การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

OPTIMIZATION OF CMCase PRODUCTION BY YEAST ISOLATE M1

กัลยาณี อยู่แก้ว
ธนภรณ์ เพ็ชร์ทอง
ปฏิมาภรณ์ ห้วยหงษ์ทอง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OPTIMIZATION OF CMCase PRODUCTION BY YEAST ISOLATE M1

KANLAYANEE YOOKAEW

THANAPORN PETTHONG

PATIMAPORN HUAYHONGTHONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ACADEMIC YEAR 2018

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 Optimization of CMCase Production by Yeast Isolate M1
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกัลยาณี อยู่แก้ว รหัสนักศึกษา 58050860 นางสาวธนภรณ์ เพ็ชร์ทอง รหัสนักศึกษา 58050893 นางสาวปฏิมาภรณ์ ห้วยหงษ์ทอง รหัสนักศึกษา 58050917
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.วิมลมาศ บุญมี ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ	
ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

ชื่อนักศึกษา นางสาวกัลยาณี อยู่แก้ว รหัสนักศึกษา 58050860
นางสาวธนภรณ์ เพ็ชร์ทอง รหัสนักศึกษา 58050893
นางสาวปฏิมาภรณ์ ห้วยหงษ์ทอง รหัสนักศึกษา 58050917

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 โดยศึกษาปัจจัยในการผลิตเอนไซม์ CMCase ได้แก่ ชนิดของอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ CMCase ให้ได้ปริมาณที่สูงขึ้น พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ได้แก่ อาหาร Vyas และ Chhabra (2017) ที่มีคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีสารสกัดมอลต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.56 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยยีสต์ไอโซเลท M1 สามารถผลิตเอนไซม์ CMCase ได้สูงถึง 0.100 ± 0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ CMCase เพิ่มขึ้นถึง 2.4 เท่า การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าที่สภาวะดังกล่าวเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 เพื่อผลิตเอนไซม์ CMCase

คำสำคัญ : คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ยีสต์ไอโซเลท M1 สารสกัดมอลต์ อาหาร Vyas และ Chhabra เอนไซม์ CMCase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Optimization of CMCase Production by Yeast Isolate M1
Students	Miss Kanlayanee Yookaew Student ID 58050860
	Miss Thanaporn Petthong Student ID 58050893
	Miss Patimaporn Huayhongthong Student ID 58050917
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Asst.Prof.Dr.Somphit Sornyotha

Abstract

The objective of this work was to study the optimization of CMCase production by yeast isolate M1. The variables in the CMCase production such as types of cultivation media, types and concentration of carbon source, and types and concentration of nitrogen source were screened for higher CMCase production. The optimal conditions were found to be Vyas and Chhabra medium, carboxymethylcellulose 1% (w/v), and malt extract 0.56% (w/v). The high CMCase production 0.100 ± 0.001 U/mL was reached in 72 hours using optimal conditions. A 2.4-fold increase in CMCase production was achieved by this study. The investigation showed that these conditions have suitable to optimize CMCase production by a yeast isolate M1.

Keywords: carboxymethylcellulose, yeast isolate M1, malt extract, Vyas and Chhabra medium, CMCase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้จะสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีไม่ได้ หากไม่ได้รับการช่วยเหลือจาก ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา ซึ่งเป็นทั้งอาจารย์ที่ปรึกษาและกรรมการให้แก่ผู้ทำการวิจัย อาจารย์ได้แนะนำชี้แนวทางและเคร่งครัดต่อผู้ทำการวิจัยให้มีความกระตือรือร้นและรับผิดชอบต่อหน้าที่มาโดยตลอด ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการศึกษางานวิจัยนี้เป็นอย่างมาก นอกจากนั้นยังตรวจทานโครงงานพิเศษฉบับนี้จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณดร.วิมลมาศ บุญมี ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการ และผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุลที่กรุณารับเป็นกรรมการในการตรวจสอบให้คำเสนอแนะและปรับปรุงให้โครงงานพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

และขอขอบพระคุณการสนับสนุนและความช่วยเหลือจากหลายฝ่ายที่ได้กรุณาชี้แนะให้กำลังใจและให้คำแนะนำตลอดจนช่วยอำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินการทดลอง ผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณทุกท่าน

กัลยาณี อยู่แก้ว
ธนภรณ์ เพ็ชร์ทอง
ปฏิมาภรณ์ ห้วยหงษ์ทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 เซลลูโลส 5

2.2 เซลลูเลส 8

2.2.1 เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส 8

2.2.2 เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส 8

2.2.3 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส 8

2.3 ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 10

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 19

2.4.1 ชนิดของจุลินทรีย์ 19

2.4.2 องค์ประกอบของอาหาร 19

2.4.2.1 แหล่งคาร์บอน 19

2.4.2.2 แหล่งไนโตรเจน 19

2.4.2.3 แร่ธาตุ 20

2.4.3 การเพาะเลี้ยง 20

2.4.3.1 Submerged fermentation 20

2.4.3.1 Solid surface fermentation 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.4 ปริมาณหัวเชื้อ 20
2.4.5 พีเอช 20
2.4.6 อุณหภูมิสำหรับการเพาะเลี้ยง 21
2.4.7 ระยะเวลาสำหรับการเพาะเลี้ยง 21
2.5 กระบวนการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส 21
2.5.1 วิธีการปรับสภาพทางกายภาพ 21
2.5.2 วิธีการปรับสภาพทางเคมี 22
2.5.3 วิธีการปรับสภาพทางเคมีกายภาพ 22
2.5.4 วิธีการปรับสภาพทางชีวภาพ 22
2.6 การประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในทางอุตสาหกรรม 23
2.6.1 อุตสาหกรรมสารซักฟอก 23
2.6.2 อุตสาหกรรมอาหารเครื่องดื่ม 23
2.6.3 อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ 24
2.6.4 อุตสาหกรรมสิ่งทอ 24
2.6.5 อุตสาหกรรมพลังงาน 24
2.5.6 อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ 25
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 25
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 28
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 28
3.2 สารเคมี 29
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ 30
3.4 ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา 33
3.5 การเตรียมกล้าเชื้อ 33
3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดย
ยีสต์ไอโซเลต M1 33
3.6.1 การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase. 33
3.6.2 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.6.3 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase 34
3.6.4 การศึกษาความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase 35
3.6.5 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase 35
3.7 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 35
3.8 การตรวจวัดปริมาณโปรตีนในส่วนใสที่ได้ 36
3.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 37
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 38
4.1 ผลของชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 38
4.2 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 43
4.3 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 45
4.4 ผลของความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 47
4.5 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase 49
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 52
5.1 สรุปผลการวิจัย 52
5.2 ข้อเสนอแนะ 53
เอกสารอ้างอิง 54
ภาคผนวก 60
ภาคผนวก ก 61
ภาคผนวก ข 64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ค 66
ภาคผนวก ง 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 2.1 แสดงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยยีสต์ genus *Trichosporon* 11

ตารางที่ 2.2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Endoglucanase และ β-glucosidase ที่ผลิตโดยยีสต์ genus *Trichosporon Cryptococcus Candida* และ *Debaryomyces* 13

ตารางที่ 2.3 สรุปวิธีการที่ใช้ในการปรับสภาพทางเคมี..... 22

ตารางที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลต M1 เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและใช้ Carboxymethylcellulose เป็นแหล่งคาร์บอน..... 39

ตารางที่ 4.2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด..... 40

ตารางที่ 4.3 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase และกิจกรรมสัมพันธ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหารที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน..... 44

ตารางที่ 4.4 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase และกิจกรรมสัมพันธ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหารที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน..... 46

ตารางที่ 4.5 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase และกิจกรรมสัมพันธ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหารที่มี Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน..... 48

ตารางที่ 4.6 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase และกิจกรรมสัมพันธ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหารที่มีสารสกัดมอลต์ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน..... 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ ค.1 แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น-ของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ภายใต้สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 67

ตารางที่ ค.2 แสดงบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ไอโซเลท M1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 79

ตารางที่ ง.1 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ CMCase เมื่อทำการศึกษาชนิดของอาหาร แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 80

ตารางที่ ง.2 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณโปรตีน เมื่อทำการศึกษาชนิดของอาหาร แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 81

ตารางที่ ง.3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของกิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ CMCase เมื่อทำการศึกษาชนิดของอาหาร แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 82

ตารางที่ ง.4 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้ชนิดของอาหารที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ ง.5 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 84

ตารางที่ ง.6 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 85

ตารางที่ ง.7 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้ Carboxymethylcellulose ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 86

ตารางที่ ง.8 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้สารสกัดมอลต์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส (A) เซลลูโลสประกอบด้วยสายยาวของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic linkage) หมุนได้ 180 องศา เซลลูโลสไฟบริลมีความแข็งแรงมาก ส่วนใหญ่ไฟบริลมีการจัดเรียงตัวเป็นผลึก หรือแบบเป็นระเบียบ (B) การเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล และระหว่างโมเลกุลของเส้นใยเซลลูโลส..... 6

รูปที่ 2.2 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของเซลลูโลส (A) การรวมกันเป็นมัดของไฟบริลด้วยพันธะไฮโดรเจน (B) ภาพตัดขวางด้านข้างของหนึ่งไฟบริล แสดงบริเวณการจัดเรียงตัวแบบเป็นระเบียบ (crystalloids) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) 7

รูปที่ 2.3 แผนภาพแสดงขั้นตอนในการย่อยสลายเซลลูโลส..... 9

รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร..... 64

รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร.....65

รูปที่ ค.1 เซลล์ยีสต์ไอโซเลท M1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) กำลังขยายทั้งหมด 1000 เท่า..... 66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช และเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ เซลลูโลสถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานให้แก่แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท และเชื้อราจำนวนมาก ซึ่งโครงสร้างเซลลูโลสมีความแข็งแรงมาก จึงทำให้การทำลายหรือการบวมโดยธรรมชาติใช้ระยะเวลานาน จึงต้องอาศัยเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น (William, 1983)

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์สำคัญที่ทำให้เกิดการย่อยสลายของเซลลูโลส เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส มี 3 ชนิด ได้แก่ 1.เอนโดกลูคาเนส (endogluconase) หรือ CMCase หรือ β-1,4-endoglucan hydrolases (EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสในบริเวณที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส (จุฑาพร และคณะ, 2554) ซึ่งไม่สามารถย่อยเซลโลไบโอส (cellobiose) ได้ แต่สามารถย่อยเซลลูโลสที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว และสารที่ใช้แทนเซลลูโลส เช่น Carboxymethylcellulose (CMC) และ Hydroxyethylcellulose (HEC) เป็นต้น (William, 1983) 2.เอกโซกลูคาเนส (Exoglucanase) หรือเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส (Cellobiohydrolase) หรือ 1,4-β-D-oligoglucan cellobiohydrolases (CBHI, EC 3.2.1.74 และ CBHII, EC 3.2.1.91) จะย่อยเซลลูโลสบริเวณผลึก (crystalline) ได้ผลิตภัณฑ์คือน้ำตาลเซลโลไบโอส และ 3.เบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) หรือ β-D-glucoside glucohydrolase (EC 3.2.1.21) จะย่อยน้ำตาลเซลโล-ไบโอสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส (กุสุมาวดี, 2557) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ส่วนประกอบของอาหาร เทคนิคการเพาะเลี้ยง ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (มูรนีย์, 2557) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ เช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท และเชื้อรา เป็นต้น ซึ่งเชื้อราเป็นที่นิยมในการนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ เช่น *Trichoderma Humicola Aspergillus Penicillium* และ *Myceliophthora* เป็นต้น (Neha และคณะ, 2018) แต่เชื้อรามีข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงและการวัดการเจริญเติบโต (อารี, 2559) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารกึ่งเหลว การผสมกันระหว่างสับสเตรทที่เป็นของแข็งและอาหารเหลวไม่ทั่วถึง รวมถึงการควบคุมพีเอช และอุณหภูมิทำได้ยาก ต้องใช้อัตราเร็วรอบของการกวนที่เหมาะสมไม่เช่นนั้นจะไปทำให้เส้นใยขาดได้ (ผ่องศรี และคณะ, 2554) นอกจากนี้เชื้อรายังส่งผลให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารหนืด และทำให้ปริมาณการละลายของออกซิเจนลดน้อยลง ซึ่งเชื้อราต้องการใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต ถ้าปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอ อาจทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อราไม่ดีและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลดน้อยลงด้วย (Kiptoo และ Rajeshwara, 2018) จากข้อจำกัดทั้งหลายของเชื้อรา จึงทำให้ปัจจุบันมีการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ประเภทอื่นมากขึ้น โดยยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างเส้นใย และสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ในปัจจุบันพบสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ เช่น *Candida, Rhodotorula, Trichosporon* และ *Sporobolomyces* เป็นต้น ข้อดีของการนำยีสต์ในการผลิตเอนไซม์คือ ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโทส และน้ำตาลซูโครส เป็นต้น และยีสต์ยังสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีองค์ประกอบที่ไม่ซับซ้อน ดังนั้นยีสต์จึงมีความได้เปรียบกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นในการนำมาใช้ผลิตเอนไซม์ เอนไซม์เซลลูเลสมีขายในท้องตลาดมานานกว่า 30 ปี และเป็นที่ต้องการมากในทางอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมสารซักฟอก อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมพลังงาน และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เป็นต้น (Mojsov, 2016) อีกทั้งเอนไซม์เซลลูเลสยังเป็นที่ต้องการมากในเชิงการค้าอีกด้วย สำหรับเอนไซม์เซลลูเลสในตลาดโลก ทวีปเอเชียเป็นผู้ผลิตและผู้บริโภคที่ใหญ่ที่สุดโดยมีส่วนแบ่งตลาดสูงถึงร้อยละ 32.84 ในปี 2559 พบว่าความต้องการเอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์สูงถึงร้อยละ 29.71 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มสูงถึงร้อยละ 26.37 และอุตสาหกรรมสิ่งทอสูงถึงร้อยละ 13.77 โดยมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทั้งสามชนิด ได้แก่ Endogluconase Cellobiohydrolase และ β-glucosidase โดยเอนไซม์ Endogluconase มีส่วนแบ่งตลาดสูงถึงร้อยละ 39.57 และคาดการณ์ว่าเอนไซม์เซลลูเลสจะเติบโตประมาณร้อยละ 7.5 ในอีกห้าปีข้างหน้า และมีรายได้สูงถึง 2320 ล้านเหรียญสหรัฐในปี 2566 จากเดิมในปี 2560 มีรายได้ 1,500 ล้านเหรียญสหรัฐ (Abby, 2019) แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากยีสต์น้อยมาก โดยจากโครงงานพิเศษของวริศรา และคณะ (2560) ได้ทำการคัดแยกยีสต์ไอโซเลท M1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ CMCase ได้ ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 เพื่อผลิตเอนไซม์ CMCase ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น รวมทั้งมีการนำเอาวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น รำข้าว ชานอ้อย ธูปฤาษี และเปลือกข้าวโพด เป็นต้น มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

1.2.3 เพื่อศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

1.2.4 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

1.2.5 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ทำการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสม ได้แก่ อาหาร Csiszar อาหาร Mandels ที่เติมเปปโตน อาหาร Mandels ที่เติมสารสกัดยีสต์ (Yunzi Hua และคณะ, 2018) อาหาร Vyas และ Chhabra (2017) และอาหาร Basal (มูรนีย์, 2557) ต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

1.3.2 ทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ได้แก่ Carboxymethylcellulose รำข้าว ชานอ้อย ธูปฤาษี และเปลือกข้าวโพด ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

1.3.3 ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมโมลิบเดต แอมโมเนียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท สารสกัดยีสต์ สารสกัดมอลต์ สารสกัดเนื้อ เปปโตน และยูเรีย ต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

1.3.4 ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose ที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 โดยมวลต่อปริมาตร ต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

