สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรโดยเชื้อรา

โดย นางสาวมณีรัตน์ เสน่ห์น้อยสินดี 35504330
นางสาวสุกัญญา ครำกระโทก 35504345

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2538

ปน.
ม137ก
2538
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 25406
วัน, เดือน, ปี 9 ก.ค. 2539

สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of Xylanase from Agricultural Waste by Fungi

Name Miss Maneerut Sanhainoisindee 35504330
Miss Sukanya Kramkratoke 35504345

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment 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 1995

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรโดยเชื้อรา

โดย นางสาวมณีรัตน์ เสน่ห์น้อยสินดี

นางสาวสุกัญญา ครั่ำกระโทก

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อารี กังแฮ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....
(ดร.อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล) หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

.....
(รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์) ประธานกรรมการ

.....
(อาจารย์อารี กังแฮ) กรรมการ

.....
(อาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรโดยเชื้อรา
โดย	นางสาวมณีรัตน์ เสน่ห์น้อยสินดี
	นางสาวสุกัญญา ครำกระโทก
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อารี กังแฮ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2538

บทคัดย่อ

ฟางข้าวเป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อราทั้งหมด 4 ชนิดได้แก่ *Aspergillus niger* ATCC 6275 *Trichoderma reesei* ATCC 13631 *Myrothecium verrucaria* UPPC 3345 และ *Sporotrichum pulverulentum* โดยเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งในฟางข้าวที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ให้มีขนาดไม่เกิน 0.25 มิลลิเมตร นำมาเลี้ยงในสภาวะเริ่มต้นเดียวกัน คือบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 60 เปอร์เซนต์ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 และปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์/5กรัม พบว่าภายใต้สภาวะดังกล่าวมีเชื้อชนิดเดียวที่สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้คือ *Sporotrichum pulverulentum* ซึ่งได้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 0.6498 ยูนิต/กรัม

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *S. pulverulentum* ที่เลี้ยงแบบอาหารแข็ง พบว่าชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดคือการใช้รำข้าวในอัตราส่วน ฟางข้าว:รำข้าว เท่ากับ 1:1 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 51.2197 ยูนิต/กรัม เชื้อให้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 56.7489 ยูนิต/กรัมที่ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 80 เปอร์เซนต์ และพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ 6 โดยให้ค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 57.1054 ยูนิต/กรัม ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ดังกล่าวเชื้อจะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและให้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 57.1054 ยูนิต/กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Production of Xylanase from Agricultural Waste by Fungi
Name	Miss Maneerat Sanhainoisindee
	Miss Sukanya Kramkratoke
Special Project Advisor	Miss Aree Kunghae
Department	Applied Biology
Acadamic Year	1995

Abstract

Rice straw, an agricultural waste was used as a substrate for the production of xylanase from four different fungal species such as *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Trichoderma reesei* ATCC 13631, *Myrothecium verrucaria* UPPC 3345 and *Sporotrichum pulverulentum*. Rice straw was milled to the size of 0.25 mm. and adjusted to obtain an initial moisture content of 60% and initial pH 6. Fungal spores (10^7 spore/5g.) were inoculated into the rice straw and incubated at 37°c. *Sporotrichum pulverulentum* showed to be the only fungus that could grow and produce xylanase with the activities of 0.6498 U/g rice straw.

The best nitrogen source for the production of xylanase from *Sporotrichum pulverulentum* under solid substrate cultivation was rice bran : rice straw with the ratio of 1:1 with gave xylanase activities of 51.2197 U/g. The activities of xylanase was 56.7489 U/g when

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

the initial moisture content of the substrate was adjusted to 80% and the activities of xylanase was 57.1054 U/g. when the optimum pH was adjusted to 6. Under these optimized condition, S. *pulverulentum* gave the maximum xylanase activities of 57.1054 U/g.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์อารี กังแฮ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและการเขียนโครงงานพิเศษฉบับนี้ รวมถึงการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณรศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์และอาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล ที่เป็นคณะกรรมการในโครงงานพิเศษและช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องบดอาหารสัตว์ที่ใช้บดฟางข้าวเพื่อใช้ในการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพรักยิ่ง ขอขอบพระคุณทุก ๆ ท่าน ที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

มณีรัตน์ เสน่ห์น้อยสินดี
สุกัญญา ครำกระโทก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	2
1. ส่วนประกอบเซลล์ของฟางข้าว	2
2. ลิกโนเซลลูโลส	2
3. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส	8
4. การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ และคุณสมบัติของเอนไซม์	10
5. ประโยชน์ของเอนไซม์ไซลาเนส	11
6. การแปรสภาพ (pretreatment) วัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส	11
7. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา	15
8. ลักษณะของเชื้อราแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลอง	27
บทที่ 3 วัตถุประสงค์	30
บทที่ 4 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	31
วัสดุ	31
อุปกรณ์	32
วิธีการ	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	1. การคัดเลือกชนิดของเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	34
	2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	34
บทที่ 5	ผลการทดลองและวิจารณ์	36
	1. การคัดเลือกชนิดของเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	36
	2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส	41
บทที่ 6	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	46
เอกสารอ้างอิง		48
ภาคผนวก		65
	ก. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์	66
	ข. วิธีการวิเคราะห์	67
	1. ความชื้น	67
	2. การเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส	68
	3. การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติเกี่ยวกับพีเอชและอุณหภูมิของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา	12
2	การปรับปรุงคุณค่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรมโดยกรรมวิธีต่าง ๆ	16
3	วิธีการต่าง ๆ ในการทำให้ไซแลนที่เป็นองค์ประกอบของพืชในธรรมชาติถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น	17
4	เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ	20
5	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อกิจกรรมเซลลูเลสของ *Penicillium funiculosum* UV-49	22
6	พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	24
7	กิจกรรมเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสของเชื้อรา (cellulase and hemicellulase activities)	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของไซแลน	4
2	โครงสร้างของสารประกอบอะโรมาติกของลิกนินและโครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน ในรูปพอลิเมอร์ของพืชโดยทั่วไป	5
3	ผลของการย่อยสลายลิกนินของเชื้อราแต่ละชนิด	7
4	ตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	37
5	ลักษณะของการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งในฟลาสก์ที่อยู่ในตู้บ่ม	38
6	ลักษณะของการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. pulverulentum*	39
7	สารละลายเอนไซม์ที่เก็บได้จากการทดลอง	40
8	ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *S. pulverulentum* ที่เลี้ยงแบบอาหารแข็งในฟางข้าวเป็นเวลา 12 วันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	42
9	ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *S. pulverulentum* ที่เลี้ยงแบบอาหารแข็งในฟางข้าวเป็นเวลา 12 วันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	43
10	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *S. pulverulentum* ที่เลี้ยงแบบอาหารแข็งในฟางข้าวเป็นเวลา 13 วันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	45

