



กระทรวงศึกษาธิการ กรุงเทพมหานคร

การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในถังหมัก

โดย

นางสาว จันท์ เรือง เอกสัมพันธ์ทิพย์

นาย อัครวิทย์ มัชฌมจันท์

ร/พ.  
๑๒๖๕ ก

๐๑๒๕ ๒๒๕๑ x

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา ๒๕๓๕ ✓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**The Study of Effects in Production of Cellulase in Fermentor**

**Miss. Chanruang Akesumpuntip**

**Mr. Akkhawi Mathayomchan**

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน.....  
วัน เดือน ปี.....

**A speacial Projects Submitted in Partial Fulfillment of the  
Requirement for the Degree of Bachelor of Science**

**Department of Applied Biology**

**Faculty of Science**

**King Monkut's Institute of Technology Ladkrabang**

**1992**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

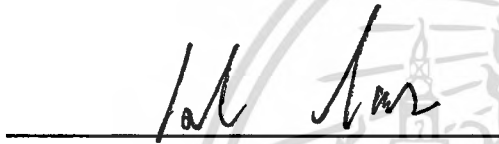
หัวข้อโครงการพิเศษ การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอโนไซม์เซลลูเลส  
ในถังหมัก

โดย นางสาวจันทร์ เรือง เอกสัมพันธ์ทิพย์  
นายอัศวীর มัชฌิมจันทร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มาลีณี ตันติยาภรณ์

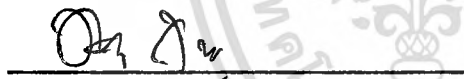
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
อนุมัติให้พิมพ์โครงการพิเศษฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต



( ผศ. เนาวรัตน์ ปานยิ้ม )

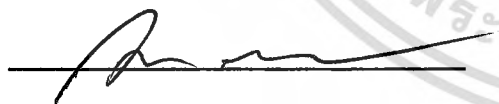
หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงการพิเศษ



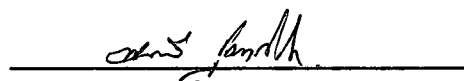
( อ. อรทัย สุขเจริญ )

ประธานกรรมการ



( ผศ. มาลีณี ตันติยาภรณ์ )

กรรมการ



( ผศ. ดร. พรรณี วิฑิตาภิชิต )

กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ให้ผลผลิตที่มีปริมาณ Soluble Protein 69.175 mg/ml เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน Endoglucanase Activity 11.603 IU/ml เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8 วัน ส่วน Exoglucanase Activity มีค่า 40.201 IU/ml FPA Activity มีค่า 2.155 IU/ml เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8 วัน และ  $\beta$ -glucosidase Activity มีค่า 85.187 IU/ml เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8 วัน ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศ 1.0 VVM ควบคุมกับอัตราเร็วในการปั่นกวน 400 rpm

สรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้เชื้อ *Trichoderma reesei* สายพันธุ์ mutant No. 22 โดยใช้ซังข้าวโพดที่ปรับสภาพแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนคือเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.8 ให้อากาศ 1.0 VVM ควบคุมกับอัตราเร็วในการปั่นกวน 300 rpm ที่อุณหภูมิ 28°C



with agitation rate are reported. Optimal fermentation condition at air flow rate 1 VVM and agitate rate 300 rpm after 8 days of cultivation give the highest activity of endoglucanase 11.603 IU/ml, exoglucanase 40.201 IU/ml and FPA 2.155 IU/ml while the value for the maximum soluble protein produced 69.175 mg/ml in 7 days. The fermentation of mutant No. 22 after 8 days of cultivation at 1 VVM with 400 rpm are found the optimal condition which has yield 85.187 IU/ml  $\beta$ -glucosidase.

The suitable conditions of high yield cellulase production in 2-L fermentor by mutant *T. reesei* No. 22 are cultivation at pH 4.8, 28°C air flow rate 1 VVM and agitation rate 300 rpm.

### กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษในหัวข้อเรื่อง การศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์  
เซลลูเลสในถั่มหมัก ได้บรรลุถึงวัตถุประสงค์และสำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความ  
อนุเคราะห์จากท่านอาจารย์มาลินี ตันติยาภรณ์ อาจารย์อรไท สุขเจริญ อาจารย์  
วรรณภา พรเศรษฐคุณ อาจารย์ปราโมทย์ ศิริโรจน์ และอาจารย์ท่านอื่นๆ ที่ได้ให้  
คำปรึกษา แนะนำ เสนอข้อคิดต่างๆ จนทำให้โครงการพิเศษฉบับนี้ลุล่วงด้วยดีจึง  
กราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่อำนวยความสะดวก  
สะดวกในการใช้เครื่องมือและสารเคมีในการทำวิจัย

และขอขอบ คุณณรงค์ แสงแก้ว คุณพงศ์ศิริ อ่อนศรี คุณปฐมศักดิ์ ศิริหาญยากร  
คุณทองคำ สุ่มโนทยาน คุณสยาม เจริญเสียง ที่เอื้อเฟื้อเครื่องคอมพิวเตอร์ โปรแกรม  
คอมพิวเตอร์ และเครื่องพิมพ์

นอกจากนี้ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ น้อง คณะวิทยาศาสตร์ ที่มีส่วนร่วมในการ  
ทำโครงการพิเศษฉบับนี้ โครงการพิเศษฉบับนี้คงจะไม่สามารถดำเนินการสำเร็จลง  
ได้ตามวัตถุประสงค์ถ้าไม่มีบุคคลเหล่านี้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง 1-4
สารบัญภาพ	จ 1-4
บทที่ 1 บทนำ	1-4
บทที่ 2 ทฤษฎีและกฎเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง	5-37
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย/งานวิจัย	38-43
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	44-79
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	80-82
ภาคผนวก	83-134
เอกสารอ้างอิง	135-142
ประวัติ	143

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ปริมาณเซลล์โอสในส่วนต่างๆ ของพืช	12
2. Genus ของจุลินทรีย์ ที่สามารถย่อยสลายเซลล์โอส	20
3. การผลิตเซลล์เลสโดย Mesophilic Cellulolytic Fungi	21
4. ปริมาณสัมพันธ์ของเซลล์เลสที่สร้างขึ้นโดย <i>Trichoderma reesei</i> และ <i>Aspergillus niger</i>	23
5. ค่า Michaelis-Menten Constant ( $K_m$ ) และ ( $K_i$ ) สำหรับ $\beta$ -glucosidase	23
6. น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลล์เลสจากจุลินทรีย์	24
7. Relative Velocity และ Michaelis Constant ของเอนไซม์เซลล์เลส	25
8. เซลล์เลสที่แยกจาก <i>Trichoderma reesei</i>	26
9. การตรวจสอบเอนไซม์เซลล์เลส	34
10. ตาราง F-value ที่ 1% และ 5%	107
11. การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ในรูปน้ำหนักแห้งของเส้นใย (mg/ml) เมื่อเลี้ยงในระบบขวดเขย่า	111
12. ผลการศึกษาปริมาณ Soluble Protein (mg/ml) เมื่อเลี้ยงในระบบขวดเขย่า	112
13. ผลการศึกษาปริมาณ FPA Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงในระบบขวดเขย่า	113
14. ผลการศึกษาปริมาณ Endoglucanase Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงในระบบขวดเขย่า	114

ตารางที่	4-2	หน้า
15. ผลการศึกษาปริมาณ Exoglucanase Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงในระบบขวดเขย่า		115
16. ผลการศึกษาปริมาณ $\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงในระบบขวดเขย่า		116
17. การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ <i>T. reesei</i> ในรูป น้ำหนักแห้งของเส้นใย (mg/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก		117
18. การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ mutant <i>T. reesei</i> ในรูปน้ำหนักแห้งของเส้นใย (mg/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดต่าง		118
19. การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ mutant <i>T. reesei</i> ในรูป น้ำหนักแห้งของเส้นใย (mg/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวน		119
20. ผลการศึกษาปริมาณ Soluble Protein (mg/ml) ที่ผลิตโดย <i>T. reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก		120
21. ผลการศึกษาปริมาณ FPA Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย <i>T. reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก		121
22. ผลการศึกษาปริมาณ Endoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย <i>T. reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก		122
23. ผลการศึกษาปริมาณ Exoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย <i>T. reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก		123
24. ผลการศึกษาปริมาณ $\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย <i>T. reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก		124
25. ผลการศึกษาปริมาณ Soluble Protein (mg/ml) ที่ผลิตโดย mutant <i>T. reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก		125

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่	๔-๓	หน้า
26.. ผลการศึกษาปริมาณ FPA Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant <i>T.reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดต่าง		126
27. ผลการศึกษาปริมาณ Endoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant <i>T.reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดต่าง		127
28. ผลการศึกษาปริมาณ Exoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant <i>T.reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดต่าง		128
29. ผลการศึกษาปริมาณ $\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant <i>T.reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดต่าง		129
30. ผลการศึกษาปริมาณ Soluble Protein (mg/ml) ที่ผลิตโดย mutant <i>T.reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวน		130
31. ผลการศึกษาปริมาณ FPA Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant <i>T.reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวน		131
32. ผลการศึกษาปริมาณ Endoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant <i>T.reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวน		132
33. ผลการศึกษาปริมาณ Exoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant <i>T.reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวน		133

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

34. ผลการศึกษาปริมาณ  $\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml)

ที่ผลิตโดย mutant *T.reesei* เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวน

134



## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แนวทางการผลิตเริ่มจากเซลล์โลส	1
2. ลักษณะโครงสร้างของเซลล์โลส	6
3. การเชื่อมต่อสายโมเลกุลเซลล์โลสด้วยพันธะไฮโดรเจน	7
4. ลักษณะโครงสร้างของเซลล์โลสธรรมชาติ	8
5. ลำดับการรวมกลุ่มของเซลล์โลส ในเนื้อเซลล์พืช	10
6. ความจำเพาะของเซลล์โลสต่อสปีสเตรทตามสมมติฐานของ Cowling	27
7. การสังเคราะห์และการควบคุมการผลิตเอนไซม์เซลล์โลสในเชื้อรา <i>Trichoderma reesei</i>	29
8. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและการผลิต Soluble Protein (mg/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า	47
9. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและ FPA Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า	48
10. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและ Endoglucanase Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า	49
11. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและ Exoglucanase Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า	50

12. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและ  $\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเซย่า 51
13. กราฟแสดงปริมาณ Soluble Protein (mg/ml) ที่ผลิตโดย mutant *T. reesei* เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆกัน 55
14. กราฟแสดงปริมาณ FPA Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant *T. reesei* เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆกัน 56
15. กราฟแสดงปริมาณ Endoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant *T. reesei* เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆกัน 57
16. กราฟแสดงปริมาณ Exoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant *T. reesei* เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างในระดับต่างๆกัน 58
17. กราฟแสดงปริมาณ  $\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant *T. reesei* เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างในระดับต่างๆกัน 59
18. กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ mutant *T. reesei* ในรูปน้ำหนักแห้งเส้นใย (mg/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุม pH ระดับต่างๆ 60
19. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและการผลิต Soluble Protein (mg/ml) โดยเชื้อ mutant *T. reesei* 61

ภาพที่	๑-๑	หน้า
20. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและการผลิต FPA Activity (IU/ml) โดยเชื้อ mutant <i>T.reesei</i>		62
21. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและการผลิต Endoglucanase Activity(IU/ml) โดยเชื้อ mutant <i>T.reesei</i>		63
22. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต และ การผลิต Exoglucanase Activity (IU/ml) โดยเชื้อ mutant <i>T.reesei</i>		64
23. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและการผลิต $\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml) โดยเชื้อ mutant <i>T.reesei</i>		65
24. กราฟแสดงปริมาณ Soluble Protein (mg/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant <i>T. reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศ และ อัตราการกวนต่างกัน		69
25. กราฟแสดงปริมาณ FPA Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant <i>T.reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน		70
26. กราฟแสดงปริมาณ Endoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant <i>T.reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน		71
27. กราฟแสดงปริมาณ Exoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant <i>T.reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน		72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

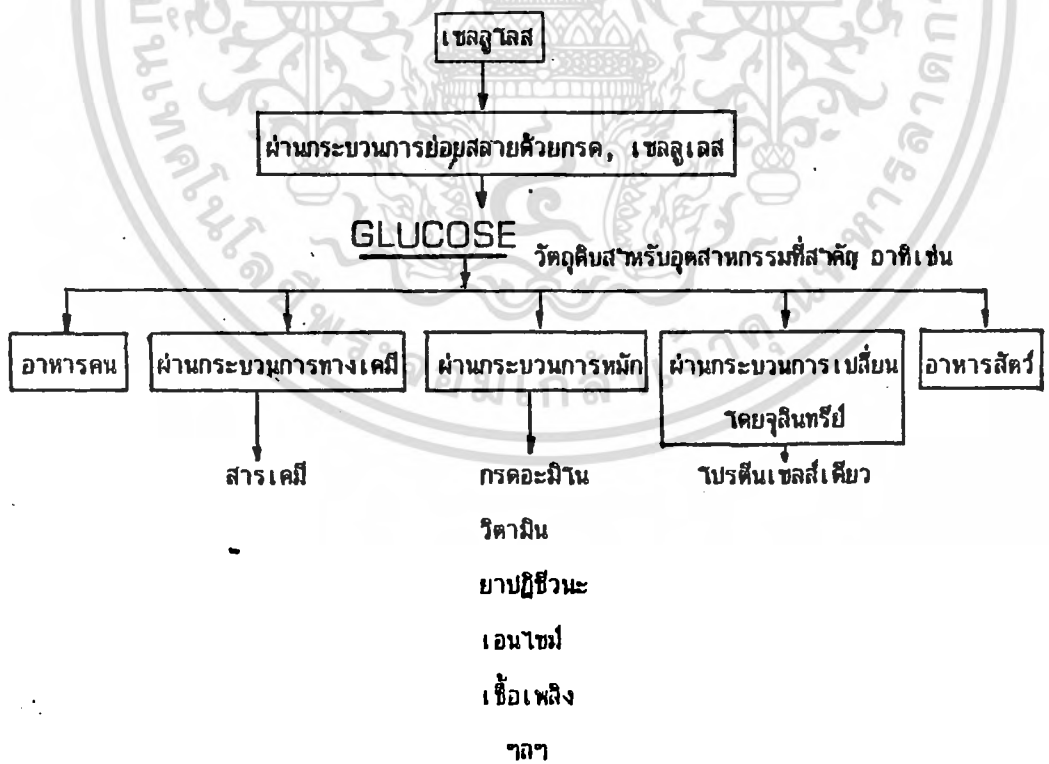
28. กราฟแสดงปริมาณ $\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดย mutant <i>T. reesei</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อในถึงหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน	73
29. กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ mutant <i>T. reesei</i> ในรูปของน้ำหนักแห้งเส้นใย (mg/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถึงหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศ และ อัตราการกวนต่างๆ	74
30. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและการผลิต Soluble Protein (mg/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถึงหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างๆกัน	75
31. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและการผลิต FPA Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถึงหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างๆกัน	76
32. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและการผลิต Endoglucanase Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถึงหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างๆกัน	77
33. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและการผลิต Exoglucanase Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถึงหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างๆกัน	78
34. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและการผลิต $\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถึงหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างๆกัน	79
35. กราฟมาตรฐานของ สารละลายโปรตีน	89
36. กราฟมาตรฐานของ สารละลายเซลโลไบโอส	94
37. กราฟมาตรฐานของ สารละลายกลูโคส	96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

เซลลูโลส เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร อุตสาหกรรมอาหาร ตลอดจนของเสียในครัวเรือน และเนื่องจากในประเทศไทยมี วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะ ฟางข้าว แกลบ ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด วัสดุเกษตรเหล่านี้มีองค์ประกอบหลักจำพวก เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และถ้าเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นโมเลกุลหน่วยเล็กที่สุด คือ กลูโคส ไม่ว่าจะด้วยวิธีใดก็ตาม เช่น การใช้กรด ต่าง เซลลูโลสก็จะเป็นวัตถุดิบของการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความหมาย และมีคุณค่าหลายชนิดที่จำเป็น แนวทางเป็นไปได้ของการผลิตที่เริ่มต้นจากเซลลูโลส แสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แนวทางการผลิตเริ่มจาก เซลลูโลส (Ghose, 1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Trichoderma reesei* เป็นเชื้อราที่มีคุณสมบัติสำคัญสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์เซลลูเลส สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่กล่าวข้างต้น เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยเปลี่ยนวัตถุดิบเหล่านี้ให้ได้ผลิตภัณฑ์ดังแสดงในภาพที่ 1 ข้างต้น

แนวทางในการปรับปรุงประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้สูงขึ้น ได้แก่ การหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมและมีราคาถูก สมพรและสันคณี (2533) แสดงให้เห็นว่า *Trichoderma reesei* สามารถใช้ซึ่งข้าวโพดที่ปรับสภาพแล้วด้วย 2% HCl เป็นวัตถุดิบ ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์สูงสุด การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่า แล้วคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ผ่าเหล่าที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าเดิมหลายเท่า เป็นวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอีกวิธีหนึ่ง ภาวดีและสิทธิพร (2534) ประยุกต์การใช้เทคนิค Agar-Block Method สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ผ่าเหล่า *Trichoderma reesei* และศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าสายพันธุ์ผ่าเหล่า No. 22 ซึ่งผ่านการฉายรังสีอุลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด นอกจากนี้การศึกษาสภาวะต่างๆ ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในถังหมัก เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ต้องทำการศึกษาเพื่อให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด สภาวะดังกล่าว ได้แก่ ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) อัตราการกวน และปริมาณอากาศที่เหมาะสม

การตรวจสอบประสิทธิภาพรวมเชิงย่อยเซลลูโลสสับเสตรที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบ ควรเป็นวัสดุที่ไม่ละลายน้ำ ถูกไฮโดรไลซ์ได้ไม่่ง่ายนัก และต้องเป็นวัสดุที่สามารถทำให้ได้มาตรฐานได้ด้วยเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์พอที่จะให้เอนไซม์เข้าไปไฮโดรไลซ์พันธะตรงบริเวณที่เอนไซม์เข้าไปได้ยาก

จากการศึกษาโดยการแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเป็น Multicomponent Enzyme มีระบบเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด มาทำงาน

ร่วมกันคือ เอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Endo- $\beta$ -1,4 glucan glucanohydrolase หรือ Endoglucanase (EC.3.1.2.1.4) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ตัดพันธะ  $\beta$ -1,4 glucosidic ภายในระบบเซลลูโลสบริเวณที่เป็น Amorphus หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส โดยจะตัดพันธะแบบสุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์เป็น กลูโคส และเซลโลไบโอส ชนิด  $\beta$ -configulaton

2. Exo  $\beta$ -1,4 glucan glucanohydrolase หรือ Exoglucanase หรือ C<sub>1</sub> (EC.3.2.121) โดยทำหน้าที่ตัดพันธะ  $\beta$ -1,4 glucosidic จากปลาย non-reducing ได้เป็นผลิตภัณฑ์ คือ กลูโคส และเซลโลไบโอส

3.  $\beta$ -glucosidase หรือ Cellobiase (EC.3.2.21) ทำหน้าที่ย่อยสลาย Cellobiose และ Dextrin จากปลาย reducing ends ได้ผลผลิตที่เป็นน้ำตาล Glucose

#### วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. ศึกษาสภาวะต่างๆ เช่น ความเป็นกรดต่าง (pH) อัตราการกวน และปริมาณอากาศที่เหมาะสม ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในถังหมัก
2. ศึกษาการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส และกลุ่มเอนไซม์ในระบบเซลลูเลส เช่น Endoglucanase, Exoglucanase,  $\beta$ -glucosididase ของเชื้อ mutant *Trichoderma reesei*
3. ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ mutant *Trichoderma reesei* และ *Trichoderma reesei* ในระบบขวดเขย่า และในถังหมัก

### วิธีดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ mutant *T. reesei* ในถังหมัก เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และ Factorial design
2. วิเคราะห์หาประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *T. reesei* ในรูปของ FPA (Filter Paper Degradation Unit) ประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยในระบบเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ Endoglucanase Activity, Exoglucanase Activity,  $\beta$ -glucosidase Activity และวิเคราะห์หาปริมาณ Soluble Protein
3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *T. reesei* และ *T. reesei* เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่าและในถังหมัก โดยใช้ซึ่งข้าวโพดที่ปรับสภาพแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน
4. สรุปผลงานวิจัย โดยการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นการนำทรัพยากรเหลือใช้ทางการเกษตร ที่มีอยู่ในประเทศไทยเป็นจำนวนมาก ราคาถูก และหาได้ง่าย มาใช้ให้เกิดประโยชน์
2. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้ในการศึกษา ทั้งยังสามารถลดค่าใช้จ่ายในการซื้อเอนไซม์
3. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและหลักเกณฑ์

#### 2.1 เซลลูโลส

##### 2.1.1 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

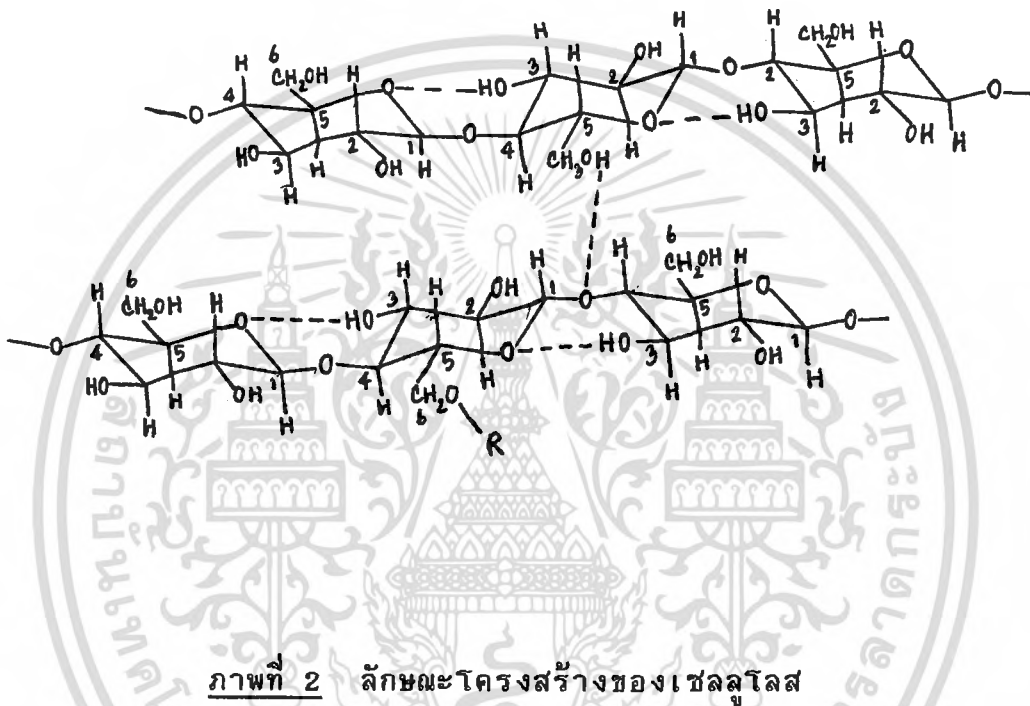
เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย Polymer Molecule ของหน่วยย่อยของ D-anhydroglucopyranose มาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 glucosidic อย่างมีระเบียบ จำนวนหน่วยย่อยของ D-anhydroglucopyranose ต่อหนึ่งโมเลกุล (Degree of Polymerization) จะมีจำนวนอย่างน้อย 15 หน่วย จนถึงประมาณ 10,000-14,000 หน่วย (Cowling and Kirk, 1976) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.5 MDa ขึ้นกับชนิดพืช (Brown, 1983)

Nisizawa, 1973 อธิบายไว้ว่าเซลลูโลสจากเนื้อไม้มีค่า Degree of Polymerization (D.P.) ประมาณ 8,000-10,000 สำหรับเนื้อไม้ที่บดละเอียด (pulp) และกระดาษกรองมีค่า D.P. ประมาณ 500-1,000

ถ้าพิจารณาถึงรูปแบบของการจัดเรียงหน่วยย่อยที่เชื่อมต่อกันจะอยู่ในลักษณะ chair form แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างกลุ่มไฮดรอกซิล (-OH) ที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 3 กับ ring oxygen ของโมเลกุลถัดไป และเชื่อมต่อกันระหว่างสายเซลลูโลสที่ขนานกันที่ระหว่างกลุ่มไฮดรอกซิล (-OH) ที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 6 กับ oxygen atom ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของ D-anhydroglucopyranose ในอีกสายหนึ่ง

(Zabriskic, 1980; Sasaki, 1982) ดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3 ทำให้เซลลูโลสมีโครงสร้างซับซ้อนขึ้น มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ยากต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และสารเคมี (Reese, 1976 : Sasaki, 1982)

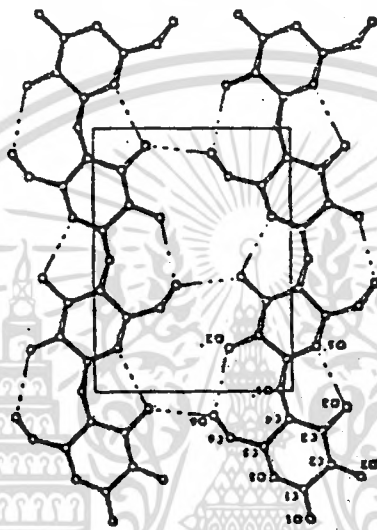
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา : Zabriskic และคณะ (1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาพที่ 3** การเชื่อมต่อของสายโมเลกุลเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยกลูโคสแต่ละหน่วยจะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ภายในสายโมเลกุลของเซลลูโลส 2 พันธะ คือ  $03-H \cdots 05$  และ  $06 \cdots H-02$  และพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโมเลกุลของเซลลูโลสคือ  $06-H \cdots 03$

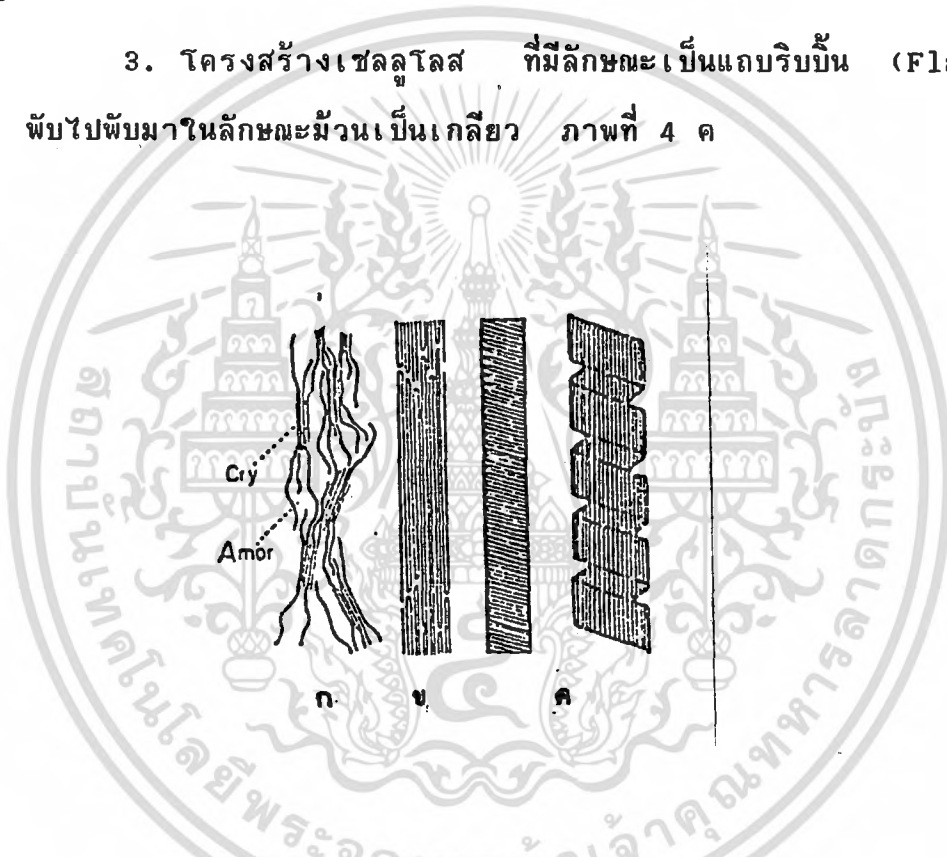
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลลูโลสธรรมชาติ (Native Cellulose) มีโครงสร้างแบ่งเป็น 3 ลักษณะ (Nisizawa, 1973) คือ

1. Fring Micelles ใน Microfibril ประกอบด้วยส่วน Crystalline และ Amorphus ภาพที่ 4 ก

2. โครงสร้างเซลลูโลส ที่มีเส้นใยพับไปมาตามแนวเส้นใย ภาพที่ 4 ข

3. โครงสร้างเซลลูโลส ที่มีลักษณะเป็นแถบริบบิ้น (Flat Ribbon) พับไปพับมาในลักษณะม้วนเป็นเกลียว ภาพที่ 4 ค



ภาพที่ 4 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลสธรรมชาติ

ที่มา : Nisizawa (1973)

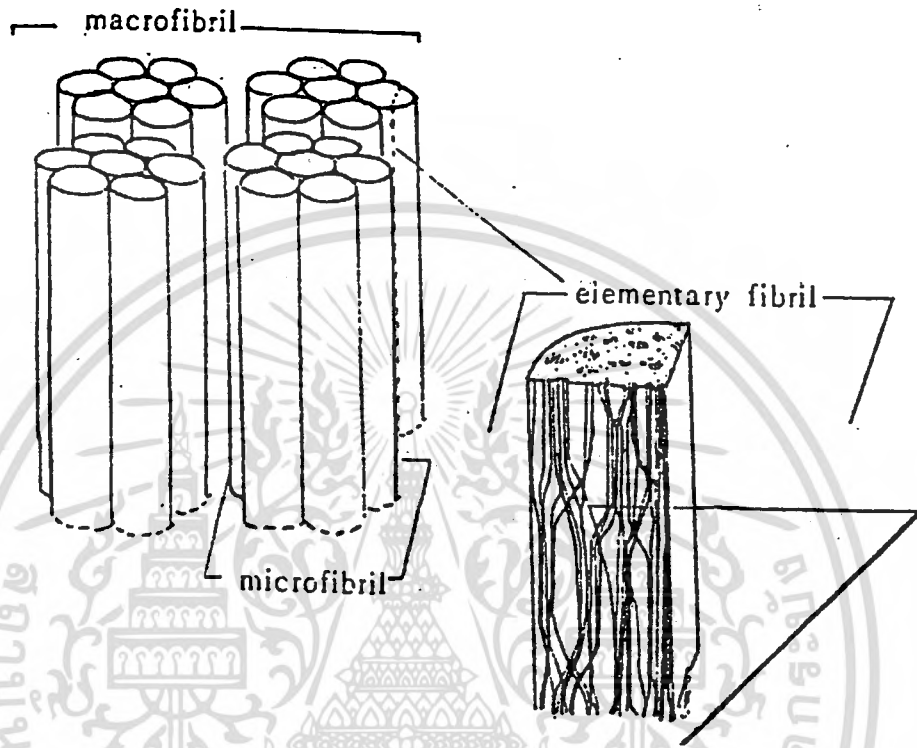
โดยทั่วไปเซลลูโลสในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของ ลิกโนเซลลูโลส เซลลูโลส จะเชื่อมอยู่กับโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ เช่น เพคติน เฮมิเซลลูโลส แป้ง และ phenolic polymer ของลิกนิน (Cowling and Kirk, 1976 : Cutzen และคณะ 1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี ค.ศ. 1976 Cowling และ Kirk ศึกษาถึงโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส พบว่าในส่วนของ secondary cell wall จะเป็นส่วนที่พบเซลลูโลสมากที่สุด และมีปริมาณลดลงใน middle lamella ส่วนเฮมิเซลลูโลสและลิกนินจะพบมากใน middle lamella และมีปริมาณลดลงใน secondary cell wall กลุ่มของสายโมเลกุลเซลลูโลสที่เชื่อมกันทางด้านข้างของสายด้วยพันธะไฮโดรเจนนี้ รวมเรียก elementary fibril การเชื่อมกันดังกล่าวถ้าสายโมเลกุลเซลลูโลสมีการเชื่อมกันอย่างมีระเบียบขนานกันไป จะทำให้เกิดบริเวณผลึก (crystalline regions) และถ้าการเรียงตัวมีระเบียบน้อยลงหรือไม่ีระเบียบ จะทำให้เกิดบริเวณที่เรียกว่า บริเวณอสัณฐาน (amorphous regions or paracrystalline regions) (Cowling and Kirk, 1976 : Brown, 1983 : Lee และคณะ 1983)

elementary fibril จำนวนหนึ่งเมื่อรวมกลุ่มกันจะเรียกว่า microfibril และเมื่อจุด fibril มาเชื่อมกันทางด้านข้างและมีลิกนินเป็นตัวห่อหุ้มให้รวมกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า macrofibril โดยมีเฮมิเซลลูโลสและสารอื่นๆ รวมอยู่ภายในช่องว่างระหว่างจุด fibril แต่ละกลุ่ม การรวมกลุ่มของสายโมเลกุลเซลลูโลสและการสะสมของสารต่างๆ ในช่องว่างดังกล่าวทำให้เซลลูโลสในธรรมชาติมีระบบการป้องกันการย่อยสลายโดยเอนไซม์

จากการศึกษาของ Sasaki ในปี ค.ศ. 1982 และ Fan and Lee ในปี ค.ศ. 1983 พบว่าบริเวณที่เป็น crystalline มีประมาณ 50-90% ส่วนที่เหลือจะเป็น amorphous แต่ละบริเวณจะแสดงคุณสมบัติในการยอมรับต่อกลไกการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างกัน โดยบริเวณ amorphous ยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายได้ง่ายกว่าบริเวณ crystalline ลำดับการรวมกลุ่มของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช แสดงในภาพที่ 5 ดังนั้นกลไกการย่อยสลายจะเกิดที่บริเวณ amorphous ได้เร็วกว่าและเกิดขึ้นก่อนบริเวณ crystalline