1.3.5 ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.08 0.16 0.24 0.32 0.48 และ 0.56 โดยมวลต่อปริมาตร ต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

1.4.2 สามารถนำเอนไซม์ CMCase ที่ผลิตจากยีสต์ไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอ-เอทานอล อุตสาหกรรมสิ่งทอ และอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ เป็นต้น

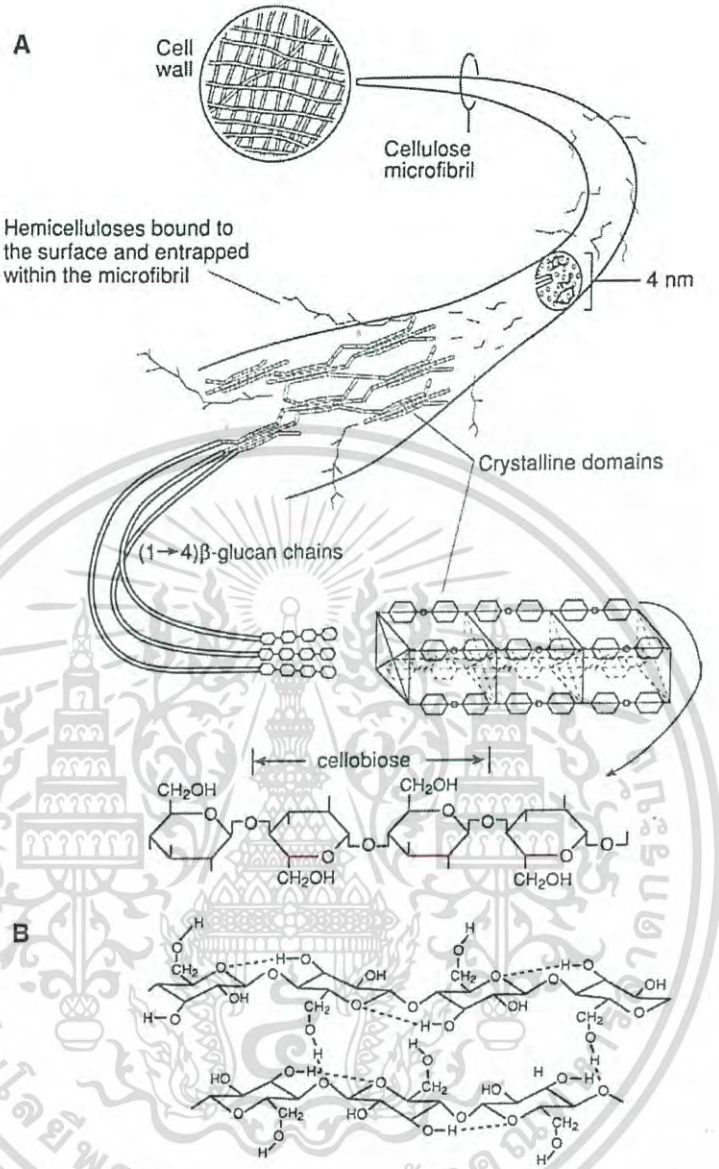
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เซลลูโลส

เซลลูโลส (cellulose) เป็นส่วนประกอบที่พบมากที่สุดของพืช โดยเฉพาะบริเวณผนังเซลล์ของพืช ซึ่งเซลลูโลสไม่สามารถละลายน้ำได้ (Remaz และคณะ, 2018) โดยผนังเซลล์พืชมีองค์ประกอบหลักสามส่วนคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เซลลูโลสจัดเป็นหนึ่งในแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานที่สำคัญให้แก่ แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท และเชื้อรา (William, 1983) เซลลูโลสเป็นโฮโมพอลิเมอร์มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคส (β-D-glucopyranose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic linkage) เซลลูโลสพบในผนังเซลล์ของพืชทุกชนิดและแบคทีเรียบางสายพันธุ์ มีคุณสมบัติเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ธรรมชาติที่มีมากที่สุดในโลก โครงสร้างทางเคมีของพันธะเบต้า1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic linkage) เป็นลักษณะสายตรงหมุนได้ 180 องศา (ดังรูปที่ 2.1) ในธรรมชาติเซลลูโลสมีการจัดเรียงตัวทั้งแบบเป็นระเบียบ (crystalline) และแบบไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ซึ่งการจัดเรียงตัวแบบเป็นระเบียบจะมีความแข็งแรงทั้งจากพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล (intrachain) และระหว่างโมเลกุล (interchain) โดยพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล (intrachain) เกิดระหว่างวงแหวนออกซิเจน และกลุ่มไฮดรอกซิล (-OH group) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ในน้ำตาลกลูโคสโมเลกุลถัดไป พันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล (interchain) เกิดขึ้นระหว่างกลุ่มไฮดรอกซิล (-OH group) และอะตอมของออกซิเจนที่เชื่อมต่อกันด้วยแรงวันเดอร์วาลส์ สายกลูแคน (glucan) เรียงต่อกันเรียกว่าไมโครไฟบริล (microfibrils) หรืออาจเป็นไฟบริล (fibrils) หมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) ส่วนใหญ่ในเซลลูโลสถูกนำไปใช้ในการสร้างพันธะไฮโดรเจน จึงทำให้โมเลกุลของเซลลูโลสแข็งแรงและทนทานมาก (Lalit, 2002) ในธรรมชาติโมเลกุลของเซลลูโลสจะจัดเรียงตัวในรูปแบบไฟบริล ประกอบด้วยหลายโมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (ดังรูปที่ 2.2) ทำให้มีโครงสร้างที่แข็งแรงและทนทาน ดังนั้นการย่อยสลายเซลลูโลสในธรรมชาติจึงเป็นไปได้ยาก ในการศึกษาวัสดุที่สามารถนำมาทดแทนสำหรับการผลิตพลังงานและอาหาร จึงนำไปสู่ความสนใจในการใช้เอนไซม์ เพื่อย่อยสลายเซลลูโลส (William, 1983)

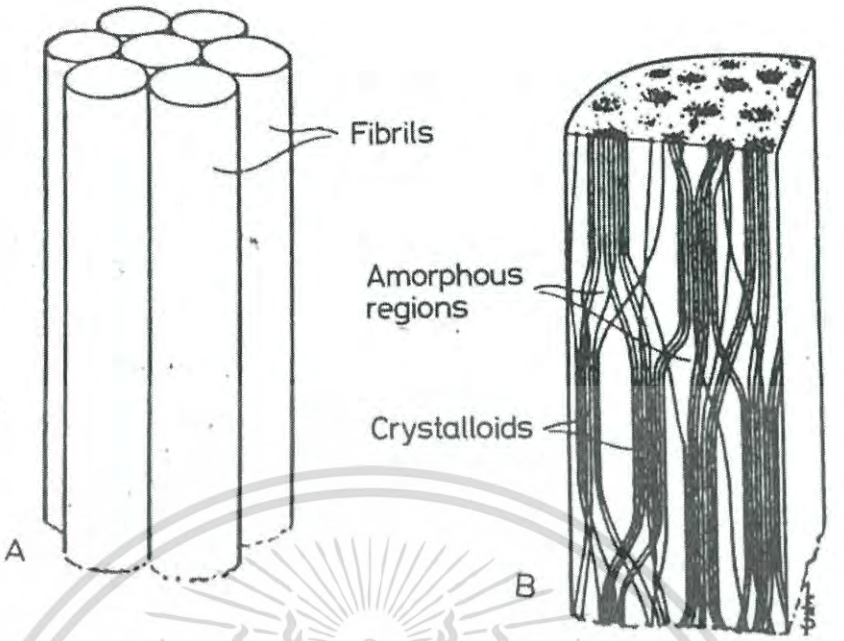
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส (A) เซลลูโลสประกอบด้วยสายยาวของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic linkage) หมุนได้ 180 องศา เซลลูโลสไฟบริลมีความแข็งแรงมาก ส่วนใหญ่ไฟบริลมีการจัดเรียงตัวเป็นผลึก หรือแบบเป็นระเบียบ (B) การเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล และระหว่างโมเลกุลของเส้นใยเซลลูโลส

ที่มา: Lalit (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของเซลลูโลส (A) การรวมกันเป็นมัดของไฟบริลด้วยพันธะไฮโดรเจน (B) ภาพตัดขวางด้านข้างของหนึ่งไฟบริล แสดงบริเวณการจัดเรียงตัวแบบเป็นระเบียบ (crystalloids) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous)

ที่มา: William (1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) สามารถย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic bound) ในสายโซ่ของเซลลูโลส (cellulose) ได้เป็นโมเลกุลน้ำตาลที่เล็กลงคือ โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) เซลโลไบโอส (cellobiose) และกลูโคส (glucose) เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลู-เลสได้มีทั้งพวกจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ (aerobic microorganism) และไม่ใช่อากาศ (anaerobic microorganism) รวมทั้งจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic microorganism) และจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูง (thermophilic microorganism) ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศและสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ ปานกลาง (Mojsov, 2016) โดยจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุดคือ เชื้อรา ในสกุล *Trichoderma* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง อีกทั้งยังเป็นเชื้อราที่ใช้ในผลิต เอนไซม์เซลลูเลสในเชิงการค้ามากที่สุดอีกด้วย (Ayman และคณะ, 2017)

โดยเอนไซม์เซลลูเลสสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ

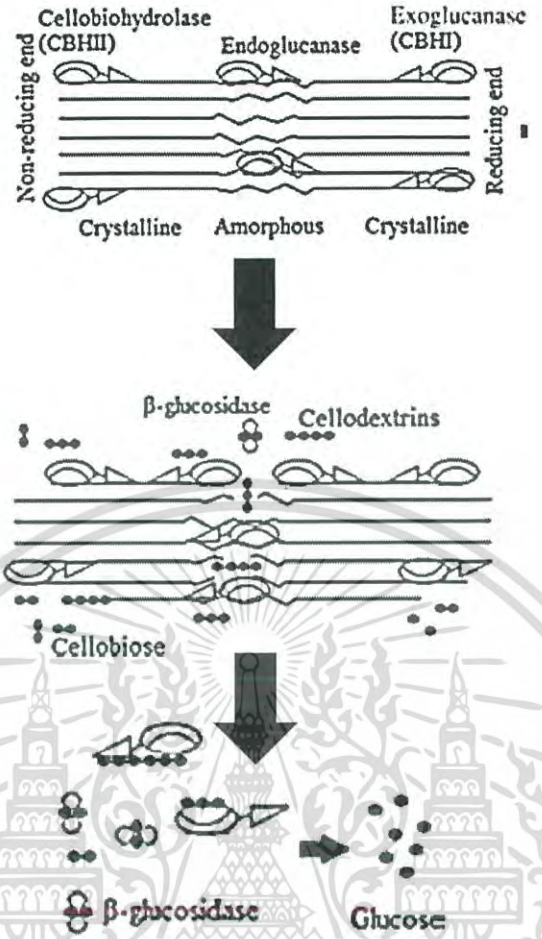
2.2.1 เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) หรือ CMCase หรือ β-1, 4-endoglucan hydrolases (EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose delivatives) เช่น คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูโลส (carboxymethylcellulose หรือ CMC) โดยการตัดที่ตำแหน่งพันธะเบต้า-1, 4-ไกลโคซิ-ดิก (β-1, 4 glycosidic bound) แบบสุ่ม (Random) ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ เซลโลโอลิโกแซกคาไรด์ (cellooligosaccharide) เซลโลไบโอส และน้ำตาลกลูโคส (Anita และคณะ, 2018)

2.2.2 เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) หรือเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส (cellobiohydrolase) หรือ 1, 4-β-D-oligoglucan cellobiohydrolases (CBHI, EC 3.2.1.74 และ CBHII, EC 3.2.1.91) จะย่อยบริเวณผลึก (crystalline) ของเซลลูโลส โดย CBHI ทำหน้าที่ย่อยสลาย เซลลูโลสจากปลายด้านที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing) และ CBHII ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส จาก ปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ของเซลลูโลส ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายคือ น้ำตาลเซลโลไบโอส (Anita และคณะ, 2018)

2.2.3 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) หรือ β-glucoside glucohydrolase (EC 3.2.1.21) เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการย่อยสลาย ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอสให้เป็น น้ำตาลกลูโคส (Anita และคณะ, 2018)

ดังนั้นในการย่อยสลายเซลลูโลสที่สมบูรณ์จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ในการทำงาน ร่วมกัน (Synergism) ดังรูปที่ 2.3 (Anita และคณะ, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แผนภาพแสดงขั้นตอนในการย่อยสลายเซลลูโลส

ที่มา: Anita และคณะ (2018)

จากรูปที่ 2.3 เป็นรูปแบบของการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ โดยการตัดที่ตำแหน่งพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่ม ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ เซลโลโอลิโกแซกคาไรด์ เซลโลไบโอส และน้ำตาลกลูโคส จากนั้นเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส หรือเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส จะย่อยบริเวณผลึกของเซลลูโลสโดย CBHI ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing) และ CBHII ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ของเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายคือ น้ำตาลเซลโลไบโอส จากนั้นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จะย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส

2.3 ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท และยีสต์ ซึ่งจุลินทรีย์มีบทบาทและความสำคัญในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เนื่องจากสะดวกในการสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถผลิตได้ในปริมาณสูง ประหยัดพื้นที่ และเวลาสำหรับการผลิต รวมทั้งต้นทุนการผลิตต่ำ (มูรนีย์, 2557) จุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งมีข้อดีคือ ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโทส และน้ำตาลซูโครส เป็นต้น และยีสต์ยังสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีองค์ประกอบที่ไม่ซับซ้อน ดังนั้นยีสต์จึงมีความได้เปรียบกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นในการนำมาใช้ผลิตเอนไซม์ และสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ง่าย ต้นทุนต่ำ ใช้เวลาน้อย ตัวอย่างยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดังตารางที่ 2.1 และ 2.2

จากตารางที่ 2.1 และ 2.2 พบว่ามีตัวอย่างยีสต์ 4 genus ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้แก่ *Trichosporon Cryptococcus Candida* และ *Debaryomyces* เป็นต้น โดยพบว่ายีสต์ genus *Trichosporon* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด พบทั้งหมด 6 species ได้แก่ *Trichosporon cutaneum T. pullulans T. laibachii T. mycotoxinivorans T. mucoides* และ *T. moniliiforme* เป็นต้น และพบชนิดของเอนไซม์เซลลูเลสที่ยีสต์สามารถผลิตได้ คือ Endoglucanase และ β-glucosidase เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยยีสต์ genus *Trichosporon*

ยีสต์	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ที่มา
Trichosporon cutaneum G1	Endoglucanase	17.4	Stevens และ Payne (1977)
Trichosporon sp.	Endoglucanase	13.00±0.2	Hanane และคณะ (2019)
Trichosporon pullulans CBS2532	Endoglucanase	10.0	Stevens และ Payne (1977)
Trichosporon pullulans C35	Endoglucanase	8.0	
Trichosporon cutaneum G31	Endoglucanase	7.9	
Trichosporon cutaneum G124	Endoglucanase	5.0	
Trichosporon cutaneum Y1	Endoglucanase	4.8	

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยยีสต์ genus *Trichosporon*

ยีสต์	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ที่มา
Trichosporon cutaneum G142	Endoglucanase	3.4	Stevens และ Payne (1977)
Trichosporon pullulans CBS2533	Endoglucanase	3.2	
Trichosporon cutaneum RHY59	Endoglucanase	2.0	
Trichosporon pullulans CBS2536	Endoglucanase	1.5	
Trichosporon pullulans CBS2543	Endoglucanase	1.5	
Trichosporon cutaneum Y16	Endoglucanase	1.3	
Trichosporon cutaneum Y12	Endoglucanase	1.0	

ตารางที่ 2.2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Endoglucanase และ β-glucosidase ที่ผลิตโดยยีสต์ genus *Trichosporon Cryptococcus Candida* และ *Debaryomyces*

