สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

นายชัยวัฒน์ รักษ์บุญยวง
นางสาวศิริวรรณ โตประเทศ
นายศุภฤกษ์ เผ่าศรีเจริญ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67308
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549

Visit only
.b 11662408
.i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Optimization of xylanase production by thermotolerant a mutant of *Aspergillus fumigatus.*

Chaiwat Luckboonjung

Siriwan Tohprated

Supalerk Phoasicharoen

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

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

นักศึกษา นายชัยวัฒน์ รักษ์บุญยวง รหัสประจำตัว 45050732

นางสาวศิริวรรณ โตประเทศ รหัสประจำตัว 45050777

นายศุภฤกษ์ เผ่าศรีเจริญ รหัสประจำตัว 45050780

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ ผศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์	
กรรมการ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

นักศึกษา นายชัยวัฒน์ รักษ์บุญยวง รหัสประจำตัว 45050732
นางสาวศิริวรรณ โตประเทศ รหัสประจำตัว 45050777
นายศุภฤกษ์ เผ่าศรีเจริญ รหัสประจำตัว 45050780

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2548

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราทนร้อน *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวซึ่งใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน ในการเลี้ยงเชื้อในสภาวะเริ่มต้น คือ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 และให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 สปอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราชนิดนี้ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด ประกอบด้วยเปปโตนร้อยละ 0.3 ยีสต์สกัดร้อยละ 0.3 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.2 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 และแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0.03 เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดเล็กเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด คือ ความเข้มข้นร้อยละ 1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด คือ การใช้เปปโตนและยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นไนโตรเจนเท่ากับร้อยละ 0.3 และที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 และอุณหภูมิเริ่มต้นเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส เป็นค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด โดยจะทำให้เชื้อให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 50.33 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Optimizaion of xylanase production by thermotolerant a mutant of *Aspergillus fumigatus* .
Name	Mr. Chaiwat Luckboonjung Miss Siriwan Tohprated Mr. Supalerk Phoasicharoen
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Acadamic Year	2005
Special Project Advisor	Asst.Prof. Aree Rittiboon

Abstract

Fermentable conditions for xylanase production by termotolerant a mutant of *Aspergillus fumigatus* were optimized in submerged cultures by various agricultural waste as the carbon source ,various nitrogen source ,pH and temperature on medium was studied. The initial pH and spores was 6.0 , 10^6 spores respectively in 250 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of medium . Cultivation on a rotary shaker at 200 rpm , 30 C° for 5 days.

The best medium was composed of peptone 0.3% (w/v) , yeast extract 0.3% (w/v) , KH_2PO_4 0.2% (w/v), $MgSO_4$ 0.1% (w/v) and $CaCl_2$ 0.03% (w/v). In best medium , 1% corn husk was suitable carbon source. The optimum nitrogen source and concentration was 0.3% peptone mixed 0.3% yeast extract and the suitable initial pH was 6.0 and the suitable temperature was 30°C gave the highest xylanase activity of 50.33 U/ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษาระหว่างการค้นคว้าวิจัย และการเขียนโครงงานพิเศษฉบับนี้ รวมถึงการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง และ ผศ.ดร.มาริสา จาตุรพรพิพัฒน์ ที่เป็นคณะกรรมการในโครงงานพิเศษ และช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องบดอาหารสัตว์ในการบดซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด เพื่อใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณพี่ๆ นักวิทยาศาสตร์ภาคชีววิทยาประยุกต์ที่ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบคุณพี่ๆนักศึกษาปริญญาโทภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง และขอบคุณเพื่อนๆและทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนานมา ณ ที่นี้ด้วย ที่ให้การสนับสนุน และให้กำลังใจในการศึกษามาตลอดรวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นายชัยวัฒน์ รักษ์บุญยวง
นางสาวศิริวรรณ โตประเทศ
นายศุภฤกษ์ เผ่าศรีเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 องค์ประกอบหลักของเซลล์พืช	4
2.2 ลักษณะของเชื้อรา	8
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยการหมัก	10
2.4 การวัดกิจกรรมเอนไซม์	16
2.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนส	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัสดุ	19
3.2 อุปกรณ์	19
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	20
3.4 การเตรียมเชื้อรา	20
3.5 การเตรียมอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	20
3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ซลาเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง	20
3.7 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์	22
3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส 23

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เอกสารอ้างอิง

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์

ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต่างๆเพื่อสร้างไซลาเนส องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	15
ค.2	การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	44
ค.3	การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	44
ค.4	การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	45
ค.5	การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	46
ค.6	การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของพืชที่มีส่วนประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน	5
2	โครงสร้างของไซแลนซึ่งแสดงความแตกต่างของกลุ่มแทนที่กับตำแหน่งที่จับ	6
3	การทำงานของกลุ่มเอนไซม์ในการย่อยสลายไซแลน	8
4	การเจริญของ *A. fumigatus* บนอาหาร Czapexdox agar	9
5	ผลของชนิดแหล่งคาร์บอน ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	24
6	ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	25
7	ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	26
8	ผลของพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	27
9	ผลของอุณหภูมิที่ผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	27
10	กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร	42
11	กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของโครงงานพิเศษ

เชื้อราเป็นเชื้อที่มีศักยภาพมากที่สุดในการย่อยสลายสารลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นส่วนประกอบของพืชในธรรมชาติ เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ใช้แล้วไม่หมดไป โดยยังมีเชื้อราน้อยชนิดที่สามารถย่อยสลายสารเหล่านี้ได้ และให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase) ที่เป็นไปได้ในทางเศรษฐกิจ ซึ่งถ้าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่เป็นไปได้ก็จะเป็นการนำแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกมาใช้แทนแหล่งคาร์บอนเดิมที่ใช้กันอยู่ ซึ่งมีราคาแพงมากจะเป็นการลดต้นทุนได้อย่างมาก เนื่องจากแหล่งคาร์บอนคิดเป็นร้อยละ 50 ของต้นทุนการผลิตเอนไซม์ทั้งหมด เนื่องจากสาเหตุเหล่านี้ จึงทำการศึกษาการแยก และการคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสารลิกโนเซลลูโลสและสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้ แต่เนื่องจากสายพันธุ์ที่แยกได้ตามธรรมชาตินั้นจะมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ได้น้อย จึงจำเป็นต้องนำสายพันธุ์เหล่านี้มาชักนำการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมากมาย เช่น กากเมล็ดฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว ซังข้าวโพด เปลือกเมล็ดธัญพืช ซึ่งถือเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีมากในธรรมชาติ โดยประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) แต่ก่อนที่ได้ถูกนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ ปุ๋ย ทำให้ได้ผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจไม่เต็มที่ ในปัจจุบันวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยไซแลน (xylan) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายในกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์และผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งเอนไซม์ไซลาเนสสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมได้หลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น จึงเป็นการลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมที่ใช้ในอุตสาหกรรมเหล่านี้ และยังลดต้นทุนด้วยการลดการใช้ไซแลนบริสุทธิ์

จากการศึกษาวิจัยพบว่า *Aspergillus fumigatus* สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้สารลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด และมีคุณสมบัติในการทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง เพื่อให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีประสิทธิภาพสูงสุด โครงงานพิเศษนี้จึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราทนอุณหภูมิสูงสายพันธุ์กลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลายโดยทำการศึกษาจากคุณสมบัติต่างๆได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น และอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ โดยคัดเลือกสภาวะที่เชื้อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดและผลิตเซลลูเลสได้ต่ำสุดหรือไม่มีการผลิต

1.2.2 ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีราคาถูก ทดแทนการใช้ไซแลน

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1.3.1 ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส คือชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยใช้ซังข้าวโพดเล็ก ซังข้าวโพดใหญ่ เปลือกข้าวโพดเล็กและเปลือกข้าวโพดใหญ่ ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และทำการคัดเลือกสูตรอาหารและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมมาแปรผันความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0

1.3.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน โดยใช้เปปโตนและยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.06 และนำแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกมาแปรผันความเข้มข้นร้อยละ 0.2, 0.3 และ 0.4

1.3.3 ศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกัน คือ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0

1.3.4 ศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน คือ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และสภาวะที่เชื้อราทนอุณหภูมิสูงสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดโดยผลิตเอนไซม์เซลลูเลสน้อยที่สุดหรือไม่มีการผลิต

1.4.2 เพื่อเป็นแนวทางในการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่มีราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอนแทนไซแลนซึ่งมีราคาแพง

1.4.3 เพื่อทราบถึงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราสายพันธุ์กลาย

1.4.4 เพื่อใช้เป็นแนวทางในการทำวิจัยขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.5.1 การเตรียมเชื้อรา

1.5.1.1 การเลี้ยงเชื้อราเพื่อให้มีการสร้างสปอร์

1.5.1.2 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา

1.5.2 การเตรียมอาหารที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

1.5.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง

1.5.3.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

1.5.3.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

1.5.3.3 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

1.5.3.4 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

1.5.3.5 การศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

1.5.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

1.5.4.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

1.5.4.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

1.5.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 องค์ประกอบหลักของเซลล์พืช

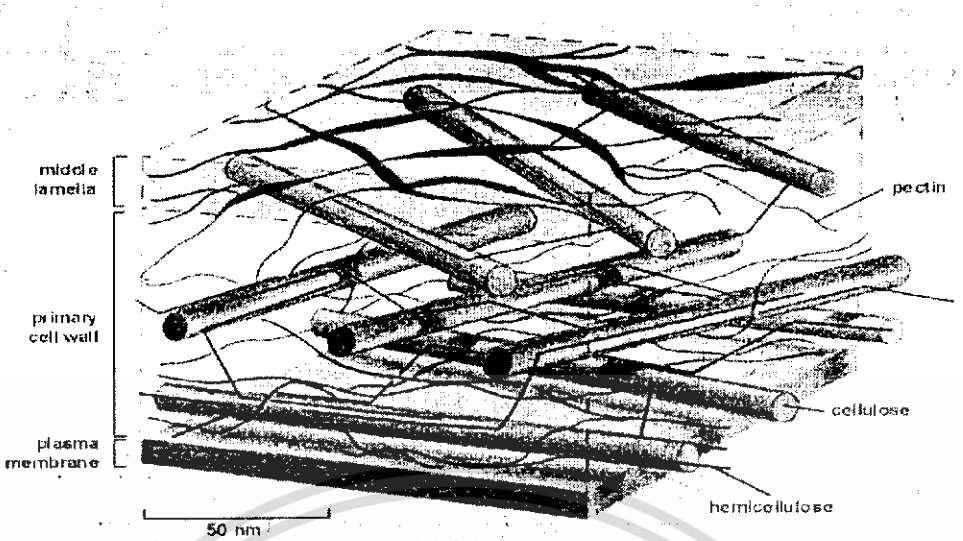
เซลล์พืชเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีมากในธรรมชาติ ประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมด้วยพันธะ บีตา-1,4-ไกลโคซิดิกที่เป็นสายตรง มีสูตรทั่วไปคือ (CHO) พบในปริมาณร้อยละ 30-50 ของน้ำหนักแห้ง เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส และน้ำตาลเฮกโซส ได้แก่ กลูแคน แมนแนนและไซแลน โดยที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนลิกนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทพอลิฟีโนลิก เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ มักหุ้มชั้นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเอาไว้ (Wong และ Saddler, 1988)

