การผลิตน้ำตาลจากการย่อยเปลือกและกากผลไม้ด้วยเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium menonorum*

SUGAR PRODUCTION FROM FRUIT WASTES USING CRUDE XYLANASE ENZYME FROM *Penicillium menonorum*

ศรัณย์ภัทรโทริ ประภาศิริ

ชลธิชา กระจ่าง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SUGAR PRODUCTION FROM FRUIT WASTES USING CRUDE XYLANASE ENZYME FROM *Penicillium menonorum*

SARUNPATTORI PRAPASIRI

CHOLTHICHA KRACHANG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตน้ำตาลจากการย่อยเปลือกและกากผลไม้ด้วยเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium menonorum*

Sugar production from fruit wastes using crude xylanase enzyme from *Penicillium menonorum*

ชื่อนักศึกษา นางสาวศรัณย์ภัทรโทริ ประภาศิริ รหัสนักศึกษา 63050439

นางสาวชลธิชา กระจ่าง รหัสนักศึกษา 63050463

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2566

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ปีการศึกษา 2566

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ. ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ผศ. ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ กรรมการ	
รศ. ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตน้ำตาลจากการย่อยเปลือกและกากผลไม้ด้วยเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium menonorum*
Sugar production from fruit wastes using crude xylanase enzyme from *Penicillium menonorum*

ชื่อนักศึกษา นางสาวศรัณย์ภัทรโทริ ประภาศิริ รหัสนักศึกษา 63050439
นางสาวชลธิชา กระจ่าง รหัสนักศึกษา 63050463

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2566

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตน้ำตาลจากการย่อยเปลือกและกากผลไม้ ได้แก่ เปลือกส้ม เปลือกเสาวรส เปลือกมะนาว เปลือกแตงโม และซังข้าวโพด โดยใช้เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบที่ผลิตจากเชื้อรา *Penicillium menonorum* โดยตรวจวัดการผลิตน้ำตาลด้วยวิธี Dinitro Salicylic Acid (DNS) พบว่าเปลือกและกากผลไม้ทั้งห้าชนิดสามารถผลิตน้ำตาลได้ด้วยเอนไซม์ไซลาเนส โดยเฉพาะซังข้าวโพดที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสมากที่สุด แสดงให้เห็นว่าซังข้าวโพดเป็นตัวเลือกที่ดีในการนำไปเป็นซับสเตรตสำหรับการผลิตน้ำตาล ต่อมาได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตน้ำตาล โดยมีการศึกษา 4 ปัจจัย คือ ปริมาณซับสเตรต ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิการบ่ม และระยะเวลาการบ่ม จากผลการวิจัยพบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาล คือ ปริมาณซับสเตรตเท่ากับ 0.4 กรัม ค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 6.0 อุณหภูมิสำหรับการบ่ม คือ 55 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการบ่มที่ 24 ชั่วโมง งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าซังข้าวโพดเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการนำไปเป็นซับสเตรตการผลิตน้ำตาล

คำสำคัญ : การผลิตน้ำตาล ขยะจากผลไม้ ไซลาเนส และเพนิซิลเลียม มีโนโนรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Sugar production from fruit wastes using crude xylanase enzyme from *Penicillium menonorum.*
Students	Miss Sarunpattori Prapasiri Student ID 63050439
	Miss Cholthicha Krachang Student ID 63050463
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2023
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim

Abstract

This research explores the production of sugar from fruit wastes, including orange peel, passion fruit peel, lemon peel, watermelon rind, and corn cob, using crude xylanase enzymes from *Penicillium menonorum*. Sugar production was quantified using the Dinitro Salicylic Acid (DNS). Results indicated that all fruit waste showed increased sugar yields when treated with crude xylanase enzymes, with corn cob demonstrating the highest xylanase activity among the substrate. This highlights the efficacy of corn cob as a substrate for sugar production. Subsequently, further optimization of sugar production was achieved by varying four parameters: substrate loading, pH, incubation temperature and inoculation time. The optimized conditions for maximal sugar production were identified as 0.4 grams of substrate, pH 6.0, an incubation temperature of 55 ℃ and an incubation time of 24 hours. This research demonstrates that corn cobs are an excellent choice as a substrate in sugar production.

Keywords: Sugar production, Fruit waste, Xylanase, *Penicillium menonoru*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก รศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง จนโครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณ รศ. ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ และ ผศ. ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ กรรมการ ตลอดจนนักวิทยาศาสตร์ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในอุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ จนทำให้สามารถทำการทดลองในหัวข้อโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงลงได้

ขอขอบพระคุณคุณ รศ. ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อรา *P. menonorum* SP10 ที่นำมาใช้ในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้ และขอขอบพระคุณคุณ Thi Thu Huong Luong ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในโครงงานพิเศษครั้งนี้จนสามารถสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้กับข้าพเจ้าในการศึกษาจนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี และคุณประโยชน์อันใดที่จะได้รับจากการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่บิดา มารดา ครู อาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้สั่งสอนและประสิทธิ์ประสาทวิชาทุกแขนง เพื่อให้ข้าพเจ้าสามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการปฏิบัติงานและเกิดประโยชน์แก่ประเทศชาติต่อไป

ศรัณย์ภัทรโทริ ประภาศิริ

ชลธิชา กระจ่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญรูป ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ช

คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขต 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 เชื้อราสกุล *Penicillium* 3

2.2 เอนไซม์ไซลาเนส 4

2.3 น้ำตาลไซโลส 6

2.4 วิธีการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ และน้ำตาล 7

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 10

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 10

3.2 สารเคมี 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ซับสเตรต 12
3.4 เชื้อราที่ใช้ในงานวิจัย 12
3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อรา 12
3.6 การเตรียมซับสเตรต 12
3.7 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อราในขวดแก้ว 13
3.8 วิธีการสกัดเอนไซม์สำหรับใช้ทดสอบเอนไซม์ไซลาเนส 13
3.9 การทดสอบเอนไซม์ไซลาเนส 13
3.10 การเตรียมเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตน้ำตาล 13
3.11 การผลิตน้ำตาล 14
3.12 การตรวจสอบส่วนประกอบของน้ำตาลด้วยวิธีการ TLC 15
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 17
4.1 ผลการตรวจสอบการผลิตน้ำตาลจากการย่อยเปลือกและกากผลไม้เหลือทิ้งด้วยเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบที่ผลิตจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 17
4.2 ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาล 22
4.3 ผลการตรวจสอบชนิดของน้ำตาล 26
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 31
5.1 สรุปผลการวิจัย 31
5.2 ข้อเสนอแนะ 31
เอกสารอ้างอิง 33
ภาคผนวก 37
ภาคผนวก ก 38
ภาคผนวก ข 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.1	ลักษณะสัญฐานวิทยาภายนอกของเชื้อรา *P. menonorum* SP10 (ก) การเจริญบนผิวหน้าอาหาร PDA ของเชื้อรา *P. menonorum* SP10 (ข) การเจริญด้านหลังอาหาร PDA ของเชื้อรา *P. menonorum* SP10 (ค) เส้นใยภายใต้กล้อง stereo (ง) ลักษณะเส้นใย (จ) ลักษณะสปอร์ (ฉ) ลักษณะ Conidiophores, phialides และ conidia.....	18
4.2	การเจริญบนผิวหน้า ซับสเตรตของเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ในอาหารทั้ง 5 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน.....	19
4.3	การเปรียบเทียบการผลิตน้ำตาลไซโลส (ยูนิต/กรัม) จากการย่อยเปลือกและกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิดด้วยเอนไซม์ไซลาเนสในการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสของวันที่ 7, 14, 21 และ 28.....	22
4.4	การเปรียบเทียบปริมาณซังข้าวโพดในการใช้เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 เพื่อผลิตน้ำตาลไซโลส (มก./มล.) ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 อุณหภูมิการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	24
4.5	การเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างในการใช้เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 เพื่อผลิตน้ำตาลไซโลส (มก./มล.) โดยใช้ปริมาณซังข้าวโพด 0.4 กรัม อุณหภูมิการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	25
4.6	การเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ใช้เพื่อผลิตน้ำตาลไซโลส (มก./มล.) ในการบ่มซังข้าวโพด 0.4 กรัม ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	27
4.7	การเปรียบเทียบระยะเวลาในการที่เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ย่อยซังข้าวโพด 0.4 กรัม เพื่อผลิตน้ำตาลไซโลส (มก./มล.) ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 อุณหภูมิการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส.....	28
4.8	แสดงการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารตัวอย่างที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดโดยใช้เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ในปริมาณ 0.4 กรัมของซังข้าวโพด ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6 อุณหภูมิการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้วิธี TLC: (1) ไซโลส (2) กลูโคส (3) ซังข้าวโพด (4) ไซลาเนส (5) สารตัวอย่าง.....	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ค่าเฉลี่ยปริมาณไซโลสที่ปล่อยออกมา (ยูนิต/กรัม) จากการย่อยเปลือกและกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิดด้วยเอนไซม์ไซลาเนสในการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของวันที่ 7, 14, 21 และ 28.....	21
4.2	แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล (มก./มล.) ในแต่ละปริมาณซับสเตรตของซังข้าวโพด (กรัม) ที่ถูกย่อยด้วยไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 อุณหภูมิการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	24
4.3	แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล (มก./มล.) ในแต่ละค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ย่อยซังข้าวโพดปริมาณ 0.4 กรัม ด้วยไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 อุณหภูมิการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	25
4.4	แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล (มก./มล.) ในแต่ละอุณหภูมิที่ใช้ย่อยซังข้าวโพดปริมาณ 0.4 กรัม ด้วยไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	26
4.5	แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล (มก./มล.) ในแต่ละช่วงระยะเวลาที่ใช้ย่อยซังข้าวโพดในปริมาณ 0.4 กรัม ด้วยไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 อุณหภูมิบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส.....	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
DNS	Dinitrosalicylic Acid
GC	Gas chromatography
H_2SO_4	กรดซัลฟิวริก
HPLC	High-performance liquid chromatography
O.D.control	ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม
O.D.sample	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง
PDA	Potato Dextrose Agar
TLC	Thin layer chromatography
%	เปอร์เซ็นต์
มก./มล.	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตสินค้าทางการเกษตรสมบูรณ์แห่งหนึ่งของโลก และผลไม้ถือเป็นสินค้าทางเกษตรกรรมที่สำคัญ มีทั้งการจำหน่ายในประเทศ ส่งออกตลาดนอกประเทศ และเพื่อบริโภคภายในประเทศ ไม่ว่าจะเป็นการทานสดหรือการแปรรูป (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2565) แต่ไม่ว่าจะวิธีใด ผลไม้ถือเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดขยะมูลฝอยขึ้น เนื่องจากส่วนใหญ่จะบริโภคส่วนเนื้อผลไม้และปลอกเปลือกทิ้ง ทั้งนี้การบริโภคผลไม้นั้น ทำให้เกิดขยะมูลฝอยขึ้นอย่างเปลือกผลไม้หรือกากผลไม้ ในประเทศไทยมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณขยะมูลฝอยทุกปี และการกำจัดขยะมูลฝอยส่วนใหญ่ยังคงกำจัดด้วยวิธีการเผากลางแจ้ง หรือทิ้งลงในบ่อดินฝังกลบ ซึ่งเป็นเหตุให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและต่อสุขภาพอนามัยของประชาชนโดยรอบได้ (กรมควบคุมมลพิษ, 2565) แต่ขยะมูลฝอยเหล่านี้สามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์และสร้างมูลค่าได้ เนื่องจากเปลือกผลไม้และกากผลไม้มีลิกโนเซลลูโลส ส่วนใหญ่มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณสูง โดยลิกโนเซลลูโลสถือเป็นทรัพยากรธรรมชาติ เป็นที่นิยมของอุตสาหกรรมต่างๆ ในการนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนหรือพลังงานหมุนเวียน และเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด อย่างการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ หรือสารตั้งต้นในการผลิตน้ำตาลได้ (Qian, 2014) ดังนั้นคณะผู้จัดทำจึงมีความสนใจนำเปลือกผลไม้และกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ส้ม มะนาว แตงโม เสาวรส และซังข้าวโพด เนื่องจากเป็นผลไม้ที่มีการ มาสร้างประโยชน์โดยการแปรรูปเป็นน้ำตาล โดยการใช้เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium menonorum* SP10 มาย่อยเปลือกและกากผลไม้ เพื่อผลิตเป็นน้ำตาล โดยใช้เอนไซม์ไซลาเนสที่สามารถผลิตได้ทั้งจากแบคทีเรีย จุลินทรีย์ และเชื้อราเส้นใย (Sakthiselvan et al., 2014) ซึ่งเชื้อราเส้นใยถือเป็นผู้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดี เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในระดับสูงกว่าแบคทีเรียและยีสต์ (Kulkarni et al., 1999) มีงานวิจัยของ Luong และคณะ (2023) ที่ได้มีการคัดแยกและศึกษาเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าเชื้อรา *P. menonorum* SP10 เป็นเชื้อราที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด ซึ่งถูกระบุด้วยวิธีการทางโมเลกุลโดยใช้ยีนบีต้า-ทูบูลิน และผลงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า *P. menonorum* SP10 เป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการเลือกใช้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งเชื้อรา *P. menonorum* นั้นมีงานวิจัยของ Babu และคณะ (2015) ได้ระบุลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *P. menonorum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ว่า “เส้นใยมีลักษณะคล้ายไหมเป็นกำมะหยี่ ตรงกลางโคโลนีมีสีฟ้าอ่อนถึงเทาเข้ม รอบข้างโคโลนีเป็นสีขาว และสร้างเม็ดสีชมพูใสตรงกลาง ส่วนด้านหลังโคโลนีเป็นสีเหลืองและมีจุดศูนย์กลางเป็นสีน้ำตาลเหลืองหรือน้ำตาลแดง”และคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสนั้น มีความสามารถที่จะนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลาย หนึ่งในนั้นคือความสามารถในการย่อยสลายไซแลนที่เป็นองค์ประกอบในเฮมิเซลลูโลส ซึ่งพบได้ในเปลือกผลไม้ เมื่อย่อยสลายไซแลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วเกิดเป็นน้ำตาลไซโลส (Kulkarni et al., 1999) ดังนั้นคณะผู้จัดทำจึงเลือกใช้เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *P. menonorum* มาย่อยเปลือกและกากผลไม้ เพื่อลดปัญหาการกำจัดขยะมูลฝอย และนำกลับมาใช้ประโยชน์อย่างมีประสิทธิภาพ โดยตรวจวัดปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี Dinitro Salicylic Acid (DNS) และศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลจากการใช้เอนไซม์ไซลาเนสด้วยการเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณของสาร ซับสเตรต ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิในการบ่ม และเวลาที่ใช้ในการบ่ม อีกทั้งยังตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่สร้างขึ้นด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการผลิตน้ำตาลจากการย่อยเปลือกและกากผลไม้เหลือทิ้งด้วยเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบที่ผลิตจากเชื้อรา *P. menonorum*

