สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การชักนำและการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* เพื่อเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูง

นางสาวนิรมล นิยมจันทร์
นางสาวอรชร เมฆเกิดชู

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....67295
วัน,เดือน,ปี.....22 พ.ย. 2549
b.....11663029
i.....

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Induction and Selection Mutants of *Aspergillus fumigatus* for enhanced Production of a thermostable xylanase

Niramol Niyomchan

Orachorn Mekkerdchoo

A special Project Submitted in Partial Fulfillment for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การชักนำและการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* เพื่อเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูง
นักศึกษา	นางสาวนิรมล นิยมจันทร์ รหัสประจำตัว 45050205
	นางสาวอรชร เมฆเกิดชู รหัสประจำตัว 45050262
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

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

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์เฉพาะภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การชักนำและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* เพื่อเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูง

นักศึกษา นางสาวนิรมล นิยมจันทร์ รหัสประจำตัว 45050205

นางสาวอรชร เมฆเกิดชู รหัสประจำตัว 45050262

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2548

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ *A. fumigatus* ที่แยกได้จากดินในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย ดังนั้นเพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูงด้วยวิธีชักนำผ่านสารเคมี N-methyl-N-nitnitrosoguanidine (NTG) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำมาฉายแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้หลอดยูวี (256 nm) เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ โดยการวัดอัตราส่วนของวงใสต่อขนาดโคโลนีของเชื้อที่หยดเอนไซม์ลงบนอาหาร Czapek-Dox (CD) medium ที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ และในเชิงคุณภาพโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ที่ 550 นาโนเมตร โดยเทียบ กับกราฟมาตรฐานไซโลส และค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสต่ำสุดในเชิงปริมาณและคุณภาพเพื่อต้องการเชื้อกลายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสทนอุณหภูมิสูงที่ปราศจากเซลลูเลส พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายที่ 26 มีอัตราส่วนของวงใสต่อขนาดของโคโลนีเท่ากับ 5.133 เซนติเมตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดที่ 100.6147 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พร้อมทั้งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ในงานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสทนอุณหภูมิสูงที่ปราศจากเซลลูเลสสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมทั้งหมด 18 สายพันธุ์ และได้นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ พบว่าสายพันธุ์กลายที่ 49 , 41 และ 26 มีประสิทธิภาพภาพมากที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสทนอุณหภูมิสูงที่ปราศจากเซลลูเลสสูงสุด คือ 56.656 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และให้อัตราส่วนของวงใสต่อขนาดโคโลนีเท่ากับ 3.518 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Induction and Selection Mutants of *Aspergillus fumigatus* for enhanced Production of a thermostable xylanase

Name Miss Niramol Niyomchan

Miss Orachorn Mekkerdchoo

Department Applied Biology

Acadermic year 2005

Speacial Project Adviser Assistant Professor Aree Rittiboon

Abstract

Mutagenesis of *Aspergillus fumigatus* from soil located in northern Thailand by using 100 ug/ml (NTG) as chemical reagent and ultraviolet treatment (256 nm) was studied by inoculating spore suspension to NTG for 30 minutes and exposed to ultraviolet for 3 minutes. That 5% survival at 10^{-2} dilution of the treated spores population was studied. The 10^{-2} dilution was incubated on medium agar at 45^{0}c for 4 days. Enzyme activity was then tested and selected by studying the xylanase activity in both their quantitatively and qualitatively. The quality activity was tested by checking the ratio of the clear zone/diameter of the colonies and the quantity activity was tested by OD test at the wave length of 550 nm, by compairing with the standard curve of xylose. From this experiment, it was found that the fungi mutant number 26 had the highest values of the ratio activity both of their quality and quantity for the medium using xylan as the C-source (the ratio of the clear zone/diameter of colony was 5.133 cm and the enzyme activity was 100.6147 unit/ ml) the mutant number 26 had the low activity of cellulase, therefore it can produce highest thermostable xylanase without cellulase. The selected mutant number 26 had the ability to produce highest tolerant xylanase without cellulase more than the wild type. For cultivation in medium corn cop medium, mutant number 49, 41 and 26 having the highest tolerant xylanase without cellulase both of qualitatively and quantitatively were selected. When it was compared between xylan medium and corn cop medium in the same mutant strain was compared, it was found that only mutant number 49 and 41 produce the enzyme xylanase more than the mutant strain in xylan medium.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้จะมิสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีหากปราศจากบุคคลผู้ให้ความรู้ กำลังกายและกำลังใจเหล่านี้

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์ ที่เสียสละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษาและช่วยสนับสนุนอนุเคราะห์ข้อมูลความรู้ รวมถึงอุปกรณ์ทุกๆด้านในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

ขอขอบคุณท่านประธานกรรมการและกรรมการที่เสียสละเวลามาร่วมเข้าฟังโครงงานพิเศษในครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ปริญญาโทที่ช่วยเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และช่วยเสียสละเวลามาช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขอขอบคุณห้องเครื่องมือที่ช่วยอำนวยความสะดวกและให้ยืมอุปกรณ์ในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

สุดท้ายขอขอบคุณทุกความช่วยเหลือ คุณพ่อ คุณแม่ น้องสาวและเพื่อนๆ ที่ร่วมทำโครงงานพิเศษร่วมกันที่ช่วยเหลือทั้งกำลังใจและกำลังกาย รวมถึงให้คำปรึกษาและแบ่งปันอุปกรณ์ต่างๆ ทำให้งานในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นิรมล นิยมจันทร์

อรชร เมฆเกิดชู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	
1.2 วัตถุประสงค์	
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	56
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	61
บทที 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	98
เอกสารอ้างอิง	101
ภาคผนวก	109

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ความสามารถในการหมักของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยเกิดผ่าน xylanolytic enzyme system	15
2.2 อัตราการเกิดยีนการกลายพันธุ์ตามสภาพธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตต่างๆ	22
2.3 คุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	31
2.4 ลำดับขั้นตอนของการใช้สารเคมีในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ	49
2.5 สารเคมีที่เป็นพิษที่เกิดจากกระบวนการผลิตเยื่อและกระบวนการฟอกสี	54
4.1 จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรและเปอร์เซ็นการอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ที่ผ่านการการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) 100 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที ร่วมกับแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ ในระดับความเจือจาง 10^{-2}	62
4.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1	66
4.3 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1	69
4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน	75
4.5 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน	79
4.6 เปรียบเทียบค่าอัตราส่วนของวงใสและกิจกรรมของเอนไซม์เชิงของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกเพื่อไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน	83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.7	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1	84
4.8	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1	87
4.9	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน	90
4.10	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน	91
4.11	เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสของสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ แท้ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน	94
4.12	เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน	95
ข-1.	การวิเคราะห์ค่าทางสถิติในการหาค่าอัตราส่วนวงใสต่อขนาดของโคโลนีในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 58 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน	115
ข-2.	การวิเคราะห์ค่าทางสถิติในการหาอัตราส่วนวงใสต่อขนาดของโคโลนีในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 58 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน	119

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ข-3. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 58 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน	121
ข-4. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 58 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน	123
ข-5. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยการวัดอัตราส่วนวงใสต่อขนาดของโคโลนีในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 18 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน	125
ข-6. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยการวัดอัตราส่วนวงใสต่อขนาดของโคโลนีในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 18 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน	126
ข-7. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 18 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน	127
ข-8. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 18 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน	129

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ข-9. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 18 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะการเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน 130

ข-10. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 18 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะการเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน 133

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างสามมิติ Endo-β-1,4 Xylanase	6
2.2	ลักษณะโมเลกุลของไซแลน	7
2.3	โครงสร้างของพืชที่มีส่วนประกอบหลักเป็น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน	8
2.4	องค์ประกอบของไซแลนในไม้เนื้อแข็งที่มีลักษณะเป็น O-acetyl-4-O- methylglucuronoxylan	9
2.5	องค์ประกอบของไซแลนในไม้เนื้ออ่อนที่มีลักษณะเป็น arabino-4-O- methylglucuronoxylan	9
2.6	องค์ประกอบของไซแลนในพืชตระกูลหญ้าหรือฟางข้าว ที่มีลักษณะเป็นอนุพันธุ์ ของ arabino-4-*O*-methylglucuronoxylan	10
2.7	โครงสร้างของไซแลนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β - 1,4 และพันธะ β -1,3-D-ไซโลไพราโนซิล	10
2.8	ลักษณะซังข้าวโพดบดละเอียด	12
2.9	โครงสร้างคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส	13
2.10	การย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส	19
2.11	ลักษณะโครงสร้างของ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)	27
2.12	ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus ochraceus* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	29
2.13	ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	30
2.14	ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อ *Trichoderma viride* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	30
2.15	ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus niger* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	30
2.16	โครงสร้างของเชื้อรา	35
2.17	วงจงชีวิตโดยทั่วไปของเชื้อรา	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.18	การย่อยสลายภายนอกเซลล์ของเชื้อราเอนไซม์หลั่งออกมาเพื่อย่อยสารพอลิเมอร์โครงสร้างขนาดใหญ่ได้เป็นสารตัวกลางเกิดขึ้นและต่อมาจะเกิดการย่อยสลายได้ผลเป็นหน่วยของมอนอเมอร์เพื่อให้เชื้อราดูดซึมต่อไป	36
2.19	A : ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. fumigatus* B : ลักษณะโครงร่างของ *A. fumigatus*	38
4.1	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Aspergillus fumigatus*	61
4.2	แสดงเปอร์เซ็นการอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ผ่านการการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีร่วมกับแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ ในระดับความเจือจาง 10^{-2}	63
4.3	สายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* ที่เจริญเติบโตในอาหารเหลวซึ่งจะให้อาหารเหลวที่มีลักษณะใสและขุ่น	64
4.4	สายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* ที่เจริญเติบโตในอาหารเหลวในรูปของรูปของในรูปของเพนเลต (pellet) และเส้นใย (mycelium)	64
4.5	ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบเป็นเวลา 15-20 นาที ซึ่งใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบ	64
4.6	ตัวอย่างของวงใสรอบโคโลนี เมื่อนำตัวอย่างเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็งCD- medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ย้อมสีด้วย congo red	65
4.7	ตัวอย่างของวงโคโลนี เมื่อนำตัวอย่างเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมเซลลูโลส เป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ย้อมสีด้วย congo red	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.8	เปรียบเทียบลักษณะของโคโลนีและวงใสของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* เมื่อนำตัวอย่างเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ย้อมสีด้วย congo red (จานเพาะเชื้อซ้ายมือ) และ เมื่อนำตัวอย่างเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 (จานเพาะเชื้อขวามือมือ)	72
4.9	กราฟเปรียบเทียบอัตราส่วนขนาดวงใสต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* ในแต่ละสายพันธุ์ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	73
4.10	กราฟเปรียบเทียบอัตราส่วนขนาดวงใสต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* ในแต่ละสายพันธุ์ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	74
4.11	กราฟเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเชิงคุณภาพของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* ในแต่ละสายพันธุ์	78
4.12	กราฟเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงคุณภาพของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* ในแต่ละสายพันธุ์	82
4.13	อัตราส่วนวงใสต่อขนาดโคโลนีของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์กลายต่างๆ ที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน	86
4.14	แสดงค่าอัตราส่วนวงใสต่อขนาดโคโลนีของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณที่ผลิตได้จากสายพันธุ์กลายต่างๆ กันโดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน	87
4.15	อัตราส่วนวงใสต่อขนาดโคโลนีของค่ากิจกรรมเอนไซม์ เซลลูเลสของสายพันธุ์กลายต่างๆ ที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน	89
4.16	กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์กลายต่างๆ ที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน	93
4.17	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์กลายต่างๆ ที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน	93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.18	เปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์กิจกรรมไซลาเนสของสายพันธุ์กลายต่างๆ ที่ใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนและที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน	97
4.19	เปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์กิจกรรมเซลลูเลสของสายพันธุ์กลายต่างๆ ที่ใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนและที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน	97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

เอนไซม์ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยไซแลน (xylan) ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่เกิดจากอนุพันธุ์ของไซโลไพราโนส (xylopyranose) ที่เชื่อมต่อด้วยพันธะ β-1,4-glycosidic ซึ่งในปัจจุบันนี้ เอนไซม์ไซลาเนสจัดเป็นเอนไซม์ที่น่าสนใจอย่างมาก เนื่องมาจากเอนไซม์ถูกนำมาประยุกต์ใช้งานอุตสาหกรรมกระดาษ (Wong และคณะ, 1992) โดยในอุตสาหกรรมกระดาษมีการปล่อยสารก่อมะเร็งซึ่งเป็นสารจำพวก chlorinated phenolic ลงสู่ธรรมชาติ ซึ่งเนื่องมาจากมีการใช้สารเคมีเหล่านี้ในขั้นตอนการฟอกกระดาษ โดยขั้นคอนการใช้เอนไซม์ไซลาเนสซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในขั้นตอนการฟอกกระดาษ โดยจะช่วยในการลดการใช้สารเคมีในการฟอกกระดาษเพื่อให้เกิดความเป็นพิษน้อยที่สุด นอกจากนี้เอนไซม์ไซลาเนสมีประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มโดยเอนไซม์ไซลาเนสจะช่วยในการทำลายพันธะในพอลิแซ็กคาไรด์ช่วยให้การทำขนมและอาหารรวดเร็วขึ้น อีกทั้งยังทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้นด้วย (Godfrey และ West, 1996) และยังใช้เอนไซม์ในการย่อยเศษวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรก่อนที่จะไปเป็นอาหารสัตว์ หรือเติมเอนไซม์ลงไปในอาหารธัญพืชที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารของสัตว์ (Gilbert และ Hazlewood, 1993) นอกจากนั้นในงานอุดสาหกรรมน้ำมันปิโตรเลียม ได้มีการนำเอนไซม์มาใช้ในการกำจัดซัลเฟอร์ซึ่งเป็นสารพิษในการย่อยสารประกอบ เช่น dibenzothiophene (Bahrami และคณะ, 2001) อุตสาหกรรมการผลิต 1,3-propanediol จากสาร glycerol โดยเอนไซม์จะถูกนำมาใช้เพื่อลดการเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษเนื่องจากการใช้สารเคมีในการผลิต (Peter และคณะ 2001)

จากการศึกษาพบว่าเชื้อราเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถมากที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (Haltrichและคณะ1996) แบคทีเรียและเห็ดรา (Fungi) จำนวนมาก เช่น *Trichoderma* spp. (Steiner และคณะ, 1987) *Aspergillus* spp. (Ghosh และคณะ, 1994 ; Bailey และคณะ, 1993) *Penicilium* spp. (Haas และคณะ, 1992) และ *Schizophyllum* spp. (Morales และคณะ, 1995) สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ ส่วนมากจะเป็นจุลินทรีย์จำพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปกติ (mesophilic) แต่จากการศึกษาพบว่าเชื้อราเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถมากที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (Haltrich และคณะ, 1996) และในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มักจะใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Aspergillus* sp. ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

เอนไซม์ไซลาเนสซึ่งมีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงที่น่านำไปใช้งานสำหรับกระบวนการฟอกขาวทางชีวภาพ (bio-bleaching) เพื่อให้มีประสิทธิภาพในอุตสาหกรรมฟอกกระดาษ ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไซลาเนสที่ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular xylanase) จากเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ที่ช่วงอุณหภูมิสูง จะให้เอนไซม์ที่มีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงโดยธรรมชาติ (Antony และคณะ, 2003)

โดยทั่วๆไปแล้วเชื้อราส่วนมากสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสในช่วงเวลาเดียวกันในขั้นตอนการฟอกกระดาษ (pulp treatment) ซึ่งเอนไซม์ไซลาเนสที่นำไปใช้งานจำเป็นต้องปราศจากเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งจะสามารถลดการทำลายเส้นใยของเยื่อให้น้อยลง และควรจะมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงหากมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วย จึงจำเป็นต้องกำจัดเอนไซม์เซลลูเลสออกก่อนจึงจะนำมาประยุกต์ใช้ในขบวนการฟอกกระดาษได้ ซึ่งขบวนการที่กำจัดเอนไซม์เซลลูเลสนี้เองที่ทำให้ขบวนการฟอกกระดาษมีราคาแพงขึ้น อีกทั้งเอนไซม์ไซลาเนส (crude xylanase) ที่ปราศจากเซลลูเลสสามารถนำมาใช้ในขบวนการผลิตกระดาษจะทำให้ต้นทุนมีราคาถูกลง เนื่องจากว่าไม่มีความจำเป็นในการทำให้เอนไซม์ไซลาเนสนั้นให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้ในกระบวนการผลิตกระดาษ (Antony และคณะ, 2003)

ดังนั้นจึงนำวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูงจากจุลินทรีย์ เพื่อใช้เอนไซม์ไซลาเนสมาทดแทนสารเคมีในงานอุตสาหกรรมทำให้ลดความเป็นพิษต่อสภาพแวดล้อมลดลง นอกจากนี้ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ยังสามารถใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตได้ เช่น ซังข้าวโพด (Gomes และคณะ, 1993) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนจากสภาพธรรมชาติและมีราคาถูกทำให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตได้

ดังนั้นโครงงานนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไซลาเนส โดยชักนำนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *Aspergillus fumigatus* ที่แยกได้จากดินและสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (45^{o}C) (เรวดี ปรีบัว, 2547) และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูงได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type)

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อ *Aspergillus fumigatus* โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตและการใช้สารเคมีร่วมกัน

2. เพื่อศึกษาความสามารถของการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูงของ *Aspergillus fumigatus* ของสายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของสารพันธุ์กลายโดยการใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตแตกต่างกัน

4. เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

1. ชักนำให้เชื้อ *Aspergillus fumigatus* เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีร่วมกับการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (UV)

2. คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีความคงตัวและมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูงได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารแข็งและอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

3. คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีความคงตัวและมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิสูงได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารแข็งและอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

4. เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์กลายโดยการใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตแตกต่างกัน

1.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1. การเตรียมสารละลายสปอร์

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

2. การหาร้อยละการอยู่รอดของเชื้อจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี

ทำการเตรียมสารละลายสปอร์ให้ได้จำนวนสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร นำสปอร์ไปทำการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีร่วมกับแสงอัลตราไวโอเลต โดยการนำสารละลายสปอร์ที่ถูกเตรียมไปทรีตด้วยสารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที (Singh และคณะ, 1995) จากนั้นจากนั้นนำสปอร์ที่ผ่านการทรีตแล้วมาล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2-3 ครั้ง แล้วนำมาฉายแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้หลอดยูวี (254 นาโนเมตร) เป็นเวลา 0 , 1 , 3 , 5 , 7 และ 10 นาที ทำการสุ่มตัวอย่างตามช่วงเวลาต่างๆ กัน ในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำการเจือจางในอัตราที่เหมาะสมแล้วนำมา spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยให้มีจำนวนโคโลนีเกิดขึ้นอยู่ในช่วง 100-300 โคโลนี โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณหาร้อยละการอยู่รอดของเชื้อโดยการเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการทรีตด้วยสารเคมีและแสงอัลตราไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือกเวลาที่ทำการทรีตด้วยสารเคมีและแสงอัลตราไวโอเลตที่ให้ร้อยละการอยู่รอดของเชื้อร้อยละ 5 (Singh และคณะ, 1995) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ทนอุณหภูมิสูง

นำสารละลายสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร มาทำการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยการทรีตสารเคมีและผ่านการฉายแสงแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาที่ให้อัตราการอยู่รอดร้อยละ 5 แล้วทำการ spread plate เชื้อลงในอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นทำการเคลื่อนย้ายโคโลนีโดยใช้ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อ ลงบน Czapek-Dox (CD) medium ซึ่งประกอบด้วย $NaNO_2$ 3.0 กรัม/ลิตร, KH_2PO_4 1 กรัม/ลิตร, $MgSO_4$ 0.5 กรัม/ลิตร, $FeSO_4$ 0.01 กรัม/ลิตร, ยีสต์สกัด 5 กรัม/ลิตร และมีการเติมเป็นไซแลนหรือเซลลูโลสร้อยละ 1 และเติมวุ้นความเข้มข้นร้อยละ18 (Anthony และคณะ, 2003) นอกจากนี้มีการเติมสาร Sodium tauroglucocholate (เป็นตัวยับยั้งการเจริญของโคโลนี) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (Singh และคณะ, 1995) บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน คัดเลือกโคโลนีที่ให้วงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนแต่ไม่ให้วงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลสและมีอัตราส่วนของวงใสรอบโคโลนีมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ย้ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เลี้ยงให้เกิดสปอร์เต็มที่รวบรวมและทำการเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

4. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณและคุณภาพ

โคโลนีจากขั้นต้นที่ถูกคัดเลือก นำไปทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ ในสภาวะอาหารเหลวที่ประกอบด้วยเปปโตนร้อยละ 0.3 , KH_2PO_4 ร้อยละ 0.2, $MgSO_4$ร้อยละ 0.1 , $CaCl_2$ ร้อยละ 0.1 , ยีสต์สกัดร้อยละ 0.3 และการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นไซแลนหรือซังข้าวโพดร้อยละ 1 ปรับให้อาหารมีค่าพีเอช 5.0 โดยเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้รอบของการหมุนเหวี่ยงที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อไป ปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ เป็นเวลา 15-20 นาที เก็บส่วนใสแบ่งใส่ภาชนะเล็กๆ เพื่อทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในชิงปริมาณ (วัดอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนี/ขนาดของโคโลนีของเชื้อ) โดยนำสารละลายเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD medium ที่มีการเติมไซแลนหรือเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ปริมาณหลุมละ 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 45 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำไปย้อมสี congo red ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 15 นาที และล้างออกด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที วัดขนาดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อและหาอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนี/ขนาดของโคโลนีของเชื้อ และทำการคัดเลือกที่ให้อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนี/ขนาดของโคโลนีของเชื้อเท่ากับหรือมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม แล้วนำไปวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลส (ในรูปกิจกรรมของเอนไซม์) โดยวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Tang และคณะ, 1987)

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม
2. ได้เชื้อสายพันธุ์กลายทนร้อนที่จะมีประโยชน์ในการใช้งานได้ดีขึ้น
3. ทราบถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของสายพันธุ์กลายโดยการใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตแตกต่างกัน
4. เป็นแนวทางในการวิจัยขั้นสูงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

เซลล์พืชเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งใหญ่ที่สุดในธรรมชาติ โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์พืชจะประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เซลลูโลส (cellulose) และ ลิกนิน (lignin) โดยเซลลูโลสเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4 ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic) มีสูตรทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ ส่วนเฮมิเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลเพนโทส และ/หรือน้ำตาลเฮกโซส ได้แก่ กลูแคน (glucan) แมนแนน (mannan) และไซแลน (xylan) ซึ่งประกอบด้วยไซแลน (xylan) เป็นส่วนใหญ่ โดยไซแลนมักพบเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยในไซแลนเป็นสารประกอบพวกเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharides) ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1, 4-ไซโลไพราโนซิล (β-1,4-xylopyranosyl) เป็นโครงสร้างหลัก (backbone) มีแขนง (branch chain) เป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดอื่นมาเชื่อมต่อกับโครงสร้างหลัก เช่น อะซิทิล (acetyl) อะราบิโนวิล (arabinosyl) และกรดเมทิลกลูคูโรนิก (methylglucuronic acid) (Whistler และ Richards, 1970) ส่วนลิกนิน(lignin) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทโพลีฟีนอลิก (polyphenolic) เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่และห่อหุ้มเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเอาไว้ข้างใน (Wong และคณะ, 1988) ซึ่งในเซลล์พืชจะมีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่แตกต่างกัน

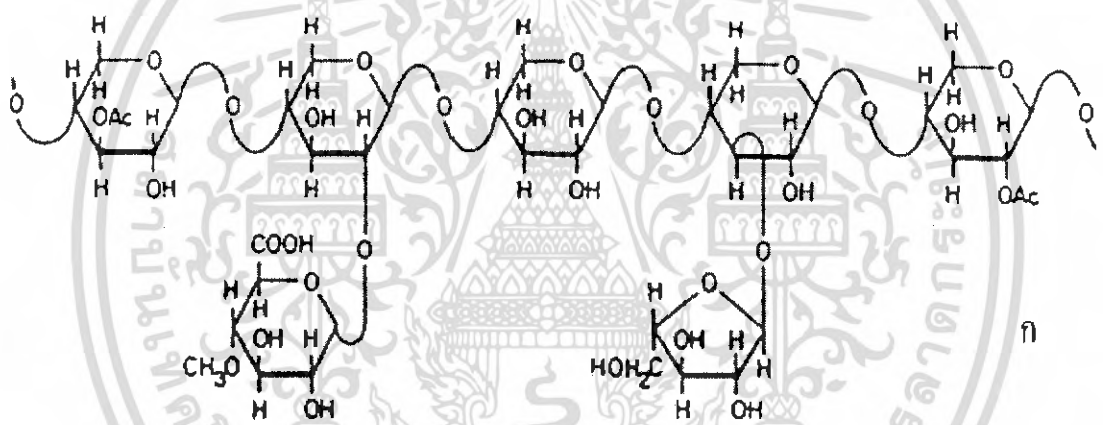
รูปที่ 2.1 โครงสร้างสามมิติของเอนโด-บีต้า-1,4 ไซลาเนส (endo-β-1,4 xylanase)

ที่มา : http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1bg4.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 ไซแลน (xylan)

องค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์พืชตามธรรมชาติประกอบด้วยไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส โครงสร้างหลักของไซแลนประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลดีไซโลส (D-xylose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4-D-ไซโลไพราโนซิล (β-1,4-D-xylopyranosyl) เป็นโครงสร้างหลัก (backbone) มีแขนง (branch chain) เป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดอื่นมาเชื่อมต่อกับโครงสร้างหลัก เช่น อะซิทิล (acetyl) อะราบิโนวิล (arabinosyl) และกรดเมทิลกลูคูโรนิก (methylglucuronic acid) (Whistler และ Richards, 1970) การเชื่อมต่อกันนี้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งที่มาของไซแลน (Filho,1998) โดยหมู่อะราบิโนสต่อกับตำแหน่ง O -3 ของไซโลส หมู่กลูโคโลนิลต่อกับที่ตำแหน่ง O -2 ของไซโลส ส่วนหมู่อะซิติลต่อกับตำแหน่ง O-3 และ O -2 ของไซโลส (รูปที่ 2.2)

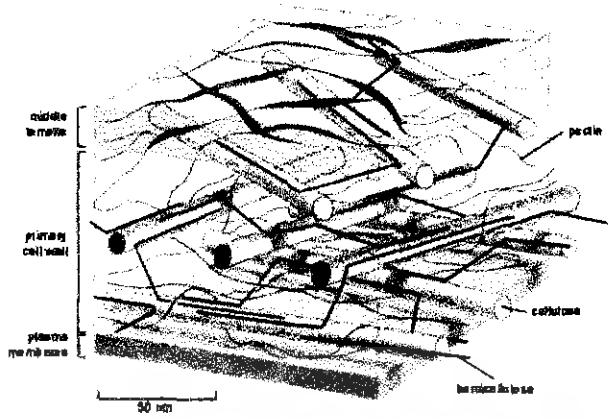


รูปที่ 2.2 ลักษณะโมเลกุลของไซแลน
ที่มา : Biely (1985)

2.1.1 แหล่งที่พบไซแลน

พบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิด ซึ่งโครงสร้างของพืชจะประกอบไปด้วย ส่วนประกอบหลัก 3 ส่วน ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (รูปที่ 2.3) โดยไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักในส่วนของเฮมิเซลลูโลส โดยในไม้เนื้ออ่อนพบไซแลนประมาณร้อยละ 7 -12 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด ไม้เนื้อแข็งพบประมาณร้อยละ 15 - 30 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด และในไม้ล้มลุกพบมากกว่าร้อยละ 30 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (Wong และคณะ, 1988 ; Whistler และ Richard, 1970)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของพืชที่มีส่วนประกอบหลักเป็น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน
ที่มา : www.enzyme.co.uk/Basics/cell_wall.gif

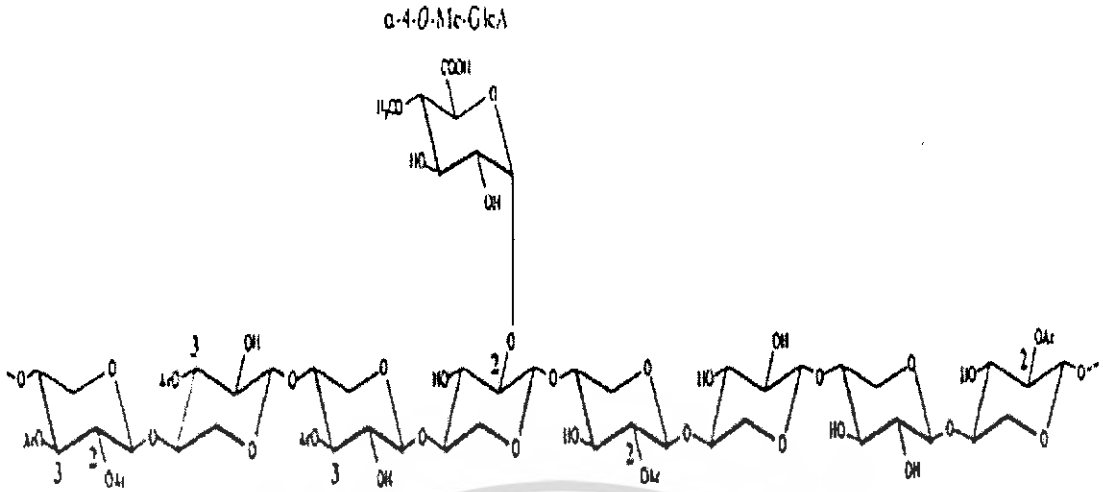
ไซแลนจึงสามารถพบได้ในพืชทุกชนิดแต่ปริมาณไซแลนในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามโครงสร้างของการเจริญและสภาพแวดล้อม โดยส่วนใหญ่จะใช้ไซแลนจากพืชไม่กี่ชนิด ได้แก่ ไซแลนจากโอ๊ก (oat spelt xylan) และไซแลนจาก birchwood (birchwood xylan)

พืชแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบบริเวณแขนงที่แตกต่างกันมายึดจับกับโครงสร้างหลักเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดอื่น โดยในส่วนไม้เนื้อแข็งจะมี 4-O-methylglucuronopyranosyl มายึดจับกับโครงสร้างหลักของไซแลนที่ตำแหน่ง α-1,2 ในไม้เนื้ออ่อนจะมี α-arabinofuranose และ α-4-O-methylglucuronic มายึดจับกับโครงสร้างหลักของไซแลน (Hurlbert and Preston, 2001) (รูปที่ 2.4 - 2.5) โดยระดับการเกิดพอลิเมอไรซ์ (degree of polymerization) ในไม้เนื้ออ่อนอยู่ในช่วง 70-130 และในไม้เนื้อแข็งอยู่ในช่วง 150-200 (Filho, 1994) และในโครงสร้างหลักของเฮมิเซลลูโลสในพืชตระกูลหญ้าจะมี L-arabinose, β-coumaroyl และ ferruloyl มายึดจับกับโครงสร้างหลักของไซแลน (รูปที่ 2.6)

โดยไม้เนื้ออ่อนพบไซแลนประมาณร้อยละ 7 ถึง 12 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด ไม้เนื้อแข็งพบประมาณร้อยละ 15 -30 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด และในไม้ล้มลุกพบมากกว่าร้อยละ 30 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (Wong และคณะ, 1988 ; Whistler และ Richard, 1970)

นอกจากนี้ยังมีไซแลนอีกชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลดีไซโลสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,3-D-ไซโลไพราโนซิล (β-1,3-D-xylopyroanosyl) ซึ่งมักพบเป็นองค์ประกอบของสาหร่ายน้ำจืด และสาหร่ายทะเล (*Horikoshi*, 1999) (รูปที่ 2.7)

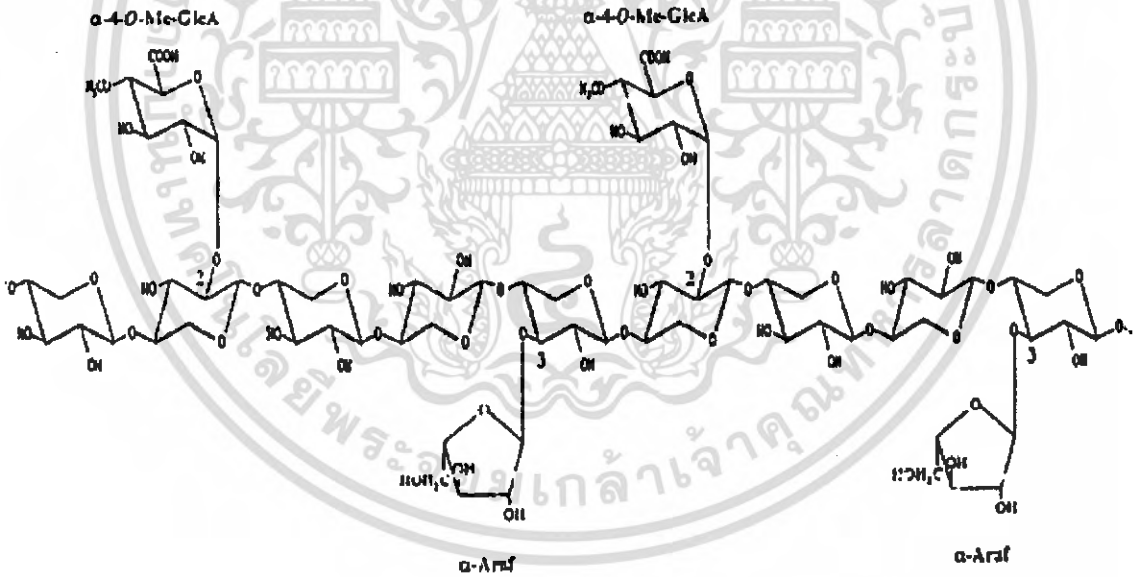
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 องค์ประกอบของไซแลนในไม้เนื้อแข็งที่มีลักษณะเป็น O-acetyl-4-O methylglucuronoxylan

Ac = acetyl group, α-4-O-Me-GlcA = α-4-O-methylglucuronic acid

ที่มา : Sunna และ Antrnikian (1997)

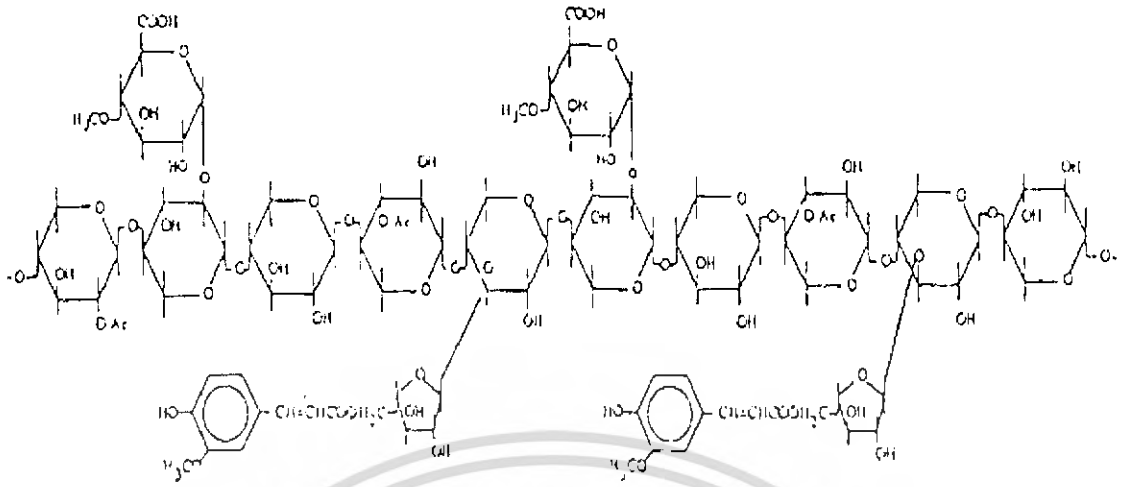


รูปที่ 2.5 องค์ประกอบของไซแลนในไม้เนื้ออ่อนที่มีลักษณะเป็น arabino-4-O-methylglucuronoxylan

α-Araf = α-arabinofuranose, α-4-O-Me-GlcA = α-4-O-methylglucuronic acid

ที่มา : Sunna และ Antranikian (1997)

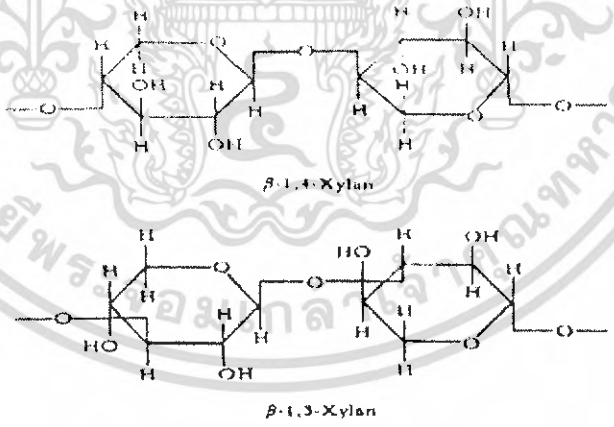
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 องค์ประกอบของไซแลนในพืชตระกูลหญ้าหรือฟางข้าว ที่มีลักษณะเป็นอนุพันธ์ของ arabino-4-O-methylglucuronoxylan

Ac = acetyl group

ที่มา : Coughlan และ Hazlewood (1993)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของไซแลนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β- 1,4 และพันธะ β- 1,3-Dxylopyranosyl

ที่มา : Horikoshi และ Akiba (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ประโยชน์ของไซแลน (Biely, 1985)

1. ใช้ในกระบวนการหมักสำหรับผลิตเชื้อเพลิง เช่น เอทานอล
2. ใช้ในการผลิตสารเคมี เช่น สารทำละลายและกรดอินทรีย์
3. อาหารสำหรับคนและสัตว์ ได้แก่ อาหารเสริมโปรตีนและอาหารเสริมเส้นใย

2.2 ซังข้าวโพด (corn cob)

