สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนด่างโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

นายศักย์ศิล อภิรักษ์นภานนท์
นางสาวอภิญญา บุญโญ

ปพ.
ต333ก
9529

เลขหมู่ 72582
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

b 11769683
i

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Optimization of xylanase production from alkalotorelant mutant *Aspergillus fumigatus.*

Saksin Apiraknapanon

Apinya Boonyo

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

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนด่าง โดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

นักศึกษา นายศักย์ศิล อภิรักษ์นภานนท์ รหัสประจำตัว 46050832

นางสาวอภิญญา บุญโญ รหัสประจำตัว 46050835

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ	ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ	รศ. สุขใจ ชูจันทร์	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนด่างโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย		
นักศึกษา	นายศักย์ศิล	อภิรักษ์นภานนท์	รหัสประจำตัว 46050832
	นางสาวอภิญญา	บุญโญ	รหัสประจำตัว 46050835
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม		
ปีการศึกษา	2549		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์		

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราทนด่าง *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลายได้ทำ ที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยในการเลี้ยงเชื้อในสภาวะเริ่มต้นที่พีเอชเท่ากับ 8 และปริมาณสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 70 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราชนิดนี้ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด ประกอบด้วย ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 1 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.5 และโซเดียมไนเตรดร้อยละ 3 เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด คือ ความเข้มข้นร้อยละ 4 และพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด คือ ยีสต์สกัดที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับร้อยละ 3 ซึ่งพบว่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 และอุณหภูมิเริ่มต้นเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส จะทำให้เชื้อให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดซึ่งเท่ากับ 13.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Optimizaion of xylanase production from alkalotorelant mutant *Aspergillus fumigatus* .
Name	Mr. Saksin Apiraknapanon
	Miss Apinya Boonyo
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Acadamic Year	2006
Special Project Advisor	Asst.Prof. Aree Rittiboon

Abstract

Studies on xylanase production from a alkalotorelant mutant of *Aspergillus fumigatus* were performed by incubating the fungus at the initial conditions of pH 8 and the amount of spores of 10^6 spores/ml in a 70 ml medium at 200 rpm, 30 $^{\circ}$C for 5 days. The results of the studies were that the best medium for xylanase production of the fungus composed of 1% $KHPO_4$, 0.5% $MgSO_4$ and 3% $NaNO_3$ when 4% corn husk was used as the carbon source while the most suitable nitrogen source was yeast extract with 3% nitrogen which at pH 8, 30 $^{\circ}$C gave the highest xylanase activity of 13.57 U/ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษาตลอดการค้นคว้าวิจัย และการเขียนโครงงานพิเศษฉบับนี้ รวมถึงการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ. มาลินี ตันดิยาภรณ์ และ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ ที่เป็นคณะกรรมการในโครงงานพิเศษ และช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณพี่ๆ นักวิทยาศาสตร์ภาคชีววิทยาประยุกต์ที่ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจตลอดการค้นคว้าวิจัย รวมถึงให้การสนับสนุนเป็นอย่างดี

ขอบคุณเพื่อนๆและทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนานมา ณ ที่นี้ ที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจในการศึกษามาตลอดรวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นายศักย์ศิล อภิรักษ์นภานนท์
นางสาวอภิญญา บุญโญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	1
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรกรรม	3
2.2 เชื้อราที่นำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์	7
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	8
2.4 การวัดกิจกรรมเอนไซม์	13
2.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนส	13
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัสดุ	16
3.2 อุปกรณ์	16
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	16
3.4 การเตรียมเชื้อรา	17
3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนด่าง	17
3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	
4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ของเชื้อราทนด่างโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย	19
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	24
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	32
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส	34
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธี Duncan' s New Multiple - Range Test (DMRT)	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ค.1 การเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ของผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส 36

ค.2 การเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ของผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส 36

ค.3 การเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ของผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส 37

ค.4 การเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ของผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส 37

ค.5 การเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ของผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของเซลลูโลส	3
2	แสดงโครงสร้างมอนอเมอร์ต่าง ๆ ของเฮมิเซลลูโลส	4
3	โครงสร้างของไซแลนซึ่งแสดงความแตกต่างของกลุ่มแทนที่กับตำแหน่งที่จับ	5
4	การเจริญของ *A. fumigatus* บนอาหาร Czapexdox agar	7
5	ผลของชนิดแหล่งคาร์บอน ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	20
6	ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	21
7	ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	22
8	ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	23
9	ผลของพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	24
10	กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของโครงงานพิเศษ

เอนไซม์ไซลาเนส (xylanase) เป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น ซึ่งการใช้เอนไซม์ในกระบวนการของอุตสาหกรรมเหล่านี้ จะช่วยทดแทนการใช้สารเคมีที่อาจเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมได้ แต่เนื่องจากในการผลิตเอนไซม์เหล่านี้ จำเป็นจะต้องใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาค่อนข้างสูงในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ ดังนั้น หากสามารถแก้ปัญหาเรื่องแหล่งคาร์บอนที่มีราคาสูงได้ ก็จะสามารถลดต้นทุนที่ใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมได้อย่างมาก

เศษวัสดุที่เหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด รำข้าว ฟางข้าว เศษวัสดุเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีมากในธรรมชาติและราคาถูก เศษวัสดุเหล่านี้จะประกอบไปด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ซึ่งในเฮมิเซลลูโลสนั้น จะมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ ไซแลน ซึ่งไซแลนนี้จะเป็นตัวกระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสขึ้นมาได้ ดังนั้น จากข้อมูลที่กล่าวมานี้ เราจึงสามารถใช้เศษวัสดุจากกระบวนการทางเกษตรนี้มาประยุกต์ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และเพื่อเป็นการลดต้นทุนในส่วนของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นเชื้อราชนิดทนด่าง และเพื่อให้การผลิตเอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงสุด โครงงานนี้จึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลายทนด่าง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนด่าง *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และพีเอชเริ่มต้น โดยคัดเลือกสภาวะที่เชื้อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด

1.2.2 ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีราคาถูกแทนการใช้ไซแลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1.3.1 ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ ซังข้าวโพด รำข้าวสาลี และเปลือกข้าวโพดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และทำการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมมาแปรผันความเข้มข้นเป็นร้อยละ 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0

1.3.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ เปปโตน ทริปโตน และยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และทำการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมมาแปรผันความเข้ม- ข้นเป็นร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4

1.3.3 ศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ 8, 9, 10 และ 11

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนด่าง

1.4.2 เพื่อเป็นแนวทางในการใช้เศษวัสดุที่เหลือทิ้งจากกระบวนการทางการเกษตรเป็นแหล่ง คาร์บอนแทนการใช้ไซแลนซึ่งมีราคาสูง

1.4.3 เป็นแนวทางในการวิจัยขั้นสูงต่อไป

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.5.1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

1.5.1.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนโดยใช้ซังข้าวโพด รำข้าวสาลี และเปลือกข้าวโพด ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยทำการคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ให้กิจกรรมของเอน-ไซม์ไซลาเนสสูงสุด

1.5.1.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยนำแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือก มาแปรผันความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0

1.5.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

1.5.2.1 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ เปปโตน ทริปโตน ยีสต์สกัด น้ำแช่ข้าวโพด และยูเรีย ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยทำการคัดเลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจ-กรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด

1.5.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนโดยนำแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกมาแปรผันความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4

1.5.3 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

1.5.3.1 ศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกัน คือ 8, 9, 10 และ 11 โดยใช้สูตรอาหารที่ผ่านการคัดเลือก มาปรับพีเอชก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

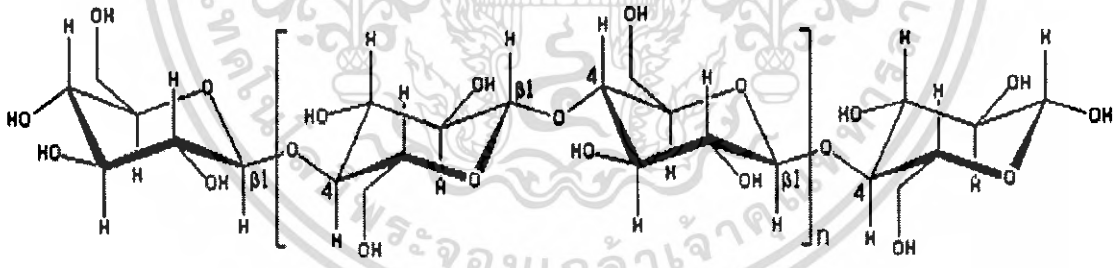
บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรกรรม

สิ่งเหลือทิ้งที่ไม่ต้องการจากการผลิตด้านเกษตรกรรมส่วนใหญ่จะเป็นเศษเหลือของพืช ซึ่งจะเป็นสารพวกลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่สำคัญคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินอยู่รวมกันในผนังเซลล์ของพืช ซึ่งจะมีปริมาณแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด โดยที่ในพืชส่วนใหญ่จะพบเซลลูโลสร้อยละ 40-50 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 30-40 และลิกนินร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง (Rani, 2000)

2.1.1 เซลลูโลส

เซลลูโลส $(C_6H_{10}O_5)_n$ ประกอบด้วยพอลิเมอร์โซ่ตรงของดี-กลูโคไพราโนส (D-glucopyranose) ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิคชนิด $\beta(1\rightarrow4)$ ประมาณ 3,000-15,000 โมเลกุล เป็นพอลิเมอร์ของโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสชนิดเดียว (homopolysaccharide) โครงสร้างของเซลลูโลสแข็งแรงและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสที่เรียงกันอยู่เป็นมัดๆ (fibril) เซลลูโลสไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ สารละลายด่างและกรดอ่อนที่อุณหภูมิ ห้อง (Jackson, 1997; Marsden และ Gray, 1986) แต่ละลายในสารละลายกรดเข้มข้น



รูปที่ 1 โครงสร้างของเซลลูโลส
ที่มา : www.lsbu.ac.uk/water/hycel.html

2.1.1.1 เอนไซม์เซลลูเลส

1. เอนโดกลูคาเนส (Endo-1,4-β-glucanase; E.C. 3.2.1.14) ทำหน้าที่ตัดพันธะบีตา-1,4 แบบสุ่มระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสในสายโซ่ตรงของกลูโคส