1.2.2 เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลจากการใช้เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาเฉพาะเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10

1.3.2 ศึกษาเปลือกและกากผลไม้เหลือทิ้งจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกส้ม เปลือกมะนาว เปลือกแตงโม เปลือกเสาวรส และซังข้าวโพด

1.3.3 ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตน้ำตาลจำนวน 4 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณของซับสเตรต ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิในการบ่ม และระยะเวลาในการบ่ม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถลดปัญหาในการกำจัดขยะมูลฝอย

1.4.2 สามารถนำเปลือกและกากผลไม้เหลือทิ้งมาเพิ่มมูลค่า โดยนำกลับมาใช้ประโยชน์ใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อราสกุล *Penicillium*

เป็นเชื้อราที่จัดจำแนกตามอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Domain: Eukaryota

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Family: Aspergillaceae

Genus: *Penicillium*

Dutta และคณะ (2007) พบไซลาเนสบริสุทธิ์จากเชื้อรา *P. citrinum* มีฤทธิ์เป็นด่าง คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.0 และทนความร้อนได้ปานกลาง โดยทำงานได้เหมาะสมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากการเพาะเลี้ยง *P. citrinum* โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นซับสเตรต

Knob และ Carmona (2010) ศึกษาไซลาเนส 2 ชนิดจาก *P. sclerotiorum* ที่ได้รับการทำให้บริสุทธิ์โดยการแลกเปลี่ยนไอออน และโคราโทกราฟีแบบแยกโมเลกุล ในการศึกษาครั้งนี้เป็นผลงานแรกๆ ที่ตรวจสอบ และอธิบายไซลาเนสที่มีความเป็นกรดสูง โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ 2.5 ซึ่งก่อนหน้าการวิจัยในครั้งนี้มีเพียงงานวิจัยเดียวเท่านั้นที่อธิบายเกี่ยวกับไซลาเนสที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเหมาะสมอยู่ที่ 2.0 ซึ่งการค้นพบไซลาเนสชนิดใหม่นี้มีลักษณะที่น่าสนใจสำหรับกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

Peterson และคณะ (2011) จากการศึกษาเชื้อราที่แยกได้จากดินในแคลิฟอร์เนียตอนใต้พบ *P. menonorum* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ มีการอธิบายว่า monoverticillate เป็นลักษณะชนิดใหม่ที่มีลักษณะคล้ายกับ *P. strictum* และ *P. pimiteouiense*

พิชามญชุ์ และคณะ (2556) มีการศึกษาสารละลายเอนไซม์ชนิดขับออกนอกเซลล์จาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 ประกอบด้วยเซลลูเลส ไซลาเนส และแมนนาเนส โดยมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 5 ชนิดคือ กากกาแฟ กากชานอ้อย กากถั่วเหลือง กากเนื้อมะพร้าว และเปลือกมันฝรั่งถูกใช้เป็นซับสเตรตสำหรับการผลิตน้ำตาลโอกิโกแซ็กคาไรด์ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบดังกล่าว และทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อย่อยซับสเตรตทั้ง 5 ชนิด จากการวิเคราะห์พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง คือแมนโนส กากชานอ้อย และเปลือกมันฝรั่ง คือกลูโคส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากเนื้อมะพร้าว และกากกาแฟ คือน้ำตาลที่ยังไม่ทราบชนิดแน่ชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Babu และคณะ (2015) มีการระบุลักษณะสัณฐานวิทยาของ *P. menonorum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 14-18 มิลลิเมตร (สูงสุด 20 มิลลิเมตร) เส้นใยมีลักษณะคล้ายไหมเป็นกำมะหยี่ ตรงกลางโคโลนีมีสีฟ้าอ่อนถึงเทาเข้ม รอบข้างโคโลนีเป็นสีขาว และสร้างเม็ดสีชมพูใสตรงกลาง ส่วนด้านหลังโคโลนีเป็นสีเหลืองและมีจุดศูนย์กลางเป็นสีน้ำตาลเหลืองหรือน้ำตาลแดง

Liao และคณะ (2015) มีรายงานว่าพบเอนไซม์ไซลาเนสหลายชนิดที่มีฤทธิ์สูงจากเชื้อรา *P. oxalicum* GZ-2 โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นซับสเตรต

Lin และคณะ (2015) ทำการศึกษา *P. ramulosum* N1 ที่แยกได้จากเนื้อไม้ พบว่า *P. ramulosum* N1 สามารถผลิตไซลาเนส และเซลลูเลส ซึ่งกิจกรรมสูงสุดของไซลาเนส และ carboxymethyl cellulose เกิดขึ้นเมื่อเติมฟางข้าวบาร์เลย์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน มีอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เหมาะสมสำหรับกิจกรรมไซลาเนสคือ 55 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 3.0 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า *P. ramulosum* N1 เป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตไซลาเนสที่ทนต่อกรด และโปรตีเอส ซึ่งเหมาะต่อการทำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมอาหาร

Bittencourt และคณะ (2020) ได้มีการศึกษาคุณบัติทางเคมีของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *P. crustosum* FP 11 พบว่า *P. crustosum* FP 11 สามารถผลิตไซลาเนสได้ 2 ชนิด คือ xylanase I และ xylanase II และนำมาเปรียบเทียบคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์กับไซลาเนสที่ผลิตโดย *Penicillium* สกุลอื่น จากการทดลองพบว่า xylanase II จาก *P. crustosum* FP 11 ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ดีที่สุดอยู่ที่ 5.5

Luong และคณะ (2023) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราที่แยกจากดินของจังหวัดสุพรรณบุรี ประเทศไทย ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ และทำการทดสอบฤทธิ์ของไซลาเนสด้วยวิธีการเชิงคุณภาพ พบว่า *P. menonorum* SP10 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ 2 ชนิด คือ 45 และ 54 kDa

2.2 เอนไซม์ไซลาเนส

ธัญญา (2537) ได้มีการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสที่บริสุทธิ์จาก *Cryptococcus laurentii* โดยทำการทดสอบด้วยวิธี DNS พบว่าเอนไซม์ Xln1 ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส Xln2 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองคือ 4.0

Bajpai (2009) กล่าวว่าไซลาเนสเป็นไฮโดรเลสที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลนที่เป็นส่วนประกอบเซลล์พืช ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีมากเป็นอันดับ 2 ไซลาเนสสามารถผลิตได้จากเชื้อรา แบคทีเรีย ยีสต์ สาหร่ายทะเล โพรโทซัว และอื่นๆ ซึ่งเชื้อราที่มีเส้นใยจะเป็นแหล่งที่ผลิตไซลาเนสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากเป็นหลัก ไซลาเนสมีความสำคัญเป็นอย่างมากในระดับอุตสาหกรรม ทั้งการผลิตอาหารสัตว์ การผลิตขนมปัง อาหารและเครื่องดื่ม สิ่งทอ การฟอกเยื่อเซลลูโลส และการผลิตไซลิทอล

มังกร และคณะ (2560) ได้มีการทดสอบเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Thermobifida fusca* PA 1-1 โดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าไซลาเนสซึ่งยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แสดงค่ากิจกรรมสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 และอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีความเสถียรสูงในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4.0-8.0 และช่วงอุณหภูมิ 40-65 องศาเซลเซียส

อัจฉรา และนพพล (2563) กล่าวว่า ไซลาเนสจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลส (hemicellulases) ชนิดหนึ่งมีหน้าที่ย่อยแกนหลัก (main chain) ของเฮมิเซลลูโลส มีอยู่ 2 ชนิด คือ ชนิด endo-1,4-β (E.C. 3.2.1.8 ชื่อตามระบบคือ β-1,4-xylan xylanohydrolase) เร่งปฏิกิริยาการย่อยแบบสุ่มในสายพอลิเมอร์ของไซแลนที่มีแกนหลักเป็นน้ำตาลไซโลสต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ทำให้ได้ไซโลโอลิโกแซ็คคาไรด์ และชนิด exo-1,4-β (E.C. 3.2.1.37 ชื่อตามระบบคือ β-1,4-xylan xylohydrolase) ซึ่งย่อยโอลิโกแซ็คคาไรด์จากปลายแต่ไม่รีดิวซ์ให้สายสั้นลง และกล่าวว่าเอนไซม์ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่จุลินทรีย์หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยไซแลนที่เป็นสารโมเลกุลใหญ่ ซึ่งจุลินทรีย์ไม่สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้

สำนักพัฒนาเทคโนโลยีเพื่ออุตสาหกรรม (2560) กล่าวว่าเอนไซม์ (Enzyme) คือ กลุ่มของโปรตีนที่มีหน้าที่พิเศษแตกต่างจากโปรตีนอื่นๆ ทั่วไป คือมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง เพื่อใช้ในการสังเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์ และระบบย่อยอาหาร เป็นต้น โดยเอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อสารที่ทำปฏิกิริยาที่เรียกว่า ซับสเตรต (Substrate) และสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นตลอดทั้งเอนไซม์จะเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาได้ คุณสมบัติของเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์มีโครงสร้างทางเคมีเป็นโปรตีน ซึ่งประกอบไปด้วยพอลิเปปไทด์ (Polypeptide) เพียงสายเดียวหรือหลายสายที่ม้วนกันเป็นก้อนกลม มีโครงรูปที่จำเพาะ และถูกกำหนดมาโดยลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน และยังมีเอนไซม์อีกจำนวนมากที่มีสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนรวมอยู่ด้วยจึงทำหน้าที่ได้ เอนไซม์เหล่านี้เรียกว่า โฮโลเอนไซม์ (Holoenzyme) เฉพาะส่วนที่เป็นโปรตีนจะเรียกว่า กลุ่มโพรสทีติก (Prothetic group) ซึ่งอาจจะเป็นไอออนของโลหะเรียกว่า โคแฟกเตอร์ (Cofactor) และถ้าเป็นสารประกอบอินทรีย์จะเรียกว่า โคเอนไซม์ (Coenzyme) นอกจากนี้เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อซับสเตรต หรือสารตั้งต้นที่จะเข้าทำปฏิกิริยาแต่ละชนิด จึงสามารถเร่งปฏิกิริยาใดปฏิกิริยาหนึ่งโดยเฉพาะเท่านั้น และอัตราการทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ อุณหภูมิ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานโดยทั่วไปของเอนไซม์อยู่ในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส หากสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพโครงสร้าง ทำให้เข้าร่วมกับซับสเตรตไม่ได้ และความเป็นกรดเบส ซึ่งโดยทั่วไปเอนไซม์จะทำงานได้ดีในช่วง ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0-7.0 แต่เอนไซม์หลายชนิดจะทำงานได้ดีในสภาพความเป็นกรดเบสแตกต่างออกไป

เอกสารนี้ [illegible] เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Luong และคณะ (2023) ได้มีการทดสอบเอนไซม์ไซลาเนสดำเนินการโดยวิธี DNS เพื่อใช้กำหนดความเข้มข้นของน้ำตาลและจากการทดลองพบว่าไซลาเนสทำงานอย่างเหมาะสมที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่า *P. menonorum* SP10 เป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการเลือกใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

2.3 น้ำตาลไซโลส

น้ำตาล หมายถึง สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต มีความหวาน และให้พลังงานแก่ร่างกาย ทางเคมีสามารถแบ่งออกเป็นสองประเภทใหญ่ คือ โมโนแซคคาร์ไรด์ เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว อย่างเช่น กลูโคส ฟรุตโตส เป็นต้น และโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ต่อกันหลายตัว อย่างเช่น ซูโครส พืชจะสังเคราะห์แสงเพื่อเป็นการสร้างอาหารและหน่วยสุดท้ายของสร้างหรือสังเคราะห์ สารที่ได้คือน้ำตาลกลูโคส (อบเชย วงษ์ทอง และคณะ, 2544)

Chen และคณะ (2017) ได้กล่าวว่า ไซโลสเป็นน้ำตาลเพนโทสชนิดหนึ่งที่มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_5H_{10}O_5$ และเฮมิเซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ของดี-ไซโลสในธรรมชาติ การผลิตไซโลสในอุตสาหกรรมมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ไซโลสมักใช้เป็นสารให้ความหวานในอาหารและเป็นแหล่งของไซลิทอล การใช้ประโยชน์จากไซโลสและเฮมิเซลลูโลสได้รับความสนใจมากขึ้นพร้อมกับการพัฒนาในการใช้ประโยชน์จากชีวมวลที่มีมูลค่าสูง ในฐานะที่เป็นหน่วยน้ำตาลธรรมชาติที่พบได้ทั่วไป การใช้ประโยชน์จากไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมการหมัก กลายเป็นจุดเด่น เทคโนโลยีการหมักไซโลสเพื่อผลิตไซลิทอลมีความก้าวหน้า การหมักอะซิโทน-บิวทานอลจากไซโลสก็เป็นไปได้เช่นกัน การใช้ไซโลสในการผลิตเอทานอลเป็นที่สนใจในระดับโลก ดังนั้น วิกฤติพลังงานและอาหารสามารถแก้ไขได้ หากใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก

Shrotri และคณะ (2017) ได้กล่าวว่า ไซโลสเป็นน้ำตาลที่น่าสนใจที่สุดที่ได้จากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส เพราะสามารถแปรสภาพเป็นเอทานอล เฟอร์ฟูรัล และไซลิทอล ในเชิงพาณิชย์ การไฮโดรไลซ์ไซแลนด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เพื่อผลิตไซโลสทำได้ที่อุณหภูมิ 413–453 เคลวิน เฮมิเซลลูโลสจะถูกละลาย ทำให้การไฮโดรไลซ์ง่ายกว่าเซลลูโลส และซังข้าวโพดถือเป็นแหล่งไซแลนทั่วไปที่มีปริมาณสูง (28%–35%)

Soccol และคณะ (2019) ได้กล่าวว่า การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งสามารถถูกหมักโดยยีสต์หรือแบคทีเรียให้เป็นเอทานอลได้ การไฮโดรไลซิสนี้เป็นปฏิกิริยาหลายขั้นตอนในระบบที่มีความเป็นเนื้อผสม โดยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำจะถูกย่อยผ่านการทำงานร่วมกันของเอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส/เซลโลไบโอไฮโดรเลส จากนั้นจะมีการไฮโดรไลซิสในเฟสของเหลวของผลิตภัณฑ์กลางที่ละลายน้ำได้ เช่น เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์และเซลโลไบโอส ซึ่งจะถูกแยกตัวเป็นกลูโคสโดย β-glucosidase ค่าใช้จ่ายในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการไฮโดรไลซิสด้วยกรดหรือด่าง เนื่องจากปฏิบัติการภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงและไม่ก่อให้เกิดปัญหาการกัดกร่อน ทั้งแบคทีเรียและเชื้อราสามารถผลิตเซลลูเลสเพื่อย่อยลิกโนเซลลูโลสได้

2.4 วิธีการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ และน้ำตาล

Miller (1959) ศึกษาวิธีการหาผลิตผลจากปฏิกิริยาโดยวิธีการตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่าง reducing end ซึ่งเป็น carboxyl group ของแต่ละโมเลกุลของน้ำตาลนั้น ๆ กับสารเคมีซึ่งเป็น oxidizing agent บางตัว เช่น DNS reagent ซึ่งสามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงระหว่าง 5-500 ไมโครกรัม การวิเคราะห์โดยวิธีนี้จะได้ กิจกรรมของทั้งเอนไซม์ไซลาเนสและไซโลซิเดส

Wood และคณะ (2012) กล่าวว่าวิธีการ DNS มักถูกนำมาใช้เพื่อดูความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในชีวมวล hydrolysates ซึ่งเป็นทางเลือกที่ไม่เฉพาะเจาะจงแทนวิธีการเชิงลึก และใช้เวลานาน เช่น GC หรือ HPLC วิธีการนี้ใช้กันอย่างแพร่หลาย เพื่อระบุกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งวิธีการ DNS เกี่ยวข้องกับการผสมรีเอเจนต์กรดไดไนโตรซาลิไซลิกกับตัวอย่าง การให้ความร้อนเพื่อเร่งปฏิกิริยา และการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มองเห็นได้ของผลิตภัณฑ์

ภาวดี (2556) ได้อธิบายเกี่ยวกับ Thin layer chromatography (TLC) ว่า หมายถึง เทคนิคการแยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างสารกับเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เฟสคงที่อาจเป็นของแข็งหรือของเหลวลว ถ้าเป็นของแข็งการแยกจะเป็นแบบดูดซับ (absorption) ถ้าเป็นของเหลวการแยกสารจะเป็นแบบแบ่งละลาย (partition) เฟสเคลื่อนที่อาจจะเป็นของเหลวหรือแก๊ส ทำหน้าที่พาสารแต่ละชนิดในสารผสมให้เคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วแตกต่างกัน จึงทำให้สารแยกออกจากกันได้ TLC เป็น chromatography แบบดูดซับ solid liquid chromatography ของผสมที่ถูกแยกจะถูกดูดซับโดยเฟสคงที่ที่เป็นของแข็ง เฟสคงที่ที่นิยมใช้ คือ silica gel และ alumina ในขณะที่เฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวก็จะพาสารให้เคลื่อนที่ไป เนื่องจากสารที่มีโครงสร้างต่างกันจะได้รับแรงดึง และแรงผลักดันต่างกันด้วย ดังนั้นสารแต่ละชนิดจึงเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน สารที่ถูกดูดซับได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับน้อย จึงทำให้เกิดการแยกของสารขึ้นเป็นแถบๆ เรียกว่า chromatogram เฟสคงที่จะทำหน้าที่ 2 ลักษณะ คือรับโมเลกุลของสารเข้ามาสัมผัสกับตัวมัน เรียกว่าเกิด adsorption และปล่อยให้โมเลกุลของสารเคลื่อนที่ต่อไปเรียกว่าเกิด desorption เฟสคงที่มีหลายชนิด ในการเลือกใช้จึงต้องเลือกให้เหมาะสมกับการที่ต้องการแยกตัวอยู่กับที่ ที่ดีจะต้องไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการแยก และต้องไม่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในขบวนการ chromatography มีหลายชนิด ซึ่งเรียงลำดับความเป็นขั้วจากต่ำไปหาสูง ดังนี้ เฮกเซน คาร์บอนเตตราคลอไรด์ เบนซีน อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตต อะซีโตนเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และน้ำ ในบางกรณีเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้มีความเป็นขั้วไม่พอ และเฟสคงที่มีความขั้วสูงกว่า ไม่ก็มีความเป็นขั้วมากเกินไป จึงไม่สามารถจะใช้ตัวเคลื่อนที่ชนิดเดียวได้ จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายผสม เพื่อที่จะได้ตัวทำละลายที่เหมาะสม เดิม TLC ใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพสำหรับสารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณน้อย เพื่อหาจำนวนสารที่อยู่ในสารผสม และใช้พิสูจน์สารโดยเปรียบเทียบ R_f ของสารกับสารแท้ (authentic sample) และยังใช้สำหรับหาตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารผสมที่มีปริมาณมาก โดยวิธี column chromatography ในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นภาคเคลื่อนที่ อาจเป็นตัวละลายเดี่ยวหรือเป็นตัวทำละลายผสม การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมควรทำอย่างมีระบบ ดังนี้ จุดสารตัวอย่างที่เป็น สารผสมลงแผ่น TLC หลายๆแผ่น เลือกตัวทำละลายหลายๆ ระบบ เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซิน อีเทอร์ และเมทานอล ตามลำดับ แล้ววางแผ่น TLC ที่ดูดสารตัวอย่างแล้วลงในตัวทำละลายแต่ละชนิดๆละ 1 แผ่น หาค่า R_f ของแต่ละแผ่นในตัวทำละลายที่ต่างกัน เลือกตัวทำละลายที่สามารถให้ผลการแยกที่ชัดเจน ค่า R_f เป็นค่าประจำตัวของสารประกอบภายใต้สภาวะต่างๆ (ตัวดูดซับ ตัวทำละลาย และความหนาของชั้นตัวดูดซับ) ที่กำหนด ประโยชน์ของ TLC คือใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยเปรียบเทียบค่า R_f ของสารตัวอย่างกับสารแท้ (authentic sample) เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสารตัวเดียวกัน ในงานวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์สาร ถ้าต้องการพิสูจน์ว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดปฏิกิริยาเป็นสารที่ต้องการหรือไม่ ให้หาสารตัวเดียวกันนี้ที่ได้จากปฏิกิริยาอื่นมาจุดบนแผ่น TLC เทียบกับสารที่เกิดปฏิกิริยาก็จะทราบว่าปฏิกิริยาที่วางแผ่นไว้ได้ผลตามที่ต้องการหรือไม่ เป็นวิธีตรวจสอบผลขั้นต้นที่รวดเร็วกว่าวิธีอื่น TLC ยังสามารถใช้ในการตรวจสอบความก้าวหน้าของปฏิกิริยา โดยใช้วิธีการหาค่า R_f ของสารตั้งต้น ผลิตภัณฑ์ เมื่อเวลาผ่านไปสารตั้งต้นย่อมมีปริมาณน้อยลง ส่วนผลิตภัณฑ์ย่อมมีมากขึ้น เราสามารถใช้ TLC ตรวจสอบระยะเวลาที่ปฏิกิริยาเกิดจนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ นอกจากนี้ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่าง สารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ย่อมให้จุดเพียงจุดเดียวบนแผ่น TLC ในทุกระบบตัวทำละลาย และใช้หาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารผสมโดย column chromatography

ชุลินารถ และกัลยา (2558) ได้อธิบายการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS ว่าการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีการ DNS จะอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์กับสารละลาย Dinitrosalicylic reagent ซึ่งสารละลาย Dinitrosalicylic reagent มีหมู่ไนโตร 2 หมู่ มีลักษณะสีเหลือง เมื่อหมู่ไนโตร 1 หมู่ถูกรีดิวซ์โดยหมู่แอลดีไฮด์ของน้ำตาล โดยมีความร้อนและสารละลายด่างเป็นตัวเร่งจะทำให้สารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid กลายเป็น 3-amino, 5-nitrosalicylic acid ที่มีสีส้มแดง และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในช่วง 520-540 นาโนเมตร วิธีนี้เหมาะกับตัวอย่างที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ปริมาณต่ำ ซึ่งในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร มักจะสร้างกราฟมาตรฐาน โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน เพื่อให้หาค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างชนิดเดียวกัน โดยการนำสารละลายตัวอย่างนั้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันแล้วนำค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ได้ไปเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

Lomthong และคณะ (2021) อธิบายการระบุน้ำตาลของ hydrolysate สามารถระบุได้โดยวิธี TLC โดยใช้ Silica Gel 60 TLC พบ hydrolysate หนึ่งไมโครลิตรบนเพลต TLC จากนั้นได้รับการพัฒนาโดยระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย ethyl acetate: n-propanol: acetic acid: น้ำ (4:2:2:1 ปริมาตร/ปริมาตร) พ่นแผ่น TLC ด้วยรีเอเจนต์ที่ประกอบด้วย 0.5% a-naphthol และ 5% sulfuric acid ใน absolute ethanal จากนั้นให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที มาตรฐานน้ำตาลซึ่งรวมถึงกลูโคส ไซโลส และซูโครส (10 มก./มล.) จัดทำขึ้นเพื่อระบุส่วนประกอบของน้ำตาลใน hydrolysate sulfuric acid ใน absolute ethanal จากนั้นให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีมาตรฐานน้ำตาลซึ่งรวมถึงกลูโคส ไซโลส และซูโครส (10 มก./มล.) จัดทำขึ้นเพื่อระบุส่วนประกอบของน้ำตาลใน hydrolysate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.1.2 อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum foil)

3.1.3 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

3.1.4 เครื่องชั่งสาร (Balance)

3.1.5 บีกเกอร์ (Beaker)

3.1.6 หลอดเซนติฟิว (Centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร

3.1.7 หลอดพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร

3.1.8 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.1.9 ขวดดูแรน (Duran) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.1.10 หลอดไมโครทิวป์ (Microtube)

3.1.11 แท่งแก้วคนสาร (Glass Rod)

3.1.12 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.1.13 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

3.1.15 ไมโครปิเปต (Micro pipette)

3.1.16 ไมโครปิเปตทิป (Micro pipette tip)

3.1.1.7 ไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader)

3.1.18 ถุงพลาสติกทนความร้อน (Polypropylene bag)

3.1.19 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.1.20 กล่องเก็บหลอดไมโครทิวป์ (Storage box)

3.1.21 หลอดฉีดยา (Syringe)

3.1.22 เครื่องควบคุมอุณหภูมิและเขย่าสำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก (Thermomixer)

3.1.23 96 well plate

3.1.24 ขวดแก้วขนาด 120 มิลลิลิตร

3.1.25 จานเพาะเชื้อ (Plate)

3.1.26 เครื่องเขย่าสาร (vortex)

3.1.27 เครื่องบดแห้ง

3.1.28 หลอดทดลองพลาสติก ขนาด 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.29 ตู้ดูดควัน

3.1.30 Hot plate

3.1.31 โถแก้วดูดความชื้น (Desiccator)

3.2 สารเคมี

3.2.1 a-naphthol reagent

3.2.2 Acetic acid

3.2.3 วุ้น (Agar)

3.2.4 แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (Alcohol 95%)

3.2.5 แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (Alcohol 70%)

3.2.6 Ammonium Sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)

3.2.7 Calcium Chloride Di-hydrate ($CaCl_2.2H_2O$)

3.2.8 Cobalt (II) Chloride 6-Hydrate ($CoCl_2.6H_2O$)

3.2.9 Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)

3.2.10 Dinitrosalicylic acid

3.2.11 Ethyl acetate

3.2.12 Ferrous Sulfate Heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$)

3.2.13 กลูโคส (Glucose)

3.2.14 Hydrochloric acid (HCl)

3.2.15 Magnesium Sulphate 7-Hydrate ($MnSO_4.7H_2O$)

3.2.16 Magnesium Sulphate Heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)

3.2.17 N-propanol

3.2.18 Peptone

3.2.19 Potassium Di-hydrogen Phosphate (KH_2PO_4)

3.2.20 Potassium sodium tartrate (Na-K-tartrate)

3.2.21 Sodium Hydroxide (NaOH)

3.2.22 Sodium phosphate monobasic monohydrate ($NaH_2PO_4.H_2O$)

3.2.23 Sulfuric acid

3.2.24 Tween-80

3.2.25 Xylan

3.2.26 Xylose

3.2.27 Zinc Sulphate 7-Hydrate ($ZnSO_4.7H_2O$)

3.2.28 น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ซับสเตรต

เปลือกและกากผลไม้ 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกส้ม เปลือกมะนาว เปลือกแตงโม เปลือกเสาวรส และซังข้าวโพด ได้รับความอนุเคราะห์จากร้านน้ำผลไม้และร้านขายของทอด คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4 เชื้อราที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อรา *Penicillium menonorum* SP10 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ได้มีการทดสอบฤทธิ์ของไซลาเนสด้วยวิธีเชิงคุณภาพ พบว่าให้ฤทธิ์ทางไซลาเนสสูง (Luong et al., 2023)