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งมีวัสดุเหลือทิ้งประเภทฟางข้าว แกลบ ขี้เลื่อย ซังข้าวโพด และชานอ้อย ฯลฯ อยู่เป็นจำนวนมาก วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรดังกล่าวส่วนใหญ่จัดเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือเซลลูโลสประมาณร้อยละ 40-60 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 20-39 และลิกนินร้อยละ 15-30 โดยน้ำหนักแห้ง (Kirk, 1983) ปัจจุบันได้มีความคิดที่จะนำวัสดุเซลลูโลสที่มีอยู่มากมายนี้เปลี่ยนแปลงให้เป็นวัสดุที่มีประโยชน์มากขึ้น เช่น แปรเปลี่ยนให้เป็นเชื้อเพลิง อาหารและสารเคมีอื่น ๆ เป็นต้น โดยเฉพาะซังข้าวโพดที่มีอยู่มากในประเทศไทย เพื่อช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้อีกด้วย

Lenartovicz และคณะ (2003) ทำการศึกษาโดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ใน submerged culture โดยการใช้แป้งซังข้าวโพดแทนการใช้ไซแลน จะสามารถเพิ่มการหลั่งของเอนไซม์ได้ โดยระดับการผลิตเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส ที่สูงที่ 45 ยูนิต/มิลลิลิตร หรือ 360 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน โดยการใช้ซังข้าวโพดร้อยละ 3 โดยมีการเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงและเป็นผลช่วยให้เอนไซม์หลั่งออกมาภายนอกเซลล์เป็นปริมาณมาก

Panagiotu และคณะ (2003) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะอาหารแข็งโดยใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน จากเชื้อ *Fusarium oxysporum* โดยพบว่าเชื้อจะผลิต multiple enzyme จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 1216 ยูนิต/กรัม ในชั่วโมงที่ 144 โดยที่เอนไซม์เซลลูเลสจะผลิตในปริมาณน้อย 3.9 ยูนิต/กรัม เมื่อสารตั้งต้นมีความชื้นอย่างน้อย ร้อยละ 80 ที่ค่า pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

Purkarthofer (1993) ได้ทำการทดลองการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จาก *T. langinosus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการหมักในสภาวะอาหารแข็งแบบ static ที่มีความชื้นร้อยละ 70 พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ถึง 20,200 ยูนิต/กรัม โดยไม่พบเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งค่ากิจกรรมในการหมักมากกว่าการหมักโดยใช้สภาวะอาหารเหลว

Gome และคณะ (1993) ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *T. langinosus* โดยใช้สารตั้งต้นเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร คือ เปลือกข้าวบาร์เล่ย์ บิชวูด ซังข้าวโพด ต้นข้าวโพด ใบข้าวโพด ใยของปอ เปลือกข้าว รำข้าวสาลี ฟางข้าวสาลี ที่นำมาบดก่อน (รูปที่ 2.8) แล้วจึงเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ 50 องศาเซลเซียส พบว่าซังข้าวโพดเป็นสารตั้งต้นที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ค่ากิจกรรม 1,438 ยูนิต/มิลลิตร โดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่ 7 วัน

รูปที่ 2.8 ลักษณะของซังข้าวโพดบดละเอียด

ที่มา : http://produto.mercadolivre.com.br/MLB-30254683--_JM

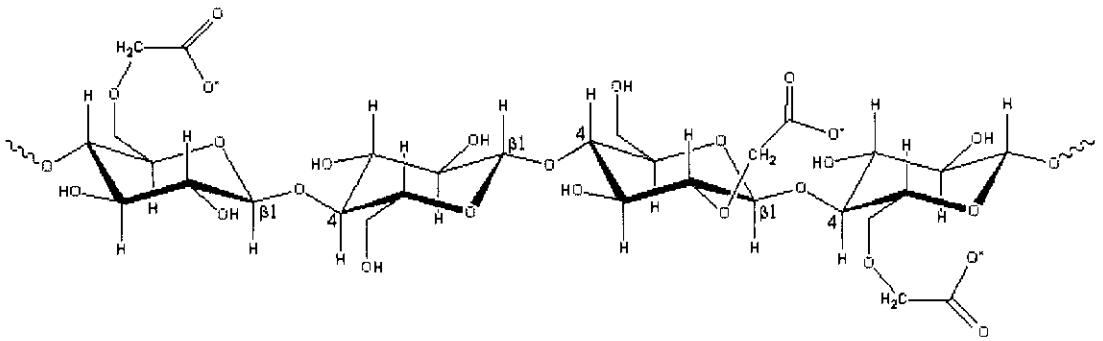
2.3 Carboxymethylcellulose (CMC)

2.3.1 แหล่งที่พบ

คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (CMC; E.C. 4.6.6) หรือ โซเดียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (sodium carboxymethylcellulose) เป็นสารที่ดัดแปลงมาจากเซลลูโลส โดยประกอบมาจากเซลลูโลสทำปฏิกิริยากับด่าง (alkali) และกรดคลอโรอะซิตริก (Chloroacetic acid) เป็นสารจำพวกเซลลูโลสอีเทอร์ชนิดหนึ่งสามารถสังเคราะห์ ได้จากการทำปฏิกิริยาของแอลฟา-เซลลูโลสปริมาณสูงกับอีเธอริไฟอิง เอเจนต์ (etherifying agent) ในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งในบรรดาสารจำพวกเซลลูโลสอีเทอร์ เยื่อเซลลูโลสคุณภาพสูงจำพวกเซลลูโลสอีเทอร์ (cellulose ethers) ที่เป็นวัตถุดิบในการเตรียมซีเอ็มซี นั้น ในต่างประเทศส่วนใหญ่ผลิตจากไม้ยืนต้น จำพวกสน และยูคาลิปตัส ทั้งนี้เนื่องจากการผลิตในเชิงอุตาหกรรมขนาดใหญ่จำเป็นต้องควบคุมคุณภาพเยื่อเซลลูโลสที่ได้ให้คงที่จึงจำเป็นต้องใช้วัตถุดิบจำนวนมาก เนื่องจากหากใช้วัตถุดิบจำพวกพืชไร่ที่มีคุณภาพและปริมาณแตกต่างกันไปจากหลายๆ แหล่งจะทำให้ได้เยื่อเซลลูโลสที่มีสมบัติไม่คงที่

โดยโครงสร้างของคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส มีโครงสร้างหลัก คือ สายโพลิเมอร์ของเซลลูโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-D-glucopyranose โดยการเตรียมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสที่แตกต่างกันอาจจะทำให้ลำดับของการเข้าแทนที่ (subsitution) ต่างกัน แต่โดยทั่วไปแล้วอยู่ในช่วงของการเปลี่ยนแปลงที่ 0.6-0.95 ต่อหน่วยโมโนเมอร์ (monomer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 โครงสร้างคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส

ที่มา : http://www.lsbu.ac.uk/water/hycmc.html

2.3.2 โครงสร้างโมเลกุล

โมเลกุลของคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส โดยเฉลี่ยแล้วจะเป็นสายสั้นเป็นส่วนใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับเซลลูโลสที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยหมู่ที่เข้าแทนที่มีทั้งสายยาวและสายสั้นไม่เท่ากัน โดยส่วนที่เข้าแทนที่มักเชื่อมต่อกันด้วย 2-O- และ 6-O-linked ตามด้วยการจัดสายข้างที่สำคัญต่างๆ ด้วยพันธะ 2, 6-di-O- จากนั้นตามด้วยพันธะ 3-O-3, 6-di-O, 2, 3-di-O- ส่วนสุดท้าย คือ 2, 3 6-tri-O-linked ซึ่งพันธะนี้จะปรากฏขึ้นเมื่อหมู่เข้าแทนที่การเชื่อมต่อกันอย่างอ่อน (ภายในอนุพันธ์) เมื่อเปรียบเทียบกับการเชื่อมต่ออย่างสุ่ม (random process) ซึ่งจะเชื่อมต่อกันอย่างอ่อนกว่าการเชื่อมต่อกับหมู่แทนที่สามตัว (trisubstituted)

โมเลกุลของคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสส่วนมากจะเป็นลักษณะขยายออกคล้ายท่อน (rod-like) ที่ความเข้มข้นต่ำๆ แต่ถ้าหากว่ามีความเข้มข้นสูงขึ้น โมเลกุลจะมีการซ้อนทับกันแล้วม้วนตัวขึ้นเป็นขดวง (coil up) โดยจุดที่มีความเข้มข้นสูงมากๆขึ้น โมเลกุลที่พันทบกันจะกลายมาเป็นลักษณะที่เป็นเจลสมมาตรที่ทนร้อน (thermoreversible gel) เมื่อมีการเพิ่มไอออน (ionic) และมีการลดค่า pH ลงไปพร้อมๆกัน จะช่วยลดความหนืดซึ่งเป็นเหตุมาจากสายโพลีเมอร์ที่มีลักษณะเป็นขดวง (coil)

2.3.3 หน้าที่และความสำคัญ

คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสมีความสามารถละลายได้อย่างรวดเร็วในน้ำเย็น (cool water) และส่วนใหญ่นำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมความหนืด (viscosity) โดยจะทำไม่ให้เกิดลักษณะที่เป็นเจล (gelling) ที่ความเข้มข้นของตัวอย่าง (ไม่เกิดลักษณะที่เป็นเจลเกิดขึ้น แม้ว่าจะมีไอออนของแคลเซียมอยู่ในสารละลาย) เมื่อผลิตภัณฑ์มีความหนืดลดลงขณะที่ให้ความร้อนโดยคาร์บอกซี-เมทธิลเซลลูโลสจะช่วยทำให้ปริมาตรที่ได้มากขึ้นในระหว่างการให้ความร้อนโดยการเกิดฟองแก๊ส (gas bubble formation) ช่วยให้มีการทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น

นอกจากนี้คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสจะช่วยในการควบคุมความหนืดโดยจะช่วยให้สารละลายมีความเข้มข้นขึ้น (thickener) รวมตัวกันได้ดีขึ้น (phase) และเป็นอิมัลชันช่วยในการคง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัว (ยกตัวอย่างเช่น คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสถูกใช้เป็นอิมัลติฟายเออร์ระหว่างน้ำนมกับเคซีน) และยังทำหน้าที่เป็นตัวทำละลาย

คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสสามารถที่จะนำไปใช้ในการช่วยเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะของน้ำ (water-holding capacity) ให้มากขึ้นแม้จะมีความเข้มข้นต่ำ โดยเฉพาะเมื่อใช้ในรูปของเกลือแคลเซียม (Ca^{2+}) ดังนั้นคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสจึงถูกใช้ในการยับยั้งการเน่าเสีย (staling) และช่วยลดปริมาณไขมัน (fat)ในอาหารจำพวกทอด

ค่าเฉลี่ยของความยาวสายและลำดับของหมู่แทนที่มีความสำคัญมาก คือ มีหมู่แทนที่ที่เป็นหมู่ที่มีส่วนที่ชอบน้ำมากๆ (more-hydrophobic) ปริมาณน้อย คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสจะเป็นในลักษณะไตรออกโทรปิก (thixotropic) (คือ ของเหลวที่มีการตอบสนองอัตราความเครียดจากแรงเฉือน โดยขึ้นอยู่กับเวลา ซึ่งจะมีลักษณะเป็นของเหลวเมื่อมีการเขย่าและจะมีลักษณะเป็นของแข็งเมื่อไม่มีการเขย่า) ถ้าหมู่แทนที่มีความยาวมากๆในคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสจะทำให้มีลักษณะเป็นซูโดพลาสติก (psedoplastic) (ซูโดพลาสติก คือ เป็นวัตถุ (material) ซึ่งจะมีความสามารถในการลดและการเพิ่มความหนืดอย่างฉับพลันตามอัตราความเครียดของแรงเฉือน ซึ่งจะสามารถทำให้สูบออก (pump) และรวมกัน (mix) ได้ง่าย ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้แรงเฉือนเบาบางลงได้ (shear-thinning) และที่ค่า pH ต่ำ) คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสอาจจะก่อรูปโดยเชื่อมโยงระหว่างกรดคาร์บอกซิลิกกับหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นอิสระ

2.4 การย่อยสลายไซแลน

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

2.4.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยสารเคมี

2.4.1.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด

การย่อยสลายไซแลนด้วยกรดเพื่อผลิตน้ำตาลไซโลสเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นรุนแรงและไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่บริสุทธิ์และเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษ เช่น เฟอร์ฟูรัล ซึ่งมีผลต่อการนำมาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ทนต่อความเป็นกรดและอุณหภูมิที่สูง

2.4.1.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง

การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการทำกระดาษ ซึ่งจะนำชิ้นของเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เพื่อให้เปลือกไม้ยุ่ย และเป็นการกำจัดลิกนินที่อยู่ในชั้นลิกโนเซลลูโลสออกไปบางส่วน หลังจากนั้นนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยใช้สารเคมีที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น คลอรีนไดออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(chlorinedioxide) ก๊าซคลอรีน เป็นต้น แต่วิธีนี้ทำให้เกิดสารประกอบไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบคลอไรด์ที่เป็นพิษชนิดอื่น ๆ

2.4.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะมากกว่าการใช้สารเคมีและไม่ทำให้เกิดสารประกอบเป็นพิษ เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประเภท เช่น กระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมอาหาร เช่น การทำน้ำผลไม้ให้ใสขึ้นและใช้ลดความหนืดของอาหารสัตว์ (Wong และ Saddler, 1992) กระบวนการย่อยสลายไซแลนของจุลินทรีย์นี้เรียกว่า ระบบของเอนไซม์ไซลาโนไลติก (xylanolytic enzyme system) เกิดในกระบวนการหมัก (ตารางที่ 2.1) โดยเกิดการสลายแขนงของหมู่อะซิลติลในโครงสร้างของไซแลน

ตารางที่ 2.1 ความสามารถในการหมักของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยเกิดผ่านระบบของเอนไซม์ไซลาโนไลติก

Microorganisms	Fermentation ability	Rej
Aureobasidium pullulans	Xylose → ethanol[a]	B
Candida shehatae	Xylose → ethanol[a]	B
Clostridium themocellum	Xylose → ethanol,acetic acid,lactic acid	10
Clostridium themohydrosulfuricium	Xylose → ethanol	10
Clostridium themosaccharolyticum	Xylose → ethanol	41
Cryptococcus albidus	Xylose → triglycerides	42
Fusarium oxsporum	Xylose → ethanol[a]	43
Monilia sp.	Xylose → ethanol	30
Neurospora crassa	Xylose → ethanol	44
Pichia stipitis	Xylose → ethanol	b
Themoanaerobacter ethanolicus	Xylose → ethanol,acetic acid,lactic acid	10
Themoanaerobium brockii	Xylose → ethanol,acetic acid,lactic acid	10
Thermoanaerobium, themoanaerobacter And *themobacteroides* species	Xylose → ethanol,acetic acid,lactic acid	45
Themobacteroides acetoethylicus	Xylose → ethanol,acetic acid,lactic acid	10

[a]Direct fermentation of xylan to ehtanol has not been demonstrated with these species.

[b]H. Lee,P.Biely and H. Scheider, unpublished.

ที่มา : Biely (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.1 ไซลาโนไลติกเอนไซม์ (xylanolytic enzymes , mutiple xylanase enzyme)

ไซลาโนไลติกหรือมัลติเปิลไซลาเนสเอนไซม์เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเฮมิเซลลูโลส ไซลาโนไลติกเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.4.2.1.1 กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลัก

2.4.2.1.1.1 บีต้า-1,4-เอนโดไซลาเนส (1,4-β-D-xylan xylohydrolase; E.C. 3.2.1.8) หรือเอนไซม์เอนโด–บีต้า-1,4-ไซลาเนส (endo-β-1,4-xylanase) ย่อยสลายพันธะบีต้า-1, 4-ไกลโคสิดิก ภายในเส้นสายของไซแลนอย่างสุ่ม การย่อยสลายขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น เช่น ความยาวของสายไซแลนและจำนวนโซ่กิ่ง ในช่วงแรกของการย่อยสลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ เมื่อเกิดการย่อยสลายต่อไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จะถูกย่อยสลายเป็นไซโลไตรโอส ไซโลไบโอส และไซโลส ตามลำดับ (Sunna และ Antranikian, 1997) สามารถจำแนกเอนไซม์ชนิดนี้ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ family 10 และ family 11 โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน (Henrissat และ Bairoch, 1993) โดยเอนไซม์เอนโด-β-1,4-ไซลาเนสทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันทั้งมวลโมเลกุลชนิดของสับสเตรทที่ย่อย และผลผลิตที่ได้จากการย่อย (Biely และคณะ, 1985) เอนไซม์ทั้งสองกลุ่มมีโครงสร้างแบบขดทบเป็นก้อน (tertiary structure) โดย family 10 มีมวลโมเลกุลประมาณ 48 กิโลดาลตัล การขดทบเกิดที่ตำแหน่ง α กับβ (Derewenda และคณะ, 1994) ส่วน family 11 ขนาดเล็กกว่า โดยมีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 19-31 กิโลดาลตัล การขดทบเกิดที่ตำแหน่ง β (Vroenmen และคณะ, 1995)

2.4.2.1.1.2 บีต้า-ไซโลซิเดส (β-D-xyloside xylohydrolase ; E.C. 3.2.1.37) เป็น exoglycosidase ที่ย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ และ ไซโลไบโอสจากปลายด้าน non-reducing และสามารถย่อยสลายสับสเตรทสังเคราะห์ (artificial substrate) เช่น p-nitrophenyl-β-D-xyloside การทำงานของเอนไซม์บีต้าไซโลซิเดสต่อการย่อยสลายสารไซโลโอลิโกแซ็คคาไรด์ลดลงเมื่อสายของไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายไซแลนได้แต่อัตราการย่อยสลายเกิดได้ช้ามาก โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส (Kormelink และคณะ, 1993)

เอนไซม์เอนโด-บีต้า-1,4-ไซลาเนสก็จะย่อยภายในโครงสร้างหลักของไซแลนที่เป็นพอลิเมอร์ไปเป็นสารประกอบพวกไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharides) ที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับระดับของการเกิดพอลิเมอร์ของไซแลนแต่ละชนิด และเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสก็จะย่อยส่วนที่เป็น nonreducing ออกจาก D-xylose โดยเอนไซม์จะทำงานร่วมกัน (ดังรูปที่ 2.10)

2.4.2.1.2 กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างที่เป็นสายโซ่กิ่ง

โดยเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยส่วนที่เป็นแขนงออกจากโครงสร้างหลักของไซแลน ได้แก่เอนไซม์แอลฟา-อะราบิโนฟูแรนโนซิเดส (α-arabinofuranosidases; E.C. 3.2.1.55)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์อะซิทิลเอสเทอเรส (acetylesterases; E.C. 3.1.1.6) เอนไซม์แอลฟา-เมทิลกลูคูโรโนซิเดส (α-methylglucurono sidases) เอนไซม์ดังกล่าวจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับแขนงเพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นแขนงออกจากโครงสร้างหลัก

2.4.2.1.2.1 แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส (α-L-arabinofuranosidase; E.C. 3.2.1.55) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายไซแลนโดยเฉพาะไซแลนในไม้เนื้ออ่อน อะราบิโนฟูราโนซิเดสแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. exo-acting α-L-arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.55) สามารถย่อยสลาย nitrophenyl α-L-arabinofuranoside และสาขาของอะราบิแนน

2. endo-1,5-α-L-arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.99) โดยมีผลเฉพาะต่ออะราบิแนนที่เป็นเส้นตรงเท่านั้น

การทำงานร่วมกันของแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดสกับไซลาเนสทำให้ได้โซโลส ไซโลไบโอส และอะราบิโนส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนเพิ่มขึ้น (Kormelinkn และคณะ, 1993)

2.4.2.1.2.2 แอลฟา-เมทธิลกลูคูโรนิเดส (α-methylglucuronidase; E.C. 3.2.1.139) ย่อยสลาย α-1, 2-linkage ระหว่างไซโลสและกรดดี-กลูคูโรนิก หรือ 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิก พบในกลูคูโรโนไซแลน ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์แอลฟา-กลูคูโรนิเดสขึ้นอยู่กับแหล่งของเอนไซม์ (Kormelink และคณะ, 1993)

2.4.2.1.2.3 อะซิทิลไซแลนเอสเทอเรส (acetylxylan esterase; E.C. 3.1.1.6) ย่อยสลายพันธะระหว่าง O-acetyl residue ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ในสายอะซิติลไซแลน (Kormelink และคณะ, 1993)

การย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์ยังต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ (รูปที่ 2.10) ได้แก่ แอลฟา-ดี-กลูคูโรโนสิเดส (α-D-glucuronosidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ในกรด4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิก แอลฟา-แอล-อะราบิโนสิเดส (α-L-arabinosidase) ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,3 ของหมู่นอนรีดิวซ์-แอลฟา-แอล-อะราบิโนส ได้น้ำตาลอะราบิโนส

2.5 ความจำเพาะต่อสับสเตรท

เอนไซม์ไซลาเนสประกอบด้วย catalytic domain และ non- catalytic xylan-binding domain (XBD) ซึ่งมีความจำเพาะต่อการจับกับไซแลนที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ และเป็นส่วนสำคัญในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท โดยทำหน้าที่ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทบนเอนไซม์ ซึ่งส่วนที่เป็น XBD แยกจากบริเวณ catalytic domain อย่างชัดเจน XBD พบน้อยมากในธรรมชาติ ปัจจุบันยังไม่มีการจัดกลุ่ม XBD เนื่องจากยังค้นพบไม่มาก XBD มีบทบาทสำคัญใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
67295

การช่วยย่อยสลายสารประกอบไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่ช่วยให้การย่อยสลายไซแลนในเยื่อกระดาษมีประสิทธิภาพมากขึ้น และคุณสมบัติของส่วนที่ยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำจะช่วยส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ต่อสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำเพิ่มขึ้น โดยช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท (Fernandes และคณะ, 1999)

โดยทั่วไปไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ มีสับสเตรทเป็นไซแลน แต่ไซแลนจากพืชต่างชนิดกันมีองค์ประกอบแตกต่างกัน โดยเฉพาะมีความแปรผันที่สายโซ่ข้างดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น ดังนั้นไซลาเนสจึงมีความจำเพาะต่อไซแลนจากพืชต่างชนิดกันแตกต่างกันและแหล่งของเอนไซม์ไซลาเนสอาจมีผลทำให้เกิดความหลากหลายของความจำเพาะต่อชนิดของไซแลนเช่นกัน โดยเมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทแล้วได้ผลผลิต โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรทและให้ผลผลิตที่แตกต่างกันไป

Kubata และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลผลิตที่ได้จากการย่อยสับสเตรทด้วยเอนไซม์ไซลาเนส IV (xylanase IV) ซึ่งได้จากการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จาก *Aeromonas caviae* สายพันธุ์ ME-1 สามารถย่อยไซแลนจากโอ๊ก ได้ผลผลิตเพียงอย่างเดียวคือ ไซโลเตตระโอส (xylotetraose)

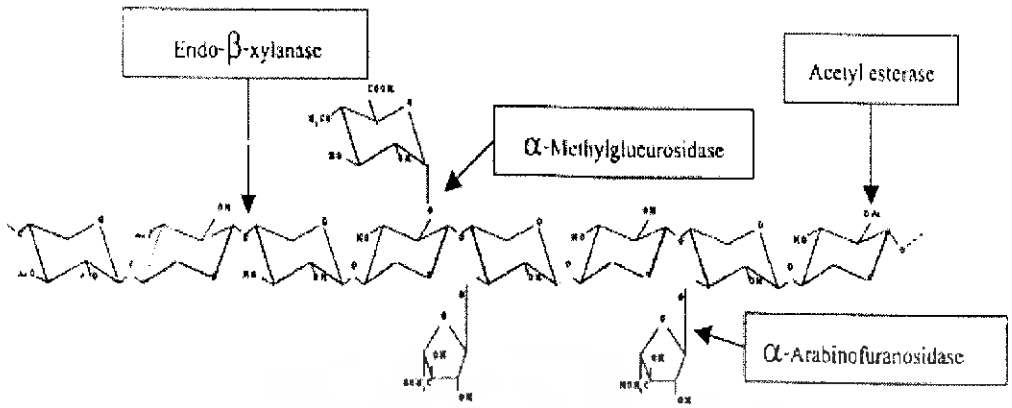
Kang และคณะ (1996) ได้ศึกษาผลผลิตที่ได้จากการย่อยสับสเตรทด้วยเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อรา *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 สามารถย่อยไซแลนจากต้นเบิร์ชให้ผลผลิตหลักคือ ไซโลไบโอส (xylobiose) และผลผลิตรองลงมาคือ ไซโลไตรโอส และไซโลเฮกโซส (xylohexose)

Lin และคณะ (1999) ได้ศึกษากลไกการย่อยไซแลนจากน้ำตาล xylooligosaccharide ด้วยเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งทำให้บริสุทธิ์แล้วจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* สายพันธุ์ SSBP โดยใช้ไซแลนจากต้นเบิร์ช ไซโลไตรโอส และไซโลเตตราโอส เป็นสับสเตรท ได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นไซโลไบโอส กลไกการย่อยเกิดขึ้นดังนี้ เมื่อเอนไซม์ย่อยไซแลนได้ผลผลิตเป็นไซโลไตรโอส จากนั้นไซโลไตรโอส 2 โมเลกุลจะมาเชื่อมต่อกันเกิดเป็นไซโลเฮกโซสด้วยเอนไซม์ทรานไกลโค-ซิเดส (transglycosidase) จากนั้นไซโลเฮกโซสจะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วด้วยเอนไซม์เอนโดไซลาเนส (endo-xylanase) เกิดเป็นไซโลไอโอส 3 โมเลกุล หรือเกิดเป็นไซโลเตตระโอสและไซโลส จากนั้นไซโลเตตระโอสจะถูกย่อยสลายไปเป็นไซโลสในที่สุด

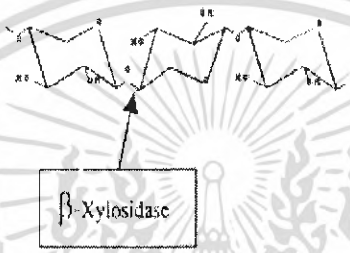
Gioris และคณะ (2002) ได้ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของสับสเตรทของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ S38 สามารถแยกเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์ได้ 3 ชนิด คือ Xy11 Xy12 และ Xy13 ศึกษาเปรียบเทียบการย่อยสับสเตรท 2 ชนิด ได้แก่ ไซแลนจากโอ๊ต และไซแลนจากต้นเบิร์ช พบว่า Xy11 ย่อยไซแลนจากต้นเบิร์ช ได้ดีกว่า Xy12 และ Xy13 ในขณะที่ Xy12 และ Xy13 ย่อยไซแลนจากโอ๊ตได้ดีกว่า Xy11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.



ข.



Ac คือ Acetyl group

รูปที่ 2.10 การย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ไซลาเนส

ที่มา : Sunna และ Antranikian (1997)

2.6 การก่อกลายพันธุ์

2.6.1 ประวัติของการศึกษาเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ (mutation)

มีความเชื่อว่าความแปรปรวนทั้งหลายที่เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตจนถึงกับได้พวกใหม่หรือสายพันธุ์ใหม่นั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทีละเล็กทีละน้อยแบบค่อยเป็นค่อยไปจนกระทั่งถึงปลายคริสต์ศตรรษที่ 19 Hugo De Vries นักพฤษศาสตร์ชาวเนเธอร์แลนด์ได้พบความจริงซึ่งแตกต่างจากข้อเสนอของดาร์วิน ทั้งนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้เรียกการเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้ว่า การกลายพันธุ์

2.6.2 ความหมายของการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับหน่วยควบคุมลักษณะเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ฉับพลันและพืชหรือสัตว์สามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงอันนี้จะรวมไปถึงการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม แต่คำว่าการกลายพันธุ์ในปัจจุบันมักจะหมายความถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนจากสภาพหนึ่งไปยังอีกสภาพหนึ่ง ดังนั้นอาจเรียกการเปลี่ยนแปลงอันว่า gene หรือ point mutation ซึ่งเป็นการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของดีเอ็นเอ คือ นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ชนิดหนึ่งเข้าไปแทนที่นิวคลีโอไทด์อีกชนิดหนึ่ง การเปลี่ยนแปลงทางกรรมพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับลักษณะรูปร่างทั่วไป หรือเกี่ยวกับลักษณะทางสรีระหรือทางชีวเคมีหรือลักษณะทางพฤติกรรมของสปีชีส์กลายพันธุ์เป็นสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิตและเป็นกลไกสำคัญอันดับแรกที่ทำให้เกิดความแปรผันในองค์ประกอบทางพันธุกรรม (genetic variation) อันเป็นพื้นฐานจำเป็นสำหรับกระบวนการวิวัฒนาการ

2.6.3 ชนิดของการกลายพันธุ์

ชนิดของการกลายพันธุ์ที่ศึกษากันมักเป็นพวกที่แสดงออกมาให้เห็นในรูปของลักษณะอย่างชัดเจน ตัวอย่างของการกลายพันธุ์ชนิดนี้ ได้แก่ ลักษณะตาสีขาว ปีกสั้น ปีกกุด ฯลฯ ของแมลงหวี่ ดังนั้นเราจึงเรียกกลายพันธุ์ดังกล่าวว่าเป็นพวกที่สังเกตุได้ (visible) ซึ่งมีอยู่ราวร้อยละ 1 ของการกลายพันธุ์ทั้งหมดและไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่สิ่งมีชีวิตมากนัก แต่การกลายพันธุ์ส่วนใหญ่คือราวร้อยละ 80 ได้แก่พวกแสดงผลในทางเสื่อม (detrimental) ซึ่งไม่อาจตรวจผลได้แน่ชัด แต่เข้าใจว่าจะกระทบกระเทือนต่อการเจริญเติบโตของพืชหรือสัตว์ได้อย่างมาก ในการกลายพันธุ์ชนิดนี้ยีนที่เปลี่ยนไปแต่ละยีนก่อผลเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อรวมผลของทุกยีนก็จะมีความรุนแรงขึ้น การกลายพันธุ์อีกพวกหนึ่งคือพวกก่อผลถึงตาย (lethal) ซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 19 ถ้าอยู่ในลักษณะ homozygous การกลายพันธุ์ชนิดนี้จะกระทบกระเทือนต่อขบวนการทางสรีระจนพืชหรือสัตว์ไม่อาจจะมีชีวิตอยู่ได้

ในสิ่งมีชีวิตพวก haploid เช่น เชื้อราในประเภท recessive lethal จะก่อผลถึงตาย ในสิ่งมีชีวิตพวกนี้มียีนที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงอีกประเภทหนึ่งซึ่งไม่ก่อผลถึงตาย เรียกยีนนี้ว่า conditional lethal ตัวอย่างเช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิดของเชื้อรา *Neurospora sp.* อาจเปลี่ยนไปจากเดิม เรียกยีนที่เปลี่ยนไปนี้ว่าเป็น conditional lethal ทั้งนี้เชื้อราที่มียีนนี้จะไม่เจริญหรือขยายพันธุ์ในอาหาร minimal medium แต่กลับเจริญตามปกติเมื่อเสริมกรดอะมิโนบางชนิดลงไปในอาหาร selective medium

2.6.3.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (spontaneous mutation)

การกลายพันธุ์ชนิดนี้เป็นผลมาจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทัวโทเมอริกชิฟท์ (tautomeric shift) หรือการก่อให้เกิดไอออน (ionization) ในโมเลกุลของเบสดีเอ็นเอ มีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (ประดิษฐ์, 2543) การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีอัตราต่ำมาก อัตราโดยเฉลี่ยประมาณ 10^{-5}–10^{-10} ต่อเซลล์ต่อรุ่นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมโดยแตกต่างกันออกไปตามแต่ละตำแหน่งและชนิดของยีนและชนิดของสิ่งมีชีวิต (ประดิษฐ์, 2536) (ดังตารางที่ 2.2) ยีนที่เกิดการกลายพันธุ์เกิดในทางไปข้างหน้า (forward mutation : จากลักษณะเด่นไปเป็นด้อย) คือลักษณะปกติเปลี่ยนไปเป็นลักษณะกลายหรืออาจเกิดขึ้นในทางกลับกัน (back mutation หรือ reverse mutation : จากลักษณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้อยไปเป็นเด่น) คือจากยีนสายพันธุ์กลายเปลี่ยนกลับไปเป็นยีนปกติตามเดิม (วิสุทธิ์, 2533) อย่างไรก็ดีนับว่าเป็นการ กลายพันธุ์ที่มีความสำคัญและก่อให้เกิดวิวัฒนาการขึ้นในสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ายีนแทบทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ นั้นเคยผ่านการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดการกลายพันธุ์มาแล้วในอดีต จากการคัดเลือกอันเข้มงวดของธรรมชาติ ยีนซึ่งก่อผลในทางเสื่อมนั้นจะค่อยๆ หายไปจากหมู่ประชากรของพืชและสัตว์ โดยเมื่อปราศจากการกลายพันธุ์ในธรรมชาติแล้วก็แทบจะกล่าวได้ว่า สิ่งมีชีวิตไม่อาจดำรงเผ่าพันธุ์หรือมีวิวัฒนาการมาจนถึงทุกวันนี้

จากการศึกษาอัตราของการกลายพันธุ์ของยีนต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงของยีนไปยังสภาพอื่นและการเปลี่ยนแปลงกับสู่สภาพเดิมนั้นมีอัตราการเกิดไม่เท่ากัน นอกจากนั้นยีนของพืชและสัตว์ชั้นสูงมีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่ายีนของแบคทีเรียและไวรัส

2.6.3.2 การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการกระตุ้น (induced mutation)

นอกจากจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแล้ว การกลายพันธุ์ก็อาจจะถูกทำให้เกิดขึ้นได้โดยใช้วิธีการกระตุ้น โดยได้เริ่มใช้รังสีเอกซ์ (X-rays) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ พบว่าอัตราของการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจะสูงกว่าพวกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติถึงราว 150 เท่า ต่อมาได้พบว่ารังสีเอกซ์นี้ได้ก่อให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) โดยการใช้รังสีเอกซ์มักจะก่อผลในทางเสื่อม และการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนั้นอาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม บางยีนอาจถูกทำลายก็ได้หรือบางส่วนของโครโมโซมอาจขาดหายไป

2.6.4 สิ่งที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagens)

2.6.4.1 สิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen)

1. อุณหภูมิ
2. รังสี
3. แสง

2.6.4.1.1 อุณหภูมิ จากการทดลองเลี้ยงแมลงหวี่ในอุณหภูมิต่าง ๆ กัน พบว่ายีนด้อยที่ทำให้การตายบนโครโมโซม X (sex linked rescessive lethal gene) ในอัตราที่แตกต่างกันดังนี้

อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เกิดร้อยละ 0.87

22 องศาเซลเซียส เกิดร้อยละ 0.188

28 องศาเซลเซียส เกิดร้อยละ 0.325

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 อัตราการเกิดการกลายพันธุ์โดยยีนตามสภาพธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตต่างๆ

สิ่งมีชีวิต	อัตราการเกิดการกลายพันธุ์
ฟาจก์ (T4)	
SM23	$1x10^{-4}$
SM37	$3x10^{-5}$
UV102	$1x10^{-6}$
SM32	$2x10^{-7}$
UV248	$1x10^{-8}$
UV237	$1x10^{-9}$
แบคทีเรีย (*Escherichia coli*)	
ยีนดื้อต่อยาสเตรปโตมัยซิน	$4x10^{-4}$
ยีนที่ต้องการฮิสทิดีน	$2x10^{-6}$
ราขนมปัง (*Neuraspora crassa*)	
ยีนที่ไม่ต้องการสารอโนซิตอล	$1.5x10^{-5}$
ยีนที่ไม่ต้องการสารอะดีนีน	$4.3x10^{-5}$
ยีสต์ *(Saccharomyces cerevisiae)*	
ยีนที่ไม่ต้องการสารอาจินีน	$9.3x10^{-7}$
ยีนที่ไม่ต้องการสารฮิสทิดีน	$3x10^{-9}$
แมลงหวี่ (*Drosophilla melanogaster*)	
ตัวสีเหลือง	$1.2x10^{-4}$
ตัวสีขาว	$2.9x10^{-5}$
มนุษย์ (Homo sapiens)	
กระดูกเล็ก (เตี้ย-แคระ)	$3x10^{-5}$
เป็นใบ้	$1.1x10^{-5}$
ตาบอดสี	$2.8x10^{-5}$
ผิวเผือก	$3.7x10^{-5}$
กล้ามเนื้อแขนขาลีบ	$5x10^{-6}$
ข้าวโพด (*Zea mays*)	
เมล็ดสีแดง	$4.92x10^{-4}$
เมล็ดสีม่วง	$1.1x10^{-5}$

ที่มา : วิสุทธิ์ (2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.4.1.2 รังสีและแสง เป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ สามารถแบ่งแสงและรังสีตามช่วงความยาวคลื่นออกเป็นพวก ๆ ดังนี้

10^{-4}-10^{-1} ซม. คลื่นวิทยุ

10^{-2}-10^{-3}ซม. แสงอินฟราเรด (infrared)

10^{-4}ซม. แสงที่มองเห็น

10^{-5}-10^{-6}ซม. แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet)

10^{-7}-10^{-8}ซม. รังสีเอกซ์(X-rays)

10^{-9}-10^{-10}ซม. รังสีแกมมา (gaมิลลิโมลาร์a rays)

10^{-11}ซม. รังสีคอสมิค (cosmic rays)

คลื่นวิทยุ แสงและรังสี คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีช่วงความยาวคลื่นขนาดต่างๆกัน โดยคลื่นวิทยุเป็นคลื่นที่ยาวมาก คือ มีความยาวระหว่าง 10^{-4}–10^{-1}ซม. และช่วงแสงที่เรามองเห็นมีช่วงคลื่น 10^{-4} ซม. (1ไมครอน) คลื่นที่มีช่วงสั้นกว่านี้เช่น แสงอัลตราไวโอเลต รังสีเอกซ์ จัดว่าเป็นคลื่นที่มีพลังงานสูง ทั้งนี้เมื่อช่วงคลื่นยิ่งสั้นลงพลังงานก็ยิ่งสูงขึ้น การที่แสงบางอย่างและรังสีมีพลังงานสูงจึงสามารถแทรกซึมวัตถุและก่อผลให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งเราอาจจะแยกคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าและพลังงานในรูปมวลจากสารที่อาจแผ่รังสี (radioactive isotope)) ออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ

รังสี (ionizing radiation) คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหรือพลังงานในรูปมวลที่มีพลังงานสูงเมื่อกระทบกับเป้าแล้วจะทำให้มีการผลิตอิออน(ions) และรังสีนี้จัดเป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมสูง

แสง (nonionizing radiation) คือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีพลังงานไม่สูงพอที่จะทำให้มีการผลิตอิออน และเป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมต่ำ

2.6.4.1.2.1 รังสี (ionizing radiation)

รังสีมีอยู่หลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดอาจมีแหล่งที่เกิดและแรงแทรกซึมแตกต่างกัน รังสีเหล่านี้ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีคอสมิค รังสีแอลฟา รังสีเบตาและนิวตรอน รังสีบางชนิดในจำนวนนี้ได้จากการแผ่รังสีของธาตุที่อาจแผ่รังสีได้ (radioactive elements) เช่น รังสีแอลฟาซึ่งประกอบด้วยโปรตอนและนิวตรอน และรังสีเบตาซึ่งประกอบด้วยอิเลกตรอน เป็นต้น

การกลายพันธุ์โดยวิธีการที่ทำให้เกิดอิออน ทั้งนี้เมื่อรังสีวิ่งไปกระทบกับอะตอมของวัตถุก็จะทำให้อะตอมนั้นยิงอิเลกตรอนออกไป หลังจากสูญเสียอิเลกตรอนไปแล้ว ทั้งนี้เป็นเพราะมีอิเลกตรอนอยู่ 1 หน่วยนั่นเอง ดังนั้นอิเลกตรอนที่ถูกยิงออกไปจะถูกจับไว้โดยอะตอมข้างเคียงจึงทำให้อะตอมนั้นกลายเป็นอิออนที่มีประจุลบ ด้วยเหตุนี้เองอิออนจึงเกิดเป็นคู่ๆ เสมอ รังสีอาจก่อให้เกิดกลายพันธุ์ได้หลายวิธี เช่น เมื่ออิออนนั้นอยู่ในส่วนของยีน การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดขึ้นกับอิออนนั้นก็จะทำให้ยีนเปลี่ยนสภาพไป ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือรังสีอาจทำให้น้ำที่มีอยู่ภายในเซลล์ผลิตอิออนของไฮโดรเจน (H^+) และกลุ่มไฮดรอกซิล (OH^-) และไฮโดรเจนจะเกิดการรวมตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับออกซิเจนได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) ซึ่งสารนี้เป็นสารเคมีที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโครโมโซมก็จะทำให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซมหรือเกิดการกลายพันธุ์ของยีนได้

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

ในที่มีออกซิเจน ไฮโดรเจนอะตอมที่เกิดจากโมเลกุลของน้ำจะเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ง่าย ดังปฏิกิริยา

$$H_2 + O_2 \rightarrow H_2O$$

$$H_2O + H_2 \rightarrow H_2O_2$$

$$2H_2 \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

2.6.4.1.2.2 แสง (nonionizing radiation)

คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าช่วงยาวๆ ไม่ทำให้มีการผลิตอิออน ทั้งนี้เพราะพลังงานที่มีอยู่นั้นค่อน ข้างต่ำดังนั้นเราเรียกคลื่นดังกล่าวนี้ว่าแสง แสงที่อาจก่อให้เกิดกลายพันธุ์ได้แก่ แสงอัลตราไวโอเลต (UV) แสงชนิดนี้มีช่วงคลื่นยาวกว่ารังสีเอกซ์ และเนื่องจากมีพลังงานต่ำ แสงอัตราไวโอเลตจึงมีแรงแทรกซึมน้อย และไม่อาจแทรกซึมผ่านส่วนของร่างกายที่มีความหนาแน่นสูงๆ ดังนั้นมักจะใช้กับส่วนเล็กๆของพืช เช่น อับละอองเกสร เป็นต้น หรือใช้กับบางส่วนของไข่แมลงหวี่และมักใช้ได้ผลดีกับเชื้อรา แบคทีเรียและไวรัส แสงอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในส่วนโพลาร์แคป (pola reap) ของไข่แมลงหวี่โดยแสงอัลตราไวโอเลตอาจทำให้โครโมโซมผิดปกติแต่ประสิทธิภาพน้อยกว่ารังสีเอกซ์ (ประดิษฐ์, 2533)

เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตไม่ทำให้มีการผลิตอิออนขึ้น ดังนั้นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นก็เนื่องมาจากเซลล์ดูดแสงเข้าไปโดยตรง ส่วนของเซลล์ที่ดูดแสงได้ดีคือ กรดนิวคลีอิกหรืออาจกล่าวลงไปให้แน่ชัดได้อีกว่า การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเบส โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ไพริมิดีนนั่นเอง เมื่อเบสกระทบกับแสงอัลตราไวโอเลตก็จะทำให้คุณสมบัติการจับเกาะของพันธะ (bond) เปลี่ยนไปคือ ทำให้มีการจับเกาะระหว่างเบสชนิดเดียวกัน เบสที่จับเกาะกันนี้เรียกว่าเป็นไดเมอร์ (dimer) การจับเกาะที่เกิดง่ายที่สุดคือ การจับเกาะระหว่างไทมีน (thymine) ซึ่งทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนในเส้นนิวคลีโอไทด์เส้นเดียวกันก็จะไม่มีการขัดขวางไม่ให้ดีเอ็นเอมีการแบ่งตัว ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนของเส้นตรงกันข้ามจะมีผลทำให้คุณสมบัติในการจับคู่ของไทมีนกับอะดีนีน (thymine กับ adenine : T-A) เปลี่ยนไป ดังนั้นทำให้ไทมีนไปจับกับกัวนีนซึ่งจะยังผลให้ T-A เปลี่ยนไปเป็น C-G ซึ่งจัดเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบทรานซิชั่น (transition) ส่วนไดเมอร์ชนิดอื่นที่พบคือ ไซโตซีนไดเมอร์ (cytosine dimer : C-C) เกิดขึ้นน้อยกว่าพวกแรก ไดเมอร์ชนิดนี้ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการที่ NH_2 ถูกขับออกไปจึงทำให้ได้ยูราซิลไดเมอร์ (uracil dimer : U-U) แต่ยูราซิลจะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับไทมีน ดังนั้นจึงทำให้ G-C เปลี่ยนเป็น A-T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของแสงอัลตราไวโอเลตที่มีต่อสิ่งมีชีวิตคือ มันทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในโครโมโซมและยีน (gene mutation) เช่นเดียวกับการใช้รังสีเอกซ์และขนาดการใช้ที่อาจทำให้เกิดการเปลี่ยน แปลงของยีนได้เท่ากัน โดยที่รังสีเอกซ์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมได้มากกว่า คุณสมบัติอีกประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลตก็คือ ช่วงแสงที่มีช่วงคลื่นต่างกันจะมีผลทางกลายพันธุ์ไม่เท่ากัน ช่วงคลื่นที่มีผลในทางกลายพันธุ์ดี คือ พวกที่ DNA สามารถดูดซับไว้ได้มากแสงอัลตราไวโอเลตไม่สามารถผ่านแก้วได้แต่สามารถทำลายสายตาได้ (Gerald, 1973)

ผลของกลายพันธุ์จากการใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะไม่สอดคล้องกับทฤษฎีการกระทบเป้า (targettheory)ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ (dosage) และอัตรากลายพันธุ์จะไม่เป็นแบบเส้นตรง แต่จากการทดลองจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ปรากฏว่าได้กราฟเส้นโค้งหลายๆ แบบ ก็แสดงว่ากลายพันธุ์ย่อมเกิดจากการกระทบกับเป้าหลายครั้ง การฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นวิธีการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้กับเชื้อรา (ชวนพิศ, 2536) ซึ่งความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์จะใกล้เคียงกับการแผ่แสงอัลตราไวโอเลต โดยความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์จะสามารถคำนวณได้จากอัตราการอยู่รอดของจำนวนโคโลนีภายหลังการฉายแสง ถ้าหากให้แสงอัลตราไวโอเลตสูงขึ้น จะทำให้อัตราการกลายและอัตราการตายเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงให้อัตราการกลายพันธุ์มีความสัมพันธ์กับร้อยละการอยู่รอดของจุลินทรีย์ภายหลังได้รับแสงอัลตราไวโอเลต (Gerald, 1973)

ผลอันน่าสนใจประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลตคือ การเกิด photoreactivation คือผลของการใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะบรรเทาลงหรือหมดไป เมื่อให้เซลล์ถูกกับแสง (visibl light) และมีการค้นพบถึงความผิดปกติที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแสงอัลตราไวโอเลต แสงอัลตราไวโอเลตที่มองเห็นด้วยดาเปล่าสามารถทำให้เซลล์ถูกเปลี่ยนแปลงไปจากสภาพเดิมได้ (Gerald, 1973) ปรากฏการณ์เช่นนี้ได้มีการพบในแบคทีเรียและไวรัส ทั้งนี้เกิดจากการที่มีเอนไซม์บางชนิดเข้าไปตัดให้ไทมีนในไทมีนไดเมอร์แยกจากกัน และทำให้ดีเอ็นเอกลับคืนสู่สภาพเดิม การซ่อมดีเอ็นเอ หรือการทำให้การกลายพันธุ์เปลี่ยนกลับโดยขบวนการที่กล่าวมานี้จะเกิดได้ดีในแสงสีน้ำเงิน

จากการศึกษาการพบว่าใน *Escherichia coli* นั้นอาจมีการขจัดไดเมอร์โดยวิธี dark reactivation ซึ่งหมายถึงว่าปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นโดยไม่ต้องการแสง (visible light) ซึ่งการขจัดแบบนี้พบว่าเกิดจากการที่มีเอนไซม์บางอย่างตัดไดเมอร์จากดีเอ็นเอทิ้ง จากนั้นจะมีนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าไปแทนที่ในส่วนนั้น

การแสดงออกของยีนที่เกิดความล่าช้า เนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ หลายปัจจัยมีดังต่อไปนี้

1. การเกิดการกลายพันธุ์ของยีนนั้น ยังไม่สามารถเกิดได้ทันทีภายหลังจากที่ได้รับแสงอัลตราไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ยีนที่จะกลายพันธุ์ต้องใช้เวลามากกว่าปกติเพื่อให้เกิด metabolic activity ก่อนที่จะเกิดการกลายพันธุ์ต่อไป

3. การแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์จะเกิดขึ้นช้ากว่าปกติ

2.6.4.2. สิ่งก่อการกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen)

ระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามค้นคว้าเพื่อหาว่าสารเคมีชนิดใดที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชหรือสัตว์ทดลอง จนทราบว่าสารเคมีจำนวนมากที่เป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น กรดไนตรัส (nitrous acid) ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Aspergillus* spp. มีรายงานว่าสารไนโตรเจน มัสตาร์ด และซัลเฟอร์มัสตาร์ด สามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ได้ ทั้งนี้สารฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ไดเอธิลซัลเฟต (diethylsulfate) ไดอะโซ-มีเทน (diazomethane) และสารประกอบอื่นๆ ก็เป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และมีผลรุนแรงต่อผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมีสารบางชนิดที่ก่อให้เกิดมะเร็ง

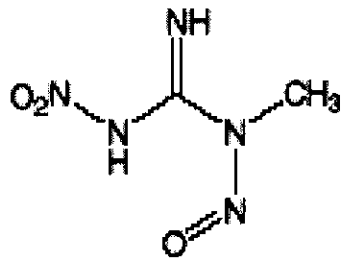
อย่างไรก็ตามสารเคมีบางชนิดอาจมีผลต่อสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งแต่จะไม่ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง สารเคมีบางชนิดอาจจะมีผลในช่วงที่มีการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตหรือมีผลเฉพาะในเพศใดเพศหนึ่งเท่านั้น เช่น สารฟอร์มัลดีไฮด์จะก่อเกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ตัวผู้ระยะที่เป็นตัวหนอน แต่จะไม่มีผลต่อตัวเมียในระยะที่เป็นตัวหนอน นอกจากนี้สารเคมีแต่ละชนิดยังก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีนแต่ละตำแหน่งด้วยความถี่ที่แตกต่างกัน

อีกทั้งสารแมงกานีสคลอไรด์ (maganese chloride) สามารถชักนำให้แบคทีเรียที่ต้องการสารอาร์จีนีน (arginine-requiring mutant) เปลี่ยนแปลงเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ด้วยความถี่ 1.72×10^{-8} และชักนำให้แบคทีเรียที่ต้องสารฟีนิลอะลานีน (phenylalanine-requiring mutant) เปลี่ยนแปลง เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ ด้วยความถี่ 11×10^{-8}

สารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) (รูปที่ 2.11) เป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่ใช้ในการก่อกลายพันธุ์ โดยเกี่ยวข้องการชักนำสายรหัสพันธุกรรมจาก G:C ไปเป็น A:T ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่คู่สายดีเอ็นเอ ซึ่งเบสกัวนีนจะจำเพาะเจาะจงใน *cI gene* ใน lambda prophage ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดเซลล์มะเร็งในมนุษย์ ซึ่งคุณสมบัติของ NTG จะมีลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลืองจางหรือสีชมพูซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีเขียวหรือสีส้มเมื่อสัมผัสถูกกับแสง โดย NTG จะละลายได้เล็กน้อยในน้ำและจะละลายได้ดีในสาร ละลายจำพวก polar organic solvent

โดย NTG มักมีปฏิกิริยาตอบสนองกับ nucleophile โดยเฉพาะกับเอมีน ที่ช่วงพีเอชที่เป็นกรด NTG จะค่อยๆปล่อย nitrous gas ถ้าหาก NTG ผสมกับ alkali hydroxide จะก่อให้เกิดก๊าซพิษที่มีความรุนแรงสูง และเมื่อสาร NTG ถูกความร้อน มันจะกระจายก๊าซพิษของ nitrogen oxides และหากมีแรงกระแทกสูง (impact) อาจเกิดการระเบิดได้ ในขั้นตอนการใช้จะถูกใช้ในปริมาณน้อยในกรณีใช้ในงานวิจัย ในอดีต NTG ถูกใช้ในการเตรียม diazomethane (Mitchell และคณะ, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 ลักษณะโครงสร้างของ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)

ที่มา : http://www.chemsources.com

Milagres และคณะ (1993) พบว่าการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการทำให้เกิดการกลายของเชื้อ *T.teesei* ทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงขึ้น

Haltrich และคณะ (2003) พบว่าเมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Candida minitans* สายพันธุ์ 2134 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส มาผ่านการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแก่สปอร์ของเชื้อ (Pycnidiospores) บนอาหารแข็ง แยกสปอร์ที่งอกออกมาแล้วนำไปผ่านแสงความยาวคลื่น (254 นาโนเมตร) โดยใช้หลอดยูวีฉายผ่านวางเป็นระยะห่าง 30 เซนติเมตร เป็นเวลา 1 , 2.5 หรือ 5 นาที และที่ 0 นาที แล้ววางไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเป็นการป้องกันปฏิกิริยาโฟโตรีแอคทิเวชัน ต่อจากนั้นให้รับแสงสว่างเป็นเวลาอีก 5 วัน และการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแก่ pycnidiospores ที่อยู่ในสภาวะแขวนลอยโดยใช้สารแขวนลอยสัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเลตที่ระยะห่าง 10 เซนติเมตร เป็นเวลา 1, 3 และ 5 นาที ตามลำดับ จากนั้นวางในที่มืด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาโฟโตรีแอคทิเวชัน จากนั้นปล่อยให้ถูกแสงสว่างอีกเป็นเวลา 14 วัน พบว่าเชื้อ *Candida minitans* สายพันธุ์ 2134 ที่ผ่านการกลายพันธุ์แล้วมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส (1.88 ยูนิต/มิลลิลิตร) สูงกว่าเชื้อ *Candida minitans* สายพันธุ์ดั้งเดิม (0.33 ยูนิต/มิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ

Bakalova และคณะ (2002) พบว่าการชักนำกลายพันธุ์เชื้อ *Thermomyces lanuginosus* โดยใช้สปอร์ 1x 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ในน้ำเกลือ และทรีตร่วมระหว่าง 2-methyl-3-nitro-N-nitrosoguanidine (40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในซิตริกแอซิดบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 4 เป็นเวลา 120 นาที) และมาทำการผ่านแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นสปอร์ที่ผ่านการทรีตแล้วจำนวน 1 x 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร (0.01%) เจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสมลงในอาหารแข็งที่มีไซแลน (ร้อยละ 0.5 น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำการเลือกโคโลนีที่มีวงใสลงในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ พบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์จะให้ค่าพลังงานจลน์ (kinetic values) (K_m = 5.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ V_{max} = 385 ไมโครโมล/นาที) และมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การทำงานของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ (อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส)สูงกว่าสายพันธุ์ดั่งเดิม (K_m = 3.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ V_{max} = 670 ไมโครโมล/นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส)

Singh และคณะ (1994) พบว่า การชักนำกลายพันธุ์เชื้อ *Fusarium oxysporum* เพื่อเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ไซลาเนส โดยใช้สปอร์ 10^5-10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และทวีน 80 ร้อยละ 0.01 โดยนำไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลต (6 วัตต์) คัดเลือกเชื้อที่ร้อยละความอยู่รอดร้อยละ 5 ในอาหารแข็งที่มีไซแลนร้อยละ1 และร้อยละ 0.1 Sodium tauroglucocholate (เป็นตัวยับยั้งการเจริญของโคโลนี) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเมื่อเชื้อมีการเจริญนำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียสข้ามคืนเพื่อพัฒนาการกลายพันธุ์ หรือนำมาชักนำโดยการใช้สารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 -60 นาที จากนั้นนำสปอร์ที่ผ่านการทรีตแล้วมาล้างด้วยน้ำเกลือ เลี้ยงบนอาหารแข็งขั้นต้น ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ให้วงใส (960 ตารางมิลลิเมตร) และมีความเข้มข้นสุดท้ายของ nitrosoguanidine ประมาณร้อยละ 0.01 พบว่า เชื้อที่ผ่านการก่อกลายพันธุ์แล้วมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและบีต้า-ไซโลซิเดสเพิ่มขึ้น

Rubinder และคณะ (2002) พบว่าการชักนำกลายพันธุ์เชื้อ *Thermomyces langinosus* เพื่อเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์อะไมเลส โดยการใช้สปอร์1x10^7 สปอร์/มิลลิลิตร นำไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลต (30 วัตต์) เป็นเวลา 45 นาที เป็นระยะห่าง 20 เซนติเมตร แล้วนำไปเลี้ยงในอาหาร starch complete medium ที่มีความเข้มข้นของ Sodium deoxycholate ร้อยละ 0.1 (เป็นตัวยับยั้งการเจริญของโคโลนี) จากนั้นบ่มในที่มืด ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเททับด้วยสารละลายไอโอดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.3 KI และร้อยละ 0.15 I_2 จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่ให้วงใส หรือนำมาชักนำโดยการใช้สารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) 350 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (เตรียมใน Tris-maleate buffer ที่ pH 7) จากนั้นนำสปอร์ที่ผ่านการทรีตแล้วมาล้างด้วย โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 5.5 แล้วนำไปเลี้ยงในอาหาร starch complete medium จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่ให้วงใส พบว่าสายพันธุ์กลายของ *Thermomyces langinosus* มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นถึงร้อยละ 97

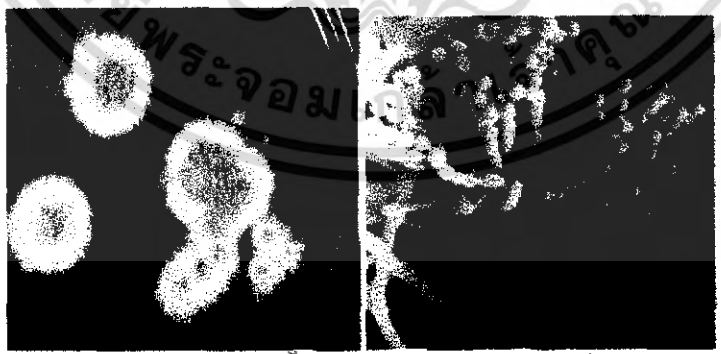
Steiner และคณะ (1998) พบว่าการชักนำการกลายพันธุ์เชื้อ *Penicillium purpurogenum* เพื่อเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ไซลาเนสและบีต้าไซโลซิเดส โดยการใช้สปอร์ 2x10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ใน อะซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ pH 5.5 นำไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 75 วินาที เป็นระยะห่าง 18 เซนติเมตร (มีร้อยละการอยู่รอดร้อยละ 1) แล้วนำไปเลี้ยงในอาหาร PDA ที่มี Triton X-100 ร้อยละ 0.1 (เป็นตัวยับยั้งการเจริญของโคโลนี) บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำมาชักนำโดยการใช้สารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรโดยการใช้สปอร์ของเชื้อขั้นต้น 2x10^7 สปอร์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5) จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร PDA ที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Triton X-100 ร้อยละ 0.1 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน คัดเลือกโดยการย้ายลงอาหารที่มี Mandel's solution จากนั้นนำไปย้อมสี congo red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 15 นาที และล้างออกด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์เป็นเวลา 10 นาที วัดขนาดวงใสรอบขนาดโคโลนีของเชื้อและหาอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนี/ขนาดของโคโลนีของเชื้อ โดยเชื้อที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จะหลั่งเอนไซม์ไซลาเนสมากที่สุดที่ 125 ยูนิต/มิลลิลิตร และปริมาณเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสเพิ่มขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม 2.2 เท่า

2.7 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

เอนไซม์ไซลาเนสพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ แอคติโนมัยสีท โปรโตซัว พืช แมลงและสัตว์ทะเลบางชนิด เอนไซม์ในกลุ่มนี้ที่นิยมศึกษามักมาจากจุลินทรีย์ เนื่องจากเจริญได้รวดเร็ว เพาะเลี้ยงได้ง่าย ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (ตารางที่ 2.3) เช่น *Aspergillus ochraceus* (Biswas และคณะ, 1990) (รูปที่ 2.12), *Aspergillus oryzae* (รูปที่2.13) (Bailey และคณะ, 1991), *Trichoderma viride* (Ujiie และคณะ, 1991) (รูปที่ 2.14) จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) (Gascoigne, 1960; Strobel, 1963; Paice และคณะ,1978) มีบางชนิดที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสอยู่ในเซลล์ (intracellular enzyme) เช่น *Aspergillus niger* (Iwamoto และคณะ, 1973) (รูปที่2.15), *Aspergillus foetidus* (Whister และ Masak, 1995) และ *Butyrivibrio fibrisovens* (Clarke และคณะ, 1969) เป็นต้น และการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่จุลินทรีย์จะเริ่มผลิตในระยะที่มีการเจริญคงที่ (Stationary growth phase) เช่น *Pseudomonas stuzeri* (Toh, 1978), *Aspergillus niger* (John และคณะ, 1979)

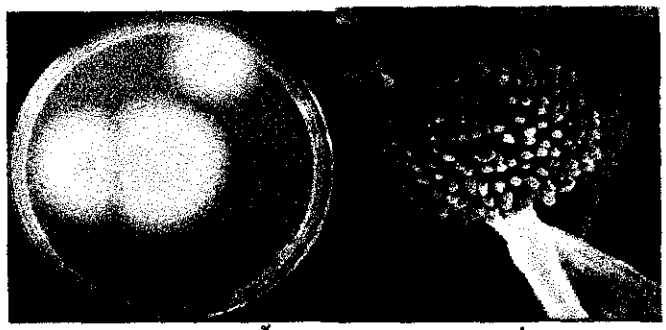


รูปที่ 2.12 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus ochraceus* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ที่มา : http://www.visualsunlimited.com/images/watermarked/357/3572.jpg

http://www.cabi-commodities.org/Cocoa/Photos/CocPPPOTA.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.13 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

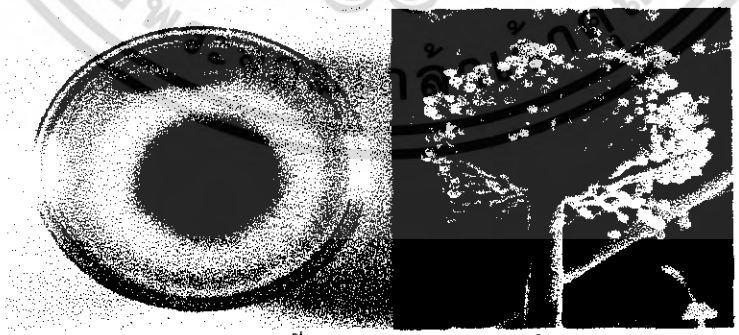
ที่มา : http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/Lab_Microbiology/P1010005.gif

http://www.u-tokyo.ac.jp/stu03/guidance/H17_html/html/img/13nougaku/im00001.jpg

รูปที่ 2.14 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อ *Trichoderma viride* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ที่มา : http://www.uio.no/conferences/imc7/NFotm2000/Images/Tharzcult.jpg

http://www.mycolog.com/Trichoderma_harzianum.jpg



รูปที่ 2.15 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus niger* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ที่มา : http://www.pfdb.net/photo/kanoko_t/CHROMagar/wide/A.niger%20TIMM2930.jpg

http://www.eurobloodsubstitutes.com/images/niger.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล[a] (กิโลดาลตัน)	pI	pH ที่เหมาะสม	ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการย่อยโดยเอนไซม์[c]	ข้อสังเกต	เอกสารอ้างอิง
Fungi						
Aspergillus niger	50	n.d.	5.6-6.0	X_2, X_3, A X_3	พบอะราบิโนส ,กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส	John และคณะ (1979)
	50	n.d.	4.0-4.5	X_2, X_3, A X_3	พบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณมาก	John และคณะ (1979)
	31	n.d.	4.0-4.5	X_2, X_3, A X_4	พบน้ำตาลอะราบิโนส	John และคณะ
	31	n.d.	4.0	X_2, X_3, X_3	พบน้ำตาลอะราบิโนสปริมาณน้อย	John และคณะ (1979)
	30	n.d.	6.0-6.5	X_1, X_4, A	พบน้ำตาลอะราบิโนส	John และคณะ (1979)
A. niger	14	9.0	5.5	X_3, X_5	ค่ากิจกรรมต่ำเมื่อใช้ไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ	Frederick และคณะ (1985)
	13	8.6	6.0	X_3, X_5	ค่ากิจกรรมต่ำเมื่อใช้ไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ	Frederick และคณะ (1985)
	21	6.7	4.0-6.0	X_2, X_1	ค่ากิจกรรมต่ำเมื่อใช้ไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ	Frederick และคณะ (1985)
	14	4.5	4.9	X_2, X_6	ค่ากิจกรรมต่ำเมื่อใช้ไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ	Shei และคณะ (1985)
	28	3.65	5.0	X_3, X_5	สามารถย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้	Fournier และคณะ (1985)
	27	4.2	4.0	X_2, X_3, X_1	ย่อยไซแลนละลายน้ำไม่พบเอนไซม์เซลลูเลส	Gorbacheva and Rodionova (1977 a, b)
A. niger	16	4.0	n.d.	X_3, X_5	พบค่ากิจกรรมเอนไซม์ทรานสเฟอเรส	Vrsanska และคณะ (1982)
A. ochraceus	48	n.d.	6.0-7.0	X_3, X_2	พบน้ำตาลอะราบิโนส	Biswas และคณะ (1990)

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) คุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล[a] (กิโลดาลตัน)	pI	pH ที่เหมาะสม	ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการย่อยโดยเอนไซม์[c]	ข้อสังเกต	เอกสารอ้างอิง
A. fumigatus	21	9.5	6.5	X_2 , X_3	สามารถย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้	Bailey และคณะ (1991) and unpublished
	29	5.7	5.5	X_2 , X_3 , X_1	สามารถย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้	data
A. oryzae	35	6.9	5.0	(X_2 , X_3 , X_1)	สามารถย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้	Bailey และคณะ (1991) and unpublished
Trichoderma	18[b]	9.2	4.8	X_2 , X , A,GAX_2	พบน้ำตาลอะราบิโนส	data Bailey และคณะ (1991)
viride	20	8.5	4.5-5.0	X_2 , X_3	สามารถย่อยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสได้	Sinner and Dietrichs (1975, 1976)
	13[b]	8.6	5.0	$X - X_3$	-	Gibson and McCleary (1987)
	22	9.3	5.0	X , X_2	-	Labavitch and Greve (1983)
	22	9.2	n.d.	n.d.	-	Ujiic และคณะ (1991)
	22	>9	4.0-5.0	X_2 , X	-	Dean and Anderson (1991)
T. reesei	20	9.0	5.0-5.5	X_2 - X_6	พบค่ากิจกรรมเอนไซม์ทรานสเฟอเรส	Lappalainen (1986)
	19	5.5	4.0-4.5	X_2 - X_6	-	Tenkanen และคณะ (1992)
	29	9.5	5.0	X - X_4	-	Tenkanen และคณะ (1992)
T. harzianum	20	9.4	5.0	X - X_4	พบค่ากิจกรรมเอนไซม์ทรานสเฟอเรส	Tan และคณะ (1985 a, b)
	22	8.5	4.5-5.0	X - X_4	-	Tan และคณะ (1985 a, b)
	18	7.3	4.9-5.5	X_2 , X_3 , AX_4	-	Wong และคณะ (1986 a)
T. koningii	29	7.2	4.9-5.8	X_2 - X_3 , X, A	พบน้ำตาลอะราบิโนส	Wood and McCrae (1986)
						Wood and McCrae (1986)

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) คุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	มวลโมเลกุล[a] (กิโลดาลตัน)	pI	pH ที เหมาะสม	ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการย่อยโดยเอนไซม์[c]	ข้อสังเกต	ข้อสังเกต
T. pseudokoningii	15	9.6	5.0	$X_2 - X_5$	-	Baker และคณะ (1977)
T. lignorum	20	8.7	6.5	X_2, AX_4 (X, X_3, A X_5)	พบค่ากิจกรรมเอนไซม์ทรานสเฟอเรส	John and Schmidt (1988)
	21	5.1	3.5	X_2, AX_4 (X, X_3, A X_5)	-	John and Schmidt (1988)
T. longibrachiatum	22	9.5	5.0	$X_2 - X_3$	พบค่ากิจกรรมเอนไซม์ทรานสเฟอเรส	Royer (1988)
	33	9.3	5.0	X, X_2	-	Royer (1988)

[a] SDS-PAGE ; [b] gel chromatotraphy ; [c] X, xylose ; A, arabinose ; G, methylglucuronic acid ; n.d., not determined.CMC = carboxymethyl cellulose

ที่มา : Tsujibo และคณะ 1997

2.7.1 ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา

เชื้อราที่แท้จริงจัดอยู่ในอยู่ 4 ไฟลัม คือ Chytridiomycota , Zygomycota , Ascomycota และ Basidiomycota (Kirk และคณะ, 2001) เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ชนิดเฮทเทอโรโทรฟิก (heterotrophic) ซึ่งแต่ก่อนพิจารณาว่าเป็นพืชชั้นต่ำ ไม่มีคลอโรฟิลล์ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อมีความชัดเจนทางด้านโมเลกุล จึงได้มีข้อเสนอแนะสนับสนุนว่าเชื้อรามีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกับสัตว์มากกว่ากลุ่มของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต (eukaryotes) ชนิดอื่น โดยในความเป็นจริงแล้วเชื้อรามีลักษณะพิเศษอยู่ในตัวเองและมีอยู่เพียงกลุ่มเดียวในโลกจึงกำหนดให้มีอาณาจักรของตัวเองซึ่งมีการจัดจำแนกไว้มากกว่า 70,000 สปีชีส์ และในแต่ละปีมีการค้นพบอีกประมาณ 1,700 สปีชีส์ (Hawksworth, 1991) ดังนั้นเชื้อราจัดว่าเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากกลุ่มของพวกแมลง

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีนิวเคลียสแบบยูคาริโอต ไม่มีคลอโรฟิลล์ สร้างสปอร์ได้ มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบมีเพศและไม่มีเพศ โครงสร้างเป็นแบบเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ โดยเซลล์เรียงตัวอยู่ในแนวเดียวกันเป็นเส้นใยที่เจริญขยายตามแนวยาวได้อย่างไม่มีขอบเขตจำกัด ผนังเซลล์ประกอบด้วยสารพวกไคตินหรือเซลลูโลส (บัญญัติ, 2534) เชื้อราที่มีเซลล์เดียวเรียกว่ายีสต์ ส่วนพวกที่มีหลายเซลล์จะประกอบด้วยเซลล์เรียงตัวในแนวเดียวกันเป็นเส้นใยเรียกว่า ไฮฟา (hypha) (รูปที่ 2.16) เส้นใยจะมีการเพิ่มจำนวนและรวมกลุ่มกันจนมีขนาดใหญ่และมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) เชื้อราส่วนมากมีเส้นใยแบบมีผนังกั้น เรียกว่า septate hypha ทำให้มีลักษณะเป็นห้องๆ ซึ่งผนังกั้นนั้นเรียกว่า septa โดยแต่ละเซลล์จะเชื่อมต่อกันด้วยรูตรงกลางของผนังกั้น ในแต่ละเซลล์อาจมีหนึ่งนิวเคลียส (uninucleate) หรือหลายนิวเคลียส (multinucleate) ส่วนชนิดของเชื้อราที่เส้นใยไม่มีผนังกั้น เรียกว่า coenolytic hypha ทำให้เส้นใยมีลักษณะเป็นท่อทะลุถึงกันโดยตลอด เป็นเซลล์ที่ยาวมีหลายนิวเคลียส เชื้อรามีการเจริญอย่างรวดเร็วที่บริเวณปลายสุดของเส้นใย การแบ่งนิวเคลียสของเชื้อราไม่เหมือนกับจุลินทรีย์ชั้นสูงกว่า เนื่องจากไม่มี centrioles โดยจะไม่แยกออกจากกันระหว่างระยะไมโตซิส (mitosis) (คือ ไมโตซิสแบบปิด โดยมีลักษณะของการเกิดไมโตซิสน้อยมาก) ซึ่งโดยทั่วไปวงจรชีวิตของเชื้อราจะเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศโดยในระยะดิพลอยด์ (diploid) จะมีการสร้างไซโกต (zygote) หลังจากนั้นจะตามด้วยการแบ่งนิวเคลียสในระยะไมโอซิส (meiosis) และเกิดการสร้างสปอร์ (รูปที่ 2.17) สภาพแวดล้อมในการเจริญของเชื้อราโดยทั่วไปที่สำคัญ ๆ (บัญญัติ, 2534) ได้แก่

1. อาหาร

อาหารที่จำเป็นในการเจริญเป็นได้ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยทั่วไปเชื้อราจะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ใช้สารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน การเจริญของเชื้อราในอาหารต่าง ๆ นั้นมีการสร้างเอนไซม์ออกมาสองชนิด คือเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์และเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์จะปลดปล่อยออกมาจากเซลล์เพื่อย่อยสลายอาหารที่มีโมเลกุลซับซ้อนให้เป็นสารโมเลกุลเชิงเดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

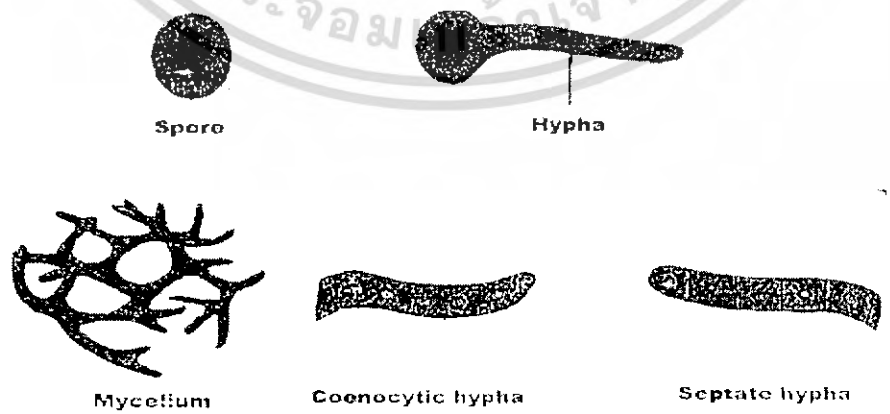
เพื่อให้ดูดซึมไปใช้ได้ ส่วนเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์จะย่อยสลายสารอาหารที่ดูดซึมเข้าไปและปลดปล่อยพลังงานออกมาใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์

2. อุณหภูมิ

เชื้อรามีช่วงอุณหภูมิในการเจริญได้แคบกว่าแบคทีเรีย ส่วนมากเจริญที่อุณหภูมิ 0 - 35 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 20 - 30 องศาเซลเซียส และในบางชนิดเป็นพวกเชื้อราชอบอุณหภูมิสูง มีอุณหภูมิสูงสุดเจริญได้ที่ 50 องศาเซลเซียส และในบางครั้งอาจถึง 60 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิต่ำเจริญได้คือ 20 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามสปอร์ของเชื้อราบางชนิดทนต่ออุณหภูมิต่ำมากๆ ได้ดี เช่น สปอร์ที่อยู่ในไนโตรเจนเหลวจะทนอุณหภูมิต่ำได้ถึง -196 องศาเซลเซียส

3. พีเอช

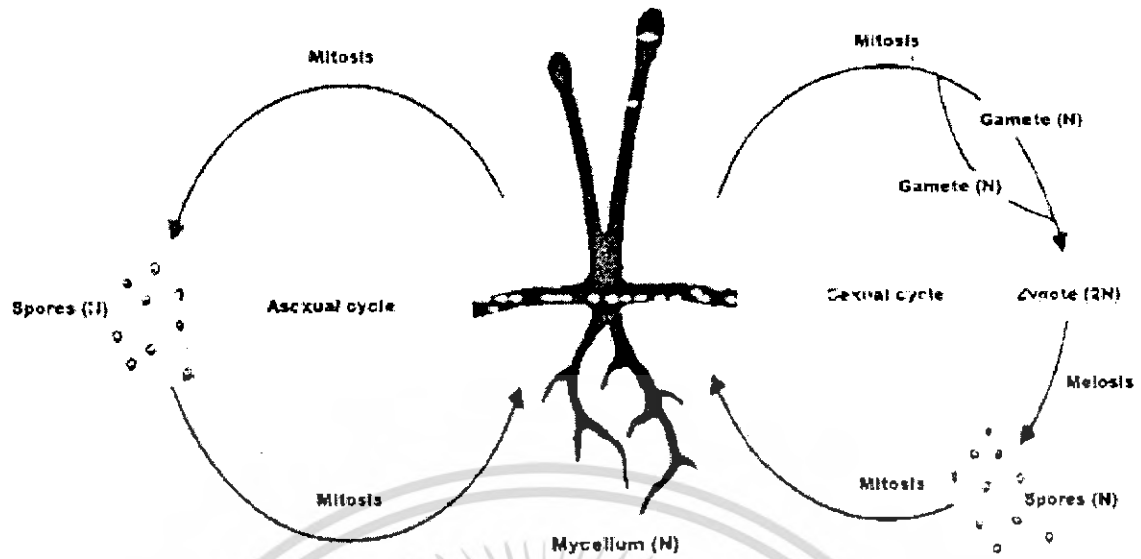
เชื้อราเจริญได้ในช่วงพีเอช 2 - 10 แต่พีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4 - 6 ซึ่งเป็นกรด ดังนั้นสภาวะที่เป็นกรดจึงทำให้เชื้อราเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย เชื้อราทั้งหมดเป็นพวกเฮทเทอโรโทรฟิก มีการดำรงชีวิตโดยใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นสารอาหาร ซึ่งมักอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นแหล่งของสารอาหาร สารประกอบคาร์บอนที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยเชื้อรา ได้แก่ สารที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แป้ง ลิกนิน ไคติน เคอราติน โปรตีน และไขมัน เป็นต้น และสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและคู่ กรดไขมัน และกรดอะมิโน เป็นต้น โดยเชื้อราจะขนส่งสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กผ่านข้ามเซลล์เมนเบรน ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านไปได้ ในอีกทางหนึ่งเชื้อราจะหลั่งเอนไซม์มาย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนให้เปลี่ยนเป็นสารที่มีโมเลกุลเดี่ยว ต่อมาจะถูกดูดซึมและนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์และแหล่งคาร์บอน ซึ่งเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์สามารถแพร่ออกจากเส้นใยของเชื้อราหรือยึดติดผนังเซลล์ของเชื้อรา (รูปที่ 2.18)



รูปที่ 2.16 โครงสร้างของเชื้อรา

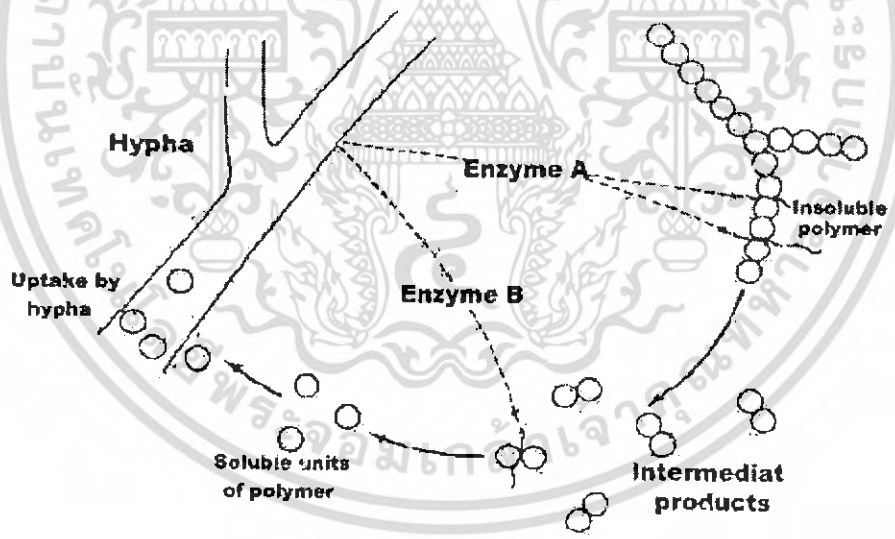
ที่มา : Vodopich และ Moore (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.17 วงจงชีวิตโดยทั่วไปของเชื้อรา

ที่มา : Vodopich และ Moore (2002)



รูปที่ 2.18 การย่อยสลายภายนอกเซลล์ของเชื้อรา เอนไซม์หลั่งออกมาเพื่อย่อยสารพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่ได้เป็นสารตัวกลางเกิดขึ้น และต่อมาจะเกิดการย่อยสลายได้ผลเป็นหน่วยของมอนอเมอร์เพื่อให้เชื้อราดูดซึมต่อไป

ที่มา : Carlile และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1.1 เชื้อ *Aspergillus* sp.

