xylanases*, Elsevier, Amsterdam. The Netherlands. pp. 535–538.
- Gupta, A. and Madamwar, D. 1997. Solid State Fermentation of Lignocellulosic Waste for Cellulose and β -Glucosidase Production By Cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and

- Aspergillus fumigatus*. Biotechnology Progress. 13(2) : 166-169.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W. & Zupancic, S. 1996. PRODUCTION OF FUNGAL XYLANASES. Bioresource Technology. 58 : 137-161
- Harris, G.W., Pickersgill, R.W., Connerton, I., Debeire, P., Touzel, J.P., Breton, C., Perez, S. 1997. Structural basis of the properties of an industrial relevant thermophilic xylanase. Proteins. 29 : 77- 86.
- Haskell, W.L., Spiller, G.A., Jensen, C.D., Ellis, B.K., Gates, J.E. 1992. Role of water-soluble dietary fiber in the management of elevated plasma cholesterol in healthy subjects. American Journal of Cardiology. 69 : 433-469.
- Hillhorst, R., Dunnewind, B., Orsel, R., Stegeman, P., van Vliet, T., Gruppen, H., Schols, H.A. 1999. Baking performance, rheology, and chemical composition of wheat dough and gluten affected by xylanase and oxidative enzymes. Journal of Food Science. 64 : 808-813.
- Hoq, M. M., Hempel, C. & Deckwer, W.-D. 1994. Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9: effect of agitation, aeration, and medium components on production. Journal of Biotechnology. 37 : 49-58.
- Hoq, M. M. & Deckwer, W.-D. 1995. Cellulase-free xylanase by thermophilic fungi: a comparison of xylanase production by two *Thermomyces lanuginosus* strains. Applied Microbiology and Biotechnology. 43 : 604-609.
- Hrmovi, M., Biely, P. & Vransk, M. 1989. Cellulose and xylan-degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*. Enzyme Microb. Technol. 11 : 610-616.
- Jackson, M.G. 1997. The Alkali Treatment of Straws. Animal Feed Science and Technology. 2(2) : 105-130.
- John, M. & Schmkr, J. 1988. Xylanases and fl-xylosidase of *Trkrhoderma ~m*. In Biomass, ed. W. A. Wood & S. T. Kellogg. Methods Enzymol., Academic Press, San Diego. 160 : 662-671.
- Johnson, K. G., Silva, M. C., MacKenzie, C. R., Schneider, H. & Fontana, J. D. 1989. Microbial degradation of hemicellulosic materials. Applied Biochemistry and Biotechnology. 20/21 : 245-258.
- Kang, S.-W., Kim, S.-W. & Lee, J.-S. 1995. Production of cellulase and xylanase in a bubble

column using immobilized *Aspergillus niger* KKS. Applied Biochemistry and Biotechnology. 53 : 101-106.

Khanna, P., Sundari, S. S. & Kumar, N. J. 1995. Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus* sp. World. Applied Microbiology and Biotechnology. 11 : 242-243.

Kitpreechavanich, V., Srisuk, W. & Lotong, N. 1992. Production of β -xylanase and β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus* using solid-state cultivation. Progress in Biotechnology. 7 : 519-522.

Kilch, M. A., Samson, R. A. & Members of the International Commission on Penicillium and Aspergillus (ICPA) 1996. Aspergillus reference cultures. New Orleans, Louisiana: Agricultural Research Service, Southern Regional Research Center.

Kuhad, R.C., Singh, A. 1993. Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects, Critical Reviews in Biotechnology. 13 : 151-172.

Kuhad, R. C., Singh, A., & Manchanda, M. 1998. Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. Process Biochemistry. 33 : 641-647.

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

Laura, P. Castro, M. Blanca, A. Trejo-Aguilar and Guillermo Aguilar Osorio. 1997. Thermostable xylanases produced at 37°C and 45°C by a thermotolerant *Aspergillus* strain . FEMS Microbiology Letters. 146 : 97-102.

Laurikainen, T., Harkonen, H., Autio, K., Poutanen, K. 1998. Effects of enzymes in fibre-enriched Baking. Journal of the Science of Food and Agriculture. 76 : 239-249.

Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, Journal of Biotechnology. 56 : 1-24.

Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., Santos da Silva, M.J., Bosse, M., Egmond, M.R., Hagemans, M.L.D., van Gorcom, R.F.M., Hessing, J.G.M., van der Hondel, C.A.M.J.J., van Rotterdam, C. 1992. Xylanases and their application in bakery, in: J. Visser, G. Beldman, M.A. Kusters-van Somerson, A.G.J. Voragen (Eds.), Xylans and Xylanases, Elsevier, Amsterdam. 349-360.

Marsden, W.L. and Gray, P.P. 1986. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignocellulosic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Material. Critical Review in Biotechnology. 3(3) : 235-276.
- Milagres, A. M. F. & Duran, N. 1992. Xylanolytic enzymes from *Penicillium janthinellum* and its applications in bleaching of pulp. Progress in Biotechnology. 7 : 539-545.
- Okeke, B. C. & Obi, S. K. C. 1993. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an *Arthrographis* species. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 9 : 345-349.
- Paice, M. G., Jurasek, L., Carpenter, M. R. & Smillie, L.B. 1978. Production, characterization, and partial amino acid sequence of xylanase A from *SchizophyUum commune*. Applied and Enviromental Microbiology. 26 : 802 - 808.
- Paice, M.G., Gurnagul, N., Page, D.H., Jurasek, L. 1992. Mechanism of hemicellulose directed prebleaching of kraft pulp, Enzyme and Microbial Technology. 14 : 272– 276.
- Patel, A.N., Grabski, A.C., Jeffries, T.W. 1993. Chromophore release from kraft pulp by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanase. Applied Microbiology and Biotechnology. 39 : 405–412.
- Peltonen, S. 1995. Comparison of xylanase production by fungal pathogens of barley with special reference to *Bipolaris sorokiniana*. Mycological Research. 99 : 717-723.
- Pettersson, D., Aman, P. 1988. Effects of enzyme supplementation of diets based on wheat, rye or triticale on their productive value for broiler chickens. Animal Feed Science and Technology. 20 : 313– 324.
- Poutanen, K., Rfitt6, M., Puls, J. & Viikari, L. 1987. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. Journal of Biotechnology. 6 : 49-60.
- Poutanen , K. 1997. Enzymes: An important tool in the improvement of the quality of cereal foods. Trends in Food Science and Technology. 8 : 300– 306.
- Purkharthofer, H., Sinner, M. & Steiner, W. 1993b. Effect of shear rate and culture pH on the production of xylanase by *Thermomyces lanuginosus*. Biotechnology Letter. 15 : 405-410.
- Qinnghe, C., Xiaoyu, Y., Tiangui, Niu., Cheng, J. and Qiugang, M. 2004. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Process Biochemistry. 39 : 1561-1566
- Rani, S., Nand, K. 1996. Development of cellulase-free xylanase producing anaerobic consortia for the use of lignocellulosic wastes. Enzyme and Microbial Technology. 18 : 23– 28.
- Ratanakhanokchai, K., Khin Lay Kyu and Tanticharoen, M. 1999. Purification and properties of