รูปผนวกที่		หน้า
ข1	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร	71
ข2	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมากมายหลายชนิดและมีอยู่เป็นจำนวนมาก วัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้นอกจากจะมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักแล้วยังประกอบด้วยไซแลน ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลสอยู่ถึง 20-30 เปอร์เซ็นต์ (Whistler and Smart, 1953; Lotong, et al.,1980; Okada, et al., 1980) ซึ่งในการทดลองนี้เป็นการใช้ประโยชน์จากฟางข้าวโดยเปลี่ยนสารลิกโนเซลลูโลสที่มีอยู่ในฟางข้าวให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่ามากขึ้น ซึ่งก็คือเอนไซม์ไซลาเนส

จากรายงานพบว่าไซแลน เป็นสารซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ได้ง่ายกว่าเซลลูโลส และลิกนิน (Domsh and Gams, 1969; Han, 1978) จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งบักเตรี แอคติโนมัยซีส และเชื้อรา สามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสย่อยสลายไซแลนให้กลายเป็นน้ำตาลไซโลสและไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ต่างๆ (Lizuka and Kawaminami, 1965; King and Fuller, 1968; Takahashi and Kutsumi,1979) ซึ่งจุลินทรีย์สามารถเจริญและผลิตสารที่มีประโยชน์อื่น ๆ ได้ ซึ่งวัตถุประสงค์จากการทดลองนี้ก็เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าว และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลองนี้ได้แก่ อาจจะได้เชื้อราที่มีศักยภาพในการย่อยสลายฟางข้าวเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส อาจจะได้ผลประโยชน์พลอยได้ คือฟางข้าวที่ผ่านการหมักเมื่อทำการสกัดเอนไซม์ออกแล้วใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ได้ และสามารถใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยเปลี่ยนสารลิกโนเซลลูโลสเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีค่ามากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ส่วนประกอบเซลล์ของฟางข้าว

ฟางข้าวเป็นอาหารหยาบที่มีคุณค่าทางอาหารต่ำสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง มีการย่อยได้ของวัตถุแห้งเพียง 45-50 เปอร์เซ็นต์

ฟางข้าวมีส่วนประกอบ 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นเนื้อเซลล์ (cell content) 21 เปอร์เซ็นต์ และผนังเซลล์ (cell wall) 79 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนผนังเซลล์ 79 เปอร์เซ็นต์นี้แบ่งเป็นส่วนที่เป็นเซลลูโลส 33 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 26 เปอร์เซ็นต์ ลิกนิน 7 เปอร์เซ็นต์ และซิลิกา 13 เปอร์เซ็นต์ (Jackson, 1977) และฟางข้าวมีค่าการย่อยได้แบบ in vitro ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ค่าการย่อยได้แบบ in vivo ประมาณ 24-30 เปอร์เซ็นต์

2. ลิกโนเซลลูโลส

วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรส่วนใหญ่จะเป็นสารพวกลิกโนเซลลูโลส ฟางข้าวก็เช่นกัน ดังนั้นจึงมีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วนคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

2.1 <u>เซลลูโลส</u>

เป็นสารประกอบพวกโพลีแซ็กคาไรด์ที่มีมากในผนังเซลล์ของพืช โครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบไม่มีกิ่งก้านสาขา ประกอบด้วยกลูโคสหลายๆหน่วยมาต่อกันเป็นเส้นยาวด้วยพันธะแบบเบตา-กลูโคซิดิก มีโครงสร้างทางเคมีเป็น $[C_6H_{10}O_5]_n$ (Goodwin and Mercer , 1972) และโมเลกุลของเซลลูโลสจะเรียงกันอยู่เป็นมัด ๆ (fibril) และเมื่อนำแต่ละมัดมาขยาย พบว่าประกอบด้วยส่วนที่อยู่รวมกันเป็นกระจุก เรียกว่า crystalloid และส่วนที่อยู่รวมกันแบบหลวม ๆ เรียกว่า amorphous region (Goksoyr and Eriksen , 1980) เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์หรือสารละลายด่าง แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายในกรด เมื่อสลายตัวโดยสมบูรณ์ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าการสลายตัวไม่สมบูรณ์จะได้เซลโลไบโอสซึ่งเป็นไดแซคคาไรด์และโอลิโกแซคคาไรด์อื่น ๆ

2.2 <u>เฮมิเซลลูโลส</u>

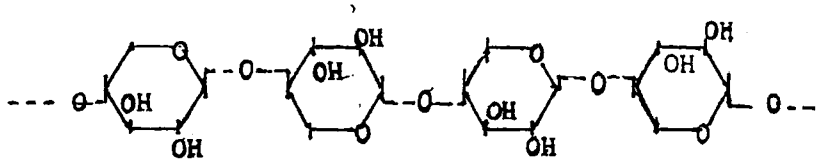
เป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก คือ ดี-ไซโลส ดี-แมนโนส ดี-กาแลคโตส และแอล-อะราบิโนส โดยมีสายโซ่ (side chain) คือ 4-O-methyl-D-glucuronic acid เชื่อมกันด้วยพันธะเบตา-กลูโคซิดิก การแบ่งชนิดของเฮมิเซลลูโลสจึงแบ่งตามชนิดของน้ำตาลได้แก่ ไซแลน แมนแนน กาแลคแทน และอะราบิแนน เป็นต้น

Goodwin และ Mercer (1972) รายงานว่า ไซแลนของพืชต่างชนิดกันมีโครงสร้างหลักเหมือนกัน จะต่างกันเฉพาะชนิด จำนวน และตำแหน่งของสายโซ่ ซึ่งมีสายโซ่ ได้แก่ ดี-ไซโลไพราโนส ฟูราโนส แอล-อะราบิโนส หรือ ดี-กลูโคโรนิก

2.2.1 ลักษณะโครงสร้างของไซแลน

ไซแลนเป็นสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรต จัดเป็นสารจำพวกเฮมิเซลลูโลส มีไซแลนเป็นองค์ประกอบประมาณ 7-30 เปอร์เซ็นต์ในผนังเซลล์ของพืช (Whistler and Smart, 1953; Kretovich, 1966; Goodwin and Mercer, 1972) ทั้งในพืชบกและพืชน้ำ (Whistler and Smart, 1953; Bjorndal, et al., 1965) มักพบอยู่รวมกับลิกนิน และเซลลูโลส (Percival, 1962) ลักษณะโครงสร้างหลักของไซแลน คือพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลส (xylopyranose) ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วย 1,4-β-linkage (Hampto, et al., 1929; Haworth, et al., 1934) มีสูตรทางเคมีคือ $(C_5H_8O_4)$ (Percival, 1962) ดังแสดงในรูปที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของไซแลน

ที่มา : Percival (1962)

คุณสมบัติทั่วไปของไซแลน คือไม่ละลายน้ำ ละลายในด่างได้ดีกว่าในกรด optical rotation มีค่าเป็นลบสูง ไม่เกิดปฏิกิริยา reduction กับ Fehling's solution (Whistler and Smart, 1953)