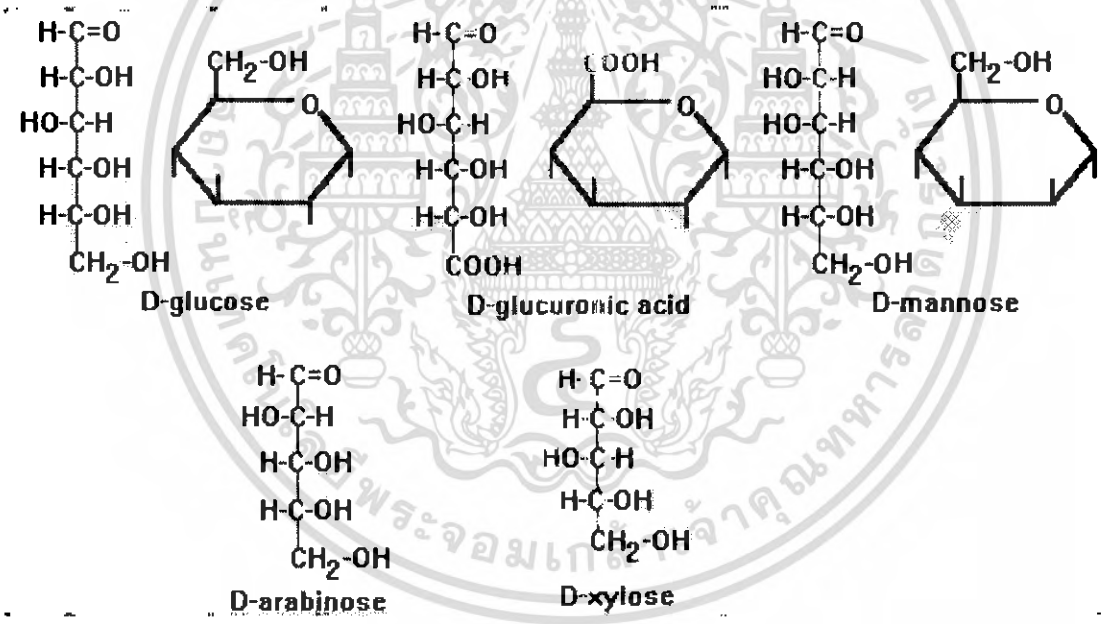
2. เซลโลไบโอไฮโดรเลส (cellobio-hydrolase; E.C. 3.2.1.91) ทำหน้าที่ตัดเซลโลไบโอส ซึ่งเกิดจากน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4 ด้านปลายสายที่ไม่มีหมู่รีดิวส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. บีตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase; E.C. 3.2.1.21) ทำหน้าที่ตัดสายโซ่ตรงของ 2,3 หรือ 4 บีตา-1,4-กลูโคซิดิก ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสโมเลกุลเดี่ยว

2.1.2 เฮมิเซลลูโลส

เป็นพอลิเมอร์โมเลกุลสั้นและมีกิ่งก้านมากทำให้โครงสร้างไม่เป็นระเบียบมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลมากกว่าหนึ่งชนิด (heteropolysaccharide) เมื่อสกัดหรือแยกส่วนที่ได้จากพืชด้วยด่างเจือจางทำให้สามารถจำแนกชนิดของเฮมิเซลลูโลสได้โดยขึ้นกับชนิดของน้ำตาลส่วนใหญ่ที่ปรากฏ ซึ่งน้ำตาลส่วนใหญ่ ได้แก่ ดี-กลูโคส (D-glucose) ดี-แมนโนส (D-mannose) แอล-อะราบิโนส (L-arabinose) กรดกลูคูโรนิค (glucuronic acid) และดี-ไซโลส (D-xylose) ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 glycosidic ทำให้สามารถแบ่งชนิดเฮมิเซลลูโลสได้เป็นไซแลนซึ่งประกอบด้วยดี-ไซโลสเป็นมอนอเมอร์หลักและสายแอล-อะราบิโนส กาแลคแตน (galactan) ที่ประกอบด้วยดี-กาแลคโตสเป็นมอนอเมอร์หลัก แมนแนน (mannan) ประกอบด้วยแมนโนสเป็นมอนอเมอร์หลักและอะราบิแนน (arabinan) เกิดขึ้นจากแอล-อะราบิโนสเป็นมอนอเมอร์หลัก



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างมอนอเมอร์ต่าง ๆ ของเฮมิเซลลูโลส

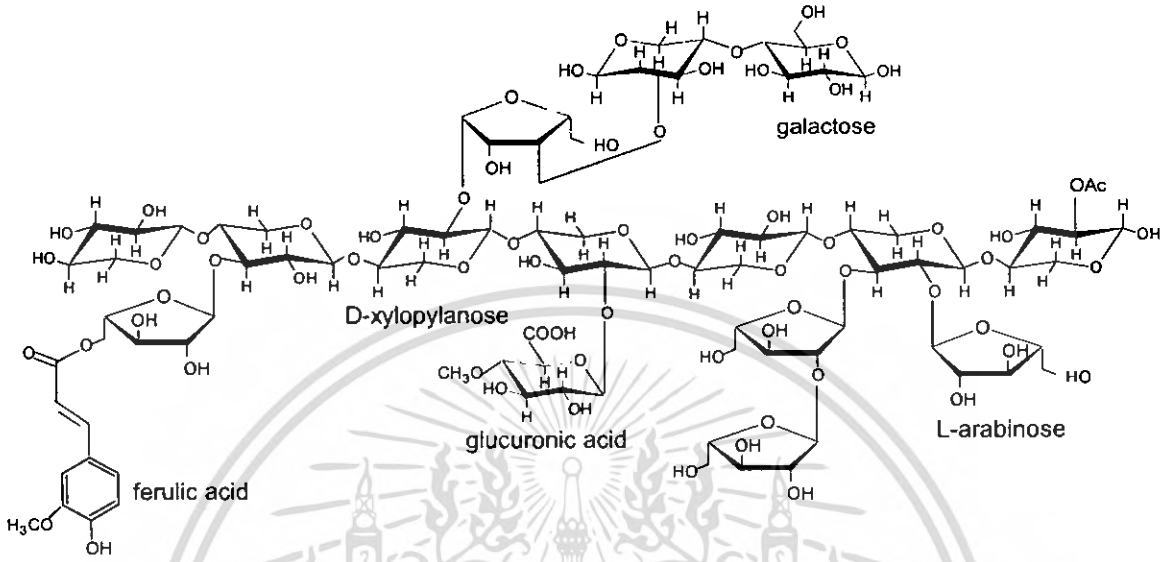
ที่มา : http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/FUNDAMNT/hemicel.htm

2.1.2.1 ไซแลน

ไซแลนเป็นส่วนประกอบสำคัญของเฮมิเซลลูโลส ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 เป็นสายหลัก (backbone) ส่วนใหญ่ไซแลนมีโครงสร้างเป็นกิ่งก้าน ดังรูปที่ 3 ไซแลนที่ได้จากธัญพืชประกอบด้วยแอล-อะราบิโนสปริมาณมาก ดังนั้นจึงเรียกได้อีกอย่างว่า อะราบิโน-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซแลน (arabinoxylan) ในทางตรงกันข้ามไซแลนที่ได้จากไม้เนื้อแข็งมักเรียกว่า กลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) เนื่องจากมีจำนวนของกรดกลูคูโรนิคมากต่อเป็นกิ่งก้านกับสายหลัก (Ronald และ Jaap, 2001)



รูปที่ 3 โครงสร้างของไซแลนซึ่งแสดงความแตกต่างของกลุ่มแทนที่กับตำแหน่งที่จับ
ที่มา : http://www.adisseonorthamerica.com/rovabioguide/versatility.asp

อะราบิโนสเชื่อมต่อกับสายหลักของไซแลนด้วยพันธะ α-1,2 หรือ α-1,3 ทั้งแบบต่อเดี่ยวๆ และเป็นโซ่กิ่งสั้นๆ โซ่กิ่งนี้สามารถเชื่อมต่อกับไซโลสอิสระได้ด้วยพันธะ β-1,2 ของอะราบิ-โนส และกาแลคโตสสามารถเชื่อมต่อกับอะราบิโนสด้วยพันธะ β-1,5 หรือต่อกับไซโลสโดยพันธะ β-1,4 โดยหมู่อะซิติล (acetyl) จะปรากฏที่ออกซิเจนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ของไซโลสในสายหลักกรดกลูคูโรนิกและ 4-O-metyl ether ต่อกับสายหลักโดยพันธะ α-1,2 ในทางตรงกันข้ามหมู่อะโรมาติก (feruloyl และ *p*-coumaroyl) ต่อกับออกซิเจนตำแหน่งที่ 5 ที่ปลายของอะราบิโนส (Ronald และ Jaap, 2001)

คุณสมบัติของไซแลน

1. ไซแลนที่ไม่มีหมู่อะซิติลจะไม่ละลายในน้ำแต่ละลายได้ในสารละลายด่างและถูกย่อยสลายด้วยกรดได้ง่าย
2. ไซแลนที่มีหมู่อะซิติลถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์
3. ไซแลนที่มีหมู่อะซิติลถูกสกัดได้ด้วยน้ำร้อนและละลายในน้ำได้ดี
4. สารละลายไซแลนไม่สามารถย่อยได้ตามหลักของ Fehling's solution ซึ่งเป็นสารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของอัลดีไฮด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. สารละลายไซแลนมีค่า optical rotation เป็นลบอย่างมากซึ่งมีระยะจาก $[\alpha]_D^{20}$ – 78.2 ถึง 109.5 องศาเซลเซียส (Whistler, 1950)

ไซแลนของไม้เนื้ออ่อนจะมีโซ่กิ่งที่เป็นกรดมากกว่าไซแลนของไม้เนื้อแข็งในกรณีของไซแลนในไม้เนื้ออ่อนจะมีกรดอยู่ 1 หน่วยต่อ ดี-ไซโลส 5-6 หน่วย ในขณะที่ไซแลนของไม้เนื้อแข็งจะมีกรด 1 หน่วยต่อ ดี-ไซโลส 9-12 หน่วย โดยปกติไม้เนื้อแข็งจะปรากฏหมู่อะซิติล 1 หมู่ที่ไซโลสหน่วยที่ 2 ในสายหลักของไซแลน และปฏิกิริยา acetylation ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ออกซิเจนตำแหน่งที่ 3 แทนที่จะเป็นออกซิเจนตำแหน่งที่ 2 (Biely, 1985)

กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลน แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลัก

1.1 เอนโด-1,4-บีตา-ไซลาเนส (Endo-1,4-β-xylanase; E.C. 3.2.1.8) ทำหน้าตัดสายตรงของหน่วยเบต้า-1,4-ไซโลส อย่างสุ่มได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์และไซโลไบโอส

1.2 บีตา-ไซโลซิเดส (β-xylosidase; E.C. 3.2.1.37) ทำหน้าที่ตัดสายตรงของไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ ที่ประกอบด้วย 2, 3 หรือ 4 หน่วยของเบต้า-1,4-ไซโลสและไซโลไบโอส จากปลายสายที่ไม่มีหมู่รีดิวส์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส

2. กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายสายโซ่กิ่ง

2.1 แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส (α-L-arabinofuranosidase; E.C. 3.2.1.55) หน้าที่ตัดพันธะระหว่างอะราบิโนสและไซโลส แต่ตัดได้เมื่อไซโลสถูกแทนที่ด้วยหน่วยแทนที่หน่วยเดียวเท่านั้น