ภาพที่ 5 ลำดับการรวมกลุ่มของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.2 ปริมาณเชลลูโลสในพืช

ส่วนต่างๆของเชลพืช จะมีปริมาณเชลลูโลสในระดับต่างๆกันและ จะมีปริมาณ ลิกนิน เฉลี่ยร้อยละ 3-13 ปริมาณเชลลูโลสที่พบในพืชชนิดต่างๆ ดังสรุปรวมในตารางที่ 1

ชนิดพืช	ส่วนต่างๆของพืช	ปริมาณเชลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
ข้าวโพด	stover	36
	ซี่ง (cobs)	28
ถั่วลิสง	เปลือก (hulls)	49
ข้าว	แกลบ (hulls)	42
	ฟาง (straw)	30
ข้าวฟ่าง	ต้นแห้ง (hay)	32
	เปลือก (hulls)	51
ถั่วเหลือง	ต้นแห้ง (hay)	31
	เปลือก (hulls)	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดพืช	ส่วนต่างๆของพืช	ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
อ้อย	ต้นแก่ (mature plants)	42
	ชานอ้อย (bagasse)	48
ฝ้าย	เปลือกหุ้มเมล็ด (seed hulls)	60
	เส้นใย	91
	ลำต้น (stalks)	35
ข้าวโอ๊ต	เมล็ด	18
	ฟาง	40
	แกลบ	51
ต้นอัลฟัลฟา	ต้นอ่อนแห้ง (hay-midbloom)	30
	ต้นแก่แห้ง (hay-mature)	36
สับปะรด	กากแห้ง	24.53

**ตารางที่ 1 ปริมาณเซลลูโลสในพืชและส่วนต่างๆของพืช**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.3 แหล่งของเซลลูโลส

ในเซลล์พืชต่างๆที่พบเซลลูโลสมักจะมีสารอินทรีย์อื่นๆรวมอยู่ด้วย ถ้าสารอินทรีย์นั้นละลายได้ใน อะซีโตน, อีเธอร์, เมทานอล, เบนซีน และน้ำ สารนั้นจะมีผลต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทันที ทั้งนี้เนื่องจากการสะสมของสารประกอบดังกล่าวในโครงสร้างที่เป็นหลอดเลือดฝอย (capillary) ของผนังเซลล์ มีผลกีดกันการจับระหว่างเอนไซม์และเซลลูโลส สารประกอบอื่นๆที่ยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ ได้แก่ glutathione, cystine จะมีผลยับยั้งเมื่อเซลลูโลสอยู่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แต่ไม่มีผลที่ซีเตรทบัฟเฟอร์ที่ pH เดียวกัน และถ้าแหล่งของเซลลูโลสต่างกัน ผลการยับยั้งก็ต่างกันด้วย

ลิกนินเป็นสารอินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่จำกัดการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และโดยทั่วไปลิกนินจะรวมตัวอยู่ในโครงสร้างของเซลลูโลส และห่อหุ้มจุดไฟบริลให้รวมกันเป็นกลุ่มใหญ่ ฉะนั้นถ้าจะเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จึงต้องแยกลิกนินบางส่วนออกไป นอกจากนี้ ชนิด ปริมาณ และการกระจายหมู่แทนที่ (substitute groups) เช่น หมู่เมธิล, เอธิล, ไฮดรอกซีเอธิล และคาร์บอกซีเมธิล เป็นต้น เมื่อหมู่เหล่านี้แทนที่อะตอมของไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิลในเซลลูโลสชั้นปฐมภูมิหรือชั้นทุติยภูมิ ทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลส มีผลให้เซลลูโลสผลึกลดลง และมีการละลายเพิ่มขึ้นซึ่งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้ง่ายจนกระทั่งละลายได้อย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นแล้วอนุพันธ์ที่ได้จะย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้น้อย

### 2.1.4 การปรับสภาพของวัสดุเหลือใช้ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ

#### 1. Chemical Treatment

##### - Alkaline Treatment

ใช้ต่างแก่ เช่น NaOH,  $\text{NH}_4\text{OH}$  สารนี้จะมีผลให้เกิดการสลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโมเลกุลเซลลูโลส นอกจากนี้ยังช่วยกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสบางส่วน

- Acid Treatment

ใช้กรดแก่ เช่น  $H_2SO_4$ ,  $HCl$  จะทำให้เฮมิเซลลูโลสละลาย  
น้ำออกมา (Moo-Young, 1978)

- Oxidizing Agent Treatment

ตัวอย่างสารเคมีที่ใช้ ได้แก่

\* โอโซน หรือ Cadaxen ช่วยกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส  
ลดขนาดความยาวโมเลกุลของเซลลูโลส ลดความเป็นผลึก  
และเพิ่มการละลายของเซลลูโลส

\* N-butylamine ช่วยกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส และลด  
ขนาดความยาวโมเลกุลของเซลลูโลส (นฤมล และ ปราณี,  
1989)

นอกจากนี้ยังมีสารเคมีตัวอื่น ๆ อีก เช่น  $NaClO_2$ ,  $KBrO_3$ ,  $KIO_3$   
และ  $SO_2$

2. Physical Treatment

- Steam Explosion Process

หลักการ คือทำให้วัสดุเหลือใช้ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ  
อิมมัตด้วยไอน้ำภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง เมื่อลดความดัน  
ลง น้ำจะระเหยอย่างรวดเร็วจะทำให้ไฟเบอร์แยกออกจากกัน  
เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยา ความชื้น  
และอุณหภูมิจะทำให้พืชปลดปล่อยกรดออกมาซึ่งมีผลต่อการย่อย  
สลายเซลลูโลสด้วย ดังนั้นกระบวนการนี้มีผลทั้งทางฟิสิกส์และ  
ทางเคมีอีกด้วย (Dale, 1982)

- การใช้ความร้อนและความดัน

การใช้ความดันสูงที่อุณหภูมิห้อง ทำให้เซลลูโลสถูกย่อยสลาย  
ได้ดีขึ้น อาจสูงถึง 8000 กิโลกรัม ต่อ ตารางเซนติเมตร

- การใช้อุณหภูมิต่ำ

โดยการแช่เยือกแข็งเซลลูโลส ในน้ำที่อุณหภูมิ  $-75^{\circ}\text{C}$  ทำให้ความแข็งแรง และความยาวของสายโมเลกุลเซลลูโลส ลดลง นอกจากนี้การแช่เยือกแข็งสลับกับการละลายน้ำหลายๆ ครั้งติดต่อกันจะทำให้เซลลูโลสอ่อนตัวและสายโมเลกุลสั้นลงไป

- การฉายรังสี

ใช้รังสีแกมมาหรืออิเล็กตรอนที่มีความเร็วสูง ทำให้เซลลูโลส ถูกย่อยได้ดีขึ้น เนื่องจากความยาวของสายโมเลกุลเซลลูโลส สั้นลง

- การม่ หรือ การบด

เป็นการใช้แรงบีบอัดและแรงเฉือน ทำให้ขนาดอนุภาค และความยาวโมเลกุลลดลง

การปรับสภาพสัปสเตอร์ท ส่วนใหญ่นิยมใช้หลายวิธีรวมกัน เช่น อาจใช้ต่างร่วมกับความร้อน หรือ การใช้การบดร่วมกับการใช้กรด เป็นต้น Han และ Callihan (1974) ได้ทำการทดลองปรับสภาพ ฟางข้าวและชานอ้อย โดยใช้ 4% NaOH 15 นาที 100 องศาเซลเซียส พบว่า ทำให้การย่อยสลายเซลลูโลส โดยใช้เชื้อ *Cellulomonase* ssp. เพิ่มจาก 29.4% เป็น 73% การปรับสภาพด้วย  $\text{NH}_3$  การย่อยสลายเซลลูโลสเพิ่มเป็น 57% และนอกจากนี้ได้ทำการปรับสภาพด้วย  $\text{H}_2\text{SO}_4$  แต่ปรากฏว่าไม่มีอัตราการเพิ่มของการย่อยสลาย และได้ทดลองใช้วิธีการบดและการใช้ความดันสูงปรากฏว่ามีผลเพียง เล็กน้อยต่อการย่อยสลาย

Ginnivan (1977) พบว่า การปรับสภาพหญ้า และฟางข้าว บาร์เลย์ ด้วย NaOH 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) จะทำให้การย่อยสลายเซลลูโลส โดยใช้เชื้อ *Thermomonospora fusca* และ *Pseudomonas thermophila* ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Miron (1981) ได้ใช้  $\text{SO}_2, \text{O}_3$  และ NaOH ในการปรับสภาพ Cotton Straw แล้วนำ Substrate ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ย่อยสลายต่อโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* ผลการทดลองปรากฏว่า  $\text{SO}_2$  ที่ปรับสภาพที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงไม่สามารถลดปริมาณลิกนิน แต่ลดปริมาณเฮมิเซลลูโลสลง 48% การใช้  $\text{O}_3$  (1 กรัม โอโซน/5 กรัม cotton straw) ลดปริมาณลิกนินลง 40% และเฮมิเซลลูโลส 54% ส่วนการปรับสภาพด้วย NaOH 25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 1 สัปดาห์ ไม่สามารถละลายส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชได้

Chen (1982) ได้ทำการย่อยสลาย Microcrystalline Cellulose และ Avicel โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma viride* โดยปรับสภาพ Substrate ด้วยสารละลายเข้มข้นของ  $\text{ZnCl}_2$  และ 0.5% HCl ให้ความร้อน  $145^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 6 นาที เมื่อเย็นแล้วนำไปตกตะกอนด้วย อะซีโตน แล้วจึงนำเซลลูโลสไปย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ต่อไป

Vidand (1982) ได้ใช้วิธีทางฟิลิกส์และทางเคมีในการปรับสภาพฟางข้าว ก่อนที่จะนำไปย่อยสลายโดยเอนไซม์ พบว่าการใช้การบดและตามด้วยการใช้ความร้อน  $110^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที จะเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายโดยเอนไซม์ได้มาก

Mes-Hartee และคณะ (1983) ปรับสภาพฟางข้าวบาร์เลย์ ฟางข้าวสาลี ต้นข้าวโพด และต้น Alfalfa โดยวิธีทำให้เนื้อเยื่อแยกออกจากกัน ด้วยไอน้ำร้อนก่อนที่จะนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma* E58

Rao (1983) ได้ทำการทดลองปรับสภาพชานอ้อย ด้วย 1 N NaOH ที่ทำให้ร้อน และ Neutralize โดย HCl และปรับสภาพด้วยไอน้ำ เปรียบเทียบชานอ้อยที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโดยการย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Penicillium funiculosum* พบว่า เซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ปรับสภาพด้วยด่าง ย่อยได้ 17% เซลลูโลสที่ Neutralize ด้วยกรด ย่อยได้ 63% ส่วนที่ปรับสภาพด้วยไอน้ำ ย่อยได้ 52%

Mishra (1984) ได้ทำการปรับสภาพ Substrate คือชานอ้อย และเยื่อไม้โดยใช้การบดและร่อนผ่านตะแกรง เพื่อให้ได้อนุภาคขนาด 20 Mesh และปรับสภาพอีกครั้งโดยเปรียบเทียบระหว่าง 5 M NaOH, 1 M NaOH, 1% Acetyl Trimethyl, Ammonium Bromide ใน 1 M NaOH, 0.1% CuSO<sub>4</sub> และ 0.001% EDTA ใน 1 M NaOH แต่ละ Treatment ใช้เวลา 18 ชั่วโมง ที่ 28°C และ Treatment สุดท้ายที่ใช้คือ 0.25 M NaOH 60 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง Substrate ที่ผ่านการปรับสภาพ จะต้องล้างด้วยน้ำจนปราศจากด่าง และผลการทดลองปรากฏว่า การใช้ 5 M NaOH จะให้การย่อยสลาย Substrate โดยเอนไซม์จากเชื้อ *Pennicillium funiculosum* ได้ดีที่สุด สมพร และ สันตน์ (2533) แสดงให้เห็นว่า ชิงข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วย 2% HCl เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยระยะเวลาของการหมัก 72 ชั่วโมง ให้ประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดคือ 2.443 Units/ml. และลดลงตามลำดับ เมื่อใช้ระยะเวลาของการปรับสภาพ 4, 24, 36 และ 72 ชั่วโมง ระยะเวลาการหมักที่เหมาะสม สำหรับการปรับสภาพของทุกการทดลองคือ 72 ชั่วโมง

## 2.2 เซลลูเลส

### 2.2.1 ระบบของเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส มี systematic name ว่า  $\beta$ -1,4-gluconohydrolase

จากการศึกษาโดยการแยกและทำเอนไซม์บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเป็น Multicomponent enzyme มีระบบเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด มาร่วมทำงาน คือ (Ryu และ Mendels, 1980 : Fan และ Lee , 1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Endo  $\beta$ -1,4 glucan gluconohydrolase หรือ Endogluconase (EC 3.2.1.4) การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ตัดพันธะ  $\beta$ -1,4 glucosidic ภายในสายเซลลูโลสบริเวณที่เป็น amorphus หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น Carboxy-methyl cellulose, Walseth cellulose และ Celloligomer เอนไซม์นี้จะตัดพันธะอย่างสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ Glucose ( $\beta$ -configuration) และ Cellobiose โดยจะได้ Cellobiose เป็นหลัก

2. Exo  $\beta$ -1,4 glucan gluconohydrolase หรือ Exoglucanase หรือ  $C_1$  (EC 3.2.1.121) การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ตัดพันธะ  $\beta$ -1,4 glucosidic จากปลายด้าน non-reducing ทำให้ได้ Glucose หรือ Cellobiose น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายจะมีการจัดตัวเรียงเป็น  $\alpha$ -configuration

3.  $\beta$ -glucosidase หรือ Cellobiase (EC 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย Cellobiose, Celloligopsaccharide สายสั้น และ Cellodextrin จากปลายด้าน reducing-end อัตราการย่อยสลายขึ้นกับความยาวของสายโมเลกุล อัตราเร็วจะลดลงเมื่อความยาวของสายเพิ่มขึ้น ผลผลิตที่ได้คือ Glucose นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลาย Cellobionic acid ให้เป็น Glucanolactone และ Glucose (Eriksson, 1978)

### 2.2.2 แหล่งของเซลลูเลส

เนื่องจากเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นทางยาว จุลินทรีย์ไม่สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง ดังนั้นจุลินทรีย์จึงต้องสร้าง Extra-cellular Enzyme ออกมาย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้และสามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกว่า เอนไซม์เซลลูเลส มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tracy (1951) พบว่าไส้เดือนสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสได้ นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์นี้ใน หอยทาก หอยทะเล Cray Fish และ Sea Urchin ด้วย (Whitaker, 1971)

จุลินทรีย์นี้มีความสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสมาก จุลินทรีย์หลายชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลส มักอยู่ในกลุ่ม เชื้อรา บักเตรี และแอกติโนมัยสิท ดังแสดงในตารางที่ 2

จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ควรมีคุณสมบัติที่เติบโตง่าย ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงสามารถเคลื่อนย้ายเอนไซม์ ออกจากมวลเซลล์ได้ดี ไม่กลายพันธุ์ง่าย และประการสำคัญต้องไม่ทำให้เกิดโรคหรือ สร้างสารพิษ จุลินทรีย์ที่นำมาศึกษาอย่างมากในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ *Trichoderma reesei* และ *Aspergillus niger*

*Trichoderma reesei* เป็นเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสทั้งระบบได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นเชื้อราที่มีการนำมาศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสกันมากที่สุด สายพันธุ์ที่ใช้กันปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ ที่ปรับปรุงจาก *Trichoderma reesei* QM 6A โดย US Army Research And Development Command และจากสายพันธุ์นี้ได้มีการพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ QM 9123 และ QM 9414 ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เพิ่มขึ้น(ตารางที่ 3) ประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสในฟิลเทรทของเชื้อ *Trichoderma* sp. สามารถเก็บไว้ในที่เย็นหรือไลโอไฟล์เซชัน หรือผงอะซิโตน ได้เป็นเวลานาน โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติ (Stenberry, 1976) สายพันธุ์กลายเหล่านี้บางสปีชีส์ สามารถสร้างโปรตีนนอกเซลล์ได้ถึง 10-20 กรัม/ลิตร ส่วนประกอบหลักของโปรตีนชนิดนี้ คือ เซลโลไบโอไฮโดรเลส ซึ่งมีอยู่ประมาณ 50-80% ของโปรตีนที่ขับออกมา นอกจากนี้ยังมีเอนโดกลูโคเนส อยู่ในสัดส่วนที่น้อยกว่า และเบตากลูโคซิเดส อยู่ใน ระดับที่ต่ำมาก (Emari, 1983 : Gay, 1979) ตารางที่ 3

Fungi	Bacteria	Actinomycetes
<u>Alternaria</u>	<u>Bacilus</u>	<u>Micromonospora</u>
<u>Aspergillus</u>	<u>Cellomonas</u>	<u>Nocardia</u>
<u>Chaetomium</u>	<u>Clostridium</u>	<u>Streptomyces</u>
<u>Coprinus</u>	<u>Corynebacterium</u>	<u>Streotasperangium</u>
<u>Foanes</u>	<u>Cytophaga</u>	
<u>Fusarium</u>	<u>Polyangium</u>	
<u>Myrothecium</u>	<u>Pseudomonas</u>	
<u>Penicillium</u>	<u>Sporocytophaga</u>	
<u>Polyporus</u>		
<u>Rhizopus</u>		
<u>Trametes</u>		
<u>Trichoderma</u>		
<u>Trichothecium</u>		
<u>Verticillium</u>		
<u>Zygorhynchus</u>		

ตารางที่ 2 แสดง Genus ของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส

ที่มา : Alexander (1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

QM Strain	Dry weight <sup>b</sup> mg/ml	Soluble protein mg/ml	C <sub>x</sub> u/ml		Cellulase FP u/ml		Cotton mg/ml	
			FC	H <sup>d</sup>	FC	H <sup>d</sup>	FC	H <sup>d</sup>
Ca <u>Trichoderma viride</u>	2.4	0.7	8	10	0.3	0.3	1.9	1.6
9123 <u>Trichoderma viride</u>	1.6	1.5	22	29	0.9	0.9	3.4	3.5
9414 <u>Trichoderma viride</u>	1.1	1.5	32	32	1.0	1.1	3.0	2.9
9316 <u>Trichoderma viride</u>	9.0	0	0	0	0	0	0.1	0.1
8814 <u>Streptomyces</u> SP	2.5	0.5	2	0	0.1	0	0.3	0.1
9624 <u>Penicillium</u> <u>iriensis</u>	1.8	0.5	14	17	0.5	0.5	1.1	1.3
9145 <u>Chrysosporium</u> <u>liqorum</u>	5.0	0.1	0	3	0	0.2	0.2	0.4
381 <u>Pestalotopsis</u> <u>westerdijkii</u>	3.7	0.1	4	4	0.2	0.2	0.4	0.3
806 <u>Sporotrichum</u> <u>dimerphosporum</u>	0.8	0.8	21	22	0.2	0.3	0.3	0.5
826 <u>Chrysosporium</u> <u>prulosum</u>	2.4	0.6	4	3	0.2	0.3	0.5	0.6

ตารางที่ 3 การผลิตเซลล์โดย Mesophilic Cellulolytic Fungi

ที่มา : M. Mandels (1975)

a. เลี้ยงเชื้อ 14 วันบน 1% pulp, 0.1% proteose peptone,

0.2% tween 80, 0.01% yeast extract

b. รวม cellulose ที่ตกค้าง

c. ทำการวัดประสิทธิภาพจากฟิลเตรท

d. ทำการวัดประสิทธิภาพจากฟิลเตรทและเชื้อ

เพื่อที่จะขจัดปัญหาที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากการที่เอนไซม์ของ *Trichoderma reesei* มีเบตาไกลูโคซิเดสต่ำ จึงมักทำการเติมเบตาไกลูโคซิเดส ที่ผลิตแยกต่างหากลงในระบบ เชื้อราที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ผลิตเบตาไกลูโคซิเดส ได้แก่ *Aspergillus* sp. บางสายพันธุ์ เช่น *Aspergillus niger* (Enari, 1983 : Lutzen, 1983) *Aspergillus phenicis* (Stenbry, 1977) ทั้งนี้ เพราะเชื้อราเหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้เป็นจำนวนมาก และมีค่า Dissociation Constant (K<sub>i</sub>) สูง (ตารางที่ 4 และ 5) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การใช้เซลล์ทั้งระบบ ได้จาก *Aspergillus* sp. ร่วมกับเอนไซม์เซลล์ ที่ได้จาก *Trichoderma reesei* จะทำให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์สูงกว่า การใช้เฉพาะเบตาไกลูโคซิเดสชนิดเดียวจาก *Aspergillus* sp. ร่วมกับเอนไซม์ เซลล์ได้จาก *Trichoderma reesei* (Lutzen, 1983)

เอนไซม์เซลล์จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติทางเคมี และฟิสิกส์ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 6 และ 7 ซึ่งแสดงถึงน้ำหนักโมเลกุล Relative Velocity และ Michaelis Constant ของเอนไซม์เซลล์ที่ได้ จากจุลินทรีย์บางชนิด เอนไซม์เซลล์ที่ได้จากเชื้อ *Trichoderma reesei* เมื่อนำไปแยกออกเป็นส่วและนำไปทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเซลล์ทั้งสามชนิดเกิดขึ้น ได้หลายแบบดังแสดงในตารางที่ 8 *Trichoderma reesei* มีการสร้างเอนไซม์ เอนโดกลูคาเนส I และ II และเซลโลไบโอไฮโดรเลส CBH I และ CHB II (Enari, 1983) เซลโลไบโอไฮโดรเลส แต่ละแบบจะมีปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน เซลโลไบโอไฮโดรเลส I (CHB I) สามารถแบ่งย่อยออกได้ 4 ไพอโซไซม์ แต่ละไพอโซไซม์ มีมวลโมเลกุลเท่ากัน มีชนิดของกรดอะมิโนเหมือนกันและมีปริมาณ โพลีแซคคาไรด์อยู่ระหว่าง 1-10% สำหรับเซลโลไบโอไฮโดรเลส II (CBH II) มี 2 ไพอโซไซม์

เอนไซม์	ปริมาณสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนนอกเซลล์ทั้งหมด)	
	<u>Trichoderma reesei</u>	<u>Aspergillus niger</u>
เซลโลไบโอไฮโดรเลส	50 - 80	0
เอนโดกลูคาเนส	8 - 12	2 - 3
$\beta$ -กลูโคซิเดส	0.2 - 1	2 - 3

ตารางที่ 4 ปริมาณสัมพัทธ์ของเซลล์เลสที่สร้างขึ้นโดยเชื้อ  
*Trichoderma reesei* และ *Aspergillus niger*

แหล่งที่มาของ $\beta$ -กลูโคซิเดส	Km (มิลลิโมลาร์)	Ki สำหรับตัวยับยั้ง		Vmax* เอนไซม์ มิลลิกรัม
		กลูโคส (มิลลิโมลาร์)	กลูโคโนแลคโตน (มิลลิโมลาร์)	
<u>Trichoderma reesei</u>	0.8	2.1	0.04	1400
<u>Aspergillus niger</u>	0.2	0.7	0.04	700

ตารางที่ 5 ค่า Michaelis-Menten Constant ( $K_m$ ) และ ( $X_i$ )  
สำหรับ  $\beta$ -glucosidase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Source	Value	Condition
<i>Myrothecium verrucaria</i>	63000	-
Component	55000	
Component	30000	Sephadex G 75
Component	5300	
<i>Trichoderma viride</i>	61000	Sephadex G 75
	52000	
<i>Polyporus vesicolor</i>	11000	pH 5
	51000	pH 5

ตารางที่ 6 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์

ที่มา : Berman (1969)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Source	Substrates	Relative	K <sub>m</sub>	Condition
<i>M. verrucaria</i>	Cellobiose	0.012-0.015	-	pH 5.0 Temp. 35 องศาเซลเซียส
	Cellotriose	0.050	-	
	Cellotetraose	1.00	-	
	Cellopentaose	1.13	-	
	Cellohexaose	1.13	-	
<i>T. viride</i>	Cellobiose	-	$1.9 \times 10^{-2}$	pH 4.8 Temp. 40 องศาเซลเซียส
	Cellotriose	-	$3.1 \times 10^{-3}$	
	Cellotetraose	-	$2.8 \times 10^{-3}$	
	Cellopentaose	-	$7.0 \times 10^{-4}$	
	Cellohexaose	-	$1.0 \times 10^{-4}$	

ตารางที่ 7 Relative Velocity และ Michaelis Constant

ของเอนไซม์เซลลูเลส

ที่มา : Berman (1969)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของเอนไซม์	มวลโมเลกุล	จุดไอโซอิเล็กตริก
เซลโลไบโอดีเอส		
เซลโลไบโอดีเอส I (CBH I)	60,000	3.9
เซลโลไบโอดีเอส II (CBH II)	60,000	5.6
เอนโดกลูคาเนส		
เอนโดกลูคาเนส I	20,000	7.5
เอนโดกลูคาเนส I	40,000	4.6
เบตาไกลูโคซิเดส		
เบตาไกลูโคซิเดส I	47,700	5.74
เบตาไกลูโคซิเดส II	35,000	--*
เบตาไกลูโคซิเดส III	130,000	--*

ตารางที่ 8 เซลลูเลสชนิดต่างๆที่แยกจาก *Trichoderma reesei*

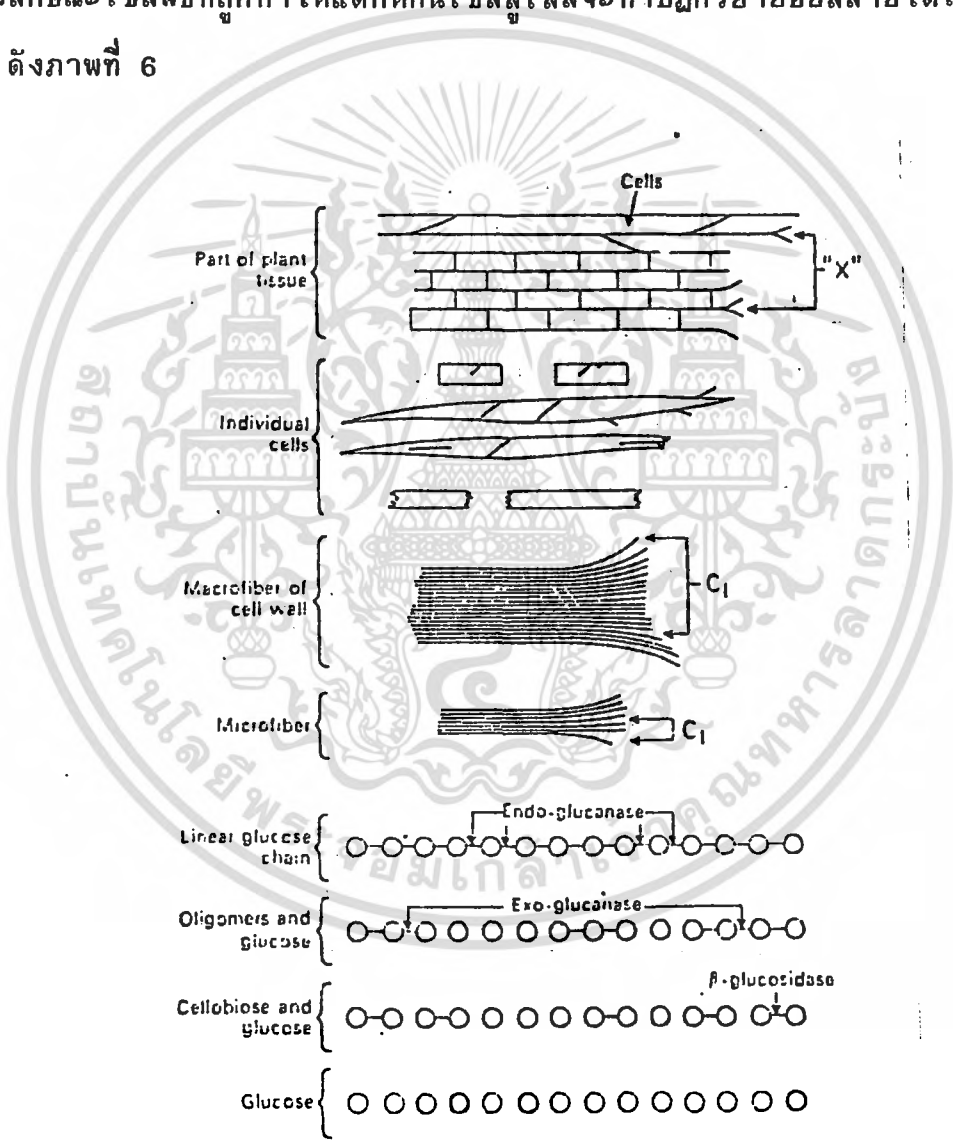
\* ไม่ได้ทำการตรวจสอบ

ที่มา : Enari (1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3. ความจำเพาะต่อสปีสแตก

Cowling ได้เสนอสมมติฐานเกี่ยวกับความจำเพาะต่อสปีสแตกของเซลลูเลส โดยได้อธิบายว่า เอนไซม์ "X" ที่มีกพบว่าอยู่ร่วมกับเซลลูเลสจะย่อยสลายสปีสแตกเป็นอันดับแรกที่ทำหน้าที่เยื่อบางส่วนกลาง (middle lamella) มีผลให้เซลล์พืชถูกแยกออกจากกันได้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ในที่สุด ผนังเซลล์บาง เซลล์แตก และหัก ซึ่งลักษณะเซลล์พืชที่ถูกทำให้แตกหักนี้ เซลลูเลสจะทำปฏิกิริยาย่อยสลายได้เป็นลำดับไป ดังภาพที่ 6



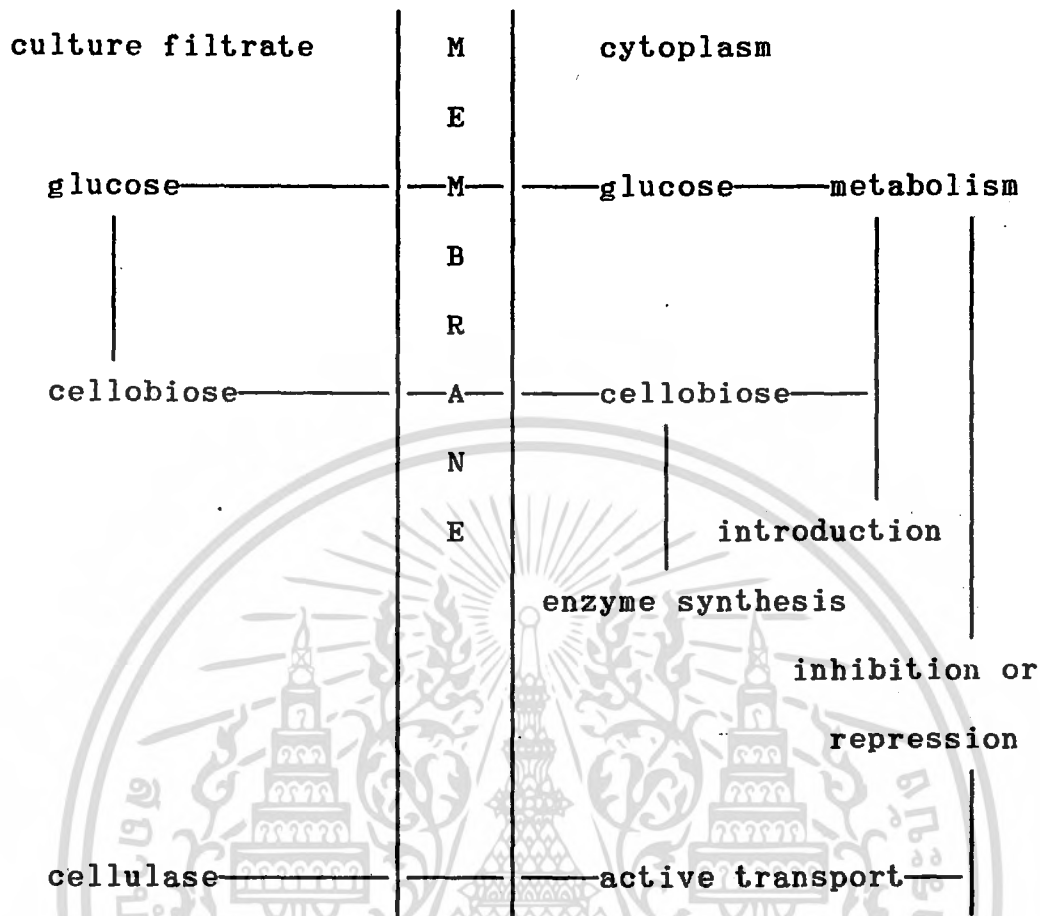
ภาพที่ 6 ความจำเพาะของเซลลูเลสต่อสปีสแตก ตามสมมติฐานของ Cowling

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 2.2.4 กลไกควบคุมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ชนิดเหนียวน่า (Inducible Enzyme) จะสร้างขึ้นก็ต่อเมื่อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลส หรือสารประกอบที่มีพันธะ  $\beta$ -1,4 glucosidic เช่น lactose, sacalin, cellobiose, sophirose ดังนั้นในสภาพที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจุลินทรีย์ก็จะสร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกมาเรื่อยๆ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถละลายน้ำได้ และสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ดังแสดงในภาพที่ 7

Mendels และ Weber (1969) ทำการทดลองเปรียบเทียบการใช้ proflo (cottonseed flour) กับเปปโตน ซึ่งราคา proflo ถูกกว่า แต่ต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นที่สูงกว่า และมีช่วง lag phase ยาวนานกว่า



ภาพที่ 7 การสังเคราะห์และการควบคุมการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส  
ในเชื้อรา *Trichoderma reesei*  
ที่มา: Ross และคณะ (1983)

