สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวุ้นมะพร้าว ที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากโรงงาน

นางสาว พิจิตรา ตั้งเชื่อนบันธ์
นางสาว รสรินทร์ รุจนานนท์
นางสาว อัญชลี อำนาจสมบูรณ์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67307
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549

b.....
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Selection of Fungi for cellulase production from waste Nata De Coco

Phichitra Tangkeunkan

Rosarin Rujananon

Anchalee Amnatsomboon

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

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวุ้นมะพร้าวที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากโรงงาน		
นักศึกษา	นางสาวพิจิตรา	ตั้งเขื่อนขันธ์	รหัสประจำตัว 45050758
	นางสาวรสรินทร์	รุจนานนท์	รหัสประจำตัว 45050767
	นางสาวอัญชลี	อำนาจสมบูรณ์	รหัสประจำตัว 45050796
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์		
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง		

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต	
กรรมการ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ อาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์	

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวุ้นมะพร้าวที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากโรงงาน		
นักศึกษา	นางสาวพิจิตรา	ตั้งเขื่อนขันธ์	รหัสประจำตัว 45050758
	นางสาวรสรินทร์	รุจนานนท์	รหัสประจำตัว 45050767
	นางสาวอัญชลี	อำนาจสมบูรณ์	รหัสประจำตัว 45050796
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม		
ปีการศึกษา	2548		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์		

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อราที่เก็บรักษาไว้ 43 สายพันธุ์ พบว่า สามารถคัดเลือกเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. มาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่แปรผันความเข้มข้นของคาร์บอน ชนิดและปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจน และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ ความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 3 เปปโตน 0.75 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 0.3 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 0.1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.8647 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Selection of Fungi for cellulase production from waste Nata De Coco

Name Miss Phichitra Tangkeunkan
Miss Rosarin Rujananon
Miss Anchalee Amnatsomboon

Department Applied Biology

Academic year 2005

Special Project Advisor Asst. Prof. Aree Rittiboon

Abstract

Pestalotiopsis sp. was selected from the 43 fungal strains in our stock culture for cellulase production studies. The fungus was optimized in submerged cultures by varying the concentrations of carbon, types and amounts of organic nitrogen and the levels of initial pH. The cultures were shaker at 200 rpm, 30°C for 4 days. The optimized conditions for cellulase production were 3%(w/v) carbon source, 0.75 g/l peptone, 0.3 g/l urea, 0.1 g/l yeast extract and the initial pH of medium was 5.0 and the highest cellulase activity was 0.8647 Unit/ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม และสามารถสำเร็จเสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ช่วยเหลือแก้ปัญหามาโดยตลอด รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานภาษาที่ใช้ ตลอดจนอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต ประธานกรรมการโครงงานพิเศษ และอาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษที่ได้ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะในการทำงาน รวมไปถึงเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทดลอง

คณะผู้จัดทำขอขอบคุณคุณพ่อ คุณแม่และเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และให้กำลังใจในการทำโครงงานพิเศษตลอดมา สุดท้ายนี้ คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากโครงงานพิเศษนี้ คณะผู้จัดทำขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นางสาวพิจิตรา ตั้งเขื่อนขันธ์
นางสาวรสรินทร์ รุจนานนท์
นางสาวอัญชลี อำนาจสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบข่ายของการวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 วุ้นน้ำมะพร้าว	3
2.2 ลักษณะทางเคมีและคุณสมบัติของวุ้นน้ำมะพร้าว	3
2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว	4
2.4 ส่วนประกอบของวุ้นน้ำมะพร้าว	5
2.5 การใช้ประโยชน์ของน้ำมะพร้าว	5
2.6 เซลลูโลส	7
2.7 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	8
2.7.1 จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส	8
2.7.2 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา	11
2.8 ระบบเอนไซม์เซลลูเลส	14
2.8.1 การย่อยสลายเซลลูโลส	14
2.8.2 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	14
2.8.3 การยับยั้งการสร้างและการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	17
2.9 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส	17
2.10 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส และจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ	21
3.2 สารเคมีที่ใช้ในโครงงานพิเศษ	21
3.3 ขั้นตอนในการดำเนินงาน	22
3.3.1 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด	22
3.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	23
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	
4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด	24
4.2 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ของเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือก	24
4.2.1 ผลศึกษาปริมาณของเซลลูโลส(วุ้นมะพร้าว) ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	24
4.2.2 ผลการศึกษาชนิด และปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	27
4.2.3 ผลการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	28
4.2.4 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	29
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
เอกสารอ้างอิง	
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์และการคำนวณ	
ภาคผนวก ค ตารางการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	
ภาคผนวก ง สายพันธุ์เชื้อรา	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	เชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส	9
2.	เชื้อราที่สร้างเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง	13
3.	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพของเชื้อรา 43 สายพันธุ์ ในการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีวุ้นมะพร้าวเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน	25
4.	สูตรอาหารดัดแปลงชนิดและปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจนจากสูตรอาหารของแมนเดล	27

ตารางภาคผนวกที่

ก5	อัตราส่วนของสารละลาย ก.(X) และ ข.(Y) ในการเตรียมสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์	38
ค6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา 43 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอาหารแมนเดลที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	43
ค7	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา 43 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอาหารแมนเดล ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	44
ค8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	45
ค9	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	45
ค10	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 26ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	46
ค11	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 26 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
ค12	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	47
ค13	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	47
ค14	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	48
ค15	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	48
ค16	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 26ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	49
ค17	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 26 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	49
ค18	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	50
ค19	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	50
ค20	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
ค21	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	51
ค22	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 26ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	52
ค23	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 26 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	52
ค24	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	53
ค25	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	53
ค26	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นไนโตรเจนสูตรต่างๆ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	54
ค27	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนสูตรต่างๆ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	54
ค28	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนสูตรต่างๆ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	55
ค29	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนสูตรต่างๆ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
ค30	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนสูตรต่างๆ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	56
ค31	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนสูตรต่างๆ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	56
ค32	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	57
ค33	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	57
ค34	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	58
ค35	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	58
ค36	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	59
ค37	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	59
ง38	รายชื่อสายพันธุ์รา 43 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส และหน่วยย่อยบีต้า-ดี-กลูโคไพราโนสที่ต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของหน่วยย่อยบีต้า-ดี-กลูโคไพราโนส กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของหน่วยย่อยถัดไป	8
2	รูปร่างของโครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์พืชโดยทั่วไป	9
3	โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เซลลูเลส	15
4	กลไกการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส	16
5	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนต่างๆในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC20, MC 26 และ MC 29 ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	26
6	สูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	28
7	ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20ในวันที่ 3, 4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	29

รูปภาคผนวกที่

ก8	กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

วัสดุเหลือทิ้งนับเป็นสิ่งที่หลายคนสนใจที่จะนำกลับมาใช้ให้เกิดประโยชน์ เพื่อลดปริมาณขยะที่อาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่ายหรืองบประมาณในการวิจัยให้น้อยลงอีกด้วย ซึ่งในปัจจุบันมีวัสดุเหลือทิ้งมากมายทั้งจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม

ปัจจุบันวุ้นมะพร้าวถือเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งที่ได้รับความนิยมในการบริโภค และมีกำลังการผลิตเพิ่มสูงขึ้น ขณะเดียวกันในการผลิตครั้งหนึ่งๆพบว่าจะมีเศษวุ้นมะพร้าวที่ถูกตัดทิ้งเป็นจำนวนมาก เพื่อเป็นการนำเศษวุ้นมะพร้าวซึ่งเป็นของเหลือจากโรงงานมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดจึงได้มีการนำวุ้นมะพร้าวมาวิเคราะห์ พบว่าองค์ประกอบหลักของวุ้นมะพร้าวส่วนใหญ่จะเป็นเส้นใยในกลุ่มเซลลูโลส (จตุรงค์, 2544) ซึ่งเราสามารถนำเศษวุ้นมะพร้าวนี้มาประยุกต์ใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

ในภาคอุตสาหกรรมสามารถนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์ได้หลายๆ ด้าน อาทิเช่น การนำไปใช้ในกระบวนการผลิตไบโอ-เอทานอล อุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น ซึ่งหากเราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณมากและมีต้นทุนการผลิตต่ำถือเป็นสิ่งที่ดีมาก ดังนั้นโครงงานนี้จึงเสนอขึ้นเพื่อทำการศึกษาเชื้อราที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้วุ้นมะพร้าวที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากโรงงานเป็นสับสเตรท อีกทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด
2. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือก

1.3 ขอบข่ายของการวิจัย

1. คัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ
2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่คัดเลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
2. ทำให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
3. เพื่อเพิ่มประโยชน์ของเศษวุ้นมะพร้าวที่เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 วุ้นน้ำมะพร้าว

วุ้นน้ำมะพร้าวมีชื่อเรียกหลายอย่าง เช่น วุ้นมะพร้าว วุ้นสวรรค์ วุ้นน้ำส้ม ลูกพร้าว หรือเห็ดรัสเซีย หากผลิตจากน้ำมะพร้าว ภาษาฟิลิปปินส์เรียกว่า "Nata de Coco" (สมคิด, 2531) โดยคำว่า Nata เป็นคำในภาษาสเปน ที่ถ่ายทอดมาจากคำในภาษาละติน คือ Natare ซึ่งหมายถึง ลักษณะที่ลอยได้ (อัจฉรา, 2536) ส่วนใน Encyclopedia Universal Illusstrada ได้ให้ความหมายของ nata ว่าเป็นวัตถุหนาจากบางส่วนของของเหลวโดยจะลอยอยู่เหนือของเหลวนั้น ดังนั้นจึงนำคำว่า nata มาใช้เรียกแผ่นของกลุ่มวุ้นที่เกาะอยู่บริเวณผิวหน้าของสารละลายที่มีน้ำตาลโดยเฉพาะน้ำตาลทรายหรือน้ำตาลอ้อย (อัจฉรา, 2536) ต่อมาได้มีการให้ความหมายของ nata ในอีกแง่หนึ่งคือ เป็นเนื้อเยื่อของตัวเซลล์ และสายของโมเลกุลน้ำตาล ลักษณะเป็นแผ่นหนามีสีขาว หรือครีมไม่ละลายน้ำเป็นแผ่นวุ้นที่เซลล์ *Acetobacter xylinum* สร้างขึ้นที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกรดน้ำตาล เอทิลแอลกอฮอล์ และสารอาหารอื่น ๆ ลักษณะของวุ้นนำมะพร้าวคล้ายวุ้นที่ใช้ทำขนมแต่เหนียวกว่ามีลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน โดยวุ้นธรรมดาประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส และ3,6-anhydrogalactose ต่อกันด้วยพันธะบีด้า-1,4 (β-1,4) หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และแข็งตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ทิพรัตน์, 2535) แต่วุ้นนำมะพร้าวมีองค์ประกอบเป็นพวกเซลลูโลส ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนใหญ่ต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4 (β-1,4) มีคุณสมบัติทางเคมีอื่น ๆ เหมือนเซลลูโลสที่ได้จากฝ้าย เช่น เมื่อต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ก็ไม่สามารถละลายน้ำได้

2.2 ลักษณะทางเคมีและคุณสมบัติของวุ้นน้ำมะพร้าว

Brown (1880) ได้อธิบายถึงแบคทีเรียชนิดหนึ่งซึ่งสร้างเยื่อที่มีความแข็งเมื่อเลี้ยงให้เจริญในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตอยู่มาก พบว่าเยื่อเหนียวสามารถละลายได้ในแอมโมเนียมคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (ammonium copper hydroxide) และให้น้ำตาลรีดิวซ์ เนื่องจากเขาพบว่าในฝ้ายก็สามารถเกิดสารเหล่านี้เช่นกัน เขาจึงเรียกจุลินทรีย์นี้ว่า *A. xylinum*

เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน พบว่าเซลลูโลสที่สร้างจาก *A. xylinum* เป็นเส้นใยที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับเส้นใยเซลลูโลสที่มาจากผนังเซลล์พืชชนิดอื่น ๆ สำหรับ *A. xylinum* สายพันธุ์นี้จะทำการสังเคราะห์เส้นใยอยู่นอกเซลล์ ซึ่งการสังเกตเซลล์นี้จะทำได้โดยมองผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการสังเคราะห์เซลลูโลส แบคทีเรียจะเริ่มจากการปล่อยสารเมือกที่มีโครงสร้างเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นอีกไม่นานจะก่อตัวกันขึ้นเป็นเส้นใยเซลลูโลส สารที่ปล่อยออกมานอกเซลล์เหล่านี้ จะเป็นตัวเริ่มต้นของเซลลูโลสโดยจะมีการต่อกันเป็นโซ่ยาวต่อไปภายนอกเซลล์โดยมีการสันนิษฐานว่ามีเอนไซม์เข้ามาช่วย ภายในชิ้นวุ้นที่เห็นทั้งหมดจะประกอบด้วยเซลลูโลสทั้งชิ้น

จากการศึกษาการเจริญของวุ้นในน้ำมะพร้าว และในน้ำผลไม้ พบว่าเซลลูโลสสามารถดูดซับน้ำได้ประมาณร้อยละ 90 จากลักษณะทางกายภาพของชิ้นวุ้นสด และจากรายงานที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ที่ผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว นำไปสู่การศึกษาเซลลูโลสทางด้านเคมี เช่น ความสามารถในการละลาย และการทดสอบทางด้าน X-ray spectrometer และ Infrared spectrometer ซึ่งผลการทดสอบทั้งหมดนี้สามารถยืนยันได้ว่าส่วนที่เป็นของแข็งของวุ้นนี้ คือ เซลลูโลส (อัจฉรา, 2536)