2.2 แอลฟา-กลูคูโรนิเดส (α-Glucuronidase; E.C. 3.2.1.139) ทำหน้าที่ตัดส่วนของกรดกลูคูโรนิค และ 4-O-methyl ether จากไซแลน แอลฟา-กลูคูโรนิเดสมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อใช้โอลิโกแซคคาไรด์เป็นสับสเตรด ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้สับสเตรตที่เป็นพอลิเมอร์จะพบว่ามีกิจกรรมต่ำหรือไม่มีเลย (Vries และคณะ, 1998)

2.3 อะซิติล เอสเทอเรส (acetyl esterase; E.C. 3.1.1.6) ทำหน้าที่กำจัดหมู่ O-acetyl residue จากออกซิเจนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ของไซโลสในสายหลัก

2.1.3 ลิกนิน

ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ที่ซับซ้อนและมีความแข็งแรงทนทานต่อการย่อยสลายเนื่องจากสังเคราะห์ขึ้นได้จากหน่วย phenylpropanoid ซึ่งเกิดจากการจับกันเป็นโมเลกุลใหญ่ของ p-coumaryl alcohol, conifetyl alcohol และ sinapyl alcohol (Sjostrom, 1981) หน่วยย่อยเหล่านี้จะจับตัวกันเป็นโครงสร้าง 3 มิติ โดยสร้างพันธะเอสเทอร์ (C-O-C) นอกจากนี้พันธะคาร์บอน (C-C) ทำให้ลิกนินทนต่อการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่าง โดยทั่วไปพบลิกนินในส่วน middle lamella ทำให้ห่อหุ้มส่วนของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเอาไว้ เป็นผลให้การย่อยสลายของทั้งสองเกิดได้ช้าและมีปริมาณต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เชื้อราที่นำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์

เชื้อราที่มีในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด เช่น *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. และ *Aspergillus* sp. เป็นต้น

2.2.1 ลักษณะสำคัญของ *A. fumigatus*

เป็นฟังไจที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและทนอุณหภูมิสูงได้ดี (สูงถึง 57 องศาเซลเซียส) พบได้ทั่วโลก สามารถแยกได้จากอากาศ พืช อาหารสัตว์ ดิน และกากของเสียจากการบำบัดน้ำเสีย ฯลฯ ลักษณะโคโลนีมีสีขาวในระยะแรก แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวออกเป็นสีน้ำเงินเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่

โครงสร้างเป็นเส้นใยเรียกว่า ไฮฟา (hypha) แบบมีผนังกั้น โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) หรือ สท๊อก (stalk) ยาว 250-300 ไมโครเมตร กว้าง 16.6-18.8 ไมโครเมตรชูขึ้นจากฟุตเซลล์ (foot cell) ซึ่งเป็นเซลล์ไมซีเลียมพิเศษมีขนาดใหญ่ผนังหนา ส่วนปลายจะโป่งออกเป็นรูปคล้ายช้อนจนกระทั่งคล้ายรูปผลแพร์เรียกว่า vesicle ฟิไลด์ (phialide) ซึ่งทำหน้าที่สร้างคอนนิเดียสั้น โคนิเดีย (conidia) รูปร่างกลมจนกระทั่งเป็นรูปไข่ ยาว 2.3-2.5 ไมโครเมตร (Stevenson, 1975; Beneke และ Rogers, 1980; Klich และคณะ, 1996)

รูปที่ 4 การเจริญของ *A. fumigatus* บนอาหาร Czapexdox agar เมื่อบ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 5 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์เป็นสิ่งจำเป็น นั่นคือในการผลิตเอนไซม์ควรเตรียมวัตถุดิบและสิ่งแวดล้อมให้มีสภาพที่เหมาะสม ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญที่จะระบุว่าจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพหรือไม่ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีจะสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แตกต่างกัน ในสภาพที่ไม่เหมาะสมจุลินทรีย์จะมีระยะ lag phase ยาวขึ้นและใช้เวลาในการแบ่งตัวนานขึ้นซึ่งทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง

2.3.1 สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์นั้นประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติและจุลินทรีย์ที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์ ปกติจุลินทรีย์ตามธรรมชาติจะมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ต่ำ เพื่อให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม จึงได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ต่างๆ จำนวนมาก ซึ่งการปรับปรุงสายพันธุ์มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การใช้รังสีต่างๆ ได้แก่ รังสีอัลตร้าไวโอเลต รังสีแกมมา เป็นต้น การใช้สารเคมี ได้แก่ สารพวก alkylating agent เป็นต้น การใช้รังสีร่วมกับการใช้สารเคมีและการสอดแทรกตีเอ็นเอ

2.3.2 แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อสังเคราะห์พลังงานและเป็นส่วนของผนังเซลล์ ซึ่งเป็นสิ่งแวดล้อมภายในที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จุลินทรีย์สามารถใช้ได้หมด ส่วนแหล่งคาร์บอนที่มีโมเลกุลซับซ้อน เช่น เพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ฯลฯ มีจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่ใช้ได้ และเนื่องจากราคาของสับสเตรตมีบทบาทต่อต้นทุนที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จึงมีการนำสับสเตรตที่ราคาถูกโดยเฉพาะวัตถุดิบที่มีลิกโนเซลลูโลสซึ่งไม่ละลายน้ำเป็นองค์ประกอบ เช่น ซังข้าวโพด เปลือกข้าวสาลี รำข้าวสาลี ฟางข้าว เป็นต้น ไปใช้ประโยชน์สำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (Kuhud, 1999; Beg และคณะ, 2001; Gupta และ Madamwar, 1997)

Veridiana และคณะ (2003) รายงานว่าการใช้ซังข้าวโพดบดร้อยละ 3 เป็นสับสเตรตและที่อุณหภูมิสูง 42 องศาเซลเซียสในการเลี้ยง *A. fumigatus* สายพันธุ์ทนร้อน เป็นเวลา 72 ชั่วโมงจะให้กิจกรรมของเบต้า-ไซโลซิเดสสูงที่สุดเท่ากับ 45.40 $\pm$ 3.10 ยูนิต/มล.

Antony และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตเอนไซม์จาก *A. fumigatus* AR1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทนด่างเจริญได้ดีในอาหารที่ประกอบด้วยสับสเตรตพวกลิกโนเซลลูโลสราคาถูก โดยผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 30 ยูนิต/มล. เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นสับสเตรต ในขณะเดียวกันผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในระดับต่ำเท่ากับ 17 ยูนิต/มล. เมื่อใช้รำข้าวสาลีและชานอ้อย อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า *A. fischeri* และ *Cephalosporium* spp. ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในระดับสูงเมื่อใช้รำข้าวสาลี เมื่อเปรียบเทียบกับฟางข้าวและชานอ้อย (Bansod และคณะ, 1993; Chandra Raj และ Chandra, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kitpreechavanich (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *A. fumigatus* 4-45-IF ในอาหารแข็งเมื่อความชื้นเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 81 พบว่าฟางข้าวให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 545 ยูนิต/มล. โดยเปรียบเทียบกับการใช้ ชานอ้อย ซังข้าวโพดและรำข้าวสาลี

Singh และคณะ (1995) รายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้นรำข้าวสาลีจากร้อยละ 1.0 เป็นร้อยละ 3.0 ทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีตา-ไซโลซิเดสโดยเชื้อ *Fusarium oxysporum* NTG-19 เพิ่มมากขึ้น

Stewart และคณะ (1983) ศึกษาการใช้หญ้าแห้งเป็นสับสเตรตในสภาวะอาหารเหลวในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *A. fumigatus* ATCC 46324 พบว่าให้กิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 900 ยูนิต/มล.

Wase และคณะ (1985) พบว่าฟางข้าวบดร้อยละ 4 เป็นสับสเตรตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *A. fumigatus* IMI 255091 โดยให้กิจกรรมสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 68.1 ยูนิต/มล.

Purkarthofer และคณะ (1993) ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จาก *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นสับสเตรต ปรากฏว่าซังข้าวโพดให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 1950 ยูนิต/มล. ซึ่งนอกจากซังข้าวโพดจะประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่สำคัญแล้ว ยังประกอบด้วยสารอาหารอื่น ๆ ได้แก่ แหล่งไนโตรเจน วิตามิน แร่ธาตุ เป็นต้น จึงช่วยส่งเสริมให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น

2.3.3 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์จะใช้สารประกอบไนโตรเจนในการเจริญเติบโต จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจนได้แตกต่างกัน โดยไนโตรเจนจะเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีน ไซโตพลาสซึม ผนังเซลล์ และเอนไซม์ต่าง ๆ แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญได้แก่แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น ยูเรีย เกลือแอมโมเนีย โซเดียมไนเตรท เป็นต้น และแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น เปปโตน ทริปโตน ยีสต์สกัด เป็นต้น

การใช้เปปโตนและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ (Haltrich และคณะ, 1996; Purkarthofer และคณะ, 1993)

จากการศึกษาของ Kuhud และคณะ (1998) เรื่องการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *F. oxysporum* สายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูง พบว่าเปปโตนกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่สุด โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 20.5 ยูนิต/มล. อย่างไรก็ตามการเติมแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างยีสต์สกัด และเปปโตนมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างจากการใช้เปปโตนเพียงชนิดเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abdel-Sater และคณะ (2001) ศึกษาเชื้อราที่ย่อยสลายไซแลนและกิจกรรมของกลุ่มเอนไซม์ไซลาเนสในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมพบว่าโซเดียมไนเทตและเปปโตนเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *Trichoderma harzianum* โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 54 และ 52 ยูนิต/มล. ตามลำดับ และแอมโมเนียมซัลเฟตให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่ำสุดเท่ากับ 42 ยูนิต/มล.

ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *Pleurotus ostreatus* ได้มีการทดสอบแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์หลายชนิด สรุปได้ว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มีผลต่อการผลิตเอนไซม์มากกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ โดย เปปโตน > เนื้อสกัด > ยีสต์สกัด > ทริปโตน > แอมโมเนียมไนเตรต > แอมโมเนียมซัลเฟต > แอมโมเนียมฟอสเฟต ตามลำดับ (Qinnghe และคณะ, 2004)

Barkir และคณะ (2001) ศึกษาการผลิต การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและลักษณะทางชีวเคมีของบีตา-1,4-ไซลาเนสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* พบว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็นสิ่งสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จากผลการทดลองสรุปได้ว่า อาหารที่ประกอบด้วยซังข้าวโพดร้อยละ 3 ต่อ ถั่วเหลืองร้อยละ 1 และแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด เท่ากับ 23.3 ยูนิต/มล.