Nisizawa (1972) ได้ศึกษาการยับยั้ง (catabolite repression) การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในเชื้อรา *Trichoderma viride* โดยการเปรียบเทียบ กลูโคส actinomycin D และ puromycin โดยที่ actinomycin D และ puromycin เป็นยาปฏิชีวนะ ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระดับ transcription และ translation ตามลำดับ พบว่า กลูโคส จะยับยั้งการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดย sophorose มีลักษณะคล้ายกับการยับยั้งการสร้างโปรตีนโดย puromycin นั่นคือ catabolic

repression ที่เกิดจากการลดอัตราการ translation ของ Cellulase mRNA นอกจากนี้ กลูโคสจะทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยตรงแล้ว สารอื่นที่มีความสัมพันธ์กับกลูโคส ในระบบ Metabolism ก็ยังมีหน้าที่ยับยั้งได้อีกด้วย เช่น succinate, malate, glutamate, glycerol, fructose, gluconate และ ATP เป็นต้น

Eriksson (1978) ศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ในการย่อยสลายเซลลูโลสของ *Sporotrichum pulverulentum* พบว่า ระดับความเข้มข้นของ กลูโคสและแมนโนส ที่ยับยั้งการทำงานของ  $\beta$ -glucosidase มีค่าประมาณ 0.25-0.5  $\mu$ M Xylose มีค่าประมาณ 7 mM และกาแลคโตส มีค่าน้อยกว่า 6 mM เซลโลไบโอสจะกระตุ้นการทำงานของเซลโลไบเอสได้ทันทีที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 3 mM นอกจากนี้จะควบคุมระดับปริมาณน้ำตาลแล้ว ยังควบคุมได้โดยระดับเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น cellobiose oxidase, cellobiose quinone oxidoreductase เอนไซม์ทั้งสองนี้ทำหน้าที่ oxidise cellobiose ให้เป็น cellobiono-sigma-lactone ในระดับนี้จะช่วยลดความเข้มข้นของ เซลโลไบโอส ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ endogluconase และ exogluconase นอกจากนี้ glucose oxidase ยัง oxidise glucose ให้เป็น gluconolactone ส่วนเอนไซม์ phenol oxidase นอกจากจะมีความสำคัญต่อการควบคุมการย่อยสลายลิกนินแล้ว ยังมีความสำคัญในการควบคุมการสร้าง เอนไซม์ ที่ย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ อีกด้วย

Ryu และ Mendels (1980) กล่าวว่ากลูโคสเป็นสารยับยั้งที่มีฤทธิ์ปานกลาง (moderately inhibitor) แต่ เซลโลไบโอส เป็นสารยับยั้งที่มีฤทธิ์แรง (strong inhibitor) ต่อกลไกการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลส เซลโลไบโอส จะถูกยับยั้งโดยกลูโคสเป็นแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) ระหว่างเซลโลไบโอสกับกลูโคส ถ้าอัตราส่วนระหว่างกลูโคส และเซลโลไบโอสสูง จะยับยั้งการทำงานของเซลโลไบเอส มีผลทำให้เกิดการสะสมของเซลโลไบโอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเซลโลไบโอสที่มากขึ้นจะช่วยยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ endo-glucanase และ cellobiohydrolase

Fan และ Lee (1983) อธิบายถึงการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลสมี 2 แบบ คือแบบแข่งขัน (competitive) และแบบไม่แข่งขัน (non-competitive) การยับยั้งแบบแข่งขันของเอนไซม์จะถูกยับยั้งโดยกลูโคสและเซลโลไบโอส โดยที่เซลโลไบโอสจะเป็นตัวยับยั้งที่มีฤทธิ์แรง การยับยั้งแบบไม่แข่งขันจะเกิดในระยะการเข้าย่อยสลายเซลลูเลสที่บริเวณผิวหน้า

Lutzen และคณะ (1983) กล่าวว่า เซลโลไบโอส หรือ  $\beta$ -glucosidase เป็นเอนไซม์ที่จำกัดอัตราเร็วของปฏิกิริยา (rate limiting enzyme) ดังนั้นในสภาพที่มีเซลโลไบโอสสะสมมากขึ้น จะยับยั้งการทำงานของ endoglucanase และ cellobiohydrolase

Montencourt (1983) อธิบายถึงการควบคุมการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลสของ *Trichoderma reesei* ว่านอกจากจะถูกควบคุมโดยกระบวนการทางชีวเคมีแล้ว ยังถูกควบคุมโดยยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ endoglucanase และ cellobiohydrolase เป็นแบบ inducible หรือ repression gene ทำให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดดังกล่าวถูกควบคุมโดยสับสเตรทหรือผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ เซลโลไบโอส ส่วน  $\beta$ -glucosidase มียีนที่ควบคุมที่ทำให้การสร้างเอนไซม์เป็นแบบ constitutive และถูกยับยั้งการทำงานโดยกลูโคส

Ross และคณะ (1983) อธิบายถึงกลไกการสร้างและการยับยั้งการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในรา *Trichoderma reesei* ว่า  $\beta$ -glucosidase จะถูกควบคุมโดยปริมาณกลูโคสและเซลโลไบโอส โดยที่กลูโคสจะทำหน้าที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เป็นตัวยับยั้ง

### 2.2.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส

ปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจสอบการทำงานของเซลลูเลส มีอยู่ด้วยกัน 2 ประการ คือ

ประการที่ 1 เอนไซม์ที่จะนำมาตรวจสอบ ส่วนมากจะไม่ใช่เอนไซม์บริสุทธิ์ มักจะเป็นสารละลายที่ประกอบด้วยเซลลูเลสชนิดต่างๆ หลายชนิดผสมกัน เนื่องจากกลุ่มเอนไซม์เหล่านี้มีการทำงานที่เกี่ยวพันกันและกัน ดังนั้นสัดส่วนเอนไซม์ชนิดต่างๆ จึงมีอิทธิพลอย่างมากต่อการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์

ประการที่ 2 สับสเตรทที่จะนำมาวัดนั้น มักเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ซึ่งยากต่อการทำให้ได้มาตรฐาน สับสเตรทที่เหมาะสมควรเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ และมีความจำเพาะ

แนวทางการพัฒนาวิธีการตรวจสอบประสิทธิภาพของเซลลูเลส มีอยู่ 2 แนวทาง ได้แก่

แนวทางเชิงเทคนิค (Technical Approach) การใช้เซลลูเลสเชิงเทคนิค ที่สำคัญ ได้แก่ การผลิตกลูโคสจากวัสดุเซลลูโลสชนิดต่างๆ ดังนั้นตามแนวทางนี้จึงทำให้เกิดวิธีการวัดการทำงานของเซลลูเลส โดยอาศัยสับสเตรทประเภทวัสดุเซลลูโลสที่เหมาะสม ได้แก่ กระดาษกรอง และทำการวัดกลูโคสซึ่งเป็นผลผลิตขั้นสุดท้ายที่เกิดขึ้น โดยวิธีการนี้จะได้ค่าประสิทธิภาพรวมในการทำงานของเซลลูเลส แต่ไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าเอนไซม์ตัวใดที่เป็นตัวกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมี วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสม ที่จะใช้ตรวจวิเคราะห์ความสามารถของสารเชิงซ้อนเอนไซม์ชุดหนึ่งในการไฮโดรไลซ์เซลลูโลส

แนวทางเชิงชีวเคมี (Biochemical Approach) มีจุดมุ่งหมายเพื่อหาประสิทธิภาพของเอนไซม์แต่ละตัว ย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ และเป็นประโยชน์อย่างมากในการนำมาใช้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสรวมถึงการพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์ สิ่งที่เป็นอุปสรรคต่อการพัฒนาวิธีการที่จะใช้วัดประสิทธิภาพเอนไซม์แต่ละตัว ได้แก่ การขาดสับสเตรทหรือตัวยับยั้งที่จำเพาะที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะใช้วัดประสิทธิภาพเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ ในขณะที่มีเอนไซม์ชนิดอื่นด้วย

การตรวจสอบประสิทธิภาพรวมเชิงย่อยเซลลูโลส สับสเตรทที่นำมาใช้ ในการตรวจสอบ ควรจะเป็นวัสดุเซลลูโลสไม่ละลายน้ำ และถูกไฮโดรไลซ์ได้ไม่ ง่ายนัก แต่ขณะเดียวกันต้องเป็นวัสดุซึ่งสามารถทำให้ได้มาตรฐานอีกด้วย ปัจจัย อีกประการหนึ่งที่เกี่ยวข้องคือ ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากสับสเตรท เป็นวัสดุประเภทเส้นใยไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงต้องใช้เวลาเอนไซม์แพร่เข้าไปถึง เส้นใย อุปสรรค อีกประการหนึ่งที่เกิดขึ้นมาจากการที่เอนไซม์จะเข้าถึงพันธะ กลูโคซิดิก ที่บริเวณต่างๆกันของเส้นใย ได้ง่ายยากไม่เท่ากัน ดังนั้นระยะเวลา ที่ใช้ในการวิเคราะห์ จึงต้องนานพอที่จะให้เอนไซม์เข้าไปไฮโดรไลซ์ตรงบริเวณ ที่เอนไซม์เข้าไปได้ยาก สับสเตรทที่นำมาใช้เพื่อทดสอบการทำงานของเอนไซม์ ประกอบด้วยเส้นใยฝ้าย เอวิเซล ซิลไฟล์พัลฟ์ และกระดาษกรอง แต่สับสเตรท ที่มีการพิสูจน์ว่าเหมาะสมที่สุด คือกระดาษกรอง ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา คือ 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นในสภาวะมาตรฐาน การตรวจสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ สับสเตรทที่นำมาใช้ตรวจสอบ แสดงใน ตารางที่ 9

Enzyme	Substrate	Product Measured
Cellobiase β Glucosidase	Cellulose Cellodextrins Salicin p Nitrophenyl β Glucoside	Glucose Saligenin p Nitrophenol
Endo β 1, 4 Glucanase C <sub>x</sub> CMC'ase	Carboxymethyl Cellulose Amorphous Cellulose Walseth Sweco Cellodextrins	Loss in Viscosity Reducing Sugar
Exo β 1, 4 Glucanase A Glucocellulase B Cellobiohydrolase CBH C1	Amorphous Cellulose Walseth Crystalline Cellulose Avicel Cellodextrins	Glucose (A) Cellulose (B)
Cellulase C <sub>1</sub> + C <sub>x</sub> Avicellase Hydrocellulase FP'ase	Crystalline Cellulose Avicel Hydrocellulose Filter Paper Cellodextrins Cotton	Loss in Weight Reducing Sugar Reduction in OD
Miscellaneous Swelling Factor Filter Paper Cellulase	Cotton Filter Paper Thread Dyed Cellulose	Uptake of Alkali Maceration [1] Breaking Strength Release of Dye

ตารางที่ 9 การตรวจสอบเอนไซม์เซลลูเลส

ที่มา : M. Mendels (1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

### 1. อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน

Mendels และ Reese (1957) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 0.75% โดยใช้ Hammer milled cellulose (Solka floc(sw 40))

Sukan, Guray และ Vardar (1989) กล่าวว่า ความเข้มข้นของ Fatty acid จะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ถูกลำกัดโดยการเติมกลุ่มสารที่มีส่วนประกอบของ ไนโตรเจน และ คาร์บอน มากๆ เพื่อขัดเชยที่ขาดแคลนในน้ำมัน

### 2. อิทธิพลของอนุมูลโลหะ (Metal Ion)

Mendels และ Reese (1957) พบว่า การเติมโคบอลต์ และแคลเซียม ไม่จำเป็นต่ออัตราการเจริญเติบโต แต่มีผลช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

Cowling และ Kirk (1967) พบว่า  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$  และ  $Ca^{2+}$  เป็นสารที่สามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ส่วนโลหะหนักบางชนิด เช่น  $Ag^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Na_2S_2O_3$  และโซเดียมบอเรต สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้

### 3. อิทธิพลของอุณหภูมิ

Sternberg (1976) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 27-28 °C อุณหภูมิที่สูงมากกว่า 55 °C จะลดประสิทธิภาพและอัตราเร็วของปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว

### 4. อิทธิพลของ pH

Kim, Yang และ Jeong (1988) พบว่า pH มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Trichoderma reesei* อย่างมากที่ pH สูงกว่า 5.2 ประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ผลิตโดยเชื้อราชนิดนี้ลดลงอย่างรวดเร็ว อธิบายได้ว่าการเปลี่ยนแปลง pH มีผลต่อสภาพการเป็นไอออนของหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนโมเลกุลของโปรตีน การเปลี่ยนแปลง pH มีผลอย่างชัดเจนต่อตำแหน่งที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาบนผิวของเอนไซม์เซลลูเลส และรูปร่างลักษณะของเอนไซม์ ค่า pH ที่สูงหรือต่ำเกินไปมีผลทำให้เกิดการเสื่อมสภาพและหยุดการทำงานของเอนไซม์

#### 5. อิทธิพลของแรงตึงผิว (Surfactant)

Reese และ Magnire (1971) พบว่า Tween 80 และ Tween 40 ช่วยให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ในการเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma* sp. ความเข้มข้นของ Tween 80 ที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.2% สำหรับกลไกของปฏิกิริยาการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์โดย Tween นั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจ แต่อาจจะเกี่ยวข้องหรือมีความสัมพันธ์กับเยื่อหุ้มเซลล์ในการยอมให้มีการผ่านของเอนไซม์ออกมาอย่างรวดเร็ว

Pathak และ Ghose (1973) กล่าวว่า การเติมสารลดแรงตึงผิวบางชนิด เช่น Tween 80, Sucrose, Monopulmalate และ non-ionic surfactant อื่นๆ ทำให้เชื้อรา *Trichoderma viride* มีการสร้างเอนไซม์มากขึ้น

Sukan, Guray และ Vardar (1989) แสดงให้เห็นว่าการใช้ Tween 80 ความเข้มข้น 0.1% (v/v) ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *T. reesei* และ *S. pulverulentum* มีผลทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์มากขึ้น อธิบายได้ว่า Tween 80 ไม่มีผลช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์ แต่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง fatty acid กลไกการเพิ่มขึ้นของ Tween 80 ที่ความเข้มข้นต่ำยังไม่เป็นที่เข้าใจ แต่คาดว่า การเข้ารวมกันของ fatty acid เข้าไปในผนังเซลล์ของเชื้อรา อาจเปลี่ยน permeability ของผนังเซลล์ เป็นผลให้มีการหลั่งผลผลิตออกมาเร็วขึ้น

#### 6. อิทธิพลของสารควบคุมการเกิดฟอง (Antifoam)

Sukan, Guray และ Vandar (1989) ทดลองใช้น้ำมันธรรมชาติ 10 ชนิด เป็นสารควบคุมการเกิดฟองในการเลี้ยงเชื้อ *T. reesei*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ *S. pulverulentum* พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันธรรมชาติ 0.4% (v/v) ให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันธรรมชาติ 0.2% (v/v) 1-5 เท่า อธิบายได้ว่า น้ำมันธรรมชาติมีผลยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ เมื่อความเข้มข้นของน้ำมันธรรมชาติมากขึ้น อธิบายได้ว่า เกิดจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ permeability ของเซลล์ซึ่งเป็นผลมาจากการดูดซึม fatty acid ที่ผิวเซลล์ ซึ่ง fatty acid นี้จะยับยั้งคุณสมบัติของผิวเซลล์โดยเปลี่ยนแรงยึดที่ผิวระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์กับของเหลวภายนอกเซลล์

### 2.2.7 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์เซลลูเลส

1. ใส่ในอาหารที่มีกากมาก เพื่อลดปริมาณกากอาหาร ช่วยเพิ่มคุณภาพการบริโภคให้ดีขึ้น
2. ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ ช่วยให้น้ำผลไม้ใสขึ้น
3. ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ ช่วยให้การละลายของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ดีขึ้น ได้ fiber ที่มีคุณภาพ ทำให้ได้กระดาษที่มีความทนทานเพิ่มขึ้น
4. ใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์ อัลกอฮอล์ ช่วยเพิ่มปริมาณน้ำตาลในช่วง mashing ได้
5. ใช้ในการทำปุ๋ยหมัก อาจใช้ในรูปเอนไซม์หรือสปอร์ของเชื้อ *T. reesei* ผสมลงในวัสดุที่จะทำการหมักโดยตรง สามารถลดระยะเวลาของการหมักลงได้
6. มีส่วนสำคัญในการงอกของเมล็ดและการสุกของผลไม้
7. ใช้ย่อยกากของเสียที่มีเซลลูโลสอยู่มาก ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอื่นๆ

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการ

##### 3.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาคือ *Trichoderma reesei* QM 9414 Mutant No.22 ซึ่งเชื้อมีต้นกำเนิดจากการฉายรังสีอุลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 256 nm. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ภาวดี และ สิทธิพร, 2533)

##### 3.2 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์และวัสดุหมักเพื่อใช้ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อ mutant *Trichoderma reesei*

###### การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมโดยเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesei* QM 9414 Mutant No. 22 บน slant อาหาร Mendels สูตร ก. ที่มีการเติม Agar 1.5% (ภาคผนวก ก.) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อ โดยนำน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 ml. ใสลงใน slant ผสมเชื้อให้เข้ากัน ตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ Heamocytometer เพื่อให้ได้จำนวนสปอร์เริ่มต้น  $10^6$ - $10^7$  spores/ml. บีบอัดสารแขวนลอยของเชื้อที่ได้มา ปริมาตร 0.2% (v/v) ใสลงใน flask ขนาด 500 ml. ที่มีอาหาร Mendels สูตร ก. (Mendels, 1981) ปริมาตร 100 ml. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

###### การเตรียมวัสดุหมัก

วัสดุหมักที่ใช้คือ ช้างข้าวโพด เตรียมโดยนำช้างข้าวโพดตากแห้งมาบดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 50-100 mesh ซึ่งวัสดุหมัก 50 กรัม นำมาแช่ใน 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HCl ปริมาตร 150 ml. เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำวัสดุหมักมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำมาขจัดลิกนิน โดยการแช่ใน 1% NaOH ปริมาตร 150 ml. ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง กรอง แล้วทำให้แห้ง โดยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส และซึ่งจนน้ำหนักคงที่ เก็บในเดซิเคเตอร์ตลอดเวลาหากยังไม่มีการใช้ทันที เพื่อไม่ให้สัมผัสกับความชื้นในอากาศ ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้ (สัณทัศน์ และ สมพร, 2532)

ซึ่งข้าวโพดที่เตรียมได้จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก (Single Carbon Source) โดยจะใช้ในอัตรา 1-2% (w/v) (Sternberg, 1976)

### 3.3 การหมักแบบ Batch Culture ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ใส่อาหาร Mendels สูตร ข. (ภาคผนวก ก.) ปริมาตร 1 ลิตร ลงในถังหมัก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 10% (v/v) ของอาหาร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน (Sukekumi, 1989)

#### 3.3.1 การศึกษาผลของ pH ต่อประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อ *mutant Trichoderma reesei*

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.3 ในสภาวะที่มีการให้อากาศในถังหมัก 0.5 VVM (Volumn air/Volumn liquid-Min) อัตราการปั่นกววน 300 รอบ/นาที ควบคุมระดับความเป็นกรดต่าง 5 ระดับ คือ 4.0, 4.4, 4.8, 5.2, 5.6 โดยใช้ 0.25 N NaOH และ 0.25 N HCl ในการควบคุมความเป็นกรดต่าง ใช้ น้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 0.4% (v/v) เป็นสารควบคุมการเกิดฟอง (Sukan, 1989) ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่เชื้อ *mutant Trichoderma*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*reesei* ผลิตทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน

### 3.3.2 การศึกษาอัตราการงอกและปริมาณอากาศที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อ mutant *Trichoderma reesei*

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.3 ศึกษาอัตราการงอกและการให้ปริมาณอากาศที่เหมาะสม โดยการวางแผนการทดลองแบบ Factorial Design โดยใช้อัตราการงอกและการให้ปริมาณอากาศ 4 ระดับ คือ 1) อัตราการงอก 300 รอบ/นาที ให้อากาศ 0.5 VVM 2) อัตราการงอก 300 รอบ/นาที ให้อากาศ 1.0 VVM 3) อัตราการงอก 400 รอบ/นาที ให้อากาศ 0.5 VVM 4) อัตราการงอก 400 รอบ/นาที ให้อากาศ 1.0 VVM ควบคุมความเป็นกรดต่างของอาหารที่ pH 4.8 โดยใช้ 0.25 N NaOH และ 0.25 N HCl ในการควบคุมใช้น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 0.4% (v/v) ในการควบคุมการเกิดฟอง ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ โดยเชื้อ mutant *Trichoderma reesei* ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน

### 3.3.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรองของเอนไซม์เซลลูเลส (Filter Paper Degradation Activity)

ตัดกระดาษกรองวอกแมน เบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) (Mendels, Andreotti and Roche, 1976) ใส่ลงในหลอดทดสอบเติม 0.05 M Acetate Buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 ml. เติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 ml. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (Vortex Mixer) นำไปบ่มใน water bath ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่น้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที ทำการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Nelson-Somogyi

### 3.3.4 การวิเคราะห์หาคิจกรรมของ Endoglucanase ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *Trichoderma reesei*

ใส่สารละลายเอนไซม์ 0.5 ml. ลงในหลอดทดสอบ เต็ม 0.5 ml. ของ 1% Carboxymethyl Cellulose (CMC) ใน 0.1 M Sodium Acetate Buffer pH 4.8 ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที นำไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Nelson-Somogyi (Mendels et al. 1974, Tjerneld et al., 1985)

### 3.3.5 การวิเคราะห์หาคิจกรรมของ Exoglucanase ( $C_{11}$ ) ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *Trichoderma reesei*

ใส่สารละลายเอนไซม์ 0.5 ml. ลงในหลอดทดสอบ เต็ม 0.5 ml. ของสารแขวนลอย 1% Microcrystalline Cellulose 20 (Sigma Cell 20) ใน 0.1 M Sodium Acetate Buffer pH 4.8 ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มใน Shake Batch Culture ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที นำไปวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Nelson-Somogyi (Tjerneld et al., 1985)

### 3.3.6 การวิเคราะห์หาคิจกรรมของ $\beta$ -Glucosidase (Cellobiase) ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *Trichoderma reesei*

เตรียมสารละลาย Cellobiose 2.1 มิลลิกรัม ใน 0.055 M Acetate Buffer pH 4.8 ปริมาตร 50 ml. แล้วนำสารละลายที่เตรียมได้มา 1 ml. ผสมกับสารละลายเอนไซม์ 0.5 ml. นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาในน้ำเดือด เป็นเวลา

5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที นำไปวัดหาน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Nelson-Samogyi (Peiji, G., 1987)

### 3.3.7 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Nelson-Somogyi

เติมสารละลาย Somogyi Reagent 1 ml. ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลายเอนไซม์ 1 ml. หรือสารละลายน้ำตาล 1 ml. ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำเดือด เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันที โดยแช่ในอ่างน้ำเย็น เติม Nelson Reagent 1 ml. ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่น 5 ml. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 520 nm. ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

### 3.3.8 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยนำสารละลายกลูโคส 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาจำนวน 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 ml. ใส่ลงในหลอดทดสอบตามลำดับ เติมน้ำจนครบ 1 ml. ในแต่ละหลอด หลอดเปรียบเทียบ (blank) ใช้ น้ำกลั่น 1 ml. นำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Nelson-Somogyi เขียนกราฟระหว่างค่าความสามารถในการดูดกลืนแสง กับปริมาณน้ำตาลกลูโคส

### 3.3.9 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Cellobiose

เตรียมวิธีการเดียวกับการเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส นำไปตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Nelson-Somogyi เขียนกราฟระหว่างค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล Cellobiose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.10 การวิเคราะห์หาปริมาณ Soluble Protein โดยวิธีของ Lawry

นำสารละลายตัวอย่าง หรือ สารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นเหมาะสม 0.5 ml. ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติม Alkaline Copper Solution ปริมาตร 2.5 ml. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม Folin Reagent ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 0.5 ml. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm. ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

### 3.3.11 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Protein ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ในลักษณะเดียวกับการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน เขียนกราฟระหว่างค่าความสามารถในการดูดกลืนแสง กับค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน

### 3.3.12 การวัดการเจริญของเซลในรูปของการหาน้ำหนักแห้ง

(Dry weight (mg/ml))

นำตัวอย่างจำนวน 10 ml. กรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman glass microfiber paper (GE/B)) ที่ทราบน้ำหนักแห้งแน่นอนแล้ว ( $W_1$ ) (กรัม) ล้างเส้นใยที่อยู่บนกระดาษกรอง ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำกระดาษกรองที่มีเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักแห้งมีค่าคงที่ ( $W_2$ ) (กรัม) น้ำหนักแห้งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{น้ำหนักแห้ง (mg/ml)} = (W_2 - W_1) \times 100$$

$$\text{หรือ น้ำหนักแห้ง (\%)} = (W_2 - W_1) \times 10$$

(ดัดแปลงมาจากวิธีของ The Association of Official Agricultural Chemist ,1965)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน

เขียนกราฟระหว่าง absorbance ที่ความยาวคลื่น 750 nm. กับ ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน ได้กราฟเส้นตรงที่มีความชัน  $1.70 \times 10^{-7}$  (ภาพที่ 35 ในภาคผนวก ค.)

#### 4.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายเซลล์โอบิโอส

เขียนกราฟระหว่าง absorbance ที่ความยาวคลื่น 520 nm. กับ ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์โอบิโอส ได้กราฟเส้นตรงที่มีความชัน  $3.5 \times 10^{-6}$  (ภาพที่ 36 ในภาคผนวก ค.)

#### 4.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

เขียนกราฟระหว่าง absorbance ที่ความยาวคลื่น 520 nm. กับ ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส ได้กราฟเส้นตรงที่มีความชัน  $6.25 \times 10^{-6}$  (ภาพที่ 37 ในภาคผนวก ค.)

4.4 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสของสายพันธุ์ *T. reesei* mutant No.22 และสายพันธุ์พ่อแม่ *T. reesei* เมื่อเพาะเลี้ยง เชื้อแบบ Batch Culture ในระบบขวดเขย่า โดยใช้ขี้ข้าวโพดที่ปรับสภาพแล้ว เป็นแหล่งคาร์บอน

##### 4.4.1 การศึกษาปริมาณ Soluble protein (ภาพที่ 8)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในระบบขวดเขย่า พบว่า เชื้อทั้งสองสามารถให้ปริมาณ Soluble Protein ได้สูงสุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยสายพันธุ์พ่อแม่ให้ผลผลิตที่มีปริมาณ Soluble Protein สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11.294 mg/ml ในขณะที่สายพันธุ์ mutant ให้ผลผลิตที่มีปริมาณ Soluble Protein 18.294 mg/ml ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ประมาณ 1.7 เท่า

#### 4.4.2 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรอง (FPA Activity) (ภาพที่ 9)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในระบบขวดเขย่า พบว่า เชื้อทั้งสองสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรองสูงสุด ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยสายพันธุ์พ่อแม่ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรอง สูง 0.373 IU/ml ในขณะที่สายพันธุ์ mutant ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรอง สูง 1.291 IU/ml ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ประมาณ 3 เท่า

#### 4.4.3 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อย CMC (Endoglucanase Activity) (ภาพที่ 10)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในระบบขวดเขย่า พบว่า เชื้อทั้งสองสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อย CMC ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยสายพันธุ์พ่อแม่ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อย CMC สูง 3.943 IU/ml ในขณะที่สายพันธุ์ mutant ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อย CMC สูง 4.878 IU/ml ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ประมาณ 1.2 เท่า

#### 4.4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสผง (Exoglucanase Activity) (ภาพที่ 11)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในระบบขวดเขย่า พบว่า เชื้อสายพันธุ์พ่อแม่ให้ผลผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสผง สูงสุด เท่ากับ 5.091 IU/ml ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่สายพันธุ์ mutant ให้ผลผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสผง สูงสุด เท่ากับ 7.971 IU/ml ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ประมาณ 1.5 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

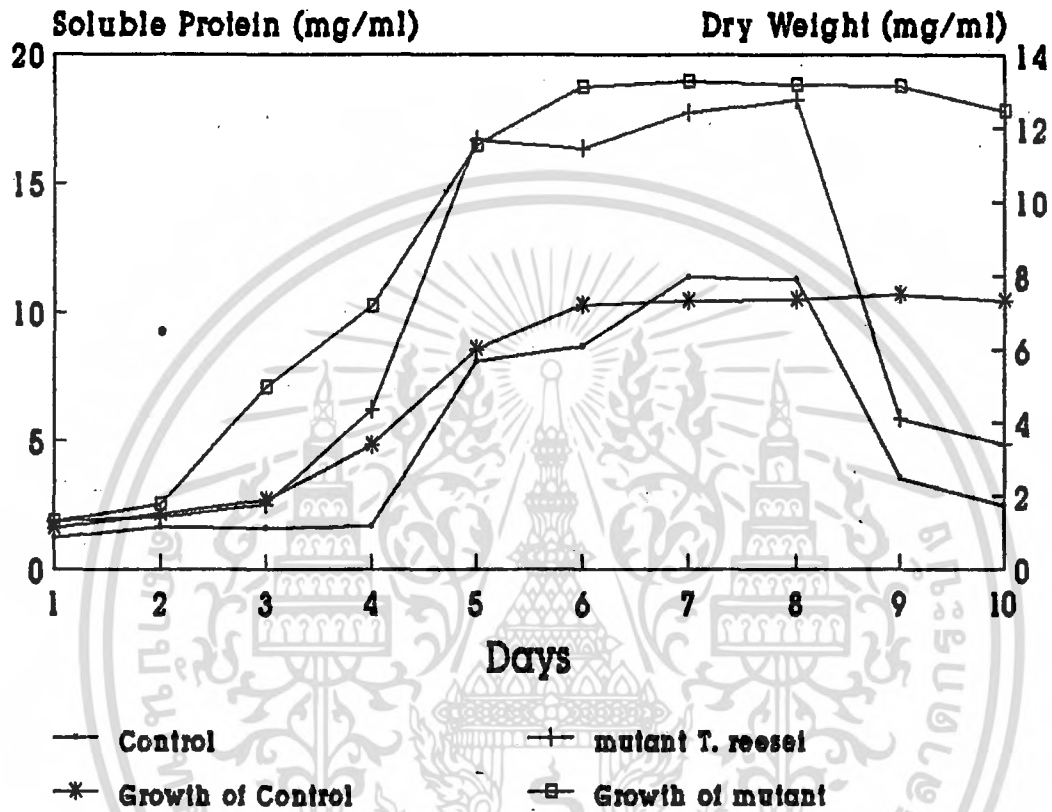
#### 4.4.5 การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ $\beta$ -glucosidase

(ภาพที่ 12)

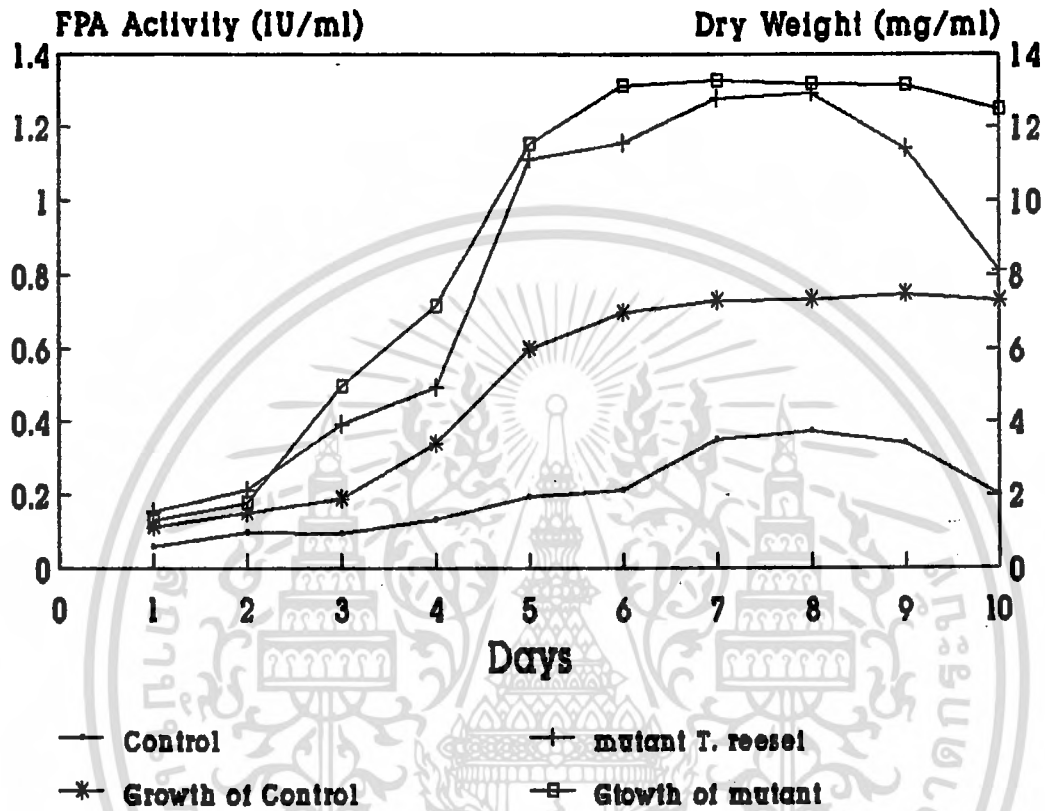
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในระบบขวดเชย่า พบว่า เชื้อทั้งสองสามารถผลิตเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง โดยสายพันธุ์พ่อแม่ ผลิตเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ที่มีประสิทธิภาพ สูง 27.018 IU/ml ในขณะที่สายพันธุ์ mutant ผลิตเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ที่มีประสิทธิภาพ สูง 29.982 ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่เล็กน้อย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