- a xylan-binding endoxylanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:694-697.
- Redgewell, R.J., Michieli, J.-H., Fisher, M., Reymond, Nicolas, S., P., Sievert, D. 2001. Xylanase induced changes to water- and alkali-extractable arabinoxylans in wheat flour: their role in lowering battering viscosity. *Journal of Cereal Science*. 33 : 83– 96.
- Reese, E.T., and Maguire, A. 1969. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Applied Microbiology*. 17:242-245.
- Ronald P. de Vries and Jaap Visser. 2001. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology*. 65 : 497-522.
- Rouau X. 1993. Investigations into the effects of an enzyme preparation for baking on wheat flour dough pentosans. *Journal of Cereal Science*. 18 : 145– 157.
- Rouau, X., El-Hayek, M.-L., Moreau, D. 1994. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flours in relation to changes in pentosan properties. *Journal of Cereal Science*. 19 : 259– 272.
- Royer, J.C. and Nakas, J.P. 1989. Xylanase production by *Trichoderma longibranchiatum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 11:405-410
- Saddler, J. N., Hogan, C. M. & Louis-Seize, G. 1985. A comparison between the cellulase systems of *Trichoderma harzianum* E58 and *Trichoderma reesei* C30. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 22 : 139-145.
- Singh, A., Kuhad, R. C. & Kumar, M. 1995. Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 17 : 551-553.
- Sinha, N. & Sengupta, S. 1995. Simultaneous production of α -arabinofuranosidase and xylanase by *Termitomyces clypeatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11 : 359-360.
- Sjostrom, F. 1981. *Wood Chemistry (Fundamentals and Application)*. New York : Academic Press.
- Smith, D. C. & Wood, T. M. 1991a. Isolation of mutants of *Aspergillus awamori* with enhanced production of extracellular xylanase and fl-xylosidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 7 : 343-354.
- Smith, D. C. & Wood, T. M. 1991b. Xylanase production by *Aspergillus awamori*. *Development*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and fl-xylosidase while maintaining low protease production. *Biotechnology and Bioengineering*. 38 : 883-890.
- Steiner, J., Socha, C. & Eyzaguirre, J. 1994. Culture conditions for enhanced cellulase production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10 : 280-284.
- Sorensen, J.F. 2003. Novel tailor-made xylanases: their characterisation, performance in cereal processing and use as a tool to understand xylanase functionality in baking, in: Courtin, C.M., Veraverbeke, W., Delcour (Eds.), J.A., Recent Advances in Enzymes in Grain Processing: Proceedings of the 3rd European Symposium on Enzymes in Grain Processing, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven.
- Stevenson, J. A. 1975. Fungi of Puerto Rico and the Virgin Islands. Ann Arbor, Michigan: Braun-Brumfield, Inc.
- Stewart, J. C., Lester, A., Milburn, B. & Parry, J. B. 1983. Xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Biotechnology Letter*. 5 : 543-548.
- Suurnakki, A., Tenkanen, M., Buchert, J., Viikari, L. 1997. Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. *Advances Biochemical engineering and Biotechnology*. 57 : 261-287.
- Sugden, C. & Bhat, M. K. 1994. Cereal straw and pure cellulose as carbon sources for growth and production of plant cell-wall degrading enzymes by *Sporotrichum thermophile*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10 : 444-451.
- Thomas, C. R. 1990. Problems of shear in biotechnology. In *Chemical Engineering Problems in Biotechnology*, ed. M. A. Winkler. Elsevier Applied Science, London. pp. 23-93.
- Veridiana Lenartovicz, Cristina Giatti Marques de Souza, Fabiana Guillen Moreira and Rosane Marina Peralta. 2003. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry*. 38 : 1775-1780
- Vietor, R.J., Voragen, A.G.J., Angelino, S.A.G.F. 1993. Composition of non-starch polysaccharides in wort and spent grains from brewing trials with malt from a good malting quality barley and a feed barley. *Journal of the Institute of Brewing*. 99 : 243-248.

- Vries, R. P., Poulsen, C. H., Madrid, S., and Visser, J. 1998. *aguA*, the gene encoding an extracellular α -glucuronidase from *Aspergillus tubingensis* is specifically induced on xylose and not on glucuronic acid. *Journal of Bacteriology*. 180:243-249
- Wang, S. L., Chen, L.G., Chen, C. S. & Chen, L. F. 1994. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus* sp. G-393. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 45/46 : 655-662.
- Wase, D. A. J., Raymahasay, S. & Wang, C. W. 1985b. Production of β -D-glucosidase, endo-1,4- β -D-glucanase and D-xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI 255091. *Enzyme and Microbial Technology*. 7 : 225-229.
- Weegels, P.L., Marseille, J.P., Hamer, R.J. 1992. Enzymes as a processing aid in the separation of wheat flour into starch and gluten, *Starch/Starke*. 44 : 44-48.
- Whistler, R.L. 1950. Xylan, *Advance in Carbohydrate Chemistry*. 5 : 269-290.
- Wiacek-Zychlinska, A., Czajak, J., Jedrychowska, B. & Sawicka-Zukowska, R. 1992. Production of xylanases by *Chaetomium globosum*. *Progress in Biotechnology*. 7 : 493-496.
- Wong, K.K.Y., Larry Tan, U.L. and Saddler, J.N. 1988. Multiplicity of 14-xylanases in microorganisms—functions and applications. *Microbiology Reviews*. 52 : 305-317.
- Wong, K.K.Y., Saddler, J.N. 1992. *Trichoderma* xylanases, their properties and application, in: Visser, J., Beldman, G., Kusters-Van Someren, M.A., Voragen (Eds.), A.G.J., *Xylans and Xylanases*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp. 171-186.
- Wong, K.K.Y., Martin, L.A., Gama, F.M., Saddler, J.N., de Jong, E. 1997. Bleach boosting and direct brightening by multiple xylanase treatments during peroxide bleaching of kraft pulps, *Biotechnology and Bioengineering*. 54 : 261-287.
- Yu, E. K. C., Tan, L. U. L., Chan, M. K.-H., Deschatelets, L. & Saddler, J. N. 1987. Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 9 : 16-24.