2.3.4 แร่ธาตุ

จุลินทรีย์ใช้แร่ธาตุหลายชนิดในกระบวนการเมแทบอลิซึม เช่น เชื้อราต้องการโปแตสเซียม แมกนีเซียม เหล็ก ฯลฯ ซึ่งในกระบวนการไกลโคไลซิส แมกนีเซียมและสังกะสีถูกใช้เป็นโคเอนไซม์ ส่วนในกระบวนการเครีบไซเคิล (crep cycle) นั้น แมงกานีส แมกนีเซียม และเหล็กถูกใช้เป็นโคเอนไซม์

จากการศึกษาพบว่า $FeSO_4$ และ $CaCl_2$ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของ *Aspergillus* spp. (Wong และคณะ, 1988) $CuSO_4$, $MnSO_4$, และ $AgNO_3$ กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสได้ การเติม EDTA จะช่วยกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ได้เล็กน้อยเนื่องจากอาจจะเป็นตัวกำจัดไอออนของโลหะ (chelating agent) ออกจากสารละลายเอนไซม์ (Antony และคณะ, 2003) การเพิ่ม Co^+, Zn^+ และ Cd^+ ช่วยเพิ่มการยึดเกาะของเอนไซม์ไซลาเนสกับไซแลนที่ไม่สามารถละลายน้ำ (Ratanakhanokchai และคณะ, 1999)

2.3.5 อุณหภูมิ

จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิในช่วงกว้าง ความร้อนสามารถถ่ายโอนผ่านผนังเซลล์ได้อย่างอิสระและมีผลโดยตรงต่อเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ในระหว่างการเจริญเติบโต ของจุลินทรีย์จะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทลงสู่อาหารเมื่ออุณหภูมิสูงจนถึงระดับหนึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ จึงต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khanna และคณะ (1995) ศึกษาการผลิต การคัดแยกและการทำให้เอนไซม์ไซลาเนสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Aspergillus* sp. PK-7 จากการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 10.6 ยูนิต/มล. เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Bailey และ Viikari (1993) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *A. fumigatus* VTT-D-82195 และ *A. oryzae* VTT-D-85248 บนอาหารที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิดเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทั้งสองเท่ากับ 29 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Singh และคณะ (1995) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *F. oxysporum* NTG-19 สายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูง ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 53.0 ยูนิต/มล. เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Costa-Ferreira และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนโดย *A. oryzae* ที่ถูกคัดเลือก จากการทดลองพบว่าเชื้อรานี้ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.3.6 พีเอช

พีเอชเป็นสิ่งแวดล้อมภายนอกที่สัมพันธ์กับอาหารและเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส การเจริญเติบโตและการทำลายจุลินทรีย์ จุลินทรีย์จะมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญหรือการผลิตเอนไซม์เรียกว่าพีเอชเหมาะสม (optimum pH) พีเอชของอาหารมีอิทธิพลต่อการซึมผ่านของผนังเซลล์ พีเอชที่มีค่าสูงหรือต่ำจะทำให้ความสามารถของกรดหรือเบสที่อยู่ในสภาพที่มีโมเลกุลไม่แตกตัวซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ ทำให้พีเอชภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักมีการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนและโปรตีนเกิดขึ้น ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่น ๆ ออกมา (สมใจ ศิริโภค, 2537) ทำให้พีเอชอาจมีการเปลี่ยนแปลงจนถึงระดับที่จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้น้อยลง เพราะฉะนั้นการควบคุมพีเอชในการหมักให้อยู่ในระดับคงที่เป็นสิ่งที่จำเป็นซึ่งอาจใช้สูตรอาหารที่มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ เช่น เติมแคลเซียมคาร์บอเนตหรือฟอสเฟต

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสซึ่งคงตัวที่อุณหภูมิสูงโดยเชื้อราสายพันธุ์ Aspergillus ที่ทนร้อน (Laura และคณะ, 1997) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 6.5 เมื่ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมคือ 4.3

Bailey และ Poutanen (1989) ศึกษาการผลิตกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลนโดย *A. fumigatus* VTT-D-82195 พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าสูงสุดเมื่อพีเอชเท่ากับ 4.8 โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 336 ยูนิต/มล.

Wang และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *Aspergillus* sp. G-393 พบว่าที่พีเอช 7 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 4.7 ยูนิต/มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hop และคณะ (1994) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *Thermomyces lanuginosus* RT9 ซึ่งพีเอชที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วง 5.0-8.0 พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 6.6 เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

2.3.7 ปัจจัยอื่นๆ

ในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยไซแลนโดย *A. terreus* ใช้ไซแลน ไซโลไบโอสหรือดีไซโลส เป็นสับสเตรทในการเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น แต่ทว่าเมื่อใช้เซลลูโลสหรือเซลโลไบโอส จะเกิดการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลส (Hrmovi และคณะ, 1989)

จลนพลศาสตร์ของการปลดปล่อยเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรทที่ใช้เป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส ตลอดระยะเวลาการหมัก หากมีการใช้ประโยชน์จากตัวเหนี่ยวนำที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ให้หมดลงอย่างช้า ๆ ซึ่งเป็นการเพิ่มระยะเวลาการหมักทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงขึ้น (Purkarthofer และคณะ, 1993)

การเติมสารลดแรงตึงผิว เช่น Tween 80 พบว่ามีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา จากการศึกษาสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นตัวกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ของ Reese และ Maguire (1969) เมื่อเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *A. fumigatus* ในสภาวะอาหารเหลว เพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม Tween 80

เนื่องจากกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเป็นกระบวนการที่ต้องการอากาศ ผลของแรงเฉือนและแรงทางกายภาพมีผลต่อเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย การเปลี่ยนแปลงของสัณฐานวิทยาและการแตกหักของไฮฟา รวมทั้งการเกิดรูรั่วภายในเซลล์ (Thomus, 1990) เพราะฉะนั้นการควบคุมการให้อากาศและความเร็วรอบในการเขย่าจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะมีผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ โดยปกติความเร็วรอบในการเขย่าที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์หรือการเจริญของเชื้อราอยู่ในช่วง 100-220 รอบต่อนาที

การเพิ่มพื้นที่ผิวของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ใช้เป็นสับสเตรทด้วยการบดจะทำให้มีการปลดปล่อยน้ำตาลที่ละลายได้ (soluble sugar) อย่างช้า ๆ ซึ่งมีประโยชน์ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (Haltrich และคณะ, 1996) การลดขนาดของอนุภาคของฟางข้าวบาเลย์หรือข้าวสาลี 2-3 จนกระทั่ง 0.20-0.25 มม. ซึ่งใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *Sporotrichum thermophile* พบว่ามีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้ลดลง ในขณะที่การผลิตชีวมวลสูงขึ้นประมาณร้อยละ 50 (Sugden และ Bhat, 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การวัดกิจกรรมเอนไซม์

กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรโดยวิธีการใช้กรดไดไนโตรไซลิซาลิก วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปล่อยจาก oat spelt และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ตามลำดับ

จากการศึกษา 1 หน่วยกิจกรรมเอนไซม์ กำหนดได้จากปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยแล้วปล่อย 1 ไมโครโมลของน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคส ต่อ 1 นาทีของการเกิดปฏิกิริยา (Chrictov และคณะ, 1999)

Milagres และ Duran (1992) หากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากการบ่มส่วนของฟิว-เตรดที่ผ่านการเจือจางปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช 6.0) นาน 15 นาที ที่ อุณหภูมิ 30 °C จากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959) โดยใช้สารละลายของน้ำตาลไซโลสเป็นมาตรฐานในการอ้างอิง

Tang และคณะ (1987) หากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส โดยการเติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ซิเตรท ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (พีเอช 4.8) บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959) โดยใช้สารละลายของน้ำตาลไซโลสเป็นมาตรฐานในการอ้างอิง

2.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนส

เนื่องจากคุณสมบัติและความอุดมสมบูรณ์ของไซแลนในธรรมชาติ การใช้เอนไซม์ไซลา-เนส จึงเป็นกระบวนการที่สำคัญในการประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ส่วนใหญ่ใช้เอนไซม์นี้ในการประยุกต์ใช้ ที่มีธัญพืชเป็นส่วนประกอบ เช่น อุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (Wong และคณะ, 1992 และ Bhat, 2000) เอนไซม์ไซลาเนสนี้ใช้ในการปรับปรุงกระบวนการคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้ายโดยการย่อยสลายและปรับปรุงปริมาณ (อะราบิโน) ไซแลน

2.5.1 การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการทำขนมปัง

การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการทำขนมปังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการขยายตัวของโด (dough) เช่น เวลาในการขยายตัว ความหนาแน่นการขยายตัว และการทนทานต่อการสลายตัว การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สามารถเห็นได้ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของขนมปัง ซึ่งเป็นการปรับปรุงของปริมาตรของก้อนขนมปังและโครงสร้างของเศษขนมปัง (Rouau, 1993; Poutanen, 1997; Rouau และคณะ, 1994; Maat และคณะ, 1992; Hillhorst และคณะ, 1999; Courtin และคณะ, 2001 และ Sorensen, 2003)

หน้าที่ของเอนไซม์ไซลาเนสเกี่ยวข้องกับความสามารถในการละลายของอะราบิ-โนไซแลนที่ไม่สามารถสกัดด้วยน้ำ (water-unextractable arabinoxylan) และการเปลี่ยนแปลงความหนืดของโด (Rouau และคณะ, 1994 และ Courtin และคณะ, 2001) เอนไซม์ไซลาเนสทำหน้าที่ย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สลาย (hydrolyse) อะราบิโนไซแลนที่ไม่มีการดึงน้ำออกได้ดีมาก กว่าอะราบิโนไซแลนที่สามารถสกัดด้วย (waer-extractable arabinoxylan) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงและความสามารถในการละลายของอะราบิโนไซแลนก็มีผลต่อการย่อยสลาย (Maat และคณะ, 1992) เอนไซม์ไซลาเนสจะทำให้โคเหนียวและอ่อนตัว เนื่องจากการสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะของน้ำ (water holding capacity)

2.5.2 การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในอาหารสัตว์

ธัญพืชเป็นส่วนผสมหลักในอาหารของสัตว์ปีก อย่างไรก็ตามพบอะราบิโนไซแลนในอาหารสัตว์ซึ่งมีข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ และข้าวสาลี เป็นส่วนประกอบ รู้กันดีว่าทำให้เกิดผลกระทบจากการต่อการใช้สารอาหาร (anti-nutritive) ในอาหารที่ใช้เลี้ยงไก่ เนื่องจากคุณสมบัติของอะราบิโนไซแลนต่อการเพิ่มความหนืด การเพิ่มความหนืดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในลำไส้ของสัตว์ปีกซึ่งเป็นที่ดูดซึมสารอาหารจะทำให้เวลาในการย่อยลดลง การแพร่ของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยอาหารลดลง (Pettersson และ Aman, 1988) ซึ่งจะทำให้การใช้อาหารสัตว์ไม่มีประสิทธิภาพและการเจริญเติบโตของสัตว์ปีกลดลง การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในอาหารสัตว์ทำให้ลดผลกระทบจากการใช้ประโยชน์อาหารโดย อะราบิโนไซแลนและความหนืดของอาหารสัตว์