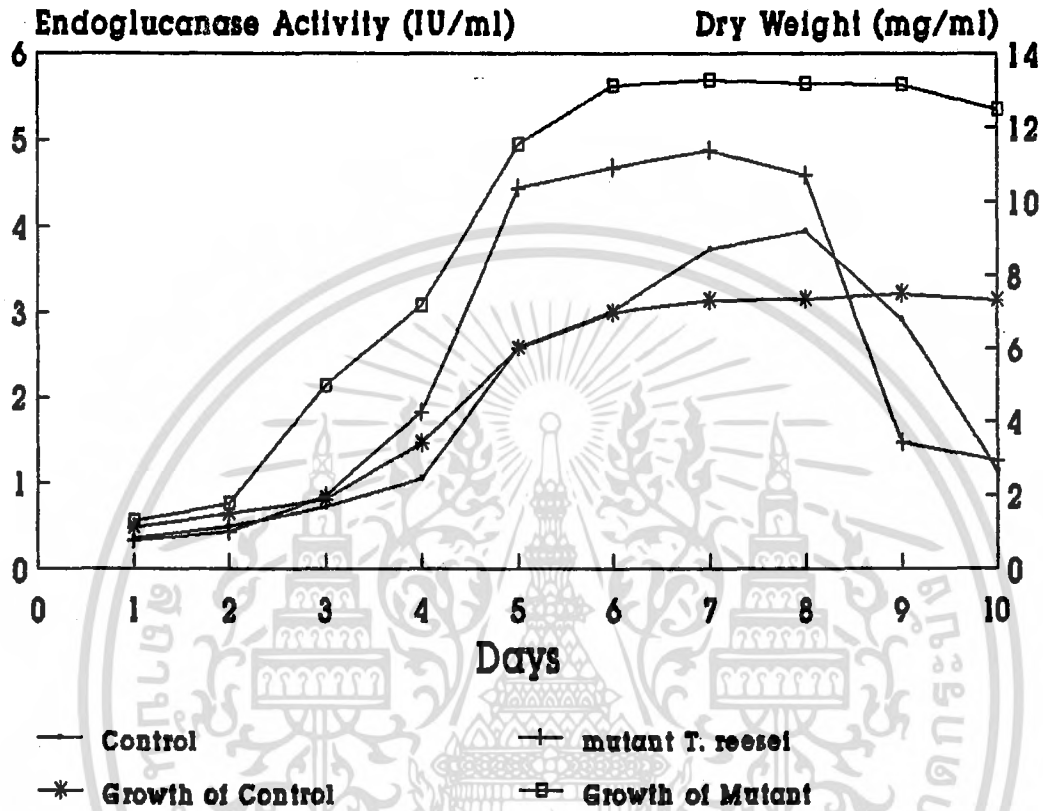


ภาพที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและการผลิต Soluble Protein (mg/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า ในสภาวะที่ควบคุมอัตราเร็วในการเขย่า 250 rpm, 28 °C



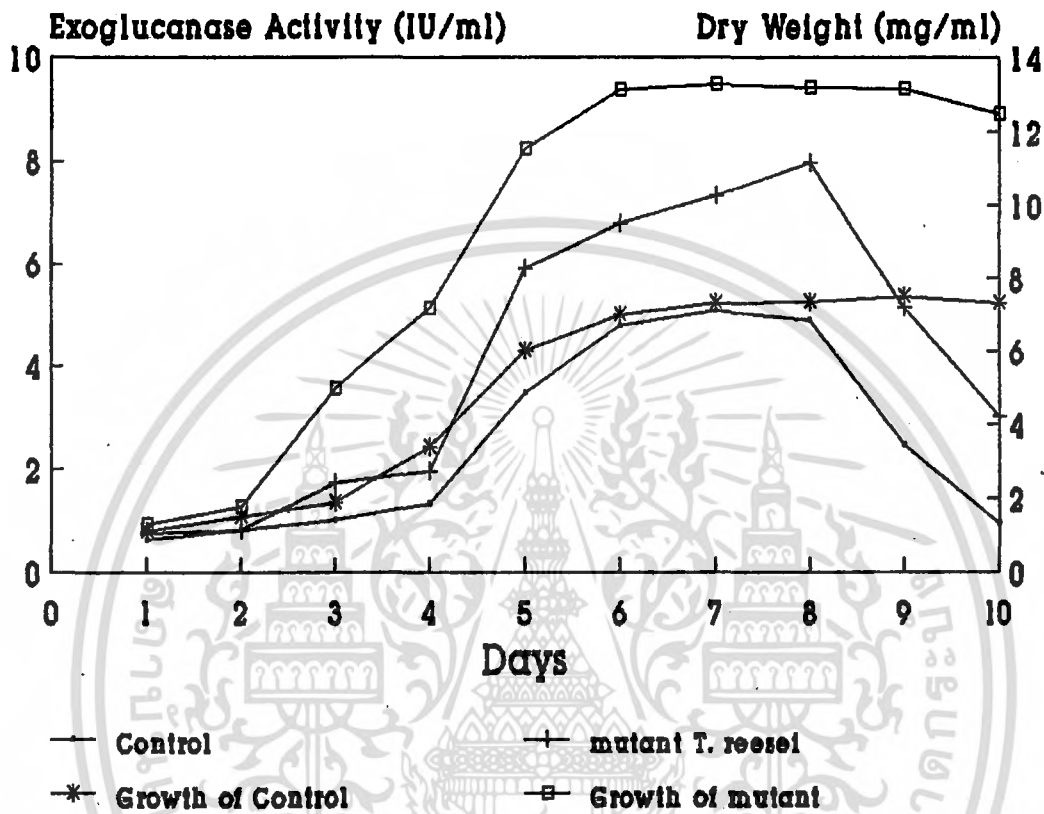
ภาพที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการผลิตเอนไซม์และ FPA Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า ในสภาวะที่ควบคุมอัตราเร็วในการเขย่า 250 rpm, 28 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

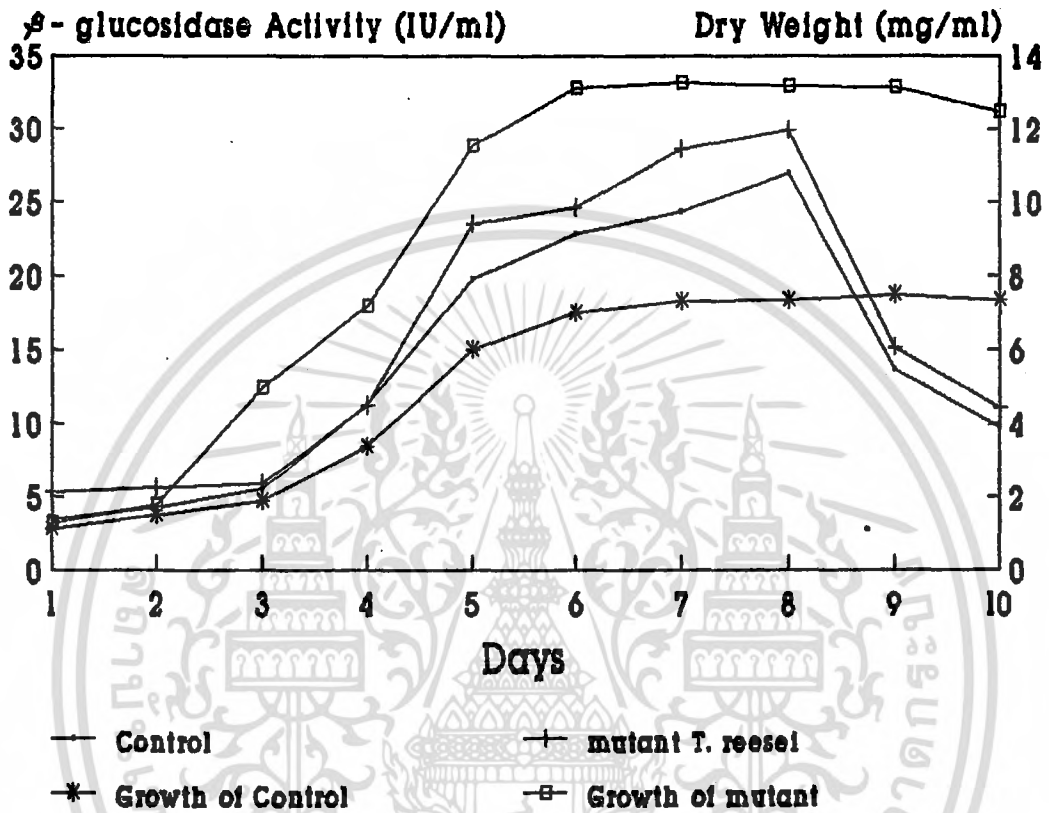


ภาพที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและ Endoglucanase Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า ในสภาวะที่ควบคุมอัตราเร็วในการเขย่า 250 rpm, 28 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและ Exoglucanase Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า ในสภาวะที่ควบคุมอัตราเร็วในการเขย่า 250 rpm, 28 °C



ภาพที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและ  $\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า ในสภาวะที่ควบคุมอัตราเร็วในการเขย่า 250 rpm, 28 °C

4.5 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์ *T. reesei* mutant No.22 และสายพันธุ์พ่อแม่ *T. reesei* เมื่อเพาะเลี้ยง เชื้อแบบ Batch Culture ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร เปรียบเทียบกับการเพาะ เลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า โดยใช้ขี้ข้าวโพดที่ปรับสภาพแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

#### 4.5.1 การศึกษาผลของ pH ต่อประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

##### 4.5.1.1 การศึกษาปริมาณ Soluble Protein (ภาพที่ 13)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยการควบคุมความเป็นกรดต่างที่ระดับต่างๆ พบว่า เชื้อทั้งสองให้ผลผลิตที่มี ปริมาณ Soluble Protein สูงสุด ในวันที่ 8 ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรด ต่างที่ 4.8 โดยที่สายพันธุ์พ่อแม่ให้ผลผลิตที่มีปริมาณ Soluble Protein 11.165 mg/ml ในขณะที่สายพันธุ์ mutant ให้ผลผลิตที่มีปริมาณ Soluble Protein 34.176 mg/ml ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ประมาณ 3.1 เท่า และ สูงกว่าสายพันธุ์ mutant เดียวกัน เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า ประมาณ 3 เท่า

##### 4.5.1.2 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรอง

(FPA Activity) (ภาพที่ 14)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยการควบคุมความเป็นกรดต่างที่ระดับต่างๆ พบว่า เชื้อทั้งสองผลิตเอนไซม์ที่มี ประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรอง สูงสุดในวันที่ 8 ในสภาวะที่ควบคุมความเป็น กรดต่างที่ 4.8 โดยสายพันธุ์พ่อแม่ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยกระดาษ กรองสูง 0.545 IU/ml ในขณะที่สายพันธุ์ mutant ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพ การย่อยกระดาษกรองสูง 2.55 IU/ml ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ประมาณ 3.9 เท่า และสูงกว่าสายพันธุ์ mutant เดียวกัน เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า ประมาณ 1.7 เท่า

#### 4.5.1.3 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อย CMC (ภาพที่ 15)

##### (Endoglucanase Activity)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยการควบคุมความเป็นกรดต่างที่ระดับต่างๆ พบว่า เชื้อทั้งสองผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อย CMC สูงสุด ในวันที่ 8 ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างที่ 4.8 โดยสายพันธุ์พ่อแม่ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อย CMC สูง 5.233 IU/ml ในขณะที่สายพันธุ์ mutant ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อย CMC สูง 8.702 IU/ml ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ 1.7 เท่า และสูงกว่าสายพันธุ์ mutant เดียวกันเมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า ประมาณ 1.8 เท่า

#### 4.5.1.4 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสผง (ภาพที่ 16)

##### (Exoglucanase Activity)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยการควบคุมความเป็นกรดต่างที่ระดับต่างๆ พบว่า เชื้อทั้งสองผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสผงสูงสุด ในวันที่ 8 ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างที่ 4.8 โดยสายพันธุ์พ่อแม่ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสผง สูง 5.865 IU/ml ในขณะที่สายพันธุ์ mutant ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสผง สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ประมาณ 6.9 เท่า และสูงกว่าสายพันธุ์ mutant เดียวกัน เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า ประมาณ 5 เท่า

#### 4.5.1.5 การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ $\beta$ -glucosidase

##### (ภาพที่ 17)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆกัน พบว่า เชื้อทั้งสองผลิตเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ในวันที่ 8 ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างที่ 4.8 โดยสายพันธุ์พ่อแม่ผลิตเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ที่มีประสิทธิภาพสูง 27.930 IU/ml ในขณะที่สายพันธุ์ mutant ผลิตเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase

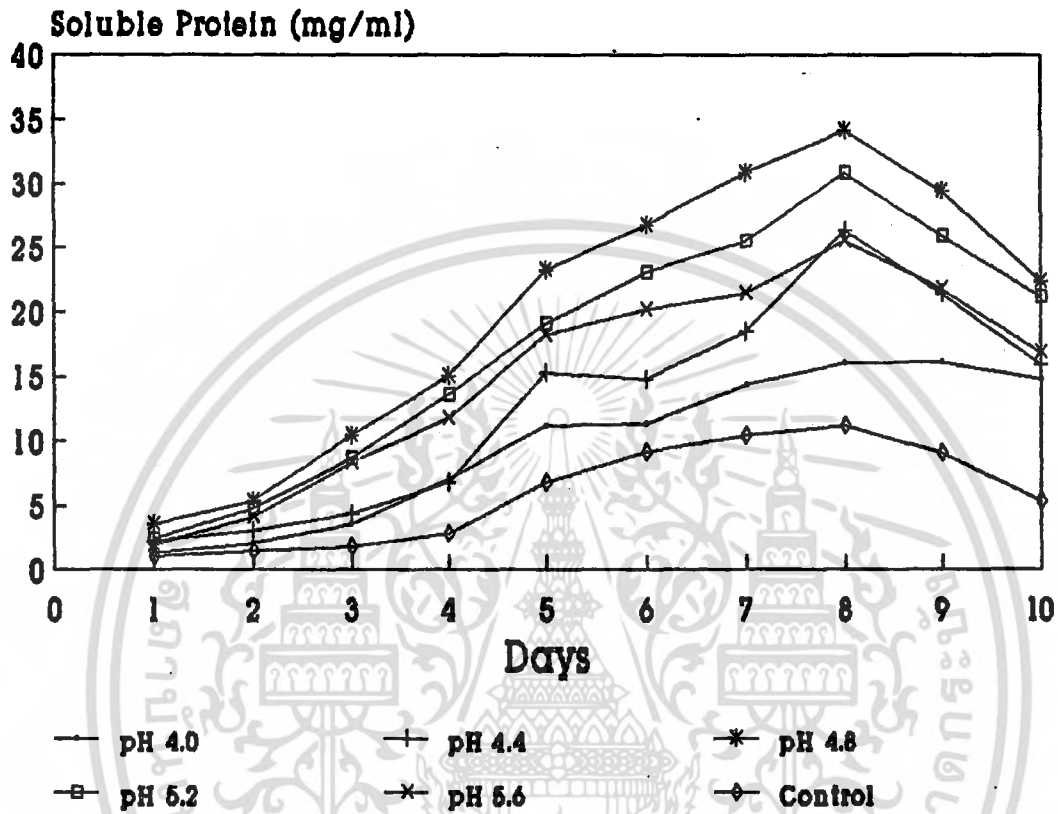
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีประสิทธิภาพสูง 60.826 IU/ml ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ประมาณ 2.2 เท่า และสูงกว่าสายพันธุ์ mutant เดียวกัน เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า ประมาณ 2 เท่า

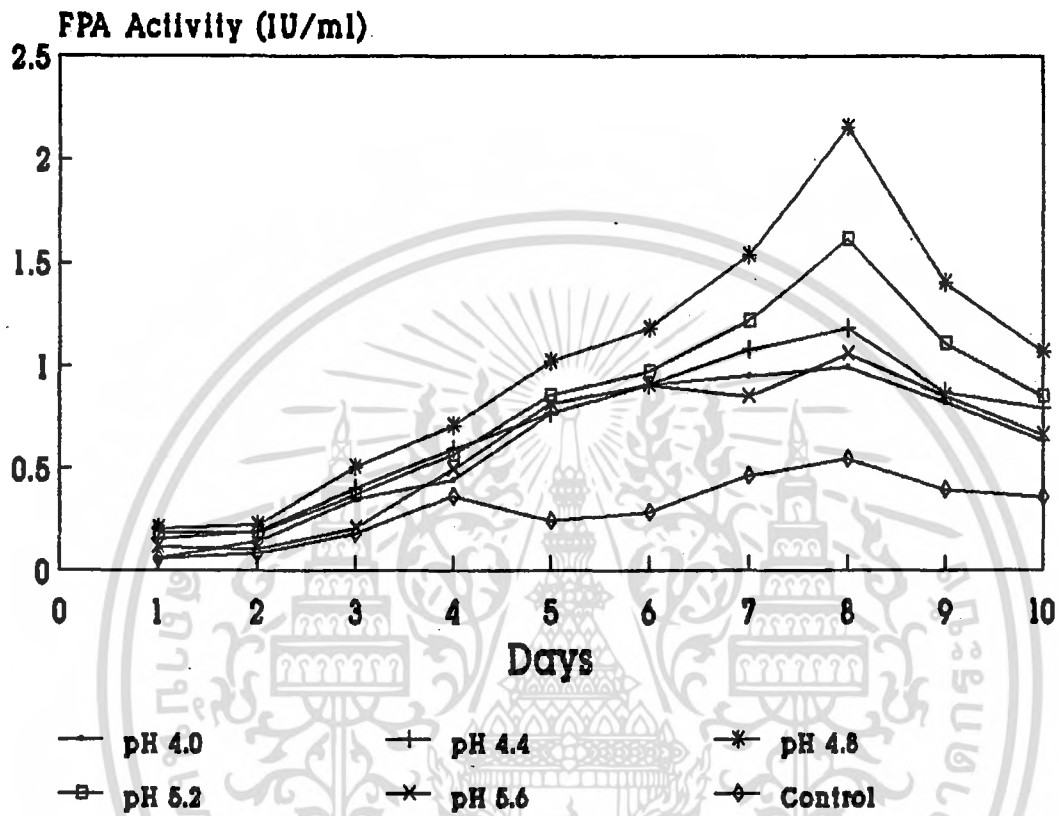
**4.5.1.6 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ mutant No. 22 ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ (ภาพที่ 18)**

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆกัน พบว่า เชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 2-4 หลังจากนั้นอัตราการเจริญค่อนข้างคงที่ และหลังจากวันที่ 10 มีแนวโน้มว่าอัตราการเจริญจะลดลง

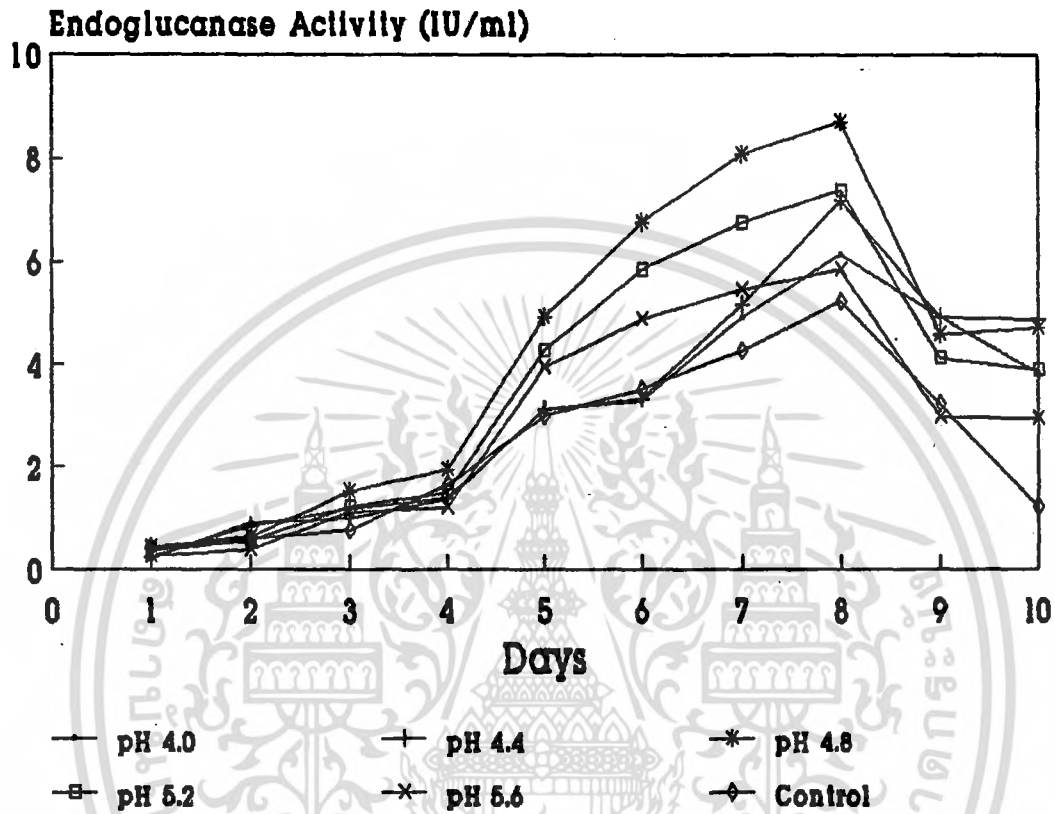
ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธุ์ mutant No. 22 และปริมาณ Soluble Protein แสดงในภาพที่ 19 ระหว่าง FPA Activity แสดงในภาพที่ 20 ระหว่าง Endoglucanase Activity แสดงในภาพที่ 21 ระหว่าง Exoglucanase Activity แสดงในภาพที่ 22 ระหว่าง  $\beta$ -glucanase Activity แสดงในภาพที่ 23



ภาพที่ 13 กราฟแสดงปริมาณ Soluble Protein (mg/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ

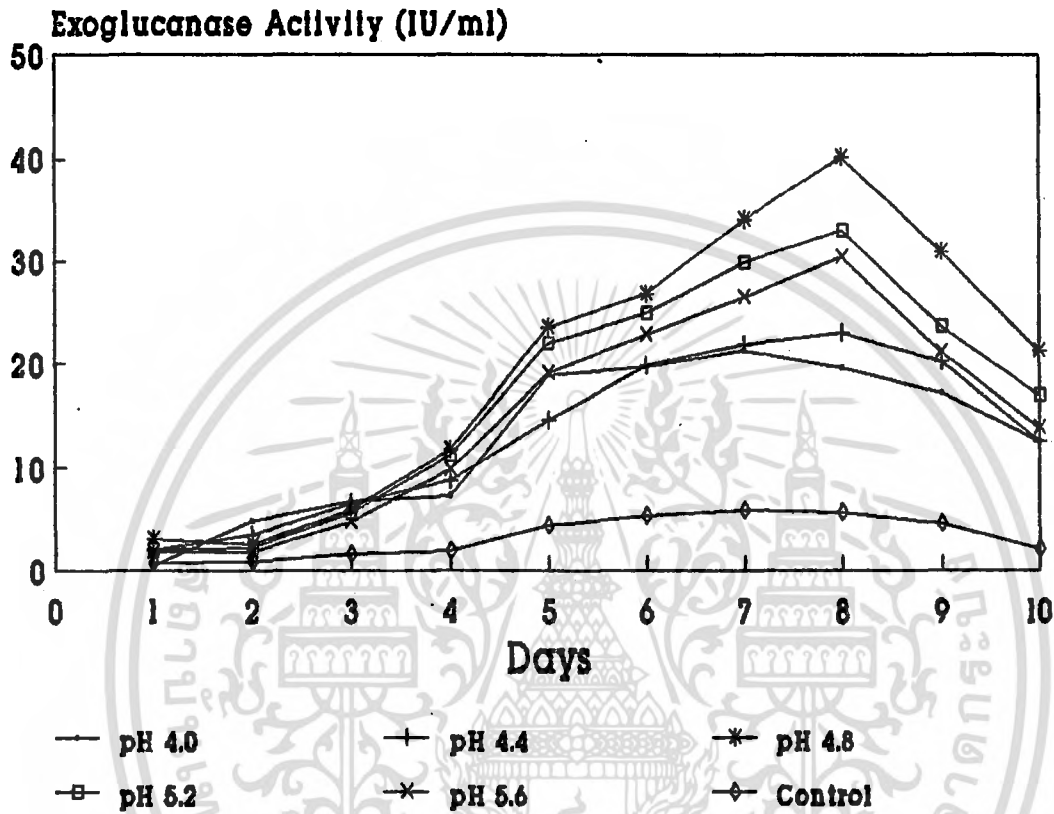


ภาพที่ 14 กราฟแสดง FPA Activity (IU/ml)  
 ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22  
 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก  
 ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ



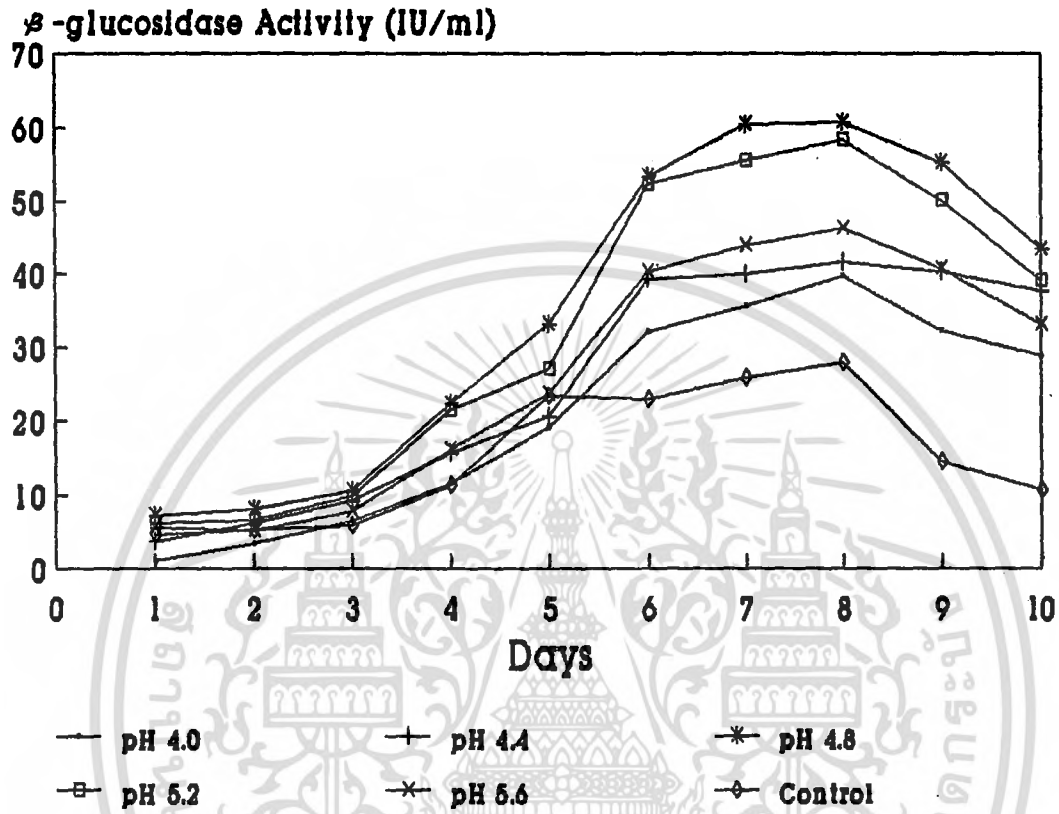
ภาพที่ 15 กราฟแสดง Endoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



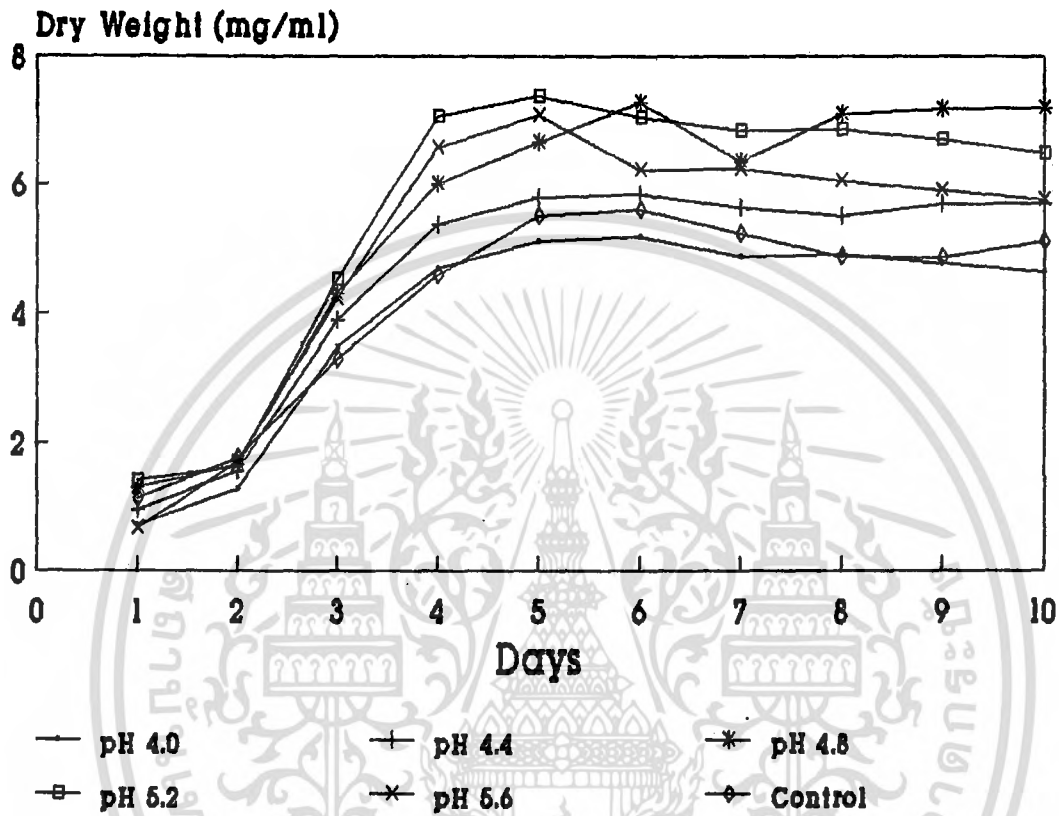
ภาพที่ 16 กราฟแสดง Exoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



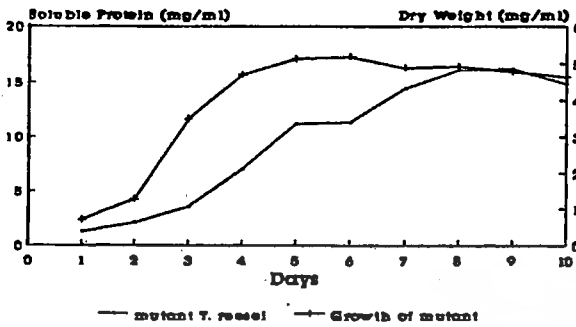
ภาพที่ 17 กราฟแสดง  $\beta$ -Glucosidase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

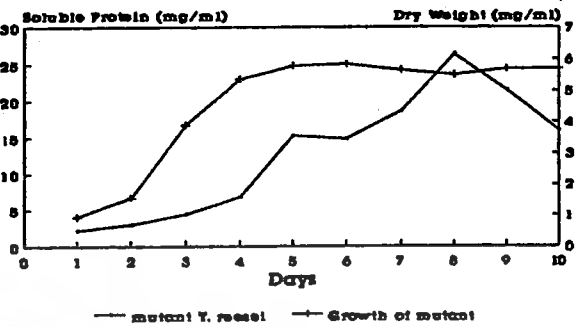


ภาพที่ 18 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 ในรูปน้ำหนักแห้งของเส้นใย (mg/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ

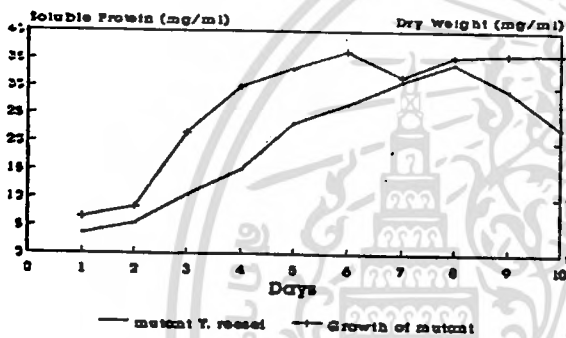
pH 4.0



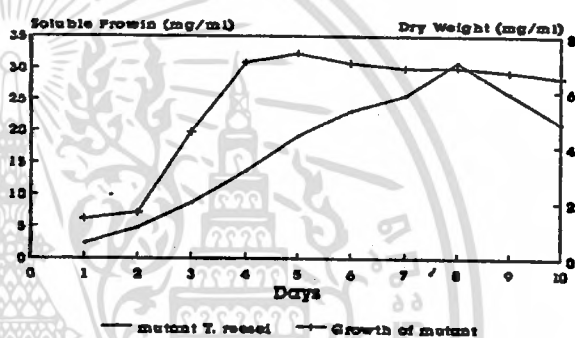
pH 4.4



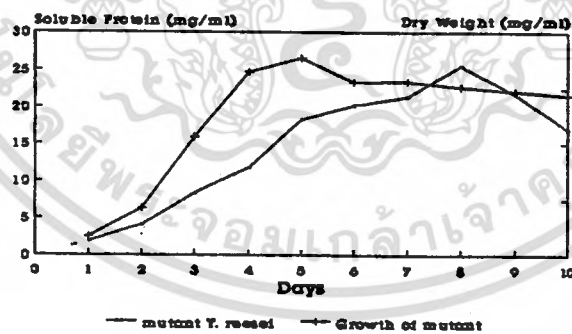
pH 4.8



pH 5.2



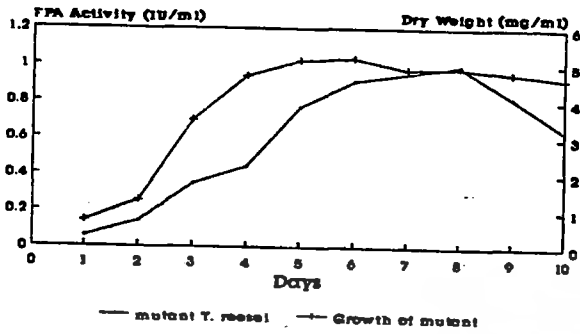
pH 5.6



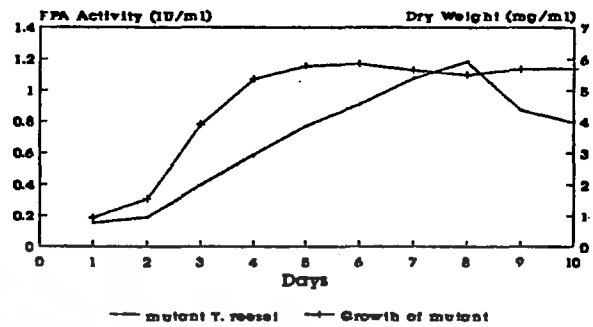
ภาพที่ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต และปริมาณ Soluble Protein (mg/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