ยีสต์	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ที่มา
Trichosporon laibachii MG270406-1A14	Endoglucanase	0.752	Ellen และคณะ (2017)
Trichosporon laibachii UFMG-CLM59.3	Endoglucanase	0.451	
Cryptococcus laurentii MG1603067A	Endoglucanase	0.427	
Trichosporon mycotoxinivorans UFMG-CLM61.3	Endoglucanase	0.398	
Trichosporon mycotoxinivorans UFMG-CLM68.1	Endoglucanase	0.304	
Trichosporon laibachii MG270406-1A14	Endoglucanase	0.090	
Candida easanensis strain JK-8	Endoglucanase	0.089	Jantaporn และคณะ (2014)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Endoglucanase และ β-glucosidase ที่ผลิตโดยยีสต์ genus *Trichosporon Cryptococcus Candida* และ *Debaryomyces*

ยีสต์	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ที่มา
Debaryomyces hansenii MG2704062B-55	Endoglucanase	0.065	Ellen และคณะ (2017)
Trichosporon mucoides UFMG-CLM41.1b	Endoglucanase	0.059	
Trichosporon mucoides UFMG-CLM42.4	Endoglucanase	0.058	
Trichosporon mucoides UFMG-CLM21.1	Endoglucanase	0.051	
Trichosporon mucoides UFMG-CLM21.1	Endoglucanase	0.045	
Trichosporon laibachii UFMG-CLM59.3	Endoglucanase	0.040	
Cryptococcus laurentii MG1603067A	Endoglucanase	0.034	

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Endoglucanase และ β-glucosidase ที่ผลิตโดยยีสต์ genus *Trichosporon Cryptococcus Candida* และ *Debaryomyces*

ยีสต์	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ที่มา
Trichosporon mycotoxinivorans UFMG-CLM61.3	Endoglucanase	0.030	Ellen และคณะ (2017)
Trichosporon laibachii MG270406-1A14	Endoglucanase	0.028	
Trichosporon laibachii UFMG-CLM59.3	Endoglucanase	0.023	
Trichosporon laibachii UFMG-CLM53.1a	Endoglucanase	0.022	
Trichosporon mucoides UFMG-CLM42.4	Endoglucanase	0.022	
Trichosporon mycotoxinivorans UFMG-CLM68.1	Endoglucanase	0.020	
Trichosporon moniliiforme UFMG-CLM48.1a	Endoglucanase	0.012	

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Endoglucanase และ β-glucosidase ที่ผลิตโดยยีสต์ genus *Trichosporon Cryptococcus Candida* และ *Debaryomyces*

ยีสต์	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ที่มา
Trichosporon laibachii MG270406-1A14	β-glucosidase	0.752	Ellen และคณะ (2017)
Trichosporon laibachii UFMG-CLM59.3	β-glucosidase	0.451	
Cryptococcus laurentii MG1603067A	β-glucosidase	0.427	
Trichosporon mycotoxinivorans UFMG-CLM61.3	β-glucosidase	0.398	
Trichosporon mycotoxinivorans UFMG-CLM68.1	β-glucosidase	0.304	
Trichosporon laibachii MG270406-1A14	β-glucosidase	0.090	
Candida easanensis strain JK-8	β-glucosidase	0.089	Jantaporn และคณะ (2014)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Endoglucanase และ β-glucosidase ที่ผลิตโดยยีสต์ genus *Trichosporon Cryptococcus Candida* และ *Debaryomyces*

ยีสต์	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ที่มา
Debaryomyces hansenii MG2704062B-55	β-glucosidase	0.065	Ellen และคณะ (2017)
Trichosporon mucoides UFMG-CLM41.1b	β-glucosidase	0.059	
Trichosporon mucoides UFMG-CLM42.4	β-glucosidase	0.058	
Trichosporon mucoides UFMG-CLM21.1	β-glucosidase	0.051	
Trichosporon mucoides UFMG-CLM21.1	β-glucosidase	0.045	
Trichosporon laibachii UFMG-CLM59.3	β-glucosidase	0.040	
Cryptococcus laurentii MG1603067A	β-glucosidase	0.034	

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Endoglucanase และ β-glucosidase ที่ผลิตโดยยีสต์ genus *Trichosporon Cryptococcus Candida* และ *Debaryomyces*

ยีสต์	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ที่มา
Trichosporon mycotoxinivorans UFMG-CLM61.3	β-glucosidase	0.030	Ellen และคณะ (2017)
Trichosporon laibachii MG270406-1A14	β-glucosidase	0.028	
Trichosporon laibachii UFMG-CLM59.3	β-glucosidase	0.023	
Trichosporon laibachii UFMG-CLM53.1a	β-glucosidase	0.022	
Trichosporon mucoides UFMG-CLM42.4	β-glucosidase	0.022	
Trichosporon mycotoxinivorans UFMG-CLM68.1	β-glucosidase	0.020	
Trichosporon moniliiforme UFMG-CLM48.1a	β-glucosidase	0.012	

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.4.1 ชนิดของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่แตกต่างกัน โดยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสารพิษ เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค สามารถปรับตัวกับสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิและพีเอชที่ไม่คงที่ได้ และมีความคงตัวทางพันธุกรรม อีกทั้งสามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างรวดเร็ว (อรัญ, 2556)

2.4.2 องค์ประกอบของอาหาร องค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมจะส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณที่ต้องการขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารที่สำคัญ ได้แก่

2.4.2.1 แหล่งคาร์บอน มีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ถ้าปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากเกินไปหรือน้อยเกินไปในอาหาร อาจส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้ โดยจุลินทรีย์อาจเจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ ถ้าแหล่งคาร์บอนไม่เหมาะสม เช่น การทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากยีสต์ *Candida easanensis* โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นสับสเตรท ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้กลูโคส Carboxymethylcellulose (CMC) และ CM-cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า CMC ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Jantaporn และคณะ, 2014)

2.4.2.2 แหล่งไนโตรเจน เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่ง แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน บางชนิดเหมาะสมกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ และบางชนิดเหมาะสมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน ถ้าปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมากเกินไป หรือน้อยเกินไปในอาหาร อาจส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้ โดยจุลินทรีย์อาจเจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ ถ้าแหล่งไนโตรเจนไม่เหมาะสม เช่น การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่คุ้มทุนโดยใช้สารชีวมวลของหญ้าขน *(Parthenium hysterophorus)* ซึ่งเป็นสับสเตรทประเภทลิกโนเซลลูโลสโดยเชื้อรา *Trichoderma reesei* ซึ่งได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase และเอนไซม์ FPase โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 13 ชนิด ได้แก่ ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมโมลิเบต โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียมไนเตรท เคซีน เปปโตน สารสกัดเนื้อ สารสกัดยีสต์ สารสกัดมอลต์ และสารสกัดจากเนื้อสัตว์ พบว่าแอมโมเนียมโมลิบเดตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และเอนไซม์ FPase เท่ากับ 20.41 และ 2.42 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสับสเตรท ตามลำดับ (Anita และคณะ, 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.3 แร่ธาตุ ส่วนใหญ่จะเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่อยู่ในอาหาร ซึ่งจุลินทรีย์ต้องการแร่ธาตุในปริมาณน้อยมาก จึงไม่จำเป็นต้องเติมลงไปหรือเติมลงไปตามความเหมาะสมของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

2.4.3 การเพาะเลี้ยง (Renge และคณะ, 2012) นิยมทำการเพาะเลี้ยง 2 วิธี ดังนี้

2.4.3.1 Submerged fermentations การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ส่วนใหญ่อุตสาหกรรมเอนไซม์จะใช้วิธีนี้ในการผลิตโดยแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งวิธีนี้จะเป็นการเพาะเลี้ยงแบบปิด มีปริมาณออกซิเจนสูง และทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ออกมา ข้อดีคือ เก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ง่าย เช่น การคัดเลือกและการจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่มีลักษณะคล้ายยีสต์จากบราซิล โดย Goldbeck และคณะ (2012) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Acremonium strictum* ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวที่ทำการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 288 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเหมาะสมที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ FPase เท่ากับ 0.33 และ 0.039 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.4.3.2 Solid surface fermentations เป็นอีกวิธีหนึ่งใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์ เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง เช่น ธัญพืช ข้าว และรำข้าวสาลี เป็นต้น เช่น การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสโดยราเอนโดไฟท์ โดย Natália และคณะ (2018) ได้ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (solid state fermentation, SSF) โดยใช้ชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรท พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง เหมาะสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง มีข้อดีมากกว่าการหมักแบบในอาหารเหลวคือ ได้ผลผลิตในปริมาณสูง ความเข้มข้นของผลผลิตสูงและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหาได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือ มีค่าใช้จ่ายสูงในการเก็บเกี่ยวเอนไซม์และต้องการพื้นที่มากในการเพาะเลี้ยง

2.4.4 ปริมาณหัวเชื้อ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ หากปริมาณหัวเชื้อมากเกินไป อาจทำให้ปริมาณอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญ หรือปริมาณหัวเชื้อน้อยเกินไปอาจส่งผลต่อปริมาณและประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ เช่น การศึกษาปัจจัยทางโภชนาการและสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus alcalophilus* S39 และ *B. amyloliquefaciens* C2 โดย Abou และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาผลของปริมาณหัวเชื้อที่แตกต่างกัน ได้แก่ ร้อยละ 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 โดยมวลต่อปริมาตร พบว่าเมื่อใช้หัวเชื้อ *B. alcalophilus* S39 และ *B. amyloliquefaciens* C2 ปริมาณร้อยละ 3.0 โดยมวลต่อปริมาตร สามารถผลิตเอนไซม์ CMCase สูงสุด 2.40 และ 2.39 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.5 พีเอช จุลินทรีย์ที่ต่างชนิดกันมีการเจริญและสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในสภาวะพีเอชที่ต่างกัน เช่น การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยยีสต์ *Trichosporon* sp. ที่ทนความร้อน โดย Hanane และคณะ (2019) ได้ทำการศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase และ FPase ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะพีเอชต่างกัน ได้แก่ 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 และ 9.0 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่พีเอชเท่ากับ 5.0 สามารถผลิตเอนไซม์CMCase สูงสุดเท่ากับ 0.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่พีเอชระหว่าง 4.0-7.0 สามารถผลิตเอนไซม์ FPase สูงสุดเท่ากับ 0.061 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.4.6 อุณหภูมิสำหรับการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ เช่น การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยยีสต์ *Trichosporon* sp. ที่ทนความร้อน โดย Hanane และคณะ (2019) ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase และ FPase ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยง *Trichosporon* sp. ในสภาวะอุณหภูมิแตกต่างกันตั้งแต่ 20-90 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอนไซม์ CMCase และ FPase สูงสุดเท่ากับ 0.19 และ 0.081 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.4.7 ระยะเวลาสำหรับการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ เช่น การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรีย *Bacillus cellulosilyticus* โดยใช้วัสดุลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรท ซึ่ง Bushra และคณะ (2018) ได้ทำการศึกษาผลของระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และทดสอบผลของระยะเวลาในการบ่มที่แตกต่างกัน ได้แก่ 24 48 72 96 120 และ 144 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยแบคทีเรีย *B. cellulosilyticus*

2.5 กระบวนการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

โดยทั่วไปเซลลูโลสจะมีความต้านทานต่อการย่อยสลายโดนเอนไซม์ เนื่องจากมีโครงสร้างที่เป็นผลึกและมีลิกนินที่ช่วยป้องกันการถูกทำลายของเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้การย่อยนั้นเกิดขึ้นได้ช้าและยังไม่สมบูรณ์ โครงสร้างที่แข็งแรงของเซลลูโลสนั้นต้องทำการกำจัดด้วยวิธีที่เหมาะสม หรือวิธีการปรับสภาพต่างๆ (Willium,1983) โดยแบ่งเป็น 4 วิธี คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1 วิธีการปรับสภาพทางกายภาพ (Physical pretreatment) มีจุดมุ่งหมายเพื่อ การลดขนาดและเพิ่มพื้นที่ผิวของอนุภาคไบโอพอลิเมอร์ (biopolymer) ด้วยวิธีการของการบด การโม่ การสับหรือตัด เป็นต้น นอกจากนี้การปรับสภาพทางกายภาพยังมีวิธีการอื่น เช่น การใช้คลื่นไมโครเวฟ โซนิเคชัน (sonication) สเปรย์แห้ง (spray drying) การใช้รังสีแกมมา และการไพโรไลซิส (pyrolysis) เป็นต้น (Karolina และคณะ, 2018)

2.5.2 วิธีการปรับสภาพทางเคมี (Chemical pretreatment) สำหรับการปรับสภาพสารชีวมวล (biomass) ประกอบด้วยการปรับสภาพด้วยกรด ด่าง และการออกซิเดชัน การปรับสภาพจะแตกต่างกันไปตามประเภทสารเคมีที่ใช้และโครงสร้างของวัสดุลิกโนเซลลูโลส การปรับสภาพด้วยด่าง (alkali pretreatment) การทำปฏิกิริยากับโอโซน (ozonolytic) และการย่อยเปียก (wet oxidation) นั้นมีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนินได้สูง ในขณะที่การปรับสภาพด้วยกรด (acid pretreatment) นั้นมีประสิทธิภาพในการกำจัดเฮมิเซลลูโลส วิธีการที่ใช้ในการปรับสภาพทางเคมีทั้งหมดดังตารางที่ 2.3 ชนิดของสารเคมีที่ใช้ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาเคมีที่แตกต่างกัน จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสแตกต่างกันอีกด้วย (Christian, 2013)

ตารางที่ 2.3 สรุปวิธีการที่ใช้ในการปรับสภาพทางเคมี

	การปรับสภาพด้วยกรด	**การปรับสภาพด้วยด่าง**	**การออกซิเดชัน**
สารเคมี	กรดซัลฟิวริก (ร้อยละ 4 โดยมวลต่อปริมาตร)	ด่าง	อากาศ หรือออกซิเจน
อุณหภูมิ	140-200 องศาเซลเซียส	85-150 องศาเซลเซียส	>120 องศาเซลเซียส
ระยะเวลา	นาทีต่อชั่วโมง	ชั่วโมง	ชั่วโมง
ข้อเสีย	อาจเกิดสารพิษ	เกิดการสูญเสียเกลือ	ใช้สำหรับสารชีวมวลที่มีลิกนินในปริมาณต่ำเท่านั้น

ที่มา: Christian (2013)

2.5.3 วิธีการปรับสภาพทางเคมีกายภาพ (physicochemical pretreatment) เป็นการทำลายโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสโดยวิธีการเกิดออกซิเดชันร่วมกับการใช้ความร้อน รวมถึงวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) ระเบิดด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide explosion) และการระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4 วิธีการปรับสภาพทางชีวภาพ (Biological pretreatment) เป็นการใช้จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ในการย่อยสลายลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส โดยปกติจะทำโดยการใช้เชื้อรา เช่น กลุ่ม basidiomycetes ราสีขาว (white rot) ราสีน้ำตาล (brown rot) ราอ่อน (soft rot) และแอคติโนมัยซีส มีความสามารถย่อยสลายลิกนิน ซึ่งราขาวสามารถย่อยสลายลิกนินได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีทางชีวภาพ (Christian, 2013)

2.6 การประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในทางอุตสาหกรรม

เอนไซม์เป็นสารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีนซึ่งสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาทางเคมีในกระบวนการเมทาบอลิซึม เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรท ดังนั้นจึงมีการนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ (ปราณี, 2556) เอนไซม์เซลลูเลสมีขายในท้องตลาดมานานกว่า 30 ปีและเอนไซม์เซลลูเลสเป็นที่ต้องการมากในทางอุตสาหกรรม การศึกษาขั้นพื้นฐานและการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลสได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพทางเทคโนโลยีชีวภาพในอุตสาหกรรมต่าง ๆ รวมถึงอุตสาหกรรมสารซักฟอก อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมพลังงาน และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (Mojsov, 2016) ข้อดีของการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในทางอุตสาหกรรมคือ ลดต้นทุนการผลิต ลดค่าใช้จ่ายสารเคมีที่มีราคาสูง และลดการใช้พลังงานในกระบวนการผลิต