ผนังเซลล์ของพืชล้มลุก โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนที่เป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร อาทิเช่น ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว แกลบ ฯลฯ มีไซแลนเป็นองค์ประกอบอยู่มากที่สุดคือประมาณ 15-30 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าในผนังเซลของไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อนซึ่งมีไซแลนเป็นองค์ประกอบอยู่เพียง 20-25 เปอร์เซ็นต์ และ 7-12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Whistler and Smart, 1953)

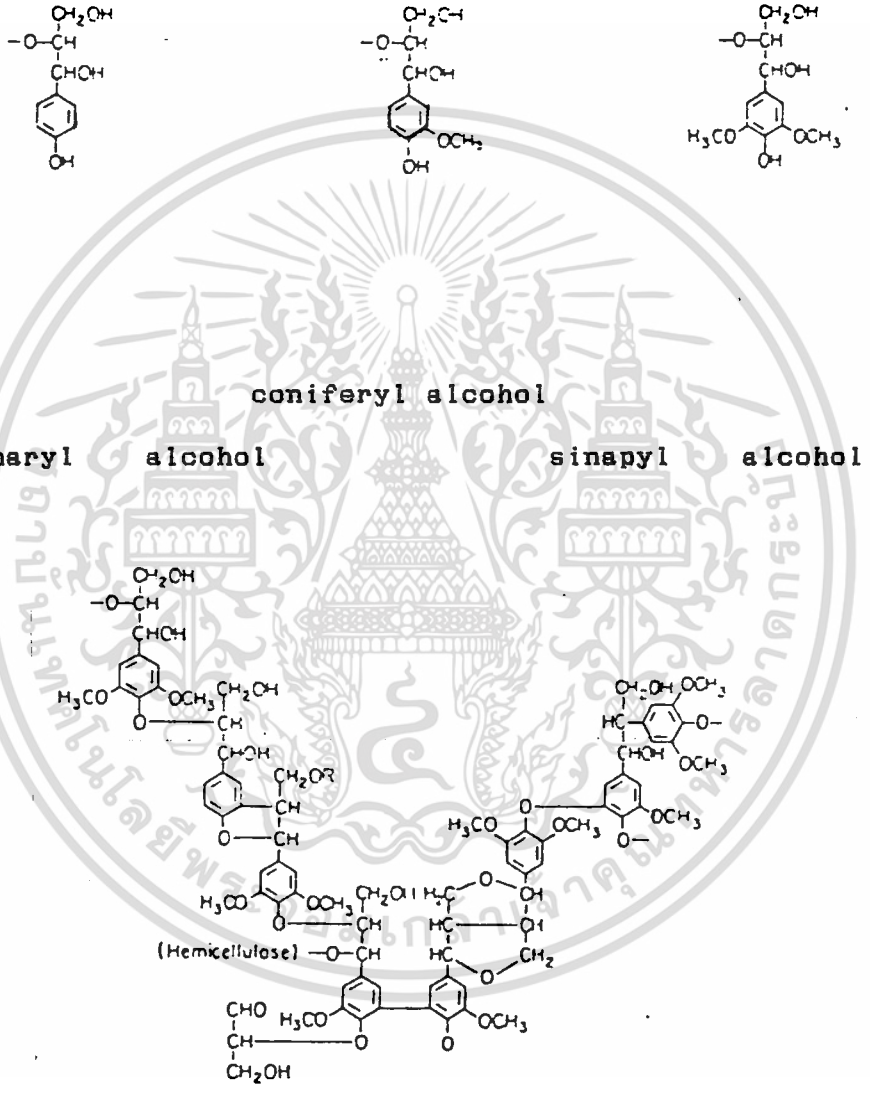
2.3 ลิกนิน

เป็นพวก polyphenylpropanoid ที่มาจากการ polymerize ของ p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol หรือ sinapyl alcohol พันธะที่พบภายในโครงสร้างหลักนั้นมีมากกว่า 10 ชนิด และพันธะที่สำคัญ คือพันธะเอสเทอร์ (C-O-C) ซึ่งจะทนต่อการถูกย่อยสลายด้วยกรด นอกจากนี้ยังพบพันธะคาร์บอน (C-C) ซึ่งทนต่อการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่าง เป็นเหตุให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง

ลิกนินมีลักษณะไม่แน่นอน (amorphus polymer) มีโครงสร้าง 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิติและไม่ตกผลึก โดยทั่วไปลิกนินไม่ละลายในน้ำ ละลายเล็กน้อยในกรด ละลายได้ดีในสภาพที่เป็นด่างและอาจถูกออกซิไดซ์ได้ในบรรยากาศ (Gottlieb and Pelczar, 1951)



รูปที่ 2 โครงสร้างของสารประกอบอะโรมาติกของลิกนินและโครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน ในรูปพอลิเมอร์ของพืชโดยทั่วไป (Kirk, 1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยเหตุที่ลิกนินเป็นโพลิเมอร์ที่ซับซ้อนและเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของพืชที่มีท่อลำเลียงทั้งหมด (Reddy, 1973; Kirk, 1975) มีหน้าที่ช่วยให้ผนังเซลล์แข็งแรง เซลล์ของพืชเกาะเข้าด้วยกันและยังทนต่อแรงกดที่ทำให้เกิดการโค้งงอ (Crawford, 1976; Janshekar and Fiechter, 1983) ลดการระเหยของน้ำที่อยู่ระหว่างเนื้อเยื่อไซเลมและผนังเซลล์ ป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อของพืชโดยจุลินทรีย์ (Sarkanen and Ludwig, 1971; Crawford, 1976; Janshekar and fiechter, 1983) เมื่อพืชถูกจุลินทรีย์ทำลายหรือเมื่อพืชมีบาดแผลเกิดขึ้นพืชจะสร้างลิกนินขึ้นมาบริเวณนั้นมากเป็นพิเศษ (Hammerschmidt and Kuc', 1982; Janshekar and Fiechter (1983)