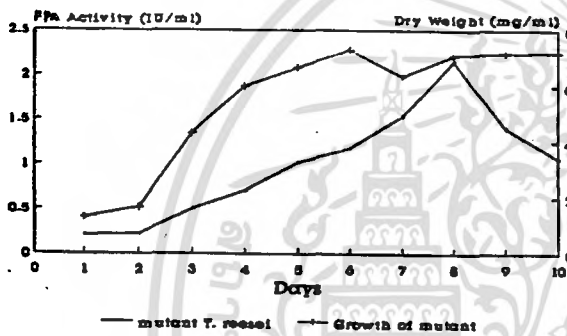
pH 4.0



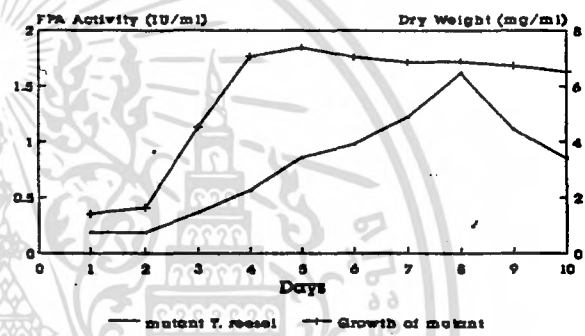
pH 4.4



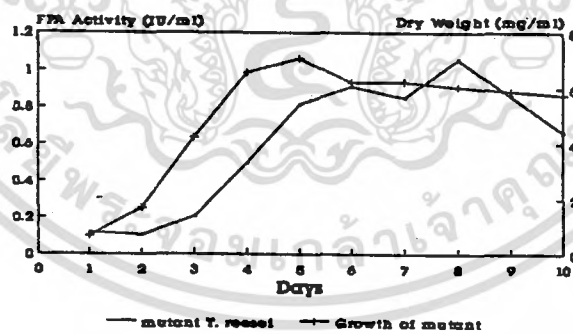
pH 4.8



pH 5.2



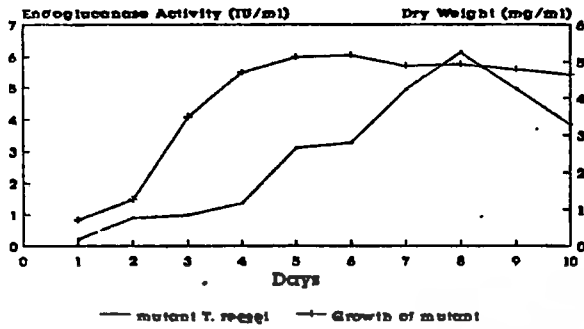
pH 5.6



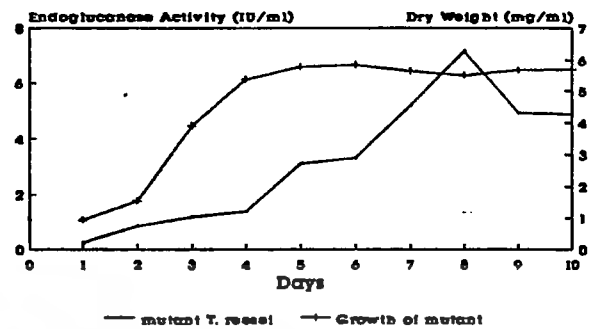
ภาพที่ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต และ FPA Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

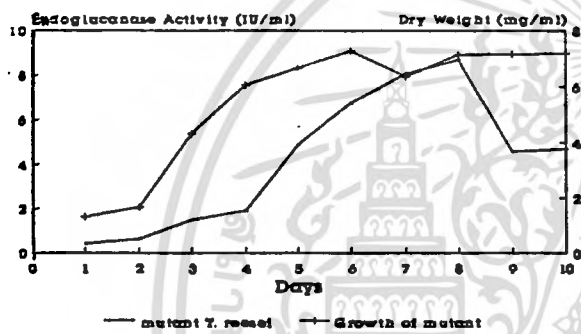
pH 4.0 63



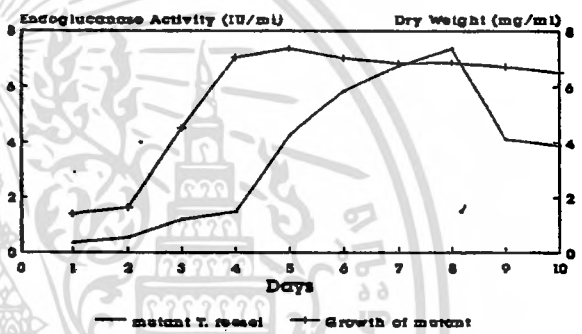
pH 4.4



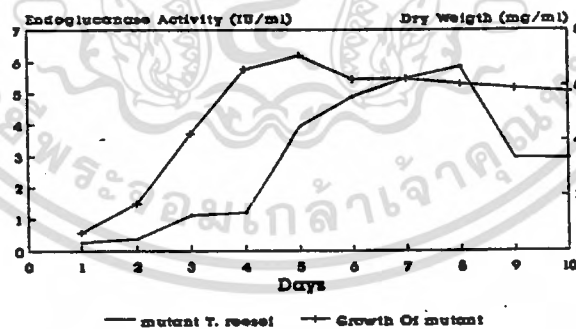
pH 4.8



pH 5.2



pH 5.6



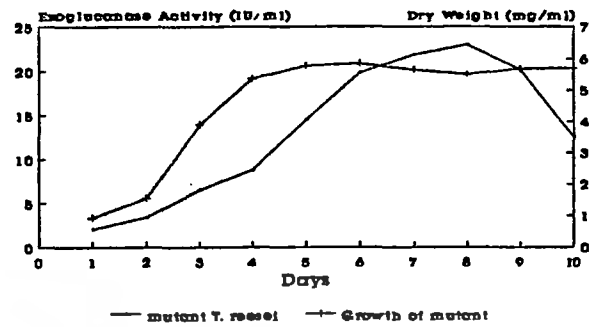
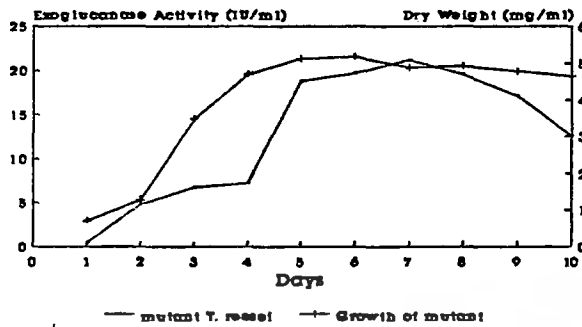
ภาพที่ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต และ Endoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH 4.0

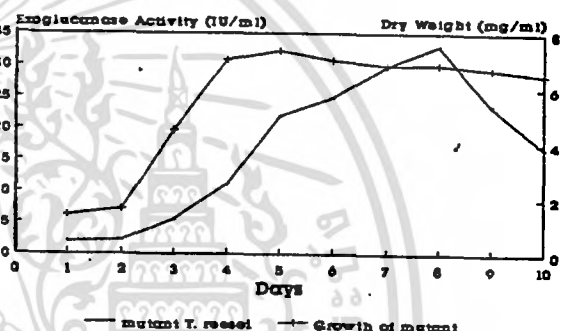
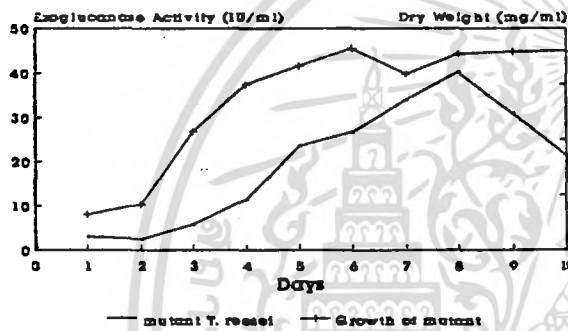
64

pH 4.4

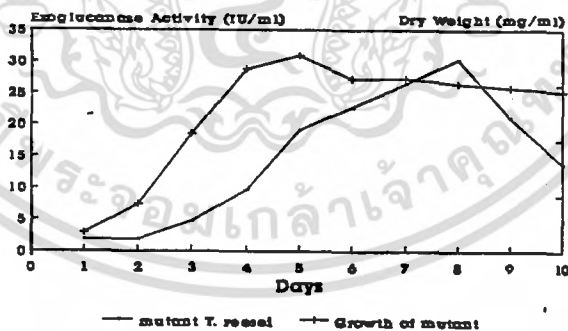


pH 4.8

pH 5.2



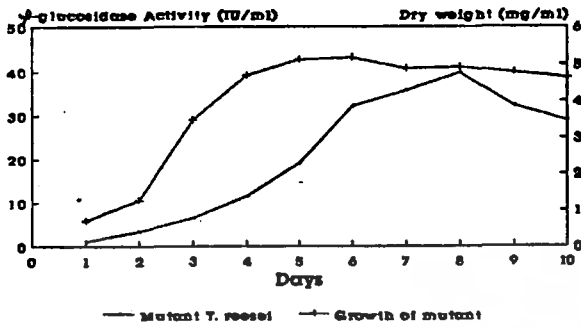
pH 5.6



ภาพที่ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต และ Exoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

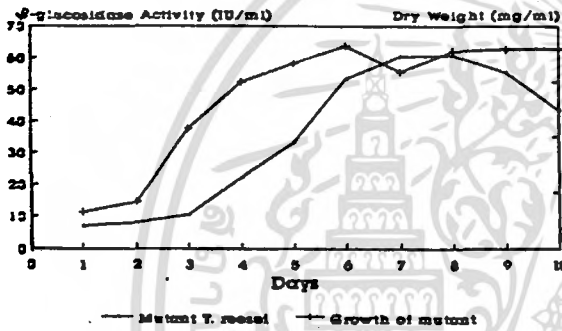
pH 4.0



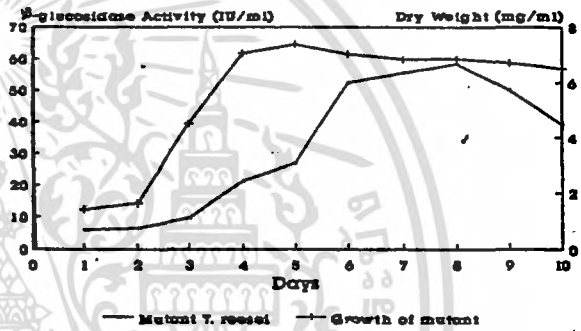
pH 4.4



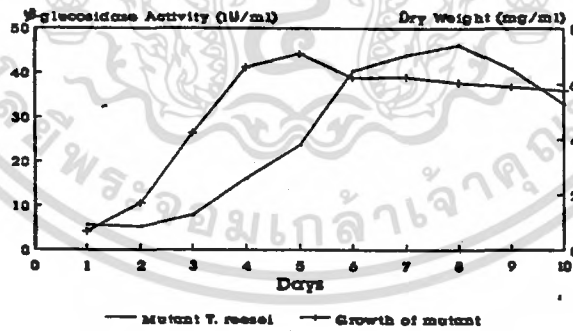
pH 4.8



pH 5.2



pH 5.6



ภาพที่ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต และ  $\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5.2 การศึกษาผลของอากาศและอัตราการกวนต่อประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

##### 4.5.2.1 การศึกษาปริมาณ Soluble Protein (ภาพที่ 24)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยควบคุมปริมาณอากาศควบคู่กับอัตราการปั่นกวนระดับต่างๆ พบว่า เชื้อทั้งสองให้ผลผลิตที่มีปริมาณ Soluble Protein สูงสุด ในสภาวะที่มีการให้อากาศ 1.0 VVM ควบคู่กับอัตราการปั่นกวน 300 rpm โดยสายพันธุ์พ่อแม่ให้ผลผลิตที่มีปริมาณ Soluble Protein สูง 11.165 mg/ml ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่สายพันธุ์ mutant ให้ผลผลิตที่มีปริมาณ Soluble Protein สูง 69.175 mg/ml ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ประมาณ 6.2 เท่า และสูงกว่าสายพันธุ์ mutant เดียวกัน เมื่อเลี้ยงในระบบขวดเชย่า ประมาณ 6 เท่า

##### 4.5.2.2 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรอง (ภาพที่ 25) (FPA Activity)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ mutant ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยควบคุมปริมาณอากาศควบคู่กับอัตราการปั่นกวนระดับต่างๆ พบว่า สายพันธุ์ mutant ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรองสูงสุด ในวันที่ 8 ในสภาวะที่ให้อากาศ 0.5 VVM ควบคู่กับอัตราการปั่นกวน 300 rpm โดยสายพันธุ์ mutant ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรอง สูง 2.155 IU/ml ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ mutant เดียวกัน เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเชย่า ประมาณ 5.8 เท่า

##### 4.5.2.3 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อย CMC (ภาพที่ 26) (Endoglucanase Activity)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยควบคุมปริมาณอากาศควบคู่กับอัตราการปั่นกวน พบว่า เชื้อทั้งสองผลิตเอนไซม์

ที่มีประสิทธิภาพการย่อย CMC สูงสุด ในวันที่ 8 ในสภาวะที่ให้อากาศ 1.0 VVM ควบคุมกับอัตราการปั่นกววน 300 rpm โดยสายพันธุ์พ่อแม่ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อย CMC สูง 5.233 IU/ml ในขณะที่สายพันธุ์ mutant ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อย CMC สูง 11.603 IU/ml ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ประมาณ 2.2 เท่า และสูงกว่าสายพันธุ์ mutant เดียวกัน เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า ประมาณ 2.9 เท่า

#### 4.5.2.4 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสผง (ภาพที่ 27) (Exoglucanase Activity)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยควบคุมปริมาณอากาศควบคุมกับอัตราการปั่นกววน พบว่า เชื้อทั้งสองผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสผงสูงสุด ในสภาวะที่ให้อากาศ 0.5 VVM ควบคุมกับอัตราการปั่นกววน 300 rpm โดยสายพันธุ์พ่อแม่ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสผง สูง 3.865 IU/ml ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่สายพันธุ์ mutant ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสผง สูง 40.201 IU/ml ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ประมาณ 6.8 เท่า และสูงกว่าสายพันธุ์ mutant เดียวกันเมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า ประมาณ 7.9 เท่า

#### 4.5.2.5 การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ $\beta$ -glucosidase (ภาพที่ 28)

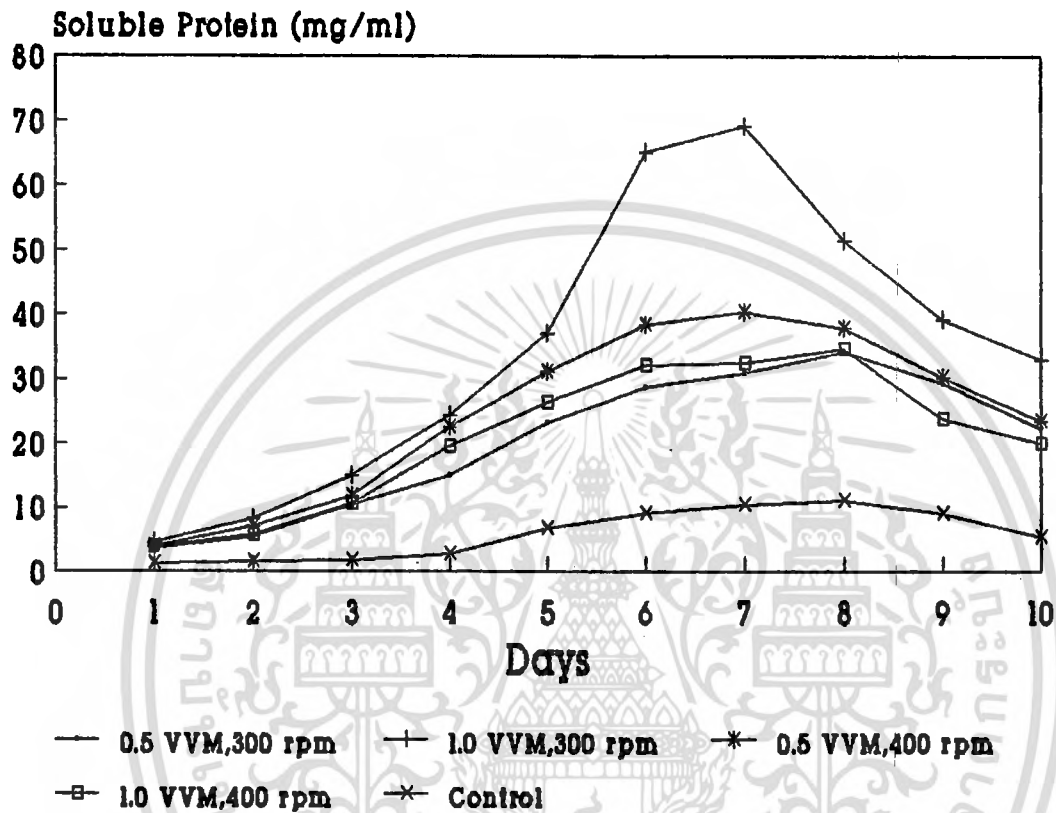
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ mutant ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยควบคุมปริมาณอากาศควบคุมกับอัตราการปั่นกววน พบว่า เชื้อสายพันธุ์ mutant ผลิตเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในสภาวะที่ให้อากาศ 1.0 VVM ควบคุมกับอัตราการปั่นกววน 400 rpm โดยผลิตเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ที่มีประสิทธิภาพสูง 85.187 IU/ml ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในระบบขวดเขย่า ประมาณ 3.2 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

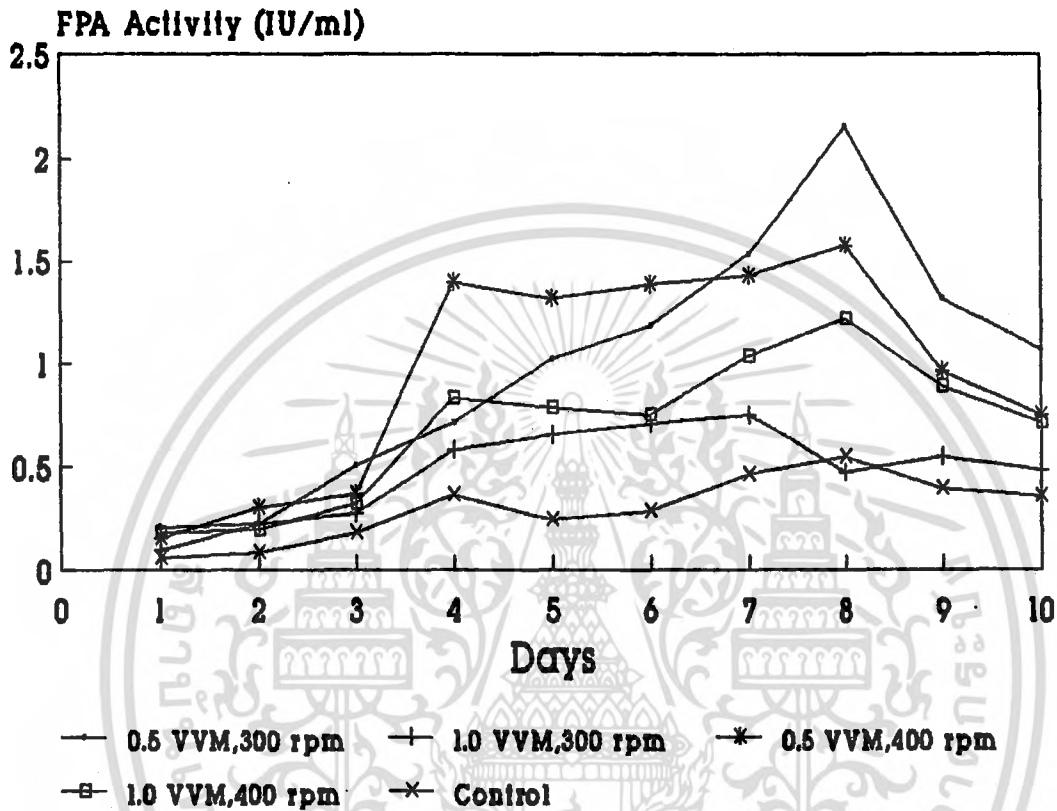
**4.5.2.6 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ mutant No. 22  
เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราเร็วในการปั่นกววน  
(ภาพที่ 29)**

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร  
ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศควบคู่กับอัตราเร็วในการปั่นกววน พบว่า เชื้อทั้ง 2  
สายพันธุ์ มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วจนในช่วงวันที่ 2-4 หลังจากนั้นอัตราการ  
เจริญค่อนข้างคงที่ และหลังจากวันที่ 10 มีแนวโน้มว่าอัตราการเจริญจะลดลง

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณ Soluble  
Protein แสดงในภาพที่ 30 ระหว่าง FPA Activity แสดงในภาพที่ 31  
ระหว่าง Endoglucanase Activity แสดงในภาพที่ 32 ระหว่าง Exoglu-  
canase Activity แสดงในภาพที่ 33 ระหว่าง  $\beta$ -glucosidase Activity  
แสดงในภาพที่ 34

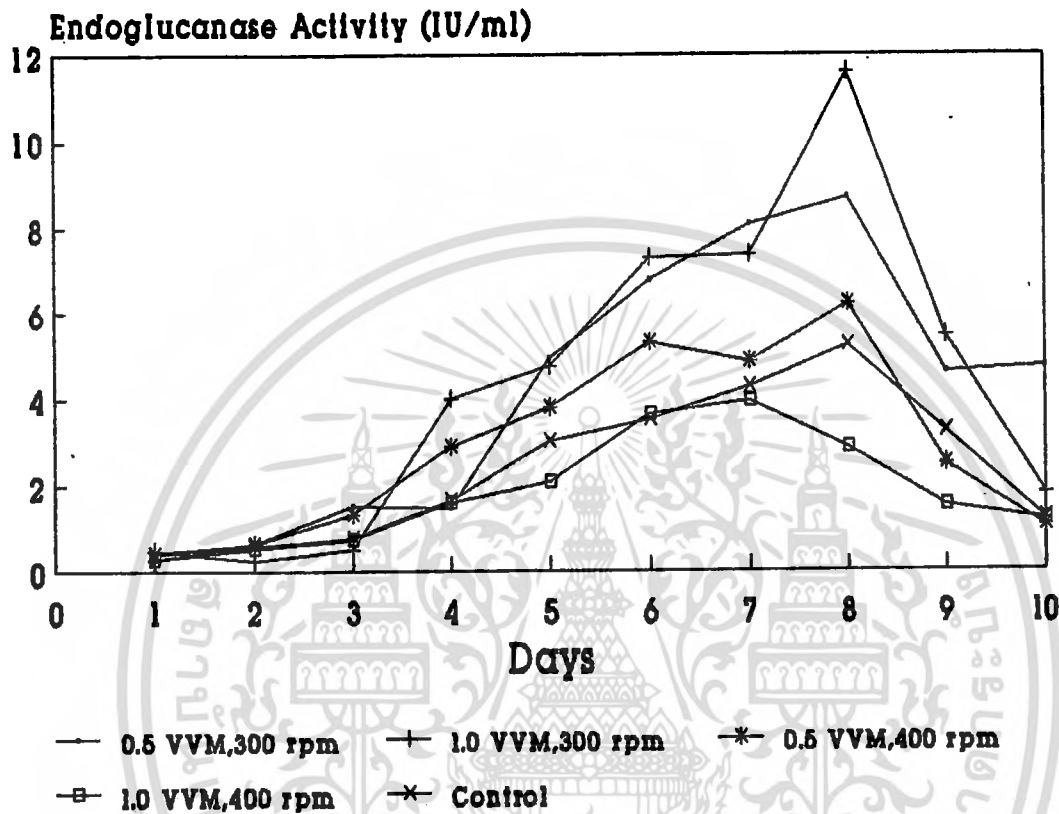


ภาพที่ 24 กราฟแสดงปริมาณ Soluble Protein (mg/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน



ภาพที่ 25 กราฟแสดง FPA Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

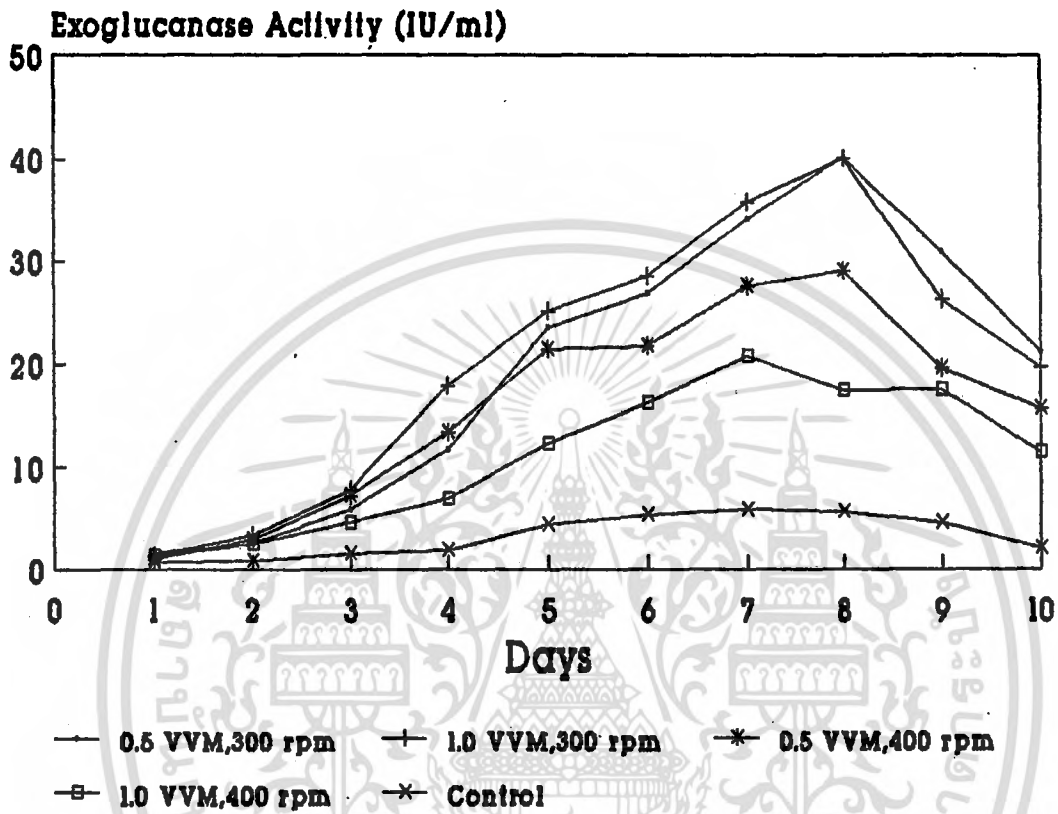


ภาพที่ 26 กราฟแสดง Endoglucanase Activity (IU/ml)

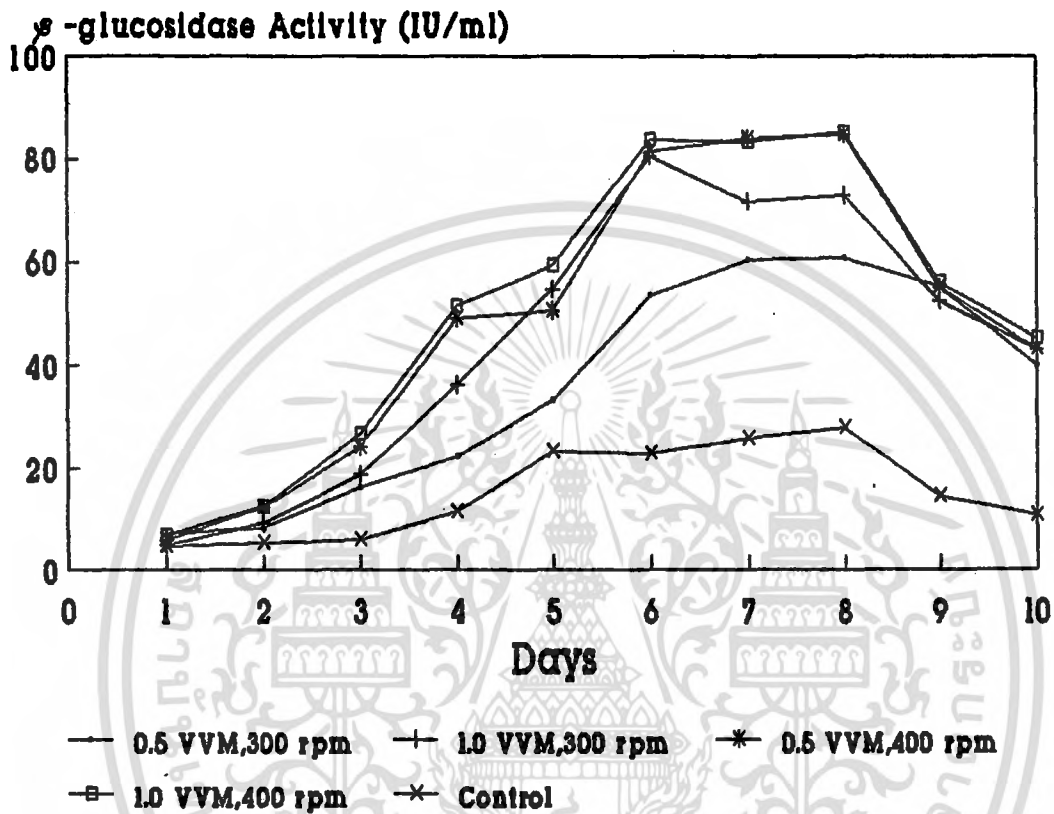
ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22

เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน



ภาพที่ 27 กราฟแสดง Exoglucanase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน

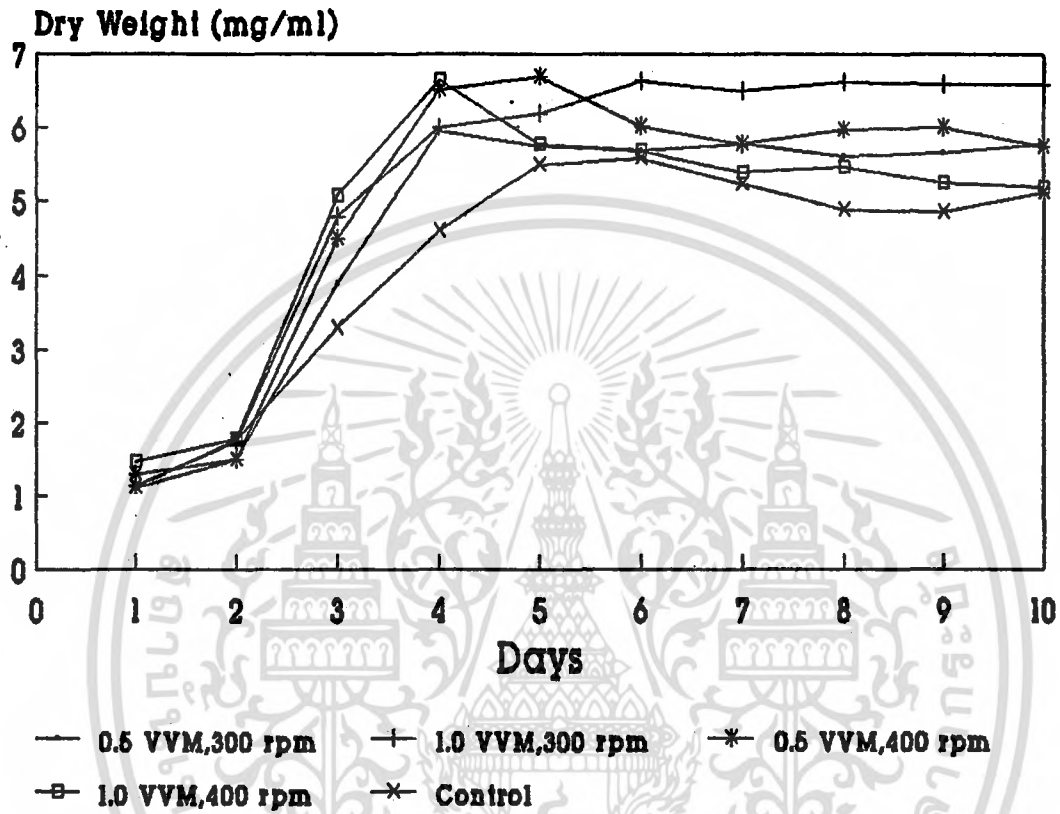


ภาพที่ 28 กราฟแสดง  $\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml)