3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อรา

3.5.1 นำหลอดพลาสติกขนาด 5 มิลลิเมตร ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วเจาะลงบนไมซีเลียมของ *P. menonorum* SP10 และนำไปวางลงบนอาหาร PDA ที่เตรียมดังภาคผนวก ก. ข้อที่ 1

3.5.2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.5.3 แบ่งเชื้อราไว้เป็น stock culture สำหรับการบ่ม (inoculation)

3.6 การเตรียมซับสเตรต

3.6.1 นำเปลือกและกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิด ซึ่งเปลือกส้มและเปลือกมะนาวนั้นนำเอาเส้นใยสีขาวออก เปลือกแตงโมนำมาใช้เพียงส่วนเปลือกภายนอกสีเขียวและสีขาวด้านใน ทำการตัดส่วนสีเนื้อสีแดงออก เปลือกเสาวรสทำการเอาเยื่อภายในออก ใช้เพียงเปลือก และซังข้าวโพดนำทั้งแกนที่มีส่วนเมล็ดติดเป็นบางส่วนมาใช้ โดยมาล้างทำความสะอาด และทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อลดความชื้นป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อรา

3.6.2 นำไปบดหยาบโดยใช้เครื่องบดแห้ง และบดละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นให้ละเอียด จากนั้นทำการร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.45 มิลลิเมตร

3.6.3 นำซับสเตรตที่แปรสภาพแล้วใส่ลงในขวดแก้ว ขนาด 120 มิลลิลิตร ซับสเตรตละ 12 ขวด เนื่องจากมีการบ่ม 4 ช่วงเวลาคือ 7, 14, 21 และ 28 วัน เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *P. menonorum* SP10 แต่ละช่วงเวลาทำการทดลอง 3 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 60 ขวด จากนั้นนำซับสเตรตใส่ขวดแก้วขนาด 120 มิลลิลิตร ขวดละ 3 กรัม ผสมกับสารประกอบที่เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อที่ 6

3.6.4 นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อราในขวดแก้ว

3.7.1 นำหลอดพลาสติกขนาด 5 มิลลิเมตร ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วเจาะลงบนไมซีเลียมของ *P. menonorum* 3 ชิ้นวุ้น ใส่ลงในขวดแก้วที่ทำการเตรียมไว้ในข้อ 3.6

3.7.2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

3.8 วิธีการสกัดเอนไซม์สำหรับใช้ทดสอบเอนไซม์ไซลาเนส

3.8.1 หลังจากบ่มครบทุกวันที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน นำน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ผสมลงในแต่ละขวด

3.8.2 เก็บส่วนที่เป็นสารละลาย 2 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ 7000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ส่วนใสที่ได้คือ เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ (Crude enzyme) (ธัญญา, 2537)

3.8.3 เก็บสารละลายส่วนใสหรือ เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบเอนไซม์

3.9 การทดสอบเอนไซม์ไซลาเนส

3.9.1 ดำเนินการโดยวิธี DNS เพื่อใช้กำหนดความเข้มข้นของน้ำตาล (Miller, 1959) เริ่มจากใช้ไมโครปิเปตดูดเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ จากข้อที่ 3.8.3 ลงในหลอดไมโครทิวป์ 50 ไมโครลิตร และวางลงบนเครื่อง Thermomixer ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

3.9.2 ใส่ไซแลนที่เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อที่ 4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.9.3 ใส่ DNS ที่เตรียมดังภาคผนวก ก. ข้อที่ 3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ให้สามารถวัดปริมาณน้ำตาลได้ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นทันที

3.9.4 นำสารละลายหลังจากทำให้เย็นในข้อที่ 3.9.3 ปริมาตร 40 ไมโครลิตรลงใน 96 well plate ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 160 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (Luong และคณะ, 2023) ทำการเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสกับค่าดูดกลืนแสง และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ตามภาคผนวก ข. ข้อที่ 1

3.10 การเตรียมเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตน้ำตาล

หลังจากการทดสอบการผลิตเอนไซม์ ทำให้ทราบว่าซังข้าวโพดเป็นซับสเตรตที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์จึงนำมาใช้เป็นซับสเตรตในการผลิตน้ำตาล

3.10.1 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. menonorum* ตามข้อที่ 3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10.2 นำซังข้าวโพดขนาด 0.45 มิลลิเมตร ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 120 มิลลิลิตร ขวดละ 3 กรัม เป็นจำนวน 24 ขวด

3.10.3 ทำการบ่มโดยดำเนินวิธีการตามข้อที่ 3.7.1 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.10.4 หลังจากบ่มครบ 7 วัน นำน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ผสมลงในแต่ละขวดให้เข้ากัน จากนั้นนำทั้งหมด 24 ขวดเทรวมกัน และกรองผ่านผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (ธัญญา, 2537)

3.10.5 เก็บสารละลายส่วนใสหรือ เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.11 การผลิตน้ำตาล

นำเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ ในข้อที่ 3.10.5 มาหาสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตน้ำตาลโดยแบ่งเป็น 4 ปัจจัย คือ ปริมาณซับสเตรต ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม และระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม

3.11.1 การหาปริมาณซับสเตรตที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาล

1. หาปริมาณซังข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาล โดยการนำซังข้าวโพดใส่ลงในแต่ละหลอดทดลองพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร ปริมาณ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัม ปริมาณละ 4 หลอด จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ ด้วย NaOH และ HCl เป็นค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 และใส่เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบลงแต่ละหลอดทดลองพลาสติก หลอดละ 5 มิลลิลิตร (Gao และคณะ, 2023) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยหลอดที่ 1 ของทุกปริมาณซับสเตรตจะเป็น negative control (เอนไซม์ที่เสียสภาพโดยการต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส)

2. หลังจากบ่มครบ 24 ชั่วโมง ถ่ายรูปดูความขุ่น และนำไปเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าสาร จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ใส่ลงหลอดไมโครทิวป์ และวางลงบนเครื่อง Thermomixer ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใส 800 ไมโครลิตรลงหลอดไมโครทิวป์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3. นำสารละลายในข้อที่ 2 มาวัดปริมาณน้ำตาลโดยวิธีการ DNS (Wood และคณะ, 2012) เริ่มจากการใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่าง 9 ไมโครลิตร ลงหลอดไมโครทิวป์ จากนั้นใส่ DNS ปริมาตร 171 ไมโครลิตร ทำการเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าสาร และวางลงบนเครื่อง Thermomixer ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำให้เย็นทันที จากนั้นนำ 90 ไมโครลิตรลง 96 well plate ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ทำการเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสง และคำนวณหาปริมาณน้ำตาลตามภาคผนวก ข. ข้อที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11.2 การหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาล

1. หลังจากที่ทราบปริมาณซับสเตรตที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาล คือ 0.4 กรัม นำ 0.4 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 24 หลอด

2. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ ด้วย NaOH และ HCl เป็น ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0

3. ใส่เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบที่ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างแล้ว 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวนค่าความเป็นกรด-ด่างละ 4 หลอดตามลำดับ โดยหลอดที่ 1 ของทุกค่าความเป็นกรด-ด่าง จะเป็น negative control (เอนไซม์ที่เสียสภาพโดยการต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส)

4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และดำเนินการตามข้อที่ 3.11.1 (ข้อ2 และ 3)

3.11.3 การหาอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาล

1.หลังจากที่ทราบค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาล คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 นำซังข้าวโพด 0.4 กรัมใส่ลงในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 24 หลอด

2. ใส่เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.0 ลงในหลอดทดลองพลาสติก หลอดละ 5 มิลลิลิตร

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40, 45, 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส อุณหภูมิละ 4 หลอด ตามลำดับ โดยหลอดที่ 1 ของทุกอุณหภูมิจะเป็น negative control (เอนไซม์ที่เสียสภาพโดยการต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และดำเนินการตามข้อที่ 3.11.1 (ข้อ2 และ 3)

3.11.4 การหาระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาล

1. หลังจากที่ทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาล คือ 55 องศาเซลเซียส นำซังข้าวโพด 0.4 กรัมใส่ลงในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร เป็นจำนวน 20 หลอด

2. ใส่เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบที่ปรับเป็น ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 ลงในหลอดทดลองพลาสติก หลอดละ 5 มิลลิลิตร

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่งโมง เวลาละ 4 หลอด โดยหลอดที่ 1 ของทุกเวลาจะเป็น negative control (เอนไซม์ที่เสียสภาพโดยการต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) และดำเนินการตามข้อที่ 3.11.1 (ข้อ2 และ 3)

3.12 การตรวจสอบส่วนประกอบของน้ำตาลด้วยวิธีการ TLC Lomthong และคณะ (2021)

3.12.1 นำสารละลายตัวอย่างที่ทราบสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตน้ำตาลในข้อที่ 3.11.4 ซังข้าวโพดที่เตรียมดังภาคผนวก ก. ข้อที่ 7 และเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบจากข้อที่ 3.10.5 หยด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 ไมโครลิตร บนตำแหน่ง TLC ระยะห่างจุดจากสารมาตรฐาน (กลูโคส เตรียมดังภาคผนวก ก. ข้อที่ 5 และไซโลส เตรียมดังภาคผนวก ก. ข้อที่ 4) จุดละ 1 เซนติเมตร เป่าจุดที่หยดให้แห้งด้วยเครื่องเป่าผม

3.13.2 ใส่ตัวทำละลาย ที่เตรียมดังภาคผนวก ก. ข้อที่ 8 ลงในบีกเกอร์ จากนั้นวางบีกเกอร์ไว้ในเดซิเคเตอร์ที่อยู่ในตู้ดูดควัน เป็นเวลา 30 นาทีก่อนใช้งาน

3.13.3 วางแผ่น TLC ลงในบีกเกอร์ที่มีตัวทำละลาย และปล่อยให้ตัวทำละลายมีความสูง 9 เซนติเมตร ระยะเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

3.13.4 นำแผ่น TLC ออกมาทำให้แห้งเพื่อขจัดตัวทำละลาย

3.13.5 ฉีดสเปรย์ naphthol reagent ที่ประกอบด้วย a-naphthol 0.5% และ sulfuric acid 0.5% ในเอทานอล (Kango, 2008) และทำให้แห้งด้วยเครื่องเป่าผม

3.13.6 อ่านผลบนแผ่น TLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

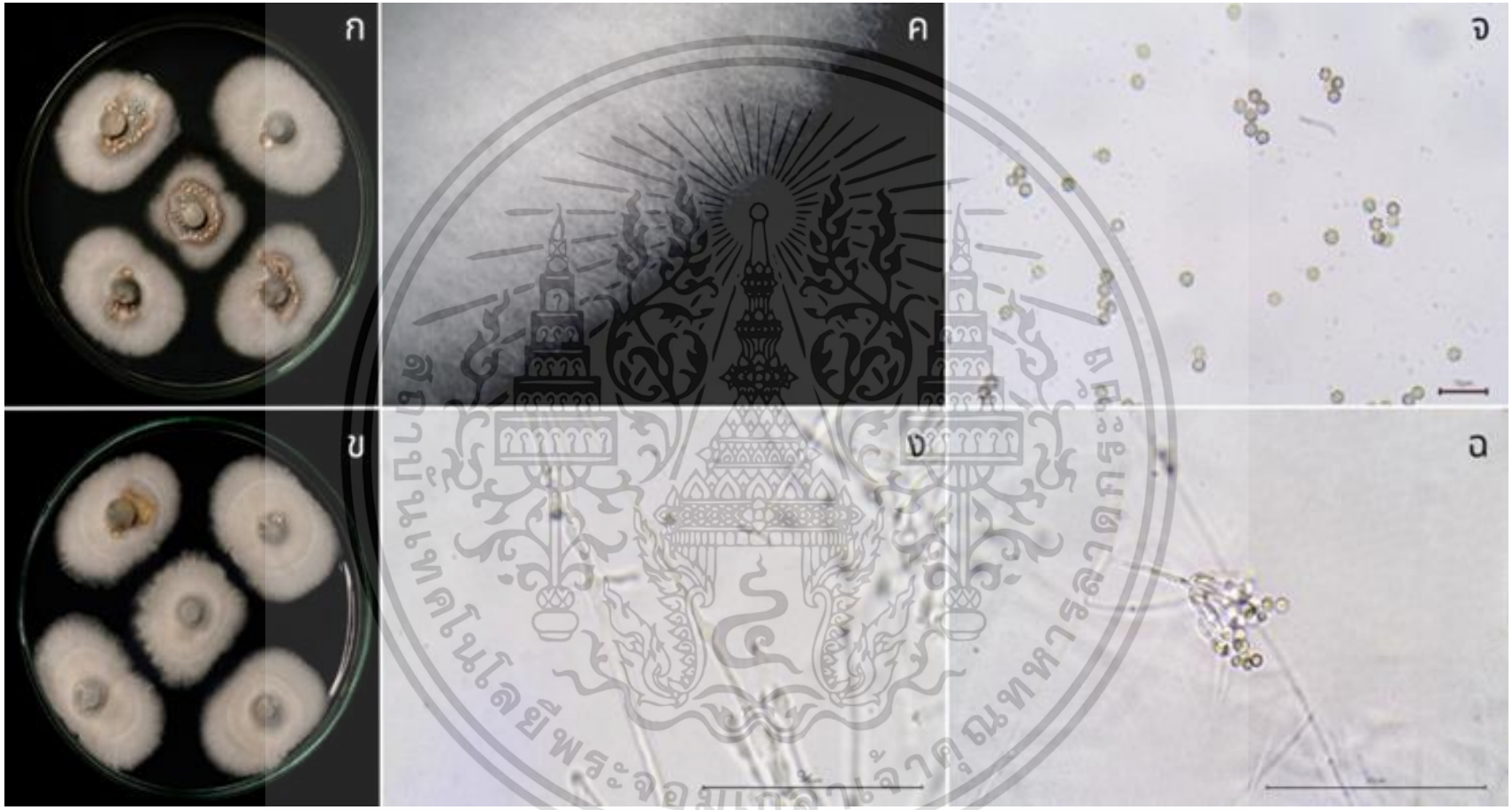
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการตรวจสอบการผลิตน้ำตาลจากการย่อยเปลือกและกากผลไม้เหลือทิ้งด้วยเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบที่ผลิตจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10

จากการนำเปลือกและกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกส้ม เปลือกมะนาว เปลือกแตงโม เปลือกเสาวรส และซังข้าวโพด มาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ในสภาวะที่ใช้ปริมาณซับสเตรตของแต่ละชนิดที่ 3 กรัม มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 6.0 อุณหภูมิในการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส และใช้ช่วงระยะเวลาการบ่มทั้งหมด 4 ช่วงเวลา คือ 7, 14, 21 และ 28 วัน ซึ่งแต่ละช่วงเวลาได้ทำการย่อยเปลือกและกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิด 3 ซ้ำ ผลการวิจัยพบว่าเปลือกและกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิดได้มีการสร้างน้ำตาลขึ้น ซึ่งสังเกตได้โดยลักษณะการเจริญของเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ทั้งจากบน PDA (รูปที่ 4.1) ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยฟูมีลักษณะคล้ายไหมเป็นกำมะหยี่สีขาว ตรงกลางโคโลนีมีสีเขียวอ่อนถึงเทาเข้ม รอบข้างโคโลนีเป็นสีแดง ส่วนด้านหลังโคโลนีเป็นสีเหลืองและมีจุดศูนย์กลางเป็นสีเทาปนน้ำตาลเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานผลการจำแนกเชื้อรา *P. menonorum* ของ Babu และคณะ (2015) ที่กล่าวว่า “ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *P. menonorum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) นั้น เส้นใยมีลักษณะคล้ายไหมเป็นกำมะหยี่ ตรงกลางโคโลนีมีสีฟ้าอ่อนถึงเทาเข้ม รอบข้างโคโลนีเป็นสีขาว และสร้างเม็ดสีชมพูใสตรงกลาง ส่วนด้านหลังโคโลนีเป็นสีเหลืองและมีจุดศูนย์กลางเป็นสีน้ำตาลเหลืองหรือน้ำตาลแดง”และยังคล้ายคลึงกับการรายงานของ Peterson และคณะ (2011) ที่กล่าวว่า “ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *P. menonorum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek yeast autolysate agar (CYA) เส้นใยมีลักษณะเนียนคล้ายไหม ตรงกลางโคโลนีมีสีเทาอมฟ้า รอบข้างโคโลนีเป็นสีขาว ด้านหลังโคโลนีเป็นสีน้ำตาลอมเหลือง” และเมื่อนำมาตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นเส้นใยแบบมีเยื่อกั้น สร้างก้านชูสปอร์ (Conidiophores) โป่งเป็น Vesiecle ส่วนปลายก้าน Conidiophores แตกแขนงเป็น Phialide เกิดสปอร์ที่มีรูปร่างกลม เซลล์เดียว และสังเกตลักษณะที่เจริญในขวดของเปลือกและกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิดในทุกช่วงเวลา พบว่าเชื้อราสร้างเส้นใยสีขาว เจริญฟูจากผิวหน้าของ ซับสเตรตทั้ง 5 ชนิด (รูปที่ 4.2) โดย ซับสเตรตจากเปลือกส้มมีเส้นใยเจริญฟูเพิ่มขึ้นจากวันที่ 7 ถึงวันที่ 21 และเจริญลดลงในวันที่ 28 เปลือกมะนาวมีการเจริญเพิ่มขึ้นจากวันที่ 7 ถึงวันที่ 14 และเจริญลดลงเรื่อย ๆตั้งแต่วันที่ 21 เปลือกเสาวรสมีการเจริญเพิ่มขึ้นจากวันที่ 7 จนถึงวันที่ 28 เปลือกแตงโมมีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 7 และเจริญลดลงเรื่อย ๆตั้งแต่วันที่ 14 และซังข้าวโพดมีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 7 และเจริญลดลงเรื่อย ๆตั้งแต่วันที่ 14 เช่นเดียวกับเปลือกแตงโม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ลักษณะสัญฐานวิทยาภายนอกของเชื้อรา *P. menonorum* SP10 (ก) การเจริญบนผิวหน้าอาหาร PDA ของเชื้อรา *P. menonorum* SP10 (ข) การเจริญด้านหลังอาหาร PDA ของเชื้อรา *P. menonorum* SP10 (ค) เส้นใยภายใต้กล้อง Stereo (ง) ลักษณะเส้นใย (จ) ลักษณะสปอร์ (ฉ) ลักษณะ Conidiophores, Phialides และ Conidia

รูปที่ 4.2 การเจริญบนผิวหน้า ซับสเตรตของเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ในอาหารทั้ง 5 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

และจากการตรวจวัดด้วยวิธี DNS โดยใช้ไซโลส เป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส แสดงค่าดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.3 โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ที่ถูกปล่อยออกมาสามารถหาได้จากการคำนวณตามสูตรดังนี้

$$U/g = \frac{mg \times 1000}{MW \times Time \times Ve} \times \frac{V \text{ of enzyme extract}}{g \text{ of substrate}}$$

หมายเหตุ : U/g (ยูนิต/กรัม) = ปริมาณไซโลสที่ปล่อยออกมาในไมโครโมลในช่วงหนึ่งเวลา

mg = ปริมาณของน้ำตาลไซโลสจากกราฟไซโลสมาตรฐานหน่วยมิลลิโมล

MW = น้ำหนักมวลโมเลกุลของไซโลส (150 กรัม/โมล)

Time = เวลา (30นาที)

Ve = ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (0.05 มิลลิลิตร)

V of enzyme extract = ปริมาณของสารสกัดเอนไซม์ (30 มิลลิลิตร)

g of substrate = ปริมาณของ ซับสเตรต (3 กรัม)

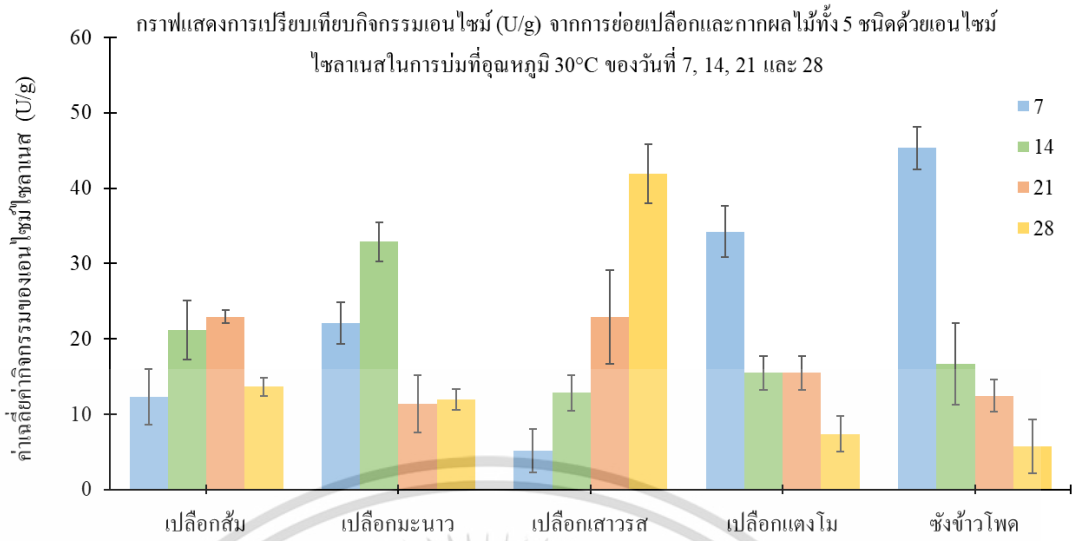
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ที่ปล่อยออกมา (ยูนิต/กรัม) จากการย่อยเปลือกและกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิดด้วยเอนไซม์ไซลาเนสในการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของวันที่ 7, 14, 21 และ 28

ซับสเตรต	วันที่	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิต/กรัม)
เปลือกส้ม	7	12.28 ± 3.71
	14	21.18 ± 3.90
	21	22.94 ± 0.87
	28	13.66 ± 1.2
เปลือกมะนาว	7	22.11 ± 2.73
	14	32.87 ± 2.54
	21	11.40 ± 3.80
	28	12.00 ± 1.39
เปลือกเสาวรส	7	5.14 ± 2.89
	14	12.86 ± 2.35
	21	22.88 ± 6.26
	28	41.91 ± 3.97
เปลือกแตงโม	7	34.24 ± 3.41
	14	15.48 ± 2.21
	21	15.48 ± 2.21
	28	7.39 ± 2.32
ซังข้าวโพด	7	45.35 ± 2.82
	14	16.67 ± 5.42
	21	12.46 ± 2.14
	28	5.72 ± 3.60

หมายเหตุ :เครื่องหมาย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิต/กรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต/กรัม) จากการย่อยเปลือกและกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิดด้วยเอนไซม์ไซลาเนสในการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของวันที่ 7, 14, 21 และ 28

พบว่า ในวันที่ 7 การใช้ซังข้าวโพดเป็นซับสเตรตมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมากที่สุดอยู่ที่ 45.35±2.82 ยูนิต/กรัม ต่อมาคือ เปลือกแตงโม 34.24±3.41 ยูนิต/กรัม เปลือกมะนาว 22.11±2.73 ยูนิต/กรัม เปลือกส้ม 12.28±3.71 ยูนิต/กรัม และเปลือกเสาวรส 5.14±2.89 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 14 การใช้เปลือกมะนาวเป็นซับสเตรตมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมากที่สุดอยู่ที่ 32.87±2.54 ยูนิต/กรัม ต่อมาคือ เปลือกส้ม 21.18±3.90 ยูนิต/กรัม ซังข้าวโพด 16.67±5.42 ยูนิต/กรัม เปลือกแตงโม 15.48±2.21 ยูนิต/กรัม และเปลือกเสาวรส 12.86±2.35 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 21 การใช้เปลือกส้มเป็นซับสเตรตมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมากที่สุดอยู่ที่ 22.94±0.81 ยูนิต/กรัม ต่อมาคือ เปลือกเสาวรส 22.88±6.26 ยูนิต/กรัม เปลือกแตงโม 15.48±2.21 ยูนิต/กรัม ซังข้าวโพด 12.46±2.14 ยูนิต/กรัม และ เปลือกมะนาว 11.40±3.80 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ และในวันที่ 28 การใช้เปลือกเสาวรสเป็นซับสเตรตมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมากที่สุดอยู่ที่ 41.91±3.97 ยูนิต/กรัม ต่อมาคือ เปลือกส้ม 13.66±1.21 ยูนิต/กรัม เปลือกมะนาว 12.00±1.39 ยูนิต/กรัม เปลือกแตงโม 7.39±2.32 ยูนิต/กรัม และซังข้าวโพด 5.72±3.60 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ

4.2 ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาล

จากผลการตรวจสอบการผลิตน้ำตาลจากการย่อยเปลือกและกากผลไม้เหลือทิ้งด้วยเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบที่ผลิตจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ด้วยเปลือกและกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกส้ม เปลือกมะนาว เปลือกแตงโม เปลือกเสาวรส และซังข้าวโพด มาทำการย่อยด้วยเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซลาเนสที่ได้จากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ในสภาวะที่ใช้ปริมาณซับสเตรตของแต่ละชนิดที่ 3 กรัม มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 6.0 อุณหภูมิในการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส และใช้ช่วงระยะเวลาการบ่มทั้งหมด 4 ช่วงเวลา คือ 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่า การนำซังข้าวโพดมาใช้เป็นซับสเตรต มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sunkar และคณะ (2020) ที่ได้รายงานว่า “ซังข้าวโพดมีองค์ประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส อีกทั้งยังมีลิกนิน ซึ่งเป็นซับสเตรตที่เหมาะสำหรับการนำมาใช้เป็นตัวชักนำในการผลิตไซลาเนส” ดังนั้นจึงได้นำซังข้าวโพดมาเป็นซับสเตรตในการย่อยเพื่อผลิตน้ำตาลและทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาล ได้แก่ ปริมาณซับสเตรต ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิการบ่มและระยะเวลาในการบ่ม โดยตรวจวัดด้วยวิธี DNS และใช้กลูโคสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐานเพื่อหาค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาล โดยปริมาณน้ำตาลสามารถหาได้จากการคำนวณตามสูตรดังนี้

$$mg/ml = \frac{((\mathbf{O.D.sample - O.D.control}) + \mathbf{0.0329})\mathbf{x\ Dilution\ factor}}{\mathbf{0.1007}}$$