2.6.1 อุตสาหกรรมสารซักฟอก

เอนไซม์เซลลูเลสทำหน้าที่รักษาสีผ้า ช่วยป้องกันไม่ให้สารซักฟอกตกตะกอนในระหว่างการซัก เอนไซม์เซลลูเลสจะทำปฏิกิริยากับเส้นใยผ้าที่เป็นเซลลูโลสที่เป็นขุยบนผ้า ทำให้ผ้าปราศจากขุย (ปราณี, 2556) อีกทั้งเอนไซม์เซลลูเลสยังช่วยทำความสะอาดผ้า โดยจะเป็นส่วนผสมที่อยู่ในสารซัก-ล้างทำให้สารซักล้างสามารถผ่านเข้าสู่เนื้อผ้าได้ดีมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยขจัดคราบที่ฝังในเนื้อผ้าและสามารถกำจัดฝุ่นในผ้าฝ้ายอีกด้วย (Kuhad และคณะ, 2011)

2.6.2 อุตสาหกรรมอาหารเครื่องดื่ม

เอนไซม์เซลลูเลสถูกใช้เพื่อทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้นและเป็นเนื้อเดียวกัน ส่งผลทำให้เพิ่มผลผลิตของน้ำผลไม้สูงขึ้น อีกทั้งช่วยลดความหนืดของน้ำผลไม้ รวมถึงใช้ในการทำซอสจากผลไม้ เช่นซอสมะม่วง ซอสพีช ซอสมะละกอ ซอสพรุน ซอสแอปริคอท และซอสลูกแพร์ เป็นต้น และยังถูกใช้ในการสกัดส่วนประกอบจากชาเขียว การสกัดส่วนประกอบจากโปรตีนถั่วเหลือง การสกัดส่วนประกอบจากน้ำมันหอมระเหย และการสกัดน้ำมันมะกอก นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังใช้ในการสกัดแคโรทีนอยด์ในการผลิตสารแต่งสีอาหาร และยังมีการใช้ประโยชน์ในการสกัดสมุนไพรด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการหมักโดยการใช้เอนไซม์เชิงซ้อน (เซลลูเลส ไซลาเนส และเพคติเนส) สำหรับการสกัด (Mojsov, 2016)

2.6.3 อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่อยู่ในเนื้อเยื่อกระดาษ อีกทั้งยังช่วยในการกำจัดเส้นใยส่วนเกินบนผิวเนื้อเยื่อกระดาษที่นำกลับมาใช้ใหม่ ทำให้กระบวนคัดแยกและทำความสะอาดเยื่อกระดาษหลังการฟอกได้ง่าย (ปราณี, 2556) การใช้เอนไซม์เซลลูเลสอย่างเดียว หรือเอนไซม์เซลลูเลสทำงานร่วมกับเอนไซม์ไซลาเนส เพื่อกำจัดน้ำหมึกบนพื้นผิวกระดาษเหลือทิ้ง นอกจากนี้ยังสามารถใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการบำบัดน้ำเสีย โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะไปกำจัดเส้นใยกระดาษ และสารคอลลอยด์ที่อยู่ในน้ำทิ้งที่เกิดจากโรงงานกระดาษซึ่งมักเป็นปัญหาในการระบายน้ำ (Ramesh และคณะ, 2011)

2.6.4 อุตสาหกรรมสิ่งทอ

การใช้เอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมสิ่งทอในขั้นตอนการซักผลิตภัณฑ์ผ้ายีนด้วยหินขัดประสบความสำเร็จมากที่สุด และเอนไซม์เซลลูเลสยังสามารถปรับปรุงผิวของเส้นใยในผ้าฝ้ายได้ โดยการทำปฏิกิริยากับเส้นใยเซลลูโลสส่วนเกินที่โผล่ขึ้นมาบนผิวผ้าฝ้าย ทำให้เส้นใยเซลลูโลสหลุดออกได้ง่ายขึ้น ส่งผลทำให้ผ้านุ่ม อีกทั้งยังสามารถช่วยแก้ไขปัญหาการติดสีของผ้าฝ้ายช่วยให้สีติดสม่ำเสมอ (ปราณี, 2556) นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังทำให้เนื้อผ้าเรียบ มันเงา ทำให้คุณภาพของเนื้อผ้าดีมากยิ่งขึ้น (Juturu และ Wu, 2014)

2.6.5 อุตสาหกรรมพลังงาน

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายซึ่งทำงานร่วมกันอย่างเป็นระบบเพื่อกระตุ้นการย่อยสลายเซลลูโลส การผลิตไบโอเอทานอลจากเซลลูโลส เป็นวิธีการที่ศึกษากันอย่างแพร่หลายเพื่อรองรับความมั่นคงด้านพลังงานสำหรับคนรุ่นต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามประโยชน์ของเซลลูโลสในการผลิตไบโอเอทานอลนั้นขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสและใช้จุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ ในการหมักน้ำตาลกลูโคสแล้วเปลี่ยนเป็นเอทานอล ซึ่งทำได้โดยวิธีการทางเคมีและการใช้เอนไซม์ แต่เนื่องจากวิธีการทางเคมี ข้อเสียคือการใช้กรดในการย่อยสลายซึ่งอาจทำให้เกิด by-product เป็นสารพิษคือ เฟอร์ฟูรอล (furfural) หรือ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล (5-hydroxymethyl furfural) จึงเปลี่ยนเป็นวิธีการเป็นทางชีวภาพแทนโดยการใช้เอนไซม์เซลลูเลส (Anita และคณะ, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.6 อุตสาหกรรมอาหารสัตว์

การประยุกต์ใช้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากศักยภาพในการปรับปรุงมูลค่าอาหารสัตว์และประสิทธิภาพของอาหารสัตว์ การปรับสภาพหญ้าหมักและอาหารสัตว์โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส หรือเอนไซม์ไซลาเนสสามารถปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการได้ เอนไซม์ยังสามารถย่อยสลายองค์ประกอบอาหารเพื่อปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ชนิดอื่นที่ถูกนำมาใช้เพื่อปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการได้อีก เช่น เอนไซม์โปรตีเอส เอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์กลูแคเนส เป็นต้น (Ramesh และคณะ, 2011)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ayman และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Trichoderma reesei* RUT C-30 ในการหมักบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation, SSF) พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Tr. reesei* RUT C-30 ในอาหาร mineral salt medium ที่มีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน คือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *Tr. reesei* RUT C-30 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด 959.53 ยูนิตต่อกรัม

Gautam และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาเพื่อลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้กากของเสียชุมชนเป็นแหล่งคาร์บอน และทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Trichoderma viride* พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Tr. viride* ในอาหารที่มีกากของเสียชุมชนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นร้อยละ 4-5 โดยมวลต่อปริมาตร และใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตร อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 คือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Tr. viride* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ได้สูงสุดเท่ากับ 2.68, 2.17 และ 2.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Yunzi และคณะ (2018) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสจากวัสดุเหลือทิ้งจากสิ่งทอโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* CKB ในการหมักบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation, SSF) พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* CKB ในอาหาร Mandels ที่มีฝ้ายผสมโพลีเอสเทอร์อัตราส่วน 80 ต่อ 20 เป็นแหล่งคาร์บอน และมีสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นร้อยละ 2.24 โดยมวล อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน ความชื้นร้อยละ 78 ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 3.10×10^{7} สปอร์ต่อกรัม พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.29 และเติมแหล่งคาร์บอนเสริมคือ แป้งความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวล และ avicel ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มวล คือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *A. niger* CKB ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ FPase ได้สูงสุดเท่ากับ 1.56 ยูนิตต่อกรัม

Xiaolong และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการหมักแบบกึ่งกะอย่างต่อเนื่อง (repeated fed-batch) และแบบกะ (batch fermentation) ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Penicillium oxalicum* RE-10 พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะอย่างต่อเนื่องในอาหาร Production medium ที่มีรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน คือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อ *P. oxalicum* RE-10 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด 158.38 ยูนิตต่อลิตรต่อชั่วโมง

Sonia และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งคัดแยกได้จากดิน พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Production medium มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 10 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยแบคทีเรีย *P. fluorescens* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด 1.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Shazia และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Trichoderma viride* โดยใช้เทคนิคการหมักในอาหารเหลว (submerged fermentation) พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Tr. viride* ในอาหารที่มีชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 โดยมวลต่อปริมาตร คือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Tr. viride* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ CMCase สูงสุด 1.66 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที และเอนไซม์ FPase เท่ากับ 0.932 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที

Hassan และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergilus oryzae* พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Submerged fermentation, SmF) ที่มีซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 โดยมวลต่อปริมาตรในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอชเท่ากับ 7.0 คือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อ *A. oryzae* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ endoglucanase สูงสุดเท่ากับ 38.80 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที และเอนไซม์ exoglucanase สูงสุดเท่ากับ 10.94 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้นำไปดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Prasanna และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสชนิด exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ในอาหารเหลวสามชนิด ได้แก่ อาหาร basal อาหาร minimal และอาหาร Czapek-Dox โดยเชื้อ *Penicillium* sp. พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. ในอาหาร Czapek-Dox ที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอช 5.0 ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *Penicillium* sp. ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase เท่ากับ 8.7 25 และ 9.52 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Neelima และคณะ (2018) ได้ทำการศึกษาการใช้วัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus* sp. Bl1 พบว่าเมื่อใช้ใบตองเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ในการเพาะเลี้ยง *Aspergillus* sp. Bl1 สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พีเอช 5.0 ความชื้นร้อยละ 67 ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7.35×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร คือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus* sp. Bl1 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสชนิด exoglucanase 0.94 ยูนิตต่อกรัม และเอนไซม์ endoglucanase 2.2 ยูนิตต่อกรัม

Swati และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Alternaria brassicicola* พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Al. brassicicola* ในอาหาร modified Mandels ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 คือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Al. brassicicola* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสชนิด endoglucanase 120.71 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์ exoglucanase 106.93 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 ขวดลูกชมพู่ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร

3.1.2 หลอดทดลอง

3.1.3 บีกเกอร์ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.4 เครื่องดูดจ่ายสาร (Micropipette) บริษัท Vivantis Technologies, USA

3.1.5 ทิปสำหรับเครื่องดูดจ่ายสาร (Micropipette Tip)

3.1.6 ปิเปตขนาด 1, 5, 10 มิลลิลิตร

3.1.7 จานเพาะเชื้อ

3.1.8 แท่งแก้วคนสาร

3.1.9 ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.1.10 Eppendorf Tube ขนาด 1.5 ml

3.1.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.12 ช้อนตักสาร

3.1.13 หลอดฝาเกลียว

3.1.14 ที่วางหลอดทดลอง (Rank)

3.1.15 ขวดบรรจุอาหาร (Duran) ขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.16 หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube) บริษัท Extragene, USA

3.1.17 ตู้บ่มเชื่อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) ยี่ห้อ NEW BRUNSWICK รุ่น innova 4230, Canada

3.1.18 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 30 องศาเซลลเซียส บริษัท Binder, Germany

3.1.19 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-1201V Japan

3.1.20 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) บริษัท Memmert, Germany

3.1.21 เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH Meter) ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น S220 Switzerland

3.1.22 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) บริษัท VELP Scientific, Italy

3.1.23 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TE214S บริษัท Sartorius Weiging Technology, Germany

3.1.24 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ HIRAYAMA รุ่น HV-25/50/85/110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Japan

3.1.25 ตู้ลามิน่าร์ (Laminar Air Flow Carbinet) บริษัท Dwyer Instrument, USA

3.1.26 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับตกตะกอนตัวอย่าง (Centrifuge) รุ่น 16M บริษัท Labnet International, USA

3.1.27 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดา (Compound Light Microscope) บริษัท Olympus Corperation, Japan

3.1.28 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) บริษัท Memmert, Germany

3.1.29 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate Reader) บริษัท BMG Labtech รุ่น Fluo Star Omega, Germany

3.1.30 สไลด์สำหรับเตรียมตัวอย่างส่องดูภายใต้กล้องจลทรรศน์ บริษัท Yancheng Xingfu Glass Instrument Factory, china

3.1.31 กระจกปิดสไลด์ ยี่ห้อ Menzel-Glaser บริษัท Gerhard Menzel, Germany

3.2 สารเคมี

3.2.1 Glycerol บริษัท Sisco Research Laboratories, india

3.2.2 3, 5 Dinitrosalicylic acid (DNS) บริษัท SIGMA-AIDRICH, Switzerland

3.2.3 Citric acid monohydrate บริษัท Ajax Finechem, Australia

3.2.4 Trisodium citrate dehydrate ($Na_3C_6H_5O_7$) บริษัท Merck Milipor, Germany

3.2.5 Sodium hydroxide (NaOH) บริษัท LOBA CHEMIE PVT, India

3.2.6 Sodium potassium tartrate ($KNaC_4H_4O_6{\cdot}4H_2O$) บริษัท Ajax Finechem, Australia

3.2.7 Sodium carbonate (Na_2CO_3) บริษัท CARLO ERBA Reagents,Italy

3.2.8 Copper sulfate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$) บริษัท CARLO ERBA Reagents, Italy

3.2.9 Folin-Ciocalteu บริษัท LOBA CHEMIE PVT, India

3.2.10 Bovine serum albumin (BSA) บริษัท SIGMA-AIDRICH, Switzerland

3.2.11 Yeast Extract บริษัท CTI and Science, Japan

3.2.12 Malt Extract บริษัท Sisco Research Laboratories, India

3.2.13 Peptone บริษัท Sisco Research Laboratories, India

3.2.14 Glucose ($C_6H_{12}O_6$) บริษัท Sisco Research Laboratories, India

3.2.15 Carboxymethylcellulose บริษัท SIGMA-AIDRICH, Finland

3.2.16 Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4) บริษัท Merck Milipor, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.17 Dipotassium Phosphate (K_2HPO_4) บริษัท CARLO ERBA Reagents, Italy

3.2.18 Magnesium Sulfate Heptahydrate ($MgSO_4$) บริษัท CARLO ERBA Reagents, Italy

3.2.19 Ammonium Sulfate ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท CARLO ERBA Reagents, Italy

3.2.20 Ammonium Nitrate (NH_4NO_3) บริษัท Ajax Finechem, Australia

3.2.21 Ammonium Chloride (NH_4Cl) บริษัท CARLO ERBA Reagents, Italy

3.2.22 Ammonium Molybdate ($(NH_4)_2Mo_7O_{24}{\cdot}4H_2O$) บริษัท Ajax Finechem, Australia

3.2.23 Sodium Nitrate ($NaNO_3$) บริษัท Ajax Finechem, Australia

3.2.24 Beef Extract บริษัท Sisco Research Laboratories, india

3.2.25 Urea (CH_4N_2O) บริษัท Ajax Finechem, Australia

3.2.26 Agar

3.2.27 Ethyl alcohol (C_2H_5OH) ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 95 โดยมวลต่อปริมาตร

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth (Pantelides และคณะ, 2015)

Yeast Extract	3	กรัมต่อลิตร
Malt Extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Glucose	10	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นเทใส่ขวดปิดฝาแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3.2 อาหาร Csiszar (Yunzi และคณะ, 2018)

Carboxymethylcellulose	10	กรัมต่อลิตร
Yeast Extract	2.5	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	5	กรัมต่อลิตร
NH_4NO_3	3	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2HPO_4$	3	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4$	0.5	กรัมต่อลิตร
NaCl	0.5	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	0.5	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นเทใส่ขวดปิดฝาแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3.3 อาหาร Mandels ที่เติมเปปโตน (Yunzi และคณะ, 2018)