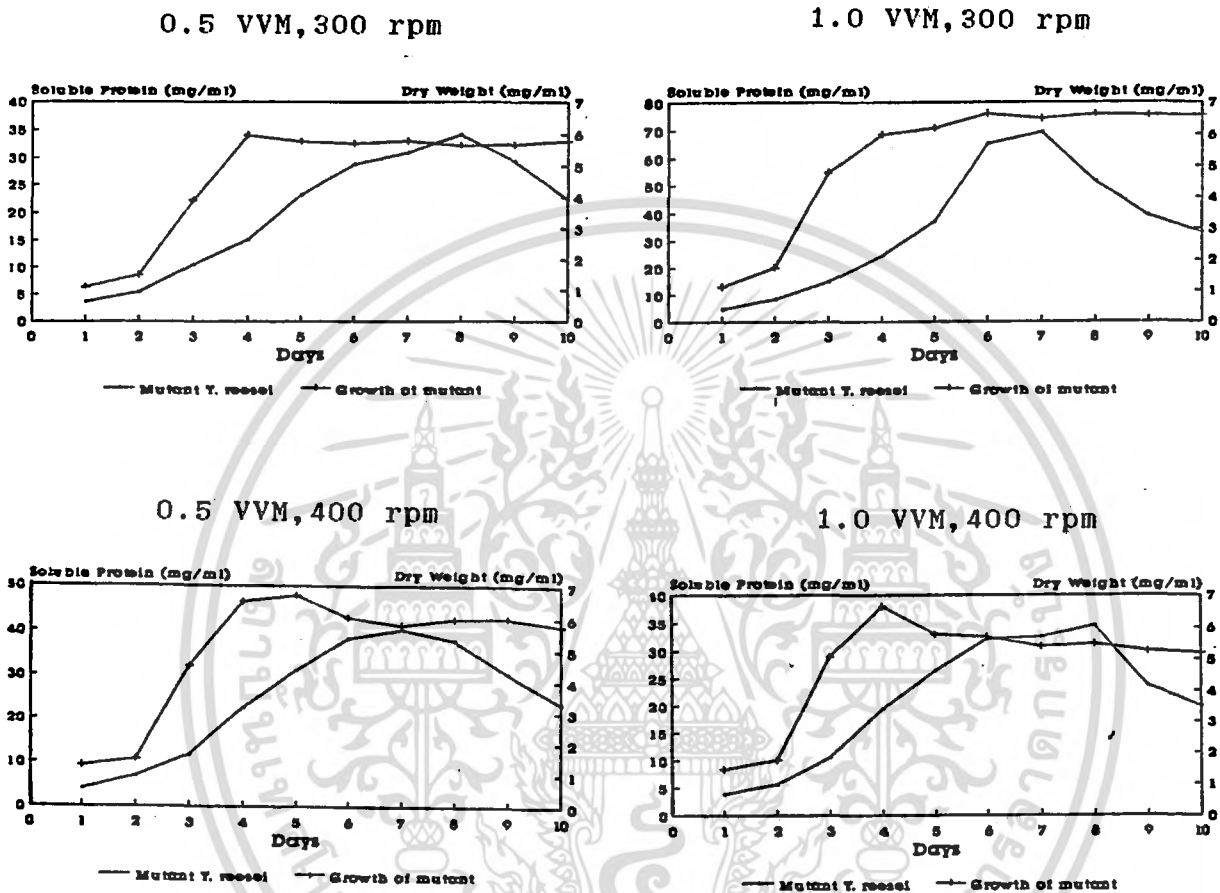
ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22

เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน



ภาพที่ 29 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22 ในรูปน้ำหนักแห้งของเส้นใย (mg/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน

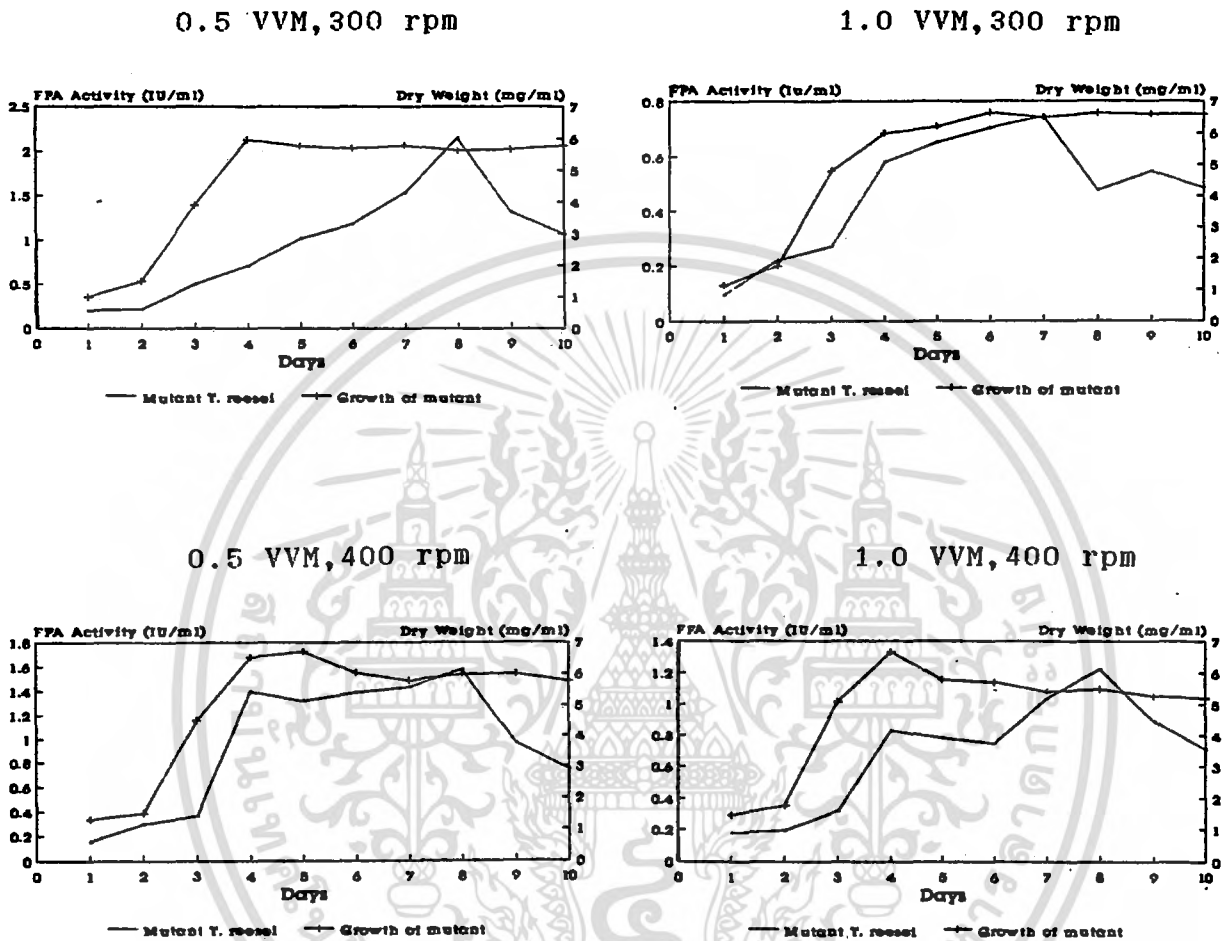


ภาพที่ 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต  
และปริมาณ Soluble Protein (mg/ml)

ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22

เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน

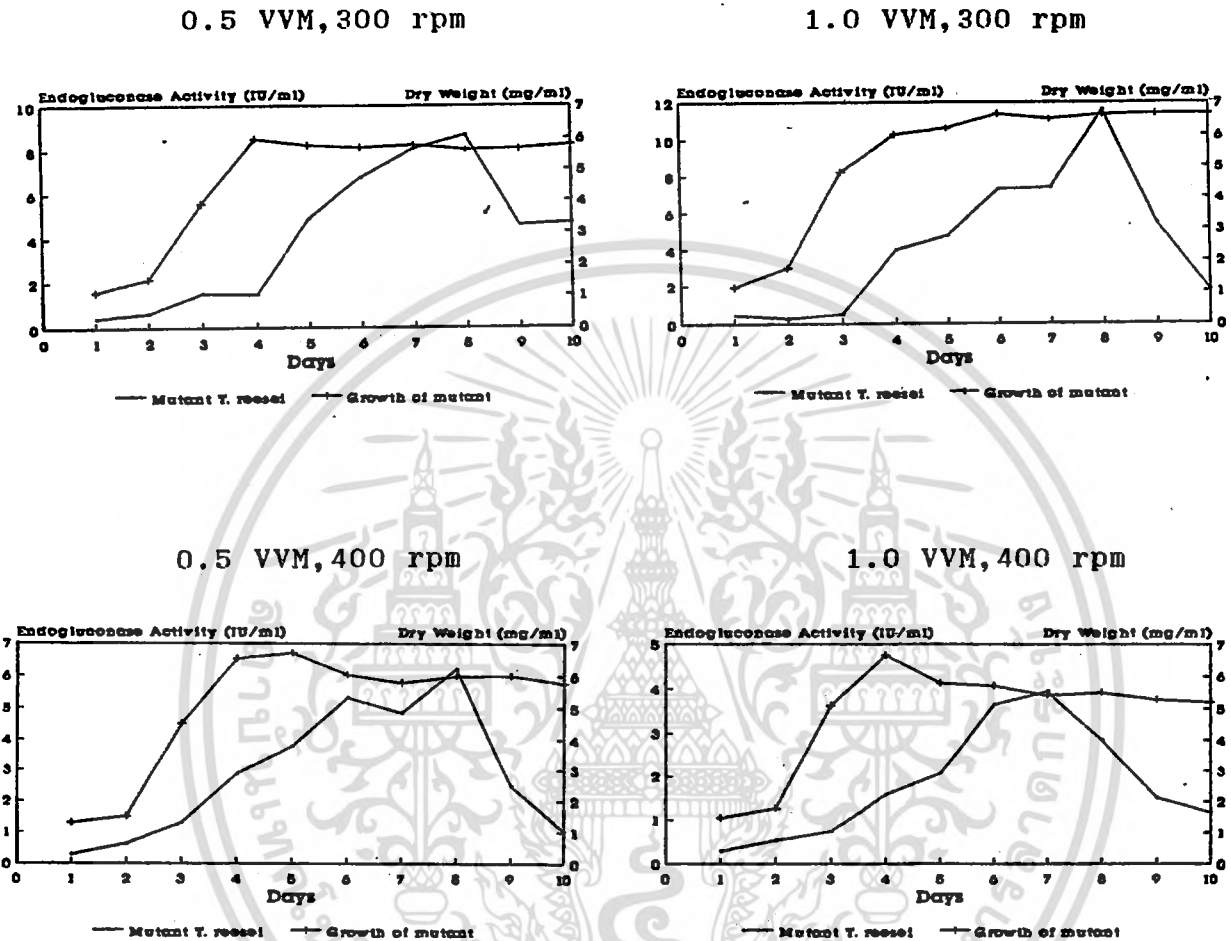


ภาพที่ 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต และ FPA Activity (IU/ml)

ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22

เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน



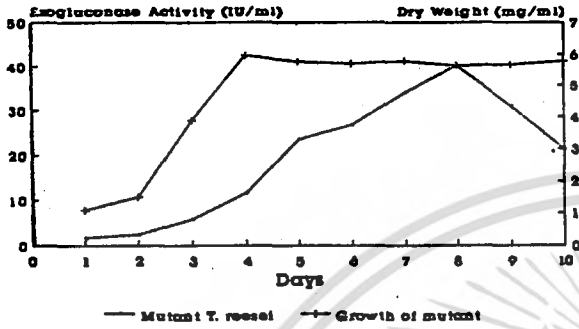
ภาพที่ 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต และ Endoglucanase Activity (IU/ml)

ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* mutant No. 22

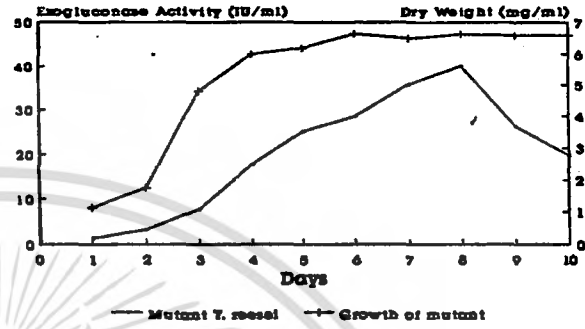
เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน

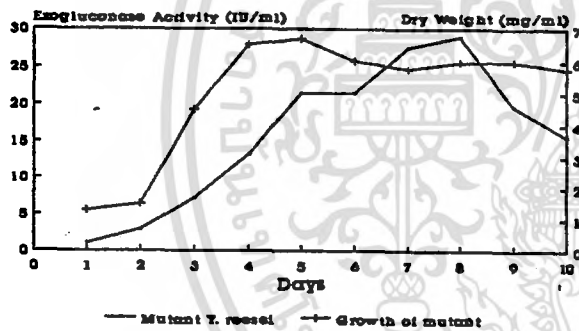
0.5 VVM, 300 rpm



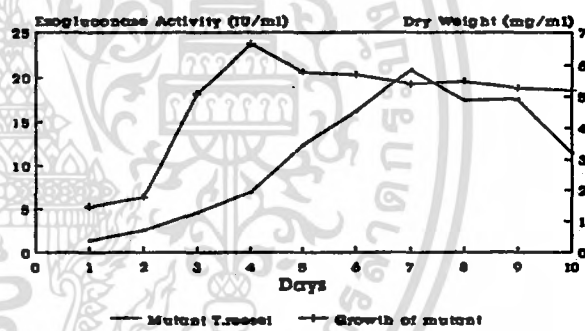
1.0 VVM, 300 rpm



0.5 VVM, 400 rpm



1.0 VVM, 400 rpm

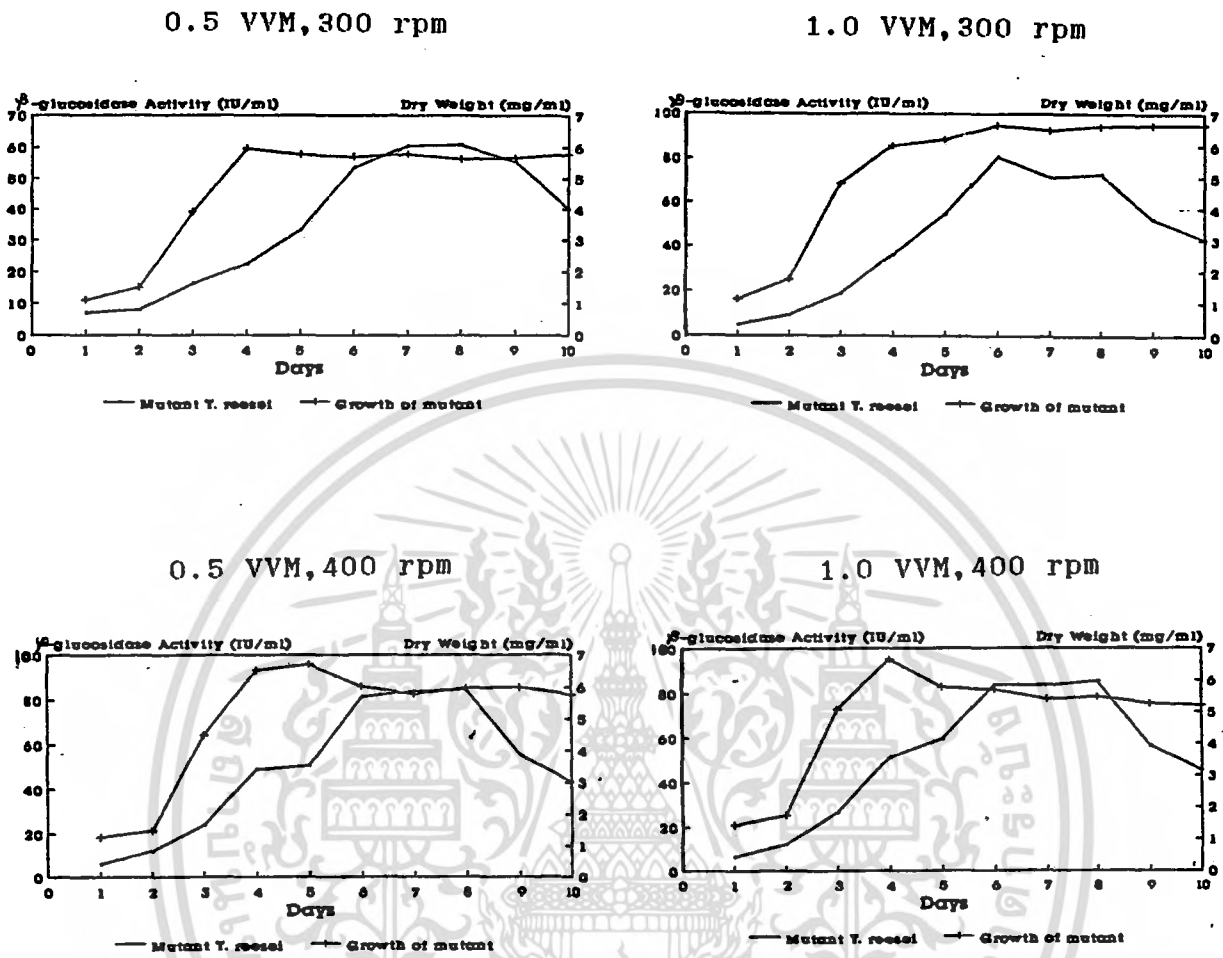


ภาพที่ 33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต และ Exoglucanase Activity (IU/ml)

ที่ผลิตโดยเชื้อ *T.reesei* mutant No. 22

เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างกัน



ภาพที่ 34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต  
 $\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml)

เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในสภาวะที่ควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนต่างๆกัน

## บทที่ 5

### สรุปผลและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

1. เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ผลิตโดยสายพันธุ์ mutant No. 22 กับสายพันธุ์พ่อแม่ *T. reesei* เมื่อเพาะเลี้ยงในระบบขวดเขย่า โดยใช้ซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วย 2% HCl เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสายพันธุ์ mutant ให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ *T. reesei* เล็กน้อย ในขณะที่ประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรองสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ถึง 3.46 เท่า และเมื่อพิจารณากราฟที่แสดงอัตราการเจริญเติบโต พบว่าทั้งสายพันธุ์ mutant NO. 22 และสายพันธุ์พ่อแม่ ต่างมีลักษณะการเจริญเติบโตที่คล้ายคลึงกันคือมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 2-5 และอัตราการเจริญจะคงที่ในวันที่ 6 เป็นต้นไป

2. เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในระบบเซลลูเลส ที่ผลิตโดยสายพันธุ์ mutant No. 22 กับสายพันธุ์พ่อแม่ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ batch culture ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงในระบบขวดเขย่า โดยใช้ซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วย 2% HCl เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่สภาวะควบคุมความเป็นกรดต่าง 4.8 เชื้อสายพันธุ์ mutant No. 22 สามารถให้ผลผลิตเอนไซม์ในระบบเซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ และสูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ให้ค่าประสิทธิภาพของเอนไซม์ แตกต่างทางสถิติที่ 1%)

ส่วนในสภาวะที่ให้อากาศ 1.0 VVM ควบคุมกับอัตราการปั่นกวน 300 rpm เชื้อสายพันธุ์ mutant No. 22 ให้ผลผลิตเอนไซม์ในระบบเซลลูเลส คือ Endo

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

glucanase Activity ได้สูงสุด และให้ปริมาณ Soluble Protein ได้สูงสุด ส่วน Exoglucanase Activity มีค่าสูงสุดในสภาวะที่ให้อากาศ 0.5 VVM ควบคู่กับอัตราการปั่นกวน 300 rpm ในสภาวะนี้ให้ค่า FPA Activity สูงสุดด้วย ส่วน  $\beta$ -glucosidase Activity มีค่าสูงสุดในสภาวะที่ให้อากาศ 1.0 VVM ควบคู่กับอัตราการปั่นกวน 400 rpm .

3. จะเห็นได้ว่าปริมาณอากาศและอัตราการเร็วในการปั่นกวนมีผลต่อเชื้อสายพันธุ์ mutant และสายพันธุ์พ่อแม่ ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในถังหมัก โดยอัตราการปั่นกวนมีผลมากกว่าปริมาณอากาศ คือมีผลให้ค่าประสิทธิภาพของเอนไซม์ในระบบเซลลูเลสมีความแตกต่างกันทางสถิติ (แตกต่างกันทางสถิติที่ 5 %) ส่วนปริมาณอากาศและอัตราการปั่นกวน 2 ปัจจัยรวมกัน มีผลให้ผลผลิตเอนไซม์ในระบบเซลลูเลสส่วนใหญ่ มีประสิทธิภาพลดลง ยกเว้น  $\beta$ -glucosidase มีค่าสูงขึ้น

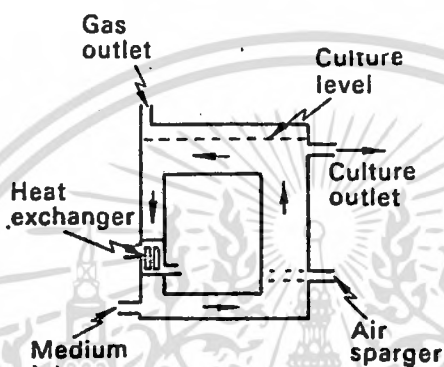
4. จาก ข้อ 1, 2 และ 3 สามารถสรุปได้ว่า สายพันธุ์ mutant No. 22 ให้ผลผลิตเอนไซม์ในระบบเซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ mutant No. 22 ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร โดยใช้ซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วย 2% HCl เป็นแหล่งคาร์บอน คือ เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดต่างของอาหารเท่ากับ 4.8 ให้อากาศ 1.0 VVM ควบคู่กับอัตราเร็วในการปั่นกวน 300 rpm ที่อุณหภูมิ 28 °C

### ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ ซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วย 2% HCl ซังซังข้าวโพด เป็นวัตถุดิบที่มีน้ำหนักเบาและไม่ละลายน้ำ จึงลอยอยู่บนผิวหน้าของสารละลายอาหาร เป็นผลให้เชื้อจุลินทรีย์ ไม่สามารถใช้ซังข้าวโพดได้เต็มที่ เมื่อเชื้อมีการเจริญ การเป่าอากาศเข้าไปในถังหมักและการกวนจะทำให้เส้นใยของเชื้อขึ้นไปเกาะด้านบนของถังหมัก ฉะนั้นถังหมักแบบที่มีการกวน ไม่เหมาะสมกับการเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อควรจะใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึงหมักแบบ Air lift แทน เพราะการให้อากาศและการผสมในถึงหมักเป็นแบบวนให้อาหารและเชื้อสัมผัสกันตลอดเวลา



Air Lift Fermentor

2. ควบคุมการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ mutant No. 22 และสายพันธุ์พ่อแม่ *T. reesei* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกัน ในระบบการเลี้ยงเชื้อแบบ Fed Batch Culture เพื่อเปรียบเทียบกับแบบ Batch Culture โดยใช้ถึงหมักแบบ Air lift

3. การเก็บตัวอย่างเซลล์ เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต ควรเก็บตัวอย่างให้ได้ปริมาณมากกว่าเดิม เช่น 50 ml. (เดิมเก็บ 10 ml.) และก่อนเก็บตัวอย่าง ควรเพิ่มอัตราการให้อากาศ หรือเพิ่มอัตราการกวน เพื่อให้เซลล์มีการผสมอยู่ในน้ำหมักอย่างทั่วถึง เพื่อลดข้อผิดพลาด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ภาคผนวก ก.**  
**อาหารเลี้ยงเชื้อ**

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นตามสูตรเหล่านี้ หนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ  
ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1. สูตรอาหาร Mendels ก.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.40	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.00	กรัม
Urea	0.30	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.40	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.61	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.00	มิลลิกรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot 4-5\text{H}_2\text{O}$	2.20	มิลลิกรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.40	มิลลิกรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	36.30	มิลลิกรัม
Cellulose Powder	7.50	กรัม
Tween 80	2.00	กรัม
Proteose Peptone	0.75	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

หมายเหตุ : ถ้าจะทำเป็นอาหารแข็งให้เติมวุ้น (agar) 1.5%

## 2. สูตรอาหาร Mendels บ.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.00	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.40	กรัม
Urea	0.30	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.30	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.00	มิลลิกรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot 4-5\text{H}_2\text{O}$	1.56	มิลลิกรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.40	มิลลิกรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.00	มิลลิกรัม
แหล่งคาร์บอนพวกเซลลูโลส	1	%
Tween 80	2.00	กรัม
Proteose Peptone	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย1. Nelson-Samogyi Reagent1.1 Samogyi Reagent1.1.1 Copper Reagent A

ละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่ปราศจากน้ำ ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 25 กรัม  
โซเดียมโพแทสเซียมเตตระเรท (Rochelle Salt) 20 กรัม โซเดียมไบคาร์  
บอเนต ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ ) 20 กรัม โซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ( $\text{NaSO}_4$ ) 200  
กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ทำการเจือจางจนมีปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร

1.1.2 Copper Reagent B

ละลายคอปเปอร์(II)ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4$ ) 10 กรัม ในน้ำกลั่น  
100 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1-2 หยด ลงไปผสมให้เข้ากัน

xCopper Reagent (Samogyi) ผสม Copper Reagent A  
กับ Copper Reagent B ในอัตราส่วน 25:1 (เตรียมในวันที่จะนำมาใช้)

1.2 Nelson's Reagent

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร  
เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมโซเดียมอาร์ซีเนต  
( $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 3 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน  
นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สารละลายควรเก็บใน  
ขวดสีชา

## 2. สารละลายน้ำตาลกลูโคส

ละลายกลูโคส 0.02 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย  
กลูโคสความเข้มข้น 200 กรัม/มิลลิลิตร

## 3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 20, 40, 60, 100, 120,  
140, 160 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยนำสารละลายน้ำตาลกลูโคส 200 ไมโครกรัม/  
มิลลิลิตร มาจำนวน 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 มิลลิลิตร  
ตามลำดับ ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 มิลลิลิตร หลอดเปรียบเทียบ  
ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (Blank) นำไปตรวจสอบวัดปริมาณน้ำตาลตามวิธีของ  
Nelson-Somogyi

## 4. Alkaline Copper Solution

A : $\text{Na}_2\text{CO}_3$	2 % ใน 0.1 N NaOH
B : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 %
C : Na-K Tartrate	1 %

Alkaline Copper Solution จะผสม A, B, C ในอัตราส่วน  
50:0.5:0.5 ตามลำดับ

### 5. Acetate Buffer

เตรียมได้โดยผสม สารละลาย C กับ สารละลาย D ตาม pH ที่ต้องการ แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิตร

สารละลาย C : 0.2 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Acetic Acid 11.6 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร )

สารละลาย D : 0.2 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  หรือ  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (ละลาย 16.4 กรัม หรือ 27.4 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร )

C (ml.)	D (ml.)	pH
46.3	3.7	3.6
44.3	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.0	30.0	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.5	5.2
8.8	41.2	5.4
4.8	45.2	5.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.  
วิธีการวิเคราะห์ผล

1. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry

สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายโปรตีน 0.5 มิลลิลิตร

↓  
เติม Alkaline Copper Solution 2.5 มิลลิลิตร

↓  
เติม Folin Reagent (ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:1) 0.5 มิลลิลิตร

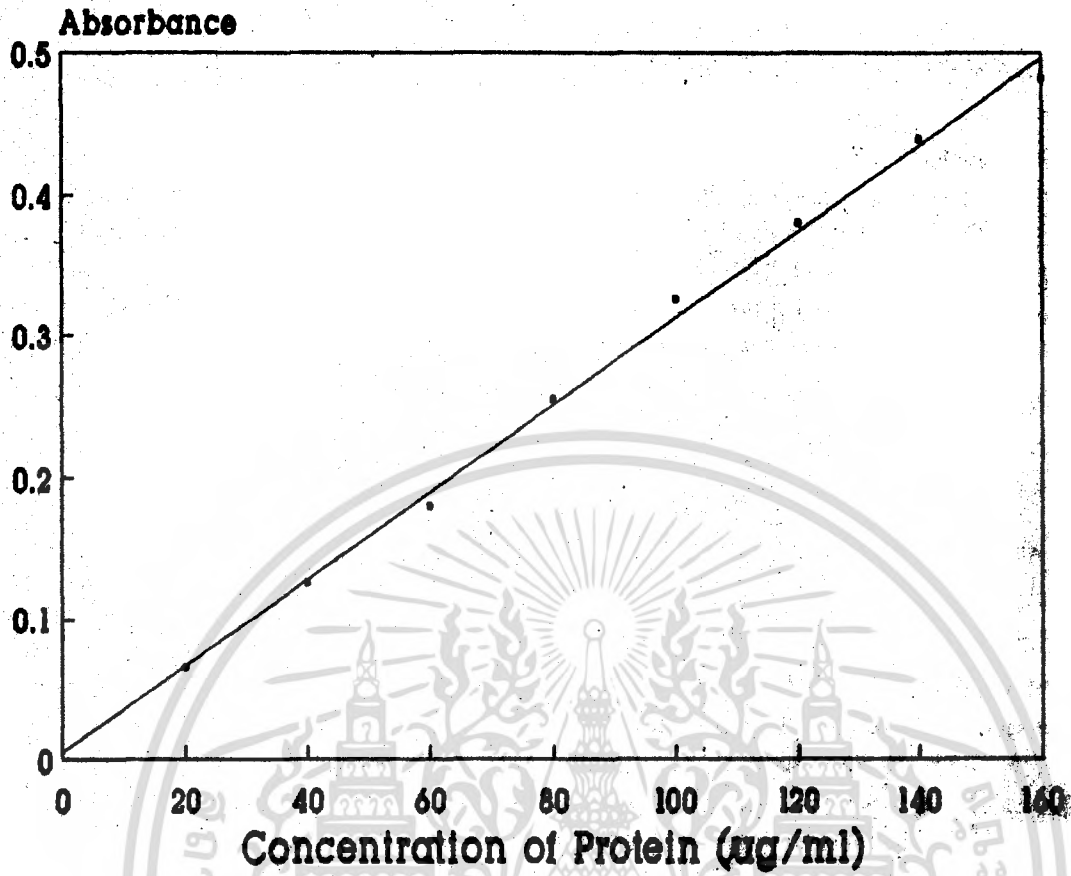
↓  
เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที

↓  
นำไปวัดค่า O.D. ที่ 750 nm.