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในเซลล์พืช โดยยึดเกาะกับพอลิแซคคาไรด์ชนิดอื่นด้วยพันธะนอน-โควาเลนท์ และยึดเกาะด้วยพันธะไฮโดรเจนกับส่วนของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส พบตามธรรมชาติทั้งในไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง พืชล้มลุกในผนังเซลล์ชั้นแรกของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว รวมทั้งในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น กาก, เมล็ดฝ้าย, รำข้าว, ฟางข้าว, ซังข้าวโพด, เปลือกเมล็ดทานตะวัน และในเปลือกเมล็ดธัญพืชต่างๆ เป็นต้น นอกจากนั้นยังสามารถพบในวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการลอกเนื้อไม้เพื่อทำเยื่อกระดาษ (Biely, 1985) ปริมาณและโครงสร้างจะแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มา เช่น ในไม้เนื้อแข็งพบว่ามีปริมาณไซแลนมากกว่าร้อยละ 30 ของน้ำหนักแห้ง ในไม้เนื้ออ่อนจะมีไซแลนประมาณร้อยละ 8 ของน้ำหนักแห้ง ในไม้ล้มลุกและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจะมีไซแลนเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 20-40 ของน้ำหนักแห้ง (Wong และ Saddler, 1988)

2.1.1 เซลลูโลส

เซลลูโลส $(C_6H_{10}O_5)_n$ ประกอบด้วยพอลิเมอร์โซ่ตรงของดี-กลูโคไพราโนส (D-glucopyranose) ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด $\beta(1\rightarrow4)$ ประมาณ 3,000-15,000 โมเลกุล เป็นพอลิเมอร์ของโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสชนิดเดียว (homopolysaccharide) โครงสร้างของเซลลูโลสแข็งแรงและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสที่เรียงกันอยู่เป็นมัดๆ (fibril) เซลลูโลสไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ สารละลายด่าง และกรดที่อุณหภูมิห้อง (Jackson, 1997; Marsden และ Gray, 1986) แต่ละลายในสารละลายกรดเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 โครงสร้างของพืชที่มีส่วนประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน
ที่มา : www.enzymes.co.uk/Basics/cell_wall.gif

2.1.1.1 เอนไซม์เซลลูเลส

1. เอนโดกลูคาเนส (Endo-1,4-β-glucanase; E.C. 3.2.1.14) ทำหน้าที่ตัดพันธะบีตา-1,4 แบบสุ่มระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสเมื่อมีพันธะบีตา-1,4 เท่านั้นในสายโซ่ตรงของกลูโคส

2. เซลโลไบโอไฮโดรเลส (cellobio-hydrolase; E.C. 3.2.1.91) ทำหน้าที่ตัดเซลโลไบโอส ซึ่งเกิดจากน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4 ด้านปลายสายที่ไม่มีหมู่รีดิวส์

3. บีตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase; E.C. 3.2.1.21) ทำหน้าที่ตัดสายโซ่ตรงของ 2 ,3 หรือ 4 บีตา-1,4-กลูโคซิดิก ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสโมเลกุลเดี่ยว

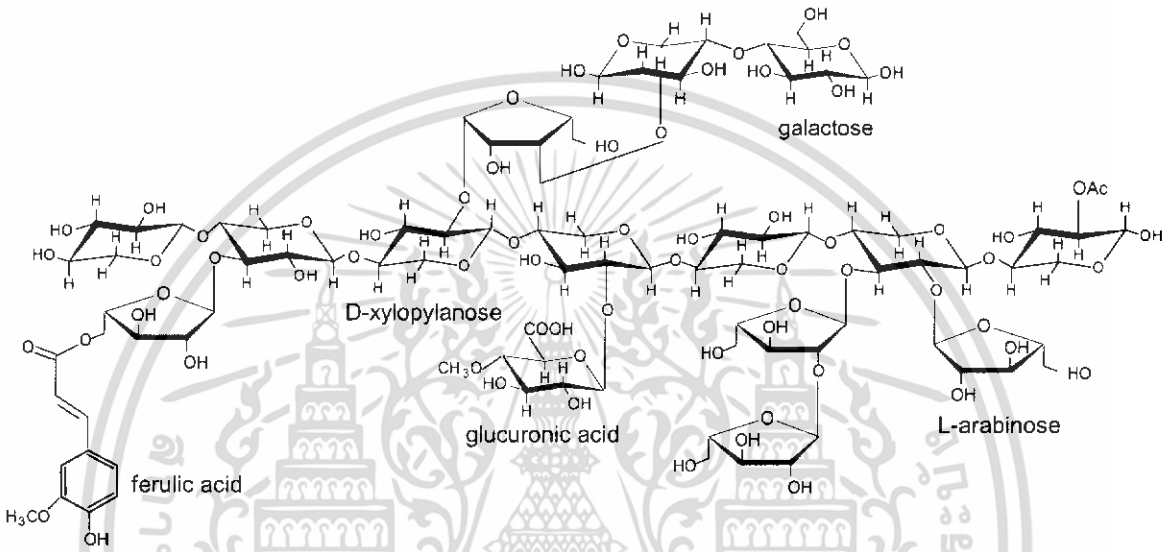
2.1.2 เฮมิเซลลูโลส

เป็นพอลิเมอร์โมเลกุลสั้นและมีกิ่งก้านมาก ทำให้โครงสร้างไม่เป็นระเบียบ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลมากกว่าหนึ่งชนิด (heteropolysaccharide) เมื่อสกัดหรือแยกส่วนที่ได้จากพืชด้วยด่างเจือจางทำให้สามารถจำแนกชนิดของเฮมิเซลลูโลสได้ โดยขึ้นกับชนิดของน้ำตาลส่วนใหญ่ที่ปรากฏซึ่งน้ำตาลส่วนใหญ่ ได้แก่ ดี-กลูโคส (D-glucose), ดี-แมนโนส (D-mannose), แอล-อะราบิโนส (L-arabinose), กรดกลูคูโรนิค (glucuronic acid) และดี-ไซโลส (D-xylose) ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 glycosidic ทำให้สามารถแบ่งชนิดเฮมิเซลลูโลสได้เป็นไซแลนซึ่งประกอบด้วยดี-ไซโลสเป็นมอนอเมอร์หลักและสาย แอล-อะราบิโนส กาแลคแตน (galactan) ที่ประกอบด้วยดี-กาแลคโตสเป็นมอนอเมอร์หลัก แมนแนน (mannan) ประกอบด้วยแมนโนสเป็นมอนอเมอร์หลักและอะราบิแนน (arabinan) เกิดขึ้นจากแอล- อะราบิโนสเป็นมอนอเมอร์หลัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.1 ไซแลน

ไซแลนเป็นส่วนประกอบสำคัญของเฮมิเซลลูโลส ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 เป็นสายหลัก (backbon) ส่วนใหญ่ไซแลนมีโครงสร้างเป็นกิ่งก้าน ดังรูปที่ 2 ไซแลนที่ได้จากธัญพืชประกอบด้วยแอล-อะราบิโนสปริมาณมาก ดังนั้นจึงเรียกได้อีกอย่างว่า อะราบิโนไซแลน (arabinoxylan) ในทางตรงกันข้ามไซแลนที่ได้จากไม้เนื้อแข็งมักเรียกว่า กลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) เนื่องจากมีจำนวนของกรดกลูคูโรนิคมากต่อเป็นกิ่งก้านกับสายหลัก (Ronald, 2001)



รูปที่ 2 โครงสร้างของไซแลนซึ่งแสดงความแตกต่างของกลุ่มแทนที่กับตำแหน่งที่จับ
ที่มา : http://www.adisseonorthamerica.com/rovabioguide/versatility.asp

อะราบิโนสเชื่อมต่อกับสายหลักของไซแลนด้วยพันธะ α-1,2 หรือ α-1,3 ทั้งแบบต่อเดี่ยวๆและเป็นโซ่กิ่งสั้นๆ โซ่กิ่งนี้สามารถเชื่อมต่อกับไซโลสอิสระได้ด้วยพันธะ β-1,2 ของอะราบิโนสและกาแลคโตสสามารถเชื่อมต่อกับอะราบิโนสด้วยพันธะ β-1,5 หรือต่อกับไซโลสโดยพันธะ β-1,4 โดยหมู่อะซิติล (acetyl) จะปรากฏที่ออกซิเจนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ของไซโลสในสายหลัก กรดกลูคูโรนิกและ 4-O-metyl ether ต่อกับสายหลักโดยพันธะ α-1,2 ในทางตรงกันข้าม หมู่อะโรมาติก (feruloyl และ *p*-coumaroyl) ต่อกับออกซิเจนตำแหน่งที่ 5 ที่ปลายของอะราบิโนส (Ronald , 2001)

<u>คุณสมบัติของไซแลน</u>

1. ไซแลนที่ไม่มีหมู่อะซิติลจะไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายได้ในสารละลายด่างและถูกย่อยสลายด้วยกรดได้ง่าย
2. ไซแลนที่มีหมู่อะซิติลถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์
3. ไซแลนที่มีหมู่อะซิติลถูกสกัดได้ด้วยน้ำร้อนและละลายในน้ำได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สารละลายไซแลนไม่สามารถย่อยได้ตามหลักของ Fehling's solution ซึ่งเป็นสารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของอัลดีไฮด์
5. สารละลายไซแลนมีค่า optical rotation เป็นลบอย่างมากซึ่งมีระยะจาก $[\alpha]_D^{20}$ – 78.2 ถึง 109.5 องศาเซลเซียส (Whistler, 1950)

ไซแลนของไม้เนื้ออ่อนจะมีโซ่กิ่งที่เป็นกรดมากกว่าไซแลนของไม้เนื้อแข็ง โดยไซแลนในไม้เนื้ออ่อนจะมีกรดอยู่ 1 หน่วยต่อ ดี-ไซโลส 5-6 หน่วย ในขณะที่ไซแลนของไม้เนื้อแข็งจะมีกรด 1 หน่วยต่อ ดี-ไซโลส 9-12 หน่วย โดยปกติไม้เนื้อแข็งจะปรากฏหมู่อะซิติล 1 หมู่ที่ไซโลสหน่วยที่ 2 ในสายหลักของไซแลน และปฏิกิริยาอะซิทิเลชัน (acetylation) ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ออกซิเจนตำแหน่งที่ 3 แทนที่จะเป็นออกซิเจนตำแหน่งที่ 2 (Biely, 1985)

กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลน ดังรูปที่ 3 แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลัก

1.1 เอนโด-1,4-บีตา-ไซลาเนส (endo-1,4-β-xylanase; E.C. 3.2.1.8) ทำหน้าตัดสายตรงของหน่วยบีตา-1,4-ไซโลส อย่างสุ่มได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโล-โอลิโกแซคคาไรด์และไซโลไบโอส

1.2 บีตา-ไซโลซิเดส (β-xylosidase; E.C. 3.2.1.37) ทำหน้าที่ตัดสายตรงของไซโล-โอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆที่ประกอบด้วย 2, 3 หรือ 4 หน่วยของบีตา-1,4-ไซโลสและไซโลไบโอสจากปลายสายที่ไม่มีหมู่รีดิวส์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส

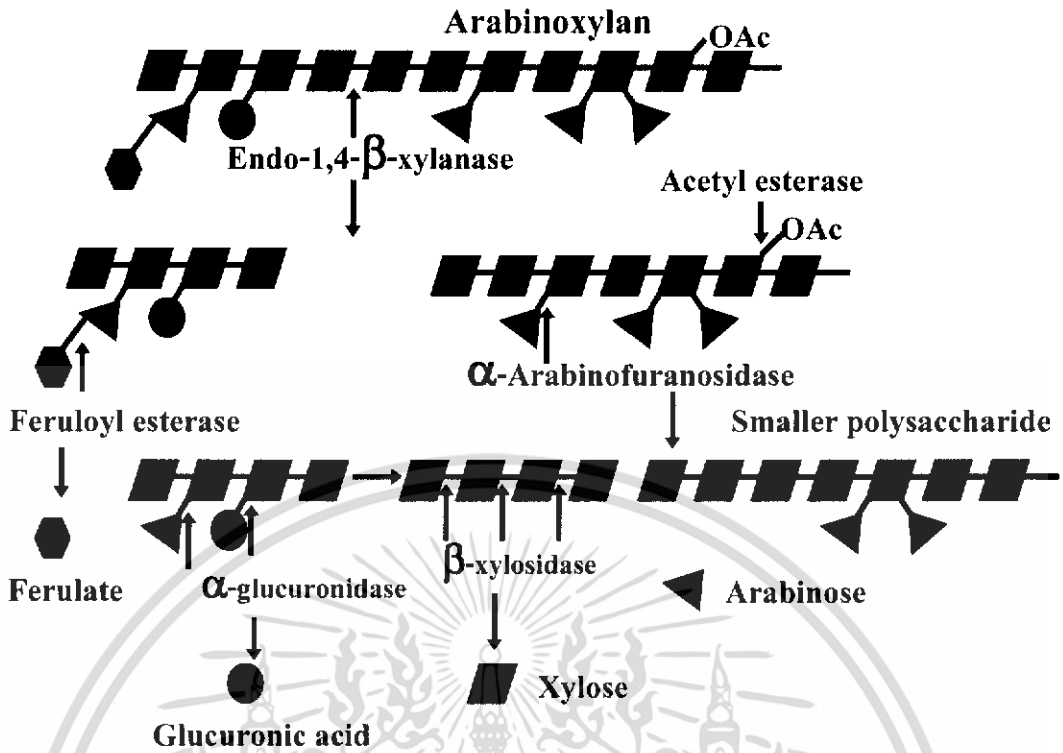
2. กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายสายโซ่กิ่ง

2.1 แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส (α-L-arabinofuranosidase; E.C. 3.2.1.55) ทำหน้าที่ตัดพันธะระหว่างอะราบิโนสและไซโลส แต่ตัดได้เมื่อไซโลสถูกแทนที่ด้วยหน่วยแทนที่หน่วยเดียวเท่านั้น

2.2 แอลฟา-กลูคูโรนิเดส (α-glucuronidase; E.C. 3.2.1.139) ทำหน้าที่ตัดส่วนของกรดกลูคูโรนิค และหมู่ 4-O-methylether ของไซแลน แอลฟา-กลูคูโรนิเดสมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อโอลิโกแซคคาไรด์เป็นสับสเตรตในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้สับสเตรต ที่เป็นพอลิเมอร์จะพบว่ามีกิจกรรมต่ำหรือไม่มีเลย (Vries และคณะ, 1998)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 การทำงานของกลุ่มเอนไซม์ในการย่อยสลายไซแลน
ที่มา: http://www.adisseonorthamerica.com/rovabioguide/versatility.asp

2.1.3 ลิกนิน

ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ที่ซับซ้อน และมีความแข็งแรงทนทานต่อการย่อยสลาย เนื่องจากสังเคราะห์ขึ้นได้จากหน่วย phenylpropanoid ซึ่งเกิดจากการจับกันเป็นโมเลกุลใหญ่ ของ p-coumaryl alcohol, conifetyl alcohol และ sinapyl alcohol (Sjostrom, 1981) หน่วยย่อยเหล่านี้จะจับตัวกันเป็นโครงสร้าง 3 มิติ โดยสร้างพันธะเอสเทอร์ (C-O-C) นอกจากนี้พันธะคาร์บอน (C-C) ทำให้ลิกนินทนต่อการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่าง โดยทั่วไปพบลิกนินในส่วน middle lamella ทำให้ห่อหุ้มส่วนของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเอาไว้ เป็นผลให้การย่อยสลายของทั้งสองส่วนเกิดได้ช้าและย่อยได้น้อย

2.2 ลักษณะของเชื้อรา

เชื้อราที่มีในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด เช่น *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* และ *Aspergillus sp.* เป็นต้น แต่ชนิดที่มีความน่าสนใจสำหรับการทดลองนี้ คือ *Aspergillus sp.* ซึ่งโคโลนีมีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีสีขาว สีเหลือง สีน้ำตาลอมเหลือง สีน้ำตาลถึงดำหรือสีโทนเขียว โคนิดิโอเฟอร์ จะตั้งตรงและหนาแน่น (มีผนังกั้น) มีลักษณะเป็นกิ่งก้านส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลายจะพองเป็นถุง phialide จะตั้งอยู่บนถุงนั้นอาจมี 1ชั้นหรือ 2ชั้นโคนิเนียจะเกิดเป็นสายที่ปลาย phialide โคนิเดียที่แห้งแล้วจะอัดตัวกันเป็นปล้องๆคล้ายไม้ไผ่ หรือแยกออกเป็นแฉก *Aspergillus sp.* สามารถปนเปื้อนใน สับสเตรตหลายชนิด สามารถเจริญในอากาศร้อนได้ดีกว่า *Penicillium* หลายสปีชี่ส์ จะมีกระบวนการดูดสารอาหารได้โดยตรง สามารถผลิตสารพิษจากกระบวนการผลิตเมทาบอไลท์ มีความสำคัญในกระบวนการหมักของอาหาร(ประเภทอาหารตะวันออก) และสามารถถูกประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตสารอินทรีย์หรือผลิตเอนไซม์

2.2.1 ลักษณะของเชื้อ *Aspergillus fumigatus*

เป็นฟังไจที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและทนอุณหภูมิสูงได้ดี (สูงถึง 57 องศาเซลเซียส) พบได้ทั่วโลก สามารถแยกได้จากอากาศ พืช อาหารสัตว์ ดิน และกากของเสียจากการบำบัดน้ำเสีย ลักษณะโคโลนีมีสีขาวในระยะแรกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวออกเป็นสีน้ำเงินเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่

โครงสร้างเป็นเส้นใยเรียกว่า ไฮฟา (hypha) แบบมีผนังกั้น โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) หรือ สทอก (stalk) ยาว 250-300 ไมโครเมตร กว้าง 16.6-18.8 ไมโครเมตร ชูขึ้นจากฟุตเซลล์ (foot cell) ซึ่งเป็นเซลล์มัยซีเลียมพิเศษมีขนาดใหญ่ผนังหนา ส่วนปลายจะโป่งออกเป็นรูปคล้ายช้อนจนกระทั่งคล้ายรูปผลแพร์เรียกว่า vesicle ฟิไลด์ (phialide) ซึ่งทำหน้าที่สร้างคอนนิเดียสั้น โคนิเดีย (conidia) รูปร่างกลมจนกระทั่งเป็นรูปไข่ ยาว 2.3-2.5 ไมโครเมตร (Stevenson, 1975; Klich และคณะ, 1996)

รูปที่ 4 การเจริญของ *A. fumigatus* บนอาหาร Czapexdox agar เมื่อบ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยการหมัก

การศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์เป็นสิ่งจำเป็น นั่นคือในการผลิตเอนไซม์ควรเตรียมวัตถุดิบและสิ่งแวดล้อมให้มีสภาพที่เหมาะสมซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญที่จะระบุว่าจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพหรือไม่ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แตกต่างกัน ในสภาพที่ไม่เหมาะสมจุลินทรีย์จะมีระยะ lag phase ยาวขึ้นและใช้เวลาในการแบ่งตัวนานขึ้นซึ่งทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง

2.3.1 สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์นั้นประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติและจุลินทรีย์ที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์ ปกติจุลินทรีย์ตามธรรมชาติจะมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ต่ำ เพื่อให้ไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม จึงได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ต่างๆ จำนวนมาก ซึ่งการปรับปรุงสายพันธุ์มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การใช้รังสีต่างๆ ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีแกมมา เป็นต้น การใช้สารเคมี ได้แก่ สารพวก alkylating agent เช่น etyl methanesulphonate เป็นต้น การใช้รังสีร่วมกับการใช้สารเคมี และการสอดแทรกดีเอ็นเอ ซึ่งการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

2.3.2 แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อสังเคราะห์พลังงานและเป็นส่วนของผนังเซลล์ ซึ่งเป็นสิ่งแวดล้อมภายในที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจุลินทรีย์สามารถใช้ได้หมด ส่วนแหล่งคาร์บอนที่มีโมเลกุลซับซ้อน เช่น เพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ฯลฯ มีจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่ใช้ได้ และเนื่องจากราคาของสับสเตรตมีบทบาทต่อต้นทุนที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จึงมีการนำสับสเตรตที่ราคาถูกโดยเฉพาะวัตถุดิบที่มีลิกโนเซลลูโลสซึ่งไม่ละลายน้ำเป็นองค์ประกอบ เช่น ซังข้าวโพด, เปลือกข้าวสาลี, รำข้าวสาลี, ฟางข้าว เป็นต้น ไปใช้ประโยชน์สำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (Kuhud และคณะ1999; Beg และคณะ, 2000; Gupta และคณะ, 2001)

Veridiana และคณะ (2003) รายงานว่าการใช้ซังข้าวโพดบดร้อยละ 3 เป็นสับสเตรตและที่อุณหภูมิสูง 42 องศาเซลเซียสในการเลี้ยง *A. fumigatus* สายพันธุ์ทนร้อน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะให้กิจกรรมของบีตา-ไซโลซิเดสสูงที่สุดเท่ากับ 45.40 $\pm$ 3.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Antony และคณะ (2003) จากศึกษาการผลิตเอนไซม์จาก *A. fumigatus* AR1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทนด่างเจริญได้ดีในอาหารที่ประกอบด้วยสับสเตรตพวกลิกโนเซลลูโลสราคาถูก โดยผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นสับสเตรตในขณะเดียวกันเอนไซม์ไซลาเนสได้ในระดับต่ำเท่ากับ 17 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อใช้รำข้าวสาลีและชานอ้อย อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า *A. fischeri* และ *Cephalosporium* spp. ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับสูงเมื่อใช้รำข้าวสาลีเมื่อเปรียบเทียบกับฟางข้าวและชานอ้อยิ (Bansod และคณะ, 1993 และ Chandea และคณะ, 1995)

Kitpreechavanich (1992) จากศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *A fumigatus* 4-45-IF ในอาหารแข็งเมื่อความชื้นเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 81 พบว่าฟางข้าวให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 545 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับการใช้ ชานอ้อย ซังข้าวโพด และรำข้าวสาลี

Singhและคณะ (1995) รายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้นรำข้าวสาลีจากร้อยละ 1.0 เป็นร้อยละ 3.0 ทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีตา-ไซโลซิเดส โดยเชื้อ *Fusarium oxysporum* NTG-19 เพิ่มมากขึ้น

Stewartและคณะ (1983) ศึกษาการใช้หญ้าแห้งเป็นสับสเตรตในสภาวะอาหารเหลวใน การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *A. fumigatus* ATCC 46324 พบว่าให้กิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 900 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Wase และคณะ (1985) พบว่าฟางข้าวบดร้อยละ 4 เป็นสับสเตรตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *A. fumigatus* IMI 255091 โดยให้กิจกรรมสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 68.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Purkarthofer และคณะ (1993) ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จาก *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นสับสเตรต ปรากฏว่าซังข้าวโพดให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 1,950 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งนอกจากซังข้าวโพดจะประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่สำคัญแล้ว ยังประกอบด้วยสารอาหารอื่นๆ ได้แก่ แหล่งไนโตรเจน วิตามิน แร่ธาตุ เป็นต้น จึงช่วยส่งเสริมให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น

2.3.3 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์ใช้สารประกอบไนโตรเจนในการเจริญเติบโต จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจนได้แตกต่างกัน โดยไนโตรเจนจะเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีน ไซโตพลาสซึม ผนังเซลล์ และเอนไซม์ต่างๆ แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญได้แก่แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น ยูเรีย เกลือแอมโมเนีย โซเดียมไนเตรท เป็นต้น และแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น เปปโตน ทริปโตน ยีสต์สกัด เป็นต้น