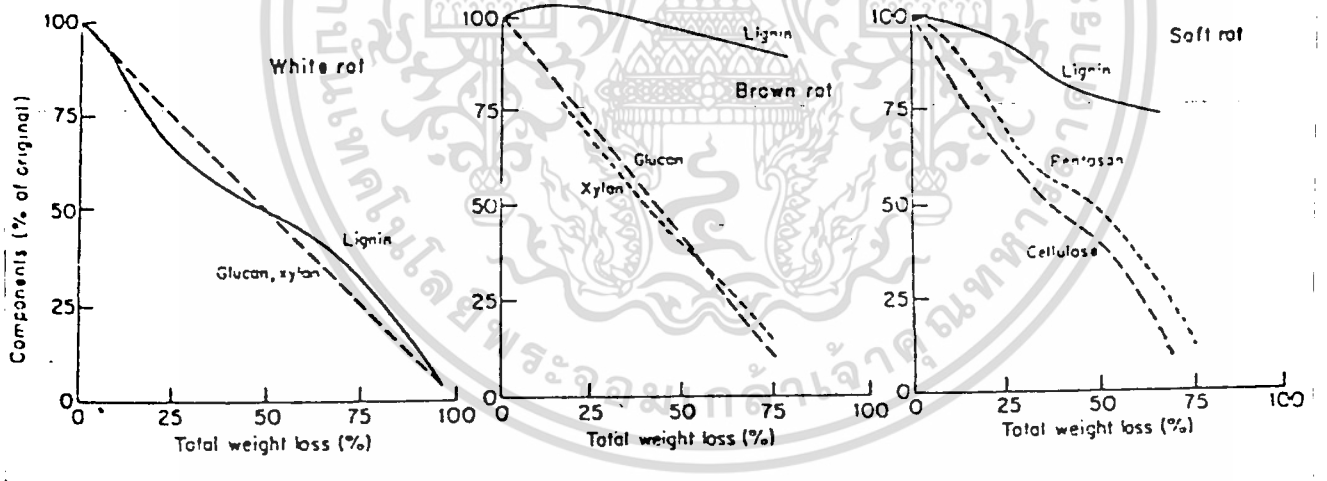
Harkin (1967) และ Harkin (1973) รายงานว่าพืชมีลิกนินเป็นองค์ประกอบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส โดยที่ส่วนของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินจะพบมากในส่วนของ middle lamella และมีปริมาณลดลงในส่วนของ secondary cell wall. Janshekar and Fiechter (1983) รายงานว่ามีหลักฐานที่แสดงว่าลิกนินเกิดพันธะโควาเลนท์กับเซลลูโลสจึงเกิดเป็นสารซับซ้อนเรียกว่า ลิกโนเซลลูโลส (Sarkanen and Luwig, 1971; Adler, 1971; Higuchi, et al., 1971; Abbott and Wicklow, 1984) ลิกนินในพืชเกิดพันธะเอสเทอร์จับกับกรดฟีโนลิก (phenolic acid) ในสารประกอบอะโรมาติกแอลกอฮอล์ (Kirk, 1983)

2.3.1 กลไกการย่อยสลายลิกนินด้วยเชื้อรา

กลุ่มของเชื้อรา class Basidiomycetes ที่ย่อยสลายลิกนินมี 3 กลุ่มคือ white rot fungi, soft rot fungi และ brown rot fungi (Cowling, 1961; Kirk and Alder, 1970; Haider and Trojanowaki, 1975; Kirk, et al., 1975; Gilbertson, 1980) โดยที่กลุ่ม white rot fungi (รูปที่ 3) ย่อยสลายลิกนินได้มากกว่าอีกสองกลุ่ม (Cowling, 1961; Savory and pinion, 1958) กลไกการย่อยสลายลิกนินของแต่ละกลุ่มแตกต่างกันไปแต่โดยหลักใหญ่แล้วมีวิธีการย่อยคล้ายกัน คือเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินทำงานเหมือนกับเอนไซม์ peroxidase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่กระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) เอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินประกอบด้วยส่วน iron porphyrin complex หรือที่เรียกว่า ฮีม (heme) เมื่อออกซิไดซ์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้วเปลี่ยนเป็นสารออกซิไดซิ่ง (oxidizing agent) สามารถดึงเอาอิเลคตรอนออกจาก phenolic ring ของลิกนิน ทำให้พอลิเมอร์ของลิกนินแตกตัวซึ่งผลจะปรากฏชัดเมื่อระดับความเป็นกรดเป็นด่างเหมาะสม (Schoemaker, et al., 1985; Harvey, et al., 1985) และเชื้อรายังมีผลต่อการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ทำให้ปริมาณของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสลดลง เช่นเดียวกับปริมาณลิกนิน (Ander and Eriksson, 1975



รูปที่ 3 ผลการย่อยสลายลิกนินของเชื้อราแต่ละชนิด (Kirk, 1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส

3.1 เอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีน มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตะโปรตีนเท่ากับ 1:1 ละลายน้ำได้ ไม่ต้องการโคแฟคเตอร์หรือโลหะอื่นในการเข้าทำปฏิกิริยา เป็นเอนไซม์เชิงซ้อนประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ส่วน ซึ่ง Enari (1983) รายงานไว้ดังนี้

3.1.1 endoglucanase (1,4-beta-D-glucan-4-glucanohydrolase; EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อย beta-1,4 glucosidic linkage แบบสุ่มได้กลูโคส เซลโลไบโอส เซลโลไตรโอส ไม่ย่อยเซลโลไบโอส แต่ย่อยเซลโลเดรกซ์ตริน เซลลูโลสที่ทำให้ฟองตัวด้วยกรดฟอสฟอริก คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) และไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (HEC) และสามารถย่อยเซลลูโลสรูปผลึก (crystalline cellulose) ได้ด้วยความจำเพาะของเอนไซม์ไม่สูงมากนัก วิเคราะห์เอนไซม์นี้ได้โดยใช้ CMC และ HEC เป็นสับสเตรท

3.1.2 cellobiohydrolase (1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase; EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้าน non-reducing end ของเส้นสาย ได้เซลโลไบโอส มีความจำเพาะสูงกว่า endoglucanase ย่อยเซลโลเดรกซ์ตรินแต่ไม่ย่อยเซลโลไบโอส การวิเคราะห์เอนไซม์นี้ใช้ลำลี อวิเซล และ amorphous cellulose เป็นสับสเตรท

3.1.3 beta-glucosidase (beta-D-glucohydrolase; EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอส และเซลโล-โอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligosaccharide) ได้กลูโคสแต่ไม่ย่อยเซลลูโลส หรือ เซลโลเดรกซ์ตริน วิเคราะห์เอนไซม์นี้โดยใช้เซลโลไบโอส p-nitrophenyl-beta-D-glucoside หรือซาลิซิน (salicin) เป็นสับสเตรท

Toussint และ Bataille (1985) รายงานว่าเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์ที่ทำกิจกรรม 3 อย่างคือ cellobiohydrolase (CBH) CX activity ซึ่งมี endo-beta-1,4 glucanase และ exo-beta-1,4 glucan glucohydrolase เพื่อที่จะย่อยเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปผลิกได้เซลโลไบโอส จากนั้น beta-glucosidase เปลี่ยนเซลโลไบโอสได้กลูโคส

3.2 <u>เอนไซม์เอมิเซลลูเลส</u>

เป็นเอนไซม์ย่อยสลายเอมิเซลลูโลส เนื่องจากโครงสร้างของเอมิเซลลูโลสเป็นกิ่งก้านสาขาและประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเอมิเซลลูโลสให้สมบูรณ์มีอยู่หลายชนิดด้วยกัน จากองค์ประกอบหลักของเอมิเซลลูโลสที่ส่วนใหญ่เป็นพวก ดี-ไซแลน ฉะนั้นเอนไซม์หลักที่มีผลต่อการย่อยสลายเอมิเซลลูโลสคือ เอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ (Rogalski, et al., 1985) คือ