2.7.1.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

เป็นเชื้อที่มีถิ่นที่อยู่กว้างขวางทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อน ในอากาศทุกหนทุกแห่งมีโคนีเดียของเชื้อราชนิดนี้ปะปนอยู่ นอกจากนี้ยังพบมากในดิน เจริญได้ในอินทรีย์วัตถุแทบทุกชนิด ซึ่งก่อให้เกิดทั้งผลดีและผลเสียโดยเฉพาะในเขตร้อน เชื้อ *Aspergillus* ทำให้เครื่องหนัง เช่น กระเป๋า รองเท้า ตลอดจนเสื้อผ้าเสียหาย *Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger* และสปีชีส์อื่น ทำให้เกิดโรค Aspergillosis ซึ่งมีอาการคล้ายวัณโรค บางชนิดทำให้หูอักเสบได้

เนื่องจากเชื้อนี้สร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด จึงมีประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมผลิตกรดต่างๆ อุตสาหกรรมเบียร์ และการผลิตยาปฏิชีวนะ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อนี้ คือ ไมซีเลียมของเชื้อนี้ประกอบด้วยเส้นใยที่แตกแขนงมากมายเส้นใยมีผนังกั้นและไม่มีสีแต่ละเซกเม้นท์มีนิวเคลียสหลายอัน

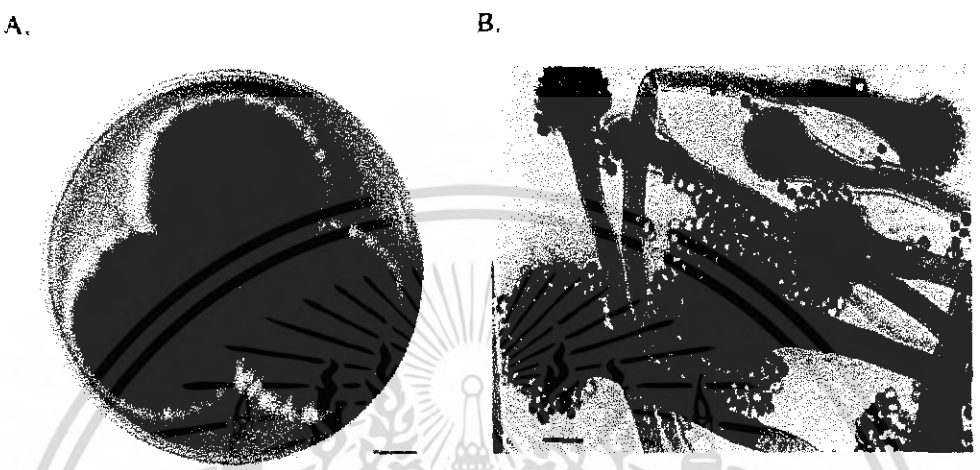
2.7.2.1.2. ลักษณะการสืบพันธุ์

มีทั้งการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศ คือในราพวก *Aspergillus* จะมีส่วนของเส้นใยที่ทำหน้าที่สร้างโคนิดิโอฟอร์ เรียกว่า foot-cell โคนิดิโอฟอร์มีลักษณะยาว และตรงส่วนปลายจะโป่งออกเรียกว่า vesicle รอบ vesicle จะมีโครงสร้างที่ยื่นออกมามีลักษณะคล้ายขวดเรียกว่าสเตอริกมาตา (sterigmata) โดยจะมีหนึ่งชั้นหรือสองชั้นก็ได้ ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของเชื้อ เชื้อสร้างโคนิเดียในสเตอริกมาตา โดยโปรโตปลาสซึมที่ส่วนปลายสเตอริกมาตาจะมีผนังกั้นและจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างจนมีลักษณะค่อนข้างกลม จากนั้นสร้างผนังล้อมรอบเจริญเป็นโคนิเดีย โคนิเดียที่ถูกสร้างทีหลังจะอยู่ลึกเข้าไปภายในสเตอริกมาตาและดันโคนิเดียอันแรกให้โผล่พ้นสเตอริกมาตาออกมา และถูกดันกันต่อมาเรื่อย ๆ โดยที่โคนิเดียแต่ละอันยังไม่หลุดขาดจากกัน ทำให้ได้เป็นสายโซ่ของโคนิเดีย ดังนั้นโคนิเดียที่มีอายุน้อยๆ จึงอยู่ติดกับส่วนของสเตอริกมาตา (รูปที่ 2.19)

โคนิเดียของ *Aspergillus* มีสีต่าง ๆ กัน เช่น สีดำ น้ำตาล เหลือง เขียว ฯลฯ สีของโคนิเดียขึ้นอยู่กับธาตุอาหารบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่น *Aspergillus niger* จะสร้างโคนิเดียสีดำถ้าอาหารนั้นมีธาตุทองแดงอยู่ไม่น้อยกว่า 2.5×10^{-6} กรัม ถ้ามีทองแดงต่ำกว่านี้สีของโคนิเดียจะอ่อนลง และถ้าไม่มีธาตุทองแดงอยู่ในอาหารเลย สีของโคนิเดียที่เคยเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือดำ จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และการสืบพันธุ์แบบมีเพศ ยังศึกษาไม่พบการสืบพันธุ์แบบมีเพศในเชื้อ *Aspergillus* หลายสปีชีส์ และเชื่อกันว่าสปีชีส์เหล่านั้นสูญเสียความสามารถในการสืบพันธุ์แบบมีเพศไปแล้ว แม้แต่ในสปีชีส์ที่สร้างแอสคัสก็ยังพบแนวโน้มว่าการสืบพันธุ์แบบมีเพศกำลังจะเสื่อมไป การศึกษาพบว่ามีระยะ พลาสโมแกมมี่เกิดขึ้นจากการผสมของแกมมีแทนเจียมสองเพศไปจนถึงบางชนิดที่ไม่สร้างแอนเธอริเดียม และบางชนิดสร้างแอสคัสจากแอสโคโกเนียมเพียงอย่างเดียวโดยไม่ต้องมีแอนเธอริเดียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aspergillus fumigatus มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงๆได้ และเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส และสามารถพบได้ทั่วไปในทุกๆที่ โดยเฉพาะในดินและในสารอินทรีย์ที่กำลังย่อยสลาย แตกหักผุผัง จุลินทรีย์สายพันธุ์นี้เป็นต้นสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในคน และเป็นสาเหตุหลักในโรคแอสเปอจิลโลซิส (aspergillosis) (Steven และคณะ, 2000)



รูปที่ 2.19 A : ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. fumigatus* B : ลักษณะโครงร่างของ *A. fumigatus*
ที่มา : http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/asp-fu.htm

2.7.3 การสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา

เอนไซม์ไซลาเนสมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ชักนำ (inducible enzyme) ซึ่งจะขับออกมาในอาหารที่มีไซแลนบริสุทธิ์หรือวัสดุเศษเหลือทิ้งที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยไซแลน (Balakrishnan และคณะ 1997) ซึ่งลักษณะโดยรวมของการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ย่อยสลายสารจำพวกพอลิเมอร์ (polymeric substances) เป็นการสร้างเอนไซม์ในระดับต่ำและขับออกมา โดยปลดปล่อยส่วนที่ละลายได้ของสารพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาเพียงเล็กน้อยแล้วทะลุผ่านเซลล์เมมเบรนออกมา ตามความเข้าใจที่เกี่ยวกับจุลินทรีย์ พบว่าสารประกอบหรือโมเลกุลที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ในปริมาณที่เพียงพอสำหรับการย่อยสลายจุลินทรีย์ และบ่อยครั้งจะพบว่าสารตะตาบอไลต์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลน มีผลช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนสทั้งในเชื้อราและยีสต์ ตัวอย่างที่เด่นชัด เช่น ไซโลไบโอสน่าจะมีความเป็นไปได้ว่าเป็นตัวชักนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่มีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกันกับกลุ่มจุลินทรีย์ทั้งหมด เช่นเดียวกับไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น (Hrmova และคณะ, 1989 ; Royer และ Nakas, 1990) การย่อยสลายไซโลไบโอสจะได้ผลลัพธ์เป็นไซโลสสามารถแสดงคุณสมบัติเป็นสารตะตาบอไลต์ที่ยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนส ในทางตรงกันข้ามไซโลสสามารถเป็นตัวชักนำที่ดีของการสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไซลาเนสได้ด้วย (Pou-linase และ Drigues, 1987; Hrmova และคณะ, 1989; Ghosh และ Nanda, 1994; Pukarthofer และ Steiner, 1995)

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไซแลนได้มักจะสามารถสร้างเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติก (cellulolytic enzyme) และขับออกมาผสมกับเอนไซม์ไซลาเนส ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากการสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ไม่เพียงแต่จะมีการแสดงออกเมื่อใช้ไซแลนเป็นสับสเตรทเพียงอย่างเดียว แต่ยังสามารถแสดงออกได้เมื่อมีเซลลูโลสอยู่ด้วย

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าในการชักนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสมีลักษณะเช่นเดียวกันกับการชักนำการสร้างเอนไซม์ของเอนไซม์ชักนำชนิดอื่นๆ เช่น แมนแนนเนสและเซลลูเลส เป็นต้น ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของยีนควบคุม (regulator gene) อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างสมบูรณ์สำหรับกลไกการควบคุมการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ ด้วยเหตุที่ว่าไซแลนไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ การชักนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจะมีการตอบสนองกับส่วนของไซแลนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งจะนำไปเป็นสับสเตรตสำหรับการผลิตเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้องค์ประกอบเหล่านี้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถผลิตเอนไซม์ได้ (Bastawde, 1992; Kulkarni และคณะ, 1999) และยังพบว่าบนพื้นผิวหน้าของจุลินทรีย์หลายชนิดจะมีสารเชิงซ้อนที่เรียกว่า "ไซลาโนโซม" (xylanosome) ซึ่งเป็นสารเชิงซ้อนที่อยู่อย่างกระจัดกระจาย มีคุณสมบัติเป็น multienzyme complexes ที่มีหน้าที่หลายอย่าง (multifunctional) และสารเชิงซ้อนนี้มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส (Sunna และ Antranikian, 1997)

Lenartovicz และคณะ (2003) พบว่า เอนไซม์ไซลาเนสส่วนมากจะหลั่งออกมาจากภายในเซลล์ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส อาจจะเป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์หรือเป็นเอนไซม์ที่ติดอยู่กับตัวเซลล์ (cell-bound) ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์และระบบของการเพาะเลี้ยง

Wong และคณะ (1992) พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราภายใต้ห้องปฏิบัติการการทดลอง ในช่วงเวลาแรกของการเจริญ เอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดสยังคงติดอยู่กับไมซีเลีย โดยจะมีการหลั่งออกมาสู่อาหารเลี้ยงเชื้อภายหลัง เนื่องจากการขับออกมาของเซลล์หรือเซลล์มีการแตกตัว

Bansod และคณะ (1999) พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่ เช่น *Aspergillus* sp. (Kunert และ Kopecek, 2000) ซึ่งจำมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลายๆ ชนิดรวมถึงเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์โปรติเอสด้วย ซึ่งจะมีผลลดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

Siedenberg และคณะ (1998) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus awamoris* สภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ 150 รอบ/นาที เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าถ้าความเข้มข้นของสารละลายสปอร์สูงจะเกิดเชื้อที่มีลักษณะเป็นเส้นใยและเป็น pellet ขนาดเล็ก ในขณะที่ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ต่ำจะเกิด pellet ที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งขนาดของ pellet มีผลต่อการใช้น้ำตาลของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pellet ที่มีขนาดเล็กจะมีการใช้น้ำตาลได้ดีกว่า pellet ขนาดใหญ่ และให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (0.55 ยูนิต/กรัมเซลล์) สูงกว่า pellet ขนาดใหญ่ (0.2 ยูนิต/กรัมเซลล์)

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซลาโนไลติกเอนไซม์

2.8.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์พลังงานและเซลล์โดยทั่วไปกระบวนการหมักเพื่อผลิตไซลาโนโลติกเอนไซม์ โดยทั่วไปนิยมใช้สารคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน การเลือกใช้สับสเตรตที่เหมาะสมมีความสำคัญมากสำหรับความสำเร็จในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส สับสเตรตไม่เพียงแต่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แต่ยังใช้เป็นสารประกอบที่จำเป็นสำหรับการชักนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ ไซแลนซึ่งเป็นสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำสามารถช่วยชักนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดี ไซแลนบริสุทธิ์สามารถใช้เป็นสับสเตรทที่ดีและบ่อยครั้งมีการนำไปใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในระดับการทดลองขนาดเล็ก ความสำคัญของสับสเตรตไม่เพียงแต่ส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิต (yields) ของเอนไซม์ไซลาเนสเท่านั้น แต่การเลือกใช้สับสเตรตนั้นยังมีความสามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีโดยไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วยหรืออาจจะมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณที่น้อยมากจะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น (Hrmova และคณะ, 1989)

สำหรับกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสขนาดใหญ่ การใช้สับสเตรตที่มีราคาแพงจะไม่มีความเหมาะสมต่อการผลิต เนื่องจากไม่คุ้มต้นทุน ยกเว้นแต่ว่าสามารถหาวัตถุดิบที่ใช้ทดแทนสารประกอบไซแลนหรือไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เหล่านี้ได้ และต้องมีราคาเหมาะสมกับกระบวนการผลิต จากการพิจารณาเหตุผลดังกล่าว พบว่าการใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรหรือวัสดุเศษเหลือจากป่าไม้ (Bailey และ Viikari, 1993) หรือใช้ไซแลนที่แยกได้จากผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น ไซแลนที่แยกได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเส้นใยสังเคราะห์เรยอน (Gamerith และคณะ, 1992) สับสเตรตที่มีราคาถูกโดยทั่วไปมักเป็นสารพวก ลิกโนเซลลูโลส เช่น เปลือกข้าวบาร์เลย์ ซังข้าวโพด หญ้าแห้ง รำ หรือฟางข้าวสาลี เป็นต้น มีงานวิจัยที่ผ่านมามากมายได้ทำการศึกษาจำแนกและประเมินค่าสารประกอบเหล่านี้ในด้านการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และพบว่าสับสเตรตเหล่านี้บางชนิดมีคุณสมบัติที่ดีกว่าการใช้ไซแลนหรือเซลลูโลสบริสุทธิ์ ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสอย่างมีนัยสำคัญ ฉะนั้นจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ดีสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตขนาดใหญ่ มีการใช้วัสดุพวกเฮมิเซลลูโลส หรือพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นสับสเตรตที่ไม่ละลายน้ำ เช่น รำข้าวสาลี ซังข้าวโพด และชานอ้อย เป็นต้น ในการชักนำการสร้างเอนไซม์ ไซลาเนส โดยเชื้อรา (Kuhad และคณะ, 1997; Beg และคณะ, 2000) นอกจากนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยังมีข้อเสนอแนะว่าการใช้สารพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งไม่เพียงแต่ประกอบด้วย เฮมิเซลลูโลสอย่างเดียว แต่ยังมีสารชนิดอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย เช่น ลิกนิน เพคติน และเซลลูโลส เป็นต้น เมื่อนำสารเหล่านี้มาใช้ในการผลิตเอนไซม์โดยเชื้อราจะได้ปริมาณเอนซ์ไซลาเนสในระดับต่ำ เนื่องจากไม่สามารถนำสารเหล่านี้ไปใช้ในระบบเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ แต่พบว่าหากมีการแปรสภาพ (pretreatment) สารลิกโนเซลลูโลสจะช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราได้ วิธีการแปรสภาพวัตถุดิบเหล่านี้มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การแปรสภาพลักษณะทางฟิสิกส์ของลิกนินมีผลทำให้ลิกนินละลายน้ำได้ การเพิ่มความสามารถในการใช้ประโยชน์ของสารเหล่านี้ โดยทำให้อนุภาคของสารลิกโนเซลลูโลสเล็กลง ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวหน้า และขนาดของรูพรุน การลดปริมาณเซลลูโลสที่อยู่ในรูปผลึก (decrystallinization) หรือการลดความเป็นพอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส (depolymerization) เป็นต้น ดังนั้นการแปรสภาพวัตถุดิบจึงให้ผลที่ดีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

Purkarthofer และ Steiner (1995) รายงานว่าจลนพลศาสตร์ของการปลดปล่อยเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรทที่ใช้เป็นตัวชักนำ การสร้างเอนไซม์ไซลาเนสหากมีการใช้ประโยชน์จากตัวชักนำที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ ให้หมดลงอย่างช้าๆ โดยตลอดระยะเวลาของการหมัก ซึ่งเป็นการทำให้ระยะเวลาของการหมักยาวนานขึ้น จะช่วยส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงขึ้น

Christov และคณะ (1999) ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันคือ รำข้าวสาลี แกนฝักข้าวโพด oat spelt xylan และของเหลวจากโรงงานฟอกสี พบว่า oat spelt xylan และแกนฝักข้าวโพดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 1808 และ *Gliocladium viride* CBS 658.70 มีความสามารถในการชักนำให้ผลิตไซลาเสนได้สูง ในขณะที่ของเหลวจากโรงงานฟอกสีก็เป็นตัวชักนำในการผลิตไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสได้ดี ซึ่งของเหลวจากโรงงานฟอกสีเป็นแหล่งที่มีคาร์บอนมากมายและราคาถูก ดังนั้นจึงเป็นจุดที่น่าสนใจในขณะนี้ในการเป็นสารตั้งต้นให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

Milagres และคณะ (1993) ศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตไซลาเนสพบว่าการใช้ไซแลนเป็นสารตั้งต้นมีผลชักนำให้มีกิจกรรมของไซลาโนไลติกสูง และมีกิจกรรมของเซลลูโล-ไลติกต่ำ

วิเชียร กิจปรีชาวนิช และคณะ (2535) ได้ศึกษาพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus Fresenius* รหัส 4-45-1F คือ ฟางข้าว โดยเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆ คือ ชานอ้อย ซังข้าวโพด และรำข้าวสาลี

Chahar (1985) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesie* QMY 1 ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของฟางข้าวแตกต่างกันคือ ร้อยละ 1 (ความเข้มข้นของเซลลูโลสร้อยละ0.1) และร้อยละ 5 (ความเข้มข้นของเซลลูโลสร้อยละ 2) พบว่าเซลลูเลสมีกิจกรรมสูงสุดในฟางข้าวสาลีที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นร้อยละ 1 เท่ากับ 1.65 หน่วยต่อมิลลิลิตร ได้ผลผลิตของเซลลูเลส เท่ากับ 412 หน่วยต่อกรับเซลลูโลส ในขณะที่ความเข้มข้นของฟางข้าวสาลีที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 จะมีเวลาในการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 7 วัน เป็น 11 วัน และกิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเป็น 6 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่ผลผลิตของเซลลูเลสลดลงเป็น 100 หน่วยต่อกรัมเซลลูเลส

Gome และคณะ (1993) ได้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงของ *Trichoderma lanuginosus* พบว่าความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงของ *Trichoderma lanuginosus* จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารลิกโนเซลลูโลสที่ใช้เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ซังข้าวโพดและใบข้าวโพดเป็นสับสเตรทเชื้อรานี้จะมีความสามารถคงตัวที่อุณหภูมิสูงได้ดีที่สุด

2.8.2 แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8 - 10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป โดยบางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ แต่บางชนิดจะต้องการสารไนโตรเจนอินทรีย์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีสารไนโตรเจนอินทรีย์เป็นองค์ประกอบได้เร็วกว่าในอาหารที่มีสารไนโตรเจนอนินทรีย์เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจึงขึ้นอยู่กับว่าจุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดใดได้ดี โดยต้องพิจารณาควบคู่ไปกับราคาของแหล่งไนโตรเจน และประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิตด้วย โดยเชื้อจะนำไนโตรเจนไปใช้สำหรับเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโนเพื่อสังเคราะห์เซลล์ (สมใจ, 2537)

Saxena และคณะ (1994) พบว่าในการผลิตเอมไซม์ไซลาเนสจาก *Cyathus stercoreus* ในอาหารพื้นฐาน (basal medium) โดยเติมไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ ยูเรีย กรดกลูทามิก เคซีนไฮโดรไลเสต เคซีน เปปโตน แอมโมเนียไนเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟต แต่ละชนิดใช้ไนโตรเจน ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากสารอินทรีย์จะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าไนโตรเจนที่ได้จากสารอนินทรีย์

Haapala และคณะ (1996) พบว่าในการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูโคเนสและไซลาเนสจากเชื้อ *Trichoderma reeset* โดยไม่มีการควบคุมพีเอชเริ่มต้น พบว่ายูเรียมีผลทำให้พีเอชเพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 6.7 (ในอาหารที่มียูเรีย 1.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับโปรติโอสเปปโตน 3 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร) และในอาหารที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวในปริมาณ 1.5 กรัมต่อลิตร พีเอชจะเป็น 6.5 ภายใน 10 วันเนื่องจากมีการกำจัดแอมโมเนียไปเป็นยูเรีย ในอาหารที่ใช้โปรติโอสเปปโตน 3 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร พีเอชสุดท้ายจะเป็น 6.0 ในอาหารที่ใช้โปรติโอสเปปโตน 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว พีเอชสุดท้ายจะเป็น 5.9 ในอาหารที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวในปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตรพีเอชจะเป็น 5.7 แต่ถ้าไม่มียูเรียพีเอชจะลดลงเป็น 4.7 นอกจากนี้พีเอชก็มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส ที่พีเอช 4.0 จะผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนโดกลูโคเนสได้สุงสุด และพีเอช 6.0 ถึง 7.0 ผลิดเอนไซม์ไซลาเนสได้สูง เมื่อใช้เซลลูโลสและไซแลนเป็นสับสเตรท

2.8.3 พีเอช

โดยพีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป การหมักในระยะแรกจะหมักที่ค่าพีเอชของการเลี้ยงเชื้อเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชเปลี่ยนแปลง อาจเกิดการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนีย หรือสารประกอบที่เป็นด่างอื่นๆออกมา หรือมีการย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์ขึ้น เป็นผลให้พีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหาร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพีเอชอย่างช้าๆ บัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+หรือ OH^- ออกมา โดยพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของสิ่งแวดล้อมมีความสำคัญต่อการเจริญและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ชอบด่างสามารถเจริญได้ดีในสภาวะพีเอชสูง ๆ ดังนั้นพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเจริญจึงขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันไป

Gessesse และ Momo (1999) ได้ทำการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยศึกษาความเข้มข้นของ Na_2CO_3 ที่ใช้เป็นบัฟเฟอร์ในการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงพบว่า Na_2CO_3 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5.0 และ 10.0 พบว่า Na_2CO_3 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด

Gomes และคณะ (1994) พบว่า จุลินทรีย์พวกรามักจะเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ เช่น *Aspergillus* AANTG 19 และ *Thermoascus aurantiacus* เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4

Roger และ Nakas (1986) พบว่า การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Trichoderma longibrachiatum* ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.5 ถึง 6.5 เมื่อเชื้อเจริญจะทำให้พีเอชเพิ่มขึ้นอีก 0.5 ถึง 1.2 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิดเอนไซม์ ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสคือพีเอช 6.5 ถึง 7.7 และพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ พีเอช 4.8 ถึง 5.8

2.8.2 อุณหภูมิ

ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน ในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมีความร้อนเกิดขึ้นจนถึงระดับหนึ่งที่จุลินทรีย์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ ดังนั้นในกระบวนการหมักต่างๆจึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม อุณหภูมิที่ใช้ในการสร้างไซลาเนสส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส แต่ก็มีจุลินทรีย์บางกลุ่ม เช่น แอคติโนมัยซิส หรือแบคทีเรีย ที่สามารถเจริญในที่อุณหภูมิสูงและสามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้ จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rapp และ Wangner (1986) พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างไซลาเนสส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 30 -35 องศาเซลเซียส เช่น *Cellulomonas uda* สามารถเจริญและผลิตไซลาเนสได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Ratto และคณะ (1994) พบว่า รา แอคติโนมัยซิลหรือแบคทีเรีย ที่สามารถเจริญในอุณหภูมิสูงและสามารถสร้างไซลาเนสได้ จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40 – 60 องศาเซลเซียส เช่น *Dictyoglomus* sp. B1 และ *Rhodothermus marinus* สามารถเจริญและผลิตไซลาเนสได้ดีที่อุณหภูมิ 68 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Lenartovicz และคณะ (2003) พบว่าเมื่อทำการเลี้ยง *Aspergillus fumigatus* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเชื้อราจะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสามชนิดที่เป็น isoenzyme ที่เป็น homogeneously และเอนไซม์ไซลาเนสมักติดอยู่กับตัวเซลล์ในขณะที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิสูงที่สุดที่เชื้อราจะสามารถเจริญได้ จะมีการผลิต isoenzyme ที่มีมวลโมเลกุลต่ำที่ทำหน้าที่เพียงร้อยละ 10 ของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสทั้งหมด แต่เอนไซม์ไซลาเนสจะถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและให้ค่ากิจกรรมที่สูงกว่าเอนไซม์ที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Castro และคณะ (1997) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ *Aspergillus* sp. ที่ทนอุณหภูมิสูงเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูงที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าการชักนำเชื้อจะมีการหลั่งเอนไซม์ออกภายนอกลดลง แต่มีการเพิ่มของไซลาเนสโมเลกุลต่ำบางชนิด อาจจะเป็นไปได้ว่าต้องการสารสำหรับการเจริญเติบโตบางชนิด ที่ 45 องศาเซลเซียส ที่ 96 ชั่วโมง เชื้อจะมีการผลิตเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมสูงสุด และมีการผลิตปริมาณโปรตีนจำนวนมาก อาจเป็นเพราะต้องการ growth factor บางอย่างเพื่อการเติบโต

2.9.ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส

โดยทั่วไปเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส สำหรับพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ไซลาเนสจากแบคทีเรียและแอคติโนมัยซิส มีพีเอชที่เหมาะสมค่อนข้างเป็นกลาง แต่ของเชื้อราค่อนข้างจะเป็นกรด ส่วนความคงตัวต่อพีเอชและความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์จะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์

2.9.1 ผลของอุณหภูมิต่อเอนไซม์

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสค่อนข้างแปรผันความเหมาะสมขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนมากจะสร้างไซลาเนสที่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อสร้างเอนไซม์ไซลาเนสส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหญ่จะอยู่ใน ช่วง 30-35 องศาเซลเซียส แต่ก็มีจุลินทรีย์บางกลุ่ม เช่น รา แอคติโนมัยซิสหรือแบคทีเรีย ที่สามารถเจริญในอุณหภูมิสูง และสามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้ จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40–60 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์แต่ละชนิดเกิดปฏิกิริยาสูงสุดที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปการทำงานของเอนไซม์จะช้าหรือหยุดชะงัก ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปเอนไซม์จะถูกทำลาย ทำให้ความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงของเอนไซม์ลดลง ส่วนมากจะพิจารณาจากค่าครึ่งชีวิต (half-life;$T_{½}$) ของกิจกรรมเอนไซม์ และความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับความเข้นข้นของโปรตีนในส่วนใส (supernatant) จากการเลี้ยงเชื้อ เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic fungi) ตามปกติจะมีความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงมากกว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic fungi) แต่น้อยกว่าแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) ส่วนเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียเหล่านี้จะมีระดับต่ำกว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูง (Lisching และคณะ, 1993)

Kang และคณะ (1996) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Cephalosporiu* sp. สายพันธุ์ RYM-202 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มที่พีเอช 8.0 นาน 2 ชั่วโมง

Gomes และคณะ (1992) รายงานถึงระดับความเหมาะสมของอุณหภูมิต่อการผลิต FPase, xylanase และ beta-glucosidase สูงสุดที่อุณหภูมิ 32 ,34 และ 31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Trigo และ Ball (1994) จากการศึกษาพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากเชื้อรา *Thermomonospora Fusca* BD25 จะสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเป็น 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะคงตัวที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส โดยมีครึ่งชีวิตเท่ากับ 70 และ 40 นาที ตามลำดับแต่เอนไซม์ไซลาเนสและเอนโดกลูโคเนสจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสูงกว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสคือ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไซลาเนสจะคงตัวที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นานกว่า 30 นาที และเอนไซม์เอนโดกลูโคเนสคงตัวที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

Cesar และ Mrsa (1996) พบว่าเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* DSM5826 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์จะคงตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แต่ถ้าเติมกลีเซอรอล (glycerol) บีต้า-เมอแคปโตเอทานอล (β-mercaptoethanol) หรือพอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) จะสามารถเก็บได้ถึง 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมถึงร้อยละ 70 และเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกทำลายมากกว่าร้อยละ 90 ภายในเวลา 40 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sing และคณะ (2000) รายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนสของ *Thermomyces lanuginosus* SSBP มีความสามารถคงตัวสูงที่สุด ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิต ($T_{½}$) เท่ากับ 337 นาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และสามารถรักษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้สมบูรณ์ที่สุดที่อุณหภูมิสูงถึง 65 องศาเซลเซียส และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ประมาณร้อยละ 45 หลังจากระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อีกทั้งยังสามารถรักษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสได้นานที่สุดเป็นระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

2.9.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อเอนไซม์

เอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็นกลางถึงด่าง โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชที่เหมาะสม ซึ่งจะแตกต่างไปตามสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ถ้าพีเอชเปลี่ยนแปลงไปจากค่าที่เหมาะสมจะทำให้กิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์ลดลง โดยเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราชอบอุณหภูมิสูงส่วนใหญ่มีความสามารถในการคงตัวได้ดีในพีเอชช่วงแคบประมาณ 5.5 - 9.5 แต่จะสามารถคงตัวได้ดีในพีเอชช่วงกว้างขึ้นเมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Sing และคณะ, 2000)

Kang และคณะ (1996) ได้ศึกษาผลของพีเอชต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Cephalosporium sp.* สายพันธุ์ RYM-202 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 7.5-8.0 และมีความคงตัวที่พีเอชในช่วง 5.5-12.0

Cesar และ Mrsa (1996) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 จะทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 4.5 ถึง 6.5 โดยพีเอชที่เหมาะสมคือ 5.0 ถึง 7.0 เอนไซม์จะคงตัวที่พีเอช 5.0 ถึง 9.0 ซึ่งเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมน้อยกว่าร้อยละ 15 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ที่พีเอช12.0 จะสูญเสียกิจกรรมร้อยละ 30 และที่พีเอชต่ำจะสูญเสียกิจกรรมเช่นกัน คือที่พีเอช 4.0 เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมร้อยละ 30 ภายใน 3 วัน และพีเอช 3.0 เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมจนหมดภายในเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.9.3ผลของไอออนของโลหะและสารประกอบบางชนิดต่อเอนไซม์

ไอออนของโลหะและสารประกอบบางชนิดมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์บางชนิดอาจไปส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปของโคแฟคเตอร์ (cofactor) ซึ่งช่วยให้เอนไซม์สามารถจับกับสับสเตรทได้ดีขึ้น หรือช่วยให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่เหมาะสมแก่การเร่งปฏิกิริยา แต่ไอออนของโลหะบางชนิดจะมีผลไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ โดยทำให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้น้อยลงลงหรือช้าลงหรืออาจไปมีผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-สับสเตรท (enzyme-substrate complex) ไปเป็นผลผลิตซึ่งมีความสามารถส่งเสริมหรือยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โดยขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ด้วย (Chaplin และ Bucke, 1992)

Antony และคณะ (2003) พบว่าเมื่อเติมเกลือแร่ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์จะถูกผสมกับส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* AR1 ที่มีไซโลสอยู่ที่ pH 9.0 ที่อุณหภูมิ 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส พบว่า $HgCl_2$ จะทำให้มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุด คือ ร้อยละ 31.5 ของกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส โดยตัวยับยั้งเอนไซม์ไซลาเนส ส่วนมาก คือ Hg^{2+} ส่วน $FeSO_4$ และ $CaCl_2$ จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ที่ร้อยละ26.3 และ 16 ตามลำดับ ส่วน $NiCl_2$, $MgCl_2$, KCl และ NaCl ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อค่ากิจกรรม ของเอนไซม์ ขณะที่ $CuSO_4$, $MnSO_4$ และ $AgNO_3$ จะกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ขึ้นที่ร้อยละ 33 ส่วนสารที่มีส่วนประกอบเป็นโลหะ คือ EDTA จะเป็นตัวกระตุ้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส เพียงเล็กน้อย (ร้อยละ 7.84) ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการเคลื่อนย้ายของไอออนของโลหะหนักในสารละลายเอนไซม์

Antony และคณะ (2003) พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ เชื้อ *Aspergillus fumigatus* AR1 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ปริมาณสูง(228 ยูนิต/มิลลิลิตร) ที่ชั่วโมงที่ 42 ในอาหารเหลว ที่พีเอช 9.0 โดยในช่วงระยะเวลาหลังของการผลิต พบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสลดลงเป็น 90 ยูนิต/มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 90 เนื่องจากมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่มีค่ากิจกรรมสูง (120-59 ยูนิต/มิลลิลิตร) ร่วมด้วยระหว่างการหมัก แต่ $CuSO_4$ ที่ 25 มิลลิโมลาร์ จะช่วยในการทำให้ไม่มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสอย่างสิ้นเชิงโดยไม่มีผลกระทบต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส

2.10. การนำเอนไซม์ไซลาเนสไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม

2.10.1 การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการฟอกเยื่อกระดาษเพื่อกำจัดลิกนิน และลดการใช้สารเคมี (Biopulping)

การผลิตกระดาษมีหลายวิธี การที่จะเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นอยู่กับว่าเยื่อกระดาษที่ได้จะนำไปทำกระดาษชนิดใด นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดไม้ที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบ กรรมวิธีที่ใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษ แบ่งตามกรรมวิธีใหญ่ ๆ ดังนี้

2.10.1.1 กรรมวิธีใช้กำลังกล (mechanical process)