Carboxymethylcellulose	10	กรัมต่อลิตร
Tween 80	1	กรัมต่อลิตร
Peptone	2.5	กรัมต่อลิตร
Urea	0.3	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	2	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	1.4	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4$	0.3	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	0.4	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4$	0.005	กรัมต่อลิตร
$MnSO_4{\cdot}7H_2O$	0.0016	กรัมต่อลิตร
$ZnSO_4$	0.0014	กรัมต่อลิตร
$CoCl_2$	0.002	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นเทใส่ขวดปิดฝาแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3.4 อาหาร Mandels ที่เติมสารสกัดยีสต์ (Yunzi และคณะ, 2018)

Carboxymethylcellulose	10	กรัมต่อลิตร
Tween 80	1	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	2.5	กรัมต่อลิตร
Urea	0.3	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	2	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	1.4	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4$	0.3	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	0.4	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4$	0.005	กรัมต่อลิตร
$MnSO_4{\cdot}7H_2O$	0.0016	กรัมต่อลิตร
$ZnSO_4$	0.0014	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$CoCl_2$	0.002	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นเทใส่ขวดปิดฝาแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3.5 อาหาร Vyas และ Chhabra (2017)

Carboxymethylcellulose	10	กรัมต่อลิตร
Yeast Extract	0.6	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	7	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	2	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	1	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นเทใส่ขวดปิดฝาแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3.6 อาหาร Basal (มูรนีย์, 2557)

Carboxymethylcellulose	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	10	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	6	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	3	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4$	0.2	กรัมต่อลิตร
$NaNO_3$	1.2	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	0.05	กรัมต่อลิตร
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
$ZnSO_4$	0.001	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นเทใส่ขวดปิดฝาแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา

จากงานวิจัยของวริศรา และคณะ (2560) ได้ทำการคัดแยกยีสต์จากดินข้างร้านนมสดบริเวณหน้าโรงเรียนบดินทร์เดชา (สิงห์ สิงหเสนี 2) พบยีสต์ไอโซเลท M1 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ CMCase ได้ จึงนำยีสต์ไอโซเลท M1 มาทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ต่อไป

3.5 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำยีสต์ไอโซเลท M1 ที่เก็บรักษาไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาปั่นให้เข้ากัน จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ 1 มิลลิลิตร หรือทำการถ่ายเชื้อยีสต์ที่เก็บรักษาไว้ในอาหารเอียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 4-6 หลอด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth (Pantelides และคณะ, 2015) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้ค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 1.7-2.1 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

3.6.1 การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase

เติมกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ดังข้อ 3.5 ปริมาตรร้อยละ 15 โดยปริมาตร ลงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ อาหาร Csiszar (Yunzi และคณะ, 2018) อาหาร Mandels ที่เติมเปปโตน (Yunzi และคณะ, 2018) อาหาร Mandels ที่เติมยีสต์สกัด (Yunzi และคณะ, 2018) อาหาร Vyas และ Chhabra (2017) และอาหาร Basal (มูรนีย์, 2557) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยใช้ Carboxymethylcellulose ร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก และนำส่วนใสที่ได้ไปทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase (Miller, 1959) และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (Lowry และคณะ, 1951) ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase

เติมกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ดังข้อ 3.5 ปริมาตรร้อยละ 15 โดยปริมาตร ลงในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ซึ่งได้จากการศึกษาข้อ 3.6.1 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยใช้ Carboxymethylcellulose ชานอ้อย รำข้าว ธูปฤาษี เปลือกข้าวโพด และรำข้าวผสม Carboxymethylcellulose อัตราส่วน 1:1 ร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน (มูรนีย์, 2557) โดยทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก และนำส่วนใสที่ได้ไปทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase (Miller, 1959) และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (Lowry และคณะ, 1951) ต่อไป

สำหรับชานอ้อย ธูปฤาษี และเปลือกข้าวโพด ได้ทำการปรับสภาพก่อนนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 โดยชั่งวัตถุดิบต่างๆ 20 กรัม และทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นึ่งในหม้อนึ่งอุณหภูมิ 122 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง เมื่อเย็นแล้วล้างกากของแข็งด้วยน้ำกลั่นจนค่าพีเอชของน้ำล้างเท่ากับ 7.0 อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ต่อไป (Bjorn และคณะ, 2009)

3.6.3 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase

เติมกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ดังข้อ 3.5 ปริมาตรร้อยละ 15 โดยปริมาตร ลงในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ซึ่งได้จากการศึกษาข้อ 3.6.1 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร และใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.6.2 ปริมาณร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตร โดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์คือ สารสกัดยีสต์ เปปโตน สารสกัดมอลต์ สารสกัดเนื้อ และยูเรีย และแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท และแอมโมเนียมโมลิบเดต (Anita และคณะ, 2017) ความเข้มข้นร้อยละ 0.16 โดยมวลต่อปริมาตร โดยทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก และนำส่วนใสที่ได้ไปทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase (Miller, 1959) และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (Lowry และคณะ, 1951) ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.4 การศึกษาความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase

เติมกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ดังข้อ 3.5 ปริมาตรร้อยละ 15 โดยปริมาตร ลงในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ซึ่งได้จากการศึกษาข้อ 3.6.1 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.6.3 โดยมี Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 1.5 2.0 และ 2.5 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก และนำส่วนใสที่ได้ไปทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase (Miller, 1959) และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (Lowry และคณะ, 1951) ต่อไป

3.6.5 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase

เติมกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ดังข้อที่ 3.5 ปริมาตรร้อยละ 15 โดยปริมาตร ลงในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ซึ่งได้จากการศึกษาข้อ 3.6.1 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยใช้ Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.6.4 เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดมอลต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.08 0.16 0.24 0.32 0.48 และ 0.56 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก และนำส่วนใสที่ได้ไปทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase (Miller, 1959) และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (Lowry และคณะ, 1951) ต่อไป

3.7 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.6 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตร ในซิเตรทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก ลงไป 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาทำให้เย็นทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร สำหรับหลอดควบคุม (Control) ทำเช่นเดียวกัน แต่นำสารละลายเอนไซม์ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีก่อน จากนั้นเติมสารละลายกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก ลงไป 1.5 มิลลิลิตร ก่อนเติมสารละลาย Carboxymethylcellulose และทำตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนอื่น ๆ เหมือนกับในตัวอย่าง ส่วนแบลงค์ (Blank) เตรียมโดยการใช้น้ำกลั่นแทนเอนไซม์และสับสเตรท และการทำกราฟกลูโคสมาตรฐานโดยมีขั้นตอนการทำเช่นเดียวกับตัวอย่างที่กล่าวมาข้างต้น แต่เปลี่ยนจากส่วนใสเป็นสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} \times \text{dilution factor} \times \text{reaction volumn}}{\text{มวลโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อโมล)} \times \text{เวลา (นาที)} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ (Miller, 1959)

3.8 การตรวจวัดปริมาณโปรตีน

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.6 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการเติมสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (alkali copper) 1000 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ก) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เพื่อให้เกิดสีอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร สำหรับการทำแบลงค์ (Blank) และโปรตีนมาตรฐานทำเช่นเดียวกัน แต่แบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายส่วนใสที่ได้ ส่วนโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ถูกใช้เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 50 100 150 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำตามขั้นตอนอื่นๆ เหมือนกับในตัวอย่าง และคำนวณกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้ (Lowry และคณะ, 1951)

$$\text{กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)} = \frac{\text{กิจกรรมเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$

$$\text{กิจกรรมสัมพันธ์ (ร้อยละ)} = \frac{\text{กิจกรรมเอนไซม์ CMCase ของชุดตัวอย่าง (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{กิจกรรมเอนไซม์ CMCase ของชุดควบคุม (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลของค่ากิจกรรมเอนไซม์ CMCase ได้รับการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การประมวลผลข้อมูลและการวิเคราะห์ทางสถิติดำเนินการโดยซอฟต์แวร์ MINITAB เวอร์ชั่น 18.0 (Fleming และ Nellis, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลของชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุต่างๆ โดยส่วนใหญ่จะใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส สำหรับการผลิตเอนไซม์จากยีสต์องค์ประกอบของอาหารที่แตกต่างกันมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ดังนั้นชนิดของอาหารที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึง จากการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสม โดยทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ อาหาร Csiszar (Yunzi และคณะ, 2018) อาหาร Mandels ที่เติมเปปโตน (Yunzi และคณะ, 2018) อาหาร Mandels ที่เติมสารสกัดยีสต์ (Yunzi และคณะ, 2018) อาหาร Vyas และ Chhabra (2017) และอาหาร Basal (มูรนีย์, 2557) ที่มี Carboxymethylcellulose เป็นแหล่งคาร์บอน โดยองค์ประกอบของอาหารแสดงดังตารางที่ 4.1 และทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบของอาหารแต่ละสูตรที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 เพื่อผลิตเอนไซม์ CMCase และใช้ Carboxymethylcellulose เป็นแหล่งคาร์บอน

องค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร)	อาหาร Csiszar (Yunzi และคณะ, 2018)	อาหาร Mandels ที่เติมเปปโตน (Yunzi และคณะ, 2018)	อาหาร Mandels ที่เติมสารสกัดยีสต์ (Yunzi และคณะ, 2018)	อาหาร Vyas และ Chhabra (2017)	อาหาร Basal (มูรนีย์, 2557)
Carboxymethylcellulose	10	10	10	10	10
Tween 80	-	1	1	-	-
เปปโตน (Peptone)	-	2.5	-	-	-
ยีสต์สกัด (Yeast Extract)	2.5	-	2.5	0.6	10
ยูเรีย (Urea)	-	0.3	0.3	-	-
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	5	2	2	7	6
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	-	-	-	2	3

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงองค์ประกอบของอาหารแต่ละสูตรที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 เพื่อผลิตเอนไซม์ CMCase และใช้ Carboxymethylcellulose เป็นแหล่งคาร์บอน

องค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร)	อาหาร Csiszar (Yunzi และคณะ, 2018)	อาหาร Mandels ที่เติมเปปโตน (Yunzi และคณะ, 2018)	อาหาร Mandels ที่เติมสารสกัดยีสต์ (Yunzi และคณะ, 2018)	อาหาร Vyas และ Chhabra (2017)	อาหาร Basal (มูรนีย์, 2557)
แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$	-	1.4	1.4	1	-
แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	3	-	-	-	-
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจน-ฟอสเฟต $((NH_4)_2HPO_4)$	3	-	-	-	-
แมกนีเซียมซัลเฟต $(MgSO_4.7H_2O)$	0.5	0.3	0.3	0.1	0.2
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	-	-	-	-
โซเดียมไนเตรท $(NaNO_3)$	-	-	-	-	1.2

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงองค์ประกอบของอาหารแต่ละสูตรที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 เพื่อผลิตเอนไซม์ CMCase และใช้ Carboxymethylcellulose เป็นแหล่งคาร์บอน

องค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร)	อาหาร Csiszar (Yunzi และคณะ, 2018)	อาหาร Mandels ที่เติมเปปโตน (Yunzi และคณะ, 2018)	อาหาร Mandels ที่เติมสารสกัดยีสต์ (Yunzi และคณะ, 2018)	อาหาร Vyas และ Chhabra (2017)	อาหาร Basal (มูรนีย์, 2557)
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	0.5	-	-	-	-
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	-	0.4	0.4	-	0.05
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$)	-	0.005	0.005	-	-
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$)	-	0.0016	0.0016	-	0.01
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$)	-	0.0014	0.0014	-	0.001
โคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2$)	-	0.002	0.002	-	-

ตารางที่ 4.2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด

ชนิดของอาหาร	กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
Csiszar (Yunzi และคณะ, 2018)	0.025±0.002^{c}	0.232±0.006^{c}	0.110±0.012^{b}
Mandels ที่เติมเปปโตน (Yunzi และคณะ, 2018)	0.030±0.003^{bc}	0.228±0.009^{c}	0.130±0.011^{ab}
Mandels ที่เติมสารสกัดยีสต์ (Yunzi และคณะ, 2018)	0.035±0.002^{ab}	0.274±0.007^{b}	0.128±0.008^{ab}
Vyas และ Chhabra (2017)	0.041±0.002^{a}	0.265±0.018^{bc}	0.154±0.004^{a}
Basal (มูรนีย์, 2557)	0.035±0.001^{ab}	0.608±0.008^{a}	0.057±0.002^{c}

หมายเหตุ: ค่า±หมายถึงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรตัวเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ด้วยวิธี Tukey

จากตารางที่ 4.2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) อาหาร Basal (มูรนีย์, 2557) อาหาร Mandels ที่เติมสารสกัดยีสต์ อาหาร Mandels ที่เติมเปปโตน และอาหาร Csiszar (Yunzi และคณะ, 2018) ตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ CMCase เท่ากับ 0.041±0.002 0.035±0.001 0.035±0.001 0.030±0.003 และ 0.025±0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 เพื่อผลิตเอนไซม์ CMCase โดยสามารถผลิตเอนไซม์ CMCase สูงสุด 0.041±0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจเป็นผลมาจากอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) มีองค์ประกอบของอาหารที่ไม่ซับซ้อน ทำให้ยีสต์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ CMCase ได้ง่ายกว่าอาหารชนิดอื่น ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร Mandels ที่เติมเปปโตน และอาหาร Mandels ที่เติมสารสกัดยีสต์ (Yunzi และคณะ, 2018) มีองค์ประกอบของธาตุอาหารเสริม (Fe Mn Zn Co) ที่เติมลงไป ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อรา (Yunzi และคณะ, 2018) โดยโคแฟกเตอร์เหล่านี้ เป็นธาตุอาหารเสริมที่ใช้ในการสร้างเส้นใยของเชื้อรา ซึ่งยีสต์ไอโซเลท M1 ไม่สามารถใช้โคแฟกเตอร์เหล่านี้ในการเจริญเติบโต และผลิตเอนไซม์ CMCase ได้ ดังนั้นอาหาร Mandels ที่เติมสารสกัดยีสต์ และอาหาร Mandels ที่เติมเปปโตน (Yunzi และคณะ, 2018) จึงเป็นอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 โดยจากเหตุผลที่กล่าวมาทั้งหมดจึงได้เลือกอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4.2 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

สำหรับการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ทำโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมคือ อาหาร Vyas และ Chhabra (2017) ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 4.1 และใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ Carboxymethylcellulose ชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ ธูปฤาษีที่ผ่านการปรับสภาพ รำข้าว และรำข้าวผสมกับ Carboxymethylcellulose อัตราส่วน 1:1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตร และทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase และกิจกรรมสัมพันธ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหารที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	กิจกรรมสัมพันธ์ (ร้อยละ)
Carboxymethylcellulose (CMC)	0.066±0.001[a]	0.184±0.003[f]	0.360±0.008[a]	100
ชานอ้อย	0.013±0.001[c]	0.388±0.031[d]	0.034±0.004[c]	20
เปลือกข้าวโพด	0.015±0.001[c]	0.657±0.013[a]	0.023±0.001[c]	23
ธูปฤาษี	0.015±0.001[c]	0.261±0.007[e]	0.058±0.006[b]	23
รำข้าว	0.015±0.001[c]	0.602±0.008[b]	0.025±0.002[c]	23
รำข้าวผสม CMC อัตราส่วน 1:1	0.033±0.001[b]	0.536±0.003[c]	0.061±0.001[b]	50

หมายเหตุ: ค่า±หมายถึงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรตัวเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ด้วยวิธี Tukey