3.2.1 endo-1,4-beta-D-xylanase (1,4-beta-D-xylan xylanohydolase; EC 3.2.1.8) ทำการย่อยสลายพันธะ 1,4 glucosidic ของ beta-D-xylopyranoside ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของไซแลนและให้ผลิตภัณฑ์ออกมาในรูปของไซโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์และไซโลไบโอส วิเคราะห์เอนไซม์นี้ด้วยไซแลน

3.2.2 exo-1,4-beta-D-xylosidase (1,4-beta-D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.37) ย่อยสลายไซโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์และไซโลไบโอส ออกมาได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส การทดสอบเอนไซม์นี้ใช้พี-ไนโตรฟินิล-เบตา-ดี-กลูโคไซด์ เป็นสับสเตรท

สำหรับ endo-xylanase ยังอาจแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด (Dekker and Richards, 1976) ตามความสามารถในการย่อยสลาย 1,3-α-L-arabinofuranosyl branch linkage ของ arabinoglucuronoxylan หรือ arabinoxylan ดังนี้

<1> พวกที่สามารถย่อยสลาย 1,3-α-L-arabinofuranosyl brach linkage อาทิเช่น endo-xylanase ของ *Aspergillus niger* (Haworth and Percival, 1931; Gorbacheva and Rodionova, 1977)

<2> พวกที่ไม่สามารถย่อยสลาย 1,3-α-L-arabinofuranosyl linkage อาทิเช่น endo-xylanase ของ *Streptomyces xylophagus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Lizuka and Kawaninami, 1965)

นอกจากเอนไซม์กลุ่มหลัก 2 กลุ่มใหญ่ ๆ แล้ว เพื่อให้การย่อยสลายเอมิ-เซลลูโลสสมบูรณ์ยิ่งขึ้นจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์อีกหลายชนิดได้แก่

3.2.3 D-galactanase เอนไซม์กลุ่มนี้ย่อย ดี-กาแลคแตน และแอล-อะราบิโน-ดี-กาแลคแตน

3.2.4 D-mannanase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย (1-->4) beta-D-mannanopyranosyl linkage ของ ดี-แมนแนน ดี-กลูโค-ดี-แมนแนน และดี-กาแลคโต-ดี-แมนแนน

3.2.5 acetyl esterase ในโครงสร้างหลักของเอมิเซลลูโลสตรงตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 และ 3 ของสายพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลส จะมีกลุ่มของ acetyl เกาะอยู่ ในการย่อย acetyl ออกจากสายพอลิเมอร์ของไซโลส จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ esterase เข้าช่วย

4. การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ และคุณสมบัติของเอนไซม์

4.1 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) (Gascoigne, 1960; Strobel, 1963; Kusakabe, et al., 1969; Paice, et al., 1978) แต่ก็มีบางชนิดที่เอนไซม์ที่ผลิตเป็นแบบ intracellular enzyme อาทิเช่น *Aspergillus niger* (Iwamoto, et al.,1973) *Aspergillus foetidus* (Whister and Masak, 1955) *Butyrivibrio fibrisolvens* (Clarke, et al.,1969 ; Gaillard, et al., 1975) และ *Sporocytophagus myxococcoides*

การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเริ่มผลิตในระยะ stationary growth phase ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas stutzeri* (Toh Suan EE, 1978) *Streptomyces* sp. (Nakanishi, et al., 1976a) *Aspergillus niger* (John, et al., 1979) ยกเว้น *Penicillium variabile* ซึ่ง Martinez, et al. (1974) รายงานว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสไปพร้อม ๆ กับการเจริญ

4.2 คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

โดยทั่วไปเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 50 องศาเซลเซียส แต่สำหรับพีเอชที่เหมาะสม พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสจากบัคเตรีและแอคติโนมัยซิสมีพีเอชที่เหมาะสมค่อนข้างจะเป็นกลาง แต่ของเชื้อราค่อนข้างจะเป็นกรด ส่วนความคงตัวต่อพีเอช และความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์จะต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ ดังที่ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 1

5. ประโยชน์ของเอนไซม์ไซลาเนส

เอนไซม์ทำให้น้ำผลไม้ใส ช่วยในการย่อยอาหารสัตว์ ซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าของอาหารสัตว์ มีการใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการเตรียมวัตถุดิบในการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ใช้ศึกษาคุณสมบัติของโพลีแซ็กคาไรด์และผนังของเซลล์พืช (Wong, et al., 1988) และประยุกต์ใช้ในการสกัดน้ำมันปาล์มเช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนส โดยใช้ในอัตรา 200-1000 กรัมต่อตันที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันและน้ำทิ้งโดยลดปริมาณเนื้อเยื่อพืชที่มีโมเลกุลสูง ซึ่งทำให้เกิดความหนืดหรือข้น เช่น กลูแคน (glucan) เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และเพคติน (Godfrey , 1983)

ประโยชน์อีกข้อหนึ่งของเอนไซม์ไซลาเนสคือ ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสทำให้ได้น้ำตาลไซโลส ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์และสารเคมีต่าง ๆ (Godfrey , 1983)

6. การแปรสภาพ (pretreatment) วัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส

ในการปรับปรุงคุณค่าทางอาหารของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรม มีวิธีการหลายวิธีที่จะนำมาปรับปรุงเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร ปริมาณการกิน และการย่อยได้สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง แบ่งออกเป็นวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ (Ibrahim, 1981) ดังตารางที่ 2

เนื่องจากลิกโนเซลลูโลสไม่ได้ประกอบด้วยเซลลูโลสเพียงอย่างเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 คุณสมบัติเกี่ยวกับ pH และอุณหภูมิของเอนไซม์ xylanase จากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	เอนไซม์	optimal pH	pH-stability	optimal temperature (°C)	temperature of complete thermal-inactivation (°C)
เชื้อรา					
Aspergillus foetidus (Whistler & Masak, 1955)	medium extract	3.4	-	37	-
	mycelium extract	4.5	-	37	-
	mycelium extract (F-1)	3.8	-	45	-
Aspergillus niger Str. 14 (Gorbacheva and Rodionova, 1977)		4.0	3.0-8.0	50	-
Aspergillus niger (John et al., 1974)	I_A	5.5-6.0	-	65-80	> 80
	I_B	4.0-4.5	-	65-80	> 80
	II_A	4.0	-	50	80
	II_B	4.0	-	50	80
	II_C	4.0	-	50	80
	II_D	6.0-6.5	-	50	80