วิธีใช้แรงอัด อัดท่อนไม้ที่ปลอกเปลือกแล้วให้สัมผัสหินบด (grinding stone) ซึ่งผิวหน้าของหินบดมีลักษณะมีคม เช่น เดียวกับหินลับมีด ไม้จะถูกันและออกมาเป็นชิ้นเล็กๆ เครื่องจักรที่ใช้ผลิตเยื่อชนิดนี้ เรียกว่า เครื่องบด (grinder) เนื่องจากขณะที่ไม้ถูกฝนอยู่นั้นจะมีความร้อนจากการเสียดสีเกิดขึ้น อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส จึงจำเป็นต้องพ่นน้ำให้เป็นละอองอยู่ตลอดเวลา และส่วนหนึ่งของหินบดจะหล่ออยู่ในอ่างน้ำ เยื่อที่ถูกบดออกมาจะอยู่ในอ่างนี้ และจะถูกระบายออกจากอ่างน้ำตลอดเวลา การผลิตโดยวิธีนี้ให้ผลผลิตสูงมากถึงร้อยละ 90-95 ของน้ำหนักไม้ที่เป็นวัตถุดิบ แต่คุณสมบัติของกระดาษที่ได้จากการผลิตเยื่อกระดาษวีนี้มีคุณภาพต่ำ จึงใช้เป็นส่วนผสมในการทำกระดาษบางประเภท โดยจะให้คุณสมบัติด้านทึบแสง เส้นใยเดี่ยวซึ่งไม่ค่อยสมบูรณ์อาจมีการฉีกขาดและยังมีลิกนินตกค้างอยู่ ทำให้พันธะระหว่างเส้นใยต่ำไม่เหมาะที่จะนำไปทำกระดาษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ต้องรับแรงดึงสูงแต่มีราคาถูก เช่น กระดาษห่อของ กล่องใส่ของ ซึ่งไม่มีความจำเป็นต้องเก็บไว้นานๆ

2.10.1.2 กรรมวิธีทางเคมี (chemical process)

วิธีนี้ใช้สารเคมีบางชนิดละลายลิกนินที่ทำหน้าที่เป็นกาวเชื่อมเซลล์ของไม้เข้าด้วยกัน ทำให้แต่ละเซลของไม้แยกหลุดออกจากกัน กรรมวิธีทางเคมีนี้แบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้

2.10.1.2.1 กรรมวิธีซัลไฟต์ (sulphite process)

กรรมวิธีนี้เกิดขึ้นครั้งแรกในยุโรป เยื่อกระดาษที่ได้นี้เรียกว่า เยื่อกระดาษซัลไฟต์ (sulphite pulp) สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ นำมาละลายในน้ำที่มีด่างบางตัวละลายอยู่ เบสที่ใช้ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม แอมโมเนียม หรือโซเดียม ซึ่งซัลเฟอร์-ไดออกไซด์จะละลายอยู่ในน้ำในสภาพกรดซัลฟูรัส การใช้ด่างแต่ละตัวค่าพีเอชของน้ำยาที่ได้จะแตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้ได้พีเอชของน้ำยาที่ต้องการ จึงจำเป็นต้องเลือกด่างที่เหมาะสม ในการย่อยกระดาษนั้น ชิ้นไม้จะถูกลำเลียงลงสู่พังย่อยพร้อมด้วยน้ำยาสำหรับย่อย จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง แล้วแต่ชนิดของวัฏดิบที่ใช้ วิธีการต้ม และชนิดของถังย่อย ลิกนินในไม้จะรวมกับไฮโดรเจนซัลไฟต์เกิดเป็นลิกโนซัลเฟอร์เนท ซึ่งละลายน้ำได้จึงทำให้ไฟเบอร์ของไม้แยกหลุดออกจากกันเป็นชิ้นไม้ เมื่อถูกย่อยดีแล้วน้ำยาจะถูกระบายออกจากถังย่อย และบางครั้งยังสามารถนำกลับไปใช้ได้อีก สำหรับชิ้นไม้จะถูกระบายออกจากถังย่อย

การร่อนเยื่อ (screening) ชิ้นไม้ที่ย่อยแล้วจะถูกล้างด้วยน้ำเพื่อเอาน้ำยาออกและกรองด้วยตะแกรงแบบต่าง ๆ เพื่อเอาส่วนที่เป็นตาไม้ซึ่งไม่ถูกย่อย หรือสิ่งสกปรกต่างๆ ออก การกรองทำหลายขั้นตอนด้วยกัน ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสิ่งสกปรกเจือปนอยู่เยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีซัลไฟต์มีสีค่อนข้างจางเกือบเป็นสีขาว สามารถนำไปทำเป็นกระดาษบางประเภทได้เลย เช่น กระดาษหนังสือพิมพ์รายวัน รายปักษ์ โดยเฉพาะเยื่อกระดาษที่ทำจากไม้ที่มียาง ได้แก่ ไม้สน สำหรับคุณสมบัติของเยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีอื่น ก็คือ เมื่อนำไปทำกระดาษแล้วให้ความแข็งแรงกว่าเยื่อกระดาษที่ได้จากวีกล แต่ผลผลิตที่ได้ประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักไม้ที่ใช้

2.10.1.2.2 กรรมวิธีซัลเฟต (sulphate process)

เรียกอีกอย่างว่า กรรมวิธีคราฟท์ (kraft process) การที่เรียกอย่างนี้เพราะว่าในการที่เอาโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำยาที่ใช้แล้วกับมาใช้อีกจะต้องเติมโซเดียมซัลเฟตลงไป จึงเรียกกรรมวิธีนี้ว่า กรรมวิธีซัลเฟต หรือเนื่องจากว่าเยื่อกระดาษที่ได้โดยกรรมวิธีนี้มีลักษณะเหนียวแข็งแรง สารเคมีที่ใช้กรรมวิธีนี้คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์กับโซเดียมซัลเฟต์เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้อาจมีโซเดียมคาร์บอเนตและโซเดียมซัลเฟตบ้างเล็กน้อย การย่อยเยื่อกระดาษทำในถังย่อยเช่นเดียวกับวิธีซัลไฟต์ อุณหภูมิที่ใช้ 170 องศาเซลเซียส เวลา 3-4 ชั่วโมง กรรมวิธีนี้ใช้ได้กับเยื่อไม้ทุกชนิดทั้งไม้สนและไม้เนื้อแข็ง เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีนี้จะมีลักษณะสีคล้ำแต่เหนียว สามารถนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำกระดาษที่ต้องการความแข็งแรงมาก ๆ ได้ดี เช่น ถุงกระดาษใส่ซีเมนต์ ปุ๋ย ถุงใส่ของ กล่องกระดาษ ส่วนสีสามารถทำให้ขาวได้โดยการฟอกสี

2.10.1.2.3 กรรมวิธีโซดา (soda process)

เป็นกรรมวิธีทางเคมีวิธีแรกที่ค้นพบ และนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมโดยชาวอังกฤษ กรรมวิธีนี้ใช้สารเคมีที่สำคัญ คือโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรรมวิธีนี้ย่อยไม้เนื้อแข็งได้ดีกว่าไม้เนื้ออ่อน เยื่อกระดาษที่ได้จากกรรมวิธีนี้ให้ผลผลิตน้อย คือประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักของไม้ และความแข็งแรงของเยื่อเมื่อนำมาทำกระดาษค่อนข้างต่ำ ซึ่งต่ำกว่าเยื่อที่ได้โดยวิธีซัลเฟต และมีสีน้ำตาลคล้ำ ก็อาจทำให้ขาวได้โดยการฟอกสี การย่อยเยื่อกระดาษจะย่อยในถัง ปริมาณสารเคมีที่ใช้คือโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 15-20 ต่อน้ำหนักแห้งของไม้ อุณหภูมิที่ใช้ 160-170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้และผลผลิตที่ต้องการ

สำหรับขั้นตอนการฟอกเยื่อมีจุดประสงค์เพื่อกำจัดลิกนินออกไป ซึ่งทำให้เยื่อมีความขาวสว่างมากขึ้น โดยใช้สารเคมีทำปฏิกิริยากับลิกนินในเนื้อไม้ การฟอกเยื่อประกอบด้วยหลายขั้นตอนมีชื่อเรียกตามสารเคมีที่ใช้ในการฟอก และเรียงตามลำดับตัวอักษรตัวแรกของแต่ละขั้นตอนโดยสารเคมี สัญลักษณ์ และชื่อขั้นตอนการฟอกต่างๆ (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 ลำดับขั้นตอนของการใช้สารเคมีในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ

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

ที่มา : วิธัญญาและคณะ (2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างของขั้นตอนการฟอก เช่น CEH, CEDED, CEDEP, CEOP ซึ่งทางโรงงานจะเลือกวิธีการฟอก โดยพิจารณาจากชนิดของกระดาษที่ต้องการผลิต มีความจำเป็นอย่างมากในการเลือกวิธีการฟอกให้เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อคุณภาพของเยื่อและลดต้นทุนการผลิตให้น้อยที่สุด

เยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ฟอกจะมีสีคล้ำ เมื่อผ่านการฟอกแล้วจะมีสีขาวขึ้น โดยการฟอกสีเยื่อกระดาษมีหลักในการพิจารณาขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ ถ้าการฟอกนั้นต้องเอาลิกนินและสารให้สีต่าง ๆ ออกจากเยื่อกระดาษ ในกรณีนี้ช่วยในการฟอกเยื่อกระดาษที่มีลิกนินปนอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ถ้าเยื่อกระดาษที่มีลิกนินเหลืออยู่มากก็ไม่เป็นการประหยัด การเอาลิกนินออกจากไม้ทำได้โดยใช้เทคนิคในการต้มไม้ (cook) ดีกว่าการฟอก

การใช้ไซลาเนสย่อยเฮมิเซลลูโลสในการฟอกกระดาษ จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้สารเคมีในขั้นตอนการกำจัดลิกนินออกจากเยื่อกระดาษ (Viikari และคณะ, 1986) วิธีการที่ใช้เอนไซม์นี้จะทำให้ได้กระดาษที่มีค่าความขาวสว่างสูงมากขึ้น หรือลดการใช้สารเคมีในการฟอกสี เนื่องจาก การกำจัดลิกนินที่ก่อให้เกิดสีน้ำตาลเข้มในกระบวนการฟอกเยื่อไม้ ซึ่งมีการใช้สารเคมีพวกคลอรีนเบส (chlorine-based) ในการช่วยฟอกลิกนินที่ละลายน้ำที่เกิดจากการผลิตทำให้น้ำมีสีเข้มขึ้นและก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนั้นยังพบสารพิษไดออกซิน (dioxin) ในน้ำเสียที่เกิดจากการฟอกเยื่อไม้อีกด้วย จึงมีการใช้เอนไซม์ช่วยในการลดสารพิษที่จะตกค้างในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะสามารถลดปริมาณการใช้ก๊าซคลอรีน ซึ่งเป็นสาเหตุในการทำให้เกิดสารพิษจำพวกสารประกอบคลอรีน โดยการใช้เอนไซม์ ไซลาเนสจะช่วยลดระยะเวลาในการย่อยสลายเนื้อไม้ ให้ได้เยื่อไม้ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ เนื่องจากสารละลายของเนื้อเยื่อไม้มีเฮมิเซลลูโลส ซึ่งระหว่างการให้ความร้อนหรือในสภาวะที่เป็นด่างไซแลนบางส่วนละลายออกมาในลักษณะสายสั้นๆ ตกตะกอนอยู่บนผิวไมโครไฟบิล (microfibril) ของเซลลูโลส (Ratto และคณะ, 1994) จึงมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการฟอกเนื้อเยื่อไม้สำหรับทำเยื่อกระดาษ

การใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ มีจุดมุ่งหมายเพื่อลดการใช้พลังงานในการผลิตเยื่อกระดาษ ปรับปรุงสมบัติการให้น้ำไหลผ่านในการทำกระดาษรีไซเคิล เพิ่มความสามารถในการบดเยื่อกระดาษ และปรับปรุงคุณภาพของเส้นใย การผลิตเยื่อกระดาษแบบวิธีกลจะได้ปริมาณเยื่อมากแต่ยังคงเหลือลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสอยู่ในเยื่อเกือบทั้งหมด (Saddler, 1993) ได้ศึกษาบทบาทของไซแลนเพื่อปรับปรุงคุณภาพเยื่อกระดาษโดยใช้ไซลาเนสฟอกเยื่อกระดาษจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าเยื่อที่ผ่านไซลาเนสจะมีความยืดหยุ่นดี บ่งชี้ว่าเกิดจากมีการเปลี่ยนแปลงภายในเส้นใยของเยื่อ นอกจากนี้พบว่าเยื่อกระดาษมีค่าการดูดน้ำเพิ่มขึ้น เนื่องจากเส้นใยพองตัวดี นอกจากนี้การใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพก็ยังมีความน่าสนใจในด้านการลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียและได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยจากสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษส่วนใหญ่ใช้คลอรีนในการฟอกสีกระดาษเพราะมีราคาถูกแต่มีผลข้างเคียงมากมาย โดยโรงงานที่ใช้คลอรีนฟอกสีกระดาษจะถ่ายเทสารไดออกซิน (dioxin) ซึ่งไดออกซินจะไปจับกับดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดอาการปวดตามข้อ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่ทำงานตามปกติทั้งยังมีผลให้ตัวอ่อนของสัตว์เป็นโรคบวม และยังมีการวิจัยพบสารไดออกซินในน้ำนมมารดาอีกด้วย ยังมีการใช้สารประกอบคลอรีนในรูปที่สลายตัวได้ง่าย คือ สารเคมีไดออกไซด์ (chlorine dioxide, DIO_2) เป็นก๊าซที่มีสีเหลืองแดง ซึ่งมีผลในการฟอกสีมากกว่า 2 เท่าของคลอรีน ปัจจุบันนี้เพื่อให้ได้เยื่อกระดาษที่ขาว และมีความบริสุทธิ์มากขึ้น จึงใช้สารเคมีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ คลอรีน โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไฮโปคลอไรด์ คลอรีนไดออกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ขั้นตอนในการฟอกสีตลอดจนสภาวะต่างๆ ในการฟอกสีที่แตกต่างกันไป โดยคำนึงถึงความสะอาดของเยื่อได้ และเยื่อได้รับความเสียหายเนื่องจากการฟอกน้อยที่สุด โดยการผลิตเยื่อและการฟอกสีโดยกระบวนการทางเคมีนั้น ถึงแม้จะมีข้อดีคือได้เยื่อที่มีคุณภาพสูงภายในระยะเวลาสั้นๆ แต่ต้องอาศัยเงินทุนจำนวนมหาศาลในแง่ของเครื่องจักรและสารเคมี นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารพิษที่เกิดจากกระบวนการทั้งสองออกมามาก (ตารางที่ 2.4)

นอกจากกระบวนการข้างต้นจะเห็นได้ว่าลิกนินถูกสกัดออกมาจะอยู่ในรูปของ chlorolignin และ chlorinated phenol สารดังกล่าวจะออกมากับน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกเยื่อ และสาร chlorinated phenol และ glycol เป็นสารที่มีพิษจากกระบวนการผลิตเยื่อเช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่น ในน้ำทิ้งที่ออกมาจากขั้นตอนแรกของวิธีการสกัดด้วยด่างจะมีสารพวกคลอรีนที่เป็นสารอินทรีย์มากมาย ซึ่งมี chlorinated phenol เป็นสารประกอบหลัก และมีความจำเป็นต้องมีการบำบัดก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งหากไม่มีการบำบัดสารประกอบดังกล่าวอาจมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำ และอาจก่อให้เกิดมลภาวะทางน้ำ ตามมาอีกด้วย ปัญหาของสีในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษก็เป็นปัญหาที่สำคัญปัญหาหนึ่ง ซึ่งเกิดจากสามกระบวนการที่แตกต่าง คือ การผลิตโดยกระบวนการทางเคมี การฟอกสีเยื่อกระดาษ และการผลิตกระดาษสี กระบวนการฟอกสีจะผลิตสีออกมาปริมาณมากกว่ากระบวนการทำเยื่อกระดาษ โดยมีผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อน้ำ คือ สีจะขัดขวางการผ่านของแสงอาทิตย์ ซึ่งมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำให้ลดปริมาณสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ เกิดปัญหากับกระบวนการต่างๆ ในอุตสาหกรรม ค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียสูง สีที่มีโลหะอิออนปน เช่น เหล็กหรือทองแดงจะไปขัดขวางกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตในสายใยอาหาร

จากปัญหาข้างต้นอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษดังกล่าวอาจมีแนวทางใหม่ให้เลือกอาทิเช่น แนวทางการนำเทคโนโลยีการฟอกเยื่อด้วยวิธีทางชีวภาพเข้ามาเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการฟอกเยื่อด้วย วิธีทางเคมีนับว่าเป็นประโยชน์อย่างมากเพราะสามารถลดต้นทุนการผลิตและไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นคุณลักษณะ 3 ประการ ที่มีการนำเอนไซม์ไซลาเนสที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกสีกระดาษ

1. มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสูงและมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง สิ่งนี้จะช่วยประหยัดพลังงานและจะช่วยประหยัดได้มาก

2. มีพีเอชที่เหมาะสมสูง และมีความเสถียรที่พีเอชสูงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและลดราคาต้นทุนในการจัดหาเครื่องมือเพื่อปรับค่าพีเอช ซึ่งสามารถช่วยแก้ปัญหาได้โดยการนำไปผสมกับเยื่อกระดาษ และสามารถใช้หมุนเวียนได้

3. มีค่า pI (isoelectric point) ที่เป็นด่างสูง เอนไซม์ไซลาเนสยังคงเกาะติดอยู่กับสารตั้งต้นเมื่อมีค่าพีเอชไม่ต่ำกว่าค่า pI ของเอนไซม์ การเกาะกับสารตั้งต้นแสดงให้เห็นว่าเป็นการช่วยส่งเสริมการย่อยสารตั้งต้น ดังนั้น เอนไซม์ไซลาเนสที่มีค่า pI เป็นด่างสูงจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นมาก อย่างไรก็ตามในสภาวะที่จะมีการนำเอนไซม์มาใช้ใหม่ จะต้องพิจารณาที่ค่า pI สูง ๆ ซึ่งสิ่งนี้ก็เป็นอุปสรรคอย่างหนึ่งที่ต้องทำการศึกษากันต่อไป

Christoy และ Prior (1993) ใช้เอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเชื้อ *Aureobasidlum pullulan* NRRL Y-2311-1 ที่มีแอคติวีตี 1500 ยูนิต/กรัม (เตรียมสารละลายเอนไซม์ในซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.5) ย่อยสารละลายเยื่อไม้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่บ่มและแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น โดยย่อยได้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อไม้ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในช่วงเวลาต่างๆ ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส

2.10.2 การผลิตเอทานอล

ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นไซแลน และเซลลูโลส ภายหลังจากการย่อยจะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลไซโลส และน้ำตาลกลูโคสตามลำดับ จากนั้นจึงใช้ยีสต์หมักน้ำตาลที่ได้เปลี่ยนเป็นเอทานอล (Puls, 1993) ซึ่งกระบวนการผลิตโดยส่วนใหญ่ใช้กรดในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ หรือการใช้ความร้อนสูงร่วมด้วยในการย่อยสลายเพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (Morjanoff และ Gray, 1987) กระบวนการผลิตเหล่านี้จะมีสารประกอบพวกฟีนอล (phenolic compound) เกิดขึ้น ซึ่งฟีนอลนี้จะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์จึงต้องมีการกำจัดฟีนอลออกโดยวิธีต่างๆ เช่น การใช้เรซินและถ่านกัมมันต์ (active charcoai) จากนั้นจึงใช้ด่างในปรับพีเอชให้เป็นกลางเพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ (Watson และคณะ, 1984)

ส่วนกระบวนการผลิตอีกวิธีหนึ่งคือ การใช้เอนไซม์ย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าให้น้ำตาลรีดิวซ์สูง อีกทั้งยังสามารถใส่ยีสต์ลงไปเพื่อหมักให้เกิดเป็นเอทานอลได้เลย ทั้งยังเป็นการลดขั้นตอนการกำจัดฟีนอลและการปรับพีเอชให้เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ (Martin และคณะ, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.3 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

ในการทำขนม เช่น เค้ก คุกกี้ แครกเกอร์ และอาหารอื่น ๆ เอนไซม์ไซลาเนส จะช่วยในการทำลายพันธะในพอลิแซ็กคาไรด์ ช่วยให้การทำขนมและอาหารเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้นด้วย

2.10.4 อาหารสัตว์

เศษวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร ซึ่งส่วนใหญ่มักประกอบด้วยลิกนิน จึงทำการกำจัดเอาส่วนที่เป็นลิกนินออกโดยใช้เอนไซม์ย่อยก่อนที่จะนำไปเป็นอาหารสัตว์ หรือเติมเอนไซม์ลงไปในอาหารธัญพืชที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารของสัตว์และยังเพิ่มการดูดซึมเกลือแร่และเป็นการเพิ่มคุณค่าของอาหารสัตว์

2.10.5 ประโยชน์ของเอนไซม์ไซลาเนสอื่นๆ

1. การปรับปรุงเส้นใย เพื่อให้เส้นใยมีคุณภาพดีขึ้น (Singh, 2000)

2 . การสกัดกาแฟ โดยใช้ในขั้นตอนการย่อยเปลือกกาแฟ (Wong และ Saddler, 1992; Singh, 2000)

3. ใช้ในการผลิตน้ำมันพืชและการทำแป้ง (Wong และ Saddler, 1992; Singh, 2000)

4. ใช้ในการปรับปรุงที่ดินสำหรับทำการเกษตรและการปลูกข้าว โดยเอนไซม์ไซลาเนสจะไปช่วยเพิ่มแร่ธาตุ ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์เหมาะแก่การเพาะปลูก (Wong และ Saddler, 1992; Singh, 2000)

5. การกำจัดส่วนที่เหลือจากการเกษตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบแข็ง (Biely, 1985)

6. การทำให้น้ำผักและผลไม้ใส โดยเอนไซม์ไซลาเนสจะไปทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์ของผักและผลไม้ทำให้ผนังเซลล์แยกตัวออกมา เรียกวิธีนี้ว่า Clarification (Biely, 1985; Wong และ Saddler, 1992)

7. การผลิตอาหารที่เพิ่มไฟเบอร์ หรือคล้ายเนื้อสัตว์ในอาหารเสริมสุขภาพและอาหารเพิ่มโปรตีนและอาหารสัตว์ (Kuhad และคณะ, 1997)

8. การผลิตเชื้อเพลิงทางเคมี ไซลิทอล เอทานอล สารทำละลายและกรดอินทรีย์ (Biely, 1985; Singh, 2000)

9. ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Singh, 2000; Kuhad, 1997)

10. การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการเตรียมวัตถุดิบในการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ เช่น ใช้ในการศึกษา คุณสมบัติของโพลิแซคคาไรด์ และผนังเซลล์ของพืช (Wong และคณะ, 1988)

11. ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันปาล์ม เช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลส และเพคติเนส ในอัตรา 200-1000 กรัมต่อตัน ที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง เพื่อแปรสภาพเนื้อเยื่อพืชก่อนนำไปสกัด นอกจากนี้ยังใช้ช่วยปรับปรุงคุณภาพของน้ำมัน และน้ำทิ้งโดยลดปริมาณเนื้อเยื่อของพืชที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงทำให้เกิดความหนืดและข้น เช่น กลูแคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และเพคติน ซึ่งช่วยในการทำให้ใส (clarification) ในกระบวนการแยกน้ำมัน (Godfrey, 1983)

12. ใช้ช่วยปรับปรุงคุณภาพของน้ำมัน และน้ำทิ้งโดยลดปริมาณเนื้อเยื่อของพืชที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงทำให้เกิดความหนืดและข้น เช่น กลูแคน เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และเพคติน ซึ่งช่วยในการทำให้ใส (clarification) ในกระบวนการแยกน้ำมัน

ตารางที่ 2.5 : สารเคมีที่เป็นพิษที่เกิดจากกระบวนการผลิตเยื่อและกระบวนการฟอกสี

กระบวนการ	สารเคมีที่เป็นพิษ
Kraft pulping	Resin acids include abietic, dehydroabietic, isopimaric, palustric, pimaric, aracopimaric and neaobietic. Unsaturated fatty acids include oleic, linoleic, and palmitoleic.
Sulfite pulping	Resin acids include abietic, dehydroabietic, isopimaric, palustric, pimaric, aracopimaric and neaobietic. Unsaturated fatty acids include oleic, linoleic and palmitoleic. Juvabines include juvabione, juvabiol, dehydrojuvabione and 3-dehydrojuvabiol. Lignin degradation products include eugenol, isoeugenol and 3, 3'dimethoxy-4 และ 4' dihydroxystilbene.
Mechanical pulping	Resin acids include abietic, dehydroabietic, isopimaric, palustric, pimaric, aracopimaric and neaobietic. Unsaturated fatty acids include oleic, linoleic and palmitoleic. Diterpene alcohols include pimarol. Isopimarol, abienol, 12-β-abienol, และ 13-epimanool.
Mechanical pulping	Juvabiones include juvabione, juvabiol, - dehydrojuvabione and dehydrojuvabiol. Chlorinated resin acids include monchloro and dichlorodehydroabietic. Unsaturated fatty acid derivatives include epoxystearic acid and dichlorostearic acid. Included also are 3,4,5,-trichloroguaiacol and3,4,5-tetrachloroguaiacol.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 (ต่อ) : สารเคมีที่เป็นที่เป็นพิษจากกระบวนการผลิตเยื่อและกระบวนการฟอกสี

กระบวนการ	สารเคมีที่เป็นพิษ
Debarking	Resin acids include abietic, dehydroabiedic, isopimaric, palustric, pimaric, aracopimaric and neaobietic. Unsaturated fatty acids include oleic, linoleic and palmitoleic. Diterpene alcohols include pimoral, isopimarol, abienol, 12-β - abienol and 13- epimanool.

ที่มา : ภัทราพร และคณะ (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

1. ไซแลนสกัดจากต้นโอ๊ค (oat spent xylan) สำเร็จรูป

2. ซังข้าวโพดบด โดยต้องนำมาตากแดดให้แห้งเพื่อป้องกันเชื้อรา จากนั้นจึงนำไปบดให้ละเอียดให้มีขนาดไม่เกิน 2.5 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องบดหญ้า และนำมาอบให้แห้งอีกครั้ง จากนั้นเก็บไว้ในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท เพื่อป้องกันซังข้าวโพดดูดความชื้นทำให้เก็บไว้ใช้ตลอดการทดลอง

3.1.2 จุลินทรีย์

เชื้อที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นเชื้อที่แยกได้จากธรรมชาติ โดยเป็นสายพันธุ์ของ *Aspergillus fumigatus* ที่แยกได้จากดินและสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (45 องศาเซลเซียส) (เรวดี ปรีบัว, 2547) โดยทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารวุ้นเอียง PDA (Potato Dextose Agar) โดยถ่ายเชื้อเดือนละ 2 ครั้ง เมื่อเชื้อเจริญและสร้างสปอร์สมบูรณ์ จะทำการเก็บรักษาเชื้อไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.3 อุปกรณ์

1. แท่งแก้วกวนสารแม่เหล็ก (magnetic bar)
2. เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)
3. ฮีมาไซโตมิเตอร์
4. ตู้บ่มเชื้อหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
5. ตู้ฉายแสงอัลตราไวโอเลต (256 nm)
6. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow)
7. เครื่องเขย่า (shaker)
8. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
9. แผ่นกรองซินเทอร์กลาส
10. ตู้อบแห้ง
11. กล้องจุลทรรศน์
12. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
13. เครื่องวัดพีเอช
14. ตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4 สารเคมี

1. ทวีน 80 (Tween 80) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01
2. ซิเตรตบัฟเฟอร์ (Citrate buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมล พีเอช 4.8
3. ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)
4. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ก)
5. คองโก เรด (congo red)
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.1.5.1 การเตรียมสารละลายสปอร์

1. นำเชื้อตัวอย่างมาเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato dextrose agar) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน เพื่อให้เกิดสปอร์เด่มที่

2. เตรียมสารละลายสปอร์ โดยการเติมน้ำกลั่นที่มีโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.85 และทวีน 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Singh และคณะ, 1995)

3. กรองเส้นใยออกด้วยแผ่นกรองซินเทอร์กลาส (sinter glass)

4. นับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ให้ได้สารละลายสปอร์ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร

3.1.5.2 การหาร้อยละการอยู่รอดของเชื้อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี

1. ทำการเตรียมสารละลายสปอร์ให้ได้จำนวนสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร

2. นำสารละลายสปอร์ไปทำการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีร่วมกับแสงอัลตราไวโอเลต โดยการนำสารละลายสปอร์ที่ถูกเตรียมไปทรีตด้วยสารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) 100 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที (Singh และคณะ, 1995)

3. จากนั้นนำ สปอร์ที่ผ่านการทรีตแล้วมาล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 2-3 ครั้ง โดยผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

4. นำมาฉายแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้หลอดยูวี (254 นาโนเมตร) เป็นเวลา 0 , 1 , 3 , 5 , 7 และ 10 นาที โดยการสุ่มตัวอย่างตามช่วงเวลาต่างๆ กัน ในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร

5. นำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6. จากนั้นนำไปทำการเจือจางในอัตราที่เหมาะสมแล้วนำมา spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยให้มีจำนวนโคโลนีเกิดขึ้นอยู่ในช่วง 100-300 โคโลนี โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

7. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

8. ทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณหาร้อยละการอยู่รอดของเชื้อโดยการเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการทรีตด้วยสารเคมีและแสงอัลตราไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. เลือกเวลาที่ทำการทรีตด้วยสารเคมีและแสงอัลตราไวโอเลตที่ให้มีร้อยละการอยู่รอดของเชื้อร้อยละ 5 (Singh และคณะ, 1995) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.5.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง

1. นำสารละลายสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร มาทำการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยการทรีตสารเคมีและผ่านการฉายแสงแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาที่ให้อัตราการอยู่รอดร้อยละ 5

2. แล้วทำการ spread plate เชื้อลงในอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

3. เมื่อเชื้อมีการเจริญ โดยแต่ละโคโลนี (colony) ของเชื้อราจะถูกนำมาทำการเคลื่อนย้ายบนอาหารแข็ง Czapek-Dox (CD) ซึ่งมีส่วนประกอบของ $NaNO_2$ (3.0 กรัม/ลิตร), KH_2PO_4 (1.0 กรัม/ลิตร), $MgSO_4$ (0.5 กรัม/ลิตร), $FeSO_4$ (0.01 กรัม/ลิตร) และ yeast extract (5.0 กรัม/ลิตร) โดยมีการเติมคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร หรือไซแลนจากโอ๊กร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร และเติมวุ้นความเข้มข้นร้อยละ 18 (Anthony และคณะ, 2003) และการเติม Sodium tauroglucocholate (เป็นตัวยับยั้งการเจริญของโคโลนี) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (Singh และคณะ, 1995)

4. บ่มที่ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-3 วัน

5.คัดเลือกโคโลนีที่ให้วงใสในอาหารแข็ง CD-medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนแต่ไม่ให้วงใสในอาหารแข็งที่มีเซลลูโลสและมีอัตราส่วนของวงใสรอบโคโลนีมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

6. ย้ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เลี้ยงให้เกิดสปอร์เต็มที่ รวบรวมและทำการเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3.1.5.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณและคุณภาพ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ ในสภาวะอาหารเหลวที่ประกอบด้วย เปปโตนร้อยละ 0.3, KH_2PO_4 ร้อยละ 0.2, $MgSO_4$ ร้อยละ 0.1, $CaCl_2$ ร้อออยละ 0.1, ยีสต์สกัดร้อยละ 0.3 และการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นไซแลนหรือซังข้าวโพดร้อยละ 1 ปรับให้อาหารมีค่าพีเอช 5.0

2. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร ลงไปใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

3. เติมโคโลนีขั้นต้น จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยมีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 4 วัน

4. เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ เป็นเวลา 15-20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยนำส่วนใส (clear supernatant) ที่ได้หลังจากปั่นเหวี่ยงจะถูกแบ่งใส่ภาชนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เล็กๆ เพื่อใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ไซลาเนสเพื่อทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ

3.1.5.4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในเชิงปริมาณ

1. โดยนำสารละลายเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD medium ที่มีการเติมไ ซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ปริมาณหลุมละ 5 ไมโครลิตร

2. นำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

3. นำไปย้อมสี congo red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 15 นาที และล้างออกด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที

4. วัดขนาดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อและหาอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนี/ขนาดของโคโลนีของเชื้อ

3.1.5.4.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในเชิงคุณภาพ

3.1.5.4.2.1 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส

1. เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายไซแลนเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที

4. ทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำก๊อก

5. เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6. ทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ (reduceing suger) ในปฏิกิริยา สามารถวัดได้โดยการใช้สารเคมีกรดไดไนโตรไซลิไซริค (dinitrosalicylic-DNS) และใช้น้ำตาลไซโลสเป็นสารละลายมาตรฐาน (Miller, 1959)

โดย 1 ยูนิต (unit) ของเอนไซม์ไซลาเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะวิเคราะห์

3.1.5.4.2.2 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (CMCase / endocellulase)

1. เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมล พีเอช 4.8

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที

4. ทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำก๊อก

5. เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ (reduceing suger) ในปฏิกิริยา สามารถวัดได้โดยการใช้สารเคมีกรดไดไนโตรไซลิไซริค (dinitrosalicylic-DNS) และใช้น้ำตาลไซโลสเป็นสารละลายมาตรฐาน (Miller, 1959)

โดย 1 ยูนิต (unit) ของเอนไซม์เซลลูเลส หมายถึง จำนวนของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับบเสตรทให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์

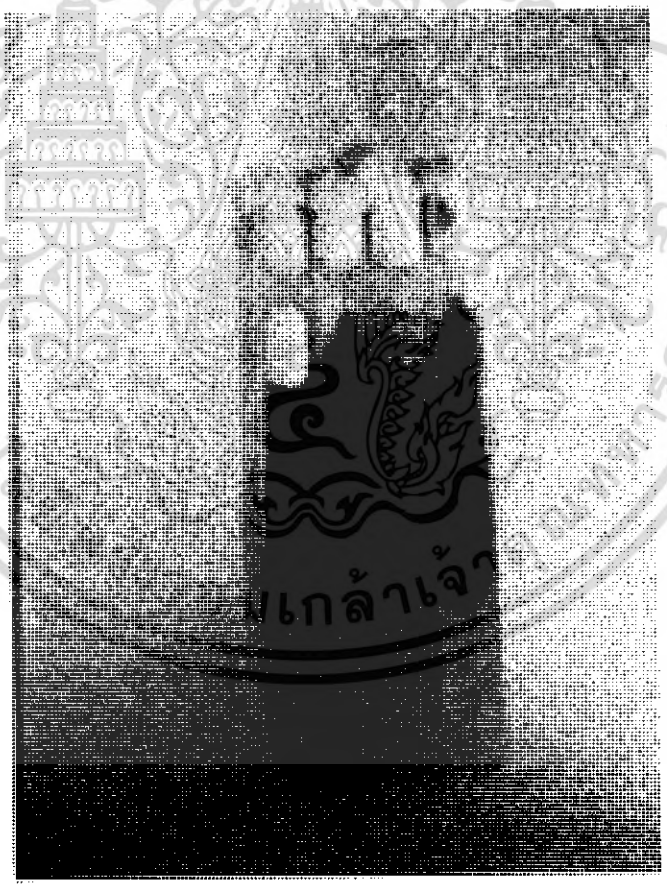
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ลักษณะเบื้องต้นของเชื้อ *Aspergillus fumigatus*

ลักษณะเบื้องต้นของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* เจริญเติบโตเป็นเส้นใย มีลักษณะเป็นเส้นใยฟู่สีเขียวที่เกิดจากสปอร์ (รูปที่ 4.1) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อนี้ คือ ไมซีเลียมของเชื้อนี้ประกอบด้วยเส้นใยที่แตกแขนงมากมายเส้นใยมีผนังกั้นและไม่มีสีแต่ละเซลมีนิวเคลียสหลายอัน มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงๆได้ และเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส และสามารถพบได้ทั่วไปในทุกๆที่ โดยเฉพาะในดินและในสารอินทรีย์ที่กำลังย่อยสลาย เช่น กองปุ๋ยหมัก จุลินทรีย์สายพันธุ์นี้เป็นตัวสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในคน และเป็นสาเหตุหลักในโรคแอสเปอจิลโลซิส (aspergillosis) (Steven และคณะ, 2000)



รูปที่ 4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ที่ใช้ในงานทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

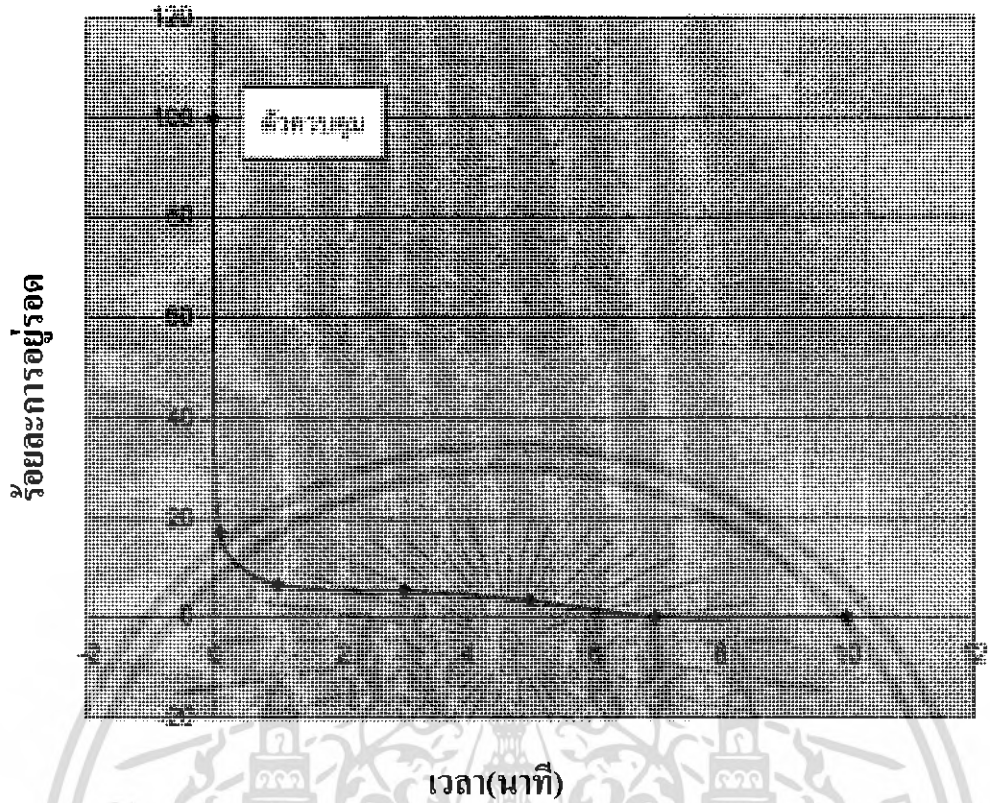
4.1.1 ศึกษาหาอัตราการอยู่รอด

ตารางที่ 4.1 : จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรและอัตราการอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine (NTG) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที (Singh และคณะ,1995) ร่วมกับแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ ในระดับความเจือจาง 10^{-2}