↓  
นำผลที่ได้ไปเทียบค่ากับกราฟมาตรฐานของโปรตีน

**การเขียนกราฟมาตรฐานของโปรตีน**

เตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ จากสารละลายมาตรฐานโปรตีนที่เตรียมไว้แล้ว ในลักษณะเดียวกับการเตรียมสารละลายกลูโคส นำผลไปเขียนกราฟโดยให้ค่า O.D. อยู่แกนนตั้ง และ ค่าความเข้มข้นอยู่ในแนวนอน



ภาพที่ 35 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. การวิเคราะห์ FPA Activity

กระดาษกรองวอกทแมน เบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตร + สารละลาย

เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร



เติมสารละลาย acetate buffer pH 4.8 0.5 มิลลิลิตร



บ่ม 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



นำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

เพื่อหยุดปฏิกิริยา



ทำให้เย็นทันที



วัด Reducing Sugar โดยวิธีของ Nelson-Somogyi

### 3. การวิเคราะห์ Endoglucanase Activity

สารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร + สารละลาย 1% CMC ใน 0.1 M

acetate buffer pH 4.8

↓  
บ่ม 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

↓  
นำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

↓  
เพื่อหยุดปฏิกิริยา

↓  
ทำให้เย็นทันที

↓  
วัด Reducing Sugar โดยวิธีของ Nelson-Somogyi

#### 4. การวิเคราะห์ Exoglucanase Activity

สารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร + 0.1 % Cellulose  
Microcrystalline ใน acetate buffer pH 4.8



บ่ม 50 องศาเซลเซียส ใน Shaake batch culture

เป็นเวลา 20 นาที



นำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

เพื่อหยุดปฏิกิริยา



ทำให้เย็นทันที



วัด Reducing Sugar โดยวิธีของ Nelson-Somogyi

## 5. การวิเคราะห์ $\beta$ -Glucosidase

สารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร + สารละลาย Cellobiose

1 มิลลิลิตร

บ่ม 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

นำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

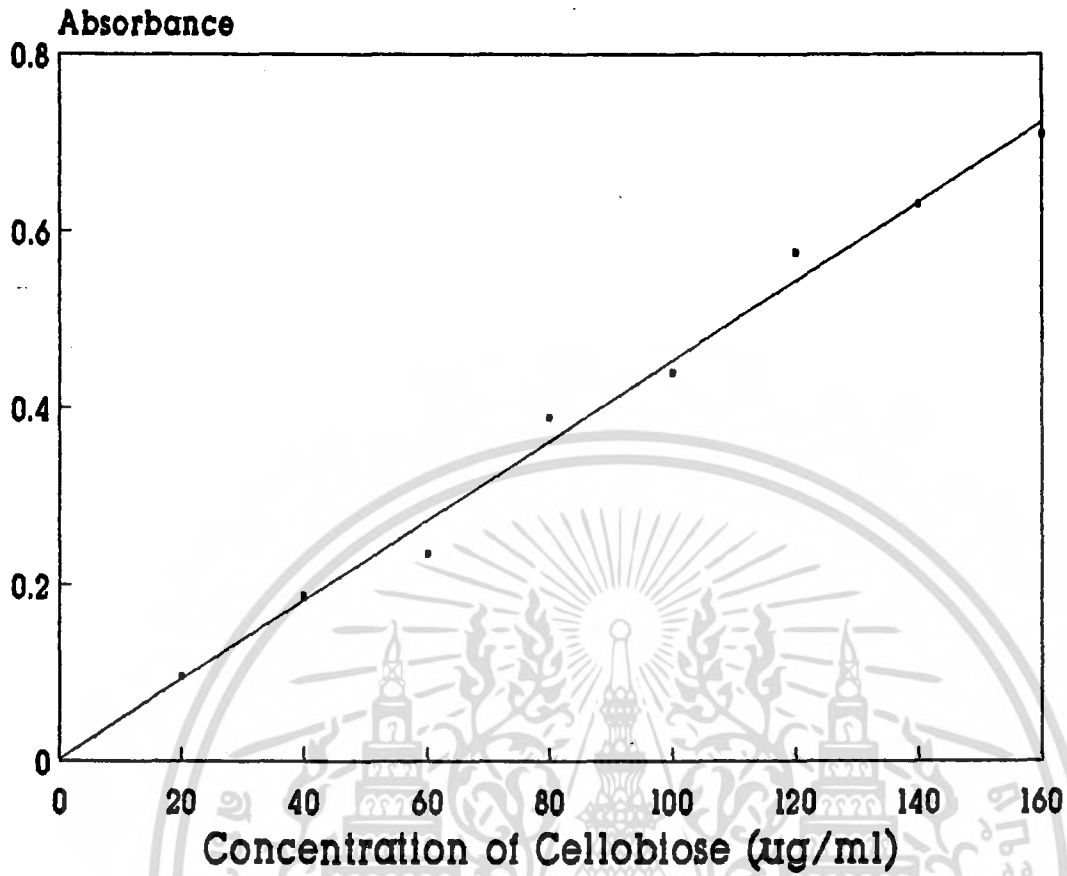
เพื่อหยุดปฏิกิริยา

ทำให้เย็นทันที

วัด Reducing Sugar โดยวิธีของ Nelson-Somogyi

การเตรียมกราฟมาตรฐานของเซลโลไบโอส

นำสารละลายมาตรฐานเซลโลไบโอสที่เตรียมได้ตามวิธีในภาคผนวก ข มาวัด  
ปริมาณ Reducing Sugar ตามวิธีของ Nelson-Somogyi นำผลไปเขียนกราฟ  
โดยให้ค่า O.D. อยู่แกนนตั้ง และค่าความเข้มข้นอยู่ในแนวนอน



ภาพที่ 36 กราฟมาตรฐานของสารละลายเซลโลไบโอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 6. การวิเคราะห์หาปริมาณ Reducing Sugar

### โดยวิธีของ Nelson-Somogyi

สารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร หรือ สารละลายน้ำตาล 1 มิลลิลิตร

เติม Somogyi Reagent 1 มิลลิลิตร

ต้มในน้ำเดือด 20 นาที

แช่น้ำเย็นทันที

เติม Nelson's Reagent 1 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

ทิ้งไว้ 10 นาที

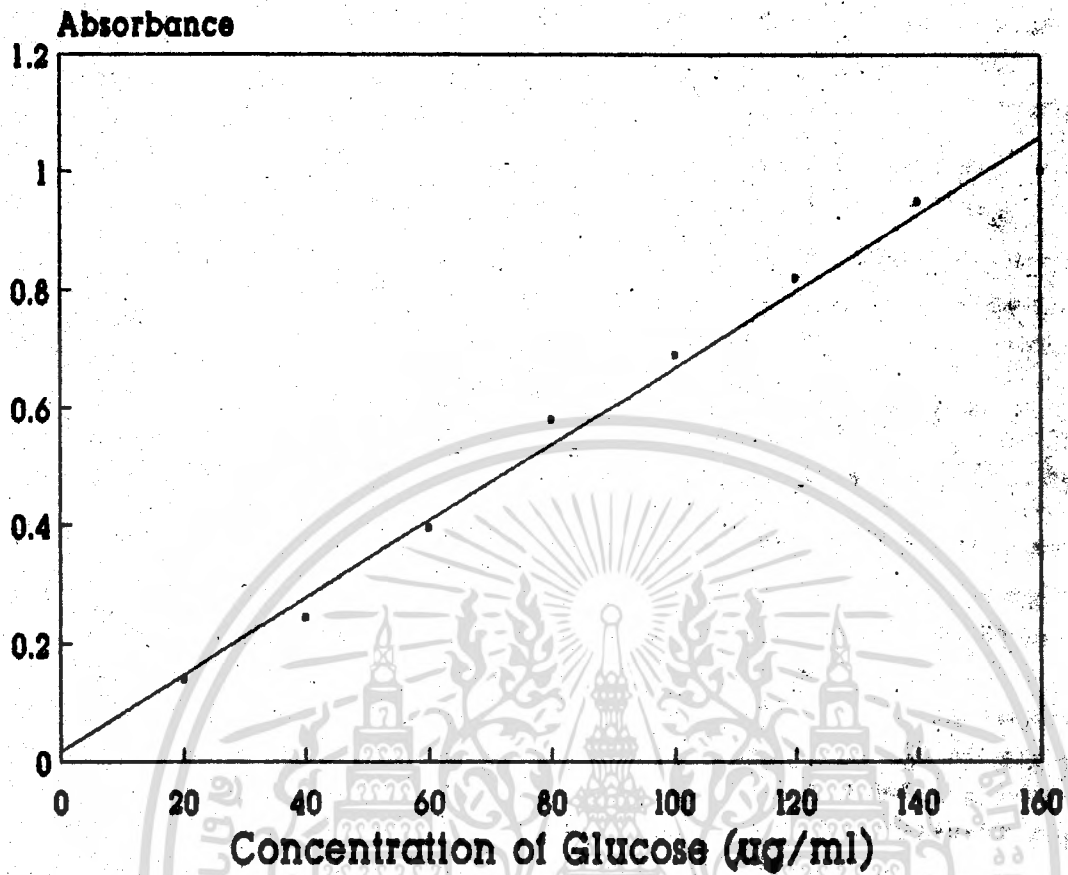
วัด O.D. ที่ 520 nm.

นำผลที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

การเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคส

นำสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่เตรียมได้ตามวิธีในภาคผนวก ข. มาวัดปริมาณ Reducing Sugar ตามวิธีของ Nelson-Somogyi นำผลไปเขียนกราฟ โดยให้ค่า O.D. อยู่แกนตั้ง และค่าความเข้มข้นอยู่ในแนวนอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 37 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.  
การวิเคราะห์ผล

**1. การคำนวณ micromolar extinction coefficient**

เส้นกราฟที่เขียนขึ้นระหว่างค่า Absorbance กับค่าความเข้มข้นของ กลูโคส มีค่าความชันเท่ากับ  $6.25 \times 10^{-6}$

เส้นกราฟที่เขียนขึ้นระหว่างค่า Absorbance กับค่าความเข้มข้นของ เซลโลไบโอส มีค่าความชันเท่ากับ  $3.50 \times 10^{-6}$

Micromolar Extinction Coefficient ของกลูโคส ( $K_g$ )

$$= 6.25 \times 10^{-6} \times 180$$

$$= 1.125 \times 10^{-3}$$

(MW. glucose = 180)

Micromolar Extinction Coefficient ของเซลโลไบโอส ( $K_c$ )

$$= 3.50 \times 10^{-6} \times 342$$

$$= 1.197 \times 10^{-3}$$

(MW. Cellobiose = 342)

**2. การคำนวณประสิทธิภาพการย่อยกระดาศกรอง**

เนื่องจาก  $A_r = K_g G_r$

ดังนั้น  $G_r = \frac{A_r}{K_g} = \frac{A_r}{1.125 \times 10^{-3}}$

เมื่อ  $G_r$  = ความเข้มข้นของกลูโคสในหน่วยไมโครโมลาร์ที่เกิดขึ้น  
จากการย่อยกระดาศกรอง

$A_r$  = แอบซอร์เบนต์ของกลูโคสในส่วนที่เกิดขึ้นจากการย่อย  
กระดาษกรอง

$K_r$  = Micromolar Extinction Coefficient ของกลูโคส

1 หน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยกระดาษกรองให้เป็น  
กลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

$$\begin{aligned}
 \text{สารละลาย 1000 มิลลิลิตร มีกลูโคส} &= G_r \quad \text{ไมโครโมล} \\
 \text{สารละลาย 1.0 มิลลิลิตร มีกลูโคส} &= \frac{G_r \times 1.0}{1000} \quad \text{ไมโครโมล} \\
 \text{ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ได้กลูโคส} &= \frac{G_r \times 1.0}{1000} \quad \text{ไมโครโมล} \\
 \text{ระยะเวลาบ่ม 1 นาที ได้กลูโคส} &= \frac{G_r \times 1.0}{1000 \times 60} \quad \text{ไมโครโมล} \\
 \text{ปริมาณเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ได้กลูโคส} &= \frac{G_r \times 1.0}{1000 \times 60} \quad \text{ไมโครโมล} \\
 \text{ปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ได้กลูโคส} &= \frac{G_r \times 1.0}{1000 \times 60 \times 0.5} \quad \text{ไมโครโมล} \\
 &= G_r \times 3.33 \times 10^{-5} \quad \text{หน่วย}
 \end{aligned}$$

### 3. การคำนวณประสิทธิภาพของ Endoglucanase

เนื่องจาก  $A_{cmc} = K_r G_{cmc}$

ดังนั้น  $G_{cmc} = \frac{A_{cmc}}{K_r}$

$$K_r$$

เมื่อ  $G_{cmc}$  = ความเข้มข้นของกลูโคสในหน่วยไมโครโมลลาร์ที่เกิดขึ้น  
จากการย่อย Carboxymethy Cellulose

$A_{cmc}$  = แอปซอร์เบนต์ของกลูโคสในส่วนที่เกิดจากการย่อย  
Carboxymethyl Cellulose

$K_{\epsilon}$  = Molar Extinction Coefficient ของกลูโคส

1 หน่วยเอนไซม์ Endoglucanase คือปริมาณเอนไซม์ Endoglucanase ที่สามารถย่อย Carboxymethyl Cellulose ให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมลาร์ ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

$$\begin{aligned}
 \text{สารละลาย 1000 มิลลิลิตร มีกลูโคส} &= G_{cmc} \text{ ไมโครโมล} \\
 \text{สารละลาย 1.0 มิลลิลิตร มีกลูโคส} &= \frac{G_{cmc} \times 1.0}{1000} \text{ ไมโครโมล} \\
 \text{ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ได้กลูโคส} &= \frac{G_{cmc} \times 1.0}{1000} \text{ ไมโครโมล} \\
 \text{ระยะเวลาบ่ม 1 นาที ได้กลูโคส} &= \frac{G_{cmc} \times 1.0}{1000 \times 30} \text{ ไมโครโมล} \\
 \text{ปริมาณเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ได้กลูโคส} &= \frac{G_{cmc} \times 1.0}{1000 \times 30} \text{ ไมโครโมล} \\
 \text{ปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ได้กลูโคส} &= \frac{G_{cmc} \times 1.0}{1000 \times 30 \times 0.5} \text{ ไมโครโมล} \\
 &= G_{cmc} \times 6.66 \times 10^{-6} \text{ หน่วย}
 \end{aligned}$$

#### 4. การคำนวณประสิทธิภาพของ Exoglucanase

เมื่อ  $A_{mc} = G_{mc} K_{\epsilon}$

ดังนั้น  $G_{mc} = \frac{A_{mc}}{K_{\epsilon}}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ  $G_{mc}$  = ความเข้มข้นของกลูโคสในหน่วยไมโครโมลาร์ที่เกิดขึ้น

จากการย่อย Cellulose Microcrystalline

$A_{mc}$  = แอมพลิจูดของกลูโคสในส่วนที่เกิดจากการย่อย

Cellulose Microcrystalline

$K_{\epsilon}$  = Molar Extinction Coefficient ของกลูโคส

1 หน่วยเอนไซม์ Exoglucanase คือ ปริมาณเอนไซม์ Exoglucanase ที่สามารถย่อย Cellulose Microcrystalline ให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมลาร์ ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

สารละลาย 1000 มิลลิกรัม มีกลูโคส =  $G_{mc}$  ไมโครโมล

สารละลาย 1.0 มิลลิกรัม มีกลูโคส =  $\frac{G_{mc} \times 1.0}{1000}$  ไมโครโมล

ระยะเวลาบ่ม 20 นาที ได้กลูโคส =  $\frac{G_{mc} \times 1.0}{1000}$  ไมโครโมล

ระยะเวลาบ่ม 1 นาที ได้กลูโคส =  $\frac{G_{mc} \times 1.0}{1000 \times 20}$  ไมโครโมล

ปริมาณเอนไซม์ 0.5 มิลลิกรัม ได้กลูโคส =  $\frac{G_{mc} \times 1.0}{1000 \times 20}$  ไมโครโมล

ปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิกรัม ได้กลูโคส =  $\frac{G_{mc} \times 1.0}{1000 \times 20 \times 0.5}$  ไมโครโมล

=  $G_{mc} \times 1 \times 10^{-4}$  หน่วย

## 5. การ Estimate Cellulase ( $\beta$ -Glucosidase) Activity

### 5.1 เมื่อเซลโลไบโอสทำปฏิกิริยากับ Nelson-Somogyi Reagent

สามารถคำนวณ ความเข้มข้นของเซลโลไบโอส จากสมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$A_o = C_o K_e \quad \text{----- (1)}$$

$A_o$  = แอบซอร์เบ้นด์ ของเซลโลไบโอสที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของ  
เซลโลไบโอส

$C_o$  = ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลโลไบโอส ในหน่วยไมโครโมลาร์

$K_e$  = Micromolar Extinction Coefficient ของ  
เซลโลไบโอส

แทนค่า  $C_o = 1.22 \times 10^{-2}$  ไมโครโมลาร์ (2.1 mg/0.055 M

Sodium Acetate Buffer pH 4.8 ปริมาตร 50 ml)

$$K_e = 1.197 \times 10^{-3}$$

ดังนั้น  $A_o = 1.46 \times 10^{-5}$

5.2 เมื่อเซลโลไบโอสถูกไฮโดรไลซ์โดยเบตากลูโคซิเดส แล้วนำมาทำ  
ปฏิกิริยากับ Nelson-Somogyi Reagent

แอบซอร์เบ้นด์ ของ Cellobiose-Glucose Solution ( $A_u$ )

คำนวณจากสมการ

$$A_u = (C_o - C_u) K_e + K_g G_u \quad \text{----- (2)}$$

$C_u$  = ความเข้มข้นของเซลโลไบโอสที่ถูกไฮโดรไลซ์  
ในหน่วยไมโครโมลาร์

$G_u$  = ความเข้มข้นของกลูโคสที่ผลิตออกมา ในหน่วย  
ไมโครโมลาร์

ดังนั้น  $C_u = 1/2 G_u \quad \text{----- (3)}$

แทน (3) ใน (2) และ จากสมการที่ (1)

$$G_u = \frac{A_u - A_o}{K_g - K_e/2}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$G_u$  = ความเข้มข้นของกลูโคส ซึ่งเป็นค่าของ  
Cellobiase Activity

### 5.3 การคำนวณประสิทธิภาพของ $\beta$ -Glucosidase

1 หน่วยเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase คือ ปริมาณเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ที่สามารถย่อย Cellobiose ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 2 ไมโครโมลาร์ ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

สารละลาย 1000 มิลลิลิตร มีกลูโคส	=	$G_u$	ไมโครโมล
สารละลาย 1.5 มิลลิลิตร มีกลูโคส	=	$\frac{G_u \times 1.5}{1000}$	ไมโครโมล
ระยะเวลาบ่ม 10 นาที ได้กลูโคส	=	$\frac{G_u \times 1.5}{1000}$	ไมโครโมล
ระยะเวลาบ่ม 1 นาที ได้กลูโคส	=	$\frac{G_u \times 1.5}{1000 \times 10}$	ไมโครโมล
ปริมาณเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ได้กลูโคส	=	$\frac{G_u \times 1.5}{1000 \times 10}$	ไมโครโมล
ปริมาณเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ได้กลูโคส	=	$\frac{G_u \times 1.5}{1000 \times 10 \times 0.5}$	ไมโครโมล
	=	$G_u \times 1.5 \times 10^{-4}$	หน่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 6. การวัดปริมาณโปรตีน

เส้นกราฟที่เขียนขึ้นระหว่าง แอบซอร์แบนต์ กับ ความเข้มข้นของโปรตีน (Bovine Serum Albumin) มีความเข้มข้นเท่ากับ  $1.70 \times 10^{-3}$

$$\text{ปริมาณโปรตีน} = \frac{\text{แอบซอร์แบนต์}}{1.70 \times 10^{-3}} \quad \text{มิลลิกรัม/มิลลิลิตร}$$

$$= \frac{\text{แอบซอร์แบนต์}}{1.70} \quad \text{มิลลิกรัม/มิลลิลิตร}$$

ได้จากการตรวจโปรตีนของสารละลายตัวอย่างโดยวิธีของ Lawry และคณะ (1951)

## ภาคผนวก จ.

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ1. การวิเคราะห์ Variance แบบสุ่มตลอด (Completely Random Design, CRD)

เป็นแผนการทดลองที่สนใจศึกษาปัจจัยหนึ่งโดยเฉพาะ เหมาะสำหรับการทดลองในห้องปฏิบัติการ และหน่วยทดลองต้องมีความสม่ำเสมอ คือมีความเท่ากันในทุกหน่วยการทดลอง เช่น ขนาด ปริมาณ

SOV	df	SS	MS	F-value
Treatment	$t-1$		$SS(tmt)/df(tmt)$	$MS(tmt)/MS(E)$
Error	$t(r-1)$		$SS(E)/df(E)$	
Total	$rt-1$			

วิธีคำนวณ

เมื่อ  $X_{ij}$  = ค่าสังเกตที่  $j$  ใน treatment ที่  $i$   
 $i$  = 1, 2, ...,  $t$   
 $j$  = 1, 2, ...,  $r$   
 $X_i$  = ผลรวมของ treatment ที่  $i$   
 $r$  = จำนวนซ้ำในแต่ละ treatment  
 $t$  = จำนวน treatment

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1)  $CT = \frac{\sum X^2}{rt} = \frac{(\sum X_{i,j})^2}{rt}$
- 2) total SS =  $\sum_{i,j} X_{i,j}^2 - CT$
- 3) Treatment SS =  $\frac{(X_{1.} + X_{2.} + \dots + X_{r.})^2}{r} - CT$
- 4) Error SS = Total SS - Treatment SS

การสรุปผล เปรียบเทียบค่า F จากการคำนวณ กับค่า F จากตาราง

ถ้า F-value > F ตาราง 5% => แตกต่างทางสถิติ

F-value > F ตาราง 1% => แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

F-value < F ตาราง 5% => ไม่แตกต่างทางสถิติ

## 2. การวิเคราะห์ข้อมูลจาก Factorial Experiment

เป็นการรวมชนิดต่างๆ ของสิ่งทดลองเข้าด้วยกัน เป็นการศึกษาค้นคว้าความแตกต่างระหว่างอิทธิพลอย่างง่ายของปัจจัยหนึ่งที่ระดับต่างๆ ของอีกปัจจัยหนึ่ง มีขนาด 2x2 ขึ้นไป

SOV	df	SS	MS	F-value	F-table
Treatment	ab-1				
A	a-1				
B	b-1				
AxB	(a-1)(b-1)				
Error	ab(r-1)				
Total	abr-1				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ควรระบุชื่อผู้จัดทำเอกสารไว้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### วิธีการคำนวณ

A = ปัจจัยที่ 1

B = ปัจจัยที่ 2

AxB = ปัจจัยที่ 1 และ ปัจจัยที่ 2 ร่วมกัน

วิธีการคำนวณอื่นๆ เหมือนกับ CRD

( ดร. จรุณ จันทลักษณ์, 2534 )



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$f_2$	$f_1$ Degrees of Freedom (for greater mean square)																						$f_2$		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200		500	$\infty$
1	161 4.052	200 4.999	216 5.403	225 5.625	230 5.764	234 5.859	237 5.928	239 5.981	241 6.022	242 6.056	243 6.082	244 6.106	245 6.142	246 6.169	248 6.208	249 6.234	250 6.261	251 6.286	252 6.302	253 6.323	253 6.334	254 6.352	254 6.361	254 6.366	1
2	18.51 98.49	19.00 99.00	19.16 99.17	19.25 99.25	19.30 99.30	19.33 99.33	19.16 99.16	19.32 99.37	19.38 99.39	19.39 99.40	19.40 99.41	19.41 99.42	19.42 99.43	19.43 99.44	19.44 99.45	19.45 99.46	19.45 99.47	19.47 99.48	19.47 99.48	19.48 99.49	19.49 99.49	19.49 99.49	19.50 99.50	19.50 99.50	2
3	10.13 34.12	9.55 30.82	9.28 29.46	9.12 28.71	9.01 28.24	8.94 27.91	8.88 27.67	8.84 27.49	8.81 27.34	8.78 27.23	8.76 27.13	8.74 27.05	8.71 26.92	8.69 26.83	8.66 26.69	8.64 26.60	8.62 26.50	8.60 26.41	8.58 26.35	8.57 26.27	8.56 26.23	8.54 26.18	8.54 26.14	8.53 26.12	3
4	7.71 21.20	6.94 18.00	6.59 16.69	6.39 15.98	6.26 15.52	6.16 15.21	6.09 14.98	6.04 14.80	6.00 14.66	5.96 14.54	5.93 14.45	5.91 14.37	5.87 14.24	5.84 14.15	5.80 14.02	5.77 13.93	5.74 13.83	5.71 13.74	5.70 13.69	5.68 13.61	5.66 13.57	5.65 13.52	5.64 13.48	5.63 13.46	4
5	6.61 16.26	5.79 13.27	5.41 12.06	5.19 11.39	5.05 10.97	4.95 10.67	4.88 10.45	4.82 10.29	4.78 10.15	4.74 10.05	4.70 9.96	4.68 9.89	4.64 9.77	4.60 9.68	4.56 9.55	4.53 9.47	4.50 9.38	4.46 9.29	4.44 9.24	4.42 9.17	4.40 9.13	4.38 9.07	4.37 9.04	4.36 9.02	5
6	5.99 13.74	5.14 10.92	4.76 9.78	4.53 9.15	4.39 8.75	4.28 8.47	4.21 8.26	4.15 8.10	4.10 7.98	4.06 7.87	4.03 7.79	4.00 7.72	3.96 7.60	3.92 7.52	3.87 7.39	3.84 7.31	3.81 7.23	3.77 7.14	3.75 7.09	3.72 7.02	3.71 6.99	3.69 6.94	3.68 6.90	3.67 6.88	6
7	5.59 12.25	4.74 9.55	4.35 8.45	4.12 7.85	3.97 7.46	3.87 7.19	3.79 7.00	3.73 6.84	3.68 6.71	3.63 6.62	3.60 6.54	3.57 6.47	3.52 6.35	3.49 6.27	3.44 6.15	3.41 6.07	3.38 5.98	3.34 5.90	3.32 5.85	3.29 5.78	3.28 5.75	3.25 5.70	3.24 5.67	3.23 5.65	7
8	5.32 11.26	4.46 8.65	4.07 7.59	3.84 7.01	3.69 6.63	3.58 6.37	3.50 6.19	3.44 6.03	3.39 5.91	3.34 5.82	3.31 5.74	3.28 5.67	3.23 5.56	3.20 5.48	3.15 5.36	3.12 5.28	3.08 5.20	3.05 5.11	3.03 5.06	3.00 5.00	2.98 4.96	2.96 4.91	2.94 4.88	2.93 4.86	8
9	5.12 10.56	4.26 8.02	3.86 6.99	3.63 6.42	3.48 6.06	3.37 5.80	3.29 5.62	2.23 5.47	3.18 5.35	3.13 5.26	3.10 5.18	3.07 5.11	3.02 5.00	2.98 4.92	2.93 4.80	2.90 4.73	2.86 4.64	2.82 4.56	2.80 4.51	2.77 4.45	2.76 4.41	2.73 4.36	2.72 4.33	2.71 4.31	9
10	4.96 10.04	4.10 7.56	3.71 6.55	3.48 5.99	3.33 5.64	3.22 5.39	3.14 5.21	3.07 5.06	3.02 4.95	2.97 4.85	2.94 4.78	2.91 4.71	2.86 4.60	2.82 4.52	2.77 4.41	2.74 4.33	2.70 4.25	2.67 4.17	2.64 4.12	2.61 4.05	2.59 4.01	2.56 3.96	2.55 3.93	2.54 3.91	10
11	4.84 9.65	1.98 7.20	3.59 6.22	3.36 5.67	3.20 5.32	3.09 5.07	3.01 4.88	2.95 4.74	2.90 4.63	2.86 4.54	2.82 4.46	2.79 4.40	2.74 4.29	2.70 4.21	2.65 4.10	2.61 4.02	2.57 3.94	2.53 3.86	2.50 3.80	2.47 3.74	2.45 3.70	2.42 3.66	2.41 3.62	2.40 3.60	11
12	4.75 9.33	3.88 6.93	3.49 5.95	3.26 5.41	3.11 5.06	3.00 4.82	2.92 4.65	2.85 4.50	2.80 4.39	2.76 4.30	2.72 4.22	2.69 4.16	2.64 4.05	2.60 3.98	2.54 3.86	2.50 3.78	2.46 3.70	2.42 3.61	2.40 3.56	2.36 3.49	2.35 3.46	2.32 3.41	2.31 3.38	2.30 3.36	12
13	4.67 9.07	3.80 6.70	3.41 5.74	3.18 5.20	3.02 4.86	2.92 4.62	2.84 4.44	2.77 4.30	2.72 4.19	2.67 4.10	2.63 4.02	2.60 3.96	2.55 3.85	2.51 3.78	2.46 3.67	2.42 3.59	2.38 3.51	2.34 3.42	2.32 3.37	2.28 3.30	2.26 3.27	2.24 3.21	2.22 3.18	2.21 3.16	13

0131971 10 F-Value 1% and 5%

$f_2$	$f_1$ Degrees of Freedom (for greater mean square)																								$f_2$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	$\infty$	
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.77	2.70	2.65	2.60	2.56	2.53	2.48	2.44	2.39	2.35	2.31	2.27	2.24	2.21	2.19	2.16	2.14	2.13	14
	8.86	6.51	5.56	5.03	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.86	3.80	3.70	3.62	3.51	3.43	3.34	3.26	3.21	3.14	3.11	3.06	3.02	3.00	
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.70	2.64	2.59	2.55	2.51	2.48	2.43	2.39	2.33	2.29	2.25	2.21	2.18	2.15	2.12	2.10	2.08	2.07	15
	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.73	3.67	3.56	3.48	3.36	3.29	3.20	3.12	3.07	3.00	2.97	2.92	2.89	2.87	
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.45	2.42	2.37	2.33	2.28	2.24	2.20	2.16	2.13	2.09	2.07	2.04	2.02	2.01	16
	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.61	3.55	3.45	3.37	3.25	3.18	3.10	3.01	2.96	2.98	2.86	2.80	2.77	2.75	
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.62	2.55	2.50	2.45	2.41	2.38	2.33	2.29	2.23	2.19	2.15	2.11	2.08	2.04	2.02	1.99	1.97	1.96	17
	8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.52	3.45	3.35	3.27	3.16	3.08	3.00	2.92	2.86	2.79	2.76	2.70	2.67	2.65	
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.29	2.25	2.19	2.15	2.11	2.07	2.04	2.00	1.98	1.95	1.93	1.92	18
	6.28	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.85	3.71	3.60	3.51	3.44	3.37	3.27	3.19	3.07	3.00	2.91	2.83	2.78	2.71	2.68	2.62	2.59	2.57	
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.55	2.48	2.43	2.38	2.34	2.31	2.26	2.21	2.15	2.11	2.07	2.02	2.00	1.96	1.94	1.91	1.90	1.88	19
	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.36	3.30	3.19	3.12	3.00	2.92	2.84	2.76	2.70	2.63	2.60	2.54	2.51	2.49	
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.52	2.45	2.40	2.35	2.31	2.28	2.23	2.18	2.12	2.08	2.04	1.99	1.96	1.92	1.90	1.87	1.85	1.84	20
	5.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.71	3.56	3.45	3.37	3.30	3.23	3.13	3.05	2.94	2.86	2.77	2.69	2.63	2.56	2.53	2.47	2.44	2.42	
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.20	2.15	2.09	2.05	2.00	1.96	1.93	1.89	1.87	1.84	1.82	1.81	21
	8.02	5.78	4.87	4.37	4.04	3.81	3.65	3.51	3.40	3.31	3.24	3.17	3.07	2.99	2.88	2.80	2.72	2.63	2.58	2.51	2.47	2.42	2.38	2.36	
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.47	2.40	2.35	2.30	2.26	2.23	2.18	2.13	2.07	2.03	1.98	1.93	1.91	1.87	1.84	1.81	1.80	1.78	22
	7.94	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.18	3.12	3.02	2.94	2.83	2.75	2.67	2.58	2.53	2.46	2.42	2.37	2.33	2.31	
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.45	2.38	2.32	2.28	2.24	2.20	2.14	2.10	2.04	2.00	1.96	1.91	1.88	1.84	1.82	1.79	1.77	1.76	23
	7.58	5.66	4.76	4.26	3.94	3.71	3.54	3.41	3.30	3.21	3.14	3.07	2.97	2.89	2.78	2.70	2.62	2.53	2.48	2.41	2.37	2.32	2.28	2.26	
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.43	2.36	2.30	2.26	2.22	2.18	2.13	2.09	2.02	1.98	1.94	1.89	1.86	1.82	1.80	1.76	1.74	1.73	24
	7.82	5.61	4.72	4.22	3.90	3.67	3.50	3.36	3.25	3.17	3.09	3.03	2.93	2.85	2.74	2.66	2.58	2.49	2.44	2.36	2.33	2.27	2.23	2.21	
25	4.24	3.38	2.99	2.76	2.60	2.49	2.41	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.11	2.06	2.00	1.96	1.92	1.87	1.84	1.80	1.77	1.74	1.72	1.71	25
	7.77	5.57	4.68	4.18	3.86	3.63	3.46	3.32	3.21	3.13	3.05	2.99	2.89	2.81	2.70	2.62	2.54	2.45	2.40	2.32	2.29	2.23	2.19	2.17	
26	4.22	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.10	2.05	1.99	1.95	1.90	1.85	1.82	1.78	1.76	1.72	1.70	1.69	26
	7.72	5.53	4.64	4.14	3.82	3.59	3.42	3.29	3.17	3.09	3.02	2.96	2.86	2.77	2.66	2.58	2.50	2.41	2.36	2.28	2.25	2.19	2.15	2.13	

The function  $F = c$  with exponent  $2z$  computed in part from Fisher's table VI(7). Additional critics are by interpolation mostly graphical.