จากตารางที่ 4.3 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน พบว่ายีสต์ไอโซเลท M1 สามารถผลิตเอนไซม์ CMCase เท่ากับ 0.066±0.001 0.033±0.001 0.015±0.001 0.015±0.001 0.015±0.001 และ 0.013±0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้ Carboxymethylcellulose (CMC) รำข้าวผสม CMC อัตราส่วน 1:1 เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ ธูปฤาษีที่ผ่านการปรับสภาพ รำข้าว และชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 เพื่อผลิตเอนไซม์ CMCase โดยสามารถผลิตเอนไซม์ CMCase สูงสุด 0.066±0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดย Abou และคณะ (2009) ได้รายงานว่า CMC ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียสองสายพันธุ์ คือ *Bacillus alcalophilus* S39 และ *Bacillus amyloliquefaciens* C2 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด 1.85 และ 1.88 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 เนื่องจากโครงสร้าง CMC เป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์ มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมาก เกิดจากการแทนที่อะตอมไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ในหน่วยย่อยกลูโคสของเซลลูโลสด้วยหมู่ Alkyl (อรพิน, 2523) สามารถละลายน้ำได้ ทำให้เอนไซม์ CMCase สามารถย่อยเซลลูโลสบริเวณที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จึงทำให้ยีสต์อาจนำไปใช้ได้ง่ายกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น สำหรับแหล่งคาร์บอนจำพวกวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบของน้ำตาล เช่น น้ำตาลกลูโคส (glucose) น้ำตาลไซโลส (xylose) และน้ำตาลกาแล็กโทส (galactose) เป็นต้น (Wang และคณะ, 2014) โดยทำการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีกายภาพก่อนนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 และตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ CMCase ที่เกิดขึ้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 แต่ปริมาณโปรตีนที่ได้มีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน อาจเกิดจากปริมาณโปรตีนที่ได้เป็นเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น เอนไซม์ไซลาเนส (xylanase) เป็นต้น (Motta และคณะ, 2013) อีกทั้งวัสดุลิกโนเซลลูโลสยังมีโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ตัวอย่างเช่น ชานอ้อยและรำข้าวมีปริมาณซิลิกาและลิกนินสูง แต่มีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสอยู่น้อย โดยลิกนินมีคุณสมบัติในการป้องกันเซลลูโลสจากการถูกทำลายโดยการปรับสภาพทางเคมีกายภาพ (Kumar และ Wyman, 2010) นอกจากนี้กระบวนการปรับสภาพเพื่อกำจัดลิกนิน อาจเกิด by-product ที่เป็นสารพิษคือ เฟอร์ฟูรอล (furfural) หรือ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล (5-hydroxymethyl furfural) เนื่องจากใช้กรดและความร้อนในปริมาณสูง จึงส่งผลต่อความสามารถในการผลิตเอนไซม์ CMCase ได้น้อย (Christian, 2013) โดยจากเหตุผลที่กล่าวมาทั้งหมดจึงได้เลือก CMC เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4.3 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

สำหรับการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ทำโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) ที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมโมลิบเดต แอมโมเนียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรทซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ สารสกัดยีสต์ สารสกัดมอลต์ สารสกัดเนื้อ เปปโตน และยูเรียซึ่งเป็นสารอินทรีย์ โดยใช้แหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.16 โดยมวลต่อปริมาตร และทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase และกิจกรรมสัมพันธ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหารที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	กิจกรรมสัมพันธ์ (ร้อยละ)
ชุดควบคุม				
สารสกัดยีสต์ผสมแอมโมเนียมซัลเฟต	0.070 ± 0.001^{c}	0.118 ± 0.000^{e}	0.591 ± 0.014^{a}	100
แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์				
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.012 ± 0.001^{f}	0.032 ± 0.001^{g}	0.386 ± 0.022^{cd}	17
แอมโมเนียมคลอไรด์	0.020 ± 0.000^{e}	0.034 ± 0.001^{g}	0.599 ± 0.024^{a}	29
แอมโมเนียมโมลิบเดต	0.015 ± 0.001^{ef}	0.035 ± 0.001^{g}	0.426 ± 0.051^{bcd}	22
แอมโมเนียมไนเตรท	0.017 ± 0.002^{ef}	0.033 ± 0.001^{g}	0.510 ± 0.071^{abc}	24
โซเดียมไนเตรท	0.009 ± 0.001^{f}	0.035 ± 0.000^{g}	0.270 ± 0.041^{de}	13
แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์				
สารสกัดยีสต์	0.097 ± 0.000^{b}	0.227 ± 0.000^{d}	0.427 ± 0.000^{bcd}	139
สารสกัดมอลต์	0.135 ± 0.003^{a}	0.241 ± 0.000^{c}	0.559 ± 0.013^{ac}	193
สารสกัดเนื้อ	0.031 ± 0.000^{d}	0.262 ± 0.000^{b}	0.116 ± 0.000^{ef}	44
เปปโตน	0.011 ± 0.001^{f}	0.301 ± 0.001^{a}	0.038 ± 0.005^{f}	16
ยูเรีย	0.012 ± 0.000^{f}	0.039 ± 0.000^{f}	0.314 ± 0.014^{d}	17

หมายเหตุ: ค่า±หมายถึงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรตัวเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ด้วยวิธี Tukey

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.4 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) ที่มี Carboxymethylcellulose เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ายีสต์ไอโซเลท M1 สามารถผลิตเอนไซม์ CMCase เท่ากับ 0.020±0.000 0.017±0.002 0.015±0.001 0.012±0.001 และ 0.009±0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมโมลิบเดต แอมโมเนียมซัลเฟต และโซเดียมไนเตรท ตามลำดับ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) ที่มี Carboxymethylcellulose เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ายีสต์ไอโซเลท M1 สามารถผลิตเอนไซม์ CMCase เท่ากับ 0.135±0.000 0.097±0.000 0.031±0.000 0.012±0.000 และ 0.011±0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้สารสกัดมอลต์ สารสกัดยีสต์ สารสกัดเนื้อ ยูเรีย และเปปโตน ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดมอลต์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 เพื่อผลิตเอนไซม์ CMCase โดยสามารถผลิตเอนไซม์ CMCase สูงสุด 0.135±0.000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sakthi และคณะ (2011) ซึ่งรายงานว่าสารสกัดมอลต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยสามารถผลิตเอนไซม์ CMCase สูงสุด 1.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และงานวิจัยของ Prasanna และคณะ (2016) ได้รายงานว่า เปปโตนและสารสกัดยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยรา *Penicilium* sp. เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารเพาะเลี้ยงที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต ส่งผลให้การใช้แหล่งคาร์บอนลดลงและลดการเกิด by-product รวมทั้งสารสกัดมอลต์และสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่สำคัญของอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ ซึ่งการใช้แหล่งไนโตรเจนที่มาจากสารอินทรีย์จะช่วยกระตุ้นการผลิตและทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จึงมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (Abou และคณะ, 2009) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกสารสกัดมอลต์ไปใช้ในการศึกษาต่อไป

4.4 ผลของความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

สำหรับการศึกษาความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ทำโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) ที่มีสารสกัดมอลต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แก่ ร้อยละ 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase และกิจกรรมสัมพันธ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหารที่มี Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน

ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose (ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	กิจกรรมสัมพันธ์ (ร้อยละ)
0.5	0.055 ± 0.001^{c}	0.189 ± 0.001^{b}	0.330 ± 0.002^{bc}	75
1.0	0.073 ± 0.001^{a}	0.199 ± 0.000^{ab}	0.418 ± 0.006^{a}	100
1.5	0.060 ± 0.000^{b}	0.195 ± 0.003^{ab}	0.353 ± 0.006^{b}	82
2.0	0.055 ± 0.001^{c}	0.200 ± 0.001^{a}	0.310 ± 0.008^{c}	75
2.5	0.046 ± 0.001^{d}	0.204 ± 0.000^{a}	0.257 ± 0.003^{d}	63

หมายเหตุ: ค่า±หมายถึงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่า±หมายถึงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรตัวเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ด้วยวิธี Tukey

จากตารางที่ 4.5 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) ที่มีสารสกัดมอลต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ CMCase เท่ากับ 0.073±0.001 0.060±0.000 0.055±0.001 0.055±0.001 และ 0.046±0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหารที่มี Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 1.5 0.5 2.0 และ 2.5 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตรเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 เพื่อผลิตเอนไซม์ CMCase โดยสามารถผลิตเอนไซม์ CMCase สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.073±0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gautam และคณะ (2010) ซึ่งรายงานว่า Carboxymethylcellulose ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Trichoderma viride* สามารถผลิตเอนไซม์สูงสุด 2.09±0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เนื่องจากการผลิตเอนไซม์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 คือร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตร เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้น อาจทำให้แรงดันออสโมติกสูงตามไปด้วยเกิดการดึงน้ำและสารอาหารออกจากเซลล์เรียกว่า Hypertonic (Ludmila และคณะ, 2004) ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase และทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์สุดท้ายยับยั้งการสร้าง และการทำงานของเอนไซม์ (Desrochers และคณะ, 1980) โดยจากเหตุผลที่กล่าวมาทั้งหมดจึงได้เลือก Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตรเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4.5 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

สำหรับการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ทำโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) ที่มี Carboxymethylcellulose เป็นแหล่งคาร์บอน และมีสารสกัดมอลต์ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ ร้อยละ 0.08 0.16 0.24 0.32 0.48 และ 0.56 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase และกิจกรรมสัมพันธ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหารที่มีสารสกัดมอลต์ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน

ความเข้มข้นของสารสกัด-มอลต์ (ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	กิจกรรมสัมพันธ์ (ร้อยละ)
0.08	0.052±0.001^{f}	0.182±0.000^{f}	0.289±0.003^{a}	75
0.16	0.069±0.001^{e}	0.235±0.000^{e}	0.292±0.003^{a}	100
0.24	0.076±0.002^{d}	0.286±0.000^{d}	0.267±0.007^{ab}	110
0.32	0.085±0.002^{c}	0.331±0.001^{c}	0.255±0.007^{b}	123
0.48	0.091±0.000^{b}	0.481±0.000^{b}	0.189±0.000^{c}	131
0.56	0.100±0.001^{a}	0.524±0.001^{a}	0.192±0.002^{c}	144

หมายเหตุ: ค่า±หมายถึงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรตัวเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ด้วยวิธี Tukey

จากตารางที่ 4.6 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) ที่มี Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีสารสกัดมอลต์ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ CMCase เท่ากับ 0.100±0.001 0.091±0.000 0.085±0.002 0.076±0.002 0.069±0.001 และ 0.052±0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 ในอาหารที่มีสารสกัดมอลต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.56 0.48 0.32 0.24 0.16 และ 0.08 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้สารสกัดมอลต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.56 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท M1 เพื่อผลิตเอนไซม์ CMCase โดยสามารถผลิตเอนไซม์ CMCase สูงสุด 0.100±0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Priyanka และคณะ (2012) ซึ่งรายงานว่าสารสกัดมอลต์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 โดยมวลต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยยีสต์ *Candida* sp. R-1 โดยสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด 796.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยเมื่อความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่ำเกินไปหรือมีความเข้มข้นที่จำกัด ส่งผลทำให้การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตของเซลล์สูงขึ้นในช่วงแรกแล้วหยุดลง (Glodberg และคณะ, 2006) แต่ถ้าความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่สูงเกินไป ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญ และการสร้างเอนไซม์ได้ (Cowling และคณะ, 1976) ทั้งนี้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแปรผันตามความสามารถในการผลิตเอนไซม์ CMCase จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดมอลต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.56 โดยมวลต่อปริมาตร อาจยังไม่ใช่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1เนื่องจากยังไม่เกิดการยับยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ โดยจากเหตุผลที่กล่าวมาทั้งหมดควรทำการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มากกว่าร้อยละ 0.56 โดยมวลต่อปริมาตร เพื่อเป็นการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 จากการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) สามารถผลิตของเอนไซม์ CMCase ได้สูงสุดเท่ากับ 0.041±0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

5.1.2 จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 พบว่าเมื่อใช้ Carboxymethylcellulose (CMC) เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตเอนไซม์ CMCase ได้สูงสุดเท่ากับ 0.066±0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

5.1.3 จากการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 พบว่าเมื่อใช้สารสกัดมอลต์เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตเอนไซม์ CMCase ได้สูงสุดเท่ากับ 0.135±0.003 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

5.1.4 จากการศึกษาความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose (CMC) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 พบว่าเมื่อใช้ Carboxymethylcellulose (CMC) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตเอนไซม์ CMCase ได้สูงสุดเท่ากับ 0.073±0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

5.1.5 จากการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 พบว่าเมื่อใช้สารสกัดมอลต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.56 โดยมวลต่อปริมาตร สามารถผลิตเอนไซม์ CMCase ได้สูงสุดเท่ากับ 0.100±0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณหัวเชื้อ และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่สูงขึ้น

5.2.2 ควรทดสอบการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร หรือวัสดุลิกโนเซลลูโลสชนิดอื่นมาเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าว ก้านฝ้าย ขี้เลื่อย กากน้ำตาล และขุยมะพร้าว เป็นต้น (Shivani และคณะ, 2016)

5.2.3 ควรทำการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่มากกว่าร้อยละ 0.56 โดยมวลต่อปริมาตร เพื่อเป็นการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กุสุมาวดี ฐานเจริญ. 2557. "การใช้ประโยชน์จากผักตบชวาในการผลิตเซลลูเลสจากแบคทีเรียทนร้อน และการนำมาผลิตไบโอเอทานอล." บทความวิจัย สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.

จุฑาพร แสวงแก้ว พลสัณห์ มหาขันธ์ คณิต วิชิตพันธุ์ และสุกานดา วิชิตพันธุ์. 2554. "การประยุกต์ใช้เซลลูโลไลติกเอนไซม์จากราและยีสต์ เพื่อในการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร." รายงานวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2556. **เอนไซม์เทคโนโลยี**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์, จุไรวัลย์ รัตนะพิสิฐ และสถาพร ทองวิค. 2554. "การศึกษาเพื่อพัฒนาการผลิตเซลลูเลสเอนไซม์ชนิดผงแห้งสำหรับอุตสาหกรรมเอทานอลระดับต้นแบบ". รายงานวิจัย คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

มูรนีย์ บริบูรณ์สุข. 2557. "การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน." วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วริศรา ฮวบเจริญ กรกนก จุฑาพงศ์ และกรรณิการ์ ขัดดร. 2560. "การคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไลเปสจากแหล่งธรรมชาติภายในประเทศไทย". โครงงานพิเศษระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อรัญ หันพงศ์กิตติกูล. 2556. **เทคโนโลยีเอนไซม์ (Enzyme Technology)**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรพิน ภูมิภร. 2523. **คาร์โบไฮเดรทในอาหาร: โพลีเซคคาไรด์.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2559. **ปฏิบัติการเทคโนโลยีของเอนไซม์**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Abby C. 2019. **Market dynamic: Cellulase market players, growth, trends, outlook–forecast 2019-2024, opportunities, demand, industrial research analysis.** [Online]. Available: http://downeygazette.com/market-dynamic-cellulase-cas-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9012-54-8-market-players-growth-trends-outlook-forecast-2019-2024-opportunities-demand-industrial-research-analysis/19094/.

Abou T., Khadiga A. A., Mashhoor, W. A., Nasr, Sohair A., Sharaf M.S., Abdel A. & Hoda H.M. 2009. "Nutritional and environmental factors affecting cellulase production by two strains of cellulolytic *Bacilli*." *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 3(3): 2429-2436

Anita S., Neeraj K. A. & Anita Y. 2017. "Cost-effective cellulase production using *Parthenium hysterophorus* biomass as an unconventional lignocellulosic Substrate." *3 Biotech*. 7: 12.

Anita S., Neeraj K. A & Anita Y. 2018. "Microbial cellulases: Role in second-generation ethanol production." *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*. 167-187.

Ayman S. O. I., Ashok P., Rao S.S. & Rajeev K. S. 2017. "Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover." *Bioresource Technology*. 242: 265–271.

Bjorn A., Shaunita H. R., Willem H. van Z., Anders S., Nils O. N. & Leif J. J. 2009. "Cellulase production from spent lignocellulose hydrolysates by recombinant *Aspergillus niger*." *Applied and Environmental Microbiology*. 2366–2374.