เวลา (นาที)	จำนวนโคโลนีของเชื้อต่อมิลลิลิตร (x 100)	อัตราการอยู่รอด (ร้อยละ)
ตัวควบคุม	57	100
0	10	16.95
1	4	6.43
3	3	5.26
5	2	3.51
7	0	0
10	0	0

จากผลการทดลองหลังจากการผ่านการการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี เป็นเวลา 30 นาที ร่วมกับแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ พบว่า เชื้อตัวควบคุมที่ไม่ผ่านสารเคมีและแสงอัลตราไวโอเลตได้ 5.7×10^3 โคโลนี และการตรวจนับโคโลนีที่เวลาที่ 0 นาที เชื้อจะผ่านการทรีตด้วยสารเคมีแต่ไม่ผ่านการฉายแสงแสงอัลตราไวโอเลตได้ 1.0×10^4 โคโลนี เมื่อนำมาคำนวณอัตราการอยู่รอดโดยเทียบกับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ผ่านสารเคมีร่วมกับแสงอัลตราไวโอเลต (ตัวทดลอง) ที่เวลา 3 นาทีจะมีอัตราการอยู่รอดประมาณร้อยละ 5.26 และได้คัดเลือกเอาเวลาที่ 3 นาที จาก killing curve ที่มีอัตราการอยู่รอดประมาณร้อยละ 5 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับทฤษฎีในการก่อกลายพันธุ์ *Fusarium oxysporum* โดยสามารถเพิ่มความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและ β- ไซโลซิเดสเป็นสามเท่าจากเดิม (Singh และคณะ, 1995) มาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* เพื่อเพื่อเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนอุณหภูมิสูงที่ปราศจากเอนไซม์เซลลูเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ร้อยละของการอยู่รอดของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีร่วมกับแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ ในระดับความเจือจาง 10^{-2}

4.1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณและคุณภาพ

เมื่อนำเชื้อที่ผ่านการชักนำด้วยสารเคมีและแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาคัดเลือกได้ให้มีร้อยละการอยู่รอดร้อยละ 5 ได้สายพันธุ์กลายทั้งหมด 58 สายพันธุ์ แล้วนำลงลงบนอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของ เปปโตนร้อยละ 0.3, KH_2PO_4 ร้อยละ 0.2 , $MgSO_4$ ร้อยละ 0.1, $CaCl_2$ ร้อยละ 0.1, ยีสต์สกัดร้อยละ 0.3 และการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นไซแลนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับให้อาหารมีค่าพีเอช 5.0 โดยเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้รอบของการหมุนเหวี่ยงที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่า เชื้อสายพันธ์กลาย *Aspergillus fumigatus* จะเจริญเติบโตในรูปของเส้นใย (mycelium)และในรูปของเพนเลต (pellet) ในอาหารเหลว โดยอาหารเหลวที่เชื้อเจริญเติบโตอยู่นั้นมีทั้งลักษณะใสและขุ่น (รูปที่ 4.3 และ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3 สายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* ที่เจริญเติบโตในอาหารเหลวซึ่งจะให้อาหารเหลวที่มีลักษณะใสและขุ่น

รูปที่ 4.4 สายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* ที่เจริญเติบโตในอาหารเหลวในรูปของ เพนเลต (pellet) และเส้นใย (mycelium)

หลังจากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* ในอาหารเหลว ที่ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้รอบของการหมุนเหวี่ยงที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อไป ปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ เป็นเวลา 15-20 นาที เก็บส่วนใสแบ่งใส่ภาชนะเล็กๆ เพื่อทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์

รูปที่ 4.5 ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ เป็นเวลา 15-20 นาที ซึ่งใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณ

เมื่อนำสายพันธุ์เชื้อ *Aspergillus fumigatus* ที่ผ่านการเหนี่ยวนำการก่อกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) และแสงอัลตราไวโอเลตทั้งหมด 58 สายพันธุ์ มาเลี้ยงลงในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้รอบของการหมุนเหวี่ยงที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการเลี้ยงไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในเชิงปริมาณ (วัดอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อ) โดยนำสารละลายเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ปริมาณหยดละ 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปย้อมสี congo red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 15 นาทีและล้างออกด้วยสารละลาย NaCl ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงวัดขนาดวงใสโคโลนีของเชื้อและทำการหาอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อ (รูปที่ 4.6) และทำการคัดเลือกที่ให้อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อที่มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

รูปที่ 4.6 ตัวอย่างของวงใสรอบโคโลนี เมื่อนำตัวอย่างเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD medium ที่มีการเติมไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน และทำการย้อมสีด้วย congo red

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็ง CD-medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1

เชื้อ	อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี(ซม.)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	2.092 efghijklmn
สายพันธุ์กลายที่ 1	1.865 jklmnopq
สายพันธุ์กลายที่ 2	2.502 bcdefghij
สายพันธุ์กลายที่ 3	1.986 ghijklmno
สายพันธุ์กลายที่ 4	1.219 pqr
สายพันธุ์กลายที่ 5	1.975 ghijklmno
สายพันธุ์กลายที่ 6	2.110 efghijklmn
สายพันธุ์กลายที่ 7	2.698 bcdefg
สายพันธุ์กลายที่ 8	1.961 hijklmno
สายพันธุ์กลายที่ 9	2.268 defghijkl
สายพันธุ์กลายที่ 10	2.893 bcd
สายพันธุ์กลายที่ 11	1.973 ghijklmno
สายพันธุ์กลายที่ 12	1.939 ijklmno
สายพันธุ์กลายที่ 13	2.233 dfghijklm
สายพันธุ์กลายที่ 14	1.810 klmnopq
สายพันธุ์กลายที่ 15	2.061 fghijklmn
สายพันธุ์กลายที่ 16	2.152 efghijklm
สายพันธุ์กลายที่ 17	3.022 bc
สายพันธุ์กลายที่ 18	2.002 ghijklmno
สายพันธุ์กลายที่ 19	2.784 bcde
สายพันธุ์กลายที่ 20	2.993 bc
สายพันธุ์กลายที่ 21	2.160 efghijklm
สายพันธุ์กลายที่ 22	2.800 bcde
สายพันธุ์กลายที่ 23	2.232 dfghijklm
สายพันธุ์กลายที่ 24	2.739 bcdef
สายพันธุ์กลายที่ 25	1.999 ghijklmno

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1

เชื้อ	อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี(ซม.)
สายพันธุ์กลายที่ 26	5.133[a]
สายพันธุ์กลายที่ 27	2.794[bcde]
สายพันธุ์กลายที่ 28	2.264[defghijkl]
สายพันธุ์กลายที่ 29	1.925[ijklmnop]
สายพันธุ์กลายที่ 30	1.190[qr]
สายพันธุ์กลายที่ 31	1.480[nopqr]
สายพันธุ์กลายที่ 32	2.249[defghijkl]
สายพันธุ์กลายที่ 33	1.680[klmnopqr]
สายพันธุ์กลายที่ 34	1.280[op]
สายพันธุ์กลายที่ 35	2.339[cdefghijkl]
สายพันธุ์กลายที่ 36	2.691[bcdefg]
สายพันธุ์กลายที่ 37	1.520[mnopqr]
สายพันธุ์กลายที่ 38	1.460[nopqr]
สายพันธุ์กลายที่ 39	2.995[bc]
สายพันธุ์กลายที่ 40	1.440[nopqr]
สายพันธุ์กลายที่ 41	2.348[cdefghijkl]
สายพันธุ์กลายที่ 42	1.870[jklmnopq]
สายพันธุ์กลายที่ 43	1.170[qr]
สายพันธุ์กลายที่ 44	1.951[hijklmno]
สายพันธุ์กลายที่ 45	1.520[mnopqr]
สายพันธุ์กลายที่ 46	1.024[r]
สายพันธุ์กลายที่ 47	1.651[lmnop]
สายพันธุ์กลายที่ 48	3.164[b]
สายพันธุ์กลายที่ 49	2.675[bcdefgh]
สายพันธุ์กลายที่ 50	2.630[bcdefghi]
สายพันธุ์กลายที่ 51	1.448[nopqr]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์ดั้งเดิมกับสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็ง CD-medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1

เชื้อ	อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี(ซม.)
สายพันธุ์กลายที่ 52	1.432 ^{nopqr}
สายพันธุ์กลายที่ 53	2.535 ^{bcdefghij}
สายพันธุ์กลายที่ 54	2.086 ^{efghijklmn}
สายพันธุ์กลายที่ 55	2.386 ^{cdefghijk}
สายพันธุ์กลายที่ 56	2.020 ^{fghijklmn}
สายพันธุ์กลายที่ 57	2.133 ^{efghijklm}
สายพันธุ์กลายที่ 58	1.814 ^{klmnopq}

จากผลการทดลองในการวัดค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีและทำการคัดเลือกที่ให้อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อที่มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายจำนวน 24 สายพันธุ์มีอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อที่มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ สายพันธุ์ที่ 23, 13, 32, 28, 9, 35, 41, 55, 53, 2, 50, 49, 36, 7, 24, 19, 27, 22, 10, 20, 39,17, 48 และ 26 โดยเชื้อสายพันธุ์กลายที่ 26 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เชิงปริมาณสูงสุดเท่ากับ 5.133 เซนติเมตร แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์กลายตัวอื่นๆ ในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.2)

4.1.4 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในเชิงปริมาณ

ทำการเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ เป็นเวลา 15-20 นาที นำไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในเชิงปริมาณ (วัดอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อ) โดยนำสารละลายเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมเซลลูเลสเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ปริมาณหลุมละ 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 45 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำไปย้อมสี congo red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 15 นาที และล้างออกด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์เป็นเวลา 10 นาที วัดขนาดของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อและหาอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนี/ขนาดของโคโลนีของเชื้อ (ตารางที่ 4.3) และทำการคัดเลือกเชื้อที่ให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม เนื่องจาก โดยทั่วๆไปแล้วเชื้อราส่วนมากสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสในช่วงเวลาเดียวกัน ซึ่งเป็นผลของเอนไซม์ที่ไม่เป็นที่ต้องการสำหรับขบวนการการผลิตกระดาษในขั้นตอนการฟอกกระดาษ (pulp treatment) ซึ่งเอนไซม์ไซลาเนสที่นำไปใช้งานจำเป็นต้องปราศจากเอนไซม์เซลลูโลสซึ่งจะสามารถลดการทำลายเส้นใยของเยื่อให้น้อยลง (Antony และคณะ , 2003)

ตารางที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1

เชื้อ	อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี(ซม.)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	1.515 ^{cde}
สายพันธุ์กลายที่ 1	1.541 ^{bcde}
สายพันธุ์กลายที่ 2	1.485 ^{cde}
สายพันธุ์กลายที่ 3	1.404 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 4	1.405 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 5	1.561 ^{bcde}
สายพันธุ์กลายที่ 6	1.397 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 7	1.284 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 8	1.320 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 9	1.378 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่10	1.348 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 11	0.240 ^{ef}
สายพันธุ์กลายที่ 12	0.244 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 13	0.000 ^{g}
สายพันธุ์กลายที่ 14	1.522 ^{bcde}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1

เชื้อ	อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี(ซม.)
สายพันธุ์กลายที่ 15	1.171 ^{ef}
สายพันธุ์กลายที่ 16	1.624 ^{bcde}
สายพันธุ์กลายที่ 17	0.000 ^{g*}
สายพันธุ์กลายที่ 18	0.000 ^{g*}
สายพันธุ์กลายที่ 19	0.000 ^{g*}
สายพันธุ์กลายที่ 20	0.000 ^{g*}
สายพันธุ์กลายที่ 21	1.356 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 22	0.239 ^{ef}
สายพันธุ์กลายที่ 23	1.345 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 24	1.307 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 25	2.241 ^{a}
สายพันธุ์กลายที่ 26	1.280 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 27	1.396 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 28	1.317 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 29	0.000 ^{g*}
สายพันธุ์กลายที่ 30	0.000 ^{g*}
สายพันธุ์กลายที่ 31	0.000 ^{g**}
สายพันธุ์กลายที่ 32	0.000 ^{g**}
สายพันธุ์กลายที่ 33	0.000 ^{g*}
สายพันธุ์กลายที่ 34	0.000 ^{g*}
สายพันธุ์กลายที่ 35	0.000 ^{g*}
สายพันธุ์กลายที่ 36	0.000 ^{g*}
สายพันธุ์กลายที่ 37	1.196 ^{ef}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4..3 (ต่อ) กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็ง CD-medium ที่มีการเติมเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1

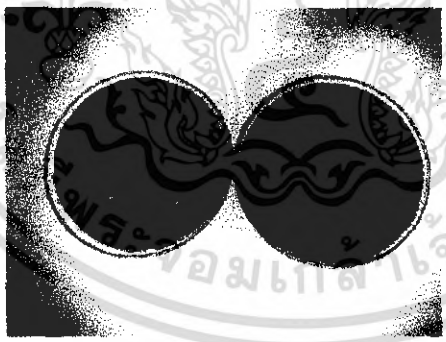
เชื้อ	อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี(ซม.)
สายพันธุ์กลายที่ 38	1.417 cdef
สายพันธุ์กลายที่ 39	1.490 cde
สายพันธุ์กลายที่ 40	1.596 bcde
สายพันธุ์กลายที่ 41	1.569 bcde
สายพันธุ์กลายที่ 42	2.155 ab
สายพันธุ์กลายที่ 43	0.000 g*
สายพันธุ์กลายที่ 44	0.000 g*
สายพันธุ์กลายที่ 45	1.666 bcde
สายพันธุ์กลายที่ 46	1.490 cde
สายพันธุ์กลายที่ 47	1.387 def
สายพันธุ์กลายที่ 48	2.013 abc
สายพันธุ์กลายที่ 49	1.586 bcde
สายพันธุ์กลายที่ 50	1.543 bcde
สายพันธุ์กลายที่ 51	1.661 bcde
สายพันธุ์กลายที่ 52	1.621 bcde
สายพันธุ์กลายที่ 53	1.497 cde
สายพันธุ์กลายที่ 54	1.648 bcde
สายพันธุ์กลายที่ 55	0.833 f
สายพันธุ์กลายที่ 56	0.000 g*
สายพันธุ์กลายที่ 57	1.861 abcd
สายพันธุ์กลายที่ 58	1.261 def

* หมายถึง ไม่มีเชื้อขึ้นบนอาหารแข็ง ** หมายถึง มีเชื้อขึ้นแต่ไม่มีการผลิตเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองในการวัดค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี และทำการคัดเลือกที่ให้อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อที่น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายจำนวน 38 สายพันธุ์มีอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อที่น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ สายพันธุ์ที่ 13, 17, 18, 19, 20, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35,36, 43, 44, 56, 55, 15, 37, 22, 11, 12, 58, 26, 7 , 24, 28, 8, 23, 10, 21, 9, 47, 27, 6, 3 และ 4 โดยเชื้อสายพันธุ์กลายที่ 13, 17, 18, 19, 20, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 43, 44, 56 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เชิงปริมาณต่ำสุดเท่ากับ 0.000 เซนติเมตร แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์กลายตัวอื่นๆ ในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

รูปที่ 4.7 ตัวอย่างของวงโคโลนี เมื่อนำตัวอย่างเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมเซลลูโลสความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน และทำการย้อมสีด้วย congo red



รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบลักษณะของโคโลนีและวงใสของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* เมื่อตัวอย่างเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ย้อมสีด้วย congo red (จานเพาะเชื้อซ้ายมือ) และ เมื่อนำตัวอย่างเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 (จานเพาะเชื้อขวามือ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.7 กราฟแสดงเปรียบเทียบค่าความสามารถในการสลายยาฆ่าแมลงไดเมโธเอตของเชื้อราเส้นใย *Aspergillus fumigatus* ในแต่ละสายพันธุ์ในการทดลองในห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.10 กราฟเปรียบเทียบอัตราส่วนขนาดความกว้างต่อขนาดของไอโซเลียนของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* ในแต่ละสายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5 ศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพ

สามารถหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ในเชิงคุณภาพในรูปของค่ากิจกรรม (enzyme activity) โดยการนำตัวอย่างเอนไซม์จากอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน มาวิธีการวิเคราะห์ตามวิธี DNS method ของ Tang และคณะ (1987) ในการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 550 นาโนเมตร (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิต/มิลลิลิตร)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	31.345^{fghi}
สายพันธุ์กลายที่ 1	30.869^{fghi}
สายพันธุ์กลายที่ 2	34.444^{efgh}
สายพันธุ์กลายที่ 3	5.359^{tu}
สายพันธุ์กลายที่ 4	23.553^{ijklmnop}
สายพันธุ์กลายที่ 5	24.850^{ijklmn}
สายพันธุ์กลายที่ 6	19.527^{klmnopqr}
สายพันธุ์กลายที่ 7	36.259^{defg}
สายพันธุ์กลายที่ 8	31.257^{fghi}
สายพันธุ์กลายที่ 9	23.675^{ijklmnop}
สายพันธุ์กลายที่ 10	37.360^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 11	17.937^{mnopqr}
สายพันธุ์กลายที่ 12	24.039^{ijklmnop}
สายพันธุ์กลายที่ 13	12.050^{rst}
สายพันธุ์กลายที่ 14	20.863^{jklmnopq}
สายพันธุ์กลายที่ 15	21.228^{jklmnopq}
สายพันธุ์กลายที่ 16	18.096^{lmnopqr}
สายพันธุ์กลายที่ 17	37.086^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 18	19.000^{klmnopqr}
สายพันธุ์กลายที่ 19	42.201^{de}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิต/มิลลิลิตร)
สายพันธุ์กลายที่ 20	66.799[b]
สายพันธุ์กลายที่ 21	20.408[klmnopq]
สายพันธุ์กลายที่ 22	40.510[de]
สายพันธุ์กลายที่ 23	20.235[klmnopq]
สายพันธุ์กลายที่ 24	43.536[d]
สายพันธุ์กลายที่ 25	16.823[nopqr]
สายพันธุ์กลายที่ 26	100.614[a]
สายพันธุ์กลายที่ 27	42.142[de]
สายพันธุ์กลายที่ 28	36.391[defg]
สายพันธุ์กลายที่ 29	3.248[u]
สายพันธุ์กลายที่ 30	26.477[ijkl]
สายพันธุ์กลายที่ 31	25.758[ijklm]
สายพันธุ์กลายที่ 32	25.098[ijklmn]
สายพันธุ์กลายที่ 33	2.971[u]
สายพันธุ์กลายที่ 34	21.940[jklmnopq]
สายพันธุ์กลายที่ 35	23.774[ijklmnop]
สายพันธุ์กลายที่ 36	20.106[klmnopqr]
สายพันธุ์กลายที่ 37	17.638[mnopqr]
สายพันธุ์กลายที่ 38	26.888[hijk]
สายพันธุ์กลายที่ 39	56.993[c]
สายพันธุ์กลายที่ 40	16.074[opqrs]
สายพันธุ์กลายที่ 41	41.622[de]
สายพันธุ์กลายที่ 42	9.070[stu]
สายพันธุ์กลายที่ 43	3.923[stu]
สายพันธุ์กลายที่ 44	29.043[ghij]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิต/มิลลิลิตร)
สายพันธุ์กลายที่ 45	21.205 ^{jklmnopq}
สายพันธุ์กลายที่ 46	34.789 ^{efg}
สายพันธุ์กลายที่ 47	21.530 ^{jklmnopq}
สายพันธุ์กลายที่ 48	56.242 ^{c}
สายพันธุ์กลายที่ 49	37.112 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 50	36.135 ^{defg}
สายพันธุ์กลายที่ 51	24.367 ^{ijklmno}
สายพันธุ์กลายที่ 52	21.070 ^{jklmnopq}
สายพันธุ์กลายที่ 53	38.664 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 54	3.943 ^{u}
สายพันธุ์กลายที่ 55	17.261 ^{nopqr}
สายพันธุ์กลายที่ 56	14.280 ^{qrs}
สายพันธุ์กลายที่ 57	23.289 ^{ijklmnop}
สายพันธุ์กลายที่ 58	15.726 ^{pqrs}

จากผลการทดลองในการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพ และทำการคัดเลือกที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อที่มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายจำนวน 18 สายพันธุ์ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อที่มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ สายพันธุ์ที่ 2, 46, 50, 7, 28, 17, 49, 10, 53, 22, 41, 27, 19, 24, 48, 39, 20 และ 26 โดยเชื้อสายพันธุ์กลายที่ 26 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เชิงคุณภาพสูงสุดเท่ากับ 100.6147 ยูนิต/มิลลิลิตร แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์กลายตัวอื่นๆในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยจากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสทนร้อนของเชื้อสายพันธุ์ *Aspergillus sp.* ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า แม้การเจริญเติบโตของเชื้อจะต่ำเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูง แต่ความสามารถในการผลิตปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสมีมากกว่าปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า (Castro และคณะ,1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.11 กราฟเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์โพลาเทสเชิงคุณภาพของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus fumigatus* ในแต่ละสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.6 ศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในเชิงคุณภาพ

สามารถหาค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในเชิงคุณภาพในรูปของค่ากิจกรรม(enzyme activity) โดยการนำตัวอย่างเอนไซม์จากอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน มาวิธีการวิเคราะห์ตามวิธี DNS method ของ Tang และคณะ (1987) ในการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 540 นาโนเมตร (ตารางที่ 4.5) โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

ตารางที่ 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในอาหาเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	0.00941 ^{fcde}
สายพันธุ์กลายที่ 1	0.00491 ^{defg}
สายพันธุ์กลายที่ 2	0.00544 ^{defg}
สายพันธุ์กลายที่ 3	0.02933 ^{b}
สายพันธุ์กลายที่ 4	0.06723 ^{a}
สายพันธุ์กลายที่ 5	0.00244 ^{efg}
สายพันธุ์กลายที่ 6	0.00202 ^{efg}
สายพันธุ์กลายที่ 7	0.00656 ^{cdefg}
สายพันธุ์กลายที่ 8	0.11603 ^{cd}
สายพันธุ์กลายที่ 9	0.00317 ^{efg}
สายพันธุ์กลายที่ 10	0.00523 ^{defg}
สายพันธุ์กลายที่ 11	0.00553 ^{defg}
สายพันธุ์กลายที่ 12	0.00835 ^{cdefg}
สายพันธุ์กลายที่ 13	0.00358 ^{efg}
สายพันธุ์กลายที่ 14	0.00566 ^{defg}
สายพันธุ์กลายที่ 15	0.00268 ^{efg}
สายพันธุ์กลายที่ 16	0.00586 ^{defg}
สายพันธุ์กลายที่ 17	0.00563 ^{defg}
สายพันธุ์กลายที่ 18	0.00244 ^{efg}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)
สายพันธุ์กลายที่ 19	0.00257 efg
สายพันธุ์กลายที่ 20	0.00069 g
สายพันธุ์กลายที่ 21	0.00247 efg
สายพันธุ์กลายที่ 22	0.00318 efg
สายพันธุ์กลายที่ 23	0.00444 defg
สายพันธุ์กลายที่ 24	0.00332 efg
สายพันธุ์กลายที่ 25	0.00241 efg
สายพันธุ์กลายที่ 26	0.00697 cdefg
สายพันธุ์กลายที่ 27	0.00318 efg
สายพันธุ์กลายที่ 28	0.00299 efg
สายพันธุ์กลายที่ 29	0.00515 defg
สายพันธุ์กลายที่ 30	0.00230 efg
สายพันธุ์กลายที่ 31	0.00541 defg
สายพันธุ์กลายที่ 32	0.00293 efg
สายพันธุ์กลายที่ 33	0.11663 cd
สายพันธุ์กลายที่ 34	0.00373 efg
สายพันธุ์กลายที่ 35	0.00449 defg
สายพันธุ์กลายที่ 36	0.00241 efg
สายพันธุ์กลายที่ 37	0.00147 g
สายพันธุ์กลายที่ 38	0.00180 fg
สายพันธุ์กลายที่ 39	0.00732 cdefg
สายพันธุ์กลายที่ 40	0.00145 g
สายพันธุ์กลายที่ 41	0.00963 cdc
สายพันธุ์กลายที่ 42	0.00720 cdefg

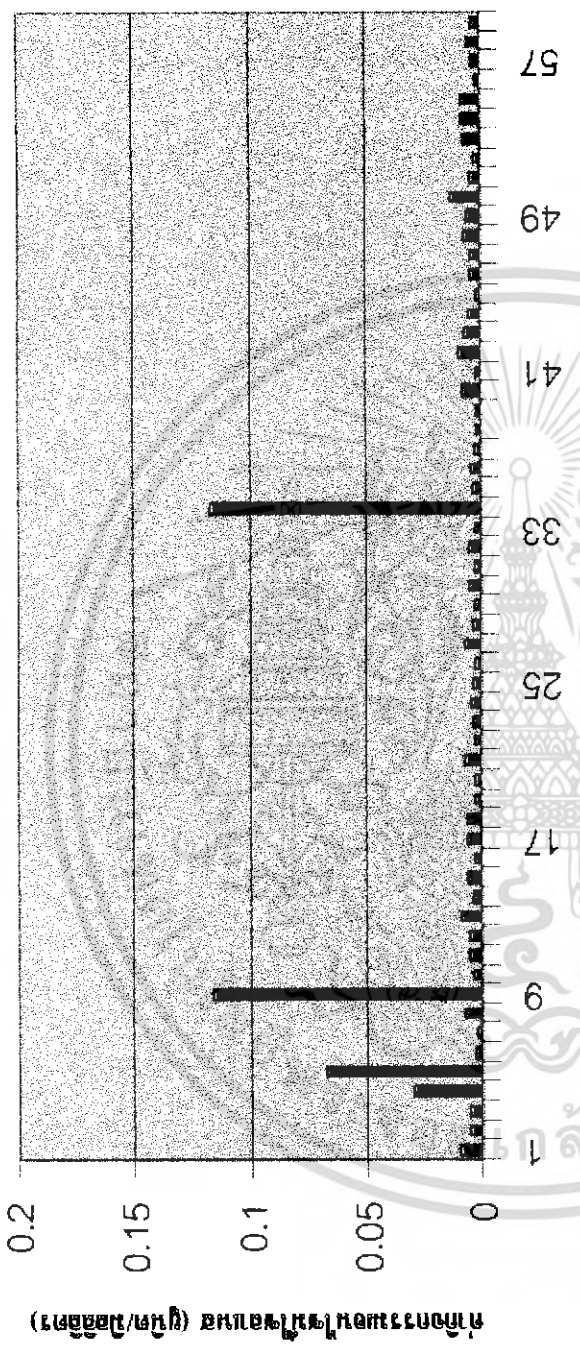
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)
สายพันธุ์กลายที่ 43	0.00524 ^{defg}
สายพันธุ์กลายที่ 44	0.00184 ^{fg}
สายพันธุ์กลายที่ 45	0.00463 ^{defg}
สายพันธุ์กลายที่ 46	0.00403 ^{efg}
สายพันธุ์กลายที่ 47	0.00720 ^{cdefg}
สายพันธุ์กลายที่ 48	0.00601 ^{cdefg}
สายพันธุ์กลายที่ 49	0.01330 ^{c}
สายพันธุ์กลายที่ 50	0.00392 ^{efg}
สายพันธุ์กลายที่ 51	0.00281 ^{efg}
สายพันธุ์กลายที่ 52	0.00660 ^{cdefg}
สายพันธุ์กลายที่ 53	0.00780 ^{cdefg}
สายพันธุ์กลายที่ 54	0.00747 ^{cdefg}
สายพันธุ์กลายที่ 55	0.00187 ^{fg}
สายพันธุ์กลายที่ 56	0.00370 ^{efg}
สายพันธุ์กลายที่ 57	0.00483 ^{defg}
สายพันธุ์กลายที่ 58	0.00383 ^{efg}

จากผลการทดลองในการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในเชิงคุณภาพ และทำการคัดเลือกที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อที่น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายจำนวน 3 สายพันธุ์ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อที่น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ สายพันธุ์ที่ 20, 40, และ 37 โดยเชื้อสายพันธุ์กลายทั้งสามมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เชิงคุณภาพต่ำสุดที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ คือ 0.0006950 , 0.00145 , 0.00147 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์กลายตัวอื่นๆในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยสายพันธุ์กลายที่ 26 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 0.00697 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับสายพันธุ์ดั้งเดิม จากการศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus fumigatus* ที่สามารถผลิตได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์น้อยกว่า 0.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถจัดได้ว่าเชื้อไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเลย (Anthony และคณะ, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 กราฟเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ *Aspergillus fumigatus* ในแต่ละสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.7 การศึกษาการใช้วัสดุทดแทนแหล่งคาร์บอนในการผลิต

จากการก่อกลายพันธุ์สามารถการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ในเชิงปริมาณและคุณภาพที่มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายมีการให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งเดิม ดังนี้ สายพันธุ์ที่ 2 , 7, 10, 17, 19, 20, 22, 24, 26, 27, 28, 39, 41, 46, 48, 49, 50 และ 53 (ตารางที่ 4.6) โดยใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก ซึ่งมีราคาแพง จึงมีการใช้ซังข้าวโพดบดแห้ง มาทดแทนแหล่งคาร์บอนที่ใช้ เนื่องจากซังข้าวโพดเป็นวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีราคาถูกกว่าการใช้ไซแลนบริสุทธิ์ เป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิตได้

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบค่าอัตราส่วนของวงใสและกิจกรรมของเอนไซม์เชิงของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกเพื่อไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	ค่ากิจกรรมไซลาเนส (ยูนิต/มล.)	ค่ากิจกรรมเซลลูเลส (ยูนิต/มล.)	อัตราส่วนวงใสไซเลนเนส (ซม.)	อัตราส่วนวงใสเซลลูโลส (ซม.)
สายพันธุ์ตั้งเดิม	31.345 fghi	0.00941 fede	2.092 efghijklmn	1.515 ede
สายพันธุ์กลายที่ 2	34.444 efgh	0.00544 defg	2.502 bcdefghij	1.485 ede
สายพันธุ์กลายที่ 7	36.259 defg	0.00656 cdefg	2.698 bcdefg	1.284 def
สายพันธุ์กลายที่ 10	37.360 def	0.00523 defg	2.893 bcd	1.348 def
สายพันธุ์กลายที่ 17	37.086 def	0.00563 defg	3.022 bc	0.000 g*
สายพันธุ์กลายที่ 19	42.201 de	0.00257 efg	2.784 bcde	0.000 g*
สายพันธุ์กลายที่ 20	66.799 b	0.00069 g	2.993 bc	0.000 g*
สายพันธุ์กลายที่ 22	40.510 de	0.00318 efg	2.800 bcde	0.239 ef
สายพันธุ์กลายที่ 24	43.536 d	0.00332 efg	2.739 bcdef	1.307 def
สายพันธุ์กลายที่ 26	100.614 a	0.00697 cdefg	5.133 a	1.280 def
สายพันธุ์กลายที่ 27	42.142 de	0.00318 efg	2.794 bcde	1.396 def
สายพันธุ์กลายที่ 28	36.391 defg	0.00299 efg	2.264 defghijkl	1.317 def
สายพันธุ์กลายที่ 39	56.993 c	0.00732 cdefg	2.995 bc	1.417 cdef
สายพันธุ์กลายที่ 41	41.622 de	0.00963 cde	2.348 cdefghijkl	1.569 bcde
สายพันธุ์กลายที่ 46	34.789 efg	0.00403 efg	1.024 f	1.490 cde
สายพันธุ์กลายที่ 48	56.242 c	0.00601 cdefg	3.164 b	2.013 abc
สายพันธุ์กลายที่ 49	37.112 def	0.01330 c	2.675 bcdefgh	1.586 bcde

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) เปรียบเทียบค่าอัตราส่วนของวงใสและกิจกรรมของเอนไซม์เซิงของเชื้อรา สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกเพื่อไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	ค่ากิจกรรมไซลาเนส (unit/ml)	ค่ากิจกรรมเซลลูเลส (unit/ml)	อัตราส่วนวงใสไซเลนเนส (ซม.)	อัตราส่วนวงใสเซลลูโลส (ซม.)
สายพันธุ์กลายที่ 50	36.135 ^{defg}	0.00392 ^{efg}	2.630 ^{bcdefghi}	1.543 ^{bcde}
สายพันธุ์กลายที่ 53	38.664 ^{def}	0.00780 ^{cdefg}	2.535 ^{bcdefghij}	1.497 ^{cde}

4.1.8 การศึกษาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยการใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ เป็นเวลา 15-20 นาที นำไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในเชิงปริมาณ (วัดอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดโคโลนีของเชื้อ) โดยนำสารละลายเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ปริมาณหลุมละ 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 45 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำไปย้อมสี congo red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 15 นาที และล้างออกด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์เป็นเวลา 10 นาที วัดขนาดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อและทำการหาอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อ(ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่าง ขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1

เชื้อ	อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี(ซม.)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	1.207 ^{c}
สายพันธุ์กลายที่ 2	2.400 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 7	2.944 ^{ab}
สายพันธุ์กลายที่ 10	2.166 ^{bc}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 (ต่อ) กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1

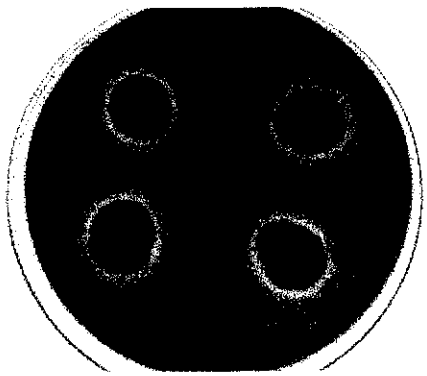
เชื้อ	อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี(ซม.)
สายพันธุ์กลายที่ 17	1.334 ^{e}
สายพันธุ์กลายที่ 19	2.300 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 20	1.493
สายพันธุ์กลายที่ 22	2.583 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 24	2.333 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 26	2.908 ^{ab}
สายพันธุ์กลายที่ 27	2.842 ^{ab}
สายพันธุ์กลายที่ 28	1.957 ^{cde}
สายพันธุ์กลายที่ 39	1.788 ^{cde}
สายพันธุ์กลายที่ 41	2.333 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 46	1.339 ^{e}
สายพันธุ์กลายที่ 48	2.500 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 49	3.518 ^{a}
สายพันธุ์กลายที่ 50	2.964 ^{ab}
สายพันธุ์กลายที่ 53	2.266 ^{bc}

จากผลการทดลองในการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากวงใสของสายพันธุ์กลาย โดยวัดอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายที่ 27 , 26, 7 , 50 และ 49 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เชิงปริมาณไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 3.518 เซนติเมตร แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์กลายตัวอื่นๆในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 ตัวอย่างของวงใสของโคโลนี เมื่อนำตัวอย่างเอนไซม์ที่มีการใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ย้อมสีด้วย congo red

4.1.9 การศึกษาค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยการใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ เป็นเวลา 15-20 นาที นำไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในเชิงปริมาณ (วัดอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาด โคโลนีของเชื้อ) โดยนำสารละลายเอนไซม์ไปหยดลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ปริมาณหลุมละ 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 45 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำไปย้อมสี congo red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 15 นาที และล้างออกด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์เป็นเวลา 10 นาที วัดขนาดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อและหาอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็ง CD- medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1

เชื้อ	อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี(ซม.)
สายพันธุ์กลายที่ 2	1.533 [a]
สายพันธุ์กลายที่ 7	0.000 [e]
สายพันธุ์กลายที่ 10	0.935 [c]
สายพันธุ์กลายที่ 17	1.435 [b]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

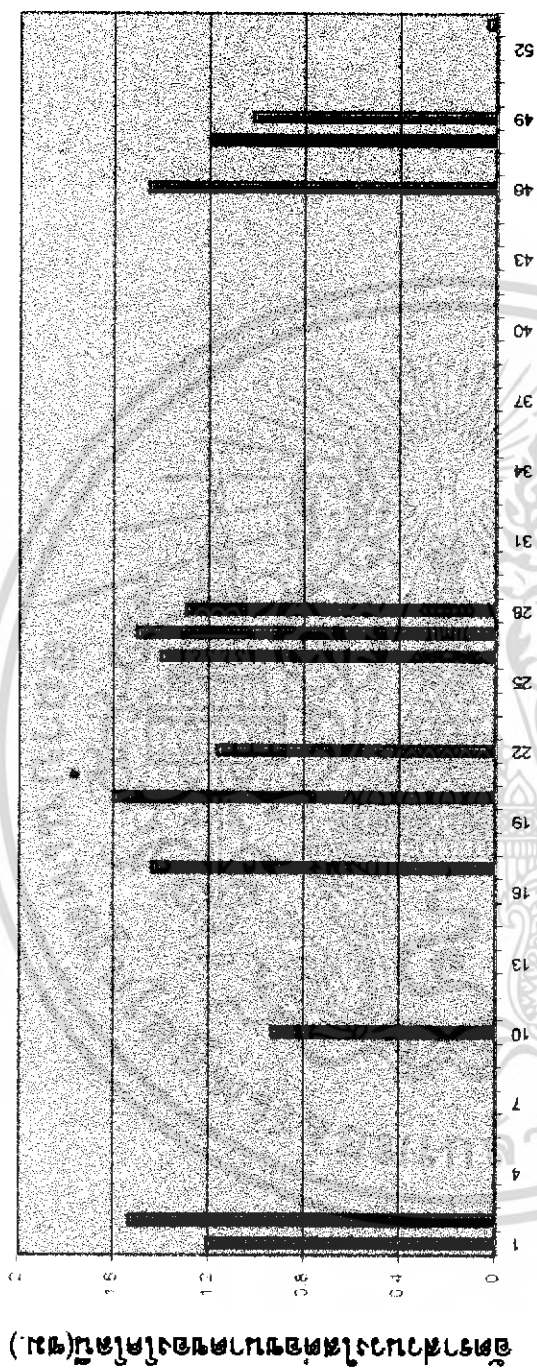
ตารางที่ 4.8 (ต่อ) กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์กลายจากอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อลงบนอาหารแข็งCD- medium ที่มีการเติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1