คุณลักษณะที่ดีของวุ้นน้ำมะพร้าวจะต้องมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ คือ

1) วุ้นจะต้องมีสีขาวหรือสีครีม

2) แผ่นเนื้อหนา เหนียว และนุ่ม ไม่มีเส้นใย หรือมีเพียงเล็กน้อย

การที่จะได้มาซึ่งวุ้นที่มีประสิทธิภาพที่ดีดังกล่าว จะต้องมีการควบคุมปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนี้

2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว

ลักษณะของจุลินทรีย์ที่สร้างวุ้นน้ำมะพร้าว

จากการศึกษาจุลินทรีย์ที่ได้จากการแยกเซลล์แบคทีเรีย ที่ผลิตวุ้นจากน้ำมะพร้าวในแง่ของลักษณะทางกายภาพ ลักษณะของเชื้อและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่สร้างวุ้นนี้ ทำให้สรุปได้ว่าจุลินทรีย์นี้คือ *Acetobacter xylinum* ซึ่งมีลักษณะดังนี้คือ เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง มีขนาด 2 ไมโครเมตร ไม่มีแฟลกเจลลา ที่ผนังเซลล์ปกคลุมด้วยชั้นของเมือกลื่น เซลล์อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นเส้นสาย ไม่เคลื่อนที่ และติดสีแกรมลบ เซลล์นี้ต้องการอากาศ เจริญเติบโตช้า สามารถเจริญได้ในน้ำหมักที่เป็นกรด สามารถสร้างกรดกลูโคสเอธิลและโพรพิลแอลกอฮอล์และไกลคอลได้ สามารถออกซิไดซ์เอธานอลเป็นกรดอะซิติก และออกซิไดซ์กรดอะซิติกไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ไม่รีดิวซ์ไนเตรต *Acetobacter xylinum* นี้จะให้ผลการทดสอบ catalase เป็นบวก ไม่มีการเปลี่ยนสีลิตมัสมิลค์ สามารถสร้าง 5- ketogluconate, 2- ketogluconate และ gluconate ไม่มีการสร้างอัลโดส อัลฟาไพโรน (α-pyrone) และไม่มีการสร้างสีน้ำตาล คุณสมบัติที่ทำให้แยกจุลินทรีย์ตัวนี้ได้คือ ความสามารถในการสร้างเยื่อเหนียวที่สามารถยึดเซลล์ให้รวมกันและให้ผลบวกเมื่อทำการทดสอบเซลลูโลส

Sowdeb (1978) ได้ศึกษาโครงสร้าง และการพัฒนาโคโลนีของ *Acetobacter xylinum* ที่เจริญบนวุ้น ศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เซลล์จะแบ่งล้อมรอบ sheath ของ cellulose microfibrils ซึ่งจากรูปร่างกลมรีคล้ายไข่ก็จะแบนราบลงคล้ายหมอนอิง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปร่างที่ได้นี้เป็นผลมาจากการไหลของเซลล์จากชีท (sheath) เป็นการสร้างรูปร่างขึ้นมาใหม่โดยส่วนของชีท (sheath) ที่ขับของเหลวออกมานอกเซลล์

2.4 ส่วนประกอบของวุ้นน้ำมะพร้าว

น้ำ	94.40 เปอร์เซ็นต์
ไขมัน	0.50 เปอร์เซ็นต์
สารเยื่อใย	1.10 เปอร์เซ็นต์
โปรตีน	0.68 เปอร์เซ็นต์
เถ้า	0.77 เปอร์เซ็นต์
คาร์โบไฮเดรต(คิดจากผลต่าง)	3.00 เปอร์เซ็นต์
แคลเซียม	34.50 มม. ต่อ 100 กรัม
เหล็ก	0.20 มม. ต่อ 100 กรัม
ฟอสฟอรัส	22.00 มม. ต่อ 100 กรัม
วิตามินบี 1	0.01 มม. ต่อ 100 กรัม
วิตามินบี 2	0.06 มม. ต่อ 100 กรัม
ไนอาซีน	0.22 มม. ต่อ 100 กรัม

2.5 การใช้ประโยชน์ของน้ำมะพร้าว

ในสมัยก่อน ๆ ยังไม่อาจที่จะเก็บถนอมรักษาน้ำมะพร้าวอ่อนเพื่อใช้เป็นเครื่องดื่มตามท้องถิ่นได้ นอกจากจะถูกบรรจุอยู่ตามธรรมชาติในกะลามะพร้าว จนกระทั่งถึงเวลารับประทานจึงเจาะรูที่ตาของกะลามะพร้าวเพื่อเอาน้ำมะพร้าวออกมาใช้ แต่ในปัจจุบันนี้มีการถนอมรักษาน้ำมะพร้าวอ่อนโดยการบรรจุกระป๋อง หรือบรรจุถุงพลาสติก เพื่อให้เก็บไว้บริโภคได้เป็นเวลานานๆ และเพื่อความสะดวกในการใช้ประโยชน์ และส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศ

น้ำมะพร้าวอ่อนจะมีรสชาติอร่อย และเป็นที่ยอมรับในการบริโภคมากที่สุดเมื่อผลมะพร้าวมีอายุได้ประมาณ 7 เดือน ภายหลังจากที่มีการผสมเกสร และเริ่มเกิดเป็นผลมะพร้าว น้ำมะพร้าวจะมีปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solids) ประมาณร้อยละ 5 ถ้าใช้ผลมะพร้าวที่มีอายุอ่อนกว่านี้ จะได้น้ำมะพร้าวที่ขาดความหวาน และรสชาติซึ่งจำเป็นจะต้องทิ้งไป แต่ถ้าผลมะพร้าวแก่เกินไปกว่านี้ จะได้น้ำมะพร้าวที่มีรสชาติเปลี่ยนไปไม่ตรงกับรสชาติที่ต้องการ ซึ่งรสชาติที่ต้องการคือ หวาน และมีรสเฝื่อนเล็กน้อย

มะพร้าวอ่อนที่นำมาจำหน่ายเป็นการค้าส่วนใหญ่จะมีเฉพาะแต่ในท้องถิ่นเท่านั้น ถ้าผลมะพร้าวแก่เกินไปจนน้ำมะพร้าวไม่สามารถใช้รับประทานได้ ก็สามารถขูดเอาเนื้อมะพร้าวมารับประทานได้แบบสดๆ เพื่อให้เกิดความสดชื่น ตามปกติแล้วมะพร้าวอ่อนจะจำหน่ายให้แก่ผู้ใช้เสียงในการโฆษณา พ่อค้าจร พ่อค้าขายปลีก ภายหลังที่เก็บจากต้นมะพร้าวแล้วทันที เพื่อนำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำหน่ายตามเมือง ร้านอาหาร สถานีรถไฟ และตามสถานที่ต่าง ๆ ตามแต่จะสะดวกซึ่งก็มีลักษณะการดำเนินการเช่นเดียวกันกับประเทศไทยเรา และประเทศอื่น ๆ ที่สามารถปลูกมะพร้าวได้

น้ำมะพร้าวสามารถใช้ผสมกับนมวัว เพื่อใช้เป็นเครื่องดื่ม และยังใช้ผสมใน น้ำมันละหุ่ง เพื่อใช้ในการล้างเครื่องมือเครื่องใช้ให้สะอาดเป็นมันวาวได้

ประโยชน์ในทางการแพทย์ของน้ำมะพร้าว คือ

1.ใช้ในการรักษาโรคอหิวาต์ ทำลายพวกพยาธิในลำไส้ และใช้บรรเทาอาการปวดท้อง เนื่องจากว่าน้ำมะพร้าวมีปริมาณเกลือ และอัลบูมินสูงตามธรรมชาติอยู่แล้ว

2.ใช้ในการผสมเทียม โดยการนำเอาน้ำมะพร้าวจากมะพร้าวอ่อนมาผสมกับไข่แดงเพื่อใช้เป็นตัวทำให้น้ำเชื้อ (Semen) หมูตัวผู้ เจือจางลงประมาณร้อยละ 30 ในการทดลองนี้ไม่มีความแตกต่างในเรื่องการตายของตัวสเปอร์ม เมื่อสังเกตจากการทำให้เจือจาง 3 ระดับ คือ น้ำมะพร้าวอ่อนบริสุทธิ์ น้ำมะพร้าวอ่อนผสมกับไข่แดงร้อยละ 1 และน้ำมะพร้าวอ่อนผสมกับไข่แดงร้อย 5 ปรากฏว่าประสิทธิภาพในการผสมติดจะสูงในสารละลายเจือจางระดับที่ 1 ประมาณร้อยละ 50 ระดับที่ 2 และที่ 3 ร้อยละ 44.4 และร้อยละ 31.6 ตามลำดับ โดยน้ำเชื้อ (Semen) จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 41 องศาฟาเรนไฮต์ เป็นเวลาประมาณ 8 วัน เป็นอย่างสูง และใช้เวลาเก็บเพียง 2-3 วัน เพื่อให้น้ำเชื้อมีประสิทธิภาพตามผลของการทดลองข้างต้น

3.ใช้ในงานวิจัยทางชีววิทยา โดยน้ำมะพร้าวสามารถที่จะเร่งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เรียกว่า *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเชื้อพวกนี้ตามปกติแล้ว สามารถเจริญเติบโตบนผิวของสารที่ใช้เพาะเชื้อแต่เมื่อเติมน้ำมะพร้าวลงไปใน standard culture media แม้ว่าจะเจือจางประมาณ 10,000 เท่า จะลดเวลาในการให้เจริญเติบโตเต็มที่ลงเหลือเพียง 12 วัน เมื่อเติมน้ำมะพร้าวลงไปซึ่งตามปกติแล้วจะใช้เวลาประมาณ 20 วัน ในการที่จะให้เชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ แต่ถ้าใช้น้ำมะพร้าวเพียงอย่างเดียวจะไม่ได้ผลในกรณีเช่นนี้ น้ำมะพร้าวจะมีผลต่อเชื้อก็ต่อเมื่อเราเติมน้ำมะพร้าวลงไปใน standard culture media ซึ่งปัจจัยที่ส่งเสริมในการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ ได้แก่สารพวกโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ซึ่งมีอยู่ในน้ำมะพร้าว

4.ใช้น้ำมะพร้าวฉีดเข้าเส้นเลือดดำเพื่อเป็นการให้อาหารคนไข้ ซึ่งการทดลองนี้ได้กระทำที่โรงพยาบาลเซนต์หลุยส์ กรุงเทพมหานคร แสดงถึงความเป็นไปได้ในการที่จะใช้น้ำมะพร้าวฉีดเข้าเส้นเลือดดำให้แก่คนไข้ 21 คนจากจำนวนคนไข้ทั้งหมด 26 คน ซึ่งคนไข้ทั้ง 21 คน ไม่เกิดปฏิกิริยารุนแรงแต่อย่างใด

5.ใช้น้ำมะพร้าวในท้องถิ่นทุรกันดารที่ห่างไกล หรือในกรณีฉุกเฉินทางทหารเมื่อการขนส่งน้ำตาล และน้ำเกลือที่ใช้สำหรับฉีดเข้าเส้นเลือดดำหยุดชะงักไป เพราะมีอุปสรรคเกิดขึ้นก็ใช้น้ำมะพร้าวแทนได้ เพราะในน้ำมะพร้าวมีโปแตสเซียมคลอไรด์ (ส่วนประกอบของเกลือ) ฟอสเฟต น้ำตาล แมกนีเซียม แคลเซียม และ โปรตีน รวมอยู่ในน้ำมะพร้าวตามธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปได้ว่า น้ำมะพร้าวมีประโยชน์นานาประการซึ่งนอกจากจะใช้เป็นเครื่องดื่มแล้ว ยังมีประโยชน์ในทางการแพทย์และทางด้านการเกษตรดังกล่าวมาแล้วข้างต้น ช่วยทำให้ร่างกายเรารู้สึกสดชื่น แข็งแรง ถ้าได้บริโภคเป็นประจำ เพราะเป็นเครื่องดื่มที่สะอาดบริสุทธิ์ มีคุณค่าทางโภชนาการ และช่วยในการป้องกัน และบรรเทาโรคภัยไข้เจ็บต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี

นอกเหนือจากน้ำมะพร้าวแล้วการผลิตวุ้นด้วยเชื้อ *Acetobacter xylinum* นี้ อาจใช้วัตถุดิบทางการเกษตรอื่น ๆ ได้อีก เช่น น้ำสับปะรด น้ำอ้อย น้ำตาลปี๊บ น้ำนมสด น้ำกะทิ และน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ เป็นต้น เนื้อวุ้นที่ได้จะมีลักษณะคล้ายกัน อาจจะมีกลิ่นของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตติดมาบ้าง ทั้งนี้ปัจจัยในการผลิตย่อมแตกต่างกันออกไป เช่น ความเข้มข้นของวัตถุดิบ ปริมาณน้ำตาล สารไนโตรเจน และสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้