Bushra M., Abdul Q., Mariam Z., Sajid R. A., Rubina N., Nadia J., Sameen A. & Rubab A. 2018. "Production of cellulases by *Bacillus cellulosilyticus* using lignocellulosic material." *Polish Journal of Environmental Studies*. 27(6): 2659-2667.

Christian P. K. 2013. **Fungi and Lignocellulosic biomass**. Essex: Wiley-Blackwell.

Cowling E. B. & Kirk T. K. 1976. " Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymic conversion processes." *Biotechnology and bioengineering symposium*. 6(6): 95-123.

Desrochers M., Jurasek L. & Koller E. 1980. "Production of cellulase in shake flask culture of *Schizophyllum commune*: Optimization of the medium." **TAPPI Papermarkers Conference Proceedings**. 161-167.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ellen C. G., Kelly J. D., Maurício P., Anuj K. C., Fernando C. P. & Silvio S. da S. 2017. "Cellulase production by *Trichosporon laibachii*." *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*. 9(4): 271-278.

Fleming M. C. & Nellis J. G. 2000. **Principal of applied statistics: an integrated approach using MINITAB and Excel.** UK: Thomson Learning.

Gautam S.P., Bundela P.S., Pandey A.K., Jamaluddin, Awasthi M.K. & Sarsaiya S. 2010. "Optimization of the medium for the production of cellulase by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation." *International Journal of Environmental Sciences*. 1(4): 976 – 4402.

Goldbeck R., Andrade C. C. P., Pereira G. A. G. & Filho F. M. 2012. "Screening and identification of cellulase producing yeast-like microorganisms from Brazilian biomes." *African Journal of Biotechnology*. 11(53): 11595-11603.

Goldberg I., Rokem J. S. & Pines O. 2006. "Organic acid: Old metabolites, new themes." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81(10): 1601-1611.

Hanane T., Najoua B., Mohamed E., Abdellatif J. I., Bouchra C. & Hicham B. 2019. "Thermostable cellulases from the yeast *Trichosporon* sp." *Enzyme Research*. 1-6.

Hassan S., Muhammad F., Abdul G., Rashid M., Hamza R. & Syed A. I. B. 2017. "Optimization of cellulase enzyme production from *Aspergillus oryzae* for industrial applications." *World Journal of Biology and Biotechnology*. 2(2): 155-158.

Jantaporn T., Wanlee P. & Apichat J. 2014. "Cellulase and xylanase production from *Candida easanensis* using agricultural wastes as a substrate." *Songklanakarin Journal Science Technology*. 36(6): 607-613.

Juturu V. & Wu J. C. 2014. "Microbial cellulose: Engineering production and application." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 33: 188-203.

Karolina K., Marta G., Piotr R., Iwona H., Rafał Ł. & Marian K. 2018. "Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes." *Molecules*. 23: 2937.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kiptoo G. & Rajeshwara N. A. 2018. "Screening and production of lipase from fungal organisms." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 14: 241-253.

Kuhad R. C., Gupta R. & Singh A. 2011. "Microbial cellulases and their industrial application." *Enzyme Research*. 10 pages.

Kumar R. & Wyman C. E. 2010. "Key features of pretreated lignocelluloses biomass solids and their impact on hydrolysis." **Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass Woodhead Publishing Series in Energy.** Pages 73-121.

Lalit M. Srivastava. 2002. "Cell wall, cell division, and cell growth." *Plant Growth and Development: Hormomes and Enviroment*. 92(6): 846.

Lowry O. H., Rosebrongh N. A., Farr A. L. & Randall R. L. 1951. "Protien measurement with the folin – ciocalteu's phenol reagent." *The Journal of Biological Chemistry*. 13: 265-275.

Ludmila G. P., Roumiana P. S., Emma G., Satinder S. L., Lloyd S. W., Andrew G. L. 2004. "Effect of concentration polarisation and osmotic pressure on flux in organic solvent nanofiltration." *Journal of Membrane Science*. 236: 121–136.

Miller G. L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." *Analytical Chemistry*. 31(3): 426-428.

Mojsov K. D. 2016. "*Aspergillus* enzymes for food industries." *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. 215-222.

Motta F., Andrade C. & Santana M. 2013. "A review of xylanase production by the fermentation of xylan: Classification, characterization and applications." **In Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization.** Pages 251-275.

Natália P. M., Josiani de C. P., Eleni G., Roberto da S., Daniela A. B., Henrique F., André R., Kelly J. D. & Daniela A. B. 2018. "Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse." *Industrial Crops & Products*. 122: 66–75.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Neelima K., Tejashri V. & Gunjan R. 2018. "Optimization of cellulase production by *Aspergillus* species under solid state fermentation." *The Pharma Innovation Journal*. 7(1): 193-196.

Neha V., Anusuiya S., Mukund A., Pooja D., Simranjeet K. S., Anshu M., Suresh K. P. & Reeta R. S. 2018. "*Penicillium*: The next emerging champion for cellulase production." *Bioresource Technology Reports*. 2: 131–140.

Pantelides I. S., Christou O., Tsolakidou M. D., Tsaltas D. & loannou N. 2015. "Isolation, identification and in vitro screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes." *Biological Control*. 88:46-53.

Prasanna H. N., Ramanjaneyulu G. & Rajasekhar R. B. 2016 "Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp." *3 Biotech*. 6: 162.

Priyanka R., Soni T. & Rajeeva G. 2012. "Saccharification of bagasse." *BioResources*. 7(4): 5401-5414.

Ramesh C. K., Rishi G. & Ajay S. 2011. "Microbial cellulases and their industrial applications." *Enzyme Research*. 1-10.

Remaz M. M., Ahmed A. E., & Shami E. B. A. 2018. "Optimization of factors influencing cellulase production by some indigenous isolated fungal species." *Jordan Journal of Biological Sciences*. 11: 31 – 36.

Renge V. C., KhedkarS. V. & Nikita R. N. 2012. "Enzyme synthesis by fermentation method: A review." *Science Reviews and Chemical Communications*. 2(4): 585-590.

Sakthi S. S., Saranraj P. & Rajasekar M. 2011. "Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using paddy straw as substrate." *International journal of Advanced Scientific and Technical Research*. 1(1): 69-85.

Shazia K. M., Ammad A. F., Hamid M. & Ikram. 2010. "Optimization of process parameters for the biosynthesis of cellulases by *Trichoderma viride*." *Pakistan Journal of Botany*. 42(6): 4243-4251.

Shivani S., Vinay S. & Arindam K. 2016. "Cellulase production using natural medium and its application on enzymatic hydrolysis of thermo chemically pretreated biomass." *3 Biotech*. 6:139.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sonia S. & Saksham G. 2014. "Optimization of cultural parameters for cellulase enzyme production from fungi." *BioLife.* 2(3): 989-996.

Sonia S., Aparna D., Gupta B. L. & Saksham G. 2013. "Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil." *International Scholarly Research Notices: Biotechnology*. 1-7.

Stevens B. J. H. & Payne J. 1977. "Cellulase and xylanase production by yeasts of the genus *Trichosporon." Journal of General Microbiology*. 100: 381-393.

Stoll V. S. & Blendchard J. S. 1990. "Buffer: Principles and practice." **In Method in Enzymology.** Academic Press, New York, pp.22-38.

Swati D., Pratibha S. & Niranjan B. 2014. "Optimization of extracellular cellulase enzyme production from *Alternaria brassicicola." International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 3(9): 127-139.

Vyas S. & Chhabra M. 2017. "Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium oligophagum* JRC1: A cellulase and lipase producing oleaginous yeast." *Bioresource Technology*. 223: 250–258.

Wang K. Kim K.H. & Brown R.C. 2014. "Catalytic pyrolysis of individual components of lignocellulosic biomass." *Green Chemistry*. 16: 727–735.

William M. F. 1983. **Microbial Enzymes and Biotechnology**. Essex: Applied Science Publishers.

Xiaolong H., Wenxia S., Guodong L., Zhonghai L., Piao Y. & Yinbo Q. 2017. "Improving cellulase productivity of *Penicillium oxalicum* RE-10 by repeated fed-batch fermentation strategy." *Bioresource Technology*. 227: 155-163.

Yunzi H., Chenyu D., Nattha P. & Carol S. K. L. 2018. "Optimisation of fungal cellulase production from textile waste using experimental design." *Process Safety and Environmental Protection*. 118: 133–142.

Zhang X. Z. & Zhang Y. H. 2013. Cellulases: Characteristics, sources, production, and applications. bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers. 131-145.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

ก.1 คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethycellulose) ร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตรในซิเทรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8

คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	1	กรัม
ซิเทรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8	100	มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส 1 กรัมด้วยซิเทรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 (ภาคผนวก ก.4) ในอ่างน้ำร้อน (80-90 องศาเซลเซียส) ให้มีความหนืดปานกลางโดยเติมสารลงไปช้าๆ และคนอย่างต่อเนื่อง และเติมซิเทรตบัฟเฟอร์พีเอช 4.8 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็น (อารี, 2559)

ก.2 สารละลายกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5 dinitroslicylic acid)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	10	กรัม
ไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS)	10	กรัม
โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต	300	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาณหนึ่ง (ไม่เกิน 600 มิลลิลิตร) ละลายจนหมด จากนั้นค่อยๆ เติมไดไนโตรซาลิไซลิก 10 กรัม โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต 300 กรัม โดยค่อยๆ ละลายสารเคมีแต่ละตัวจนหมด จึงค่อยเติมสารเคมีตามลำดับจนครบทุกตัว จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร และเก็บในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิห้อง (Miller, 1959)

ก.3 สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Glucose anhydrous	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เตรียมโดยอบน้ำตาลกลูโคสที่ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักกลูโคส 0.1 กรัมละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร ซึ่งสารละลายนี้มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็น (อารี, 2559)

ก.4 ซิเทรตบัฟเฟอร์ (Citrate Buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8

สารละลาย ก: สารละลายกรดซิตริก ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (มวลโมเลกุล = 192.124)
(ทำการละลาย $C_6H_8O_7$ 9.6 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข: สารละลายโซเดียมซิเตรท ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (มวลโมเลกุล = 294.1)
(ทำการละลาย $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ 14.7 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ทำการเตรียมสารละลาย ก ปริมาตร 23 มิลลิลิตร และ ข ปริมาตร 27 มิลลิลิตร นำมาผสมกันเพื่อให้ได้พีเอชเท่ากับ 4.8 และทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร (ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้) (Stoll และ Blanchard, 1990)

ก.5 สารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (alkali copper)

นำสารละลาย ก ผสมกับ สารละลาย ข โดยใช้

สารละลาย ก	50	มิลลิลิตร
สารละลาย ข	1	มิลลิลิตร (ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้)

โดยการเตรียมสารละลาย ก และ สารละลาย ข เตรียมได้ดังนี้

สารละลาย ก

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	20	กรัม
สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์	1000	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์โดยการชั่ง NaOH (มวลโมเลกุล = 39.997) 3.999 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำโซเดียม-คาร์บอเนต (Na_2CO_3) 20 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย ข

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	5	กรัม
โซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate)	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำโซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 5 กรัม ในสารละลายโซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรต (Lowry และคณะ, 1951)

ก.6 สารละลาย Folin-Clocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

นำสารละลาย Folin-Clocalteu มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (เตรียมเมื่อต้องการใช้) (อารี, 2559)

ก.7 สารละลายมาตรฐานของโปรตีนความเข้มข้น 1000 โมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Bovine serum albumin (BSA)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ชั่งน้ำหนัก bovine serum albumin (BSA) 0.1 กรัมละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร ซึ่งสารละลายนี้มีความเข้มข้นของโปรตีน 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็น (อารี, 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐาน

ข.1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

นำสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก ลงไป 1.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็น เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในรูปของน้ำตาลกลูโคส โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 นาโนเมตรและสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ดังรูป ข.1

รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 กราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine serum albumin (BSA)

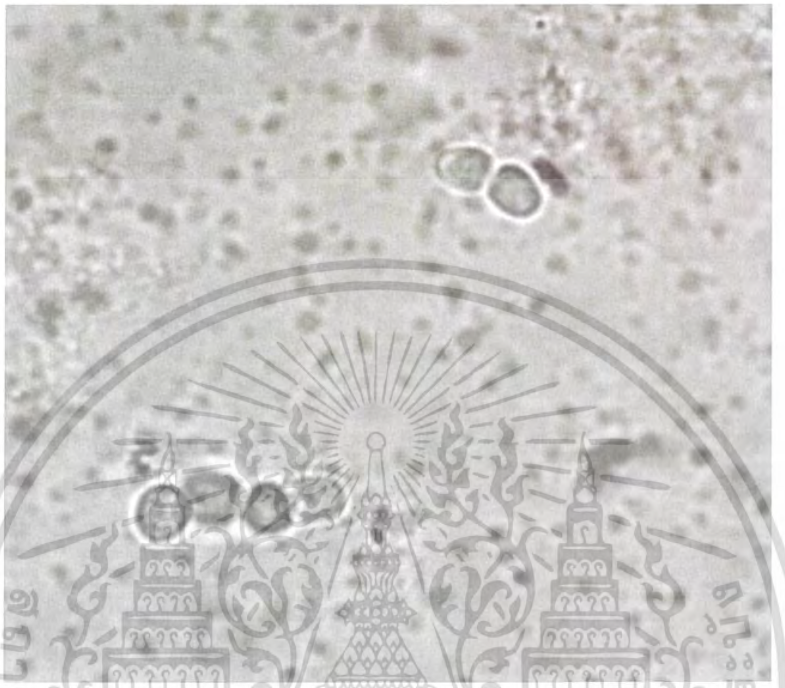
เตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ให้มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0 50 100 150 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อ-มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปิเปตสารละลาย folin-ciocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร และสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ดังรูป ข.2

รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

แสดงลักษณะของยีสต์ไอโซเลท M1



รูปที่ ค.1 เซลล์ยีสต์ไอโซเลท M1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) กำลังขยายทั้งหมด 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1

ตารางที่ ค.1 แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ภายใต้สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะความขุ่นของยีสต์ไอโซเลท M1
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Csiszar (Yunzi และคณะ, 2018)	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Mandels ที่เติมเปปโตน (Yunzi และคณะ, 2018)	

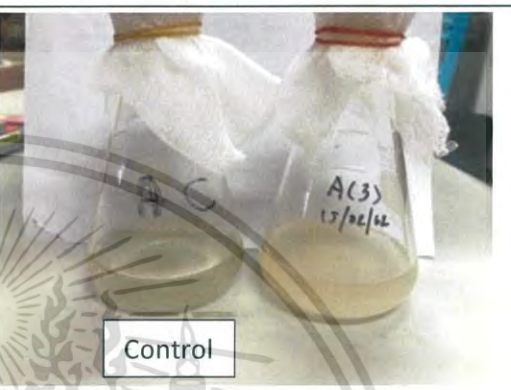
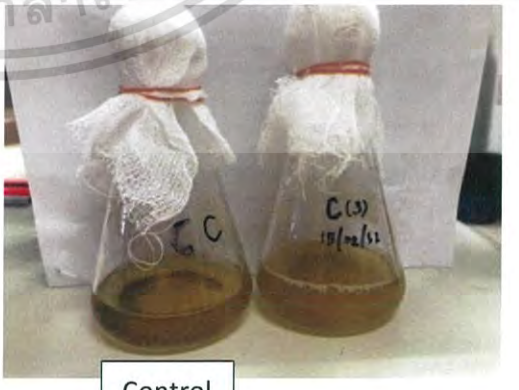
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ภายใต้สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะความขุ่นของยีสต์ไอโซเลท M1
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Mandels ที่เติมสารสกัดยีสต์ (Yunzi และคณะ, 2018)	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Vyas และ Chhabra (2017)	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal (มูรนีย์, 2557)	