ตารางที่ 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	เอนไซม์	optimal pH	pH-stability	optimal temperature (°C)	temperature of complete thermal-inactivation (°C)
Aspergillus niger (Dekker & Richards, 1976)	I	4.5	-	50	60
	II	5.5	-	50	60
	III	4.5-5.0	2.0-9.0	50	80
Aspergillus niger van Tieghem (Dekker & Richards, 1976)	I	5.5	3.5-10.0	-	60
	II	5.0	4.0-10.0	-	> 75
	III	3.5	3.0-8.0	-	> 75
Ceratocystis paradoxa (Dekker & Richards, 1976)	I	5.5	-	40	65
	II	5.1	5.0-10.0	80	100
Diplodia viticola (Strobel, 1963)		3.8	-	-	-
Fusarium roseum (Gascoigne & Gascoigne, 1960)		6.3	-	-	-
Gliocladium virens (Takahashi & Kutsumi, 1979)		6.0	4.5-7.0	45	-

ตารางที่ 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	เอนไซม์	optimal pH	pH-stability	optimal temperature (°C)	temperature of complete thermal-inactivation (°C)
Penicillium janthinellum (Takenishi & Tsujisaka, 1973)	I	5.3	5.0-8.0	-	70
	II	4.7	4.0-9.0	-	80
	III	4.7	5.0-9.0	-	80
Pericularia oryzae (Sumizu et al., 1961)	I	6.4	3.5-6.0	45	-
	II	8.1	6.0-9.5	45	-
Schizophyllum commune (Dekker & Richards, 1976)		4.8-5.4	-	-	6.5
Schizophyllum commune (Paice et al., 1978)		5.0	-	45-50	-
Trichoderma viride (Toda et al., 1971)		5.0-6.0	3.0-7.0	-	90
Trichoderma viride (Hashimoto, et al., 1971)		3.5	2.0-7.0	50	65

แต่มีสารอื่นปนอยู่ด้วย เช่น ลิกนิน เพคตินและเฮมิเซลลูโลส เป็นต้น

วิธีการแปรสภาพต่าง ๆ ได้แก่ การบด เป็นการทำให้อนุภาคของลิกโนเซลลูโลสมีขนาดเล็กลง เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวและลดปริมาณเซลลูโลสรูปผลึก (Jones, et al., 1980) วิธีทางเคมีโดยใช้กรดแก่หรือด่างแก่ NaOH ทำให้เกิดการพองตัว ทำให้ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสละลายน้ำได้ ส่วนกรดทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายน้ำได้ (Moo-Young, et al., 1978) วิธีการใช้ตัวทำละลายเพื่อกำจัดลิกนินและตัวขัดขวางที่เป็นรูปผลึกออกจากเซลลูโลส และการใช้หลายวิธีร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแปรสภาพวัตถุดิบ

ดังตารางที่ 3 ที่แสดงให้เห็นถึงวิธีการต่าง ๆ ที่ทำให้ไซแลนที่อยู่ในพืชถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น

7. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา

7.1 แหล่งคาร์บอน

Wase และคณะ (1985) เลี้ยง *Aspergillus fumigatus* IMI 255091 แบบอาหารเหลวในฟลาสก์โดยใช้ฟางข้าวบดความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1.0, 2.0, 4.0 และ 5.0 (น้ำหนักโดยปริมาตร) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ ฟางข้าวบดร้อยละ 4.0 ให้ค่ากิจกรรมของ beta-D-Glucosidase endo-1,4-beta-D-glucanase และ D-xylanase สูงสุดในวันที่ 6 หรือ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 5.88, 3.24 และ 67.65 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ

วิเชียร กิจปรีชาวนิช และคณะ (2535) พบว่าฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F และให้ผลดีกว่าการใช้ชานอ้อย ซังข้าวโพดและรำข้าวสาลี

น้อย เกษมสุขสกุล (2529) พบว่าฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus fumigatus* (Fresenius) เมื่อเปรียบเทียบกับ ผักตบชวา เปลือกมันสำปะหลัง แกลบ และขี้เลื่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 การปรับปรุงคุณค่าวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมโดยกรรมวิธีต่าง ๆ

วิธีทางกายภาพ	วิธีทางเคมี	วิธีทางชีวภาพ
การแช่น้ำ	โซเดียมไฮดรอกไซด์	การใช้เอนไซม์
การสับ,การบด	แคลเซียมไฮดรอกไซด์	การหมักด้วยเชื้อรา
การอัดเม็ด	โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์	(white-rot fungi)
การนึ่ง,การต้ม	แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	
การใช้รังสีแกมมา	ยูเรีย/แอมโมเนีย	
	โซเดียมคาร์บอเนต	
	โซเดียมคลอไรด์	
	แกสคลอรีน	
	ซัลเฟอร์ไดออกไซด์	

ที่มา : Ibrahim (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 3 วิธีการต่าง ๆ ในการทำให้ไซแลนที่เป็นองค์ประกอบของพืชในธรรมชาติถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น

วิธีการ	แหล่งของไซแลน	ประสิทธิภาพ[1/] (เปอร์เซ็นต์)	เอกสารอ้างอิง
สารเคมี			
NaOH เข้มข้น 8%	spruce wood	80	Pew and Weyna, 1962
NaOH เข้มข้น 4%	Sorgo bagasse	65	Han, 1978
NH_4OH เข้มข้น 5%	ซังข้าวโพด, ฟางข้าว เปลือกต้นโอ๊ต, ไม้เนื้อแข็ง	-	Kusakabe, et al., 1976
NH_4OH เข้มข้น 3%	ฟางข้าว	34	Weiss, et al., 1972
sulfurous acid	ขี้เลื่อย	54	Millett, et al., 1975
วิธีทางกายภาพ			
การทำให้ขนาดของอนุภาคเล็กลง	ชานอ้อย	-	Han & Callihan, 1974
การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง	ไม้เนื้อแข็ง	-	John, et al., 1979
การฉายรังสีแกมม่า	ฟางข้าว, ไม้	-	Millett, et al., 1970
การฉายรังสีอุลตราไวโอเลต	ryegrass straw	-	Park, 1970
สารเคมีร่วมกับวิธีทางกายภาพ			
NaOH เข้มข้น 10% ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (1 ชม.)	ฟางข้าว	-	Okada, et al., 1980

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25406

ตารางที่ 3 <ต่อ>

วิธีการ	แหล่งของไซแลน	ประสิทธิภาพ [1/] (เปอร์เซ็นต์)	เอกสารอ้างอิง
NaOH เข้มข้น 4% ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที	ฟางข้าวและชานอ้อย	53	Han, 1978
NaOH เข้มข้น 2% ที่อุณหภูมิ 30, 50, และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 360, 60 และ 20 นาที	ซังข้าวโพด	-	Kusakabe, et al., 1976
NaOH เข้มข้น 0.4% ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที	ชานอ้อย	-	Martinez, et al., 1974
KOH เข้มข้น 10% ร่วมกับการทำให้ขนาดเล็กลง	ผลอุ่น	-	Strobel, 1963

- ไม่ได้ทำการศึกษาว่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นกี่เปอร์เซ็นต์

[1/] ประสิทธิภาพในการย่อยสลายโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kinoshita และคณะ (1983) พบว่าอัตราส่วนรำข้าวต่อฟางข้าว เท่ากับ 4:6 ขี้เลื่อยต่อรำข้าว เท่ากับ 1:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Aspergillus* sp.