2.6 เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็กมาก ลักษณะเป็นรูปแท่ง (rod-shaped units) ที่เรียกว่า ไมเซล (micells) บางครั้งประกอบเป็นหน่วยใหญ่จากไมเซล (micells) 10 ถึง 20 หน่วย เป็นไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งโครงสร้างมีลักษณะส่วนใหญ่เป็นผลึก (cystalline) จึงถูกย่อยสลายได้ยาก เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณร้อยละ 45 ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช และสะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ เช่น ฝ้าย มีส่วนประกอบของเซลลูโลสมากกว่าร้อยละ 97-99 จัดว่าเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ ประกอบด้วยสายโพลิเมอร์เรียงขนาน และยึดกันด้วยแรงกระจายตัว (dispersion force) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ภายในโมเลกุลเซลลูโลสจึงยึดติดกันแน่น ทำให้เซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ได้ช้า เพราะสารจะไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลลูโลสได้ ยังพบในสาหร่าย และฟังไจหลายชนิด รวมทั้งในสัตว์ทะเลบางชนิด และเนื่องจากเซลลูโลสสามารถถูกย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อมโดยจุลินทรีย์ จึงเป็นสารประกอบที่มีความสำคัญต่อวัฏจักรคาร์บอน

ในด้านโครงสร้างสายของเซลลูโลสจะต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก โดยเรียงต่อกันเป็นสายตรงที่ไม่มีการแตกกิ่งก้านสาขา จำนวนหน่วยย่อยที่มาต่อขึ้นกับชนิด และอายุของพืช อาจมี 200-15,000 หน่วย หรือเป็นล้านหน่วย คอนฟิกูเลชัน (configulation) ของบีต้า-ดี-กลูโคไพรา-โนส (β-D-glucopyranose) ส่วนใหญ่จะเป็นรูปแบบเก้าอี้ (chair form) (ดังรูปที่ 1) และโมเลกุลของกลูแคนจะมีผิว (surface) เป็นไฮโดรเจนอะตอม โมเลกุลของสายกลูแคนมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) การต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก จึงเกิดแรงที่ทำให้สายกลูแคนหมุนบิดตัวได้ 180 องศา รอบแกน จึงทำให้แต่ละสายมีรูปร่างลักษณะที่เปรียบเสมือนริบบิน (flat ribbon) สายกลูแคนแต่ละสายจะมาเรียงต่อกันเป็นไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งอาจจะม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส หรือม้วนทับกันเป็นเกลียวรอบแกนของเส้นใย จากการเรียงตัวของโมเลกุลของเซลลูโลสดังกล่าวทำให้สามารถแบ่งรูปร่างของเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืชได้

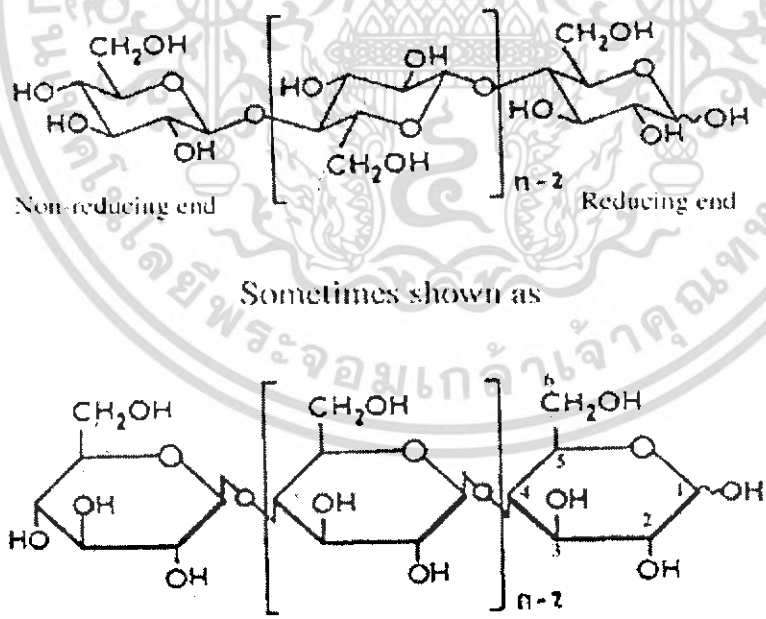
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 แบบที่แตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 2 (Norkrans, 1967) จากการศึกษาโดยใช้เอกซเรย์ดิฟแฟคชัน (x-ray diffraction) พบว่าไมโครโฟบริลบางส่วนจัดตัวอย่างมีระเบียบ (crystalline) แต่บางส่วนจัดตัวไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ซึ่งในธรรมชาติจะมีส่วนที่จัดตัวเป็นระเบียบร้อยละ 85 และส่วนที่ไม่เป็นระเบียบร้อยละ 15 ผนังเซลล์ของพืชจะมีเซลลูโลสจับตัวอยู่เป็นแถบๆไม่ติดต่อกันโดยตลอด แยกโดยช่องว่างเมื่อเซลล์แก่เต็มที่ภายในช่องว่างจะเต็มไปด้วยลิกนินซึ่งมีผลทำให้เซลลูโลสถูกห่อหุ้มด้วยลิกนิน

2.7 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.7.1 จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

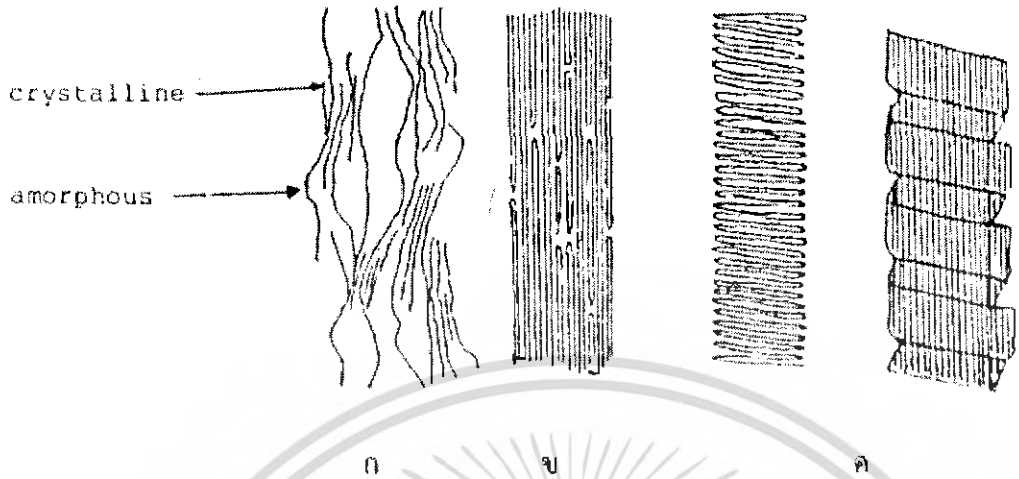
เนื่องจากเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่สลับซับซ้อน และไม่ละลายน้ำจุลินทรีย์จึงไม่สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง ดังนั้นจุลินทรีย์จึงต้องสร้างเอนไซม์หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อทำการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลเล็กลง ละลายน้ำได้ และสามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์ได้ จุลินทรีย์หลายกลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ ทั้งที่เป็นเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสิท โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบว่ากลุ่มของเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสได้ดี ดังแสดงในตารางที่ 1 (Eriksson และคณะ, 1990)



รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส และหน่วยย่อยบีต้า-ดี-กลูโคไพราโนส ที่ต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของหน่วยย่อย บีต้า-ดี-กลูโคไพราโนส กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของหน่วยย่อยถัดไป

ที่มา: www.biologie.uni-humburge.de/b-online/e26/3.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 รูปร่างของโครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์พืชโดยทั่วไป

ก. ฟริงเกิลไมเซล (fringle micelle) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นระเบียบ และที่ไม่เป็นระเบียบ

ข. โครงสร้างของเซลลูโลสที่ม้วน หรือพับไปมาตามแกนของเส้นใย

ค. โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นริบบินหนาเกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้งฉากกับแกนของริบบิน และแถบของริบบินจะม้วนเป็นเกลียว

ที่มา : อมรรัตน์, 2547 อ้างถึง Norkrans, 1967

ตารางที่ 1 เชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

เชื้อรา	เอกสารอ้างอิง
Agaricus bisporus	Manning และWood (1983)
Ascobolus furfuraceus	Wicklow และคณะ (1980a)
Aspergillus aculeatus	Kanamoto และคณะ (1979)
A. fumigatus	Roger และคณะ (1972) และ Jain และคณะ (1979)
A. niger	Ikeda และคณะ (1973), Sternberg และคณะ (1977) และ Hurst และคณะ (1978)
A. phoenicis	Sternberg และคณะ (1977)
A. terreus	Sinha และคณะ (1981) และ Garg และNeelakantan (1982)
A. wentii	Keilich และคณะ (1970)
Botryodiplodia theobromae	Umezurike (1979, 1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา	เอกสารอ้างอิง
Chaetomium cellulolyticum	Chahal และHawksworth (1976), Moo-Young และคณะ (1978) และ Fahnrich และIrrgang (1982)
C. globosum	Keilich และคณะ (1970)
C. thermophile	Romanell และคณะ (1975), Eriksson และGoksooyr (1976) และ Fergus (1969)
Chrysosporium lignorum	Eriksson และRzedowski (1969a, b)
Cladosporium cladosporioides	Lynch และคณะ (1981)
Coriolus versicolor	Highley (1975)
Dichomistus sqalens	Rouau และFoglietti (1985)
Eupenicillium javanicum	Tanaka และคณะ (1981)
Formes fomentarius	Kozlik และSchanel (1974a, b)
Fusarium moniliforme	Matsumoto และคณะ (1974)
F. solani	Wood และMcCrae (1971)
Fusarium sp.	Trivedi และRao (1980, 1981)
Sporotrichum pulverulentum	Eriksson และB. Pettersson (1975a, b), Almin และคณะ (1975), Streamer และคณะ (1975), Deshpande และคณะ (1978) และ Eriksson และHamp (1978)
Sporotrichum thermophile	Fergus(1969), Romanelli และคณะ (1975), Coutts และR.E. Smith (1975), Cancvascini และMeyer (1979), Margaritis และMerchant (1983) และ Grajek (1987)
Talaromyces emersonii	Folan และCoughlan (1981), McHale และCoughlan (1981a) และ Moloney และคณะ (1987)
Thermoascus aurantiacus	Romanelli และคณะ(1975), Tong และคณะ(1980), Sheperd และคณะ(1981), Grajek (1987)
Thraustotheca clavata	Berner และChapman (1977)
Torula thermophile	Fergus (1969) และ Jain และคณะ (1979)
Trichoderma koningii	Iwasaki และคณะ (1964), Wood และMcCrae (1978) และ Halliwell และ Vincent (1983)
T. pseudokoningii	Zhu และคณะ (1982) และ Harrer และคณะ (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา	เอกสารอ้างอิง
T. reesei (viride)	Reese (1956), Mandels และReese (1960), Berghem และคณะ(1976), Ghose (1977), Nishizawa และคณะ (1978), Shoemaker และBrown (1978a), Sternberg และMandels (1979), Ryu และ Mandels (1980), White และBrown (1981), Montenecourt และ คณะ (1981), Fagerstam (1981) และ Bhikhabhai และคณะ (1985)
Trichurus spiralis	Mishra และคณะ (1981)
Volvariella volvacea	Chang และSteinkraus (1982)
Verticillium albo-atrum	Gupta และHeale (1971)

ที่มา : รวบรวมโดย Eriksson และคณะ(1990)

2.7.2 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา

เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตเพื่อการค้านั้นมักเป็นเอนไซม์เซลลูเลสผสมที่สกัดได้จากเชื้อรา ชนิดที่แตกต่างกันไป และให้ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้ องค์ประกอบของอาหาร และสภาวะที่ใช้ในการผลิต การเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส กระทำได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็งขึ้นอยู่กับความเหมาะสม การที่จะให้ผลผลิตเอนไซม์สูง และให้คุณภาพดีนั้นจะต้องมีการควบคุมสภาวะต่างๆให้เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ชนิดอาหารที่ใช้ ต้องเหมาะสม พีเอช การปนเปื้อน รวมทั้งคำนึงถึงราคาต้นทุนในการผลิตด้วย นอกจากนี้การใส่สาร เร่งการเจริญ แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ สารเหนี่ยวนำให้เชื้อผลิต เอนไซม์ก็เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงด้วย สารเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ สารประกอบ เซลลูโลส อนุพันธ์ของเซลลูโลส และสารที่มีพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก เช่น cellobiose, sepharose และ lactose เป็นต้น (Tsao และ Chiang, 1983) การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อรามี รายงานการทดลองไว้ 2 วิธี คือ การผลิตเอนไซม์โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในลักษณะ อาหารเลี้ยงเชื้อ แบบเหลว(submerge culture) และอาหารเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง(solid substrate culture)

การผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสในกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว

การผลิตเอนไซม์แบบอาหารเหลว ได้แก่ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยนำเชื้อรามาเลี้ยงใน อาหารสังเคราะห์ชนิดเหลว (liquid synthetic medium) เช่น อาหาร Eggins & Pugh medium (Bravery, 1968) หรืออาหาร Mandels & Sternberg medium (Mandels และ Sternberg, 1979) และ อาหาร M4-medium (Desai และคณะ, 1982) เป็นต้น ข้อได้เปรียบของการผลิตแบบอาหารเหลวนี้ สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อได้ดี และง่ายต่อการควบคุมการ ปนเปื้อนจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมเป็นแหล่งอาหารสำหรับการผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์เป็นแนวทางหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิต และเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ การผลิตเอนไซม์โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมเป็นแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อมีทั้งในสภาพการหมักแบบอาหารแข็ง และการหมักในสภาพอาหารเหลว ข้อได้เปรียบของการหมักในสภาพอาหารเหลวเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบอาหารแข็ง คือ สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในระหว่างกระบวนการหมักได้ดีและง่ายกว่า อย่างไรก็ตามการหมักแบบอาหารแข็งมีข้อดีเหนือกว่าการหมักในสภาพอาหารเหลว คือ สามารถให้ผลผลิตต่อหน่วยวัสดุหมักสูงกว่า ไม่ค่อยพบปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปของสปอร์จึงไม่จำเป็นต้องใช้ถังเตรียมเชื้อเริ่มต้น(sced tank) เทคนิคการให้อากาศในวัสดุหมักทำได้ง่ายกว่าในสภาพการหมักแบบอาหารเหลว นอกจากนั้นการหมักแบบอาหารแข็งซึ่งเป็นการเจริญของจุลินทรีย์บนวัสดุแข็งที่ไม่มีน้ำในรูปอิสระ แต่จะอยู่ในลักษณะดูดซึมนั้นจะเหมาะสมกับเชื้อรา ซึ่งมีความสามารถในการชอนไชไปตามวัสดุหมักอันมีผลทำให้สามารถสัมผัสกับอาหารได้อย่างใกล้ชิด มีผลทำให้การสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่า เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งได้ แสดงดังตารางที่ 2

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งนั้น นอกเหนือจากการขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น ปัจจัยทางกายภาพ องค์ประกอบของอาหาร ตลอดจนการสร้างสปอร์ของเชื้อรา ดังนี้คือ

ปัจจัยทางกายภาพ (Physical factor)

ปัจจัยทางกายภาพเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ควบคุมการหมักแบบอาหารแข็ง ปัจจัยเหล่านี้ได้แก่ อัตราการไหลเวียนของอากาศ ความชื้นของวัสดุหมัก ขนาดและรูปร่างของวัสดุหมัก ปริมาณของวัสดุหมัก และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง วัสดุหมักที่มีขนาดเหมาะสมจะมีพื้นที่ผิวให้จุลินทรีย์เกาะได้มาก แต่ถ้ามีขนาดเล็กเกินไปจะทำให้เกิดปัญหาการถ่ายเทอากาศได้ไม่ดี ความชื้นและอุณหภูมิเป็นปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญที่สุดในการควบคุมระบบการหมักแบบอาหารแข็ง โดยเป็นปัจจัยควบคุมการสร้างเอนไซม์ การไหลเวียนอากาศจะเปลี่ยนแปลงไปพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงความชื้นของวัสดุหมัก

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในสภาพการหมักแบบอาหารแข็งแหล่งธาตุอาหารเป็นปัจจัยที่จำกัดการเจริญและกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ วัสดุที่นำมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส นอกจากจะต้องเป็นวัสดุที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบแล้ว ธาตุอาหารอื่นๆ เช่น ปริมาณโปรตีน และน้ำตาลที่มีอยู่ในวัสดุหมัก ตลอดจนความสามารถในการนำสารอาหารมาใช้โดยจุลินทรีย์ก็เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ด้วยวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถใช้เป็นวัสดุเพื่อการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส เช่น รำข้าวสาลี ซังข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าว กากถั่วเหลือง และอื่นๆ

ปัจจัยจากการสร้างสปอร์

นอกจากปัจจัยทางกายภาพ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญ และการสร้างเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของเชื้อราก็มีผลต่อการเจริญ และการสร้างเอนไซม์เช่นกัน (Xia และ Shen, 2003)

ตารางที่ 2 เชื้อราที่สร้างเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

เชื้อรา	เอนไซม์ที่สร้าง	เอกสารอ้างอิง
Allescheria terrestris	exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase	Grajek, 1987
Aspergillus fumigatus	Cellulose, carboxymethylcellulase	น้อย, 2529
A. niger	Cellulase	Pathak และ Ghose, 1973
A. phoenicis	β -glucosidase	Deschamps และ Huet, 1984
Mucor pusillus	exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase	Grajek, 1987
Penicillium sp.	Cellulase	Metanguiham และคณะ, 1985
Pestalotiopsis versicolor	Cellulase	Rao และคณะ, 1983
Sporotrichum cellulophilum	Cellulase	Kim และคณะ, 1985
S. thermophile	exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase	Grajek, 1987
Trichoderma harzianum	Cellulase	Deschamps และคณะ, 1985
T. reesei	Cellulase, β-glucosidase	Kim และคณะ, 1985
T. viside	Cellulase	Pathak และ Ghose, 1973

ที่มา: วิเชียร, 2532

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 ระบบเอนไซม์เซลลูเลส

2.8.1 การย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose hydrolysis)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นผลึก หรือเป็นลิเนียโฮโมโพลิเมอร์ (linear homopolymer) ของกลูโคสที่จับกันด้วยพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก ซึ่งยากต่อการย่อยสลาย นอกจากนี้โดยธรรมชาติจะมีลิกนินจับเป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยาการย่อยสลาย

การย่อยสลายเซลลูโลสทำได้ 2 วิธี คือ

1.วิธีการทางเคมี หรือการย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง (acid hydrolysis) เช่น กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งต้องทำภายใต้อุณหภูมิสูง วิธีนี้มีข้อจำกัดในการแยกน้ำตาลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ออกจากกรด และเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ

2.วิธีการทางชีวภาพ หรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymic hydrolysis) ปฏิกิริยาการย่อยจะเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง คือ ที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันบรรยากาศ เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะต่อเซลลูโลส จึงไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ และการสูญเสียกลูโคสระหว่างการเกิดปฏิกิริยา

การย่อยเซลลูโลสขั้นต้นเกิดจากการที่โมเลกุลถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์จะย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ แต่ข้อจำกัดในการทำงานของเอนไซม์เกิดจากการที่สับสเตรตละลายน้ำได้น้อย เมื่อย่อยได้อนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose derivative) ก็จะถูกย่อยต่อ ผลจากการย่อยได้โมโนแซคคาไรด์หรือไดแซคคาไรด์ ผลผลิตจากขั้นตอนต่อมาของการย่อยจะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ พวกจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศจะสลายน้ำตาลได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนจุลินทรีย์พวกที่ไม่ใช้อากาศจะสลายได้กรดอินทรีย์ และแอลกอฮอล์

เนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้น จุลินทรีย์จึงต้องขับเอนไซม์ออกสู่นอกเซลล์เพื่อย่อยเซลลูโลสจนได้น้ำตาลที่ละลายน้ำ แล้วดูดซึมสู่ภายในเซลล์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนใช้ในกิจกรรมของเซลล์ต่อไป

2.8.2 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เป็นกระบวนการย่อยสลายที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง เอนไซม์จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ที่ปนเปื้อนมา ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง และปฏิกิริยาไม่รุนแรงซึ่งเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกรวมว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก ภายในโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส หน่วยเล็กที่สุดหากการย่อยสลายสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เซลลูเลส
ที่มา: www.tamu.edu/.../c-density-history/e-density.htm

จากการศึกษาระบบของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase system) โดยการแยกเอนไซม์เซลลูเลส แต่ละชนิดให้บริสุทธิ์นั้น ทำให้สรุปการจัดระบบของเอนไซม์เซลลูเลสได้ว่า ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม ตามระบบการจัดจำแนกเอนไซม์ (Enzyme Classification (E.C.)) ดังนี้

1. เอนโดกลูคาเนส หรือเอนโด-บีต้า-1,4-กลูคาเนส (E.C. 3.2.1.4)

ทำหน้าที่ ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ(amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ ของเซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) เซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกรดฟอสฟอริก (phosphoric swollen cellulose) ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) และเซลโลโอลิโกเมอร์ (cello-oligomers) โดยตัดย่อยที่ตำแหน่งพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่ม (random) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิดคือเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligo- saccharides) เซลโลเพนตาโอส (cellopentaose) เซลโลเตตระโอส (cellotetraose) เซลโลไตรโอส(cellotriose) เซลโลไบโอส (cellobiose) และกลูโคส โดยจะได้ผลิตภัณฑ์หลักใดขึ้นอยู่กับสมบัติของแต่ละเอนไซม์

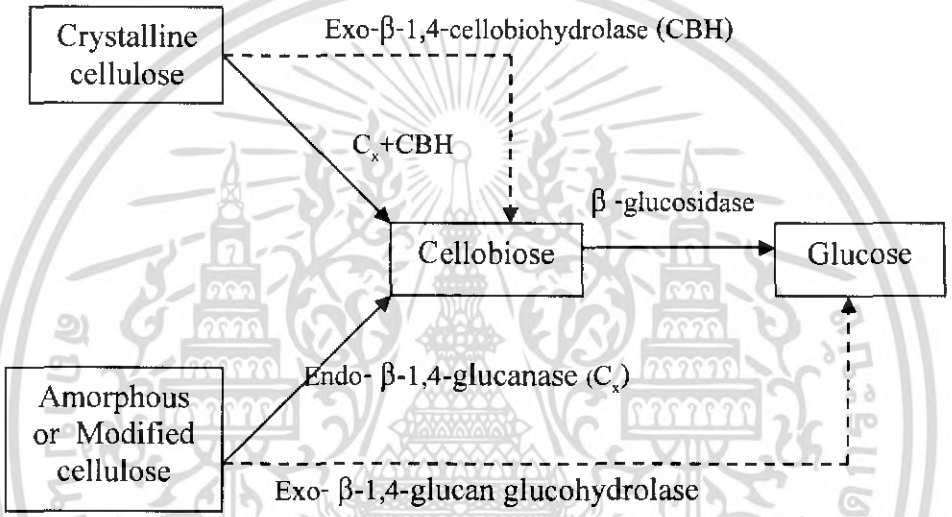
2. เอกโซกลูคาเนส หรือเอกโซ-บีต้า-1,4-กลูคาเนส หรือเอกโซบีต้า-1,4-กลูแคนกลูโคไฮโดรเลส หรือเอกโซบีต้า-1,4-เซลโลไบโอไฮโดรเลส (E.C. 3.2.1.91) พบว่ามักทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยจะย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ของสายเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบ (microcrystalline cellulose) ได้โดยอาศัยการทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เอนไซม์บีต้า-1,4-กลูโคไซเดส (E.C. 3.2.1.21)

เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรง

กลไกการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในส่วนที่เป็นระเบียบ (crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดร่วมกันแสดงเป็นแผนภูมิได้ดังรูปที่ 4 (อมรรัตน์, 2547 อ้างถึง Fan และ Lee, 1983)



รูปที่ 4 กลไกการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส
ที่มา: Fan และ Lee, 1983 อ้างโดย อมรรัตน์, 2547

ในธรรมชาติมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ เช่น สัตว์ทะเลในกลุ่มเพรียงหัวหอม (tunicate) หอยทากยักษ์ (Achatina fulica) และจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งที่เป็นโปรโตซัว แบคทีเรีย แอคติโนมัยสิท และเชื้อรา จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสมีความสามารถในการย่อยสลายแตกต่างกันขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์เหล่านั้นเจริญอยู่ พบว่าเชื้อรา (cellulolytic fungi) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ เซลลูเลสได้ในปริมาณที่มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เอนไซม์เซลลูเลสส่วนใหญ่เป็นชนิดเอกซ์ตราเซลลูลาร์เอนไซม์ (extracellular enzyme) คือ เซลล์ปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ทำให้สะดวกต่อการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายเซลลูโลส และสะดวกต่อการนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ในการศึกษาหรือใช้ในอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.3 การยับยั้งการสร้างและการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ในการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส จะมีการยับยั้งการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลส 2 แบบคือ การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive) และการยับยั้งแบบแข่งขัน (completitive) สารที่ทำให้เกิดการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive) ได้ ได้แก่ เซลโลไบโอส และกลูโคส สารที่ทำให้เกิดการยับยั้งแบบแข่งขัน (completitive)โดยจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์บีต้า1,4-กลูโคซิเดส ได้แก่ กลูโคส ทั้งนี้พบการยับยั้งได้แม้แต่ในอาหารที่มีการเติมตัวเหนี่ยวนำ (Fan และ Lee, 1983; Moo-Young และคณะ, 1983)

Duff และคณะ (1996) สรุปว่า เอนไซม์เซลลูเลสแต่ละตัวจะถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากการย่อยสลาย กล่าวคือ กิจกรรมของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสจะถูกยับยั้งโดยเซลโลไบโอส เช่นเดียวกับกิจกรรมของเอนไซม์ บีต้า-กลูโคซิเดสที่ถูกยับยั้งโดยกลูโคสซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้รุนแรง ส่วนลักษณะการยับยั้งจะเป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน (completitive inhibition)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบพอลลาเดียม (palladium) ก็เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์อย่างรุนแรง โดยมีรายงานว่าสารพอลลาเดียม (palladium) นี้ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส และเอนโดกลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* และลักษณะการยับยั้งจะเป็นแบบที่เรียกว่า irreversible inhibition อย่างไรก็ตามสามารถป้องกันการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์วิธีนี้ได้โดยการเติมกรดอะมิโนชนิดฮิสทิดีน ซิสเทอีน หรือซิสทีนลงไปในสารละลายผสมได้ (reaction mixture)

2.9 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Takashima และคณะ, 1996)