หมายเหตุ : mg/ml (มก./มล.)= ปริมาณน้ำตาล

O.D.sample = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

O.D.control = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

Dilution factor = ปริมาณเท่าของความเจือจาง

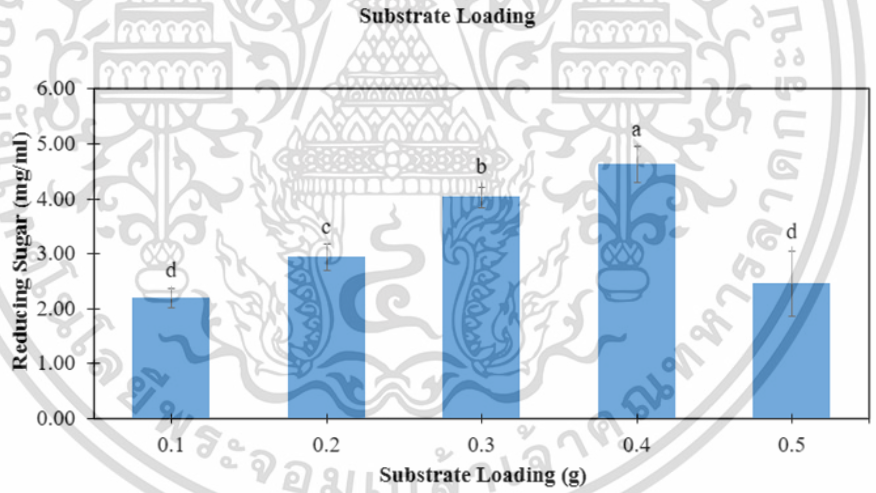
จากผลการทดสอบปริมาณซับสเตรตที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาล การวิจัยนี้ได้ทำการเลือกปริมาณซังข้าวโพดมาทดสอบ 5 ค่า คือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัม ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6 ทำการบ่มที่อุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำ 3 ซ้ำ ตรวจวัดด้วยวิธี DNS และใช้กลูโคสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อหาค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาล แสดงผลลัพธ์ดังตารางที่ 4.2 พบว่าปริมาณของซับสเตรตที่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัม มีปริมาณค่าเฉลี่ยการผลิตน้ำตาลอยู่ที่ 2.19±0.17, 2.93±0.22, 4.03±0.19, 4.62±0.33 และ 2.45±0.59 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของซับสเตรตที่ 0.4 มีปริมาณค่าเฉลี่ยการผลิตน้ำตาลได้มากที่สุด (รูปที่ 4.4) สอดคล้องกับคำกล่าวของ Khanahmadi และคณะ (2018) ว่า “พื้นที่ผิวขนาดใหญ่ จะเพิ่มการถ่ายโอนออกซิเจนและสารอาหารของเชื้อราเพื่อการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นและการผลิตไซลาเนสได้สูงขึ้น” แต่ปริมาณของซับสเตรตที่ 0.5 มีปริมาณค่าเฉลี่ยการผลิตน้ำตาลลดลง เนื่องจากปริมาณของซับเตรตที่มากเกินไปไม่เหมาะสมกับปริมาณของสารสกัดเอนไซม์ ทำให้เกิดความหนืด ซึ่งยากต่อการถ่ายเทมวลสาร (Shiva et al., 2023) ทำให้การถ่ายโอนออกซิเจนและสารอาหารของเชื้อราเพื่อการเจริญเติบโตและการผลิตไซลาเนสนั้นลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล (มก./มล.) ในแต่ละปริมาณ ซับสเตรตของซังข้าวโพด (กรัม) ที่ถูกย่อยด้วยไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6 อุณหภูมิการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ปริมาณซังข้าวโพด (กรัม)	ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล(มก./มล.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0.1	2.19^{d}	0.17
0.2	2.98^{c}	0.22
0.3	4.03^{b}	0.19
0.4	4.62^{a}	0.33
0.5	2.45^{d}	0.59

หมายเหตุ :ตัวอักษร a-d ในตารางแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) $p<0.05$



รูปที่ 4.4 การเปรียบเทียบปริมาณซังข้าวโพดในการใช้เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 เพื่อผลิตน้ำตาลไซโลส (มก./มล.) ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 อุณหภูมิการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากผลการทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาล การวิจัยนี้ได้ทำการเลือกมาทดสอบ 6 ค่า คือ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ทำการบ่มโดยใช้ปริมาณซังข้าวโพดอยู่ที่ 0.4 กรัม อุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำ 3 ซ้ำ และตรวจวัดด้วยวิธี DNS และใช้กลูโคสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อหาค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาล แสดงผลลัพธ์ดังตารางที่ 4.3 พบว่ามีปริมาณค่าเฉลี่ยการผลิตน้ำตาลอยู่ที่ 3.18±0.20, 4.44±0.71,

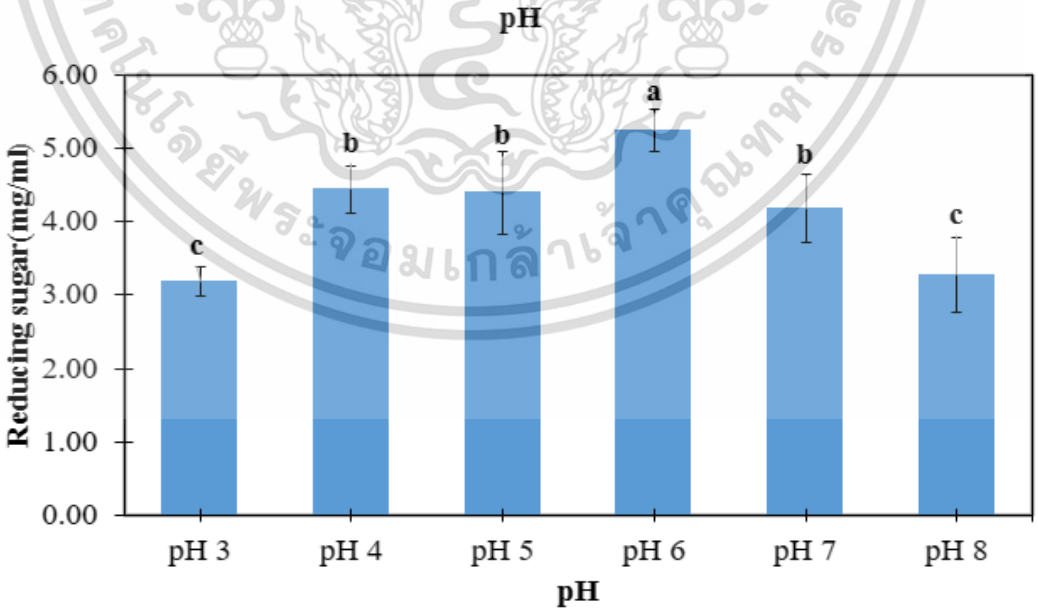
เอกสารนี้ถูกสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.39±0.56, 5.25±0.29, 4.18±0.46 และ 3.28±0.52 มก./มล. ตามลำดับ (รูปที่4.5) สอดคล้องกับ Dhaver และคณะ (2022) ที่กล่าวว่า “ไซลาเนสจากเชื้อรามีประสิทธิภาพในช่วง ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4.0–6.0” และงานวิจัยของ Luong และคณะ (2023) ที่มีการรายงานว่า “เชื้อรา *P. menonorum* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่สุดที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0”

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล (มก./มล.) ในแต่ละค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ย่อยซังข้าวโพดปริมาณ 0.4 กรัม ด้วยไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 อุณหภูมิการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล (มก./มล.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
pH 3	3.18^{e}	0.20
pH 4	4.44^{b}	0.71
pH 5	4.39^{b}	0.56
pH 6	5.25^{a}	0.29
pH 7	4.18^{b}	0.46
pH 8	3.28^{c}	0.52

หมายเหตุ :ตัวอักษร a-c ในตารางแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (DMRT) $p<0.05$



รูปที่ 4.5 การเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างในการใช้เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 เพื่อผลิตน้ำตาลไซโลส (มก./มล.) โดยใช้ปริมาณซังข้าวโพด 0.4 กรัม อุณหภูมิการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

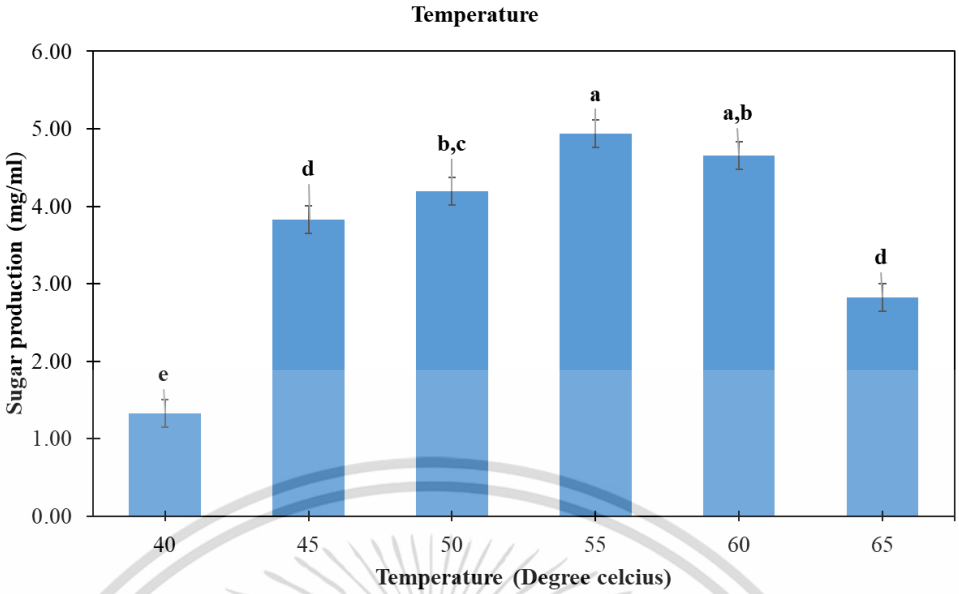
จากผลการทดสอบอุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาล การวิจัยนี้ได้ทำการเลือกมาทดสอบ 6 ค่า คือ 40, 45, 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส ทำการบ่มโดยใช้ปริมาณซังข้าวโพดอยู่ที่ 0.4 กรัม ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำ 3 ซ้ำ และตรวจวัดด้วยวิธี DNS และใช้กลูโคสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อหาค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาล แสดงผลลัพธ์ดังตารางที่ 4.4 พบว่ามีปริมาณค่าเฉลี่ยการผลิตน้ำตาลอยู่ที่ 1.32±0.21, 3.83±0.38, 4.20±0.60, 4.94±0.17, 4.65±0.61 และ 2.82±0.39 มก./มล. ตามลำดับ (รูปที่4.6) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Luong และคณะ (2023) ที่มีการรายงานว่า “เชื้อรา *P. menonorum* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส”

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล (มก./มล.) ในแต่ละอุณหภูมิที่ใช้ย่อยซังข้าวโพดปริมาณ 0.4 กรัม ด้วยไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

อุณหภูมิในการบ่ม (องศาเซลเซียส)	ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล(มก./มล.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
40	1.32^{e}	0.21
45	3.83^{d}	0.38
50	$4.20^{b,c}$	0.60
55	4.94^{a}	0.17
60	$4.65^{a,b}$	0.61
65	2.82^{d}	0.39

หมายเหตุ :ตัวอักษร a-e ในตารางแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (DMRT) $p<0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรารา *P. menonorum* SP10 ใช้เพื่อผลิตน้ำตาลไซโลส (มก./มล.) ในการบ่มซังข้าวโพด 0.4 กรัม ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากผลการทดสอบระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาล การวิจัยนี้ได้ทำการเลือกมาทดสอบ 5 ช่วงเวลา คือ 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง ทำการบ่มโดยใช้ปริมาณซังข้าวโพดอยู่ที่ 0.4 กรัม ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 และอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส โดยทำ 3 ซ้ำ และตรวจวัดด้วยวิธี DNS และใช้กลูโคสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อหาค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาล แสดงผลลัพธ์ดังตารางที่ 4.5 พบว่ามีปริมาณค่าเฉลี่ยการผลิตน้ำตาลอยู่ที่ 2.74±0.41, 6.08±0.83, 5.45±0.41, 4.67±0.25 และ 3.69±0.45 มก./มล . ตามลำดับ (รูปที่4.7) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ และคณะ (2546) ที่กล่าวว่า “การผลิตไซลาเนสของ *Bacillus halodurans* สายพันธุ์ C-1 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง”

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล (มก./มล.) ในแต่ละช่วงเลาที่ใช้ย่อยซังข้าวโพดในปริมาณ 0.4 กรัม ด้วยไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 อุณหภูมิบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส

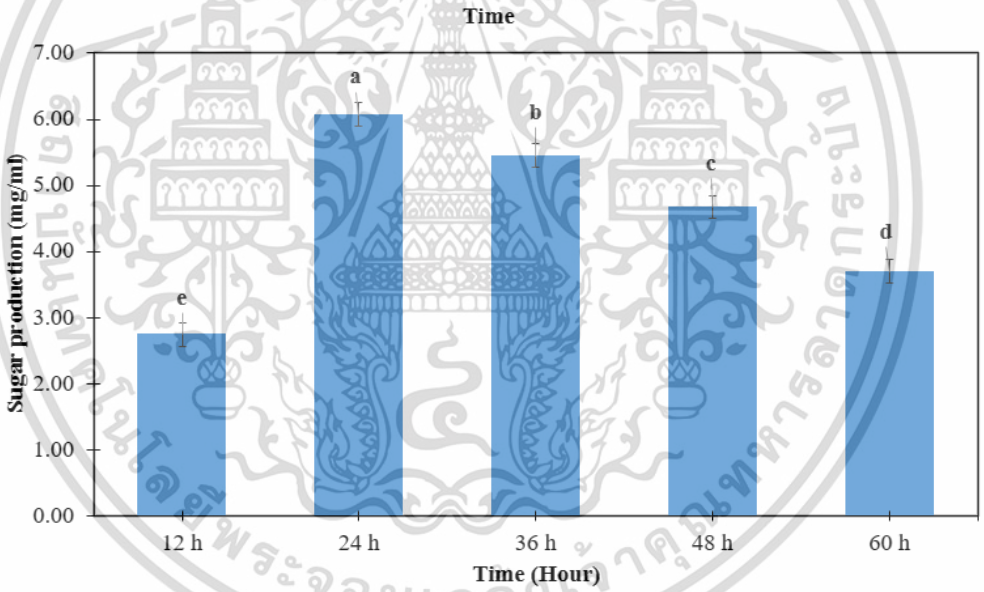
ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล (มก./มล.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
12	2.74^{e}	0.41
24	6.08^{a}	0.83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล (มก./มล.) ในแต่ละช่วงเลาที่ใช้ย่อยซังข้าวโพดในปริมาณ 0.4 กรัม ด้วยไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 อุณหภูมิบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล (มก./มล.)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
36	5.45^{b}	0.41
48	4.67^{c}	0.25
60	3.69^{d}	0.45

หมายเหตุ :ตัวอักษร a-e ในตารางแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) $p<0.05$



รูปที่ 4.7 การเปรียบเทียบระยะเวลาในการที่เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรารา *P. menonorum* SP10 ย่อยซังข้าวโพด 0.4 กรัม เพื่อผลิตน้ำตาลไซโลส (มก./มล.) ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 อุณหภูมิบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส

4.3 ผลการตรวจสอบชนิดของน้ำตาล

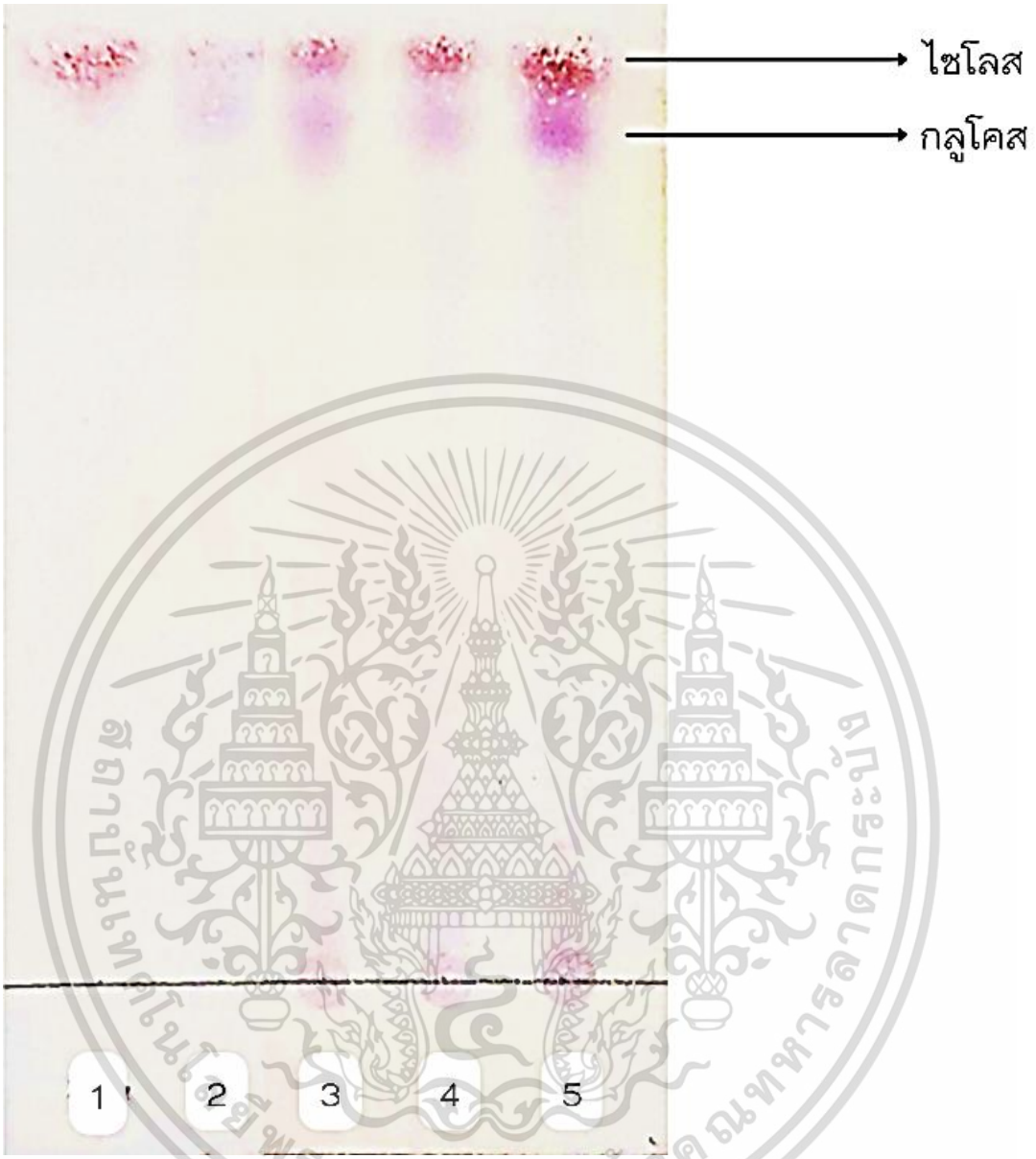
จากการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลโดยใช้ซังข้าวโพดเป็น ซับสเตรต พบว่าปริมาณของซังข้าวโพด ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิในการบ่ม และเวลาที่ใช้ในการบ่ม ที่สามารถผลิตน้ำตาลได้มากที่สุดคือ 0.4 กรัม ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 อุณหภูมิในการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส และบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำน้ำตาลที่ผลิตด้วยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย่อยซังข้าวโพดโดยใช้เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ในปริมาณ 0.4 กรัมของซังข้าวโพด ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 อุณหภูมิการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเป็นสารตัวอย่างเพื่อตรวจสอบเชิงคุณภาพของน้ำตาลว่า น้ำตาลที่ผลิตจากการย่อยซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 คือ น้ำตาลไซโลสหรือไม่ โดยใช้วิธี TLC ตามวิธี Lomthong และคณะ (2021) ซึ่งมี naphthol reagent เป็นเฟสนิ่ง Ethyl acetate/n-propanol/acetic acid/ H_2O (4:2:2:1) เป็นเฟสเคลื่อนที่ และมีไซโลส กลูโคส ซังข้าวโพด และเอนไซม์ไซลาเนสหยาบ เป็นสารมาตรฐาน

จากการตรวจสอบเชิงคุณภาพของผลิตภัณฑ์หรือน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธี TLC ผลการทดลอง แสดงดังรูปที่ 4.7 พบว่า(5) สารตัวอย่าง ปรากฏแถบสีขึ้นในแถวที่ 1 และ2 ซึ่งตรงกับสารมาตรฐาน คือ (1) ไซโลส และ (2) กลูโคส อีกทั้ง (3) ซังข้าวโพด (4) เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ ปรากฏแถบสีขึ้นในแถวที่ 1 และ2 เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า ทั้งสารตัวอย่าง ซังข้าวโพด และเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ มีองค์ประกอบเป็นไซโลส และกลูโคส และที่ซังข้าวโพดมีองค์ประกอบของไซโลสและกลูโคส เนื่องจากว่าซังข้าวโพดที่นำมาใช้เป็นแกนกลางข้าวโพดที่ยังมีเมล็ดอยู่เป็นบางส่วน ส่งผลให้เกิดน้ำตาลขึ้น และเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ มีองค์ประกอบของไซโลส และกลูโคส เนื่องจากขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ เป็นสารสกัดที่จากการนำเชื้อรา *P. menonorum* SP10 มาย่อยซังข้าวโพด ในสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้ระยะเวลาในการบ่ม 7 วัน และนำมาสกัดเพื่อเอาสารละลายส่วนใส หรือ เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ แสดงให้เห็นว่าในขั้นตอนการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบนั้นมีการผลิตไซโลสและกลูโคสขึ้น และ จากรูป 4.7 สามารถตรวจสอบเชิงปริมาณได้เบื้องต้นโดย (5) สารตัวอย่าง มีแถบสีที่เข้ม เมื่อเทียบกับ (1) ไซโลส (2) กลูโคส แสดงให้เห็นว่าสารตัวอย่างมีปริมาณของไซโลสและกลูโคสในปริมาณมาก และ (3) ซังข้าวโพด (4) เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ เมื่อเทียบกับ (5) สารตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณของไซโลสและกลูโคสในปริมาณที่น้อยกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารตัวอย่างที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดโดยใช้เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ในปริมาณ 0.4 กรัมของซังข้าวโพด ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6 อุณหภูมิการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้วิธี Thin layer chromatography (TLC) : (1) ไซโลส (2) กลูโคส (3) ซังข้าวโพด (4) เอนไซม์ไซลาเนสหยาบ (5) สารตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการตรวจสอบการผลิตน้ำตาลจากการย่อยเปลือกและกากผลไม้เหลือทิ้งด้วยเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ด้วยการนำเปลือกและกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกส้ม เปลือกมะนาว เปลือกแตงโม เปลือกเสาวรส และซังข้าวโพด มาทำการย่อยโดยเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ในสภาวะที่ใช้ปริมาณซับสเตรตของแต่ละชนิดที่ 3 กรัม มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 6.0 อุณหภูมิในการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส และใช้ช่วงระยะเวลาการบ่มทั้งหมด 4 ช่วงเวลา คือ 7, 14, 21 และ 28 วัน ซึ่งแต่ละช่วงเวลาได้ทำการย่อยเปลือกและกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิด 3 ซ้ำ ผลการวิจัยพบว่าเปลือกและกากผลไม้ทั้ง 5 ชนิดได้มีการสร้างน้ำตาลขึ้น และการใช้ซังข้าวโพดเป็นซับสเตรตมีปริมาณน้ำตาลที่ปล่อยมากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด คือ 45.35±2.82 ของวันที่ 7 จึงได้นำซังข้าวโพดมาเป็นซับสเตรตที่ใช้ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาล

จากผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาล ได้แก่ ปริมาณซับสเตรต ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิการบ่ม และระยะเวลาในการบ่ม พบว่าปริมาณของซังข้าวโพดที่ 0.4 กรัม ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6 อุณหภูมิในการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส และการใช้ระยะเวลาบ่มที่ 24 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่สามารถผลิตน้ำตาลได้ปริมาณสูงสุด และนำผลิตภัณฑ์หรือน้ำตาลที่ได้ในสภาวะที่ผลิตได้มากที่สุดมาทำการตรวจสอบเชิงคุณภาพ โดยใช้วิธี TLC

จากการตรวจสอบเชิงคุณภาพของผลิตภัณฑ์หรือน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยซังข้าวโพดโดยใช้เอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบจากเชื้อรา *P. menonorum* SP10 ในปริมาณ 0.4 กรัมของซังข้าวโพด ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6 อุณหภูมิการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ TLC พบว่าในสารตัวอย่างมีไซโลส กลูโคสเป็นองค์ประกอบ อีกทั้งซังข้าวโพด และเอนไซม์ไซลาเนสหยาบ ยังมีองค์ประกอบเดียวกันกับสารตัวอย่าง และจากผลการทดลองสามารถตรวจสอบเชิงปริมาณได้เบื้องต้น พบว่าสารตัวอย่างมีปริมาณของไซโลสและกลูโคสในปริมาณมากเมื่อเทียบกับซังข้าวโพดที่ยังไม่ถูกนำมาย่อย และเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบ

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสด้วยเปลือกหรือกากผลไม้ชนิดอื่นๆเพิ่มเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และนำเปลือกหรือกากผลไม้ชนิดอื่นๆมาทำการตรวจสอบสภาวะต่างๆที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลเพิ่มเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ. 2565. แผนปฏิบัติการด้าน การจัดการขยะของประเทศ ฉบับที่ 2 (พ.ศ. 2565 – 2570). กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ, กนก รัตนะกนกชัย และ คิน เลย์ คู. 2546. “Cellulose-free Xylanase จาก Alkaliphilic Thermotolerant *Bacillus halodurans* สายพันธุ์ C-1 ต่อการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและเยื่อกระดาษคราฟท์ต่าง ๆ.” วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. ปีที่ 26: ฉบับที่ 2.

ชุลีนารถ ฟั่นเครือ และกัลยา ประมาณเมือง. “การเตรียมน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลสด้วยเอนไซม์.” ปริญญานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี สาขาวิชาวิศวกรรมอุตสาหกรรม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. 2558.

ธัญญา ศรีโพธิ์. “การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cryptococcus laurentii.”* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2537.

พิชามญชุ์ แดงพราม, สุดาทิพย์ จันทร และสุนีย์ นิธิสินประเสริฐ. 2556. “อิทธิพลของชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *Penicillium xalicum* KUB-SN2-1.” วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. 36(1).

ภาวดี ทับศรีแก้ว. “การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของน้ำหมึกพิมพ์ โดยวิธี Thin layer chromatography.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร. 2556.

มังกร โรจน์ประภากร, ดนัย ขอประเสริฐ, วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย และวิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา. 2560. “คุณสมบัติของไซลาเนสชอบอุณหภูมิสูงจาก *Thermobifida fusca* PA 1-1 Characteristice of Thermophilic Xylanase from *Thermobifida fusca* PA 1-1.” หน้า 778-785. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักพัฒนาเทคโนโลยีเพื่ออุตสาหกรรม. 2560. โครงสร้างเพิ่มศักยภาพข้อมูลอุตสาหกรรมฐานชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์กรมหาชน). 2567. พืชเศรษฐกิจ สินค้าสร้างรายได้ในครัวเรือนและประเทศ. [Online]. Available: https://www.arda.or.th/detail/6166. เข้าถึงวันที่ 16 เมษายน 2567

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัจฉรา มะโนวัฒนา และนพพล เล็กสวัสดิ์. 2563. “แบบจำลองจลนะพลศาสตร์ไซลาเนส.” สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Babu, A.G., Kim, S.W., Yadav, D.R., Hyum, U., Adhikari, M. and Lee, Y.U. 2015. *“Penicillium menonorum*: A Novel fungus to promote growth and nutrient management in cucumber plants.” Mycobiology. 43(1): 49-56.

Bajpai, P. 2009. “Xylanases.” Encyclopedia of Microbiology. 600-612.

Bittencourt, J.W.F., Arfelli, V.C., Lunkes, J.C., Torre, C.L.D., Silva, J.L.C., Maller, A., Simao, R.D.C.G. and Kadowaki, M.K. 2020. “Biochemical characteristics of *Penicillium crustosum* FP 11 xylanase II and an assessment of the properties of xylanase produced by the genus *Penicillium*” APRB. 35: 64-75.

Chen and Wang L. 2017. “Sugar strategies for biomass biochemical conversion.” Technologies for Biochemical Conversion of Biomass. 137-164.

Dhaver, Pletschke, B., Sithole, B. and Govinden, R. 2022. “Isolation, screening, preliminary optimization and characterization of thermostable xylanase production under submerged fermentation by fungi in Durban, South Africa.” Mycology. 13(4): 271–292.

Dutta, T., Sengupta, R., Sahoo, R., Ray, S.S. and Bhattacharjee, S.G. 2007. “A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization.” Letters in Applied Microbiology. 44(2): 206-11.

Gao, B., Ma, Y., Xiao, Y., Wang, Y., Pan, Y. and Zhu, D. 2023. “Lignocelluloltic enzyme cocktail produced by plant endophytic chaetomium globosum exhibits a capacity for high-efficient saccharification of rawrice straw.” Industrial Crops and Products. 196: 116508.