Kuhud และคณะ (1998) ศึกษาเรื่องการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *F. oxysporum* สายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูง พบว่าเปปโตนกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่สุด โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 20.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามการเติมแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างยีสต์สกัดและเปปโตน มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างจากการใช้เปปโตนเพียงชนิดเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abdel-Sater และคณะ (2001) ศึกษาเชื้อราที่ย่อยสลายไซแลนและกิจกรรมของกลุ่มเอนไซม์ไซลาเนสในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรม พบว่าโซเดียมไนเตรตและเปปโตนเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ของ *Trichoderma harzianum* โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 54 และ 52 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแอมโมเนียมซัลเฟตให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่ำสุดเท่ากับ 42 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *Pleurotus ostreatus* ได้มีการทดสอบแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์หลายชนิด สรุปได้ว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มีผลต่อการผลิตเอนไซม์มากกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ โดยเปปโตนผลิตได้มากกว่าเนื้อสกัดผลิตได้มากกว่ายีสต์สกัดผลิตได้มากกว่าทริปโตนผลิตได้มากกว่า แอมโมเนียมไนเตรตผลิตได้มากกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตผลิตได้มากกว่าแอมโมเนียมฟอสเฟต ตามลำดับ (Qinnghe และคณะ, 2004)

Barkir และคณะ (2001) ศึกษาการผลิต การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและลักษณะทางชีวเคมีของบีตา-1,4-ไซลาเนสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* พบว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ต่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็นสิ่งสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จากผลการทดลองสรุปได้ว่า อาหารที่ประกอบด้วยซังข้าวโพดร้อยละ 3, ถั่วเหลืองร้อยละ 1 และแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด เท่ากับ 23.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.3.4 แร่ธาตุ

จุลินทรีย์ใช้แร่ธาตุหลายชนิดในกระบวนการเมตาบอลิซึม เช่น เชื้อราต้องการโปแตสเซียม แมกนีเซียม เหล็ก ฯลฯ ซึ่งในกระบวนการไกโคไลซิส แมกนีเซียมและสังกะสีถูกใช้เป็นโคเอนไซม์ ส่วนในกระบวนการเครปไซเคิลนั้นแมงกานีส แมกนีเซียมและเหล็กถูกใช้เป็นโคเอนไซม์

จากการศึกษาพบว่า $FeSO_4$ และ $CaCl_2$ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของ *Aspergillus* spp. (Wong และคณะ., 1988) $CuSO_4$, $MnSO_4$, และ $AgNO_3$ กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสได้ การเติม EDTA จะช่วยกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ได้เล็กน้อยเนื่องจากอาจจะเป็นตัวกำจัดไอออนของโลหะ (chelating agent) ออกจากสารละลายเอนไซม์ (Antony และคณะ, 2003) การเพิ่ม Co^{+}, Zn^{+} และ Cd^{+} ช่วยเพิ่มการยึดเกาะของเอนไซม์ไซลาเนสกับไซแลนที่ไม่สามารถละลายน้ำ (Ratanakhanokchai และคณะ, 1999)

2.3.5 อุณหภูมิ

จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิในช่วงกว้าง ความร้อนสามารถถ่ายโอนผ่านผนังเซลล์ได้อย่างอิสระและมีผลโดยตรงต่อเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทลงสู่อาหาร เมื่ออุณหภูมิสูงจนถึงระดับหนึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ จึงต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khanna และคณะ (1995) ศึกษาการผลิต การคัดแยกและการทำให้เอนไซม์ไซลาเนส บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Aspergillus* sp. PK-7 จากการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 10.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Bailey และ Vikari (1993) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *A. fumigatus* VTT-D-82195 และ *A. oryzae* VTT-D-85248 บนอาหารที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทั้งสองเท่ากับ 29 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Singh, และคณะ (1995) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *F. oxysporum* NTG-19 สายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูง ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 53.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Costa-Ferreira และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนโดย *A. oryzae* ที่ถูกคัดเลือก จากการทดลองพบว่าเชื้อรานี้ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.3.6 พีเอช

พีเอชเป็นสิ่งแวดล้อมภายนอกที่สัมพันธ์กับอาหาร และเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส การเจริญเติบโตและการทำลายจุลินทรีย์ จุลินทรีย์จะมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญหรือการผลิตเอนไซม์เรียกว่าพีเอชเหมาะสม (optimum pH) พีเอชของอาหารมีอิทธิพลต่อการซึมผ่านของผนังเซลล์ พีเอชที่มีค่าสูงหรือต่ำจะทำให้ความสามารถของกรดหรือเบสที่อยู่ในสภาพที่มีโมเลกุลไม่แตกตัวซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ ทำให้พีเอชภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง

เนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักมีการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนและโปรตีนเกิดขึ้น ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่นๆออกมา (สมใจ, 2537) ทำให้พีเอชอาจมีการเปลี่ยนแปลงจนถึงระดับที่จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้น้อยลง เพราะฉะนั้นการควบคุมพีเอชในการหมักให้อยู่ในระดับคงที่จึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ซึ่งอาจใช้สูตรอาหารที่มีความเป็นบัฟเฟอร์ เช่น เติมแคลเซียมคาร์บอเนตหรือฟอสเฟต

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสซึ่งคงตัวที่อุณหภูมิสูง โดยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* ที่ทนร้อน (Laura และคณะ, 1997) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 6.5 เมื่ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมคือ 4.3

Bailey และ Poutanen (1989) ทำศึกษาการผลิตกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลนโดย *A. fumigatus* VTT-D-82195 พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของมีค่าสูงสุดเมื่อพีเอชเท่ากับ 4.8 โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 336 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Wang และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *Aspergillus* sp. G-393 พบว่าที่พีเอช 7 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 4.7 ยูนิต/มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hoq และคณะ (1994) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *Thermomyces lanuginosus* RT9 ซึ่งพีเอชที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วง 5.0-8.0 พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 6.6 เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

2.3.7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยการเลือกใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจะช่วยให้ได้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ต้องการและยังลดปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่อาจต้องสูญเสียไปอย่างไม่จำเป็น

Dubeau และคณะ (1987) ได้ทำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Chaetomium cellulolyticum* โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

2.3.8 ตัวลดแรงตึงผิวและกรดไขมัน

ตัวลดแรงตึงผิวและกรดไขมันถูกเติมลงไปด้วย โดยตัวลดแรงตึงผิวและกรดไขมันเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากทั้งตัวตัวลดแรงตึงผิวและกรดไขมันสามารถเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ไซลาเนสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา ส่วนใหญ่ผู้ที่ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสก็จะมีการเติมสารปรุงแต่งทั้ง 2 ชนิด

Dubeau และคณะ (1987) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Chaetomium cellulolyticum* ได้มีการเติม Tween-80 ร้อยละ 0.05 ซึ่งเป็นตัวลดแรงตรึงผิวลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถให้ผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนส 15.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิม 1.6 เท่า

Singh และคณะ (1995) ได้ทำการเติมตัวลดแรงตึงผิวและกรดไขมันลงในอาหารสำหรับการเจริญของ *Fusarium oxysporum* NTG-19 โดยมีการทดลองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าการเติมน้ำมันมะกอก ร้อยละ 0.2 จะช่วยให้มีกิจกรรมเอนไซม์สูงถึง 53 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.3.9 การให้อากาศ

การเจริญของจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นผลิตภัณฑ์ อาจเกิดขึ้นได้ในสภาพที่มีอากาศหรือไร้อากาศขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการหมักและชนิดของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูโลสและไซลาเนสเป็นกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศ วิธีที่จะทำให้จุลินทรีย์ได้รับอากาศเพียงพอ ทำได้โดยการให้อากาศระหว่างการหมักซึ่งต้องควบคุมให้พอเหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์จะมากน้อยเพียงใด ขึ้นกับชนิดละปริมาณของจุลินทรีย์ จำนวนรอบและการเขย่าหรือการกวนและปริมาตรสารอาหารต่อปริมาตรของถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.10 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างเอนไซม์นั้น พบว่าจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียใช้เวลาในการเจริญและสร้างเอนไซม์ได้สูงสุด เวลา 2-3วัน แต่เชื้อราต้องใช้เวลาถึง 4-10 วัน

Joglekar และคณะ (1984) เลี้ยง *Penicillium funiculsum* ในถังหมัก พบว่าการเจริญจะเกิดขึ้นรวดเร็วในถังหมักและมีผลให้เกิดมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นหนาแน่นภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งความหนืดของน้ำเลี้ยงจะเพิ่มขึ้นตามเวลาและมีค่าสูงสุดที่ 72-96 ชั่วโมง จากนั้นลดลง การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ จะเพิ่มขึ้นเร็วมากในช่วงเวลา 24-72 ชั่วโมง โดยจะให้ค่า exo –beta-D-glucosidase และ beta-glucosidase ภายในเวลา 72 ชั่วโมง เป็น 3, 9 และ 26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต่างๆเพื่อสร้างไซลาเนส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	พีเอชเริ่มต้นของอาหาร	อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง	เวลาเพาะเลี้ยง(วัน)
Aspergillus sp. AANG19	4	35	4-7
A. fumigatus	-	40	5
A. niger	5.5	30	3
A. ochraces	6.5	30	6-14
A. terreus	4.8-4.9	30	7
Bacillus circulan	8-8.5	30	2-3
Butyrivibrio Fibrisolven	6.8-7	37	2
Dictyoglomus sp. B 1	7	68	3
Cellulomonas uda	7	30	5
Penicillium wortmanni	5.4	30	5
Rhodobacter marinus	7.1	65	2
Rhoderthesmus marinus	7.1	65	1
Streptomyces sp. T 7	7	50	3
Thermoascus aurantiacus	5-5.5	45	8
Thermoascus aurantiacus	4	50	-
Thermomonospora fusca	8	50	3
Thermomonospora fusca BD 25	7	50-55	2-4
Thermomonospora strain LL	7.6	55	2
Thermomyces lanufinosa	-	50	5-6

ที่มา : Singhและคณะ1995

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การวัดกิจกรรมเอนไซม์

กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรโดยวิธีการใช้กรดไดไนโตรไซลิซาลิก วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปล่อยจาก oat spelt และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ตามลำดับ

จากการศึกษา 1 หน่วยกิจกรรมเอนไซม์ กำหนดได้จากปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยแล้วปล่อย 1 ไมโครโมลของน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคส ต่อ 1นาทีของการเกิดปฏิกิริยา (Chrictov, และคณะ1999)

Milagres และคณะ (1993) หากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากการบ่มส่วนของฟิวเตรตที่ผ่านการเจือจางปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช 6.0) นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959)โดยใช้สารละลายของน้ำตาลไซโลสเป็นมาตรฐานในการอ้างอิง

Tang และคณะ (1987) หากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส โดยการเติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ซิเตรท ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (พีเอช 4.8) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959) โดยใช้สารละลายของน้ำตาลไซโลสเป็นมาตรฐานในการอ้างอิง

2.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนส

เนื่องจากคุณสมบัติและความอุดมสมบูรณ์ของไซแลนในธรรมชาติ การใช้เอนไซม์ไซลาเนสจึงเป็นกระบวนการที่สำคัญ ในการประยุกต์เพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (Wong และคณะ, 1992 และ Bhat, 2000) เอนไซม์ไซลาเนสนี้ใช้ในการปรับปรุงกระบวนการคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้ายโดยการย่อยสลายและปรับปรุงปริมาณอะราบิโนไซแลน