$f_2$	$f_1$ Degrees of Freedom (for greater mean square)																						$f_2$		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200		500	$\infty$
27	4.21 7.68	3.35 5.49	2.96 4.60	2.73 4.11	2.57 3.79	2.46 3.56	2.37 3.39	2.30 3.26	2.25 3.14	2.20 3.06	2.16 2.98	2.13 2.93	2.08 2.83	2.03 2.74	1.97 2.63	1.93 2.55	1.88 2.47	1.84 2.38	1.80 2.33	1.76 2.25	1.74 2.21	1.71 2.16	1.68 2.12	1.67 2.10	27
28	4.20 7.64	3.34 5.45	2.95 4.57	2.71 4.07	2.56 3.76	2.44 3.53	2.36 3.36	2.29 3.23	2.24 3.11	2.19 3.03	2.15 2.95	2.12 2.90	2.06 2.80	2.02 2.71	1.96 2.60	1.91 2.52	1.87 2.44	1.81 2.35	1.78 2.30	1.75 2.22	1.72 2.18	1.69 2.13	1.67 2.09	1.65 2.06	28
29	4.18 7.60	3.33 5.42	2.93 4.54	2.70 4.04	2.54 3.73	2.43 3.50	2.35 3.33	2.28 3.20	2.22 3.08	2.18 3.00	2.14 2.92	2.10 2.87	2.05 2.77	2.00 2.68	1.94 2.57	1.90 2.49	1.85 2.41	1.80 2.32	1.77 2.27	1.73 2.19	1.71 2.15	1.68 2.10	1.65 2.06	1.64 2.03	29
30	4.17 7.56	3.32 5.39	2.92 4.51	2.69 4.02	2.53 3.70	2.42 3.47	2.34 3.30	2.27 3.17	2.21 3.06	2.16 2.98	2.12 2.90	2.09 2.84	2.04 2.74	1.99 2.66	1.93 2.55	1.89 2.47	1.84 2.38	1.79 2.29	1.76 2.24	1.72 2.16	1.69 2.13	1.66 2.07	1.64 2.03	1.62 2.01	30
32	4.15 7.50	3.30 5.34	2.90 4.46	2.67 3.97	2.51 3.66	2.40 3.42	2.32 3.25	2.25 3.12	2.19 3.01	2.14 2.94	2.10 2.86	2.07 2.80	2.02 2.70	1.97 2.62	1.91 2.51	1.86 2.42	1.82 2.34	1.76 2.25	1.74 2.20	1.69 2.12	1.67 2.08	1.64 2.02	1.61 1.98	1.59 1.96	32
34	4.13 7.44	3.28 5.29	2.88 4.42	2.65 3.93	2.49 3.61	2.38 3.38	2.30 3.21	2.23 3.08	2.17 2.97	2.12 2.89	2.08 2.82	2.05 2.76	2.00 2.66	1.95 2.58	1.89 2.47	1.84 2.38	1.80 2.30	1.74 2.21	1.71 2.15	1.67 2.08	1.64 2.04	1.61 1.98	1.59 1.94	1.57 1.91	34
36	4.11 7.39	3.26 5.25	2.86 4.38	2.63 3.89	2.48 3.58	2.36 3.35	2.28 3.18	2.21 3.04	2.15 2.94	2.10 2.86	2.06 2.78	2.03 2.72	1.98 2.62	1.93 2.54	1.87 2.43	1.82 2.35	1.78 2.26	1.72 2.17	1.69 2.12	1.65 2.04	1.62 2.00	1.59 1.94	1.56 1.90	1.55 1.87	36
38	4.10 7.35	3.25 5.21	2.85 4.34	2.62 3.86	2.46 3.54	2.35 3.32	2.26 3.15	2.19 3.02	2.14 2.91	2.09 2.82	2.05 2.75	2.02 2.69	1.96 2.59	1.92 2.51	1.85 2.40	1.80 2.32	1.76 2.22	1.71 2.14	1.67 2.08	1.63 2.00	1.60 1.97	1.57 1.90	1.54 1.86	1.53 1.84	38
40	4.08 7.31	3.23 5.18	2.84 4.31	2.61 3.83	2.45 3.51	2.34 3.29	2.25 3.12	2.18 2.99	2.12 2.88	2.07 2.80	2.04 2.73	2.00 2.66	1.95 2.56	1.90 2.49	1.84 2.37	1.79 2.29	1.74 2.20	1.69 2.11	1.66 2.05	1.61 1.97	1.59 1.94	1.55 1.88	1.53 1.84	1.51 1.81	40
42	4.07 7.27	3.22 5.15	2.83 4.29	2.59 3.80	2.44 3.49	2.32 3.26	2.24 3.10	2.17 2.96	2.11 2.86	2.06 2.77	2.02 2.70	1.99 2.64	1.94 2.54	1.89 2.46	1.82 2.35	1.78 2.26	1.73 2.17	1.68 2.08	1.64 2.02	1.60 1.94	1.57 1.91	1.54 1.85	1.51 1.80	1.49 1.78	42
44	4.06 7.24	3.21 5.12	2.82 4.26	2.58 3.78	2.43 3.46	2.31 3.24	2.23 3.07	2.16 2.94	2.10 2.84	2.05 2.75	2.01 2.68	1.98 2.62	1.92 2.52	1.88 2.44	1.81 2.32	1.76 2.24	1.72 2.15	1.66 2.06	1.63 2.00	1.58 1.92	1.56 1.88	1.52 1.82	1.50 1.76	1.48 1.75	44
46	4.05 7.21	3.20 5.10	2.81 4.24	2.57 3.76	2.42 3.44	2.30 3.22	2.22 3.05	2.14 2.92	2.09 2.82	2.04 2.73	2.00 2.66	1.97 2.60	1.91 2.50	1.87 2.42	1.80 2.30	1.75 2.22	1.71 2.13	1.65 2.04	1.62 1.98	1.57 1.90	1.54 1.86	1.51 1.80	1.48 1.76	1.46 1.72	46
48	4.04 7.19	3.19 5.08	2.80 4.22	2.56 3.74	2.41 3.42	2.30 3.20	2.21 3.04	2.14 2.90	2.08 2.80	2.03 2.71	1.99 2.64	1.96 2.58	1.90 2.48	1.86 2.40	1.79 2.28	1.74 2.20	1.70 2.11	1.64 2.02	1.61 1.96	1.56 1.88	1.53 1.84	1.50 1.78	1.47 1.73	1.45 1.70	48

$f_2$	$f_1$ Degrees of Freedom (for greater mean square)																						$f_2$		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200		500	$\infty$
50	4.03	3.18	2.79	2.56	2.40	2.29	2.20	2.13	2.07	2.02	1.98	1.95	1.90	1.85	1.78	1.74	1.69	1.63	1.60	1.55	1.52	1.48	1.46	1.44	50
	7.17	5.06	4.20	3.72	3.41	3.18	3.02	2.88	2.78	2.70	2.62	2.56	2.46	2.39	2.26	2.18	2.10	2.00	1.94	1.86	1.82	1.76	1.71	1.63	
55	4.02	3.17	2.78	2.54	2.38	2.27	2.18	2.11	2.05	2.00	1.97	1.93	1.88	1.83	1.76	1.72	1.67	1.61	1.58	1.52	1.50	1.46	1.43	1.41	55
	7.12	5.01	4.16	3.68	3.37	3.15	2.98	2.85	2.75	2.66	2.59	2.53	2.43	2.35	2.23	2.15	2.06	1.96	1.90	1.82	1.78	1.71	1.66	1.64	
60	4.00	3.15	2.76	2.52	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.95	1.92	1.86	1.81	1.75	1.70	1.65	1.59	1.56	1.50	1.48	1.44	1.41	1.39	60
	7.08	4.98	4.13	3.65	3.34	3.12	2.95	2.82	2.72	2.63	2.56	2.50	2.40	2.32	2.20	2.12	2.03	1.93	1.87	1.79	1.74	1.68	1.63	1.60	
65	3.99	3.14	2.75	2.51	2.36	2.24	2.15	2.08	2.02	1.98	1.94	1.90	1.85	1.80	1.73	1.68	1.63	1.57	1.54	1.49	1.46	1.42	1.39	1.37	65
	7.04	4.95	4.10	3.62	3.31	3.09	2.93	2.79	2.70	2.61	2.54	2.47	2.37	2.30	2.18	2.09	2.00	1.98	1.84	1.76	1.71	1.64	1.60	1.56	
70	3.98	3.13	2.74	2.50	2.35	2.23	2.14	2.07	2.01	1.97	1.93	1.89	1.84	1.79	1.72	1.67	1.62	1.56	1.53	1.47	1.45	1.40	1.37	1.35	70
	7.01	4.92	4.08	3.60	3.29	3.07	2.91	2.77	2.67	2.59	2.51	2.45	2.35	2.28	2.15	2.07	1.98	1.88	1.82	1.74	1.69	1.62	1.56	1.53	
80	3.96	3.11	2.72	2.48	2.33	2.21	2.12	2.05	1.99	1.95	1.91	1.88	1.82	1.77	1.70	1.65	1.60	1.54	1.51	1.45	1.42	1.38	1.35	1.32	80
	6.96	4.88	4.04	3.56	3.25	3.04	2.87	2.74	2.64	2.55	2.48	2.41	2.32	2.24	2.11	2.03	1.94	1.84	1.78	1.70	1.65	1.57	1.52	1.49	
100	3.94	3.09	2.70	2.46	2.30	2.19	2.10	2.03	1.97	1.92	1.88	1.85	1.79	1.75	1.68	1.63	1.57	1.51	1.48	1.42	1.39	1.34	1.30	1.28	100
	6.90	4.82	3.98	3.51	3.20	2.99	2.82	2.69	2.59	2.51	2.43	2.36	2.26	2.19	2.06	1.98	1.89	1.79	1.73	1.64	1.59	1.51	1.46	1.43	
125	3.92	3.07	2.68	2.44	2.29	2.17	2.08	2.01	1.95	1.90	1.86	1.83	1.77	1.72	1.65	1.60	1.55	1.49	1.45	1.39	1.36	1.31	1.27	1.25	125
	6.84	4.78	3.94	3.47	3.17	2.95	2.79	2.65	2.56	2.47	2.40	2.33	2.23	2.15	2.03	1.94	1.85	1.75	1.68	1.59	1.54	1.46	1.40	1.37	
150	3.91	3.06	2.67	2.43	2.27	2.16	2.07	2.00	1.94	1.89	1.85	1.82	1.76	1.71	1.64	1.59	1.54	1.47	1.44	1.37	1.34	1.29	1.25	1.22	150
	6.81	4.75	3.91	3.44	3.14	2.92	2.76	2.62	2.53	2.44	2.37	2.30	2.20	2.12	2.00	1.91	1.83	1.72	1.66	1.56	1.51	1.43	1.37	1.33	
200	3.89	3.04	2.65	2.41	2.26	2.14	2.05	1.98	1.92	1.87	1.83	1.80	1.74	1.69	1.62	1.57	1.52	1.45	1.42	1.35	1.32	1.26	1.22	1.19	200
	6.76	4.71	3.88	3.41	3.11	2.90	2.73	2.60	2.50	2.41	2.34	2.28	2.17	2.09	1.97	1.88	1.79	1.69	1.62	1.53	1.48	1.39	1.33	1.28	
400	3.86	3.02	2.62	2.39	2.23	2.12	2.03	1.96	1.90	1.85	1.81	1.78	1.72	1.67	1.60	1.54	1.49	1.42	1.38	1.32	1.28	1.22	1.16	1.13	400
	6.70	4.66	3.83	3.36	3.06	2.85	2.69	2.55	2.46	2.37	2.29	2.23	2.12	2.04	1.92	1.84	1.74	1.64	1.57	1.47	1.42	1.32	1.24	1.19	
1000	3.85	3.00	2.61	2.38	2.22	2.10	2.02	1.95	1.89	1.84	1.80	1.76	1.70	1.65	1.58	1.53	1.47	1.41	1.36	1.30	1.26	1.19	1.13	1.08	1000
	6.66	4.62	3.80	3.34	3.04	2.82	2.66	2.53	2.43	2.34	2.26	2.20	2.09	2.01	1.89	1.81	1.71	1.61	1.54	1.44	1.38	1.28	1.19	1.11	
$\infty$	3.84	2.99	2.60	2.37	2.21	2.09	2.01	1.94	1.88	1.83	1.79	1.75	1.69	1.64	1.57	1.52	1.46	1.40	1.35	1.28	1.24	1.17	1.11	1.00	$\infty$
	6.64	4.60	3.78	3.32	3.02	2.80	2.64	2.51	2.41	2.32	2.24	2.18	2.07	1.99	1.87	1.79	1.69	1.59	1.52	1.41	1.36	1.25	1.15	1.00	

## ภาคผนวก ฉ.

## ตารางแสดงผลการทดลอง

วันที่	dry weight	เชื้อจุลินทรีย์	
		<i>T. reesei</i>	mutant <i>T. reesei</i>
1		1.12	1.30
2		1.50	1.78
3		1.88	4.98
4		3.38	7.18
5		6.00	11.54
6		7.02	13.14
7		7.32	13.28
8		7.36	13.20
9		7.50	13.16
10		7.34	12.48

ตารางที่ 11 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ในรูปน้ำหนักแห้งของเส้นใย (mg/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบเขย่าขวด ในสภาวะควบคุม อัตราเร็วในการเขย่า 250 rpm, 28°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Soluble Protein	เชื้อจุลินทรีย์	
	<i>T. reesei</i>	mutant <i>T. reesei</i>
วันที่		
1	1.235	1.882
2	1.647	2.000
3	1.618	2.529
4	1.700	6.253
5	8.118	16.706
6	8.706	16.353
7	11.412	17.765
8	11.294	18.236
9	3.559	5.882
10	2.470	4.882

ตารางที่ 12 ผลการศึกษาปริมาณ Soluble Protein (mg/ml)  
เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า  
ในสภาวะที่ควบคุมอัตราเร็วในการเขย่า 250 rpm, 28°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันที่	FPA Activity	เชื้อจุลินทรีย์	
		<i>T. reesei</i>	mutant <i>T. reesei</i>
1		0.059	0.152
2		0.098	0.213
3		0.095	0.391
4		0.133	0.494
5		0.195	1.113
6		0.213	1.156
7		0.349	1.279
8		0.373	1.291
9		0.343	1.143
10		0.201	0.814

ตารางที่ 13 ผลการศึกษา Filter Paper Degradation Activity (IU/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า ในสภาวะที่ควบคุมอัตราเร็วในการเขย่า 250 rpm, 28°C

Endo. Activity วันที่	เชื้อจุลินทรีย์	
	<i>T. reesei</i>	mutant <i>T. reesei</i>
1	0.358	0.329
2	0.497	0.426
3	0.722	0.852
4	1.048	1.812
5	2.581	4.440
6	3.019	4.677
7	3.741	4.878
8	3.943	4.594
9	2.930	1.459
10	1.119	1.255

ตารางที่ 14 ผลการศึกษา Endoglucanase Activity (IU/ml)  
เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า  
ในสภาวะที่ควบคุมอัตราเร็วในการเขย่า 250 rpm, 28°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Exo. Activity วันที่	เชื้อจุลินทรีย์	
	<i>T. reesei</i>	mutant <i>T. reesei</i>
1	0.635	0.764
2	0.812	0.823
3	1.006	1.718
4	1.328	1.952
5	3.466	5.906
6	4.788	6.498
7	5.091	7.333
8	4.899	7.971
9	2.462	5.145
10	0.940	3.004

ตารางที่ 15 ผลการศึกษา Exoglucanase Activity (IU/ml)  
เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า  
ในสภาวะที่ควบคุมอัตราเร็วในการเขย่า 250 rpm, 28°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันที่	$\beta$ -glu. Activity	เชื้อจุลินทรีย์	
		<i>T. reesei</i>	mutant <i>T. reesei</i>
1		3.477	5.330
2		4.275	5.572
3		5.558	5.914
4		11.343	11.258
5		19.836	23.541
6		22.587	24.681
7		24.339	28.641
8		27.018	29.982
9		13.680	15.162
10		9.804	11.115

**ตารางที่ 16** ผลการศึกษา  $\beta$ -Glucosidase Activity (IU/ml)  
เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบ ขวดเขย่า  
ในสภาวะที่ควบคุมอัตราเร็วในการเขย่า 250 rpm, 28°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันที่	Dry Weight (mg/ml)
1	1.12
2	1.76
3	3.30
4	4.60
5	5.50
6	5.60
7	5.24
8	4.88
9	4.86
10	5.12

ตารางที่ 17 การวัดความเจริญเติบโตของเซลล์ *T. reesei*  
 ในรูปน้ำหนักแห้งของเส้นใย (mg/ml)  
 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก  
 ในสภาวะที่ควบคุม pH 4.8, อัตราการกวน 300 rpm,  
 ให้อากาศ 1.0 VVM, 28°C

dry weight. วันที่	ระดับ pH				
	4.0	4.4	4.8	5.2	5.6
1	0.70	0.94	1.30	1.42	0.66
2	1.28	1.56	1.66	1.64	1.70
3	3.48	3.90	4.30	4.52	4.22
4	4.70	5.36	6.00	7.06	6.58
5	5.12	5.78	6.66	7.38	7.08
6	5.18	5.84	7.28	7.04	6.22
7	4.88	5.64	6.36	6.84	6.24
8	4.92	5.50	7.10	6.86	6.06
9	4.78	5.68	7.18	6.72	5.90
10	4.64	5.70	7.20	6.50	5.76

ตารางที่ 18 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ mutant *T. reesei*  
 ในรูปน้ำหนักแห้งของเส้นใย (mg/ml)  
 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก  
 ในสภาวะที่ควบคุม pH ระดับต่างๆ กัน

dry weight วันที่	ปริมาณอากาศ (VVM) และ อัตราการกวน (rpm)			
	0.5, 300	1.0, 300	0.5, 400	1.0, 400
1	1.10	1.14	1.30	1.48
2	1.50	1.75	1.50	1.78
3	3.90	4.80	4.50	5.08
4	5.96	6.00	6.52	6.66
5	5.76	6.20	6.70	5.78
6	5.70	6.64	6.02	5.70
7	5.78	6.50	5.78	5.40
8	5.62	6.62	5.98	5.48
9	5.66	6.60	6.00	5.26
10	5.78	6.60	5.7	5.20

ตารางที่ 19 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ mutant *T. reesei*

ในรูปน้ำหนักแห้งของเส้นใย (mg/ml)

เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนระดับต่างๆกัน

วันที่	Soluble Protein (mg/ml)
1	1.029
2	1.471
3	1.735
4	2.765
5	6.824
6	9.177
7	10.471
8	11.165
9	9.117
10	5.411

ตารางที่ 20 ผลการศึกษาปริมาณ Soluble Protein (mg/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะควบคุม pH 4.8, อัตราการวน 300 rpm, ให้อากาศ 1.0 VVM, 28°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันที่	FPA Activity (IU/ml)
1	0.059
2	0.085
3	0.178
4	0.361
5	0.243
6	0.284
7	0.462
8	0.545
9	0.394
10	0.358

ตารางที่ 21 ผลการศึกษา FPA Activity (IU/ml)  
 ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei*  
 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก  
 ในสภาวะที่มีการควบคุม pH 4.8,  
 อัตราการกวน 300 rpm, ให้อากาศ 1.0 VVM, 28°C

วันที่	Endoglucanase Activity (IU/ml)
1	0.417
2	0.592
3	0.761
4	1.652
5	2.996
6	3.505
7	4.262
8	5.233
9	3.226
10	1.217

ตารางที่ 22 ผลการศึกษา Endoglucanase Activity (IU/ml)  
 ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei*  
 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก  
 ในสภาวะที่ควบคุม pH 4.8, อัตราการกวน 300 rpm  
 ที่อากาศ 1.0 VVM, 28°C

วันที่	Exoglucanase Activity (IU/ml)
1	0.788
2	0.823
3	1.600
4	1.898
5	4.462
6	5.343
7	5.865
8	5.735
9	4.618
10	2.111

ตารางที่ 23 ผลการศึกษา Exoglucanase Activity (IU/ml)  
 ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei*  
 เมื่อย่อยเชื้อในถังหมัก  
 ในสภาวะที่มีการควบคุม pH 4.8, อัตราการกวน 300 rpm  
 ให้อากาศ 1.0 VVM, 28°C

วันที่	$\beta$ -glucosidase Activity (IU/ml)
1	4.560
2	5.259
3	5.885
4	11.286
5	23.427
6	22.971
7	25.935
8	27.930
9	14.535
10	10.745

ตารางที่ 24 ผลการศึกษา  $\beta$ -Glucosidase Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ *T. reesei* เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่มีการควบคุม pH 4.8, อัตราการกวน 300 rpm ให้อากาศ 1.0 VVM, 28°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันที่	Soluble Protein	ระดับ pH				
		4.0	4.4	4.8	5.2	5.6
1	1.265	2.206	3.529	2.353	1.853	
2	2.059	2.999	5.353	4.823	4.177	
3	3.530	4.353	10.471	8.706	8.353	
4	7.059	6.823	15.059	13.647	11.765	
5	11.177	15.294	23.235	19.118	18.235	
6	11.353	14.823	26.764	23.059	20.176	
7	14.411	18.529	30.882	25.529	21.411	
8	16.058	26.352	34.176	30.882	25.528	
9	16.176	21.471	29.412	25.883	21.765	
10	14.823	16.000	22.353	21.176	16.941	

ตารางที่ 25 ผลการศึกษาปริมาณ Soluble Protein (mg/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *T. reesei* เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่มีการควบคุม pH ในระดับต่างๆ

FPA Activity วันที่	ระดับ pH				
	4.0	4.4	4.8	5.2	5.6
1	0.056	0.153	0.204	0.184	0.118
2	0.142	0.192	0.219	0.185	0.104
3	0.349	0.402	0.503	0.367	0.207
4	0.444	0.592	0.710	0.568	0.497
5	0.769	0.769	1.021	0.858	0.814
6	0.911	0.911	1.181	0.974	0.911
7	0.953	1.077	1.533	1.222	0.850
8	0.995	1.181	2.155	1.676	1.057
9	0.823	0.873	1.406	1.110	0.858
10	0.639	0.793	1.066	0.852	0.663

ตารางที่ 26 ผลการศึกษา FPA Activity (IU/ml)  
 ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *T. reesei*  
 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก  
 ในสภาวะที่ควบคุม pH ในระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Endo. Activity วันที่	ระดับ pH				
	4.0	4.4	4.8	5.2	5.6
1	0.189	0.242	0.420	0.361	0.260
2	0.899	0.835	0.633	0.545	0.373
3	0.995	1.184	1.516	1.208	1.125
4	1.373	1.397	1.942	1.492	1.208
5	3.108	3.108	4.913	4.262	3.937
6	3.274	3.315	6.755	5.843	4.889
7	4.931	5.180	8.081	6.755	5.470
8	6.133	7.169	8.702	7.376	5.843
9	4.943	4.914	4.588	4.114	2.960
10	3.836	4.878	4.712	3.884	2.936

ตารางที่ 27 ผลการศึกษา Endoglucanase Activity (IU/ml)  
 ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *T. reesei*  
 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก  
 ในสภาวะที่มีการควบคุม pH ในระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Exo. Activity วันที่	ระดับ pH				
	4.0	4.4	4.8	5.2	5.6
1	0.467	2.040	3.049	1.974	1.787
2	4.818	3.449	2.498	2.178	1.805
3	6.721	6.525	5.921	5.565	4.783
4	7.219	8.783	11.628	11.166	9.743
5	18.802	14.491	23.559	21.958	19.069
6	19.664	19.789	26.821	24.892	22.776
7	21.220	21.905	34.040	29.870	26.510
8	19.540	23.025	40.201	33.044	30.368
9	17.158	20.225	30.937	23.647	21.114
10	12.482	12.482	21.265	16.962	13.762

ตารางที่ 28 ผลการศึกษา Exoglucanase Activity (IU/ml)  
 ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *T. reesei*  
 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก  
 ในสภาวะที่มีการควบคุม pH ในระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันที่	$\beta$ -Glu. Activity	ระดับ pH				
		4.0	4.4	4.8	5.2	5.6
1	1.026	3.718	7.165	6.168	5.600	
2	3.362	6.125	8.148	6.610	5.185	
3	6.496	9.345	10.598	9.801	7.863	
4	11.624	15.726	22.336	21.424	16.182	
5	19.088	20.655	33.191	27.066	23.647	
6	32.108	39.288	53.430	52.450	40.285	
7	35.698	40.085	60.427	55.641	43.847	
8	39.687	41.681	60.826	58.433	46.268	
9	32.194	40.313	55.413	50.142	40.741	
10	28.895	37.721	43.419	39.088	33.048	

ตารางที่ 29 ผลการศึกษา  $\beta$ -Glucosidase Activity (IU/ml)

ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *T. reesei*

เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในสภาวะที่มีการควบคุม pH ระดับต่างๆ

Soluble Protein วันที่	ปริมาณอากาศ (VVM) และ อัตราการกวน (rpm)			
	0.5, 300	1.0, 300	0.5, 400	1.0, 400
1	3.529	4.617	3.941	3.882
2	5.353	8.235	6.999	5.706
3	10.471	14.941	11.765	10.529
4	15.059	24.470	22.587	19.529
5	23.235	37.059	31.176	26.471
6	28.823	65.058	38.893	32.117
7	30.882	69.175	40.352	32.529
8	34.176	51.470	37.882	34.855
9	29.412	39.117	30.294	23.824
10	22.353	32.940	23.529	19.999

ตารางที่ 30 ผลการศึกษา Soluble Protein (mg/ml)  
 ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *T. reesei*  
 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก  
 ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนในระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันที่	FPA Activity	ปริมาณอากาศ (VVM) และ อัตราการกวน (rpm)			
		0.5, 300	1.0, 300	0.5, 400	1.0, 400
1		0.204	0.097	0.154	0.176
2		0.219	0.222	0.298	0.195
3		0.503	0.272	0.367	0.320
4		0.710	0.580	1.397	0.829
5		1.021	0.651	1.317	0.784
6		1.181	0.704	1.388	0.746
7		1.533	0.746	1.429	1.036
8		2.155	0.476	1.575	1.222
9		1.317	0.547	0.962	0.888
10		1.065	0.485	0.745	0.710

ตารางที่ 31 ผลการศึกษา FPA Activity (IU/ml) ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *T. reesei* เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนในระดับต่างๆ

วันที่	Endo. Activity	ปริมาณอากาศ (VVM) และ อัตราการกวน (rpm)			
		0.5, 300	1.0, 300	0.5, 400	1.0, 400
1		0.420	0.485	0.275	0.278
2		0.633	0.266	0.633	0.533
3		1.516	0.497	1.314	0.746
4		1.468	3.978	2.865	1.587
5		4.913	4.736	3.788	2.072
6		6.755	7.293	5.304	3.647
7		8.081	7.376	4.848	3.937
8		8.702	11.603	6.216	2.859
9		4.588	5.446	2.486	1.510
10		4.712	1.799	1.041	1.184

ตารางที่ 32 ผลการศึกษา Endoglucanase Activity (IU/ml)

ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *T. reesei*

เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนในระดับต่างๆกัน

วันที่	Exo. Activity	ปริมาณอากาศ (VVM) และ อัตราการกวน (rpm)			
		0.5,300	1.0,300	0.5,400	1.0,400
1		1.718	1.407	1.006	1.348
2		2.498	3.328	2.937	2.545
3		5.921	7.814	7.245	4.592
4		11.628	17.871	13.314	6.938
5		23.559	25.142	21.493	12.327
6		26.821	28.533	21.805	16.198
7		34.040	35.760	27.589	20.871
8		40.201	40.059	29.031	17.444
9		30.937	26.255	19.713	17.533
10		21.265	19.793	15.628	11.427

ตารางที่ 33 ผลการศึกษา Exoglucanase Activity (IU/ml)

ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *T. reesei*

เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนในระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันที่	$\beta$ -Glu. Activity	ปริมาณอากาศ (VVM) และ อัตราการกวน (rpm)			
		0.5, 300	1.0, 300	0.5, 400	1.0, 400
1		7.165	4.788	5.985	6.655
2		8.148	9.148	12.226	12.369
3		16.302	18.810	24.168	26.676
4		22.336	36.252	48.906	51.300
5		33.191	54.577	50.445	59.280
6		53.430	80.598	81.396	83.591
7		60.427	71.421	83.989	83.192
8		60.826	72.817	84.787	85.187
9		55.413	52.440	55.147	56.145
10		40.014	43.092	43.206	45.144

ตารางที่ 34 ผลการศึกษา  $\beta$ -Glucosidase Activity (IU/ml)

ที่ผลิตโดยเชื้อ mutant *T. reesei*

เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณอากาศและอัตราการกวนในระดับต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

จรรยา จันทลักษณ์. สถิติวิธีวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 5.

หน้า 129-134, 221-223, 453-455. 2527.

ปราณี อ่านเป็รื่อง. เอนไซม์ทางอาหาร ตอน 2. พิมพ์ครั้งที่ 1. หน้า 213-227.

2534.

ภาวดีและสิทธิพร. "การใช้ซึ่งข้าวโพดในการผลิตเซลล์เลสโดยเชื้อ *Trichoderma reesei*" วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี, ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2534.

สมพรและสันต์ฉิ. "ผลของการปรับสภาพวัตถุดิบจำพวกเซลล์โลสในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลล์เลสโดย *Trichoderma reesei*" วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี, ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2535.

สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์. เทคโนโลยีการหมัก. พิมพ์ครั้งที่ 1. หน้า 26, 29, 160.

โรงพิมพ์สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 2530.

Allen, A.L. and Roche, D.D. "Effects of Strain and Fermentation Conditions on Production of Cellulase by *Trichoderma reesei*" Biotechnol. Bioeng. 33 (1989) : 650-656.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alexander, M. Introduction to Soil Microbiology. New York :

John, Wiley & Sons, Inc. 1976.

Berman, Thomas E. 1969. Enzyme Handbook. Heidelberg: Springer-

Verlag, Berlin, 1977.

Brown, D.E. Lignocellulose Hydrolysis. Phill. trans.R.soc.

Lond.B. 300 : 305-322. 1983.

Chen, L.F. and Cheng-Shung, G. Enzymatic Hydrolysis of  
Cellulose Pretreated with Zinc Chloride and Hydrochloric  
Acid. Biotechnol. Bioeng. Symp. 12 : 57-65. 1982.

Cowling, E.B. and Kirk, T.K. Properties of Cellulose and  
Lignocellulose Material as Substrates for Enzymatic  
Conversion Process. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 : 95-123.  
1976.

Dale, B.E. and Maria, J.M. "A Freeze-explosion Technique for  
Increasing Cellulose Hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. 12  
(1982) : 31-43.

Emert, G.H., Gum, J.R., Lang, J.A., Lin, T.H. and Brown, R.D.  
Cellulase In Food Related Enzymes. In: Adv.Chem. Series,  
No.136. pp. 79-100. 1974.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Enari, T.M. and Markkanen, P. "Production of Cellulolytic Enzyme by Fungi" Biotechnol. Bioeng. 5 (1977) : 1-24.

Enari, T.M. Microbial Cellulases. In : Microbial Enzyme and Biotechnology (Fogarty, W.M. ed.). pp. 183-223. Applied Science Publishers, England, 1983.

Eriksson, K.E. "Enzyme Mechanisms Involved in Cellulose Hydrolysis by The Rot Fungi *Sporotrichum pulverulentum*" Biotechnol. Bioeng. 20 (1978) : 317-332.

Fan, L.T. and Lee, Y.H. "Kinetics Study of Enzymatic Mechanistic Kinetic Model" Biotechnol. Bioeng. 25 (1983) : 2707-2733.

Ginnivan, M.J., Wood, J.L. and Callaghan, J.R.O. "Thermophilic Fermentation of Pig Faeces and Straw by *Actinomycetes*" 43 (1977) : 231-238.

Han, Y.W. and Callihan, C.D. "Effect Of Substrate Pretreatment on Microbial Growth" Appl. Microbiol. 27 (1974) : 159-165.

Kim, D.W., Yang, J.H. and Jeong, Y.K. "Adsorption of Cellulase from *Trichoderma viride* and Microcrystalline Cellulose" Appl. Micro. Biotechnol. 28 (1988) : 148-154.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lee, S.D., Kim, I.H., Ryu, D.D.Y. and Tanguchi, H. "Structural Properties of Cellulase Reaction Mechanism" Biotechnol. Bioeng. 25 (1983) : 35-51.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. "Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent" J. Biol. Chem. 193 : (1951) 265-273.

Lutzen, N.W., Nielson, M.H., Oxenboell, K.M., Schulein, M., Stentebjerg, O.B. Cellulase and Their Application in the Conversion of Lignocellulose to Fermentable Sugar. In : Industrial and Diagnostic Enzymes (Hartky, B.S., Atkinson, T. and Lilly, M.D.) pp. 283-391. Royal Society, London, 1983.

Mendels, M., Andreotti, R.A. and Roche, C.D. Measurement of Saccharifying Cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp. No.6. 21-33. 1976.

Mandels, M., Medeeiros, J.E., Andreotti, R.E. and Bisset, F.H. Biotechnol. Bioen. 23 (1981) : 1009.

Maaandels, M. and Reese, E.T. J. Bacteriol. 73 (1957) : 269.

Mandels, M. and Weber, J. "The Production of Cellulase" Adv. Chem. Ser. 95 (1969) : 391-414.

Mandels, M. Cellulase as a Chemical and Energy Resource. Biotechnol. Bioeng. Symp. No.6. C.R. Wilk, Ed., Wiley Interscience, New York, pp. 81. 1975.

Mes-Hartree, M., Hogen, C., Hayes, R.D. and Saddler, J.N. Enzymatic Hydrolysis of Agricultural Residues by *Trichoderma* Cellulase and Fermentation of the Liberated Sugar to Ethanol. Biotechnol. Lett. 5 : 101-106. 1983.

Miron, J. and Daniel B.D. "Effect of Chemical Treatments on the Degradability of Cotton Straw by Rumen Micro-organism and by Fungal Cellulase" Biotechnol. Bioeng. 23 (1981) : 2863-2873.

Mishra, S., Rao, M., Seeta, R., Srinivasan, M.C. and Dephpande, V. "Communications to the Editor Hydrolysis of Lignocelluloses by *Penicillium funicolosum* Cellulase" Biotechnol. Bioeng. 26 (1984) : 370-373.

Moo-Young, M. Chahal, D.S. and Vlach, D. "Single Cell Protein from Various Chemically Pretreated Wood Substrates using *Chaetomium Cellulolyticum*" Biotechnol. Bioeng. 20 (1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nisizawa, K. "Mode of Action of Cellulases" J.Ferment. Technol. 51 (1973) : 267-304.

Peiji, G. "A Simple Method for Estimating Cellobiase Activity by Determination of Reducing Sugar" Biotechnol. Bioeng. 29 (1987) : 903-905.

Rao, M., Seeta, R. and Deshpande, V. "Effect of Pretreatment on the Hydrolysis of Cellulose by *Penicilium funiculosum* Cellulase and Recovery of Enzyme" Biotechnol. Bioeng. 25 (1983) : 1863-1871.

Reese, E.T. "History of the Cellulase Programme at the U.S. Army Natick Development Center" Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 (1976) : 9-20.

Reese, E.T. and Magnire, A. "Increase in Cellulase Yields by Addition of Surfactant to Cellobiose Cultures of *Trichoderma viride*" Develop. Ind. Microbiol. 12 (1971) : 212-224.

Ryu, D.D.Y. and Mandels, M. "Cellulase : Biosynthesis and Application" Enzyme. Microbiol. 2 (1980) : 91-102.

Sasaki, T. "Enzymatic Saccharification of Rice Cellulose"

Enzyme. Microbiol. Technol. 2 (1982) : 91-102.

Samogyi, M. "Notes on Sugar Determination" Biol. Chem.

195 (1952) : 19-23.

Sternberg, D. "Production of Cellulase by *Trichoderma*"

Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 (1976) : 35-53.

Sternberg, D., Vijiyakumar, P. and Reese, E.T. " $\beta$ -glucosidase

Microbial Production and Effect on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose" Canadian J. of Microbiol. 23

(1977) : 139-147.

Sukeni, M., Kobayashi, N., Sato, S. and Takashi, J. Biotechnol.

Bioeng. 32 (1988) : 760-763.

Tracy, M.V. Cellulase and Chitinase of Earthworms Nature.

167 : 776-777. 1951.

Vidand, C., Roussos, S., Raimbult, M. and Deschanps, F. "Effect

of Various Pretreatments on the Accessibility of Cellulose Contained in Corn Straw to Cellulases of *Trichoderma harzianum*" Cah. Ostrom. Ser. Biol. 45 :

17-23. 1982.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Varzywoda, M., Ferre, V. and Pourquié, J. "Development of A Culture Medium for Large-Scale Production of Cellulolytic Enzymes by *Trichoderma reesei*" Biotecnol. Bioeng. 25 (1983) : 3005-3010.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติ

นางสาว จันทร์ เรือง เอกสัมพันธ์พิชญ์ เกิดวันที่ 27 มกราคม 2512 จบการศึกษาชั้นมัธยมศึกษา โรงเรียนสตรีวิทยา กรุงเทพฯ เมื่อปี 2531 และ เข้าศึกษาต่อระดับอุดมศึกษาที่ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จบการศึกษาระดับปริญญาตรี ที่ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ในปีการศึกษา 2535 ขณะกำลังศึกษาอยู่ เคยเข้าร่วมกิจกรรมในตำแหน่ง เลขานุการจัดซื้อ ชุมชุมสหการ ร่วมวางแผนโครงการของสโมสรนักศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ ร่วมจัดงานต้อนรับน้องใหม่ ในตำแหน่ง เลขานุการและประสานงาน

นาย อัศวীর มัชฌิมจันทร์ เกิดวันที่ 11 กรกฎาคม 2514 จบการศึกษาชั้นมัธยมศึกษา โรงเรียน เซนต์คาร์เบรียล กรุงเทพฯ เมื่อปี 2531 และ เข้าศึกษาต่อระดับอุดมศึกษา ที่ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จบการศึกษาระดับปริญญาตรี ที่ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ในปีการศึกษา 2535 ขณะกำลังศึกษาอยู่ เคยเข้าร่วมกิจกรรมในชมรม ศิลปการแสดง และวรรณกรรม ในตำแหน่ง นักแสดง ผู้กำกับเวที เข้าร่วมใน สโมสรนักศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ ในตำแหน่ง รองนายกสโมสรนักศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้