Ghose, T.K. 1987. “Measurement of cellulase activitise.” Pure and Applied Chemistry. 59: 257-268.

International Organisation of Vine and Wine. 2022. “Xylanase activity.” International Oenological CODEX. COEI-1-XYLANA: 7.

Khanahmadi, Arezi, I., Amiri, M., Miranzadeh, M. 2018. “Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid- state fermentation in flask and tray bioreactor.” Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 19: 272-282.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Knob, A. and Carmona, E.C. 2010. “Purification and characterization of two extracellularxylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase.” Applied Biochemistry Biotechnology. 162(2): 429-43.

Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. 1999. “Molecular and biotechnological aspects ofxylanases.” FEMS Microbiology Review 23(4): 411-456.

Liao, H., Zheng, H., Li, S., Wei, Z., Mei, X., Ma, H., Shen, Q. and Xu, Y. 2015. “Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2.” Scientific Reports. 5: 12631.

Lin, C., Shen, Z., Zhu, T. and Qin, W. 2015. “Newly isolated *Penicillium ramulosum* N1 Is excellent for producing protease-resistant acidophilic xylanase.” Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 25(5): 320-6.

Lomthong, T., Netprasom, P., Kancharu, N., Jitmala, K., Areesirisuk, A., Trakarnpailboon, S. and Kitpreechavanich, V. 2021. “Very high gravity (VHG) bioethanol production using modified simultaneous saccharification and fermentation of raw cassava chips with molasses by *Kluyveromyces marxianus* DMKU-KS07.” Waste Biomass Valorization. 12: 3683-3693.

Liu and Kokare, C. 2017. “Chapter 11 - Microbial enzymes of use in industry.” Biotechnology of Microbial Enzymes. 267-298.

Luong, T.T.H., Poeaim, S. and Tangthirasunun, N. 2023. “Isolation and characterization of xylanase from a novel strain, *Penicillium menonorum* SP10.” Mycobiology. 4(51): 239-245.

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

Peterson, S.W., Orchard, S.S. and Menon, S. 2011. “*Penicillium menonorum*, a new species related to *Penicillium pimiteouiense*.” IMA FUNGUS. 2(2): 121–125.

Sakthiselvan and Naveena, B. 2014. Molecular characterization of a Xylanase-producing fungus isolated from fouled soil. Brazilian Journal of Microbiology. 45(4):1293-1302.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shiva, Jasso, R.M.R., Sandin, I.L., Aguilar, M.A., Badillo, C.M.L. and Ruiz, H.A. 2023. "Intensification of enzymatic saccharification at high solid loading of pretreated agave bagasse at bioreactor scale." Journal of Environmental Chemical Engineering. 11(1).

Shrotri, A., Kobayashi, H. and Fukuoka, A. 2017. "Chapter Two - Catalytic Conversion of structural carbohydrates and lignin to chemicals." Advances in Catalysis. 60: 59-123.

Soccol, C.R., Faraco, V., Karp, S.G., Vandenberghe, L.P.S., Soccol, V.T., Woiciechowski, A.L. and Pandey, A. 2019. "Chapter 14 - Lignocellulosic bioethanol: current status and future perspectives." Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels (Second Edition). 331-354.

Sunkar, B., Kannoju, B. and Bhukya, B. 2020. "Optimized production of xylanase by *Penicillium purpurogenum* and Ultrasound impact on enzyme kinetics for the production of monomeric sugars from pretreated corn cobs." Frontiers in Microbiology. 11: 772.

Wood, I.P., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I.N. and Waldron, K.W. 2012. "Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolsates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay." Biomass and Bioenergy. 44: 117-121.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี

1. Potato Dextrose Agar (PDA) แบบสำเร็จรูป ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย
   Potato Dextrose Agar powder 39.0 กรัม
   น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
   วิธีการเตรียม
   1.1 ชั่ง Potato Dextrose Agar powder 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
   1.2 ใส่ขวดดูแรนขนาด 500 มิลลิลิตร 3 ขวด โดยแบ่งใส่ปริมาตละ 300 มิลลิลิตร 2 ขวด และ 400 มิลลิลิตร 1 ขวด
   1.3 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อหนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์
   วิธีการเตรียม
   2.1 ชั่ง NaH_2PO_4 ปริมาณ 6.9 กรัม และชั่ง Na_2HPO_4 ปริมาณ 7.098 กรัม
   2.2 นำสารที่ชั่งมาละลายโดยใช้น้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 250 มิลลิลิตร ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 6
   2.3 ทำการปรับความเข้มข้น โดยใช้น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายในข้อ 2.2 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร
3. การเตรียม DNS reagent ดัดแปลงจาก Ghose (1987)
   วิธีการเตรียม
   3.1 ชั่งสาร NaOH ปริมาณ 0.4 กรัม และชั่ง Na-tartrate ปริมาณ 7.5 กรัม
   3.2 นำสารที่ชั่งมาละลายโดยใช้น้ำกลั่น 80 มิลลิลตร และทำให้ละลายโดยไมโครเวฟ
   3.3 จากนั้นเทผสมกับ DNS ปริมาณ 0.25 กรัม ละลายให้สารเข้ากัน ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร
4. การเตรียม 1% Beechwood Xylan solution ดัดแปลงจาก Ghose (1987)
   วิธีการเตรียม
   4.1 ชั่งไซแลนปริมาณ 0.3 กรัม ผสมกับบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ในข้อที่ 2 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร
   4.2 ทำให้ละลายโดยใช้ไมโครเวฟ และปรับปริมาตรโดยใช้บัฟเฟอร์ให้ปริมาตรเท่ากับ 30 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การเตรียมกลูโคส เตรียมโดยชั่งกลูโคส ปริมาณ 0.1 กรัม ผสมกับบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ในข้อที่ 2 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร
6. การเตรียมสารประกอบเพื่อใช้ผสมกับซับสเตรต ดัดแปลงจาก Sunkar และคณะ (2020) คำนวณตามสัดส่วนที่ใช้ในแต่ละครั้ง และทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ลำดับที่	Component	mg/L
1	$(NH_4)_2SO_4$	1400
2	KH_2PO_4	2000
3	$CaCl_2.2H_2O$	300
4	$MgSO_4.7H_2O$	300
5	$FeSO_4.7H_2O$	5
6	$MnSO_4.H_2O$	1.6
7	$ZnSO_4.7H_2O$	1.4
8	$CoCl_2.6H_2O$	2
9	Peptone	100
10	Tween-80	100

หมายเหตุ: ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6 ปรับโดย NaOH 1 N และ HCl 1N

7. วิธีการเตรียมซังข้าวโพดสำหรับใช้ทดสอบ TLC
   7.1 เตรียมซังข้าวโพดขนาด 0.45 มิลลิเมตร ปริมาณ 0.4 กรัม ลงในหลอดทดลองพลาสติก
   7.2 ใส่น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน
   7.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
   7.4 เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้สำหรับทดสอบ TLC

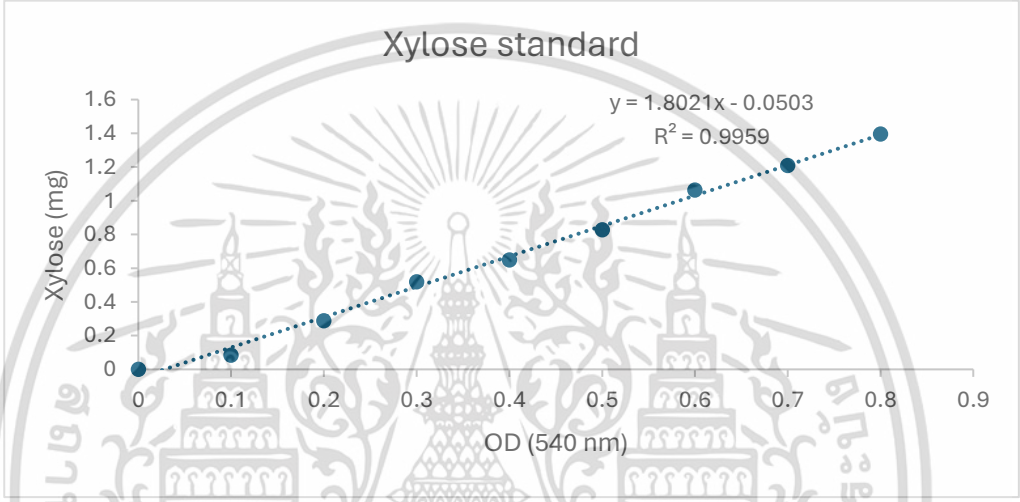
8. การเตรียมตัวทำละลายสำหรับการทดสอบ TLC เตรียมโดยใช้ Ethyl acetate: n-propanol: acetic acid: H_2O ในอัตราส่วน 4:2:2:1 v/v

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

1. กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสกับค่าดูดกลืนแสง และการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์



สูตรกิจกรรมของเอนไซม์

$$U/ml = \frac{mg \times 1000}{MW \times Time \times Ve}$$

หมายเหตุ : U/ml (ยูนิต/มิลลิลิตร) = กิจกรรมของเอนไซม์

mg = ปริมาณของน้ำตาลไซโลสจากกราฟไซโลสมาตรฐานหน่วยมิลลิโมล

MW = น้ำหนักมวลโมเลกุลของไซโลส (150 กรัม/โมล)

1000 = จาก มิลลิโมล เป็น ไมโครโมล

Time = เวลา (30นาที)

Ve = ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (0.05 มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$U/g = \frac{mg \times 1000}{MW \times Time \times Ve} \times \frac{V \text{ of enzyme extract}}{g \text{ of substrate}}$$

หมายเหตุ : U/g (ยูนิต/กรัม) = ปริมาณไซโลสที่ปล่อยออกมาในไมโครโมลในช่วงหนึ่งเวลา

mg = ปริมาณของน้ำตาลไซโลสจากกราฟไซโลสมาตรฐานหน่วยมิลลิโมล

MW = น้ำหนักมวลโมเลกุลของไซโลส (150 กรัม/โมล)

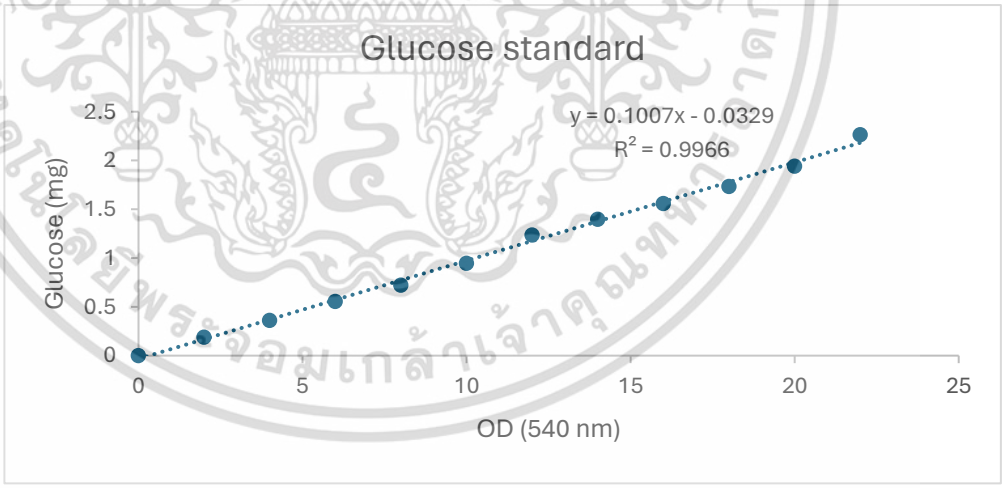
Time = เวลา (30นาที)

Ve = ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (0.05 มิลลิลิตร)

V of enzyme extract = ปริมาณของสารสกัดเอนไซม์ (30 มิลลิลิตร)

g of substrate = ปริมาณของ ซับสเตรต (3 กรัม)

2. กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสง และคำนวณหาปริมาณน้ำตาล



สูตรปริมาณน้ำตาลกลูโคส

$$mg/ml = \frac{((O.D.sample - O.D.control) + 0.0329) \times \text{Dilution factor}}{0.1007}$$

หมายเหตุ : mg/ml (มก./มล.) = ปริมาณน้ำตาล

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

O.D.sample = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

O.D.control = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

Dilution factor = ปริมาณเท่าของความเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

แบบฟอร์มการตรวจสอบการคัดลอกผลงานทางวิชาการ

ข้าพเจ้า นางสาวศรัณย์ภัทรโทริ ประภาศิริ รหัสนักศึกษา 63050439 และ นางสาวชลธิชา กระจ่าง รหัสนักศึกษา 63050463 ระดับปริญญาตรี สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ได้เสนอ โครงงานพิเศษ

เรื่อง

(ภาษาไทย) การผลิตน้ำตาลจากการย่อยเปลือกและกากผลไม้ด้วยเอนไซม์ไซลาเนสสกัดหยาบจากเชื้อรา *Penicillium menonorum*

(ภาษาอังกฤษ) SUGAR PRODUCTION FROM FRUIT WASTES USING CRUDE XYLANASE ENZYME FROM *Penicillium menonorum*

โดยได้ตรวจเช็ค โครงงานพิเศษ ในภาคเรียนที่ 2/2566 วันที่ 1 เดือนมิถุนายน ปี 2567โดยใช้โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์

ตรวจสอบความเหมือนของเนื้อหา 0.87 % โดยอาจารย์ที่ปรึกษา (โครงงานพิเศษ) ยอมรับได้ที่จะสามารถดำเนินการสอบจบวิทยานิพนธ์หรือปริญญานิพนธ์หรือปัญหาพิเศษหรือรายงานค้นคว้าอิสระ

ลายมือชื่อนักศึกษา.....ศรัณย์ภัทรโทริ ประภาศิริ.....

(นางสาวศรัณย์ภัทรโทริ ประภาศิริ)

3 / 06 / 2567

ลายมือชื่อนักศึกษา.....ชลธิชา กระจ่าง.....

(นางสาวชลธิชา กระจ่าง)

3 / 06 / 2567

ได้รับความเห็นชอบจากอาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม.....

(รศ. ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม)

3 / มิถุนายน / 2567

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้