2.5.1 การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการทำขนมปัง

การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการทำขนมปัง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการขยายตัวของโด (dough) เช่น เวลาในการขยายตัว ความหนาแน่น การขยายตัว และการทนทานต่อการสลายตัว การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สามารถเห็นได้ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของขนมปัง ซึ่งเป็นการปรับปรุงปริมาตรของก้อนขนมปังและโครงสร้างของเศษขนมปัง (Rouau และคณะ, 1993; Poutanen และคณะ, 1997; Rouau และคณะ, 1994; Maat และคณะ, 1992; Hillhorst และคณะ, 1999 ; Courtin และคณะ, 2001; Sorensen และคณะ, 2003)

หน้าที่ของเอนไซม์ไซลาเนสเกี่ยวข้องกับความสามารถในการละลายของอะราบิโนไซแลนที่ไม่มีการดึงน้ำออก (water-unextractable arabinoxylan) และการเปลี่ยนแปลงความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

หนืดของโด (Rouau และคณะ, 1994; Courtin และคณะ, 2002; McCleary และคณะ, 1986) เอนไซม์ไซลาเนสทำหน้าที่ย่อยสลาย (hydrolyze) อะราบิโนไซแลนที่ไม่มีการดึงน้ำออกได้ดีมากกว่าอะราบิโนไซ-แลนที่มีการดึงน้ำออก (waer-extractable arabinoxylan) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงและความสามารถในการละลายของอะราบิโนไซแลน ก็มีผลต่อการย่อยสลาย (Maat และคณะ, 1992) เอนไซม์ไซลาเนสจะทำให้โดเหนียวและอ่อนตัว เนื่องจากการสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะของน้ำ (water holding capacity)

2.5.2 การแยกแป้งกลูเตน (gluten starch)

เอนไซม์ไซลาเนสมีความสำคัญและช่วยกระบวนการในอุตสาหกรรมการแยกแป้งกลูเตนออกจากข้าวสาลี (Weegles และคณะ, 1992) การใช้เอนไซม์ไซลาเนสช่วยเพิ่มผลผลิตของแป้งกลูเตนให้สูงขึ้นและปรับปรุงคุณภาพของกลูเตน (Christopherson และคณะ, 2001) การปรับปรุงผลผลิตของกลูเตนโดยการลดความหนืดซึ่งเป็นผลมาจากการย่อยสลายบางส่วนของอะราบิโนไซแลนที่มีการสกัดน้ำออก (Redgewell และคณะ, 1997)

2.5.3 การผลิตเบียร์

การเติมเอนไซม์ไซลาเนส ช่วยลดความหนืดของเบียร์ที่ต้มแล้วแต่ยังไม่ได้หมักหรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า น้ำวิร์ท (wort) เพื่อลดความขุ่นของเบียร์ (Debyser และคณะ, 1997; Vietor และคณะ, 1993; Ducroo และ Frelon, 1989; Cach และคณะ, 1995; Coote และ Kirsop, 1976) เนื่องจากเอนไซม์ไซลาเนส ช่วยลดความหนืดและความสามารถในการยึดเกาะของน้ำของอะราบิ-โนไซแลน ทำให้เพิ่มอัตราในการกรอง และการป้องกันการสกปรกบนแผ่นเมมเบรน (filtration membrane)

2.5.4 การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

เอนไซม์ไซลาเนสมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติของอาหารที่ประกอบด้วยธัญพืช โดยช่วยปรับปรุงปริมาณไฟเบอร์ ไฟเบอร์ที่สามารถละลายน้ำได้มีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น ช่วยลดระดับของคอเลสเทอรอลในเลือดซึ่งช่วยลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและโรคเบาหวาน (Haskell และคณะ, 1992; Glore และคณะ, 1994) เนื่องจากเอนไซม์ไซลาเนสมีความสำคัญต่อระดับการละลายได้ของอะราบิโนไซแลนในขนมปัง (Laurikainen และคณะ, 1994) นอกจากนี้ชิ้นส่วนเล็กๆ ของอะราบิโนไซแลนเป็นผลมาจากการย่อยด้วยกลุ่มเอนไซม์ไซลาเนสยังมีผลต่อสุขภาพในมนุษย์อีกด้วย (Campbel และคณะ, 1997)

2.5.5 กระดาษและเนื้อเยื่อไม้

เอนไซม์ไซลาเนสถูกนำเข้าสู่อุตสาหกรรมกระดาษและเนื้อเยื่อไม้เมื่อ 20 ปีมาแล้ว (Beg และคณะ, 2001) Viikari และคณะ (1986) เป็นคนแรกที่เสนอรายระเอียดการบำบัด (treatment) เนื้อเยื่อไม้ด้วยเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) เอนไซม์ไซลาเนสมีชื่อเสียงอย่างมากในการลดความต้องการคลอรีนซึ่งใช้ในการฟอกสี เอนไซม์ไซลาเนสนี้จะทำให้ไซแลนแตกหัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
67308

ภายในส่วนเมทริก (matrix) ของเนื้อเยื่อไม้ (Paice และคณะ, 1992) ทำให้โครงสร้างระหว่างเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ที่เชื่อมต่อกันแน่นเปิดออกอย่างพอเพียง ซึ่งจะทำให้สารเคมีที่ใช้ฟอกสีเข้าไปทำปฏิกิริยาต่อส่วนที่เหลือของลิกนินได้ดี (Clark และคณะ, 1991; Clarke และคณะ, 1997; Harris และคณะ, 1997; Wong และคณะ, 1997; Suurnakki และคณะ, 1997) เอนไซม์ไซลาเนสสามารถเกิดปฏิกิริยากับไซแลนที่เกิดขึ้นใหม่และปลดปล่อยลิกนินในภายหลัง (Patel และคณะ, 1993)

2.5.6 ธัญพืชที่ใช้เป็นเชื้อเพลิง ของเสียจากการเกษตรและการป่าไม้

ในแต่ละปีสูญเสียค่าขนส่งชีวมวลจากธัญพืชที่ใช้เป็นเชื้อเพลิง ของเสียที่เหลือจากการเกษตรและการป่าไม้อย่างมาก จึงมีการใช้เอนไซม์ไซลาเนสให้เป็นประโยชน์ คือ เอนไซม์ไซลาเนส สามารถใช้เพื่อเปลี่ยนไซแลนไปเป็นไซโลสในของเสียที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ (Rani และ Nand, 1996) เอนไซม์ไซลาเนสร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ เช่น แมนแนเนส (mannanase) ลิกนิเนส (ligninase) ไซโลซิเดส (xylosidase) และอื่นๆ สามารถใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น เอทานอลและไซลิทอลจากชีวมวลของพืช (Dominguez, 1998; Kuhud และ Singh, 1993 ; Galbe และ Zacchi, 2002) กระบวนการชีวภาพของการผลิตเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงต้องการการแยกลิกนิน จากลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เพื่อปลดปล่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสแล้วจึงทำการดีพอลิเมอร์ไรซ์ (depolymerisation) พอลิเมอร์ของคาร์โบไฮเดรต (carbphydrate polymer) เพื่อผลิตน้ำตาลอิสระ (free sugar) ซึ่งใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล (Lee, 1997)

2.5.7 กระบวนการอื่นๆ

เอนไซม์ทำให้น้ำผลไม้ใส ช่วยในการย่อยอาหารสัตว์ ซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าของอาหารสัตว์มีการใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการเตรียมวัตถุดิบในการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ใช้ศึกษาคุณสมบัติของพอลีแซคคาไรด์และผนังเซลล์พืช (Wong และคณะ, 1988) และประยุกต์ใช้ในการสกัดน้ำมันปาล์มเช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนส โดยใช้ในอัตรา 200-1000 กรัมต่อชั่วโมง ที่ อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง เพื่อแปลสภาพเนื้อเยื่อพืชก่อนนำไปสกัดด้วยกระบวนการที่ใช้น้ำปริมาณน้อยและแยกน้ำมันด้วยการหมุนเหวี่ยงในกระบวนการขั้นต่อไป นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันและน้ำทิ้งโดยลดปริมาณเนื้อเยื่อของพืชที่มีโมเลกุลสูง ซึ่งทำให้เกิดความหนืดหรือข้น เช่น กลูแคน เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลสและเพคตินทำให้การแยกน้ำมันในขั้นตอนการทำให้ใส ดีขึ้น (Gofrey, 1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุ

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร และขนาดมากกว่า 0.75 มิลลิเมตร

3.1.2 จุลินทรีย์

เชื้อราทนอุณหภูมิสูง *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส และเอนไซม์เซลลูเลส

3.2 อุปกรณ์

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และกล้องจุลทรรศน์

เครื่องกวนระบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

ตู้บ่มเชื้อ (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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหาร potato dextose agar (PDA) เป็นอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อราอุณหภูมิสูง (ภาคผนวก ก)

3.3.2 อาหารเหลวสำหรับการเลี้ยงเชื้อราเพื่อให้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราอุณหภูมิสูง (ภาคผนวก ก)

3.4 การเตรียมเชื้อรา

3.4.1 การเลี้ยงเชื้อราเพื่อให้มีการสร้างสปอร์

ทำการเขี่ยเชื้อราทนร้อนจากเชื้อเริ่มต้นนำมาเลี้ยงลงบนอาหารวุ้นเอียง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 4 วัน

3.4.2 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา

นำหลอดอาหารที่มีเชื้อรา (จากข้อ 3.4.1) เติมน้ำกลั่นที่ผสมสารละลาย tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้ขดลวดขูดสปอร์ให้กระจายในสารละลาย และนำมาทำการนับสปอร์ของเชื้อเริ่มต้นให้มีจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5 การเตรียมอาหารที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเตรียมสูตรอาหาร (ภาคผนวก ก) นำมาบรรจุในเออเลนเมเยอร์ ฟลาสก์ (Elenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร (ตัวอย่างละ 3 ฟลาสก์) โดยในแต่ละฟลาสก์บรรจุอาหาร 100 มิลลิลิตร และบรรจุซังข้าวโพดความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบกับการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอชเป็น 6.0 ทำการฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมสารละลายสปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (จากข้อ 3.4) นำมาเลี้ยงที่สภาวะเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สุ่มเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเก็บในวันที่ 2, 3, 4 และ 5 นำตัวอย่างที่เก็บมาทำการแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวัดพีเอชและนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง

3.6.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อราทนอุณหภูมิสูงในอาหารเหลว (จากข้อ 3.5) แล้วทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ซังข้าวโพดเล็ก (ขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร) ซังข้าวโพดใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ขนาดมากกว่า 0.75 มิลลิเมตร) เปลือกข้าวโพดเล็ก (ขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร) และเปลือกข้าวโพดใหญ่ (ขนาดมากกว่า 0.75 มิลลิเมตร) (ทำการทดลองชนิดละ 3 ซ้ำ) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ทำการปรับพีเอชเป็น 6.0 ขั้นตอนต่อจากนี้ทำตามข้อ 3.5 ทำการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุด และนำแหล่งคาร์บอนที่ได้มาใช้ในการศึกษาขั้นตอนไป

3.6.2 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อราทนอุณหภูมิสูงในอาหารเหลวและมีแหล่งคาร์บอนที่มีขนาดที่คัดเลือก (จากข้อ 3.6.1) โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 (ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ) ปรับพีเอชเป็น 6.0 ขั้นตอนต่อจากนี้ทำตามข้อ 3.5 ทำการคัดเลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุด และนำความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ได้มาใช้ในการศึกษาขั้นตอนไป

3.6.3 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อราทนอุณหภูมิสูงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือก (จากข้อ 3.6.1 และ 3.6.2) โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เปปโตน (peptone) และยีสต์สกัด (yeast extract) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2, 0.3 และ 0.4 (ทำการทดลองชนิดละ 3 ซ้ำ) ทำการปรับพีเอชเป็น 6.0 ขั้นตอนต่อจากนี้ทำตามข้อ 3.5 โดยทำการคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุด แล้วนำชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ได้มาใช้ในการศึกษาขั้นตอนไป