ประโยชน์ของการเติมเอนไซม์ไซลาเนส ทำให้เกิดการย่อยสลายผนังเซลล์ของธัญพืช เพิ่มการใช้สารอาหารให้ง่ายขึ้นหรือปลดปล่อยชิ้นส่วนไซแลนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Bedford, 2003) การเติมเอนไซม์ไซลาเนสมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสัตว์น้อยมาก (Graham และ Inborr, 1992) เอนไซม์จะช่วยกำจัดปัญหาการขับถ่าย และปัญหาการกำจัดของเสียโดยการลดปริมาณน้ำของมูลสัตว์ (Bhat, 2000 และ Graham และ Inborr, 1992) ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อม

2.5.3 การแยกกลูเตนจากแป้ง (gluten starch)

เอนไซม์ไซลาเนสมีความสำคัญและช่วยกระบวนการในอุตสาหกรรมการแยกกลูเตนออกจากข้าวสาลี (Weegles และคณะ, 1992) การใช้เอนไซม์ไซลาเนสช่วยเพิ่มผลผลิตของกลูเตนให้สูงขึ้นและปรับปรุงคุณภาพของกลูเตน(Christopherson และคณะ, 2001) การปรับปรุงผลผลิตของกลูเตนโดยการลดความหนืดซึ่งเป็นผลมาจากการย่อยสลายของอะราบิโนไซแลนที่มีการสกัดน้ำออกบางส่วน (Redgewell และคณะ, 2001)

2.5.4 การผลิตเบียร์

การเติมเอนไซม์ไซลาเนสช่วยลดความหนืดของเบียร์ที่ต้มแล้วแต่ยังไม่ได้หมักหรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า น้ำเวิร์ท (wort) เพื่อลดความขุ่นของเบียร์ (Vietor และคณะ, 1993; Ducroo และ Frelon, 1989; Coote และ Kirsop, 1976) เนื่องจากเอนไซม์ไซลาเนส ช่วยลดความหนืดและความสามารถในการยึดเกาะของน้ำของ อะราบิโนไซแลนทำให้เพิ่มอัตราในการกรองและการป้องกันการสกปรกบนแผ่นเมมเบรน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.5 การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

เอนไซม์ไซลาเนสมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติของอาหารในธัญพืช โดยช่วยปรับปรุงปริมาณไฟเบอร์ ไฟเบอร์ที่สามารถละลายน้ำได้มีประโยชน์ต่อสุขภาพ (เช่น ช่วยลดระดับของคอเลสเตอรอลในน้ำเลือดซึ่งช่วยลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและโรคเบาหวาน) (Haskell และคณะ, 1992; Glore และคณะ, 1994) เนื่องจากเอนไซม์ไซลาเนสมีความสำคัญต่อระดับการละลายได้ของอะราบิโนไซแลนในขนมปัง (Laurikainen และคณะ, 1998) นอกจากนี้ ชิ้นส่วนเล็ก ๆ ของอะราบิโนไซแลนเป็นผลมาจากการย่อยด้วยกลุ่มเอนไซม์ไซลาเนสยังมีผลต่อสุขภาพในมนุษย์อีกด้วย (Campbell และคณะ, 1997)

2.5.6 กระดาษและเนื้อเยื่อไม้

เอนไซม์ไซลาเนสถูกนำเข้าสู่อุตสาหกรรมกระดาษและเนื้อเยื่อไม้เมื่อ 20 ปีมาแล้ว (Beg และคณะ, 2001) เอนไซม์ไซลาเนสมีชื่อเสียงอย่างมากในการลดความต้องการคลอรีนซึ่งใช้ในการฟอกสี เอนไซม์ไซลาเนสนี้จะทำให้ไซแลนแตกหักภายในส่วนเมทริก (matrix) ของเนื้อเยื่อไม้ (Paice และคณะ, 1992) ทำให้โครงสร้างระหว่างเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ที่เชื่อมต่อกันแน่นเปิดออกอย่างพอเพียง ซึ่งจะทำให้สารเคมีที่ใช้ฟอกสีเข้าไปทำปฏิกิริยาต่อส่วนที่เหลือของลิกนินได้ดี (Clark และคณะ, 1991; Clarke และคณะ, 1997; Harris และคณะ, 1997; Wong และคณะ, 1997 และ Suurnakki และคณะ, 1997) เอนไซม์ไซลาเนสสามารถเกิดปฏิกิริยากับไซแลนที่เกิดขึ้นใหม่และปลดปล่อยลิกนินในภายหลัง (Patel และคณะ, 1993)

2.5.7 ธัญพืชที่ใช้เป็นเชื้อเพลิง ของเสียจากการเกษตรและการป่าไม้

ในแต่ละปีสูญเสียค่าขนส่งชีวมวลจากธัญพืชที่ใช้เป็นเชื้อเพลิง ของเสียที่เหลือจากการเกษตรและการป่าไม้อย่างมาก จึงมีการใช้เอนไซม์ไซลาเนสให้เป็นประโยชน์ คือ เอนไซม์ไซลาเนสสามารถใช้เพื่อเปลี่ยนไซแลนไปเป็นไซโลสในของเสียที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ (Rani และ Nand, 1996) เอนไซม์ไซลาเนสร่วมกับเอนไซม์อื่น ๆ เช่น แมนแนเนส (mannanase) ลิกนิเนส (ligninase) ไซโลซิเดส (xylosidase) และอื่น ๆ สามารถใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น เอทานอลและไซลิทอล จากชีวมวลของพืช (Dominguez, 1998; Kuhud และ Singh, 1993; Galbe และ Zacchi, 2002) กระบวนการทางชีวภาพของการผลิตเอทานอล เป็นเชื้อเพลิงต้องการการแยกลิกนินจากลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เพื่อปลดปล่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส แล้วจึงทำการดีพอลิเมอร์ไรซ์ (depolymerisation) พอลิเมอร์ของคาร์โบไฮเดรต (carbphydrate polymer) เพื่อผลิตน้ำตาลอิสระ (free sugar) ซึ่งใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล (Lee, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุ

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และรำข้าวสาลีที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร

3.1.2 จุลินทรีย์

เชื้อราทนอุณหภูมิสูง *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายทนด่าง

3.2 อุปกรณ์

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และกล้องจุลทรรศน์
เครื่องกวนระบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow)
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge)
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 และ 3 ตำแหน่ง
เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหาร potato dextose agar (PDA) เป็นอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อราทนด่าง (ภาคผนวก ก)

3.3.2 อาหารเหลวสำหรับการเลี้ยงเชื้อราเพื่อให้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนด่าง (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.4 การเตรียมเชื้อรา

3.4.1 การเลี้ยงเชื้อราเพื่อให้มีการสร้างสปอร์

ทำการเขี่ยเชื้อราทนด่างจากเชื้อเริ่มต้นนำมาเลี้ยงลงบนอาหารวุ้นเอียง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 4 วัน

3.4.2 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา

นำหลอดอาหารที่มีเชื้อรา (จากข้อ 3.4.1) เติมน้ำกลั่นที่ผสมสารละลาย tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้ขดลวดขูดสปอร์ให้กระจายในสารละลาย และนำมาทำการนับสปอร์ของเชื้อเริ่มต้นให้มีจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนด่าง

3.5.1 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อราลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CD-Medium ที่ทำการเติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ ไซแลน ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และรำข้าวสาลี โดยจะเติมแหล่งคาร์บอนลงในแต่ละขวดในปริมาณร้อยละ 1 ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร(ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) โดยในแต่ละฟลาสก์บรรจุอาหาร 70 มิลลิลิตร ใส่สารละลายสปอร์ลงไปขวดละ 1 มิลลิลิตร และนำไปเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีการเขย่า 200 รอบต่อนาที จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 2, 3, 4, 5 ของวันที่ทำการเลี้ยงเชื้อโดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มิลลิลิตร โดยวิธีปลอดเชื้อ แล้วนำตัวอย่างที่เก็บได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนออกจากส่วนใส จากนั้นจึงเก็บส่วนใสไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุดจะถูกนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.2 การคัดเลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อราลงในแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ความเข้มข้นต่างกัน คือความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ โดยใช้สภาวะเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับ 3.5.1 แล้วทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่ สุดจะถูกนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.3 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนคาร์บอนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อราลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CD-Medium ที่ทำการเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ เปปโตน ทริปโตน และยีสต์สกัด โดยจะเติมแหล่งไนโตรเจนลงในแต่ละขวดในปริมาณร้อยละ 0.1 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้สภาวะเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับ 3.5.1 แล้วทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
72582

การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุดจะถูกนำ ไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.4 การคัดเลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อราลงในแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ความเข้มข้นต่างกัน คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ตามลำดับ โดยใช้สภาวะเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับ 3.5.1 แล้วทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยระดับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุดจะถูกนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.5 การคัดเลือกค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อราลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CD-Medium ที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกัน คือ 8, 9, 10 และ 11 โดยใช้สภาวะเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับ 3.5.1 แล้วทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุดจะถูกนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง) แบบ Duncan'new Mulpitle-Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

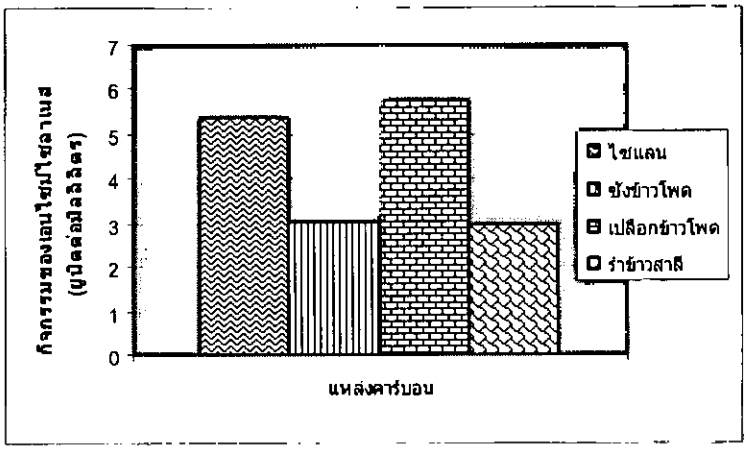
4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนด่างโดยเชื้อ *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย

4.1.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

ผลของชนิดแหล่งคาร์บอนซึ่งใช้สูตรอาหาร CD-Medium (ภาคผนวก ก) ที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ไซแลน ซังข้าวโพด รำข้าวสาลี และเปลือกข้าวโพด ที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ของเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย จากผลการทดลองพบว่าในการเลี้ยงเชื้อราจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด คือ 5.74 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จะสูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นดังรูปที่ 5 เมื่อนำมาเปรียบเทียบทางสถิติ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค ตารางที่ ค.1) จากผลการทดลองพบว่าการใช้ซังข้าวโพดและรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราลดลงอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้เปลือกข้าวโพด และค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน และเนื่องจากเปลือกข้าวโพดเป็นเศษวัสดุที่มีราคาถูกมากเมื่อเทียบกับไซแลน ดังนั้นเปลือกข้าวโพดจึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนด่าง *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย

จากการที่เชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายสามารถใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่สุด อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบภายในของเปลือกข้าวโพดมี เฮมิเซลลูโลสอยู่เป็นจำนวนมาก คือ ร้อยละ 39 และมีลิกนินอยู่ในปริมาณน้อย ซึ่งลิกนินเป็นส่วนที่ย่อยสลายได้ยากเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ (Benber และ Benedito de Barder, 1974; Kuhud, 1999) อีกทั้งอาจเนื่องจากการเรียงตัวของไซแลนในโครงสร้างของเปลือกข้าวโพดอยู่ในตำแหน่งที่ย่อยสลายได้ง่ายกว่า ส่วนเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนที่สามารถนำไปใช้ได้ง่ายที่สุด เมื่อเทียบกับเซลลูโลสและลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของเปลือกข้าวโพด (Kuhud, 1999) ดังนั้นเปลือกข้าวโพดจึงสามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากที่สุดประกอบกับในเปลือกข้าวโพดอาจมีแหล่งของสารอาหารอื่น ๆ เช่น แหล่งไนโตรเจน วิตามิน แร่ธาตุ เป็นต้น ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อราจึงช่วยส่งเสริมให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากขึ้น (Purkarthofer และคณะ, 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



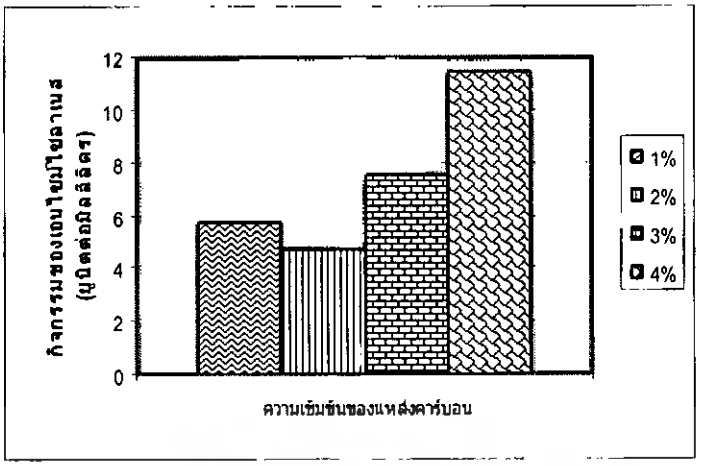
รูปที่ 5 ผลของชนิดแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายทนด่าง เมื่อมีการแปรผันแหล่งคาร์บอน และทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 เป็นระยะเวลา 5 วัน

4.1.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

จากผลของการใช้เปลือกข้าวโพดบดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0, 3.0 และ 4.0 เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยการเลี้ยงเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย ผลการทดลอง พบว่าเมื่อใช้เปลือกข้าวโพด ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4.0 เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลทำให้เชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลาย ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 11.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน (แสดงดังรูปที่ 6) ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ใช้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 (ภาคผนวก ค ดังตารางที่ ค.2)

มีงานวิจัยที่สอดคล้องกับการทดลองนี้โดย ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการใช้วัสดุเหลือทิ้งพวกลิกโนเซลลูโลสหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งแต่ละชนิดใช้ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 และ 3.0 สำหรับการผลิตเอนไซม์บีตา-ไซโลซิเดส โดย *A. fumigatus* ในการหมักแบบสภาวะอาหารเหลวโดยใช้ซังข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นร้อย 3 จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดสสูงสุดเท่ากับ 45.40 ยูนิต/มล. และรายงานว่าเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของรำข้าวสาลีจากความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เป็นร้อยละ 3.0 พบว่าปริมาณการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีตา-ไซโลซิเดส โดยเชื้อ *F. oxysporum* NTG-19 เพิ่มมากขึ้น (Singh และคณะ, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



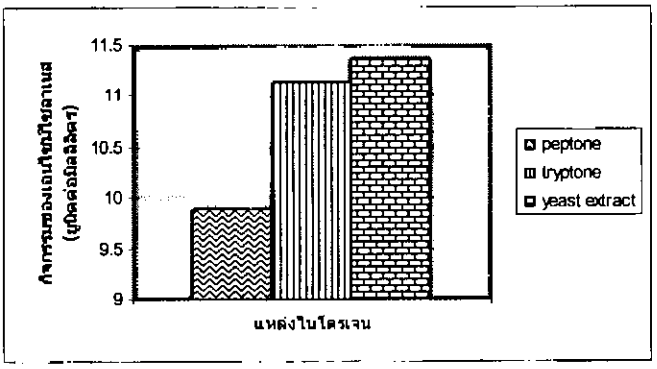
รูปที่ 6 ผลของความเข้มข้นของเปลือกข้าวโพดที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A. fumigatus* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลว ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 เป็นระยะเวลา 5 วัน

4.1.3 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

จากผลที่ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เปปโตน ทริปโตน และยีสต์สกัด ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จากผลการทดลองพบว่าในการเลี้ยงเชื้อราจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด โดยใช้ทริปโตนและยีสต์สกัด เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด คือ 11.15 และ 11.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน (แสดงดังรูปที่ 7) ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จะสูงกว่าการใช้เปปโตน เมื่อนำมาเปรียบเทียบทางสถิติ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค ตารางที่ ค. 3) จากผลการทดลองพบว่าการใช้ทริปโตนและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อได้เปรียบเทียบกันระหว่างทริปโตนและยีสต์สกัดพบว่า ยีสต์สกัดหาซื้อได้ง่ายและมีราคาถูกกว่าทริปโตน ดังนั้นจึงเลือกใช้ยีสต์สกัดจึงเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองชนิดของแหล่งไนโตรเจนกับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อ *A. fumigatus* พบว่าเปปโตน และยีสต์สกัดสามารถให้ผลผลิตที่ใกล้เคียงกัน (กนกวรรณ และคณะ, 2004)

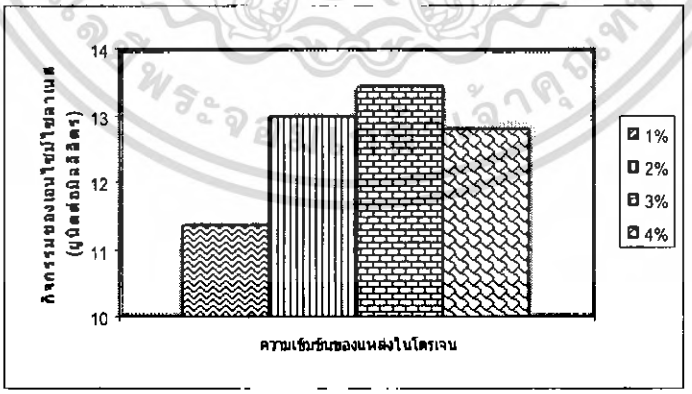
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายทนด่าง เมื่อมีการแปรผันแหล่งไนโตนเจน ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 เป็นระยะเวลา 5 วัน

4.1.4 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนซึ่งก็คือยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตร-เจนร้อยละ 0.2, 0.3 และ0.4 ผลการทดลองพบว่ายีสต์สกัดที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.2, 0.3 และ 0.4 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 12.97, 13.45 และ 12.80 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (แสดงดังรูปที่ 8) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 (ภาคผนวก ค ดังตารางที่ ค.4) จึงเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 เนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด

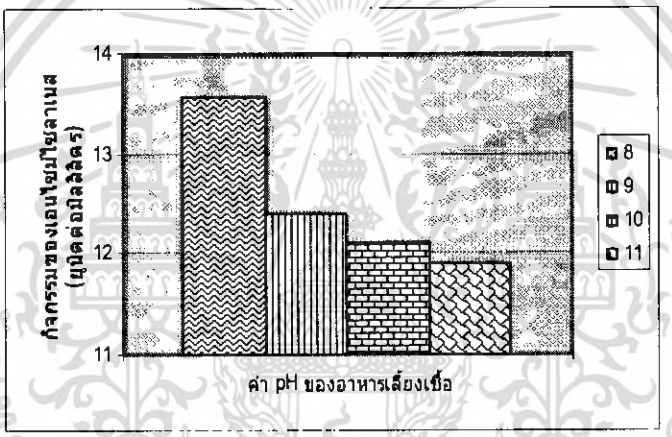


รูปที่ 8 ผลของความเข้มข้นยีสต์สกัดที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา*A. fumigatus* สายพันธุ์กลายเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลว โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้นของอาหาร 8 เป็นระยะเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5 พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

จากผลการทดลองพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ของเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายโดยทำการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 8, 9, 10 และ 11 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 8 ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 13.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ และสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวอื่น ๆ ที่ได้ศึกษามา (แสดงดังรูปที่ 9) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ผลการทดลองของพีเอช 9, 10 และ 11 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีรายงานการทดลองของ Anthony และคณะ (2003) ที่ได้ทำการทดลองกับเชื้อ *A. fumigatus* AR1 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์กลายทนด่างและทำการทดลองทดลองเลี้ยงเชื้อในช่วงค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 5 - 9 พบว่าเชื้อจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดที่ค่าพีเอชเริ่มต้นในช่วง 6.0 - 6.5



รูปที่ 9 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่ความเร็วรอบ 200 รอบ ต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายทนด่าง โดยเลี้ยงในอาหารเหลว ใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร 1 มิลลิลิตรลงในออเลนเมเยอร์ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลว CD-Medium 70 มิลลิลิตร และใช้เปลือกข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 ใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ภายใต้สภาวะการเจริญที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 8 ตามลำดับ โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสนี้ พบว่า *A. fumigatus* สายพันธุ์กลายทนด่างให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 13.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน

ข้อเสนอแนะ

1. นอกจากปัจจัยที่ได้ทำการทดลองมาแล้ว ควรทำการศึกษาปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ เช่น อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ สารลดแรงตึงผิว ปริมาตรอาหารต่อขนาดของขวดรูปชมพู่ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

2. ขนาดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ยังมีขนาดที่ไม่สม่ำเสมอ คืออาจจะมีขนาดมากกว่าที่กำหนด หรือน้อยกว่าที่กำหนดเล็กน้อย ซึ่งอาจมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ได้ จึงควรมีเครื่องมือที่ใช้ในการการควบคุมขนาดของแหล่งคาร์บอนให้มีขนาดที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด ทุกอนุภาค

3. ควรทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อคาร์บอนว่าอัตราส่วนใด ทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สุด

4. ควรมีการปรับปรุงพันธุ์เชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เช่น การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต หรือการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ จันทบาล, ธนพล ธรรมประทีป และธีรศักดิ์ เพียรสิริรัตน์. 2004. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราทนอุณหภูมิสูง *Aspergillus fumigatus*. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. น.22-31.