<http://www.adisseeonorthamerica.com/rovabioguide/versatility.asp>

<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/asp-fu.htm>

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. อาหารสูตร Potato dextrose agar (PDA)

ประกอบด้วย

Potato dextrose agar	39	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Potato dextrose agar ในน้ำกลั่น แล้วมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตรสำหรับการสร้างเอนไซม์ไลเปส

ส่วนประกอบของอาหารสูตรที่ 1 Singh; et.al.(1998)

ประกอบด้วย (ร้อยละ)	
เปปโตน	0.3
ยีสต์สกัด	0.3
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4)	0.1
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)	0.03

วิธีการเตรียม

นำส่วนประกอบของอาหารสูตรที่ 1 ละลายในน้ำกลั่นตามลำดับรวมกัน แล้วมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนประกอบของอาหารสูตรที่ 2 Ikura and Horikoshi (1987)

ประกอบด้วย (ร้อยละ)	
เปปโตน (peptone)	0.5
ยีสต์สกัด (yeast extract)	0.5
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.1
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01
กลูโคส	0.5

วิธีการเตรียม

นำส่วนประกอบของอาหารสูตรที่ 2 ละลายในน้ำกลั่นตามลำดับรวมกัน แล้วมาเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนประกอบของอาหารสูตรที่ 3 Carter and Bull (1969)

ประกอบด้วย (ร้อยละ)

โปรติโอสเปปโตน	0.75
ยีสต์สกัด	0.25
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.025
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.005
ยูเรีย	0.14
คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.005
ไอลอนซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)	0.15
อีดีทีเอ (EDTA)	0.06
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.002
แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.002

วิธีการเตรียม

นำส่วนประกอบของอาหารสูตรที่ 3 ละลายในน้ำกลั่นตามลำดับรวมกัน แล้วมาเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียมซีเตรทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ตามวิธีของ Lillie (1948)

เตรียม Stock solution :

(A) : สารละลายของกรดซิตริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

(B) : สารละลายโซเดียมซีเตรท ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.05 โมลาร์

วิธีการ

เติมสารละลายของกรดซิตริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 230 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายของโซเดียมซีเตรท 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 270 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนตามวิธีของ Tang et. al. (1987)

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย	(ร้อยละ)
Dinitrosalicylic (DNS) acid	1.0
Phenol	0.2
Sodium potassium tartrate	20.0
Sodium sulphite (Na_2SO_3)	0.05
Sodium hydroxide	1.0

วิธีการเตรียม

ละลาย Sodium hydroxide ในน้ำกลั่นตามปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเติม Sodium potassium tartrate , Phenol และ Dinitrosalicylic acid ลงในสารละลาย Sodium hydroxide จากนั้นจึงให้เย็น ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชาเก็บไว้ในที่มืด ก่อนนำมาใช้ให้เติม Sodium sulphite 0.5 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตรของ DNS reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายไซแลนและความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในบัฟเฟอร์ซึ่งเตรียมความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร แล้วต้มในน้ำเดือด 5 นาที

3. ทำให้เย็นด้วยน้ำก๊อก

4. เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

(ชุดควบคุม : นำเอนไซม์ไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำการเติมสารละลายไซแลน แต่ไม่บ่ม โดยเติม DNS reagent ลงไปที่นำไปต้มแล้วทำตามวิธีการข้างต้น)

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนส

หน่วยต่อมิลลิลิตร = มิลลิกรัมของไซโลส x 1000 x จำนวนเท่าของความเจือจางสารละลายเอเอ็นไฮม์
น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลไซโลส x ระยะเวลาบ่ม x ปริมาตรสารละลายเอเอ็นไฮม์

(กรัมต่อโมล)(นาที)(มิลลิลิตร)

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลไซโลส
1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

1.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลสในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้

DNS reagent ၁၀၄ Miller (1959)

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส

1. เติรม stock solution ของน้ำตาลไซโลสให้มีความเข้มข้น 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร (แบบตัก (blank) ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทน)

3. เติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร

4. นำไปต้มน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรับประทานเป็นดื่มน้ำจืด

5. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ใลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส

2. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลล์ตามวิธีของ Mandel et. al. (1969)

เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลสความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในบัฟเฟอร์ซีเตรทความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเลส (ข้อ 1)

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลล์เลส

$$\text{ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของกลูโคส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าของความเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

(กรัมต่อโมล)
(นาที)
(มิลลิลิตร)

1 ยูนิค หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส
1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

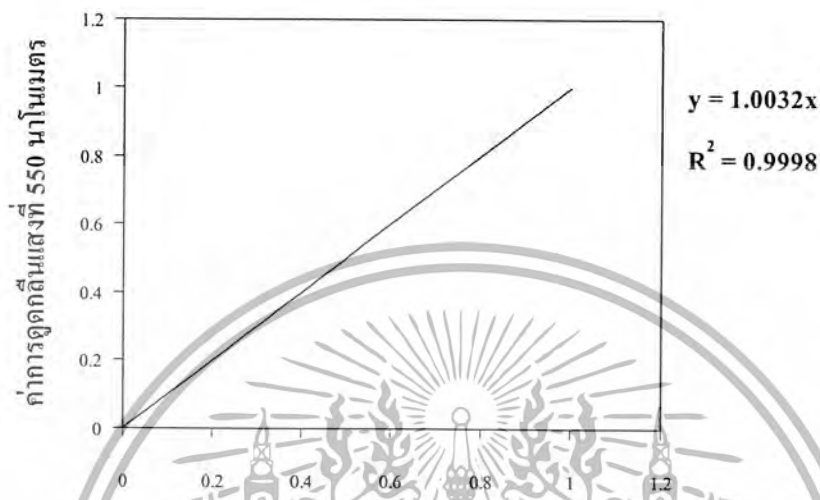
2.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส (ข้อ 1.1) แต่ใช้สารละลายกลูโคสแทนสารละลายไซโลส นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติโดย Duncan's New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค. 1 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan's New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของสูตรอาหารและชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนส โดยเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus*

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ซึ่งข้าวโพด	เปลือกข้าวโพด	ชานอ้อย
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนส (หน่วยค่อมิลลิตร)	45.63 ^a	30.12 ^b	21.89 ^c

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค. 2 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan's New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของสูตรอาหาร Ikura and Horikoshi (1987) และชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนส โดยเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus*

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ซึ่งข้าวโพด	เปลือกข้าวโพด	ชานอ้อย
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนส (หน่วยค่อมิลลิตร)	31.48 ^a	29.89 ^a	17.03 ^b

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค. 3 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan’s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของสูตรอาหาร Carter และ Bull (1969) และชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไโซลานเอสโดยเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus*

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ซังข้าวโพด	เปลือกข้าวโพด	ขานอ้อย
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเอส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	34.79 ^a	22.76 ^b	17.94 ^c

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค. 4 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan’s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไโซลานเอสโดยเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus*

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (ร้อยละ)	1.0	2.0	3.0
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเอส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	34.17 ^a	42.43 ^b	56.03 ^a

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค. 5 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan’s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus*

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	peptone + yeast extract	peptone	yeast extract	tryptone
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	73.17 ^a	67.75 ^{ab}	62.82 ^b	54.28 ^c

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค. 6 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan’s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของความเข้มข้นของเปปโตนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus*

ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (ร้อยละ)	ชุดควบคุม*	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	49.74 ^c	44.07 ^d	63.41 ^b	69.86 ^a	32.69 ^c	23.41 ^f

หมายเหตุ

ชุดควบคุม* หมายถึง ความเข้มข้นของเปปโตนร้อยละ 0.0612

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค.7 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan’ s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของความเข้มข้นของยีสต์สกัดผสมกับเปปโตनที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus*

ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (ร้อยละ)	ชุดควบคุม*	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	42.60 ^b	30.22 ^d	61.45 ^a	36.29 ^c	14.73 ^e	10.69 ^f

หมายเหตุ

ชุดควบคุม* หมายถึง ความเข้มข้นของยีสต์สกัดผสมเปปโตนร้อยละ 0.0612
ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค.8 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan’ s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus*

พีเอชเริ่มต้น	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	32.23 ^d	65.18 ^c	72.88 ^b	80.44 ^a	73.01 ^b	21.65 ^e	20.02 ^e

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05