3.6.4 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อราทนอุณหภูมิสูงในอาหารเหลวที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (จากข้อ 3.6.1 และ 3.6.2) และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน(จากข้อ 3.6.3 และ 3.6.4) โดยทำการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหาร ได้แก่ พีเอช 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 (ทำการทดลองพีเอชละ 3 ซ้ำ) ทำการปรับพีเอชก่อนการฆ่าเชื้อ ทำการฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ขั้นตอนต่อจากนี้ทำตามข้อ 3.5 โดยคัดเลือกพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุด

3.6.5 การศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อราทนอุณหภูมิสูงในอาหารเหลวที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (จากข้อ 3.6.1 และ 3.6.2) และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (จากข้อ 3.6.3 และ 3.6.4) พีเอชเริ่มต้น (จากข้อ 3.6.5) แล้วทำการฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ขั้นตอนต่อจากนี้ทำตามข้อ 3.5 โดยทำการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส (ทำการทดลองอุณหภูมิละ 3 ซ้ำ) แล้วทำการคัดเลือกอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุด

3.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.7.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

นำสารละลายเอนไซม์ที่มีความเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงสารละลายไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ละลายในบัฟเฟอร์ซนิดซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที นำมาหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำมาคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส (Tang และคณะ, 1987)

3.7.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

นำสารละลายเอนไซม์ที่มีความเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงสารละลายคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส (Carboxymethylcellulose; CMC) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ละลายในบัฟเฟอร์ซนิดซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำมาหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำมาคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (Mandel และคณะ, 1969)

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง) แบบ Duncan'new Mulpitle-Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย

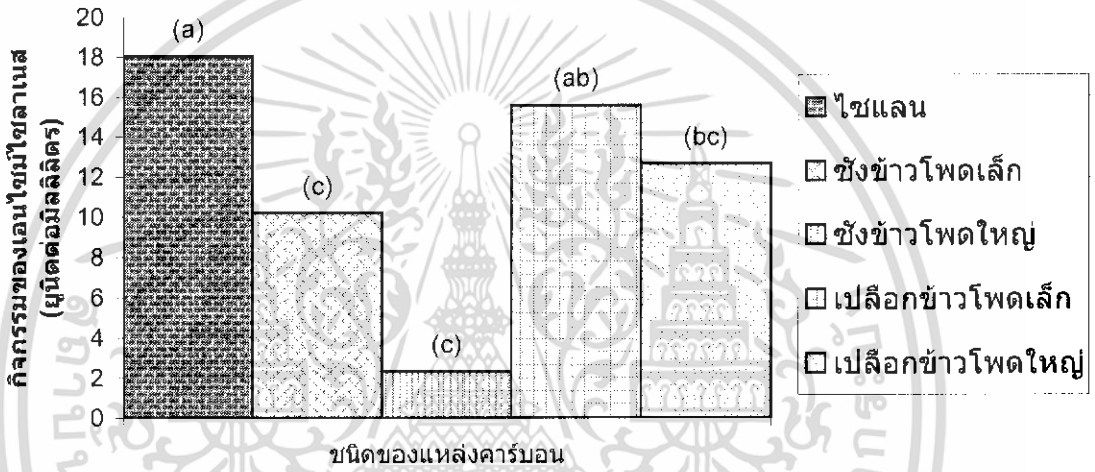
4.1.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

ผลของชนิดแหล่งคาร์บอนซึ่งใช้สูตรอาหารของ Singh และคณะ (1998) (ภาคผนวก ก) ที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ ซังข้าวโพด และเปลือกข้าวโพด ที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร และขนาดมากกว่า 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย จากผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.1 พบว่า ในการเลี้ยงเชื้อราจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด โดยใช้เปลือกข้าวโพดเล็ก (ขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร) เป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด คือ 16.93 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จะสูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น เมื่อนำมาเปรียบเทียบทางสถิติซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค ตารางที่ ค.1) จากผลการทดลองพบว่าการใช้ซังข้าวโพดเล็กและซังข้าวโพดใหญ่เป็นแหล่งคาร์บอนมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราน้อยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้เปลือกข้าวโพด และค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมื่อใช้เปลือกข้าวโพด (ขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 9.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 8.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อใช้เปลือกข้าวโพดขนาดเล็กและใหญ่ตามลำดับ ดังนั้นเปลือกข้าวโพดเล็ก (ขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย

จากการที่เชื้อรา *A. fumigatus* สามารถใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่สุด อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบภายในของเปลือกข้าวโพดมีเฮมิเซลลูโลสอยู่เป็นจำนวนมาก คือ ร้อยละ 39 และมีลิกนินอยู่ในปริมาณน้อย ซึ่งลิกนินเป็นส่วนที่ย่อยสลายได้ยากเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ (Benber และ Benedito de Barder, 1974; Kuhad, 1999) อีกทั้งอาจเนื่องจากการเรียงตัวของไซแลนในโครงสร้างของเปลือกข้าวโพดอยู่ในตำแหน่งที่ย่อยสลายได้ง่ายกว่า ส่วนเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนที่สามารถนำไปใช้ได้ง่ายที่สุดเมื่อเทียบกับเซลลูโลสและลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของเปลือกข้าวโพด (Kuhad, 1999) ดังนั้นเปลือกข้าวโพดจึงสามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากที่สุด ประกอบกับในเปลือกข้าวโพดอาจมีแหล่งของสารอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งไนโตรเจน วิตามิน แร่ธาตุ เป็นต้น ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อราจึงช่วยส่งเสริมให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากขึ้น (Purkarthofer และคณะ, 1993b)

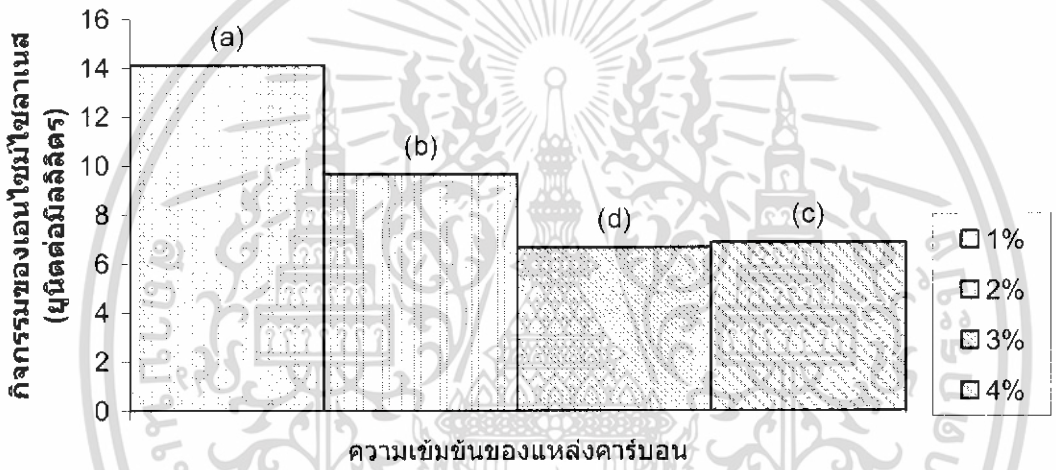


รูปที่5 ผลของชนิดแหล่งคาร์บอน ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย เมื่อมีการแปรผันแหล่งคาร์บอน คือ ซังข้าวโพดขนาดเล็ก (ขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร) ซังข้าวโพดขนาดใหญ่ (ขนาดเกิน 0.75 มิลลิเมตร) เปลือกข้าวโพดขนาดเล็ก (ขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร) และเปลือกข้าวโพดขนาดใหญ่ (ขนาดมากกว่า 0.75 มิลลิเมตร) ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่สภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.0 เป็นระยะเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

จากผลของการใช้เปลือกข้าวโพดบดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยการเลี้ยงเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.2 พบว่าเมื่อใช้เปลือกข้าวโพด ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลทำให้เชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 14.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นอื่นๆ ที่ใช้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 (ภาคผนวก ค ดังตารางที่ ค.2)

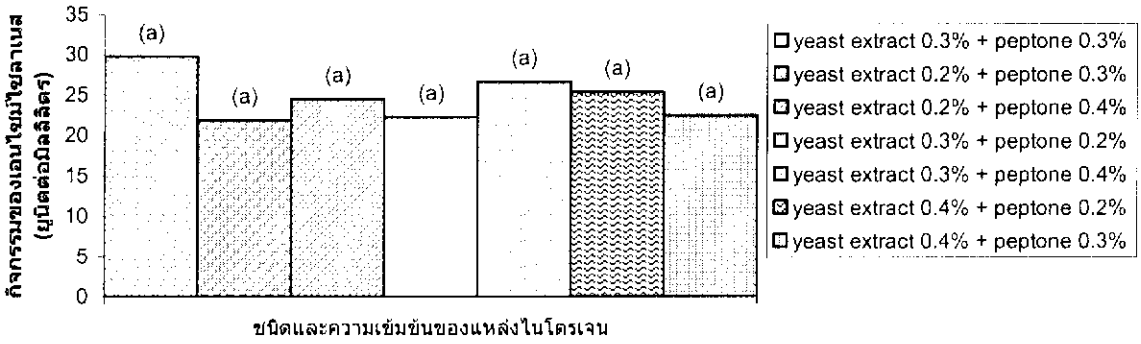


รูปที่ 6 ผลของความเข้มข้นของเปลือกข้าวโพด (ขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A. fumigatus* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่สภาวะความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.0 เป็นระยะเวลา 5 วัน

4.1.3 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ยีสต์สกัดผสมกับเปปโตน ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนซึ่งประกอบด้วยยีสต์สกัดผสมกับเปปโตน ที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.0612 ผลการทดลอง (แสดงดังรูปที่ 4.3) ยีสต์สกัดผสมเปปโตน ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.2 , 0.3 และ0.4 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 (ภาคผนวก ค ดังตารางที่ ค.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 ผลของความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน ยีสต์สกัดผสมกับเปปโตน ที่มีผลต่อการผลิเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้นของอาหาร 6.0 เป็นระยะเวลา 5 วัน

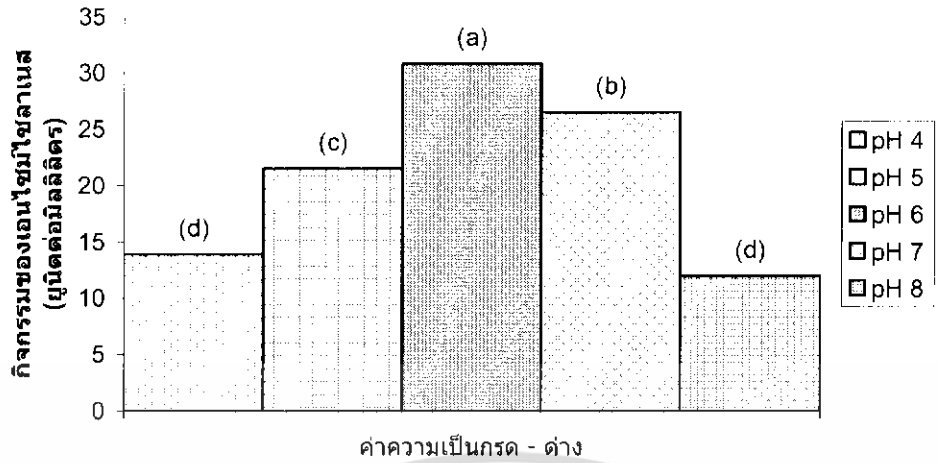
4.1.4 พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

จากผลการทดลองพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายโดยทำการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 30.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวอื่นๆ ที่ได้ศึกษามา แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.4 ยังพบว่าในน้ำหมักส่วนใหญ่มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้น โดยมีค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 5.99, 6.78, 7.09, 7.33 และ 7.91 ตามลำดับ