เซลลูเลส (cellulase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลสซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมด้วยพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic) ซึ่งพบมากในส่วนต่างๆ ของพืชและยังพบอยู่ร่วมกับพอลิเมอร์อื่นๆ ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส เพคติน และลิกนิน

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส นิยมวัดเป็นอัตราการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์นี้ ซึ่งวิธีการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย คือ วิธีดีเอ็นเอส (DNS method) เนื่องจากขั้นตอนการทำง่ายและใช้สารเคมีน้อย

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีนี้ทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์สุดท้ายแล้วเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่วัดค่าการดูดกลืนแสงเดียวกัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวิธี DNS นี้อาจลดลงเนื่องจากออกซิเจนที่ละลาย (dissolved oxygen) รบกวนการออกซิไดส์ของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งมีการปรับปรุงสาร DNS โดยการเพิ่มซัลเฟต ซึ่งจะช่วยลดปริมาณออกซิเจนที่ละลาย โดยไม่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
67307

2.10 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส และจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส

ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์เซลลูเลส หรือจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสได้ในอุตสาหกรรม และเกษตรกรรม เช่น ในการใช้ในการสลายพืชผัก และกากเหลือจากการเกษตรกรรม การย่อยขยะเป็นปุ๋ยหมัก เป็นต้น ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ ได้แก่

1. อุตสาหกรรมกระดาษ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสบางชนิดที่เหมาะสมมีส่วนช่วยลดเวลาในการตี (beating time) และช่วยต้านไข (grease resistance) ทำให้กระดาษมีคุณภาพดี

2. ใช้ในกระบวนการน้ำผักกระป๋อง

3. ใช้ในการสกัดน้ำผลไม้เปรี้ยว และทำให้ใส (extraction and clarification of juice) แล้วยังทำให้น้ำผลไม้ที่ได้เป็นเนื้อเดียวกัน

4. เอนไซม์เซลลูเลสนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในส้วมถังเกรอะ(septic tank)

5. เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* ช่วยสลายผนังเซลล์พืช ทำให้มีการเชื่อมโปรโตพลาสต์ (protoplast) ของเซลล์พืชสองชนิด ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์ที่มีค่ายิ่งต่อวงการเกษตรแผนใหม่

6. ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม เป็นต้น

7. ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์

8. ใช้ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากเมล็ดธัญพืช

9. ใช้จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ยหมัก

10. นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาผลิตเป็นยาอีกด้วย โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นช่วยเป็นยาขับลมในกระเพาะ และช่วยลดอาการแน่นท้อง เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสไปย่อยเส้นใยได้

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Sibtain และคณะ (2003) ศึกษาการชักนำการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase) และเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ด้วยเชื้อ *Trichoderma harzianum* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน พบว่า กลูโคสจะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ ขณะที่ไซแลน (xylan) และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) จะสามารถชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสจะมีค่ามากสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Vogel' medium ที่มีพีเอช 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในสภาวะที่มีการเขย่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ikram-ul-Haq และคณะ (2001) ที่พบว่าพีเอช 5.5 จะทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงสุด

Eslerbaur และคณะ (1991) พบว่าที่อุณหภูมิ 15 ถึง 28 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesei* เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ส่วนอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ ซึ่งเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับรายงานของ Gomes และคณะ (1992) ที่เลี้ยงเชื้อ *Trichoderma viride* Bt 2169 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลส โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 31.1 องศาเซลเซียส สามารผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด

จากบทความวิจัยของรัตนะ ชังวัดดี และคณะ (2545) พบว่าเชื้อรา *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดเมื่อใช้อาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก Mendels และคณะ(1976) ที่ปรับพีเอช 4.0 ถึง 4.5 มียีสต์สกัด (yeast extract) เข้มข้นร้อยละ 0.4 เป็นแหล่งไนโตรเจน เซลลูโลสของแบคทีเรียเข้มข้นร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณสปอร์เชื้อรา 8×10^{8} สปอร์ต่อกรัมวัสดุหมัก โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตได้แสดงกิจกรรมสูงสุดซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ D' Sousa และVolfava (1982) ที่พบว่าเชื้อ *Aspergillus terreus* สามารถผลิดเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดที่พีเอช 5.0

Roman และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคไซเดสโดยเชื้อ *Chaetomium erraticum* สำหรับเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสและบีต้ากลูโคไซเดสจะเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่า (shake condition) ส่วนเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจะเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่ง (static condition) โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่า เอนไซม์ทั้งสามชนิดผลิตได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชอยู่ในช่วง 5.0 ถึง 10.0 โดยใช้คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (CMC) เป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึง 2

ถ้าเป็นเชื้อ *Chetomium* สายพันธุ์อื่น จะมีอุณหภูมิที่เหมะสมคือ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส และพีเอชอยู่ในช่วง 4.0 ถึง 5.0 (Fahnrich และ Irrgang, 1982; Lakshmikant และ Mathur, 1990)

ในการผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสและเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส โดยเชื้อ *Neurospora crassa* พีเอชที่เหมาะสมคือ 6.0 ส่วนการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส พีเอชที่เหมาะสมคือ 7.0 (Yazadi และคณะ, 1990) ส่วนเชื้อราชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะเชื้อ *Trichoderma* และ *Aspergillus* spp. พีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 3.4 ถึง 6.3 (Shewale และ Sadana, 1981; Ortega, 1990)

Rao และคณะ (1982) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Pestalotiopsis vesicolor* เป็นเวลา 7 วันในอาหารเหลวที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในส่วนของเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส และบีต้ากลูโคซิเดสสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช 5.0 ขณะที่เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช 4.5 โดยพบว่าเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด รองลงมาคือ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส ตามลำดับ

Rao และคณะ (1983) ศึกษาพบว่า เชื้อ *Pestalotiopsis vesicolor* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 3 เท่าของการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว โดยเอนไซม์บีต้ากลูโค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิเดสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมา คือ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส ตามลำดับ โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

จากรายงานของ Maria และคณะ(1996) พบว่าเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. สามารถยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์บางชนิดได้ เช่น *Candida albicans, Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* และพบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไลเปสได้ โดยเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในอาหารเหลวที่สภาวะพีเอช 7.0 โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Shimasu รุ่น UV1610

ตู้อบความร้อน (hot air oven) Memmert Model 600

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator shaker) GALLENKAMP

เครื่องปั่นเหวี่ยง Hermle Model Z383K

หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) Harvey Model Hydroclave MC10

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง SHIMADZU LIBROR EB-4000H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Metter-toledo Model AG204

เครื่องอังน้ำอุ่น (water bath) Memmert

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง Dever instrument Model 215

เครื่องแก้ว (ฟลาสก์ หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ ฯลฯ)

อุปกรณ์วัดปริมาตร (ปิเปต ไมโครปิเปต กระบอกตวง ฯลฯ)

ลวดเขี่ยเชื้อ

3.2 สารเคมีที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

Urea	กรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก
$(NH_4)_2SO_4$	คาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส (CMC)
KH_2PO_4	โซเดียมไฮดรอกไซด์
$CaCl_2$	โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรด
$MgSO_4.7H_2O$	โซเดียมคลอไรด์
Peptone	ซิเตรตบัฟเฟอร์
Yeast extract	ฟีนอล
$FeSO_4.7H_2O$	น้ำตาลกลูโคส
$MnSO_4$	เซลลูโลส
$ZnSO_4$	สีคองโกเรด
$CoCl_2$	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

ขั้นตอนการดำเนินงาน แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ ดังนี้

3.3.1 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด

3.3.1.1 นำ stock culture ของเชื้อราที่มีอยู่มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA บ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร

3.3.1.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ PDB ผสมกับวุ้นมะพร้าวร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.3.1.3 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.1.1 มาเจาะให้เป็นชิ้นกลมๆ ด้วยคอร์กบอยเลอร์ จำนวน 3 ชิ้น แล้วนำไปใส่ในฟลาสก์ที่ได้จากข้อ 3.3.1.2

3.3.1.4 นำฟลาสก์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 5 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อออกมา

3.3.1.5 แบ่งน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ออกเป็น 2 ส่วน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงปริมาณ

1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบเอนไซม์เซลลูเลส โดยมีเซลลูโลสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน

1.2 นำคอร์กบอยเลอร์เจาะอาหารเพื่อให้มีหลุมสำหรับใส่น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.1.5 ปริมาณหลุมละ 5 ไมโครลิตร จำนวน 3 หลุมต่อเชื้อแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

1.3 นำมาย้อมสีด้วยคองโกเรดที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 นาน 15 นาที ล้างออกด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น (NaCl) 1 โมลาร์ นาน 10 นาที ทำการวัดขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น

1.4 วัดขนาดวงใสและเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราแต่ละชนิด

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงคุณภาพ

2.1 วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยวัดเป็นอัตราการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยใช้วิธีดีเอ็นเอส (DNS method) (Ghose, 1987)

3.3.1.6 ทำการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแต่ละชนิดที่ได้จากการวิเคราะห์เชิงปริมาณ และเชิงคุณภาพ

3.3.1.7 คัดเลือกเชื้อราที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด เพื่อนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

3.3.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตรอาหารของแมนเคล (Bollok และ Reczey, 2000)

3.3.2.2 ศึกษาปริมาณของเซลลูโลส (วุ้นมะพร้าว) ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้ความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2 , 3 , 4 , 5 และ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.3.2.3 ศึกษาชนิดและปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจน โดยแปรผันสารอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน และยูเรีย โดยแปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจนจากสูตรอาหารของแมนเคล

3.3.2.4 ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปรับระดับพีเอช ที่ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 โดยใช้ NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1.ผลการคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงปริมาณโดยทำการวัดขนาดวงใสด้วยการย้อมสีคองโกเรดความเข้มข้นร้อยละ 0.1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยวัดอัตราการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method) ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้เชื้อราทั้งหมด 43 สายพันธุ์ ได้ผลดังตารางที่ 3 ซึ่งจะเห็นว่าขนาดวงใส และกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราทั้ง 43 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่มีค่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติ แต่จะมีเชื้อราสายพันธุ์ MC 29, MC 26 และ MC 20 ที่มีขนาดวงใส และกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสมากกว่าเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆ คือ มีขนาดวงใสเท่ากับ 5.0, 3.0 และ 2.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ และมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 8.5667, 4.9900 และ3.9600 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพจะเห็นว่าให้ผลสอดคล้องกัน ดังนั้น จึงนำเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์มาทำการศึกษาขั้นต่อไป เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่ต้องการเพียงสายพันธุ์เดียว

4.2 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือก

4.2.1 ผลศึกษาปริมาณของเซลลูโลส (วุ้นมะพร้าว) ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การศึกษาหาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยนำเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลงของแมนเดล และกำหนดปริมาณของแหล่งคาร์บอนเป็นร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 3, 4 และ 5 ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงทำการเก็บส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงคุณภาพ จากการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติพบว่า เชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง แสดงดังรูปที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

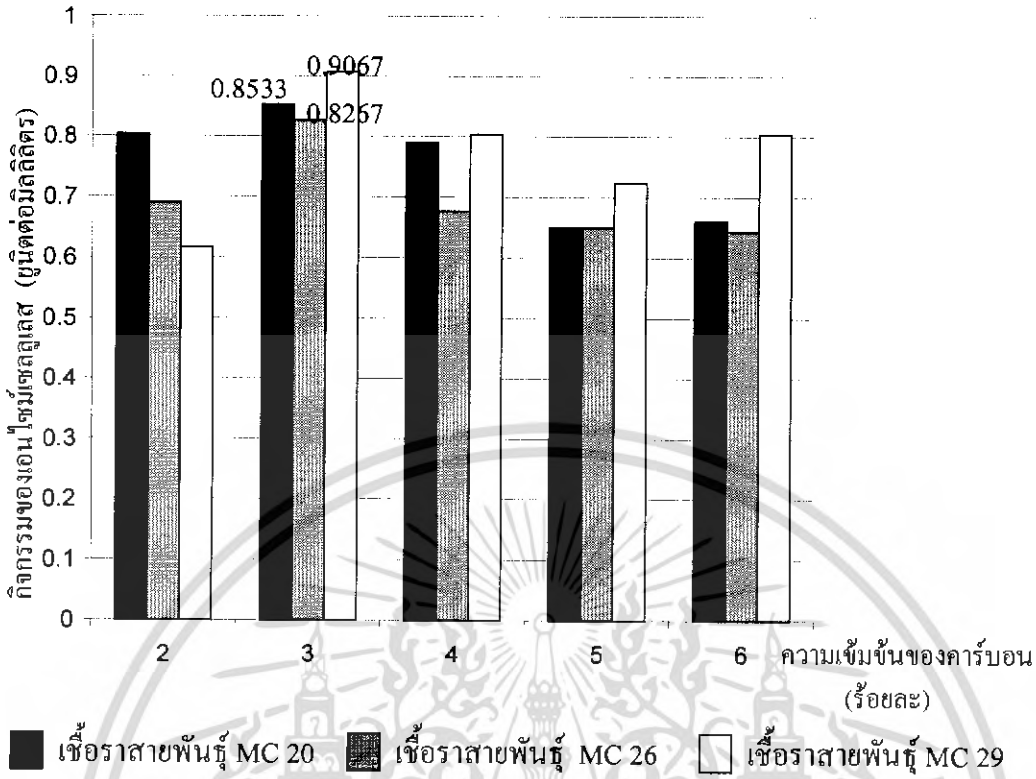
ตารางที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพของเชื้อรา 43 สายพันธุ์ในการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีวุ้นมะพร้าวเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน

สายพันธุ์รา	ขนาดวงใส (มม.)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	สายพันธุ์รา	ขนาดวงใส (มม.)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
MC1	<1.0	0.0967^{j}	MC 23	<1.0	0.0733^{j}
MC 2	<1.0	0.0833^{j}	MC 24	<1.0	0.0733^{j}
MC 3	<1.0	0.1033^{j}	MC 25	<1.0	0.1233^{j}
MC 4	<1.0	0.1200^{j}	**MC 26**	**3.0**	**4.9900^{b}**
MC 5	<1.0	0.1200^{j}	MC 27	<1.0	0.2433^{j}
MC 6	<1.0	0.1033^{j}	MC 28	<1.0	1.7733^{f}
MC 7	<1.0	0.0700^{j}	**MC 29***	**5.0**	**8.5667^{a}**
MC 8	1.0	2.2167^{c}	MC 30	<1.0	0.0967^{j}
MC 9	<1.0	0.1300^{j}	MC 31	<1.0	0.9133^{h}
MC 10	<1.0	0.1467^{j}	MC 32	<1.0	0.3167^{j}
MC 11	<1.0	0.1933^{j}	MC 33	<1.0	0.1167^{j}
MC 12	<1.0	0.0867^{j}	MC 34	<1.0	0.0933^{j}
MC 13	<1.0	0.1200^{j}	MC 35	<1.0	0.0900^{j}
MC 14	<1.0	0.0733^{j}	MC 36	<1.0	0.1233^{j}
MC 15	<1.0	0.0767^{j}	MC 37	<1.0	0.1000^{j}
MC 16	<1.0	0.2033^{j}	MC 38	<1.0	0.7167^{ih}
MC 17	2.0	3.0867^{d}	MC 39	<1.0	0.7700^{ih}
MC 18	<1.0	1.8533^{f}	MC 40	<1.0	0.1033^{j}
MC 19	<1.0	0.0667^{j}	MC 41	<1.0	1.3467^{g}
MC 20	**2.0**	**3.9600^{c}**	MC 42	<1.0	0.0900^{j}
MC 21	<1.0	0.6067^{i}	MC 43	<1.0	0.0933^{j}
MC 22	<1.0	0.0600^{j}			

* สายพันธุ์อ้างอิง

หมายเหตุ ในแต่ละคอลัมน์ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนต่างๆในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC20, MC 26 และ MC 29 ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 5 จะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 3 เชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ จะมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสดีกว่าที่ความเข้มข้นของคาร์บอนอื่นๆ โดยเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด คือ 0.9067 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ เชื้อราสายพันธุ์ MC 20 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.8533 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเชื้อราสายพันธุ์ MC 26 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.8267 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ MC 26 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแตกต่างกับเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสไม่แตกต่างกับเชื้อราสายพันธุ์ MC 26 และเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ดังนั้น เชื้อราสายพันธุ์ MC 20 จึงจัดเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด จากนั้นจึงนำเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 มาศึกษาชนิดและปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

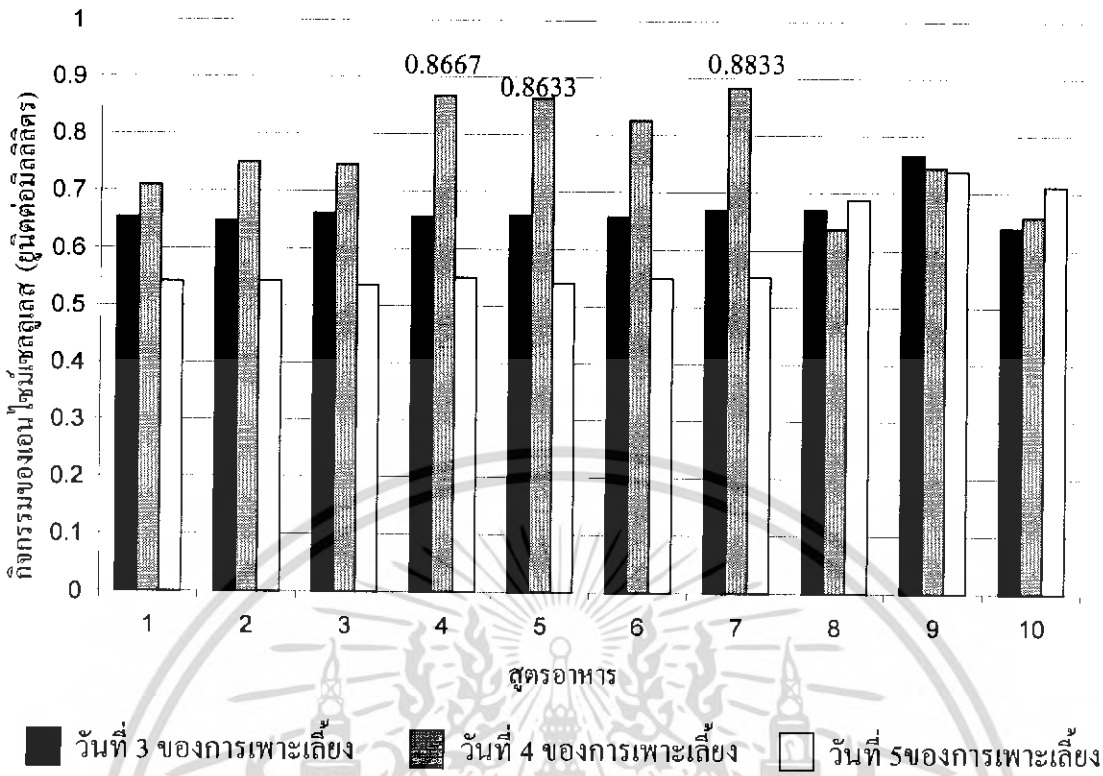
4.2.2 ผลการศึกษาชนิด และปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลงชนิด และปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจนจากสูตรอาหารของแมนเดล ทั้งหมด 10 สูตร (ตารางที่ 4) โดยใช้ความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 3 เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 3, 4 และ 5 ของการเพาะลี้ยง ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงทำการเก็บส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงคุณภาพ ได้ผลดังรูปที่ 6 พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติจะพบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4, 5 และ 7 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเป็น 0.8667, 0.8633 และ 0.8833 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 5 เนื่องจากใช้แร่ธาตุปริมาณต่ำสุด ซึ่งน่าจะมีต้นทุนต่ำสุดด้วย นั่นคือ ใช้เปปโตน 0.75 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 0.3 กรัมต่อลิตรและยีสต์สกัด 0.1 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน จากนั้นศึกษาหาสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิดเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

ตารางที่ 4 สูตรอาหารดัดแปลงชนิดและปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจนจากสูตรอาหารของแมนเดล

แหล่งไนโตรเจน / สูตรอาหาร	เปปโตน (กรัมต่อลิตร)	ยูเรีย (กรัมต่อลิตร)	ยีสต์สกัด (กรัมต่อลิตร)
1	0.75	0.30	0.25
2	0.5	0.30	0.25
3	1.00	0.30	0.25
4	**0.75**	**0.30**	**0.40**
5	**0.75**	**0.30**	**0.10**
6	0.75	0.20	0.25
7	**0.75**	**0.40**	**0.25**
8	0.75	0.00	0.00
9	0.00	0.00	0.25
10	0.00	0.40	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



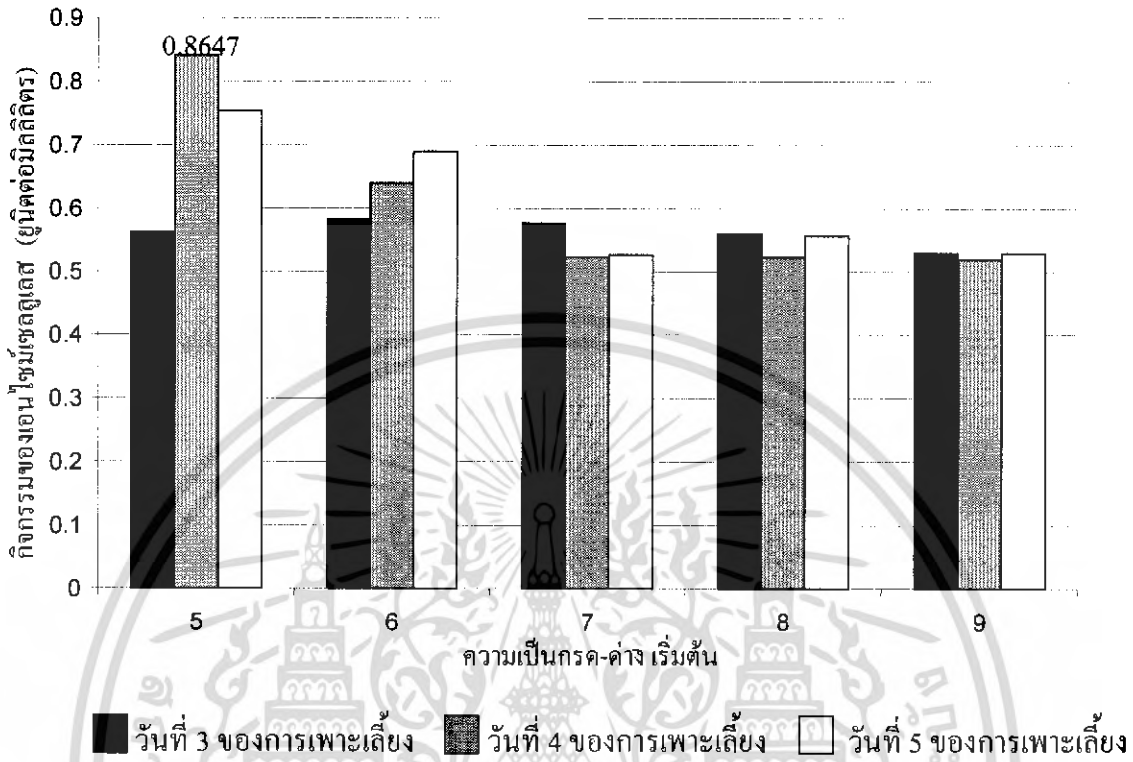
รูปที่ 6 สูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.2.3 ผลการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลงจากสูตรอาหารของแมนเดล ที่สภาวะความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 3 มีเปปโตน 0.75 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 0.1 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 0.3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 3, 4 และ5 ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงทำการเก็บส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงคุณภาพ ได้ผลดังรูปที่ 7 จะเห็นว่าเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.0 ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสมีค่าเท่ากับ 0.8647 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ในทางสถิติ พบว่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 5.0 นั้นแตกต่างกับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อค่าอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 5.0 จึงจัดเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 จากนั้นจึงทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่สภาวะต่างๆ ที่ทดลองได้อีกครั้งหนึ่ง



รูปที่ 7 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ในวันที่ 3, 4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.2.4 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลงจากสูตรอาหารของแมนเคล ที่สภาวะความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 3 มีเปปโตน 0.75 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 0.1 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 0.3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 แล้วนำไปทำการเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงทำการเก็บส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงคุณภาพ พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.8651 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่เก็บรักษาไว้ (stock culture) 43 สายพันธุ์ เมื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เชิงปริมาณโดยใช้อาหาร PDA medium พบว่าเชื้ออ้างอิง *Trichoderma reesei* TISTR3080 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางยาว 5.0 มิลลิเมตร รองลงมาคือเชื้อ *Trichoderma* sp. และเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางยาว 3.0 และ 2.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เชิงคุณภาพโดยใช้วิธีดีเอ็นเอส (DNS method) พบว่าเชื้อ *Trichoderma reesei* TISTR3080 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดเช่นเดียวกัน โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 8.5667 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเชื้อ *Trichoderma* sp. และเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 4.9900 และ 3.9600 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำเชื้อราทั้ง 3 ชนิด มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของแมนเดล เป็นเวลา 5 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 3 โดยเชื้อ *Trichoderma reesei* TISTR3080 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.9067 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และเชื้อ *Trichoderma* sp. มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.8533 และ 0.8267 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธีทางสถิติของเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ ข้างต้น พบว่า เชื้อ *Pestalotiopsis* sp. มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ไม่แตกต่างกันในทางสถิติกับเชื้อ *Trichoderma reesei* TISTR3080 ดังนั้น เชื้อ *Pestalotiopsis* sp. จึงถูกคัดเลือกให้เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 5 ซึ่งมีเปปโตน 0.75 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 0.3 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 0.1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด คือ 0.8633 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อนี้มีค่าเท่ากับ 5 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.8647 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของแมนเดล ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 3 มีเปปโตน 0.75 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 0.3 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 0.25 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.8651 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ (Maria และคณะ, 2005; Saiaomorn, 2002; Sutheera, 2002) แต่สามารถผลิตได้ในปริมาณน้อย โดยพบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสได้ดีกว่าเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเซลโลไบโอไฮโดรเลส (Rao และ Mithal, 1982) และพบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตสารชนิดหนึ่งที่เรียกว่าแทกซอล (taxol) ออกมาจากเส้นใย (Strobel และคณะ, 2005) ซึ่งสารชนิดนี้เป็นสารที่มีความสำคัญในการนำมาทำเป็นยาต่อต้านโรคมะเร็ง (Strobel และคณะ, 2006) โดยเฉพาะโรคมะเร็งเต้านมและมะเร็งมดลูก (Anneke, 2005)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้น้อยมาก จึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม แต่เชื้อนี้สามารถผลิตสารที่สามารถนำมาทำเป็นยาได้ จึงควรนำเชื้อนี้ไปศึกษา และพัฒนาในด้านการแพทย์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จตุรงค์ พิญพร. 2544. การศึกษาการผลิตเครื่องดื่มเวย์ผสมวุ้นน้ำมะพร้าว. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี. 2535. ปัจจัยสำคัญในการผลิตวุ้นสวรรค์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. คณะทรัพยากรธรรมชาติ. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร : 44.