Prasertsan และ Ooi (1992) เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมระหว่างกากปาล์มและเส้นใยปาล์มต่อการผลิตเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* พบว่ากากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมกว่า โดยให้ค่าแอคติวิตี้สูงสุดของ CMCase, xylanase และ beta-glucosidase เท่ากับ 75.5, 1.156 และ 0.79 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ

Storbel (1963) ศึกษาและรายงานว่า *Diplodia viticola* จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสก็ต่อเมื่อมีไซแลน เซลลูโลส ไซโลส หรือ อะราบิโนส เป็นแหล่งคาร์บอน แต่จะไม่ผลิตเมื่อมีกลูโคสหรือเซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน

Cheah และคณะ (1988) ผลิตเซลลูเลสจากกากปาล์ม โดยเลี้ยงเชื้อรา cf-27 ในอาหารเหลวและอาหารแข็ง พบว่าเชื้อนี้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในขณะที่ *T. reesei* สายพันธุ์ QM 9414, MCG 77, และ Rut C-30 สามารถผลิตเซลลูเลสและไซลาเนสได้สูงระหว่างการเจริญบนกากปาล์ม

Shewale และ Sadana (1978) พบว่า การเติมกลูโคสร้อยละ 0.01-0.02 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยในการเจริญของเชื้อในช่วงต้นแต่ไม่เพิ่มการผลิตเอนไซม์

Cheah และ Ooi (1984) พบว่าการใช้กลูโคสร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อรา cf-27 พบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะถูกยับยั้ง

ขณะเดียวกันก็มีผู้รายงานว่าพบเชื้อราหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้เมื่อเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ดังที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	เอกสารอ้างอิง
Chrysosporium lignorum	cellulose	Eriksson & Rzedowski, 1969
Diplodia viticola	L-arabinose D-xylose cellulose	Strobel, 1963
Stereum sanguinolentum	cellulose	Bucht & Eriksson, 1968
Trichoderma viride	Sophorose	Nisizawa, 1971

7.2 แหล่งไนโตรเจน

Coutts และ Smith (1976) เลี้ยงเชื้อ *Sporotrichum thermophile* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ $NH_4H_2PO_4$, $NaNO_3$, NH_4NO_3 และยูเรีย พบว่า $NaNO_3$ และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และ $NaNO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.4 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสไม่แตกต่างกัน

Raimbault และ Alazard (1980) หมัก *A. niger* ในแป้งมันสำปะหลังโดยใช้ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ายูเรียในอัตราส่วนร้อยละ 40-50 ของไนโตรเจนทั้งหมดจะกระตุ้นการเจริญของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รา ซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างโปรตีน การใช้คาร์โบไฮเดรตมีมากขึ้นเมื่ออัตราส่วนของยูเรียเพิ่มขึ้น และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้มีผลต่อพีเอช คือการใช้เกลือแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เมื่อเชื้อราเจริญจะเกิดกรดอย่างรวดเร็ว ทำให้การเจริญหยุดชะงัก

Barker และคณะ (1981) เลี้ยง *Aspergillus oryzae* ในน้ำทิ้งจากการอบทะลายปาล์มและสลัดจ์ เติม $(NH_4)_2SO_4$ ลงไปเพื่อให้ได้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เติมเท่ากับ 20:1 และอัตราส่วนทั้งหมดของคาร์บอนต่อไนโตรเจนประมาณ 14:1 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยไม่มีการควบคุมพีเอช ได้เซลล์ที่มี crude protein ร้อยละ 39.6

Joglekar และ Karanth (1984) เลี้ยง *Aspergillus funiculosum* UV-49 ในอาหารเหลว พบว่ายูเรียและ $NaNO_3$ (ไนโตรเจน 0.5 กรัมต่อลิตร) ดีกว่า $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4NO_3 และดีกว่าเคซีนและเปลือกถั่วลิสง หากเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนมากกว่า 0.5 กรัมต่อลิตร พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ไนโตรเจนอินทรีย์ ส่วนการใช้ไนโตรเจนอินทรีย์กิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 1-1.2 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามการเพิ่มไนโตรเจนเป็นการเพิ่มต้นทุน และไนโตรเจนมากกว่า 2 กรัมต่อลิตรจะเพิ่มปัญหา คือทำให้ค่าพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูงซึ่งไม่เหมาะในการผลิตเอนไซม์

Gomes และคณะ. (1989) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Gliocladium virens* พบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ดีที่สุด คือ bacto-peptone เข้มข้นร้อยละ 0.2 อาจจะเนื่องมาจากมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตเซลลูเลสของเชื้อ และถ้าความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 0.4 จะยับยั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์

เบญจวรรณ ชิตมณี (2534) พบว่าการใช้ NH_4NO_3 เข้มข้นร้อยละ 0.02 ร่วมกับโปรติโอสเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.025 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการใช้ NH_4NO_3 เพียงอย่างเดียว ในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเชื้อ *Cladosporium* sp.

ตารางที่ 5 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อกิจกรรมเซลลูเลสของ *Penicillium funiculosum* UV-49

Nitrogen source	Activities	Activity at given time period		
		7 day (IU/ml)	10 day (IU/ml)	13 day (IU/ml)
$(NH_4)_2SO_4$	CMCase	6.0	4.0	7.0
	FPA	0.3	0.5	0.6
Urea	CMCase	10.7	10.0	17.5
	FPA	0.6	1.4	1.2
NH_4NO_3	CMCase	7.0	6.4	8.0
	FPA	0.5	0.7	0.7
$NaNO_3$	CMCase	9.3	11.2	15.0
	FPA	0.8	1.0	1.1
Casein	CMCase	14.0	12.8	16.0
	FPA	0.8	1.1	0.8
Groundnut-cake	CMCase	11.0	7.0	10.7
	FPA	0.5	0.8	0.7

ที่มา : Joglekar and Karanth (1984)

7.3 เกลือแร่

Desrochers และคณะ (1981) ทดสอบผลของความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ร้อยละ 0.13, 0.20 และ 0.27 ต่อการผลิต เบตา-กลูโคซิเดส ของเชื้อ *Schizophyllum commune* พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือร้อยละ 0.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gomes และคณะ (1989) พบว่าความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ที่เพิ่มการผลิตเซลลูเลสของเชื้อ *G. virens* คือร้อยละ 1.0

7.4 พีเอช

พีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การหมักในระยะแรก พีเอชของการเลี้ยงเชื้อเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชเปลี่ยนแปลง อาจเกิดจากการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่น ๆ ออกมา หรือมีการย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์ขึ้น เป็นผลให้พีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อควบคุมให้พีเอชในอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ บัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา

Mendel และ Weber (1969) และ Neudoerffer และ Smith (1970) รายงานว่าค่าพีเอชที่เป็นด่างและเป็นกลางไม่เป็นที่ต้องการสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา เพราะการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีปริมาณสูงภายใต้สภาวะที่เป็นกรด และพีเอชที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 6