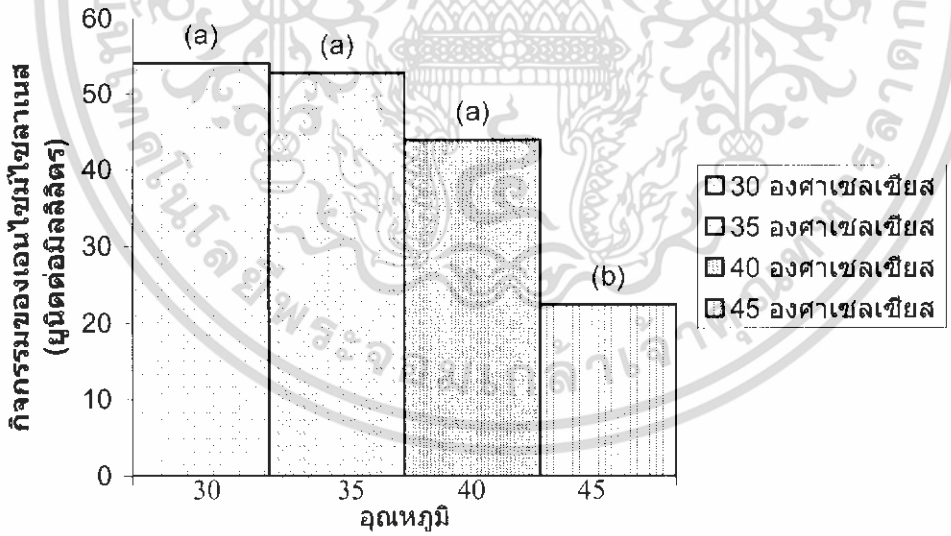
4.1.5 อุณหภูมิเริ่มต้นที่ผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

จากการทดลองอุณหภูมิเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย โดยทำการแปรผันอุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราทนร้อน *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 50.33 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ได้ศึกษามาจากผลการทดลอง ดังรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่สภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ ต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ เป็นระยะเวลา 5 วัน



รูปที่ 9 ผลของอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่สภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ ต่อนาที ที่อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 เป็นระยะเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราทนร้อน *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายในสภาวะอาหารเหลว ใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อราในเออเลนเมเยอร์ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสูตรอาหารของ Singh และคณะ (1998) และใช้เปลือกข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และใช้แหล่งเปปโตนผสมยีสต์สกัดที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนร้อยละ 0.3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ภายใต้สภาวะการเจริญที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสนี้ พบว่า *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 50.33 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 1.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน และวัดค่าพีเอชสุดท้ายของน้ำหมักได้ 7.56

ข้อเสนอแนะ

1. การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว ควรศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ เช่น การควบคุมพีเอช การเติมสารเหนี่ยวนำเอนไซม์ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว ความเร็วรอบในการเขย่า อัตราส่วนของปริมาณอาหารต่อขนาดของฟลาสก์ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

2. ควรศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อคาร์บอนว่าอัตราส่วนใดทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซท์ไซลาเนสได้สุด

3. เนื่องจากซังข้าวโพดที่ผ่านการบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิลิตรอาจมีหลายขนาดตั้งแต่ 0 – 0.75 มิลลิลิตร ปะปนกันอยู่ ทำให้ไม่สามารถควบคุมให้ได้ขนาดเดียวกันทุกอนุภาคได้ จึงอาจทำให้มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ได้ จึงควรหาวิธีในการทำให้ได้อนุภาคของซังข้าวโพดที่มีขนาดเดียว กันทุกอนุภาค

4. การปรับปรุงกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เช่น การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) หรือการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม อาจทำให้ได้จุลินทรีย์ที่สามารถต้านทานการยับยั้งการผลิตเอนไซม์จากกระบวนการ catabolite repression ซึ่งทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. สหมิตรออฟเซต. กรุงเทพฯ. น.250

Abdel-Sater, M. A. and El-Said, A. H. M. 2001. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. *International Biodeterioration and 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 and Technology.* 32 : 647-654

Bailey, M. J. and Poutanen, K. 1989 . Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus fumigatus. Applied Microbiology Biotechnology.* 30: 5-10.

Bailey, M. J. and Viikari, L. 1993. Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylanbased media. *World Journal Microbiology 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 Microbrial Technology.* 29: 328-334.

Bansod, S. M., Dutta-Choudhary, M., Srinivasan, M. C. and 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 cerealbased diets, In: Courtin, C.M., Veraverbeke, W., Delcour (Eds.), J.A., Recent Advances in Enzymes in Grain Processing: Proceedingsof 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 Biotechnology.* 56: 326– 338.

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

Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advance.* 18: 355–383.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Biely, P. 1993. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: Hemicellulose and Hemicellulases, ed. M. P. Coughlan amd G. P. Hazlewood. Portland Press, London. 40: 29-51.

Biswas, S.R., Jana, S. C., Mishra, A.K. and Nanda, G. 1990. Production, purification, and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*. *Biotechnology Bioengineering*. 35: 244-251.

Brafia-Castillo, B.E. and Berry, D.R. 1992. Xylanase biosynthesis by the wood-rotting fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Process 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 Nutrition*. 127: 130–136.

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

Chandra , K. and Chandra, T. S. 1995. A cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxnl. *Biotechnology Letters*. 17: 309-314.

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., and Singh, D. 1991. Improved bleachability of Radiata pine kraft pulps following treatment with hemicellulolytic enzymes. *Applied Microbiology Biotechnology*. 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 Biotechnology*. 48: 177–183.

Costa-Ferreira, M., Dias, A., M~imo, C., Morgado, M. J., Sena-Martins, G. and Duarte, J. C. 1994. Xylanolytic enzyme production by an *Aspergillus niger* isolate. *Applied Biochemistry 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 Agricultural Food Chem*istry. 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Courtin, C.M., Delcour, J.A. 2002. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal Cereal Science*. 35: 225– 243.

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. and Steinmiiller, H. 1987. The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 26: 485-494.

Ducroo, P. and Frelon, P.G. 1989. Improvement of beer production by the use of α-glucanase-pentosanase from *Diporotrichum dimorphosphorum*, European Brewery Convention: Proceedings of the 22nd Congress, IRL Press, Oxford. pp. 445–452.

Fengler, A.I. and 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., Ramón, D., Pifiaga, F. and 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 Biotechnology*. 59 : 618– 628.

Ghosh, M., Das, A., Mishra, A. K. and Nanda, G. 1993. *Aspergillus sydowii* MG49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes. *Enzyme Microbial Technology*. 15: 703-709.

Ghosh, V. K. and Deb, J. K. 1988. Production and characterization of xylanase from *Thielaviopsis basicola*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 29 : 44-47.

Gilbert, M., Breuil, C. and Saddler, J. N. 1992. Characterization of the enzymes present in the cellulase system of *Thielavia terrestris* 255B. *Bioresource Technology*. 39: 47-154.

Gomes, J., Gomes, I., Esterbauer, H., Kreiner, W. and 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 Biotechnology*. 31: 601-608.

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

Gomes, D. J., Gomes, J. and Steiner, W. 1994. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. *Journal Biotechnology*. 33: 87-94.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Graham ,H. and 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. and 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.and Perez , S. 1997. Structural basis of the properties of an industrial relevant thermoplhilic xylanase. Proteins. *Bioresource Technology*. 29: 77– 86.

Hillhorst, R., Dunnewind, B., Orsel, R., Stegeman, P., van Vliet, T., Gruppen, H. and Schols, H.A. 1999. Baking performance, rheology, and chemical composition of wheat dough and gluten affected by xylanase and oxidative enzymes. *Journal Food Science*. 64: 808– 813.

Hoq, M. M., Hempel, C. and Deckwer, W.-D. 1994. Cellulase- free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9: effect of agitation, aeration, and medium components on production. *Journal Biotechnology*. 37: 49-58.

Hoq, M. M. and Deckwer, W.-D. 1995. Cellulase-free xylanase by thermophilic fungi: a comparison of xylanase production by two *Thermomyces lanuginosus* strains. *Applied Microbiology Biotechnology*. 43: 604-609.

Hrmovi, M., Biely, P. and Vransk, M. 1989. Celluloseand xylan-degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbial Technology*. 11 : 610-616.

Jackson, M.G. 1997. The Alkali Treatment of Straws. *Animal Feed Science and Technology*. 2(2) : 105-130.

John, M. and SchmkR, J. 1988. Xylanases and xylosidase of Trichoderma . In Biomass, ed. W. A. Wood and S. T. Kellogg. Methods Enzymology.,Academic Press, San Diego. 160 : 662-671.

Johnson, K.G., Silva, M.C., MacKenzie, C.R., Schneider, H. and Fontana, J.D. 1989. Microbial degradation of hemicellulosic materials. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 20(21): 245-258.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kang, S.-W., Kim, S.-W. and Lee, J.-S. 1995. Production of cellulase and xylanase in a bubble column using immobilized *Aspergillus niger* KKS. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 53: 101-106.

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

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

Kilch, M. A., Samson, R. A. and 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. and Singh, A. 1993. Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects, *Critical Review Biotechnology*. 13: 151–172.

Kuhad, R. C., Singh, A., and 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 Review Biotechnology*. 13: 151-172.

Laura, P. Castro, M. Blanca, A. Trejo-Aguilar and Osorio., G.A. 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 Science Food Agriculture*. 76: 239–249.

Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, *Journal 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. and Rotterdam, C.V. 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. pp. 349–360.

Marsden, W.L. and Gray, P.P. 1986. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignocellulosic Material. *Critical Review in Biotech*. 3(3): 235-276.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Milagres, A. M. F. and Duran, N. 1992. Xylanolytic enzymes from *Penicillium janthinellum* and its applications in bleaching of pulp. *Process Biotechnology*. 7: 539-545.

Okeke, B. C. and Obi, S. K. C. 1993. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an *Arthrographis* species. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 9: 345-349.

Paice, M. G., Jurasek, L., Carpenter, M. R. and Smillie, L.B. 1978. Production, characterization, and partial amino acid sequence of xylanase A from *Schizophyllum commune*. *Applied Environment Microbiology*. 26 pp. 802 - 808.

Paice, M.G., Gurnagul, N., Page, D.H. and Jurasek, L. 1992. Mechanism of hemicellulose directed prebleaching of kraft pulp, *Enzyme Microbial Technology*. 14 : 272– 276.

Patel, A.N., Grabski, A.C. and Jeffries, T.W. 1993. Chromophore release from kraft pulp by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanase. *Applied Microbiology Biotechnology*. 39: 405–412.

Peltonen, S. 1995. Comparison of xylanase production by fungal pathogens of barley with special reference to *Bipolaris sorokiniana*. *Mycology Reviews*. 99: 717-723.

Pettersson, D. and Aman, P. 1988. Effects of enzyme supplementation of diets based on wheat, rye orriticale on their productive value for broiler chickens. *Animal Feed Science Technology*. 20: 313– 324.

Poutanen, K., Rfitt6, M., Puls, J. and Viikari, L. 1987. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. *Journal Biotechnology*. 6: 49-60.

Poutanen , K. 1997. Enzymes: An important tool in the improvement of the quality of cereal foods. *Trend Food Science Technology*. 8: 300– 306.

Purkarthofer, H., Sinner, M. and 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. and Nand, K. 1996. Development of cellulase-free xylanase producing anaerobic consortia for the use of lignocellulosic wastes. *Enzyme 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Redgewell, R.J., Michieli, J.H., Fisher, M., Reymond, Nicolas, S., P. and Sievert, D. 2001. Xylanase induced changes to water and alkali-extractablearabinoxylans in wheat flour: their role in lowering battering viscosity. *Journal 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 Cereal Science*. 18: 145– 157.