เชื้อ	อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี(ซม.)
สายพันธุ์กลายที่ 19	0.000 g*
สายพันธุ์กลายที่ 20	1.600 a
สายพันธุ์กลายที่ 22	1.162 de
สายพันธุ์กลายที่ 24	0.000 g*
สายพันธุ์กลายที่ 26	1.400 abc
สายพันธุ์กลายที่ 27	1.500 ab
สายพันธุ์กลายที่ 28	1.296 bcd
สายพันธุ์กลายที่ 39	0.000 g**
สายพันธุ์กลายที่ 41	0.000 g*
สายพันธุ์กลายที่ 46	1.452 ab
สายพันธุ์กลายที่ 48	1.197 cde
สายพันธุ์กลายที่ 49	1.017 ef
สายพันธุ์กลายที่ 50	0.000 g*
สายพันธุ์กลายที่ 53	0.033 g

* หมายถึง ไม่มีเชื้อขึ้นบนอาหารแข็ง ** หมายถึง มีเชื้อขึ้นแต่ไม่มีการผลิตเอนไซม์

จากผลการทดลองเมื่อทำการวัดอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของสายพันธุ์กลาย พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย 8 สายพันธุ์ ที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ สายพันธุ์ที่ 19 , 24 , 7 , 39, 41, 50, 53 และ 10 ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เชิงปริมาณไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.000 เซนติเมตร แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์กลายตัวอื่นๆ ในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 อัตราส่วนวงใสต่อขนาดของโคโลนีของค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์กลายต่างๆ ที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.10 การศึกษาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยการใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

สามารถหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพในรูปของค่ากิจกรรม (enzyme activity) โดยการนำตัวอย่างเอนไซม์จากอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายจำนวน 13 สายพันธุ์ ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อที่มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ สายพันธุ์ที่ 2 ,17 , 20, 22 , 26, 27 , 28, 39, 41 ,48 ,49, 50 และ 53 โดยเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เชิงคุณภาพสูงสุดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ คือ สายพันธุ์ที่ 49 , 26 และ 41 ที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ 56.656 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.9) แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์กลายตัวอื่นๆในทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.9 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์ดั้งเดิมกับสายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส(ยูนิต/มล.)
สายพันธุ์กลายที่ 2	39.631 ^{cd}
สายพันธุ์กลายที่ 7	22.990 ^{ghi}
สายพันธุ์กลายที่ 10	24.972 ^{fgh}
สายพันธุ์กลายที่ 17	31.111 ^{def}
สายพันธุ์กลายที่ 19	16.957 ^{i}
สายพันธุ์กลายที่ 20	35.683 ^{cd}
สายพันธุ์กลายที่ 22	36.681 ^{cd}
สายพันธุ์กลายที่ 24	21.100 ^{hi}
สายพันธุ์กลายที่ 26	53.993 ^{ab}
สายพันธุ์กลายที่ 27	32.524 ^{cde}
สายพันธุ์กลายที่ 28	35.661 ^{cd}
สายพันธุ์กลายที่ 39	47.548 ^{b}
สายพันธุ์กลายที่ 41	56.656 ^{a}
สายพันธุ์กลายที่ 46	26.136 ^{efgh}
สายพันธุ์กลายที่ 48	35.792 ^{cd}
สายพันธุ์กลายที่ 49	52.470 ^{ab}
สายพันธุ์กลายที่ 50	29.859 ^{defg}
สายพันธุ์กลายที่ 53	35.032 ^{cd}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยจากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสโดยเชื้อสายพันธุ์ *Thermomyces langinosus* โดยการใช้วัตถุดิบที่เป็นลิกโนเซลลูโลส พบว่า เมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่ 50 องศาเซลเซียส จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดกว่าการใช้วัตถุดิบที่เป็นลิกโนเซลลูโลสชนิดอื่นๆ คือ 1,438.7 ยูนิต/มิลลิลิตร (Gome และคณะ,1993)

โดยจากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus fumigatus* AR1 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลส โดยการเลี้ยงในอาหารเหลว CD-medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ปรับค่าพีเอชเป็น 9.0 โดยใช้แหล่งคาร์บอน คือ ซังข้าวโพด พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* AR1 มีค่าเท่ากับ19.3 ยูนิต/มิลลิลิตร (Anthony และคณะ, 2003)

4.1.11.การศึกษาค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสโดยการใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

สามารถหาค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในเชิงคุณภาพในรูปของค่ากิจกรรม(enzyme activity) โดยใช้ตัวอย่างเอนไซม์จากอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายจำนวน 18 สายพันธุ์ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อไม่มีแตกต่างกันทางสถิติกับสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ สายพันธุ์ 2, 7, 10, 17, 19, 22, 24, 26, 27, 28, 39, 41, 46, 48, 49, 50 และ 53 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	0.00091 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 2	0.02253 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 7	0.01765 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 10	0.01555 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 17	0.02823 [ab]
สายพันธุ์กลายที่ 19	0.00121 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 20	0.05884 [a]

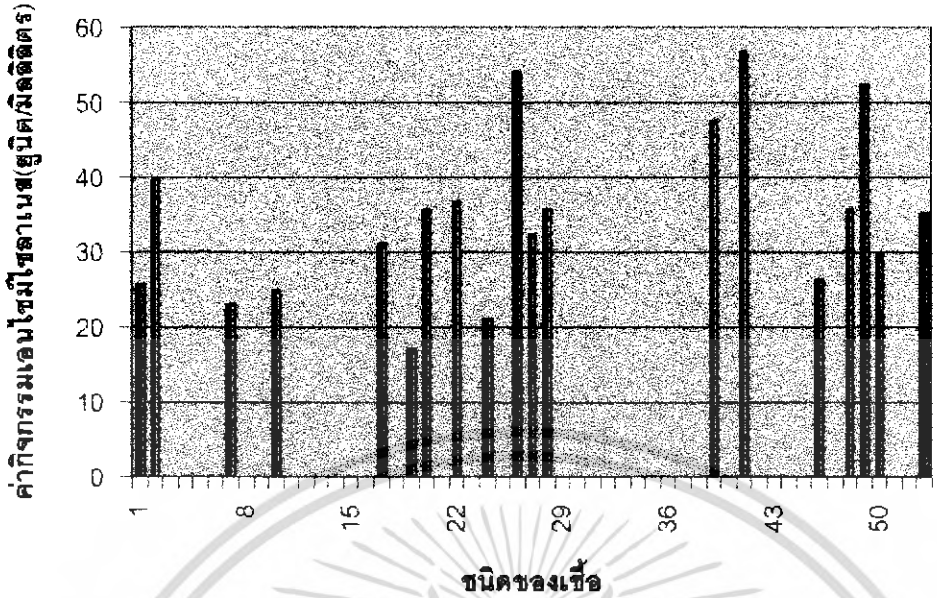
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 (ต่อ) กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

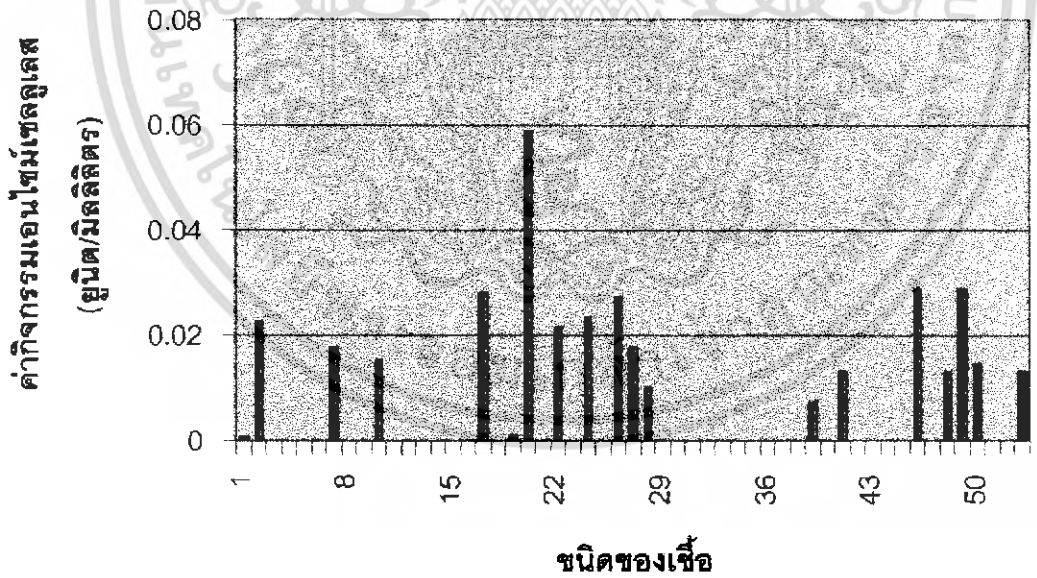
เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร)
สายพันธุ์กลายที่ 22	0.02169 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 24	0.02361 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 26	0.02738 [ab]
สายพันธุ์กลายที่ 27	0.01785 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 28	0.00996 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 39	0.00718 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 41	0.01322 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 46	0.02873 [ab]
สายพันธุ์กลายที่ 48	0.01474 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 49	0.01312 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 50	0.01525 [b]
สายพันธุ์กลายที่ 53	0.01484 [b]

โดยจากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลส โดยเชื้อสายพันธุ์ *Thermomyces langinosus* โดยการใช้วัตถุดิบที่เป็นลิกโนเซลลูโลส พบว่า เมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่ 50 องศาเซลเซียส จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสน้อยมาก สามารถนับได้ว่าไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ น้อยกว่า 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร (Gome และคณะ,1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของสายพันธุ์กลายต่างๆ ที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.17 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์กลายต่างๆ ที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.11 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพ จากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

ตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสของสายพันธุ์ กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสใช้ ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน (ยูนิต/มิลลิลิตร)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	31.524 ^{hijklm}	25.810 ^{lmn}
สายพันธุ์กลายที่ 2	34.444 ^{fghijk}	40.510 ^{fghijk}
สายพันธุ์กลายที่ 7	36.259 ^{fghij}	22.990 ^{mn}
สายพันธุ์กลายที่ 10	37.360 ^{fghij}	4.972 ^{lmno}
สายพันธุ์กลายที่ 17	37.088 ^{fghij}	31.111 ^{jklmn}
สายพันธุ์กลายที่ 19	42.201 ^{ef}	16.957 ^{o}
สายพันธุ์กลายที่ 20	66.799 ^{b}	35.683 ^{fghij}
สายพันธุ์กลายที่ 22	40.510 ^{efgh}	36.681 ^{fghij}
สายพันธุ์กลายที่ 24	43.536 ^{ef}	21.100 ^{no}
สายพันธุ์กลายที่ 26	100.614 ^{a}	53.860 ^{cd}
สายพันธุ์กลายที่ 27	42.143 ^{ef}	32.524 ^{ghijklh}
สายพันธุ์กลายที่ 28	36.397 ^{fghij}	35.661 ^{fghij}
สายพันธุ์กลายที่ 39	56.993 ^{c}	37.548 ^{de}
สายพันธุ์กลายที่ 41	41.662 ^{efg}	56.656 ^{c}
สายพันธุ์กลายที่ 46	34.789 ^{fghij}	26.136 ^{klmn}
สายพันธุ์กลายที่ 48	53.860 ^{cd}	35.792 ^{fghij}
สายพันธุ์กลายที่ 49	37.112 ^{fghij}	52.470 ^{cd}
สายพันธุ์กลายที่ 50	36.135 ^{fghij}	29.859 ^{jklmn}
สายพันธุ์กลายที่ 53	38.664 ^{fghij}	35.032 ^{fghij}

จากการทดลองพบว่า สายพันธุ์กลายที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าสายพันธุ์กลายที่ใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนในทางสถิติ คือ สายพันธุ์กลาย 49 และสายพันธุ์กลาย 41 ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส คือ 52.470 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 56.656 ยูนิต/มิลลิลิตร ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ส่วนสายสายพันธุ์กลายที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสายพันธุ์กลายที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน คือ สายพันธุ์ดั้งเดิม สายพันธุ์กลายที่ 2 , 17 , 22 , 28, 50 และ 53 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ส่วนสายพันธุ์กลายที่ที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสน้อยกว่าสายพันธุ์กลายที่ใช้ ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนในทางสถิติ คือ สายพันธุ์กลาย 7 , 10 , 19 , 20 ,24 , 27 , 27 , 26 , 39 ,46 และสายพันธุ์กลาย 48 โดยสายพันธุ์กลายที่ 26 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้สูงสุดที่ใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 100.6147 ยูนิต/มิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.11) จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus fumigatus* AR1 ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 9.0 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน คือ ไซแลนและซังข้าวโพด พบว่า เชื้อที่เจริญในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนให้กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส(24 ยูนิต/มิลลิลิตร) สูงกว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน (19.3 ยูนิต/มิลลิลิตร) (Anthony และคณะ, 2003)

4.1.12 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในเชิงคุณภาพ จากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

ตารางที่ 4.12 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน(ยูนิต/มิลลิลิตร)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	0.00941 ^{bc}	0.00091 ^{c}
สายพันธุ์กลายที่ 2	0.00527 ^{bc}	0.02253 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 7	0.00656 ^{bc}	0.01765 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 10	0.00523 ^{bc}	0.01555 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 17	0.00563 ^{bc}	0.02823 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 19	0.00257 ^{bc}	0.00121 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 20	0.00069 ^{c}	0.05888 ^{a}
สายพันธุ์กลายที่ 22	0.00318 ^{bc}	0.02169 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 24	0.00332 ^{bc}	0.02361 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 26	0.00697 ^{bc}	0.02738 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 27	0.00318 ^{bc}	0.017853 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 28	0.00299 ^{bc}	0.00996

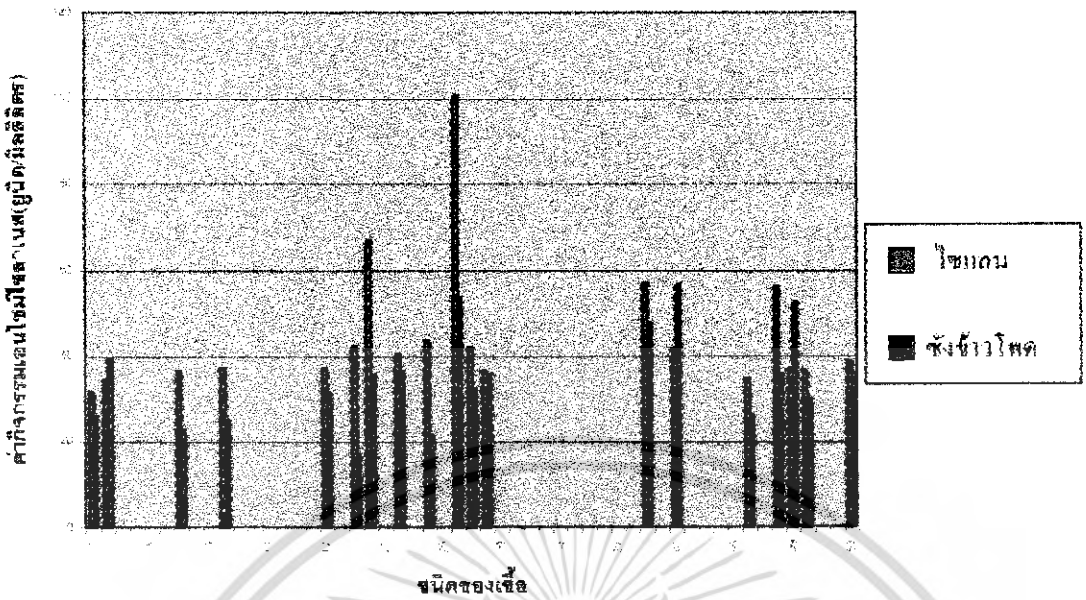
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 (ต่อ) เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์กลายและพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

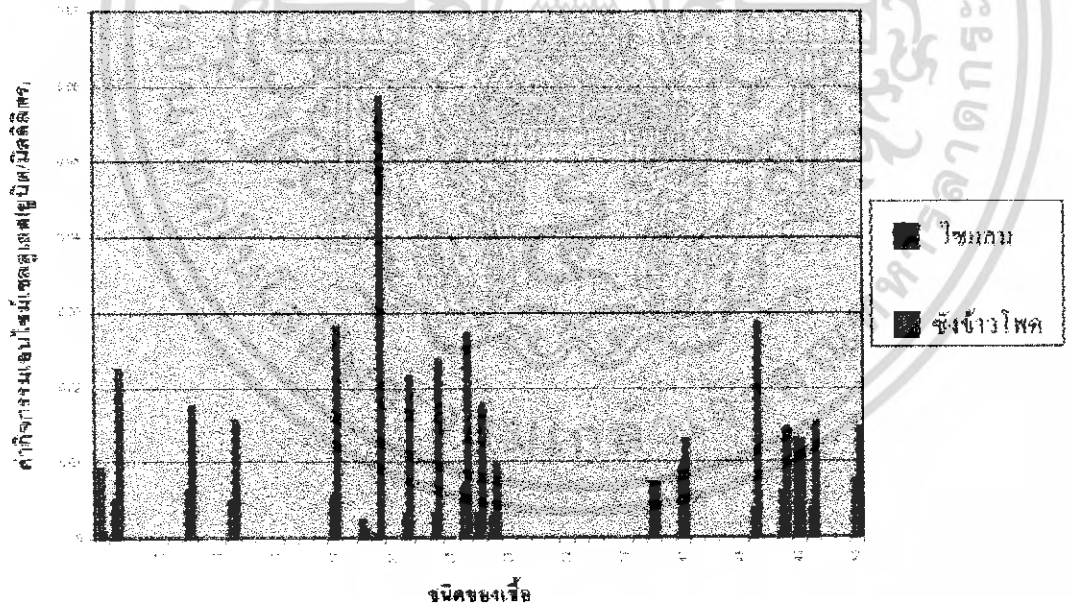
เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน(ยูนิต/มิลลิลิตร)
สายพันธุ์กลายที่ 39	0.00748 ^{bc}	0.00748 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 41	0.00963 ^{bc}	0.01322 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 46	0.00403 ^{bc}	0.02873 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 48	0.00601 ^{bc}	0.01474 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 49	0.13303 ^{bc}	0.01312 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 50	0.00392 ^{bc}	0.01525 ^{bc}
สายพันธุ์กลายที่ 53	0.00780 ^{bc}	0.01484 ^{bc}

จากการทดลองพบว่า สายพันธุ์กลายที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าสายพันธุ์กลายที่ใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนในทางสถิติ คือ สายพันธุ์กลาย 20 ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส คือ 0.5884 ยูนิต/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และสายพันธุ์กลายที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหลือจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสายพันธุ์กลายที่ใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์กิจกรรมไซลาเนสของสายพันธุ์กลายต่างๆ ที่ใช้ไซแลนและซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.19 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์กิจกรรมแซคคูเลสของสายพันธุ์กลายต่างๆ ที่ใช้ไซแลนและซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการหาร้อยละของอัตราการอยู่รอด เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ โดยการคัดเลือกที่เซลล์เริ่มต้นหายไปร้อยละ 95 หรือร้อยละของการอยู่รอดเท่ากับ 5 เมื่อผ่านการชักนำโดยสารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที และการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (256 นาโนเมตร) ได้ที่เวลา 3 นาที ที่ความเจือจางของสปอร์ คือ 10^{-2} จะมีอัตราการอยู่รอดประมาณร้อยละ 5.26 เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ต้องการต่อไป

เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์กลายที่ผ่านการชักนำแล้ว ไปทดสอบการคัดเลือกสายพันธุ์กลายตามจุดประสงค์ของงานวิจัย โดยการศึกษาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงปริมาณ จากการวัดอัตราส่วนวงใสต่อขนาดของโคโลนีในอาหารที่มีแหล่งไซแลนเป็นคาร์บอน ซึ่งมีคุณสมบัติในการชักนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และศึกษาหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในเชิงคุณภาพเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ระหว่างเอนไซม์ทั้งสอง เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลส พร้อมทั้งเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมกับเชื้อกลายพันธุ์ และจากการทดลองพบว่า เชื้อสายพันธุ์กลาย 26 มีประสิทธิภาพภาพมากที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสทนร้อนสูงสุดต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสทั้งในเชิงปริมาณและในเชิงคุณภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เชิงคุณภาพสูงสุดเท่ากับ 100.6147 ยูนิต/มิลลิลิตรและมีอัตราส่วนของวงใสต่อขนาดของโคโลนีเท่ากับ 5.133 เซนติเมตร พร้อมทั้งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในเชิงปริมาณและมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับสายพันธุ์ดั้งเดิมในเชิงคุณภาพ โดยสามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ได้ทั้งหมด 18 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 2 ,7 , 10 ,17 ,19 ,20 ,22 ,24 ,26 ,27 ,28 ,39 ,41 ,46 ,48 ,49 ,50 และ 53 ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนไปเป็นซังข้าวโพด พบว่าสายพันธุ์กลายที่ 49 , 41 และสายพันธุ์กลายที่ 26 มีประสิทธิภาพภาพมากที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสทั้งในเชิงปริมาณและในเชิงคุณภาพ ที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ 56.656 ยูนิต/มิลลิลิตรและให้อัตราส่วนวงใสต่อขนาดของโคโลนีเท่ากับ 3.518" เซนติเมตร และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และเมื่อนำมาเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน พบว่าสายพันธุ์กลายที่ 41 และสายพันธุ์ที่ 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่ากิจกรรมสูงกว่าสายพันธุ์กลายเดียวกันที่ใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของทั้งสองสภาวะไม่แตกต่างกัน

เมื่อนำผลที่ได้จากการทดลองทั้งหมดทุกๆเชื้อมาพิจารณารวมกัน สามารถหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสทนอุณหภูมิสูงปราศจากเซลลูเลสที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน คือ สายพันธุ์กลายที่ 26 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมากที่สุด และสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมในการใช้แหล่งคาร์บอนทดแทน คือ สายพันธุ์กลายที่ 49 และสายพันธุ์ที่ 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ในขั้นตอนการฉายแสงอัลตราไวโอเลตควรมีการระมัดระวังไม่ให้โดนแสง เนื่องจากอาจเกิด photoreactivity หรือ reverse mulation จะทำให้เชื้อเกิดการกลายพันธ์น้อยลง

2. ควรมีการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเพิ่มเติม เพื่อที่จะสามารถหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้อย่างถูกต้องและน่าเชื่อถือมากขึ้น เพราะแหล่งของเอนไซม์อาจมีโปรตีนชนิดอื่นปะปนอยู่

3. นอกจากซังข้าวโพดที่เป็นวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรแล้ว ควรมีการวิจัยใช้แหล่งวัตถุดิบเหลือใช้อื่นๆมาเป็นแหล่งคาร์บอนอีก เช่น เปลือกข้าว หรืออาจมีการแปรผันขนาดของแหล่งคาร์บอนเพื่อที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ได้ดียิ่งขึ้น

4. ในการเก็บรักษาแหล่งของเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ ควรมีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิเหมาะสมและไม่ควรนำมา thaw ใหม่บ่อยครั้ง อาจเป็นผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงหรือลดลงได้

5. ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์จากเชื้อชนิดอื่นๆที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เช่นเดียวกัน

6. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์จากสายพันธุ์กลายชนิดนี้ เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์มากที่สุด

7. ควรมีการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ศึกษาอยู่เพื่อให้ผลิตเอนไซม์มากขึ้น ด้วยการใช้กรรมวิธีชักนำ โดยการใช้สารชักนำชนิดอื่นๆช่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จุฑามาศ มณีวงศ์. 2546. *การคัดเลือกแบคทีเรียที่ชอบด่างที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 28-49

ชนัญญา ทิพย์มงคลศิลป์, นัฐวัฒน์ ชินะโยธิน และอภิวัฒน์ ถึกคุ้ม. 2545. *การชักนำและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อราเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส*. ปริญญานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 12-57

บัญญัติ สุขศรีงาม. พิมพ์ครั้งที่ 3. *จุลชีววิทยาทั่วไป*. กรุงเทพ ฯ : โอเดียนสโตร์. หน้า 57-62

ภัทราพร แสงสว่าง, พัชรี จารุวัฒนชัยกุล และอธิพงษ์ สายหยุด. 2543. *การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กลายออกโซโทรปจากเชื้อ Penicillium sp. เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส*. ปริญญานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 8-24

มาริสา บินอุสมัน, ยุทธกร นาคศรี และรอง พิริยะพิทยา. 2540. *การแยกและการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราในสภาพธรรมชาติเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส*. ปริญญานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 22-34

เรวดี ปรีบัว. 2547. *การแยกและการคัดเลือกเชื้อราจากดินในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 14-48

วิธัญญา ชวเจริญพันธ์, เสาวภา อาศน์ศิลารัตน์ และอารยา วงศ์พินิจวโรดม. 2546. *การชักนำและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อ Aspergillus fumigatus เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส*. ปริญญานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 11-25

สมใจ ศิริโกค. 2537. *เทคโนโลยีการหมัก*. กรุงเทพ ฯ : ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพ.หน้า 17-19

สุพัตรา บวรลักษณกุ, สุวัฒนาวดี ไชยวัน และอัจฉรา บุตรสุด. 2542. *การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราที่แยกได้จากสภาพธรรมชาติ*. ปริญญานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 22-34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อารี ฤทธิบูรณ์. 2547. *เทคโนโลยีของเอนไซม์*. กรุงเทพฯ :โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 72-74

Anand, I., Krishnamurthy, S. and Vithayathil, P. J. 1990. Purification and properties of xylanase from the thermophilic fungus *Humicola lanuginose*. *Arch Biochemistry biophysical*. (257) : 546–53.

Anthony, T., Chandra Raj, K., Rajendram, A. and Gunasekaran, P. 2003. High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. *Enzyme and Microbial Technology*.(32) : 647-654.

Anthony, T., Chandra Raj, K., Rajendram, A. and Gunasekaran, P. 2003. Inhibition of proteases during fermentation improves xylanase production by alkali tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (96) : 394-396.

Bailey, M. J. and Viikari, L. 1993. Production of xylanase by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan based media. *World Journal of Microbial and Biotechnology*. (9) : 80–84.

Bansod, S. M., Dutta-Choudary, M., Srinivasan, M. C. and Rele, N. V. 1993. Xylanase active at high pH from an alkali-tolerant *Cephalosporium* sp. *.Biotechnology Letter*. (15) : 965-970.

Balakrishana, H., Srinivasan, M. C. and Rele, M. V. 1997. Extracellular protease activities in relation to xylanase secretion in an alkalophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letter*. (18) : 599-601.

Bansod, S. M., Dutta-Choudary, M., Srinivasan ,M. C. and Rele, M. V. 1993. Xylanase active at high pH from an alkalo-tolerant *Cephalosporium* sp. *Biotechnology Letter*. (35) : 965–970.

Bastawde, K.B. 1992 .xylan structure, microbial xylanase and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. (8) : 353-368.

Beg, O.K., Bushan, B., Kapoor, M. and Hoondal, G. S. 2000. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Journal of Industry Microbiology and Biotechnology*. (24) : 396-402.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Tread in Biotechnology*. (3) : 286-290.

Carlile, S., Hyams, S. and Delaney, S. 200. Discrepancies between Gleason scores of needle biopsy and redicle prostatectomy specimens. *Pathos Interchange*. (256):364-70.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chandra Raj, K. and Chandra,T. S. 1995. Production of cellulase-free xylanase from an alkalo-tolerant *Aspergilus fischeri* Fxn1. *Biotechnology Letter.* (17) : 309–314.

Chandra Raj, K. and Chandra T. S. 1996. Purification and characterization of xylanase from alkalo-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. *FEMS Microbial Letter.* (145) : 457–461.

Chaplin, M. F. and Bucke, C. 1992 . *Enzyme technology.* London : Cambridge university. pp. 75-84

Clarke, R. T. J., Bally, R. W. and Gaillard , B. D. E. 1969. Growth of rumen bacteria on plant cell wall polysaccharide. *Journal of General Microbiology.* (56) : 79-86.

Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P. 1993. β-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology Application Biochemistry.* (17) : 259-289.

Das, A. and Nanda, G. 1995. Production of xylanolytic enzymes during growth on pulverized grass by *Aspergillus achraceus*-42. *Letter Application of Microbial.* (20) : 141–144.

Derewenda, Z., Green, R., Smith, S., Swenson, L. 1994. Crystallization of thioesterlase II from *Escherichia coli. Journal of Molecular Biology.* 236(2):660-662.

Eisenthal, R. and Danson, M. J. 1992. *Enzyme assays a practical approach.* New York: Oxford University Press. 22 pp.

Espinar, M. T. F., Pinaga, F., Sanz, P., Ramon, D. and Valles, S. 1993. Purification and characterization of a neutral endoxylanase from *Aspergillus nidulans. FEMS Microbial Letter.* (113) : 223–228.

Frederick, M., Kiang, C. H., Frederick, J. R. and Reilly, P. J. 1985. Purification and characterization of endoxylanases from *Aspergillus niger* two isoenzymes active on xylan backbones near branch points. *Biotechnology and Bioengineer.* (26) : 525–532.

Gamerith, G., Groicher, R., Zeilinger, S., He4rzog, P. and Kubicek, C. P. 1992. Cellulase-poor xylanase produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on hemicellulose substates. *Applied Microbiology and Biotechnology.* (38) : 315-322.

Gascoigne, J. and Gascoigne, M. M. 1960. The xylanase of *Fusarium roseum. Journal of General Microbiology.* (22) : 242-248.

Ghosh, M. and Nanda, G. 1994. Physiogical studies on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzyme in *Aspergillus sydowii* MG 49. *FEMS Microbiology Letter.* (117) : 151-156.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gomes, J., Purkarthofer, H., Hayn, M., Kapplmuller, J., Sinner, M. and Steiner, W. 1993. Production of a high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in laboratory and pilot scale using lignocellulosic materials. *Application of Microbial and Biotechnology.* (39) : 700–707.

Gomes, D. J., Gomes, J. and Steiner, W. 1994. Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterisation of the enzyme. *Journal of Biotechnology.* (37) : 11-22.

Filho, E. F. X. 1998. *Hemicellulose and biotechnology.* India :Pandalai. pp 47-55 .

Haas, H., Herfurth, E., Stoffler, G. and Redl,B. 1992. Purification characterization and amino acid sequences of xylanase produced by *Penicillium chrysogenum. Biochemistry and Biophysical Activity.* 111(17) : 279–86.

Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and convation. *Mycological Research.* (95) : 641-655.

Horikoshi, T. 1999. Alkaliphile : some application of their products for biotechnology. *Microbial Molecular and Biology Review.* 63(4) : 735-750.

Horikoshi, K. and Akiba,T. 1982. *Alkalophlic microorganism-a new microbial world.* Tokyo : Japan societies Press. pp 60-62 .

Hrmova, M., Biely, P. and Vrsanska, M. 1989. Cellulose and xylan-degrading enzyme of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger. Archives of Microbiology.* (11) : 610-616.

Iwamoto , T., Sasaki, T. and Inaoka, M. 1973. Hemicelluase their occurrence, purification, properties and mode of function. *Advance Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.* (32) : 277-352.

John, M., Schmidt, B. and Schmidt, J. 1979. Purification and some properties of five endo-1,4-β –D- xylanase and β-D-xylosidase produced by strain of *Aspergillus niger. Canadian Journal of Biochemistry.* (57) : 125-135.

Kang, M. K., Maeng, P. and Rhee, Y. H. 1996. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic *Cephalosporium* sp. *Application of Environment Microbial.* (62) : 3480–3482.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kimura, I., Sasahara, H. and Tajima, S. 1995. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranases from *Aspergillus sojae*. *Journal of Fermentation Technology and Bioengineer*. (80) : 334–339.

Kitpreechavanich, V., Hayashi, M. and Nagai, S. 1984. Production of xylan degrading enzymes by thermophilic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Humicola lanuginose*. *Journal of Fermentation Technology*. (62) : 63–69.

Kirk, P. M., Cannon, P. E., David, J. C. and Stalpers, J. A. 2001. *Ainsworth and Bisby's dictionary of fungi* . 9th (ed.). UK : Publishing. 55 pp.

Komerlink, F. J. M., Gruppen, H., Vietor, R. J. and Voragen, A. G. J. 1993. Model of action of the xylan degrading enzymes from *Aspergillus awamori* on alkali-extractable cereal arabinoxylans. *Carbohydate Rescher*. (249) : 369–375.

Kormelink, F. J. M., Searle-van Leeuween, M. J. F.,Wood, T. M. and Voragen, A. G. J. 1993. Purification and characterization of three endo- (1,4) –β-xylanase and one β-xylosidase from *Aspergillus awamorsi* . *Journal of Biotechnology* . (27) : 249-265.

Krall, R. G. 1990. *Alkalophiles*. New York :Mc Graw-Hill Publishing Co. pp 48-49.

Kubata, B. K., Sujuki, T., Horitsu, H., Kawai, K. and Takamizawa, K. 1994. Purification and characterization of *Aeromonas caviae* ME-1 xylanaseV which produce exclusively xylobiose from xylan. *Applied of Environment Microbial*. (60) : 531-537.

Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Review*. (23) : 411-456.

Kuhad, R. C., Sing, A., Tripathi, K. K., sexena, R. X. and Eriksson, K. E. L. 1997. Microorganism as an alternative source of protein. *Nutrition Review*. (55) : 65-75.

Kunert, J. and Kopecek, P. 2000. Multiple forms of the serine protease alp of *Aspergillus fimigatus*. *Mycoses*. (43) : 339-347.

Lenartovicz, V., Souza, C., Moreira, F. and Peralta, R. 2003. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable b-xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry*. (38) : 1775-1780.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Genetic Microbial*. (131) : 3017-3027.

Magnuson, T. S. and Crawford, D. L. 1997. Purification and characterization of an alkaline xylanase from *Streptomyces viridosporus* T7A. *Enzyme and Microbial Technology*. (21) : 260–264.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mandels, M. and Weber, J. 1969. *The production of cellulase, Advances in Chemistry Serology.* Washington D.C. : American Chemistry Serology. pp 47-48 .

Martin, C., Galbe, M., Wahlbom, F. C., Hahn-Hagerdal, B. and Jonsson, J. L 2002. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces Cerevisiae. Enzyme and Microbial Technology.* (31) : 274-282.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analysis Chemistry.* (31) : 426–428.

Mitchell, R. E. J., Morrison, D. P. and Gragtmans N. J. 1988. The influence of a hyperthermia threatmenton chemically induced tumor initiation and progression in mouse skin. *Carcinogenesis.* 9(3) : 379-385.

Morales, P., Madarro, A., Flors, A., Sendra, J. M. and Perez-Gonzalez, J. A. 1995. Purification and characterization of a xylanase and an arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa. Enzyme and Microbial Technology.* (17) : 424–429.

Nummi, M., Perrin, J. M., Niku-Paavola, M. L. and Enari, T. M. 1985. Measurement of xylanase activity with insoluble xylan substrate. *Biochemistry Journal.* (226) : 617-620.

Paice, M. G., Jurask, L., Carpenter, M. R. and Smillie, L. H. 1978. Production, characterization and partial amino acid sequence of xylanase A. from *Schizophyllum commune. Applied of Environmental Microbiology.* (36) : 802-808.

Pou-Llinas, J. and Driguez, H. 1987. D-xylose as inducer of xylan-degrading enzyme system in yeast *Pullularia pullulans . Applied Microbiology and Biotechnology.* (27) : 355-361.

Purkarthofer, H. and Steiner, W. 1995. Induction of endo β-xylanase in the fungus *Thermomyces langinosus. Enzyme and Microbial Technology.* (17) : 114-118.

Raj, K and Chandra, T. S. 1996. Purification and characterization of xylanase from alkalo-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. *Biotechnology Letter.* (17) : 309-314.

Rotto, M., Poutanen, K. and Viikari, L. 1992. Production of xylanase enzyme by an alkali-toterant *Bacillus circulan* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology.* (37) : 470-473.

Royer, J. C. and Nakas, J. P. 1990. Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum. Applied Microbiology and Biotechnology.* (11) : 405-410.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Saddler, J. N., Nazhad, M. and Ramos, L. 1993. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues. *Enzyme and Microbial Technology.* (15) : 821-831.

Singh, S., Pillay, B., Dilsook, V. and Prrior, B. A. 2000. Production and properties of hemicellulasea by *Thermomyces Langinosus* strain. *Journal of Applied Microbiology.* (88) : 119-128.

Steiner, W., Lafferty, R. M., Gomes, I. and Esterbauer, H. 1987. Studies on wild strain of *Schizophyllum commune* : cellulase and xylanase production and formation of the extracellular polysaccharide schizophyllan. *Biotechnology and Bioengineer.* (30) : 169–178.

Strobel, G.A. 1963. A xylanase system produced by *Diplodia viticola. Phytophysical Pathlogy.* (53) : 592-596.

Sunna , A. and Antranikian, G. 1997. Xylanase enzyme from Fungi and Bacteria. *Critical Review Biotechnology.* (17) : 39-47.

Tang, L. U. L., Yu, E. K. C., Louis-Seize, G. W. and Saddler, J. W. 1987. Inexpensive, rapid produre for bulk purification of cellulose–free beta,1-4.D-xylanase for High specific activity. *Biotechnology and Bioengineering.* (30) : 96-106.

Toh, W. 1978. Wage sausality in the aukruse-efo model:The Australin case. *Economic Letter.* 1(2) : 379-382.