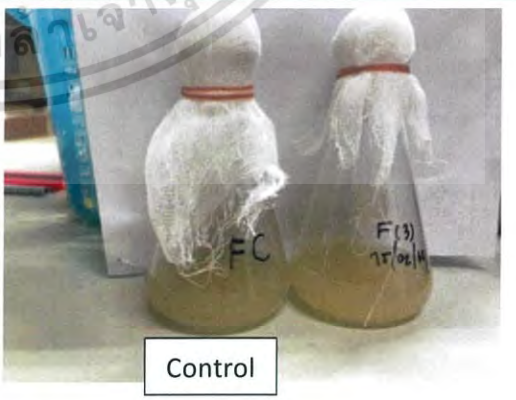
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ภายใต้สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทดสอบชนิดของแหล่งคาร์บอน	ลักษณะความขุ่นของยีสต์ไอโซเลท M1
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี Carboxymethylcellulose เป็นแหล่งคาร์บอน	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ภายใต้สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทดสอบชนิดของแหล่งคาร์บอน	ลักษณะความขุ่นของยีสต์ไอโซเลท M1
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีธูปฤาษีที่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน	Control
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	Control
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีรำข้าวผสมกับ Carboxymethylcellulose ในอัตราส่วน 1:1 เป็นแหล่งคาร์บอน	 Control

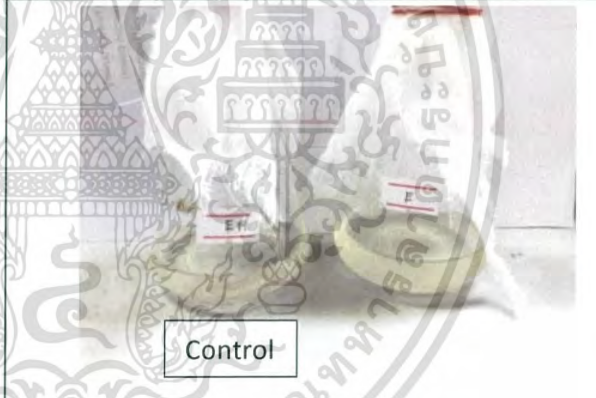
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ภายใต้สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทดสอบชนิดของแหล่งไนโตรเจน	ลักษณะความขุ่นของยีสต์ไอโซเลท M1
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดยีสต์ผสมแอมโมเนียม-ซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน	Control
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน	Control
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน	Control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ภายใต้สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทดสอบชนิดของแหล่งไนโตรเจน	ลักษณะความขุ่นของยีสต์ไอโซเลท M1
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมโมลิบเดตเป็นแหล่งไนโตรเจน	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน	

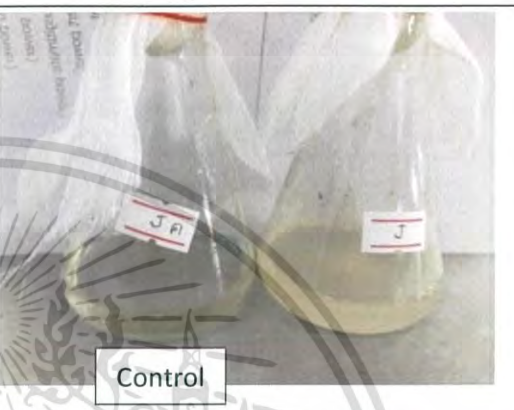
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ภายใต้สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทดสอบชนิดของแหล่งไนโตรเจน	ลักษณะความขุ่นของยีสต์ไอโซเลท M1
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน	Control
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดมอลต์เป็นแหล่งไนโตรเจน	Control
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดเนื้อเป็นแหล่งไนโตรเจน	Control

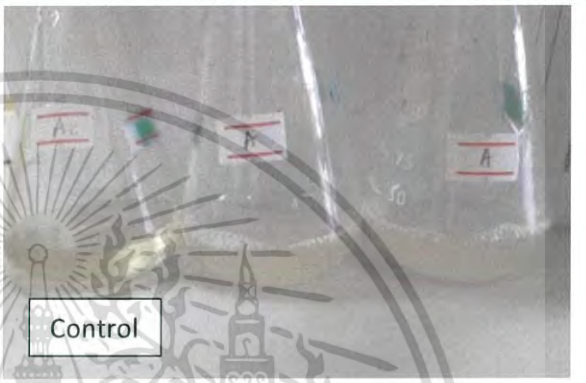
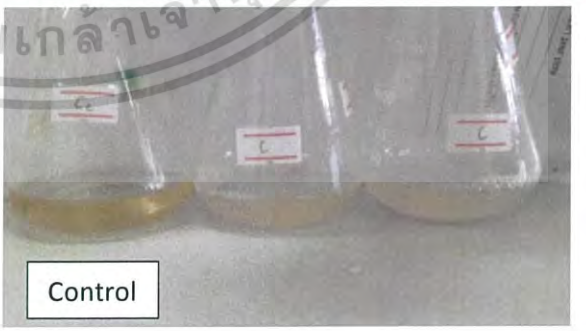
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ภายใต้สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทดสอบชนิดของแหล่งไนโตรเจน	ลักษณะความขุ่นของยีสต์ไอโซเลท M1
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน	 Control
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน	Control

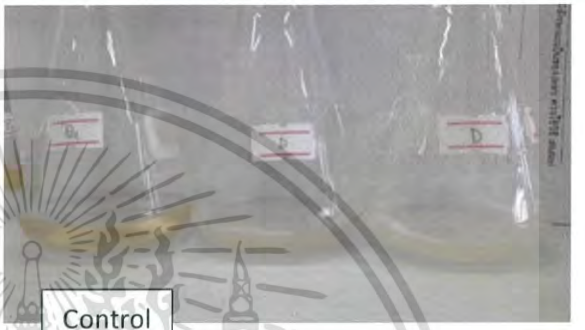
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ภายใต้สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทดสอบความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose	ลักษณะความขุ่นของยีสต์ไอโซเลท M1
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตร	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยมวลต่อปริมาตร	

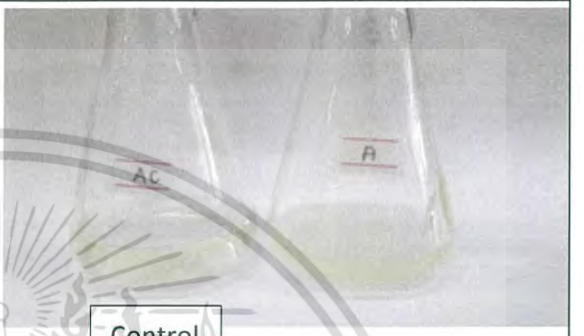
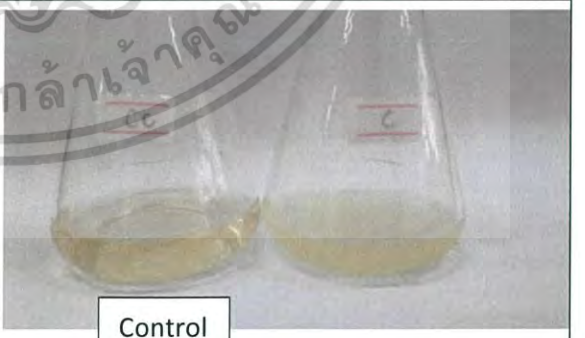
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ภายใต้สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทดสอบความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose	ลักษณะความขุ่นของยีสต์ไอโซเลท M1
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี Carboxymethylcellulose ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยมวลต่อปริมาตร	

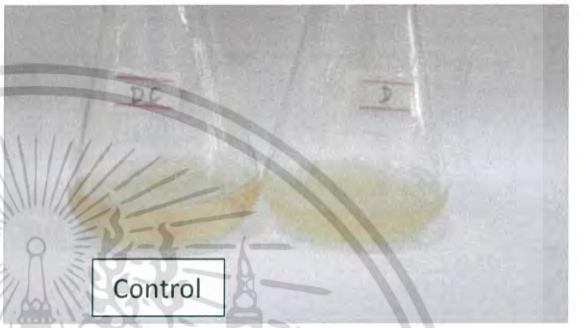
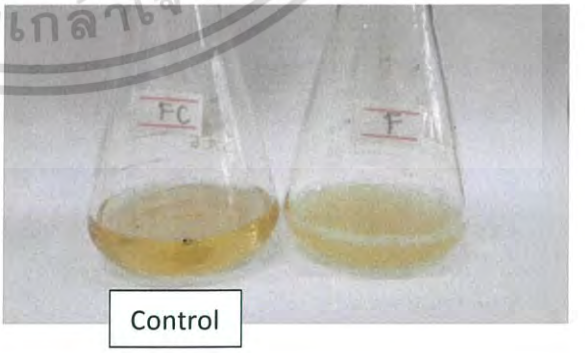
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ภายใต้สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์	ลักษณะความขุ่นของยีสต์ไอโซเลท M1
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดมอลต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.08 โดยมวลต่อปริมาตร	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดมอลต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.16 โดยมวลต่อปริมาตร	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดมอลต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.24 โดยมวลต่อปริมาตร	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ไอโซเลท M1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ภายใต้สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทดสอบ	ลักษณะความขุ่นของยีสต์ไอโซเลท M1
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดมอลต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.32 โดยมวลต่อปริมาตร	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดมอลต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.48 โดยมวลต่อปริมาตร	
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดมอลต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.56 โดยมวลต่อปริมาตร	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 แสดงบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ไอโซเลท M1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Vyas และ Chhabra (2017) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ยีสต์	ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์
ไอโซเลท M1	แสดงบริเวณใสรอบโคโลนีเดี่ยวของยีสต์
	แสดงบริเวณใสในลักษณะรอยโคโลนีของยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ง.1 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ CMCase เมื่อทำการศึกษาชนิดของอาหาร แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	P-value
ชนิดของอาหาร	Factor	0.000406	4	0.000102	21.39	0.000
	Error	0.000047	10	0.000005		
	Total	0.000454	14			
แหล่งคาร์บอน	Factor	0.006584	5	0.001317	1538.63	0.000
	Error	0.000010	12	0.000001		
	Total	0.006594	17			
แหล่งไนโตรเจน	Factor	0.036174	10	0.003617	1544.96	0.000
	Error	0.000026	11	0.000002		
	Total	0.036200	21			
ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose	Factor	0.001017	4	0.000254	254.15	0.000
	Error	0.000005	5	0.000001		
	Total	0.001022	9			
ความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์	Factor	0.002910	5	0.000582	332.62	0.000
	Error	0.000010	6	0.000002		
	Total	0.002921	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณโปรตีน เมื่อทำการศึกษาชนิดของอาหาร แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสาร-สกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	P-value
ชนิดของอาหาร	Factor	0.313085	4	0.78271	704.98	0.000
	Error	0.001110	10	0.000111		
	Total	0.314196	14			
แหล่งคาร์บอน	Factor	0.548901	5	0.109780	534.63	0.000
	Error	0.002464	12	0.000205		
	Total	0.551365	17			
แหล่งไนโตรเจน	Factor	0.246046	10	0.024605	62650.59	0.000
	Error	0.000004	11	0.000000		
	Total	0.246050	21			
ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose	Factor	0.000251	4	0.000063	20.95	0.003
	Error	0.000015	5	0.000003		
	Total	0.000266	9			
ความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์	Factor	0.185078	5	0.037016	88837.32	0.000
	Error	0.000002	6	0.000000		
	Total	0.185080	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของกิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ CMCase เมื่อทำการศึกษาชนิดของอาหาร แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose และความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	P-value
ชนิดของอาหาร	Factor	0.15870	4	0.003968	59.82	0.000
	Error	0.000663	10	0.000066		
	Total	0.016534	14			
แหล่งคาร์บอน	Factor	0.259983	5	0.051997	2724.67	0.000
	Error	0.000229	12	0.000019		
	Total	0.260212	17			
แหล่งไนโตรเจน	Factor	0.69685	10	0.069685	69.97	0.000
	Error	0.01096	11	0.000996		
	Total	0.70780	21			
ความเข้มข้นของ Carboxymethylcellulose	Factor	0.028037	4	0.007009	223.22	0.000
	Error	0.000157	5	0.000031		
	Total	0.028194	9			
ความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์	Factor	0.021240	5	0.004248	191.64	0.000
	Error	0.000133	6	0.000022		
	Total	0.021373	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.4 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้ชนิดของอาหารที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ชนิดของอาหาร				
Tukey				
ชุดการทดลอง	N	Subset for alpha = 0.01 Mean/Grouping		
		กิจกรรมเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
Csiszar (Yunzi และคณะ, 2018)	3	0.0254409/C	0.232133/C	0.109782/B
Mandels ที่เติมเปปโตน (Yunzi และคณะ, 2018)	3	0.0296040/BC	0.227689/C	0.129953/AB
Mandels ที่เติมสารสกัดยีสต์ (Yunzi และคณะ, 2018)	3	0.0351547/AB	0.274311/B	0.128183/AB
Vyas และ Chhabra (2017)	3	0.0407055/A	0.264800/BC	0.153850/A
Basal (มูรนีย์, 2557)	3	0.0346922/AB	0.608089/A	0.057042/C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.5 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

แหล่งคาร์บอน				
Tukey				
ชุดการทดลอง	N	Subset for alpha = 0.01 Mean/Grouping		
		กิจกรรมเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
Carboxymethylcellulose	3	0.0661464/A	0.183778/F	0.359988/A
ชานอ้อย	3	0.0129517/C	0.387822/D	0.033601/C
เปลือกข้าวโพด	3	0.0148020/C	0.657111/A	0.022517/C
ธูปฤาษี	3	0.0152645/C	0.261422/E	0.058440/B
รำข้าว	3	0.0148020/C	0.602133/B	0.024597/C
รำข้าวผสม Carboxymethylcellulose อัตราส่วน 1:1	3	0.0328419/B	0.536444/C	0.061220/B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.6 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

แหล่งไนโตรเจน				
Tukey				
ชุดการทดลอง	N	Subset for alpha = 0.01 Mean/Grouping		
		กิจกรรมเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
สารสกัดยีสต์ผสมแอมโมเนียมซัลเฟต	2	0.069731/C	0.1180/E	0.590959/A
แอมโมเนียมซัลเฟต	2	0.012489/F	0.0323/G	0.386422/CD
แอมโมเนียมคลอไรด์	2	0.020468/E	0.0342/G	0.598691/A
แอมโมเนียมโมลิบเดต	2	0.14918/EF	0.0351/G	0.425512/BCD
แอมโมเนียมไนเตรท	2	0.016652/EF	0.0327/G	0.510011/ABC
โซเดียมไนเตรท	2	0.009367/F	0.0347/G	0.269855/DE
สารสกัดยีสต์	2	0.097138/B	0.2273/D	0.427356/BCD
สารสกัดมอลต์	2	0.134952/A	0.2413/C	0.559261/AB
สารสกัดเนื้อ	2	0.030529/D	0.2623/B	0.116390/EF
เปปโตน	2	0.011448/F	0.3014/A	0.037973/F
ยูเรีย	2	0.012142/F	0.0387/F	0.313779/D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.7 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้ Carboxymethylcellulose ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ความเข้มข้นของ CMC				
Tukey				
ชุดการทดลอง	N	Subset for alpha = 0.01 Mean/Grouping		
		กิจกรรมเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
0.5	2	0.0625/C	0.1890/B	0.3305/BC
1.0	2	0.0830/A	0.1985/AB	0.4185/A
1.5	2	0.0690/B	0.1955/AB	0.3530/B
2.0	2	0.0620/C	0.2000/A	0.3100/C
2.5	2	0.0525/D	0.2040/A	0.2570/D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.8 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้สารสกัดมอลต์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยยีสต์ไอโซเลท M1 ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์				
Tukey				
ชุดการทดลอง	N	Subset for alpha = 0.01 Mean/Grouping		
		กิจกรรมเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
0.08	2	0.0525/E	0.1820/F	0.2885/A
0.16	2	0.0685/D	0.2350/E	0.2920/A
0.24	2	0.0765/C	0.2860/D	0.2675/AB
0.32	2	0.0845/B	0.3310/C	0.2550/B
0.48	2	0.0910/B	0.4810/B	0.1890/C
0.56	2	0.1005/A	0.5235/A	0.1920/C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้