Rouau, X., El-Hayek, M.-L. and 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 Cereal Science*. 19: 259– 272.

Saddler, J. N., Hogan, C, M. and Louis-Seize, G. 1985. A comparison between the cellulase systems of *Trichoderma harzianum* E58 and *Trichoderma reesei* C30. *Applied Microbiology Biotechnology*. 22: 139-145.

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

Sinha, N. and Sengupta, S. 1995. Simultaneous production of α-arabinofuranosidase and xylanase by *Termitomyces clypeutus*. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 11: 359-360.

Sjostrom, F. 1981. Wood Chemistry (Fundamentals and Application). New York : Acedemic Press.

Smith, D. C. and Wood, T. M. 1991a. Isolation of mutants of *Aspergillus awamori* with enhanced production of extracellular xylanase and fl-xylosidase. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 7: 343-354.

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

Steiner, J., Socha, C. and Eyzaguirre, J. 1994. Culture conditions for enhanced cellulase production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 10: 280-284.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Stewart, J. C., Lester, A., Milburn, B. and Parry, J. B. 1983. Xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Biotechnology Letter*. 5: 543-548.

Suurnakki, A., Tenkanen, M., Buchert, J. and Viikari, L. 1997. Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. *AdvanceBiochemistry Engineer Biotechnology*. 57: 261–287.

Sugden, C. and 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 Microbiology 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 L., Cristina, G., Marques D.S., Fabiana, G.M. and Rosane, M.P. 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 Instant Brewing*. 99: 243– 248.

Vries, R. P., Poulsen, C. H., Madrid, S., and Visser, J. 1998. *agu4*, the gene encoding an extracellular α-glucuronidase from *Aspergillus tubingensis* is specifically induced on xylose and not on glucuronic acid. *Journal Bacteriology*. 180 :243-249

Wang, S. L., Chen, L..G., Chen, C. S. andChen, L. F. 1994. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus* sp. G-393. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 45(46) : 655-662.

Wase, D.A.J., Raymahasay, S. and 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 Microbial Technology*. 7: 225-229.

Weegels, P.L., Marseille, J.P. and Hamer, R.J. 1992. Enzymes as a processing aid in the separation of wheat flour into starch and gluten, Starch/Starke. 44: 44–48.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Whistler, R.L. 1950. Xylan *Advance Carbohydrate Chemistry*. 5: 269-290.

Wiacek-Zychlinska, A., Czakaj, J., Jedrychowska, B. and Sawicka-Zukowska, R. 1992. Production of xylanases by *Chaetomium globosum*. *Process 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 Review*. 52 : 305–317.

Wong, K.K.Y. and 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. and Jong, E. 1997. Bleach boosting and direct brightening by multiple xylanase treatments during peroxide bleaching of kraft pulps, *Biotechnology Bioengineering*. 54: 261–287

Yu, E. K. C., Tan, L. U. L., Chan, M. K.-H., Deschatelets, L. and Saddler, J. N. 1987. Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Enzyme Microbial Technology*. 9: 16-24.

http://www.adisseonorthamerica.com/rovabioguide/versatility.asp

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

http://www.enzymes.co.uk/Basics/cell_wall.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. อาหารสูตร Potato dextose agar (PDA)

ประกอบด้วย

Potato dextose agar	39	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Potato dextose agar ในน้ำกลั่น แล้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตรสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส

ส่วนประกอบของอาหารสูตร 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 แล้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

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

เตรียม Stock solution :

(A) : สารละลายของกรดซิตริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

(B) : สารละลายโซเดียมซิเตรท ($C_6H_5O_7Na_3 . 2H_2O$) 0.05 โมลาร์

วิธีการ

เติมสารละลายของกรดซิตริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 230 มิลลิลิตร ลงไปในสารลายของโซเดียมซิเตรท 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 270 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้ได้ 4.8 โดยการปรับพิเอชให้ลดลงโดยใช้สารละลายของกรดซิ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และปรับพีเอชให้เพิ่มขึ้นโดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรท 0.05 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสตามวิธีของ Tang et. al. (1987)

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย (ร้อยละ)

Dinitrosalicylic (DNS) acid	1.0
Phenol	0.2
Sodium potasssium tartrate	20.0
Sodium sulphite (Na_2SO_3)	0.05
Sodium hydroxide	1.0

วิธีการเตรียม

ละลาย Sodium hydroxide ในน้ำกลั่นตามปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเติม Sodium potasssium tartrate, Phenol และ Dinitrosalicylic acid ลงในสารละลาย Sodium hydroxide จากนั้นทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชาเก็บไว้ในที่มืด ก่อนนำมาใช้ให้เติม Sodium sulphite 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ DNS reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายไซแลนและความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในบัฟเฟอร์ซิเตรทความเข้มข้น 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 ลงไปทันที นำไปต้มแล้วทำตามวิธีการข้างต้น)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

ยูนิตต่อมิลลิลิตร = มิลลิกรัมของไซโลส x 1000 x จำนวนเท่าของความเจือจางสารละลายเอนไซม์
น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลไซโลส x ระยะเวลาบ่ม x ปริมาตรสารละลายเอนไซม์
(กรัมต่อโมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

1.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลสในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส

1. เตรียม stock solution ของน้ำตาลไซโลสให้มรความเข้มข้น 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

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

3. เติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร

4. นำไปต้มน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบทำให้เย็นด้วยน้ำก๊อก

5. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ใดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส

2. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mandelและคณะ(1969)

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

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ยูนิตต่อมิลลิลิตร = มิลลิกรัมของกลูโคส x 1000 x จำนวนเท่าของความเจือจางสารละลายเอนไซม์
น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส x ระยะเวลาบ่ม x ปริมาตรสารละลายเอนไซม์
(กรัมต่อโมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

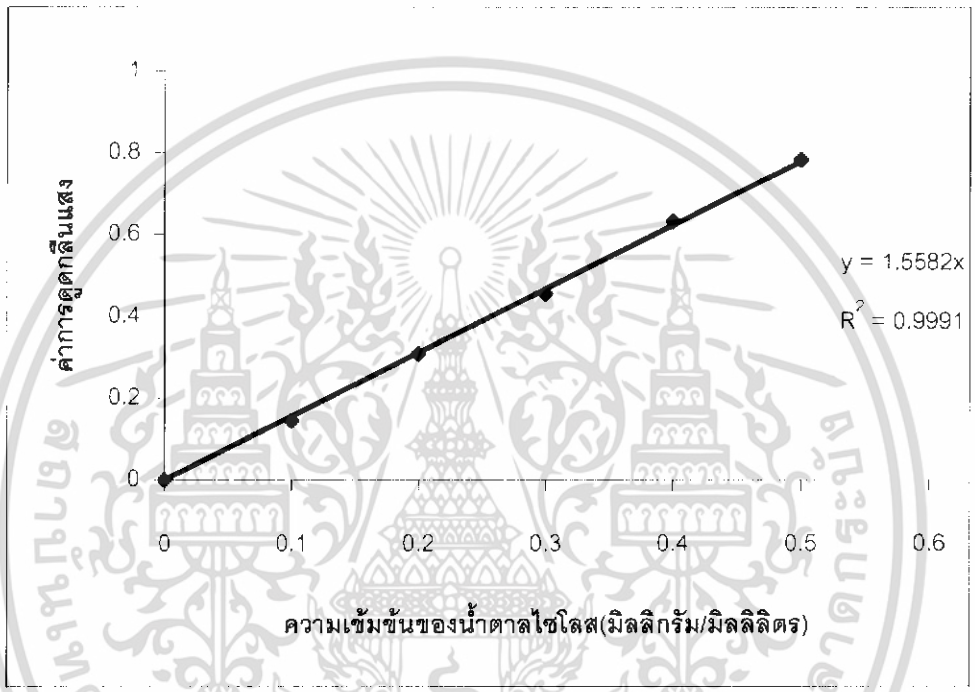
1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

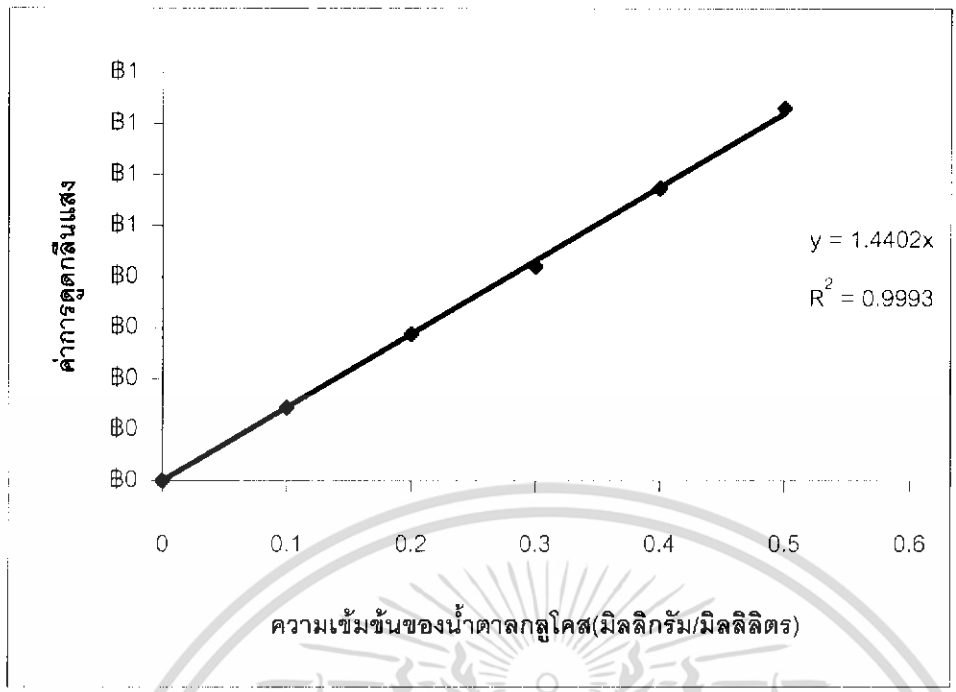
<u>วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส</u>

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส (ข้อ 1.1) แต่ใช้สารละลายกลูโคสแทนสารละลายไซโลส นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

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

ตารางที่ ค. 2การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของสูตรอาหารและชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราทนร้อน *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ซังข้าวโพดเล็ก	ซังข้าวโพดใหญ่	เปลือกข้าวโพดเล็ก	เปลือกข้าวโพดใหญ่
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	8.999^{c}	8.283^{c}	16.933^{ab}	13.018^{bc}

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค. 3 การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราทนร้อน *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน(ร้อยละ)	1.0	2.0	3.0	4.0
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	14.2000^{a}	9.6335^{b}	6.7000^{d}	6.9000^{c}

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค. 4 การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราทนร้อน *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (ร้อยละ)	ยีสต์สกัด 0.3 + เปปโตน 0.3	ยีสต์สกัด 0.2 + เปปโตน 0.3	ยีสต์สกัด 0.2 + เปปโตน 0.4	ยีสต์สกัด 0.3 + เปปโตน 0.2	ยีสต์สกัด 0.3 + เปปโตน 0.4	ยีสต์สกัด 0.4 + เปปโตน 0.2	ยีสต์สกัด 0.4 – เปปโตน 0.3
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	20.4665[a]	15.5000[a]	16.6665[a]	14.8335[a]	23.9670[a]	18.6665[a]	20.4000[a]

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.5 การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราทนร้อน *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

พีเอชเริ่มต้น	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	13.5665^{d}	21.1000^{c}	30.2000^{a}	24.7000^{b}	12.7335^{d}

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค.6 การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ทีระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราทนร้อน *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30.0	35.0	40.0	45.0
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	50.3330^{a}	48.1335^{a}	39.6000^{a}	19.2000^{b}

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้