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. สหมิตรออฟเซต. กรุงเทพฯ. น.250.

Abdel-Sater, M.A. and El-Said, A.H.M. 2001. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. International Biodeterioration and Biodegradation. 47: 15-21.

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

Bailey, M.J. and Poutanen, K. 1989 . Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus fumigatus*. Applied Microbiology Biotechnology. 30: 5-10.

Bailey, M.J. and Viikari, L. 1993. Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylanbased media. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 9: 80-84.

Bansod, S. M., Dutta-Choudhary, M., Srinivasan, M. C. and Rele, M. V. 1993. Xylanase active at high pH from an alkalotolerant *Cephalosporium* species. Biotechnology. Letter. 15: 965-970.

Bedford, M.R. 2003. Factors influencing the use of enzymes in cerealbased diets, In: Courtin, C.M.,Veraverbeke, W., Delcour (Eds.), J.A., Recent Advances in Enzymes in Grain Processing: Proceedingsof the 3rd European Symposium on Enzymes in Grain Processing, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven.

Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. and Hoondal, G.S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications. Applied Microbiology Biotechnology. 56: 326– 338.

Benber, S. and Benedito de Barder, C. 1974. Basic and Applied Research Needs for Optimizing Utilization of Rice Bran as Food and Feed. Proceedings of the Rice By-Products Utilization International Conference. Institute of Agrohemistry and Food Technology. Valencia. 4 :1-99.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Beneke, E.S. and Rogers, A.L. 1980. Medical mycology manual with human mycoses monograph, 4th ed. New York & London: Macmillan Publishing Company & Collier Macmillan Publishers.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnology. 3: 286-290.

Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advance. 18: 355–383.

Campbell Jr, J.M., Fahey, G.C. and Wolf, B.W. 1997. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. Journal Nutrition. 127: 130–136.

Chandra Raj, K. and Chandra, T.S. 1995. A cellulase-free xylanase from alkali-tolerant Aspergillus fischeri Fxnl. Biotechnology. Letter. 17 : 309-314.

Clark, T.A., Steward, D., Bruce, M., McDonald, A., Senior, A., and Singh, D. 1991. Improved bleachability of Radiata pine kraft pulps following treatment with hemicellulolytic enzymes. Applied Microbiology Biotechnology. 44: 389– 393.

Clarke, J.H., Rixon, J.E., Ciruela, A., Gilbert, H.J. and Hazlewood, G.P. 1997. Family 10 and family 11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleachability of hardwood and softwood paper pulps. Applied Microbiology Biotechnology. 48: 177–183.

Coote, N., Kirsop, B.H. 1976. A haze consisting largely of pentosan. Journal Instant Brewing. 82 : 34

Costa-Ferreira, M., Dias, A., M~imo, C., Morgado, M.J., Sena-Martins, G. and Duarte, J.C. 1994. Xylanolytic enzyme production by an *Aspergillus niger* isolate. Applied Biochemistry Biotechnology. 44: 231-242.

Courtin, C.M., Gelders, G.G. and Delcour, J.A. 2001. Use of two endoxylanases with different substrate selectivity for understanding arabinoxylan functionality in wheat flour breadmaking. Cereal Chemistry. 78: 564– 571.

Dominguez, J.M. 1998. Xylitol production by free and immobilised Debaryomyces hansenii,Biotechnology Letter. 20: 53- 56.

Ducroo, P. and Frelon, P.G. 1989. Improvement of beer production by the use of α -glucanase-pentosanase from *Diporotrichum dimorphosphorum*, Europcan Brewery Convention: Proceedings of the 22nd Congress, IRL Press, Oxford. pp. 445–452.

Galbe, M. and Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. Applied Mierobiology Biotechnology. 59: 618- 628.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glore, S.R., Van Treeck, D., Knehans, A.W. and Guild, M. 1994. Soluble fiber and serum lipids: a literature review. Journal of the American Dietetic Association. 94 : 425–436.

Graham ,H. and Inborr, J. 1992. Application of xylanase-based enzymes in commercial pig and poultry production, In: Visser, J., Beldman, G., Kusters-Van Someren, M.A., Voragen (Eds.), A.G.J., Xylans and Xylanases,Elsevier, Amsterdam. The Netherlands. pp. 535–538.

Gupta, A. and Madamwar, D. 1997. Solid State Fermentation of Lignocellulosic Waste for Cellulose and β-Glucosidase Production By Cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. Biotechnology Progress. 13(2): 166-169.

Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W. and Zupancic, S. 1996. Production of fungal xylanases. Bioresource Technology. 58: 137-161.

Harris, G.W., Pickersgill, R.W., Connerton, I., Debeire, P., Touzel, J.P., Breton, C. and Perez, S. 1997.Structural basis of the properties of an industrial relevant thermoplhilic xylanase. Proteins. Bioresource Technology. 29: 77– 86.

Haskell, W.L., Spiller, G.A., Jensen, C.D., Ellis, B.K. and Gates, J.E. 1992. Role of water-soluble dietary fiber in the management of elevated plasma cholesterol in healthy subjects. The American Journal Cardiology. 69: 433–469.

Hillhorst, R., Dunnewind, B., Orsel, R., Stegeman, P., van Vliet, T., Gruppen, H. and Schols, H.A. 1999. Baking performance, rheology, and chemical composition of wheat dough and gluten affected by xylanase and oxidative enzymes. Journal Food Science. 64: 808– 813.

Hrmovi, M., Biely, P. and Vransk, M. 1989. Celluloseand xylan-degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*. Enzyme Microbial Technology. 11 : 610-616.

Jackson, M.G. 1997. The Alkali Treatment of Straws. Animal Feed Science and Technology. 2(2): 105-130.

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

Kitpreechavanich, V., Srisuk, W. and Lotong, N. 1992. Production of β-xylanase and β-xylosidase by *Aspergillus fumigatus* using solid-state cultivation. Process Biotechnology. 7: 519-522.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kilch, M.A., Samson, R.A. and Members of the International Commission on Penicillium and Aspergillus (ICPA) 1996. Aspergillus reference cultures. New Orleans, Louisiana: Agricultural Research Service, Southern Regional Research Center.

Kuhud, R.C. and Singh, A. 1993. Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects, Critical Review in Biotechnology. 13 : 151–172.

Kuhud, R.C., Singh, A., and Manchanda, M. 1998. Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. Process Biochemistry. 33: 641-647.

Kuhud, R.C. 1999. Lignocellulose biotechnology : Current and future prospects. Critical Review in Biotechnology. 13 : 151-172.

Laura, P.Castro, M. Blanca, A. Trejo-Aguilar and Osorio., G.A. 1997. Thermostable xylanases produced at 37°C and 45°C by a thermotolerant *Aspergillus* strain . FEMS Microbiology Letters. 146: 97-102.

Laurikainen, T., Harkonen, H., Autio, K. and Poutanen, K. 1998. Effects of enzymes in fibre-enriched Baking. Journal Science Food Agricultural. 76 : 239–249.

Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, Journal Biotechnology. 56: 1 –24.

Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., Santos da Silva, M.J., Bosse, M., Egmond, M.R., Hagemans, M.L.D., van Gorcom, R.F.M., Hessing, J.G.M., van der Hondel, C.A.M.J.J. and Rotterdam, C.V. 1992. Xylanases and their application in bakery, In: J.Visser, G. Beldman, M.A. Kusters-van Somerson, A.G.J.Voragen (Eds.), Xylans and Xylanases, Elsevier, Amsterdam. pp. 349–360.

Marsden, W.L. and Gray, P.P. 1986. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignoecellulosic Material. Critical Review in Biotechnology. 3(3): 235-276.

Milagres, A.M.F. and Duran, N. 1992. Xylanolytic enzymes from *Penicillium janthinellum* and its applications in bleaching of pulp. Process Biotcchnology. 7: 539-545.

Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analysis Chemistry.31, 426–428.

Paice, M.G., Gurnagul, N., Page, D.H. and Jurasek, L. 1992. Mechanism of hemicellulose directed prebleaching of kraft pulp, Enzyme Microbial Technology. 14 : 272– 276.

Patel, A.N., Grabski, A.C. and Jeffries, T.W. 1993. Chromophore release from kraft pulp by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanase. Applied Microbiology Biotechnology. 39: 405–412.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pettersson, D. and Aman, P. 1988. Effects of enzyme supplementation of diets based on wheat, rye orriticale on their productive value for broiler chickens. Animal Feed Science Technology. 20: 313– 324.

Poutanen, K. 1997. Enzymes: An important tool in the improvement of the quality of cereal foods. Trend Food Science Technology. 8: 300– 306.

Purkarthofer, H., Sinner, M. and Steiner, W. 1993. Effect of shear rate and culture pH on the production of xylanase by *Thermomyces lanuginosus*. Biotechnology Letter. 15: 405-410.

Qinnghe, C., Xiaoyu, Y., Tiangui, Niu., Cheng, J. and Qiugang, M. 2004. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Process Biochemistry. 39: 1561-1566.

Rani, S. and Nand, K. 1996. Development of cellulase-free xylanase producing anaerobic consortia for the use of lignocellulosic wastes. Enzyme Microbial Technology. 18: 23–28.

Ratanakhanokchai, K., Khin Lay Kyu and Tanticharoen, M. 1999. Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. Applied and Environmental Microbiology 65: 694-697.

Redgewell, R.J., Michieli, J.H., Fisher, M., Reymond, Nicolas, S., P. and Sievert, D. 2001. Xylanase induced changes to water and alkali-extractablearabinoxylans in wheat flour: their role in lowering battering viscosity. Journal Cereal Science. 33: 83– 96.

Reese, E.T.,and Maguire, A. 1969. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. Applied Microbiology. 17: 242-245.

Ronald P. de Vries and Jaap Visser. 2001. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. Microbiology and Molecular Biology. 65: 497-522.

Rouau X. 1993. Investigations into the effects of an enzyme preparation for baking on wheat flour dough pentosans. Journal Cereal Science. 18: 145– 157.

Rouau, X., El-Hayek, M.-L. and Moreau, D. 1994. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flours in relation to changes in pentosan properties. Journal Cereal Seience. 19: 259- 272.