ปิยะมาศ สระบัว. 2547. การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมการแปรรูปไม้เพื่อผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรรณทิพา ธงทอง. 2547. การโคลนนิ่งยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิเชียร สีสุข. 2532. การย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. น.5-22.

สมคิด ธรรมรัตน์. 2531. การผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวและการแปรรูป. วารสารอาหาร. 18, 4 (ตุลาคม - ธันวาคม) : 250–262.

อัจฉรา แสงอุทัย. 2536. การผลิตเห็ดวุ้นน้ำมะพร้าวในเชิงพาณิชย์. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

Africa, T. K. 1949. The production of nata from coconut water. Unitas 22 : 61-105.

Avgerinos, G. C. and Wang, D. I. C. 1983. Seleetive solvent delignification for fermentation enhancement. Biotech. Bioeng. 25 : 67-83.

Cowling, E. B. and Kisk, T. K. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrate for cnzymatic conversion process. Bioteeh. Bioeng. 6 : 95-123.

Duff, S. J. B. and Murray, W. D. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol : a review. Bioresour. Technol. 55, 1–33.

Eriksson, K. E. L., Blaschette, R. A. and Ander, P. 1990. Microbial and enzymatic Degradation of Wood and Wood Component. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 407pp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Esterbauer, H., Steiner, W. and Labudova, I. 1991. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. Bioresour Technol. 36:51–65.

Evans, C. 1987. Lignin degradation. Process Biochem. 22(4) : 102-104.

Fan, L. T. and Lee, Y. H. 1983. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insolublc cellulose : derivation of mechanistic kinetic model. Biotech. Bioeng. 25 : 2707-2733. อ้างโดย อมรรัตน์ บุญมาศิริ. 2547. การทำเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากเชื้อรา *Pseudeurotium* sp. HTN 14/1 ให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. น. 6-14.

Fiechter, A. 1986. Biodegradation of lignocellulosic materials. Microbial Utilization of Renewable Resources. 5 : 283-290.

Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure Appl Chem. 59:257–268.

Gomes, I., Gomes, J., Steines, W. and Esterbauer, H. 1992. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. Appl. Microbiol. Biotech. 36 : 701-707.

Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen, E. L. and Howard, S. 2003. Lignocellulose biotechnology : issues of bioconversion and enzyme production. J. Biotech. (12) : 602-619.

Kirk, T. K. 1983. Degradation and conversion of lignocellulose, pp.226-295. *In* Smith, J.E., D.R. Berry and Kristiansen, B.(eds). The Filamentous Fungi. Fungal Technology. New York : John Wiley & Sons Inc.

Lapuz, M. M., Gallardo, E.C. and Palo, M. A. The nata organism culture requirements characteristics and identity. Philip, J. Sci. 96.(1967) : 91-109.

Mandels, M., Medeiros, J. E., Andreotti, R. E and Bissett, F. H. 1981. Enzymic hydrolysis of cellulose : evaluation of cellulase culture filtrates under use condition. Biotech Bioeng. 23 : 2009-2026.

Mandels, M. and Sternberg, E. T. 1976. Recent Advances in cellulose technology. J. Ferment. Technol. 554(4) : 267-286.

Maria, G. L., Sridhar, K. R. and Raviraja, N. S. 1996. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. J. Agri Technol. 1(1) : 67-80.

Mendoza, J. M. 1961. Philippine Foods. Their processing and manufacture. Published in the Philippines by the author.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Moo-Young, M., Moreira, A. R. and Tenger, R. P. 1983. Priciples of solid substrate fermentation, pp.117-144. *In* Smith, J. E., D. R. Berry and Kristiansen, B.(eds). The Filamentous Fungi. Fungal Technology. New York : John Wiley & Sons Inc.

Norkrans, B. 1967. Cellulose and cellulolysis. Adv. Appl. Microbiol. 9 : 91-215.

Rao, M.N.A. and Mithal, B. M. 1982. Solid-State Fermentation for Cellulase Production by *Pestalotiopsis vesicolor*. Biotech. Bioeng. 25 : 869-872.

Rao, M. N. A. and Mithal, B. M. 1983. Production of Cellulase from *Pestalotiopsis versicolor*. Biotech. Bioeng. 25 : 2395-2398.

Sanchez, P. C. 1978. Nata de coco production. Dept of food Sci. and Tech, UPLB, Collage Laguna, Philippines.

Shen, X. L. and Xia, L. M. 2003. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. Process Biochem. 39 : 1363-1367.

Shewale, J. G. and Sadana, J. C. 1978. Cellulase and β- glucosidase production by *Basidomycete* sp. Canadian J. Microbial. 24 : 1204-1216.

Sibtain Ahmed, Qurrat-ul-Ain, Nighat Aslam, Saima Naeem, Sajjad-ur-Rahman and Amer Jamil. 2003. Induction of Xylanase and Cellulase Genes from *Trichoderma harzianum* with Different Carbon Sources. Biosci. 22 : 1912-1916.

Soni, R., Sandhu, D. K., Soni, S. K. 1999. Localisation and optimization of cellulose production in *Chaetomium erraticum*. Biotech. 73 : 43-51.

Takasima, S., Nakamura, A., Masaki, H. and Uosumi , T. 1996. Purification and charact erization of cellulose from *Humicola grisea*. Biosci. Biotech. Biochem. 60(1) : 77-82.

Tolan, J. S. and Foody, B. 1999. Cellulase from submerged fermentation. Adv Biochem Eng Biotech. 65 : 41–67.

Tsao, G. T. and Chiang, L. 1983. Cellulose and hemicellulose technology, pp.296-326. *In* Smith, J.E., D.R. Berry and Kristiansen, B.(eds). The Filamentous Fungi. Fungal Technology. New York : John Wiley & Sons Inc.

Xia, L. M. and Cen, P. L. 1999. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. Process Biochem. 34 : 909-912.

www.tamu.edu/.../e-density-history/e-density.htm

www.biologie.uni-humburge.de/b-online/e26/3.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ก. PDA medium

มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
เด็กโทส	20	กรัมต่อลิตร
วุ้น	15	กรัมต่อลิตร

ข. Mandel's medium (Bollok และ Reczey, 2000)

Urea	0.3	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	1.4	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	2	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	0.3	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.3	กรัมต่อลิตร
Peptone	0.75	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	0.25	กรัมต่อลิตร

ค. Trace elements

$FeSO_4.7H_2O$	0.5	มิลลิลิตรต่อลิตร
$MnSO_4$	0.16	มิลลิลิตรต่อลิตร
$ZnSO_4$	0.14	มิลลิลิตรต่อลิตร
$CoCl_2$	2	มิลลิลิตรต่อลิตร

ง. DNS

กรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก	10	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	10	กรัม
โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต	200	กรัม
ฟีนอล	0.2	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต	0.5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ. อาหารทดสอบวงใสของโคโลนี

Urea	0.3	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	1.4	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	2	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	0.3	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.3	กรัมต่อลิตร
Peptone	0.75	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	0.25	กรัมต่อลิตร
Cellulose	10.00	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ก. วิธีการเตรียม PDA medium

1. ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. นำอาหารเข้าตู้ไมโครเวฟละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันจนมีลักษณะใส
3. นำอาหารบรรจุลงในขวดอาหาร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
4. เทอาหารลงในจานเพาะเชื้อโดยวิธีปลอดเชื้อ

ข. วิธีการเตรียม Mandel's medium

1. ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. เติม Trace elements ลงไป 0.1 มิลลิลิตรต่อลิตร
3. นำอาหารเข้าตู้ไมโครเวฟละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันจนมีลักษณะใส
4. ทำการปรับค่าพีเอช ให้อยู่ในช่วง 5.0
5. นำอาหารบรรจุลงในฟลาสก์ ๆ ละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ค. วิธีการเตรียม Trace elements

1. ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. เทใส่ขวดเพื่อเตรียมใช้งานร่วมกับอาหารสูตรของแมนเดล (Mandel's medium)

ง. วิธีการเตรียมอาหารทดสอบขนาดวงใสของโคโลนี

1. ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. เติม Trace elements ลงไป 0.1 มิลลิลิตรต่อลิตร
3. นำอาหารเข้าตู้ไมโครเวฟละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันจนมีลักษณะใส
4. ทำการปรับค่าพีเอช ให้อยู่ในช่วง 5.0
5. นำอาหารบรรจุลงในฟลาสก์ ๆ ละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ. วิธีการเตรียมซิเตรตบัฟเฟอร์

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข โดยการทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและนำมาผสมกันให้ได้ พีเอชที่ต้องการใช้

สารละลาย ก : สารละลายของกรดซิตริก ความเข้มข้น 0.1 M (ทำการละลายกรดซิตริก 51.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข : สารละลายของโซเดียมซิเทรต ความเข้มข้น 0.1 M (ทำการละลาย $C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$ 29.41 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

จำนวนมิลลิลิตรของสารละลาย ก (X) ผสมกับจำนวนมิลลิลิตรของสารละลาย ข (Y) และทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 ml (ตารางที่ ก-1)

ตารางภาคผนวกที่ ก5 อัตราส่วนของสารละลาย ก.(X) และ ข.(Y) ในการเตรียมสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์

X (ml.)	Y (ml.)	pH
46.5	3.5	3.0
43.7	6.3	3.2
40.0	10.0	3.4
37.0	13.0	3.6
35.0	15.0	3.8
33.0	17.0	4.0
31.5	18.5	4.2
28.0	22.0	4.4
25.5	24.5	4.6
23.0	27.0	4.8
20.5	29.5	5.0
18.0	32.0	5.2
16.0	34.0	5.4
13.7	36.3	5.6
11.8	38.2	5.8
9.5	41.5	6.0
7.2	42.8	6.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ. วิธีการเตรียมคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส (Carboxymethylcellulose : CMC)

1. ละลาย CMC 10 กรัม ในน้ำร้อน (80-90°C) ให้มีความหนืดปานกลางโดยเติมสารลงไปช้า ๆ และคนอย่างต่อเนื่อง

2. เติม Citrate buffer pH 4.8 ความเข้มข้น 0.05 M

3. ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร จะได้ CMC ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และเก็บไว้ในตู้เย็นก่อนนำมาใช้ให้อุ่นที่ 50°C พร้อมทั้งเขย่าขวด

หมายเหตุ : CMC ที่ได้จะหนืดและใส (เตรียม 250 ml)

ช. วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับทดสอบวงใส

1. ละลายคองโกเรด 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2. ละลายโซเดียมคลอไรด์ 5.85 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ซ. วิธีการเตรียมสารดีเอ็นเอส (DNS)

DNS : สารละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก(Miller,1959)

1. ละลาย NaOH 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาณหนึ่ง (ไม่เกิน 1,000 มิลลิตร) ละลายจนหมด

2. ค่อย ๆ เติมกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก 10 กรัม ลงไปละลายจนหมด

3. ค่อยๆเติมโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต 200 กรัม ละลายจนหมด

4. เติมฟีนอล 0.2 กรัม และ Na_2SO_3 0.5 กรัม ลงไปละลายจนผสมเป็นเนื้อเดียวกันตามลำดับ

5. ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้เป็น 1 ลิตร

หมายเหตุ : ในขณะเตรียมสารละลายควรใช้เครื่อง magnetic stirrer ช่วยในการผสมสารละลาย

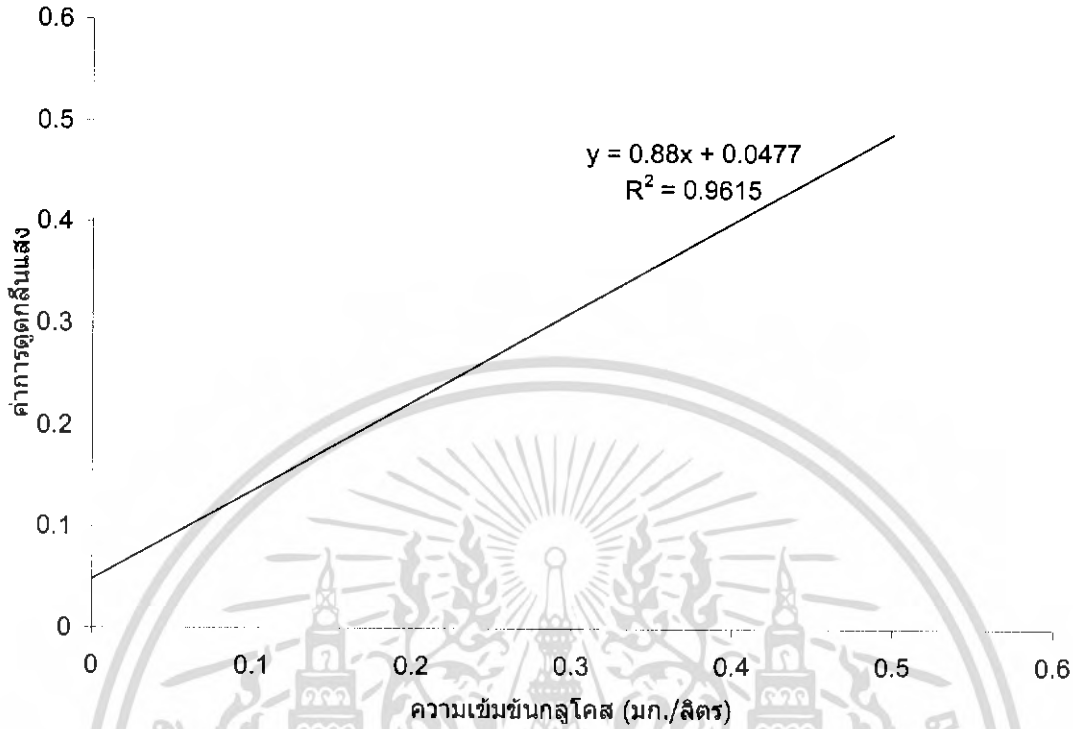
ฌ. วิธีการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