Tsujibo, H., Ohtsuki, T., Ito, T., Yamasaki, I., Miyamoto, K., Sugiyama, M. and Inamori, Y. 1997. Cloning and sequence analysis of gene encoding xylanase and acetyl xylan esterase from *Strptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Applied of Environmental Microbiology.* (63) : 615-620.

Viikari , L., Kantelinan, A ., Poutanen, K. and Ranua, M. 1990. Characterization of pulp treated with hemicellulolytic enzyme prior to bleaching: *Biotechnology in pulp and paper manufacture.*Boston:Butterworth Heinemann. pp 24-32 .

Vodopich and Moore. 2002. *Biology laboratory manual.* 5th(ed.) Massachusetts : McGraw-Hill Companies, Inc. pp 12-13 .

Vroemen, S., Heldeas, J., Boyd, C., Henrissat, B. and Keen, T. N. 1995. Cloning and characterization of the *bgx* A gene from *Erwinia chrysanthemi* D1, which Encodes a β-Glucosidase/xyloxidase Enzyme.*Molecular genetic and genetechnology.* (246) :465-477.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Whister, R. L. and Richards, E. L. 1970. The carbohydrates chemistry and biochemistry. Vol.2 New York : academic Press. 22 pp.

Wong, K. K. Y., Larry Tan, U. L. and Saddler, J. N. 1988. Multiplicity of 14-xylanases in microorganism functions and applications. *Microbial Review*. (52) : 305-317.

Wong, K. K. Y. and Saddler, S. N. 1992. *Trichoderma* xylanases, their properties and applications. *Critical Review Biotechnology*. (12) : 413–435.

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

http://www.lsbu.ac.uk/water/hycmc.html

http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1bg4.html

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ก. อาหารสูตรต่างๆในการเลี้ยงและการรักษาจุลินทรีย์

PDA Medium

มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
เด็กโทส	20	กรัมต่อลิตร
วุ้น	15	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์

1. ชั่งอาหาร PDA ในสัดส่วนให้ได้ปริมาตรตามต้องการ
2. ละลายสารเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
3. นำไปปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.0
4. บรรจุลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

Czapek-Dox (CD) medium

ส่วนที่ 1,แร่ธาตุหลัก

$NaNO_2$	3.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4$	0.5	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4$	0.01	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.0	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	15	กรัมต่อลิตร

ส่วนที่ 2 ,แร่ธาตุเสริม

	Cellulose	10	กรัมต่อลิตร
หรือ	Oat spelt xylan	10	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์

1. ชั่งส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 1ในสัดส่วนให้ได้ปริมาตรตามต้องการ ยกเว้น $MgSO_4$ จากนั้นละลายสารส่วนที่ 1 เข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. แยกเติมไซแลนหรือคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสที่ 1 % ลงในอาหารที่แบ่งไว้คนละส่วน
3. ใส่วุ้นลงไป ต้มวุ้นให้ละลาย และเติม $MgSO_4$ ที่ละลายไว้ตามสัดส่วน คนให้เข้ากัน
4. บรรจุลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อชักนำการสร้างเอนไซม์</u> (Czapek-Dox (CD) medium)

ส่วนที่ 1,แร่ธาตุหลัก

	$NaNO_2$	3.0	กรัมต่อลิตร
	KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
	$MgSO_4$	0.5	กรัมต่อลิตร
	$FeSO_4$	0.01	กรัมต่อลิตร
	Yeast extract	5.0	กรัมต่อลิตร

ส่วนที่ 2 ,แร่ธาตุเสริม

	xylose	1	กรัมต่อลิตร
หรือ	xylan	1	กรัมต่อลิตร
	Glycerol	1	มิลลิลิตรต่อลิตร
ปรับค่า pH ,	Na_2CO_3	10	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียมอาหารที่ใช้ในการชักนำการสร้างเอนไซม์

1. ชั่งส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 1 ในสัดส่วนให้ได้ปริมาตรตามต้องการ ยกเว้น $MgSO_4$ จากนั้นละลายสารส่วนที่ 1 และกลีเซอรอลเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. นำมาปรับค่าพีเอชเป็น 5.0 และ 9.0 ด้วย 10 % Na_2CO_3 ลงในอาหารที่แบ่งไว้คนละส่วน
3. แยกเติมไซแลนหรือไซโลสที่ 1 % ลงในอาหารที่แบ่งไว้คนละส่วน โดยเติมไซแลนลงในอาหารที่มีค่าพีเอช 5.0 และไซโลสลงในอาหารที่มีค่าพีเอช 9.0 บรรจุลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสตามวิธีของ Tang และคณะ (1987)

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย (ร้อยละ)	
1. dinitrosalicylic (DNS) acid	1.0
2. phenol	0.2
3. sodium potassium tartrate	20.0
4. sodiumsulphit (Na_2SO_3)	0.05
5. sodiumhydroxide	1.0

วิธีการเตรียม DNS reagent

ละลาย sodiumhydroxide ในน้ำกลั่นตามปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเติม sodium potassuim tartrate, phenol และ dinitrosalicylic (DNS) acid ลงในสารละลาย sodiumhydroxide จากนั้นทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในขวดสีชาเก็บไว้ในที่มืด ก่อนใช้ให้เติม sodiumsulphite 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร DNS reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายไซแลนเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมล พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
2. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร แล้วต้มในน้ำเดือด 5 นาที
3. ทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำก๊อก
4. เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไซโลส

(ชุดควบคุม : นำเอนไซม์ไปต้มเดือด 5 นาที แล้วทำการเติมสารละลายไซแลน แต่ไม่มีการบ่มโดยเติม DNS reagent ลงไปทันที นำไปต้มแล้วทำตามวิธีการข้างต้น)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณค่ากิจกรรมไซลาเนส

ยูนิตต่อมิลลิลิตร = มิลลิกรัมของไซโลส x 1000 x จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์
น้ำหนักโมเลกุลไซโลส x ระยะเวลาบ่ม x ปริมาตรสารละลายเอนไซม์
(กรัมต่อโมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

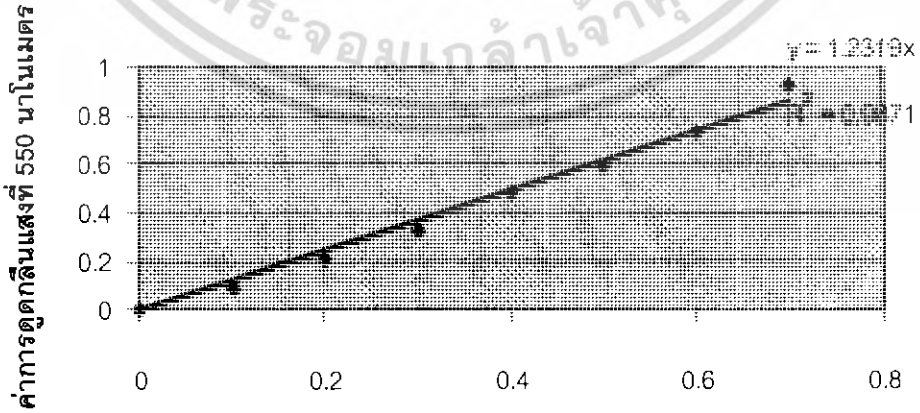
1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

1.1 การเตรียมกราฟมาตราฐานของไซโลสในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส

1. เตรียม Stock solution ของไซโลสให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร (blank ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทน)
3. เติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร
4. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบทำให้เย็นด้วยน้ำก๊อก
5. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของไซโลสกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลสที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

กราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mendal และคณะ (1969)

เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในซิเตรเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมล พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ข้อ 1)

<u>การคำนวณค่ากิจกรรมเซลลูเลส</u>

ยูนิตต่อมิลลิลิตร = <u>มิลลิกรัมของกลูโคส x 1000 x จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์</u>

น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส x ระยะเวลาบ่ม x ปริมาตรสารละลายเอนไซม์

(กรัมต่อโมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

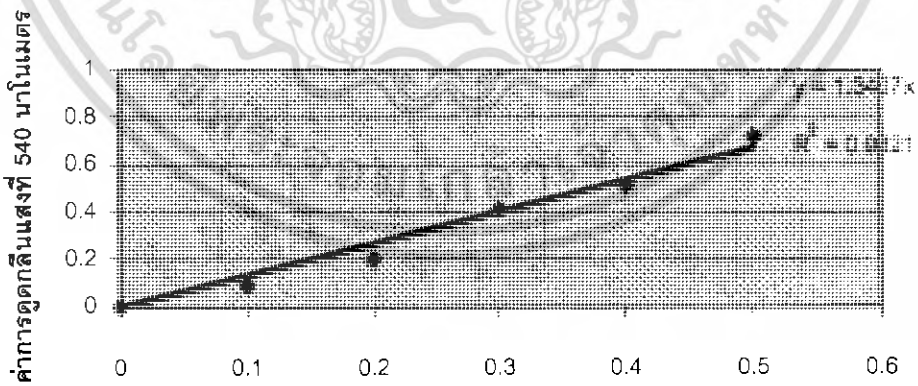
1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

2.1 การเตรียมกราฟมาตราฐานของกลูโคสในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคส

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส (ข้อ 1.1) แต่ใช้สารละลายกลูโคสแทนสารละลายไซโลส นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกลูโคส

กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การตรวจนับสปอร์ของเชื้อราโดยใช้ Haemacytometer (Petreoff-Hausserchamber)

3.1 การตรวจนับสปอร์ของเชื้อรา

เตรียมตัวอย่างที่ทำการตรวจนับ ถ้าเป็นของเหลวสามารถนำมานับได้ทันที แต่ถ้าเป็นของแข็งให้ละลายในน้ำกลั่นในปริมาตรที่ต้องการก่อนเช่น ตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร (จะได้ความเจือจางเป็น 10^{-1}) หรืออาจต้องทำการเจือจางมากขึ้น ในกรณีมีสปอร์จำนวนมาก เช่น เจือจาง 10^{-2} หรือ 10^{-3} เป็นต้น

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงใน Haemacytometer (ที่ปิดด้วย cover slip) โดยใช้ปิเปตผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างมา 1-2 หยด หยดลงด้านข้างของแผ่น cover slip

ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัว objective กำลังขยาย 10 เท่า

นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก หรือนับช่องใหญ่แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับ นำไปคูณด้วย 4×10^6 จะได้ปริมาณสปอร์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตร

3.2 วิธีการคำนวณหาค่าจำนวนสปอร์

พื้นที่ 1 ช่องเล็กในช่องใหญ่ มีค่า = 0.0025 ตารางมิลลิลิตร

ความลึกระหว่าง cover slip และช่อง = 0.1 มิลลิเมตร

ดังนั้นปริมาตร 1 ช่องเล็กจะมีค่า = 0.0025 x 0.1 = 0.00025 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ปริมาตร 0.00025 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะมีจุลินทรีย์ = Z สปอร์

ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะมีจุลินทรีย์ = Z x 1000/0.00025 สปอร์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวก ข-1. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติในการหาค่าอัตราส่วนวงใสต่อขนาดของโคโลนีในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 58 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: clearzone

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	75.014(a)	58	1.293	10.127	.000
Intercept	819.581	1	819.581	6417.265	.000
mutant	75.014	58	1.293	10.127	.000
Error	15.070	118	.128		
Total	909.666	177			
Corrected Total	90.085	176			

a R Squared = .833 (Adjusted R Squared = .750)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

clearzone

Duncan

mutant	Subset																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
46	1.02400																	
43	1.17623	1.17623																
30	1.19565	1.19565																
4	1.21943	1.21943	1.21943															
34	1.28333	1.28333	1.28333	1.28333														
52	1.43233	1.43233	1.43233	1.43233	1.43233													
40	1.44655	1.44655	1.44655	1.44655	1.44655													
51	1.44833	1.44833	1.44833	1.44833	1.44833													
38	1.46667	1.46667	1.46667	1.46667	1.46667													
31	1.48933	1.48933	1.48933	1.48933	1.48933													
37	1.52033	1.52033	1.52033	1.52033	1.52033	1.52033												
45	1.52233	1.52233	1.52233	1.52233	1.52233	1.52233												
47	1.65100	1.65100	1.65100	1.65100	1.65100	1.65100	1.65100											
33	1.68517	1.68517	1.68517	1.68517	1.68517	1.68517	1.68517	1.68517										
14		1.81167	1.81167	1.81167	1.81167	1.81167	1.81167	1.81167										
58		1.81400	1.81400	1.81400	1.81400	1.81400	1.81400	1.81400										
1		1.86503	1.86503	1.86503	1.86503	1.86503	1.86503	1.86503	1.86503									
42		1.87020	1.87020	1.87020	1.87020	1.87020	1.87020	1.87020	1.87020									
29			1.92533	1.92533	1.92533	1.92533	1.92533	1.92533	1.92533	1.92533								
12				1.93920	1.93920	1.93920	1.93920	1.93920	1.93920	1.93920								
44				1.95182	1.95182	1.95182	1.95182	1.95182	1.95182	1.95182	1.95182							
8				1.96197	1.96197	1.96197	1.96197	1.96197	1.96197	1.96197	1.96197							
11				1.97343	1.97343	1.97343	1.97343	1.97343	1.97343	1.97343	1.97343	1.97343						
5				1.97540	1.97540	1.97540	1.97540	1.97540	1.97540	1.97540	1.97540	1.97540						
3				1.98683	1.98683	1.98683	1.98683	1.98683	1.98683	1.98683	1.98683	1.98683						
25				1.99937	1.99937	1.99937	1.99937	1.99937	1.99937	1.99937	1.99937	1.99937						
18				2.00215	2.00215	2.00215	2.00215	2.00215	2.00215	2.00215	2.00215	2.00215						
56					2.05020	2.05020	2.05020	2.05020	2.05020	2.05020	2.05020	2.05020	2.05020					

15					2.06180	2.06180	2.06180	2.06180	2.06180	2.06180	2.06180	2.06180	2.06180					
54					2.08633	2.08633	2.08633	2.08633	2.08633	2.08633	2.08633	2.08633	2.08633	2.08633				
0					2.09233	2.09233	2.09233	2.09233	2.09233	2.09233	2.09233	2.09233	2.09233	2.09233				
6					2.11015	2.11015	2.11015	2.11015	2.11015	2.11015	2.11015	2.11015	2.11015	2.11015				
57					2.13327	2.13327	2.13327	2.13327	2.13327	2.13327	2.13327	2.13327	2.13327	2.13327				
16					2.15273	2.15273	2.15273	2.15273	2.15273	2.15273	2.15273	2.15273	2.15273	2.15273				
21					2.16085	2.16085	2.16085	2.16085	2.16085	2.16085	2.16085	2.16085	2.16085	2.16085				
23						2.23267	2.23267	2.23267	2.23267	2.23267	2.23267	2.23267	2.23267	2.23267	2.23267			
13						2.23353	2.23353	2.23353	2.23353	2.23353	2.23353	2.23353	2.23353	2.23353	2.23353			
32							2.24933	2.24933	2.24933	2.24933	2.24933	2.24933	2.24933	2.24933	2.24933			
28							2.26468	2.26468	2.26468	2.26468	2.26468	2.26468	2.26468	2.26468	2.26468			
9							2.26847	2.26847	2.26847	2.26847	2.26847	2.26847	2.26847	2.26847	2.26847			
35							2.33933	2.33933	2.33933	2.33933	2.33933	2.33933	2.33933	2.33933	2.33933	2.33933		
41							2.34800	2.34800	2.34800	2.34800	2.34800	2.34800	2.34800	2.34800	2.34800	2.34800		
55								2.38633	2.38633	2.38633	2.38633	2.38633	2.38633	2.38633	2.38633	2.38633		
53									2.54520	2.54520	2.54520	2.54520	2.54520	2.54520	2.54520	2.54520	2.54520	
2									2.59257	2.59257	2.59257	2.59257	2.59257	2.59257	2.59257	2.59257	2.59257	
50										2.63015	2.63015	2.63015	2.63015	2.63015	2.63015	2.63015	2.63015	
49											2.67505	2.67505	2.67505	2.67505	2.67505	2.67505	2.67505	
36												2.69167	2.69167	2.69167	2.69167	2.69167	2.69167	
7												2.69770	2.69770	2.69770	2.69770	2.69770	2.69770	
24													2.73980	2.73980	2.73980	2.73980	2.73980	
19														2.78413	2.78413	2.78413	2.78413	
27														2.79432	2.79432	2.79432	2.79432	
22														2.80037	2.80037	2.80037	2.80037	
10															2.89313	2.89313	2.89313	
20																2.99320	2.99320	
39																2.99553	2.99553	
17																3.02243	3.02243	
48																	3.16350	
26																		5.13253
Sig.	.065	.055	.050	.051	.050	.054	.061	.060	.050	.058	.051	.050	.061	.053	.071	.059	.087	1.000

The error term is Mean Square(Error) = 0.128 , a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางภาคผนวก ข-2. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติในการหาอัตราส่วนวงใสต่อขนาดของโคโลนีในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 58 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: clearzone

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	84.030(a)	58	1.449	15.898	.000
Intercept	204.300	1	204.300	2241.793	.000
mutant	84.030	58	1.449	15.898	.000
Error	10.754	118	.091		
Total	299.084	177			
Corrected Total	94.784	176			

a R Squared = .887 (Adjusted R Squared = .831)

clearzone

Duncan

mutant	N	Subset 1	2	3	4	5	6	7
13	3	.00000						
17	3	.00000						
18	3	.00000						
19	3	.00000						
20	3	.00000						
29	3	.00000						
30	3	.00000						
31	3	.00000						
32	3	.00000						
33	3	.00000						
34	3	.00000						
35	3	.00000						
36	3	.00000						
43	3	.00000						
44	3	.00000						
56	3	.00000						
55	3		.83333					
15	3		1.17133	1.17133				
37	3		1.19633	1.19633				
22	3		1.23937	1.23937				
11	3		1.24007	1.24007				
12	3		1.24400	1.24400	1.24400			
58	3		1.26127	1.26127	1.26127			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

26	3		1.28009	1.28009	1.28009			
7	3		1.28473	1.28473	1.28473			
24	3		1.30783	1.30783	1.30783			
28	3		1.31788	1.31788	1.31788			
8	3		1.32054	1.32054	1.32054			
23	3		1.34551	1.34551	1.34551			
10	3		1.34847	1.34847	1.34847			
21	3		1.35647	1.35647	1.35647			
9	3		1.37830	1.37830	1.37830			
47	3		1.38767	1.38767	1.38767			
27	3		1.39616	1.39616	1.39616			
6	3		1.39747	1.39747	1.39747			
3	3		1.40480	1.40480	1.40480			
4	3		1.40560	1.40560	1.40560			
38	3		1.41700	1.41700	1.41700	1.41700		
2	3			1.48533	1.48533	1.48533		
39	3			1.49010	1.49010	1.49010		
46	3			1.49017	1.49017	1.49017		
53	3			1.49733	1.49733	1.49733		
0	3			1.51593	1.51593	1.51593		
14	3			1.52200	1.52200	1.52200	1.52200	
1	3			1.54100	1.54100	1.54100	1.54100	
50	3			1.54367	1.54367	1.54367	1.54367	
5	3			1.56100	1.56100	1.56100	1.56100	
41	3			1.56910	1.56910	1.56910	1.56910	
49	3			1.58667	1.58667	1.58667	1.58667	
40	3			1.59667	1.59667	1.59667	1.59667	
52	3			1.62167	1.62167	1.62167	1.62167	
16	3			1.62483	1.62483	1.62483	1.62483	
54	3			1.64810	1.64810	1.64810	1.64810	
51	3			1.66110	1.66110	1.66110	1.66110	
45	3			1.66667	1.66667	1.66667	1.66667	
57	3				1.86160	1.86160	1.86160	1.86160
48	3					2.01307	2.01307	2.01307
42	3						2.11523	2.11523
25	3							2.24153
Sig.		1.000	.060	.118	.051	.053	.050	.164

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .091.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข-3. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 58 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	45439.255(a)	58	783.435	44.870	.000
Intercept	133398.428	1	133398.428	7640.225	.000
mutant	45439.255	58	783.435	44.870	.000
Error	2060.281	118	17.460		
Total	180897.965	177			
Corrected Total	47499.537	176			

a R Squared = .957 (Adjusted R Squared = .935)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

activity

Duncan[a,b]

mutant	N	Subset 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
33.0	3	2.9718133																				
29.0	3	3.2486200																				
54.0	3	3.0432800																				
3.0	3	5.3591920	5.3591920																			
43.0	3	8.9234497	8.9234497	8.9234497																		
42.0	3	9.0701693	9.0701693	9.0701693																		
13.0	3		12.05053	12.05053	12.05053																	
56.0	3			14.28072	14.28072	14.28072																
58.0	3			15.72601	15.72601	15.72601	15.72601															
40.0	3			16.07489	16.07489	16.07489	16.07489	16.07489														
25.0	3				16.82398	16.82398	16.82398	16.82398	16.82398													
55.0	3				17.26176	17.26176	17.26176	17.26176	17.26176													
37.0	3				17.63817	17.63817	17.63817	17.63817	17.63817	17.63817												
11.0	3				17.93730	17.93730	17.93730	17.93730	17.93730	17.93730												
16.0	3				18.09864	18.09864	18.09864	18.09864	18.09864	18.09864	18.09864											
18.0	3				19.00099	19.00099	19.00099	19.00099	19.00099	19.00099	19.00099	19.00099										
6.0	3				19.52735	19.52735	19.52735	19.52735	19.52735	19.52735	19.52735	19.52735										
36.0	3				20.10604	20.10604	20.10604	20.10604	20.10604	20.10604	20.10604	20.10604										
23.0	3					20.23532	20.23532	20.23532	20.23532	20.23532	20.23532	20.23532										
21.0	3					20.40860	20.40860	20.40860	20.40860	20.40860	20.40860	20.40860										
14.0	3					20.86324	20.86324	20.86324	20.86324	20.86324	20.86324	20.86324	20.86324									
52.0	3					21.07060	21.07060	21.07060	21.07060	21.07060	21.07060	21.07060	21.07060									
46.0	3					21.20597	21.20597	21.20597	21.20597	21.20597	21.20597	21.20597	21.20597									
15.0	3					21.22890	21.22890	21.22890	21.22890	21.22890	21.22890	21.22890	21.22890									
47.0	3					21.53024	21.53024	21.53024	21.53024	21.53024	21.53024	21.53024	21.53024									
34.0	3					21.64086	21.64086	21.64086	21.64086	21.64086	21.64086	21.64086	21.64086									
57.0	3						23.28994	23.28994	23.28994	23.28994	23.28994	23.28994	23.28994	23.28994								
4.0	3						23.55388	23.55388	23.55388	23.55388	23.55388	23.55388	23.55388	23.55388								
9.0	3						23.67507	23.67507	23.67507	23.67507	23.67507	23.67507	23.67507	23.67507								
35.0	3						23.77462	23.77462	23.77462	23.77462	23.77462	23.77462	23.77462	23.77462								
12.0	3						24.03976	24.03976	24.03976	24.03976	24.03976	24.03976	24.03976	24.03976								
51.0	3							24.36734	24.36734	24.36734	24.36734	24.36734	24.36734	24.36734								
5.0	3								24.85040	24.85040	24.85040	24.85040	24.85040	24.85040								
32.0	3								25.09831	25.09831	25.09831	25.09831	25.09831	25.09831								
31.0	3									25.75888	25.75888	25.75888	25.75888	25.75888								
30.0	3										26.47764	26.47764	26.47764	26.47764								
38.0	3											26.88862	26.88862	26.88862	26.88862							
44.0	3												29.04300	29.04300	29.04300	29.04300						
1.0	3													30.86858	30.86858	30.86858	30.86858					
8.0	3													31.25775	31.25775	31.25775	31.25775					
.0	3													31.34654	31.34654	31.34654	31.34654					
2.0	3														34.44454	34.44454	34.44454	34.44454				
48.0	3															34.78044	34.78044	34.78044				
50.0	3															36.13597	36.13597	36.13597	36.13597			
7.0	3															36.25985	36.25985	36.25985	36.25985			
28.0	3															36.39196	36.39196	36.39196	36.39196			
17.0	3																37.08056	37.08056	37.08056			
49.0	3																37.11212	37.11212	37.11212			
10.0	3																37.36028	37.36028	37.36028			
53.0	3																38.66435	38.66435	38.66435			
22.0	3																	40.51029	40.51029			
41.0	3																	41.62240	41.62240			
27.0	3																	42.14288	42.14288			
19.0	3																	42.20165	42.20165			
24.0	3																		43.53648			
48.0	3																			56.24222		
39.0	3																			56.99363		
20.0	3																				66.79917	
26.0	3																					100.6147
Sig.		.122	.075	.068	.051	.073	.053	.054	.055	.059	.051	.067	.054	.055	.053	.070	.060	.063	.075	.826	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 17.480.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

ตารางภาคผนวก ข-4. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 58 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: acivity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.014(a)	58	.000	17.853	.000
Intercept	.007	1	.007	506.352	.000
mutant	.014	58	.000	17.853	.000
Error	.002	118	1.39E-005		
Total	.023	177			
Corrected Total	.016	176			

a R Squared = .898 (Adjusted R Squared = .847)

acivity

Duncan

mutant	N	Subset 1	2	3	4	5	6	7
20	3	.0006950						
40	3	.0014500						
37	3	.0014710						
38	3	.0018067	.0018067					
44	3	.0018437	.0018437					
55	3	.0018717	.0018717					
6	3	.0020267	.0020267	.0020267				
30	3	.0023000	.0023000	.0023000				
36	3	.0024133	.0024133	.0024133				
25	3	.0024367	.0024367	.0024367				
18	3	.0024413	.0024413	.0024413				
5	3	.0024433	.0024433	.0024433				
21	3	.0024767	.0024767	.0024767				
19	3	.0025777	.0025777	.0025777				
15	3	.0026867	.0026867	.0026867				
51	3	.0028110	.0028110	.0028110				
32	3	.0029367	.0029367	.0029367				
28	3	.0029910	.0029910	.0029910				
9	3	.0031700	.0031700	.0031700				
22	3	.0031803	.0031803	.0031803				
27	3	.0031870	.0031870	.0031870				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

24	3	.0033267	.0033267	.0033267				
13	3	.0035847	.0035847	.0035847				
56	3	.0037043	.0037043	.0037043				
34	3	.0037333	.0037333	.0037333				
58	3	.0038333	.0038333	.0038333				
50	3	.0039293	.0039293	.0039293				
46	3	.0040313	.0040313	.0040313				
23	3	.0044487	.0044487	.0044487	.0044487			
35	3	.0044933	.0044933	.0044933	.0044933			
45	3	.0046373	.0046373	.0046373	.0046373			
57	3	.0048333	.0048333	.0048333	.0048333			
1	3	.0049133	.0049133	.0049133	.0049133			
29	3	.0051500	.0051500	.0051500	.0051500			
10	3	.0052337	.0052337	.0052337	.0052337			
43	3	.0052450	.0052450	.0052450	.0052450			
31	3	.0054100	.0054100	.0054100	.0054100			
2	3	.0054403	.0054403	.0054403	.0054403			
11	3	.0055333	.0055333	.0055333	.0055333			
17	3	.0056333	.0056333	.0056333	.0056333			
14	3	.0056667	.0056667	.0056667	.0056667			
16	3	.0058663	.0058663	.0058663	.0058663			
48	3	.0060147	.0060147	.0060147	.0060147	.0060147		
7	3	.0065677	.0065677	.0065677	.0065677	.0065677		
52	3	.0066000	.0066000	.0066000	.0066000	.0066000		
26	3	.0069727	.0069727	.0069727	.0069727	.0069727		
47	3	.0072023	.0072023	.0072023	.0072023	.0072023		
42	3	.0072033	.0072033	.0072033	.0072033	.0072033		
39	3	.0073200	.0073200	.0073200	.0073200	.0073200		
54	3	.0074700	.0074700	.0074700	.0074700	.0074700		
53	3	.0078067	.0078067	.0078067	.0078067	.0078067		
12	3	.0083500	.0083500	.0083500	.0083500	.0083500		
0	3		.0094160	.0094160	.0094160	.0094160		
41	3			.0096333	.0096333	.0096333		
8	3				.0116033	.0116033		
33	3				.0116633	.0116633		
49	3					.0133033		
3	3						.0293333	
4	3							.0672333
Sig.		.052	.053	.053	.062	.051	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 1.39E-005.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.
b Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข-5. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยการวัดอัตราส่วนวงใสต่อขนาดของโคโลนีในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 18 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: clearzone

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	21.332(a)	18	1.185	6.859	.000
Intercept	295.248	1	295.248	1708.779	.000
mutant	21.332	18	1.185	6.859	.000
Error	6.566	38	.173		
Total	323.146	57			
Corrected Total	27.898	56			

a R Squared = .765 (Adjusted R Squared = .653)

clearzone

Duncan

mutant	N	Subset 1	2	3	4	5
0	3	1.20700				
17	3	1.33467				
46	3	1.39997				
20	3	1.49367	1.49367			
39	3	1.78887	1.78887	1.78887		
28	3	1.95733	1.95733	1.95733		
10	3		2.16667	2.16667	2.16667	
53	3			2.26667	2.26667	
19	3			2.30000	2.30000	
24	3			2.33333	2.33333	
41	3			2.33333	2.33333	
2	3			2.40000	2.40000	
48	3			2.50000	2.50000	
22	3			2.58333	2.58333	
27	3				2.84233	2.84233
26	3				2.90833	2.90833
7	3				2.94443	2.94443
50	3				2.96400	2.96400
49	3					3.51843
Sig.		.058	.076	.053	.055	.082

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .173.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b Alpha = .05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข-6. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยการวัดอัตราส่วนวงใสต่อขนาดของโคโลนีในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 18 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: clearzone

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	24.105(a)	18	1.339	96.722	.000
Intercept	39.265	1	39.265	2835.930	.000
mutant	24.105	18	1.339	96.722	.000
Error	.526	38	.014		
Total	63.896	57			
Corrected Total	24.631	56			

a R Squared = .979 (Adjusted R Squared = .969)

clearzone

Duncan

mutant	N	Subset 1	2	3	4	5	6	7
7	3	.00000						
19	3	.00000						
24	3	.00000						
39	3	.00000						
41	3	.00000						
50	3	.00000						
53	3	.03333						
10	3		.93513					
49	3		1.01700	1.01700				
22	3			1.16200	1.16200			
48	3			1.19767	1.19767	1.19767		
0	3			1.20600	1.20600	1.20600		
28	3				1.29610	1.29610	1.29610	
26	3					1.40000	1.40000	1.40000
17	3						1.43567	1.43567
46	3						1.45267	1.45267
27	3						1.50000	1.50000
2	3							1.53333
20	3							1.60063
Sig.		.767	.399	.079	.211	.060	.064	.073

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .014.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.
b Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข-7. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อที่ผ่าน การชักนำการกลายพันธุ์ 18 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6874.518(a)	18	381.918	25.624	.000
Intercept	68907.543	1	68907.543	4623.246	.000
mutant	6874.518	18	381.918	25.624	.000
Error	566.374	38	14.905		
Total	76348.436	57			
Corrected Total	7440.892	56			

a R Squared = .924 (Adjusted R Squared = .888)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

activity

Duncan

mutant	N	Subset 1	2	3	4	5	6	7	8	9
19	3	16.9570367								
24	3	21.1009067	21.1009067							
7	3	22.9901600	22.9901600	22.9901600						
10	3		24.9722333	24.9722333	24.9722333					
0	3		25.8107767	25.8107767	25.8107767	25.8107767				
46	3		26.1364900	26.1364900	26.1364900	26.1364900				
50	3			29.8590867	29.8590867	29.8590867	29.8590867			
17	3				31.1116333	31.1116333	31.1116333			
27	3					32.5243733	32.5243733	32.5243733		
53	3						35.0326033	35.0326033		
28	3						35.6617400	35.6617400		
20	3						35.6836467	35.6836467		
48	3						35.7927400	35.7927400		
22	3						36.6811667	36.6811667		
2	3							39.6314533		
39	3								47.5488800	
49	3								52.4709767	52.4709767
26	3								53.9938867	53.9938867
41	3									56.6569233
Sig.		.077	.163	.057	.089	.063	.069	.056	.059	.218

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 14.905.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b Alpha = .05.

ตารางภาคผนวก ข-8. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 18 สายพันธุ์ ในสภาวะอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.009(a)	18	.000	1.312	.235
Intercept	.020	1	.020	53.793	.000
mutant	.009	18	.000	1.312	.235
Error	.014	38	.000		
Total	.042	57			
Corrected Total	.022	56			

a R Squared = .383 (Adjusted R Squared = .091)

activity

Duncan

mutant	N	Subset 1	Subset 2
0	3	.0009183	
19	3	.0012160	
39	3	.0071897	
28	3	.0099647	
49	3	.0131213	
41	3	.0132210	
48	3	.0147453	
53	3	.0148447	
50	3	.0152503	
10	3	.0155520	
7	3	.0176523	
27	3	.0178533	
22	3	.0216910	
2	3	.0225337	
24	3	.0236103	
26	3	.0273863	.0273863
17	3	.0282370	.0282370
46	3	.0287653	.0287653
20	3		.0588460
Sig.		.147	.072

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .000.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข-9. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 18 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะการเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	23030.065(a)	35	658.002	32.183	.000
Intercept	166253.252	1	166253.252	8131.360	.000
mutant	23030.065	35	658.002	32.183	.000
Error	1472.107	72	20.446		
Total	190755.424	108			
Corrected Total	24502.172	107			

a R Squared = .940 (Adjusted R Squared = .911)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

activity

Duncan

mutant	N	Subset 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
19.1	3	16.957036 7														
24.1	3	21.100906 7	21.100906 7													
7.1	3	22.990160 0	22.990160 0	22.990160 0												
10.1	3		24.972233 3	24.972233 3	24.972233 3											
.1	3		25.810776 7	25.810776 7	25.810776 7											
46.1	3		26.136490 0	26.136490 0	26.136490 0	26.136490 0										
50.1	3			29.859086 7	29.859086 7	29.859086 7	29.859086 7									
17.1	3			31.111633 3	31.111633 3	31.111633 3	31.111633 3	31.111633 3								
.0	3			31.345460 0	31.345460 0	31.345460 0	31.345460 0	31.345460 0								
27.1	3				32.524373 3	32.524373 3	32.524373 3	32.524373 3	32.524373 3							
2.0	3					34.444533 3	34.444533 3	34.444533 3	34.444533 3	34.444533 3						
46.0	3						34.789436 7	34.789436 7	34.789436 7	34.789436 7	34.789436 7					
53.1	3						35.032603 3	35.032603 3	35.032603 3	35.032603 3	35.032603 3					
28.1	3						35.661740 0	35.661740 0	35.661740 0	35.661740 0	35.661740 0					
20.1	3						35.683646 7	35.683646 7	35.683646 7	35.683646 7	35.683646 7					
48.1	3						35.792840 0	35.792840 0	35.792840 0	35.792840 0	35.792840 0					
50.0	3						36.135973 3	36.135973 3	36.135973 3	36.135973 3	36.135973 3					
7.0	3						36.259646 7	36.259646 7	36.259646 7	36.259646 7	36.259646 7					
28.0	3						36.391956 7	36.391956 7	36.391956 7	36.391956 7	36.391956 7					
22.1	3						36.681166 7	36.681166 7	36.681166 7	36.681166 7	36.681166 7					
17.0	3						37.086556 7	37.086556 7	37.086556 7	37.086556 7	37.086556 7					
49.0	3						37.112123 3	37.112123 3	37.112123 3	37.112123 3	37.112123 3					
10.0	3						37.360283 3	37.360283 3	37.360283 3	37.360283 3	37.360283 3					
53.0	3						38.664346 7	38.664346 7	38.664346 7	38.664346 7	38.664346 7					
2.1	3							39.631453 3	39.631453 3	39.631453 3	39.631453 3	39.631453 3				
22.0	3								40.510290 0	40.510290 0	40.510290 0	40.510290 0				

27.0	3										42.143453 3	42.143453 3	42.143453 3				
19.0	3										42.201656 7	42.201656 7	42.201656 7				
24.0	3											43.536480 0	43.536480 0				
39.1	3												47.548880 0	47.548880 0			
49.1	3													52.470976 7	52.470976 7		
26.1	3													53.860553 3	53.860553 3		
48.0	3														56.242223 3		
39.0	3														56.993626 7		
20.0	3															66.799166 7	
26.0	3																100.61473 33
Sig.		.127	.232	.052	.081	.051	.055	.064	.082	.092	.057	.063	.110	.271	1.000	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 20.446.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.
b Alpha = .05.

ตารางภาคผนวก ข-10. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ 18 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะการเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.014(a)	37	.000	2.039	.004
Intercept	.017	1	.017	90.920	.000
mutant	.014	37	.000	2.039	.004
Error	.014	76	.000		
Total	.045	114			
Corrected Total	.028	113			

a R Squared = .498 (Adjusted R Squared = .254)

activity

Duncan

mutant	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
20.0	3	.0006950		
.2	3	.0009183		
19.1	3	.0012160	.0012160	
19.0	3	.0025777	.0025777	
28.0	3	.0029910	.0029910	
22.0	3	.0031803	.0031803	
27.0	3	.0031870	.0031870	
24.0	3	.0033267	.0033267	
50.0	3	.0039293	.0039293	
46.0	3	.0040313	.0040313	
10.0	3	.0052337	.0052337	
2.0	3	.0052703	.0052703	
17.0	3	.0056333	.0056333	
48.0	3	.0060147	.0060147	
7.0	3	.0065677	.0065677	
26.0	3	.0069727	.0069727	
39.0	3	.0073200	.0073200	
39.1	3	.0074897	.0074897	
53.0	3	.0078067	.0078067	
.0	3	.0094160	.0094160	
41.0	3	.0096333	.0096333	
28.1	3	.0099647	.0099647	
49.1	3	.0131213	.0131213	
41.1	3	.0132210	.0132210	
49.0	3	.0133033	.0133033	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

48.1	3	.0147453	.0147453	
53.1	3	.0148447	.0148447	
50.1	3	.0152503	.0152503	
10.1	3	.0155520	.0155520	
7.1	3	.0176523	.0176523	
27.1	3	.0178533	.0178533	
22.1	3	.0216910	.0216910	
2.1	3	.0225337	.0225337	
24.1	3	.0236103	.0236103	
26.1	3	.0273863	.0273863	
17.1	3	.0282370	.0282370	
46.1	3		.0287653	
20.1	3			.0588460
Sig.		.051	.051	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .000.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b Alpha

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้