Singh, A., Kuhad, R. C. and Kumar, M. 1995. Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. Enzyme Microbial Technology. 17 : 551-553.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sorensen, J.F. 2003. Novel tailor-made xylanases: their characterisation, performance in cereal processing and use as a tool to understand xylanase functionality in baking, In: Courtin, C.M., Veraverbeke, W., Delcour (Eds.), J.A., Recent Advances in Enzymes in Grain Processing: Proceedings of the 3rd European Symposium on Enzymes in Grain Processing, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven.

Stevenson, J. A. 1975. Fungi of Puerto Rico and the Virgin Islands. Ann Arbor, Michigan: Braun-Brumfield.Stewart, J.C., Lester, A., Milbun, B. and Parry, J.B. 1983. Xylanase and cellulase production by *Aspergills fumigatus* Fresenius. Biotechnology Letter. 5: 543-548.

Sugden, C. and Bhat, M.K. 1994. Cereal straw and pure cellulose as carbon sources for growth and production of plant cell-wall degrading enzymes by *Sporotrichum thermophile.* World Journal Microbiology Biotechnology. 10 : 444-451.

Suurnakki, A., Tenkanen, M., Buchert, J. and Viikari, L. 1997. Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. Advance Biochemistry Engineer Biotechnology. 57: 261–287.

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

Thomas, C.R. 1990. Problems of shear in biotechnology. In Chemical Engineering Problems in Biotechnology, ed. M.A. Winkler. Elsevier Applied Science, London. pp. 23-93.

Veridiana Lenartovicz, Cristina Giatti Marques de Souza, Fabiana Guillen Moreira and Rosane Marina Peralta. 2003. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β-xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. Process Biochemistry. 38: 1775-1780.

Vietor, R.J., Voragen, A.G.J. and Angelino, S.A.G.F. 1993. Composition of non-starch polysaccharides in wort and spent grains from brewing trials with malt from a good malting quality barley and a feed barley. Journal Instant Brewing. 99: 243– 248.

Vries, R.P., Poulsen, C.H., Madrid, S., and Visser, J. 1998. aguA, the gene encoding an extracellular α-glucuronidase from *Aspergillus tubingensis* is specifically induced on xylose and not on glucuronic acid. Journal Bacteriology. 180 :243-249.

Wang, S.L., Chen, L.G., Chen, C.S. and Chen, L.F. 1994. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus* sp. G-393. Applied Biochemistry Biotechnology. 45(46) : 655-662.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wase, D.A.J., Raymahasay, S. and Wang, C.W. 1985. Production of β-D-glucosidase, endo-1,4-β-D-glucanase and D-xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI 255091. Enzyme Microbial Technology. 7: 225-229.

Weegels, P.L., Marseille, J.P. and Hamer, R.J. 1992. Enzymes as a processing aid in the separation of wheat flour into starch and gluten, Starch/Starke. 44: 44–48.

Whistler, R.L. 1950. Xylan. Advance Carbohydrate Chemistry. 5: 269-290.

Wong, K.K.Y. and Saddler, J.N. 1992. *Trichoderma xylanases*, their properties and application, In: Visser, J., Beldman, G., Kusters-Van Someren , M.A., Voragen (Eds.), A.G.J., Xylans and Xylanases, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp.171–186.

Wong, K.K.Y., Larry Tan, U.L. and Saddler, J.N. 1988. Multiplicity of 14-xylanases in microorganisms-functions and applications. Microbiology Review. 52: 305–317.

Wong, K.K.Y., Martin, L.A., Gama, F.M., Saddler, J.N. and de Jong, E. 1997. Bleach boosting and direct brightening by multiple xylanase treatments during peroxide bleaching of kraft pulps, Biotechnology Bioengineering. 54: 261–287.

http://www.adisseonorthamerica.com/rovabioguide/versatility.asp

http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/FUNDAMNT/hemicel.htm

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และสารละลายสปอร์

1. อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

มีส่วนประกอบดังนี้

มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
เด็กโทส(dextrose)	20	กรัมต่อลิตร
วุ้น	15	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียมอาหาร

1. ชั่งสารอาหารทั้งหมดให้ได้สัดส่วนในปริมาณที่ต้องการ
2. ละลายสารอาหารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
3. นำไปปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.0
4. นำอาหารบรรจุลงหลอดทดลอง
5. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
6. เอียงอาหารที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว จนกระทั่งวุ้นแข็งโดยวิธีปลอดเชื้อ

2. อาหาร CD-Medium

มีส่วนประกอบดังนี้

$NaNO_3$	3.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4$	0.5	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4$	0.01	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.0	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียมอาหาร

1. ทำการเตรียมสารที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร CD-Medium ให้ได้สัดส่วนตามที่ต้องการ จากนั้น ทำการละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. ทำการปรับพีเอชโดยใช้ NaOH หรือ HCl ให้ได้ค่าพีเอชเท่ากับ 8
3. บรรจุอาหารลงในขวดเลี้ยงเชื้อ ขวดละ 70 มิลลิลิตร
4. ทำการเติมแหล่งคาร์บอน เช่น ไซแลน ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด หรือรำข้าวสาลี ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. วิธีการเตรียมสารละลายสปอร์

1. นำน้ำกลั่นที่มีสารละลาย tween 80 ความเข้มข้น 0.1% เติมลงในหลอดอาหารที่มีเชื้อราที่มีสปอร์เจริญอยู่

2. ทำการขูดผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเบาๆ โดยใช้ลูปที่ฆ่าเชื้อแล้วเพื่อให้สปอร์หลุดออกมา

3. ทำการกรองเส้นใยออกจากสารละลายสปอร์โดยใช้สำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว

4. ทำการเจือจางสารละลายสปอร์ที่ได้ในระดับที่เหมาะสม

5. ทำการนับจำนวนสปอร์ให้ได้ประมาณ $4x10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร โดยใช้ haemacytometer

3.1. วิธีการตรวจนับสปอร์ของเชื้อราโดยใช้ haemacytometer

1. ปิเปตต์สารละลายสปอร์ลงใน haemacytometer โดยใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2. ตรวจนับจำนวนสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

3. นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก หรือถ้านับช่องใหญ่ให้หาค่าเฉลี่ยและนำมาคูณด้วย 4x106 จะได้เป็นปริมาณสปอร์ต่อกรัมหรือต่อมิลลิลิตร

3.2. วิธีการคำนวณปริมาณสปอร์

พื้นที่ 1 ช่องเล็กในตารางใหญ่มีค่าเท่ากับ 0.05x0.05 = 0.0025 ตารางมิลลิเมตร

ความลึกระหว่าง Cover slip และตาราง = 0.1 มิลลิเมตร

ดังนั้น ปริมาณ 1 ช่องเล็กจะมีค่า 0.0025x0.1 = 0.00025 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ปริมาณ 0.00025 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีจุลินทรีย์ Z เซลล์ (สปอร์)

ปริมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีจุลินทรีย์ = Zx1000/0.00025

= $Zx4x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรหรือเซลล์ต่อกรัม

(สปอร์ต่อมิลลิลิตรหรือสปอร์ต่อกรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

1. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสตามวิธีของ Tang และคณะ (1987)

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย (ร้อยละ)

Dinitrosalicylic (DNS) acid	1.0
Phenol	0.2
Sodium potasssium tartrate	20.0
Sodium sulphite (Na_2SO_3)	0.05
Sodium hydroxide	1.0

วิธีการเตรียม

ละลาย Sodium hydroxide ในน้ำกลั่นตามปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเติม Sodium potasssium tartrate, Phenol และ Dinitrosalicylic acid ลงในสารละลาย Sodium hydroxide จากนั้นทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชาเก็บไว้ในที่มืด ก่อนนำมาใช้ให้เติม Sodium sulphite 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ DNS reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายไซแลนและความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในบัฟเฟอร์ซิเตรทความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร แล้วต้มในน้ำเดือด 5 นาที

3. ทำให้เย็นด้วยน้ำก๊อก

4. เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

(ชุดควบคุม : นำเอนไซม์ไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำการเติมสารละลายไซแลน แต่ไม่บ่ม โดยเติม DNS reagent ลงไปทันที นำไปต้มแล้วทำตามวิธีการข้างต้น)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

ยูนิตต่อมิลลิลิตร = มิลลิกรัมของไซโลส x 1000 x จำนวนเท่าของความเจือจางสารละลายเอนไซม์
น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลไซโลส x ระยะเวลาบ่ม x ปริมาตรสารละลายเอนไซม์
(กรัมต่อโมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

1.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลสในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

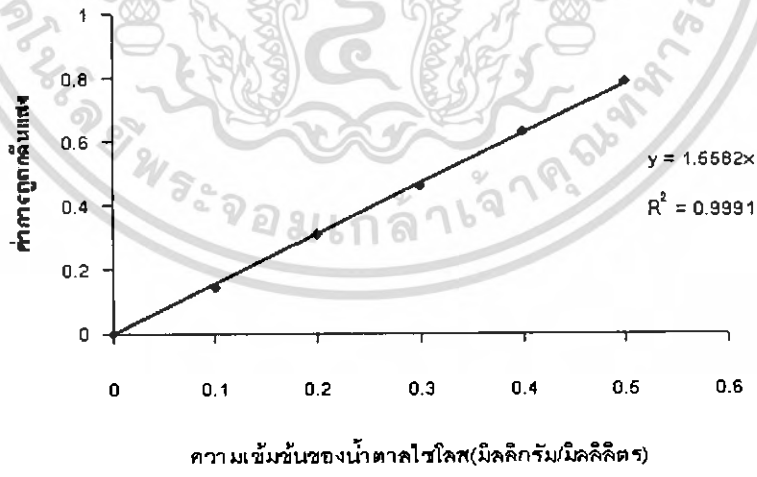
1. เตรียม stock solution ของน้ำตาลไซโลสให้มรความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร (แบลงค์ (blank) ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทน)

3. เติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร

4. นำไปต้มน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบทำให้เย็นด้วยน้ำก๊อก

5. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ใดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส



รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติโดย Duncan's New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค. 1 การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราทนด่าง *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ไซแลน	ซังข้าวโพด	เปลือกข้าวโพด	รำข้าวสาลี
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	5.41[a]	3.05[b]	5.75[a]	2.97[b]

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค. 2 การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราทนด่าง *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (ร้อยละ)	2.0	3.0	4.0
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	4.73[c]	7.55[b]	11.41[a]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค. 3 การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราทนด่าง *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	เปปโตน	ทริปโตน	ยีสต์สกัด
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	9.90^{c}	11.15^{b}	11.37^{ab}

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค. 4 การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราทนด่าง *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน(ร้อยละ)	0.2	0.3	0.4
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	12.98^{a}	13.45^{a}	12.81^{a}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ ค. 5 การเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan' s New Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราทนด่าง *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์กลาย

พีเอชเริ่มต้น	8	9	10	11
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	13.57^{a}	12.41^{b}	12.13^{b}	11.91^{b}

หมายเหตุ

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้