1. อบน้ำตาลกลูโคสที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์

2. ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3. ได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ ก8 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์และการคำนวณ

1. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

1. เจือจางสารละลายเอนไซม์ในความเจือจางที่เหมาะสม ผสมสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2. เติมสารละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก ลงไป 3 มิลลิลิตร

3. นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่น้ำก๊อกให้เย็น เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นในรูปของน้ำตาลกลูโคส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

5. เตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส นำสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามข้อ 2-4 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

6. เตรียมหลอดควบคุม (control) ทำเช่นเดียวกันแต่นำสารละลายเอนไซม์มาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เติมสารลายกรด 3, 5 ไดโนโตรซาลิกไซลิก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ก่อนใส่สารละลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส และขั้นตอนอื่นๆ เหมือนกับการในตัวอย่างหาน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ในตัวอย่าง ส่วนแบลงค์ (blank) เตรียมโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

2. วิธีการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

$$\text{ยูนิต/มล.} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส} \times \text{ค่าความเจือจาง} \times 10^3}{\text{มวลโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส} \times \text{เวลา} \times \text{ปริมาณเอนไซม์}}$$

หมายเหตุ : 10^3 คือ การเปลี่ยนหน่วยจาก มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

1 ยูนิต หมายความว่า ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่กำหนด

3. การวิเคราะห์สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

1. นำสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เติมสารละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) ลงไป 3 มิลลิลิตร

3. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที โดยใช้ลูกแก้วปิดปากหลอดทดลอง

4. จากนั้นนำไปแช่น้ำก๊อกให้หลอดทดลองเย็นลง

5. นำหลอดทดลองไปเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน

6. จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์หาความชื้น

1.นำจานอลูมิเนียมพร้อมฝาไปอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ (30นาที) ชั่งน้ำหนักของจานพร้อมฝา

2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างมาประมาณ 5 กรัม ใส่ในจานที่ชั่งน้ำหนักแล้วเกลี่ยให้เนื้อกระจายปิดฝาและชั่งน้ำหนัก

3. นำไปอบในตู้อบโดยให้ฝาปิดไว้บางส่วน อบ 10 ชั่วโมงหรือข้ามคืนที่ 105 องศาเซลเซียส

4. เมื่อแห้งแล้ว นำจานที่ฝาปิดไว้บางส่วนไปทำให้เย็นลงในเดซิกเคเตอร์ชั่งน้ำหนัก

5. วิธีการคำนวณหาความชื้น

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{w_1 - w_2}{w_1} \times 100$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนัก (กรัม) ของตัวอย่างก่อนอบ

W_2 คือ น้ำหนัก (กรัม) ของตัวอย่างหลังอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ค6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา 43 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอาหารแมนเดล ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
สายพันธุ์รา	42	336.348	8.008	345.000*
ความคลาดเคลื่อน	86	1.996	0.023	
ผลรวม	128	338.344		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05

ns = ไม่มีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค7 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา 43 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอาหารแมนเตล ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์รา	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Unit/ml)	สายพันธุ์รา	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Unit/ml)	สายพันธุ์รา	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Unit/ml)
MC1	0.0967 ^{j}	MC 16	0.2033 ^{j}	MC 31	0.9133 ^{h}
MC 2	0.0833 ^{j}	MC 17	3.0867 ^{d}	MC 32	0.3167 ^{j}
MC 3	0.1033 ^{j}	MC 18	1.8533 ^{f}	MC 33	0.1167 ^{j}
MC 4	0.120 0 ^{j}	MC 19	0.0667 ^{j}	MC 34	0.0933 ^{j}
MC 5	0.1200 ^{j}	MC 20	3.9600 ^{c}	MC 35	0.0900 ^{j}
MC 6	0.1033 ^{j}	MC 21	0.6067 ^{i}	MC 36	0.1233 ^{j}
MC 7	0.0700 ^{j}	MC 22	0.0600 ^{j}	MC 37	0.1000 ^{j}
MC 8	2.2167 ^{e}	MC 23	0.0733 ^{j}	MC 38	0.7167 ^{ih}
MC 9	0.1300 ^{j}	MC 24	0.0733 ^{j}	MC 39	0.7700 ^{ih}
MC 10	0.1467 ^{j}	MC 25	0.1233 ^{j}	MC 40	0.1033 ^{j}
MC 11	0.1933 ^{j}	MC 26	4.9900 ^{b}	MC 41	1.3467 ^{g}
MC 12	0.0867 ^{j}	MC 27	0.2433 ^{j}	MC 42	0.0900 ^{j}
MC 13	0.1200 ^{j}	MC 28	1.7733 ^{f}	MC 43	0.0933 ^{j}
MC 14	0.0733 ^{j}	MC 29*	8.5667 ^{a}		
MC 15	0.0767 ^{j}	MC 30	0.0967 ^{j}		

หมายเหตุ ในแต่ละคอลัมน์ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ความเข้มข้นของคาร์บอน	4	0.067	0.017	4.545*
ความคลาดเคลื่อน	10	0.037	0.004	
ผลรวม	14	0.104		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05
ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค9 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของคาร์บอน (ร้อยละ)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง
2	0.4300[a]
3	0.4406[a]
4	0.4287[a]
5	0.3191[b]
6	0.3033[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 26 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ความเข้มข้นของคาร์บอน	4	0.010	0.003	1.395^{ns}
ความคลาดเคลื่อน	10	0.018	0.002	
ผลรวม	14	0.029		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05
ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค11 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 26 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของคาร์บอน (ร้อยละ)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง
2	0.2200^{a}
3	0.1933^{a}
4	0.2067^{a}
5	0.1900^{a}
6	0.2107^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ความเข้มข้นของคาร์บอน	4	0.582	0.146	33.283*
ความคลาดเคลื่อน	10	0.044	0.004	
ผลรวม	14	0.626		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05
ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค13 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของคาร์บอน (ร้อยละ)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง
2	0.1467[c]
3	0.2367[b]
4	0.3567[b]
5	0.6533[a]
6	0.3267[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ความเข้มข้นของคาร์บอน	4	0.100	0.025	6.932*
ความคลาดเคลื่อน	10	0.036	0.004	
ผลรวม	14	0.136		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05
ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค15 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของคาร์บอน (ร้อยละ)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง
2	0.8033[a]
3	0.8533[a]
4	0.7900[a]
5	0.6500[b]
6	0.6600[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 26ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ความเข้มข้นของคาร์บอน	4	0.067	0.017	4.301*
ความคลาดเคลื่อน	10	0.039	0.004	
ผลรวม	14	0.106		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05
ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค17 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 26 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของคาร์บอน (ร้อยละ)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง
2	0.6900[b]
3	0.8267[a]
4	0.6767[b]
5	0.6500[b]
6	0.6433[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ความเข้มข้นของคาร์บอน	4	0.553	0.138	34.968*
ความคลาดเคลื่อน	10	0.040	0.004	
ผลรวม	14	0.592		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05
ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค19 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของคาร์บอน (ร้อยละ)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง
2	0.6167[c]
3	0.9067[b]
4	0.8033[b]
5	0.7233[a]
6	0.8033[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ความเข้มข้นของคาร์บอน	4	0.060	0.015	4.303*
ความคลาดเคลื่อน	10	0.035	0.004	
ผลรวม	14	0.095		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05
ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค21 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของคาร์บอน (ร้อยละ)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง
2	0.5000[a]
3	0.5200[a]
4	0.5200[a]
5	0.3800[b]
6	0.3900[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 26ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ความเข้มข้นของคาร์บอน	4	0.007	0.002	1.049^{ns}
ความคลาดเคลื่อน	10	0.017	0.002	
ผลรวม	14	0.024		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05
ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค23 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 26 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของคาร์บอน (ร้อยละ)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง
2	0.4200^{a}
3	0.3633^{a}
4	0.4067^{a}
5	0.3800^{a}
6	0.3700^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ความเข้มข้นของคาร์บอน	4	0.583	0.146	46.911*
ความคลาดเคลื่อน	10	0.031	0.003	
ผลรวม	14	0.614		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05
ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค25 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 29 ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนร้อยละ 2, 3, 4, 5 และ 6 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของคาร์บอน (ร้อยละ)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง
2	0.3446[c]
3	0.5367[b]
4	0.6333[b]
5	0.7033[a]
6	0.6333[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นไนโตรเจนสูตรต่างๆ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
สูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ	9	3.380E-02	3.756E-03	19.566*
ความคลาดเคลื่อน	20	3.839E-03	1.920E-04	
ผลรวม	29	3.764E-02		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05

ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค27 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนสูตรต่างๆ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สูตรอาหาร	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง
1	0.6533^{bc}
2	0.6483^{bc}
3	0.6617^{bc}
4	0.6553^{bc}
5	0.6583^{bc}
6	0.6573^{bc}
7	0.6693^{b}
8	0.6707^{b}
9	0.7650^{a}
10	0.6390^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค28 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนสูตรต่างๆ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
สูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ	9	0.209	2.317E-02	8.706*
ความคลาดเคลื่อน	20	5.322E-02	2.661E-03	
ผลรวม	29	0.262		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05

ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค29 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนสูตรต่างๆ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สูตรอาหาร	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง
1	0.7093^{cd}
2	0.7500^{bc}
3	0.7467^{bc}
4	0.8667^{a}
5	0.8633^{a}
6	0.8253^{ab}
7	0.8833^{a}
8	0.6366^{d}
9	0.7441^{bc}
10	0.6583^{cd}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนสูตรต่างๆ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
สูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ	9	0.179	1.991E-02	105.584*
ความคลาดเคลื่อน	20	3.771E-03	1.886E-04	
ผลรวม	29	0.183		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05

ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค31 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนสูตรต่างๆ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สูตรอาหาร	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง
1	0.5426^{c}
2	0.5433^{c}
3	0.5360^{c}
4	0.5497^{c}
5	0.5413^{c}
6	0.5500^{c}
7	0.5533^{c}
8	0.6877^{b}
9	0.7370^{a}
10	0.7107^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	4	0.005	0.001	2.449^{ns}
ความคลาดเคลื่อน	10	0.005	0.001	
ผลรวม	14	0.010		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05
ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค33 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น(pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง
5.0	0.5633^{ab}
6.0	0.5833^{a}
7.0	0.5767^{a}
8.0	0.5600^{ab}
9.0	0.5300^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค34 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	4	0.108	0.027	1.663^{ns}
ความคลาดเคลื่อน	10	0.162	0.016	
ผลรวม	14	0.269		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05
ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค35 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น(pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง
5.0	0.8647^{a}
6.0	0.6400^{b}
7.0	0.5233^{c}
8.0	0.5233^{c}
9.0	0.5200^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค36 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	4	0.129	0.032	44.921*
ความคลาดเคลื่อน	10	0.007	0.001	
ผลรวม	14	0.137		

หมายเหตุ * = นัยสำคัญ 0.05
ns = ไม่มีนัยสำคัญ

ตารางภาคผนวกที่ ค37 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ MC 20 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง
5.0	0.7533[a]
6.0	0.6900[b]
7.0	0.5267[c]
8.0	0.5567[c]
9.0	0.5300[c]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
สายพันธุ์เชื้อรา

ตารางภาคผนวกที่ ง38 รายชื่อสายพันธุ์รา 43 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง

รหัส	ชื่อ	รหัส	ชื่อ
MC1	*Aspergillus* sp.	MC23	S
MC2	*A. foctidus*	MC24	St II
MC3	*A. niger*	MC25	T
MC4	*A. oryzae*	MC26	*Trichoderma* sp.
MC5	B	MC27	*T. harziarum*
MC6	C	MC28	*T. reesei*
MC7	D	MC29*	*T. reesei* TISTR 3080
MC8	E	MC30	Xylanase
MC9	F	MC31	Xylanase No.1
MC10	G	MC32	No.1
MC11	H	MC33	No.13
MC12	I	MC34	No.14
MC13	J	MC35	No.16
MC14	K	MC36	เกาลัด
MC15	*Moniella* st.II	MC37	ขนุน
MC16	*P. alulonum*	MC38	เขาเขียว
MC17	*P. citrinum*	MC39	เขาเขียว1
MC18	*P. chrysogenum*	MC40	บ้านเพ
MC19	*P. chrysogenum* ATCC	MC41	ปลวกแดง
MC20	*Pestalotiopsis* st.I	MC42	ฝรั่ง
MC21	Q	MC43	สวนตราด
MC22	R		

* สายพันธุ์อ้างอิง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้