Lonsane และคณะ (1985) รายงานการควบคุมพีเอชในอาหารแข็งมักไม่ค่อยทำกัน มักใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ที่ดี และใช้ประโยชน์จากการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารแข็งให้อยู่ในช่วง 4.5-5.0 ในขณะที่ปรับปริมาตรความชื้นให้ได้ตามต้องการ และ Lonsane และคณะ (1992) กล่าวว่าการควบคุมพีเอชในช่วงของการหมัก มักใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมากกว่าเกลือแอมโมเนีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

จุลินทรีย์	พีเอชที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus fumigatus IMI 246651	6.0	Stewart & Parry (1981)
Aspergillus terreus	5.0	D-souza, et al.(1982)
Aspergillus fumigatus IMI 255091	5.0	Wase,et al. (1985)
Penicillium funiculosum UV-49	4.5	Joglekar & Karanth (1984)
Trichoderma reesei	5.8	Chahal (1985)
Trichoderma reesei D1-6 และ *Aspergillus wentii* Pt 2804	4.8	Panda (1989)

7.5 อุณหภูมิ

ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทลงสู่อาหาร ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่งที่จุลินทรีย์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ ดังนั้นในกระบวนการหมักต่าง ๆ จึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ *A. niger* ในการหมักอาหารแข็งที่มีมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทอยู่ระหว่าง 35-40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงจะยับยั้งการงอกของสปอร์ แต่ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญของไมซีเลียม (Raimbault and Alazard, 1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stewart และ Parry (1981) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการผลิต exo- และ endoglucanase ของเชื้อ *A. fumigatus* IMI 246651 คือ 35-45 องศาเซลเซียส และจากการเลี้ยงเชื้อ *A. niger* JB 1984 พบว่าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 48 ชั่วโมงแรก จากนั้นจะลดลง และอัตราการสร้างโปรตีนสูงในระหว่าง 48 ชั่วโมงแรกของการหมักเช่นกัน นั่นคือการสร้างโปรตีนที่สูงจะทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งเกิดจากเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ (Essifie,et al. , 1986)

Gomes และคณะ (1982) รายงานถึงระดับความเหมาะสมของอุณหภูมิต่อการผลิต FPase, xylanase และ beta-glucosidase สูงสุดที่อุณหภูมิ 32, 34 และ 31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

7.6 ปริมาณความชื้น

ความชื้นเป็นตัวควบคุมและทำให้กระบวนการหมักแบบอาหารแข็งดำเนินไปได้ ความชื้นที่มากเกินไปทำให้สับสเตรทอัดกันแน่น ป้องกันการแทรกซึมของออกซิเจน และทำให้เกิดการปนเปื้อนโดยแบคทีเรียที่เจริญได้เร็ว ความชื้นที่น้อยจะยับยั้งการเจริญ กิจกรรมของเอนไซม์และการนำไปใช้ประโยชน์ได้ (accessibility) ของสารอาหาร

Raimbault และ Alazard (1980) ศึกษาผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นในการหมักแบบอาหารแข็งต่อการเจริญของไมซีเลียมของเชื้อ *A. niger* โดยใช้ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 35-60 พบว่าปริมาณความชื้นร้อยละ 55 ทำให้การเจริญและการสร้างโปรตีนสูงสุด รองลงมาคือปริมาณความชื้นร้อยละ 60 แสดงให้เห็นว่าน้ำที่เพียงพอมีความจำเป็นต่อการพัฒนาที่ดีของเชื้อรา แต่ถ้าน้ำมากเกินไปจะลดรูพรุนและการพาออกซิเจนในมวลสารน้อยลงและอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนโดยแบคทีเรียได้

Battaglino และคณะ (1991) ศึกษาผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นต่อการเจริญของ *A. oryzae* NRRL 2160 โดยใช้สับสเตรท 10 กรัม (แกลบ : รำข้าว เท่ากับ 7:3) บรรจุฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 27 องศาเซลเซียส สำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่าปริมาณความชื้นมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงสุดที่ความชื้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 35-40 โดยสัมพันธ์กับค่า water activity (Aw) เท่ากับ 0.982-0.986 และความชื้นที่มากเกินไปมีผลให้เอนไซม์โปรติเอสที่ได้ลดลง

7.7 <u>ปริมาณเชื้อเริ่มต้น</u> (inoculum size)

Battaglino และคณะ (1991) ศึกษาขนาดของเชื้อเริ่มต้น (10^4 , 10^5 และ 10^6 สปอร์/กรัมสับสเตรท) ต่อการเจริญของเชื้อ *A. oryzae* ในอาหารแข็ง (แกลบ : รำข้าว เท่ากับ 7:3) พบว่าการเพิ่มขนาดของเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^6 สปอร์/กรัมสับสเตรท ทำให้ผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Ofuya and Ukpong (1988) ที่รายงานว่าความเข้มข้นของอะไมเลส เซลลูเลส และอะไมโลกลูโคซิเดสเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 4 เท่า เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นจาก $7x10^4$ เป็น $3.5x10^5$ เซลล์

Joglekar และคณะ (1983) เลี้ยง *Penicillium funiculosum* ในถังหมัก พบว่าการเจริญจะเกิดขึ้นรวดเร็วในถังหมักและมีผลให้เกิดมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นหนาแน่นภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งความหนืดของน้ำเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นตามเวลาและมีค่าสูงสุดที่ 72-96 ชั่วโมง จากนั้นลดลง การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มเร็วมากในช่วงเวลา 24-72 ชั่วโมง โดยจะให้ค่า exo-endo-beta-D-glucanase และ beta-glucosidase ภายใน 72 ชั่วโมง เป็น 3, 26 และ 9 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ

Gomes และคณะ (1989) เลี้ยง *G. virens* ในฟลาสก์เพื่อการผลิตเซลลูเลสและไซลาเนสในฟางข้าวสาลีที่ผ่านการแปรสภาพด้วยไอน้ำ พบว่าเริ่มมีการสังเคราะห์เอนไซม์ภายใน 24 ชั่วโมงของการบ่ม การเปลี่ยนแปลงพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังการบ่ม 1 วัน และลดลงในวันที่ 2 วันที่ 3 ไมซีเลียมจะเกิดการสลายตัวเอง (autolysis) ปลดปล่อยเอนไซม์ลงสู่อาหาร พีเอชเพิ่มขึ้น ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง คือ 5-6 วัน ส่วนการเลี้ยงในถังหมัก พบว่าระยะเวลาการปรับตัว (lag phase) ของเชื้อลดลง การใช้แอมโมเนียและการลดลงของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (ลิกโนเซลลูโลสกับไมซีเลียม) ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก และลดลงช้ามากหรือหยุดในช่วงที่มีการเจริญคงที่ และการใช้ลิกโนเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก็ช้าด้วย ซึ่งอาจเนื่องมาจากการมีน้ำตาลอิสระ ทำให้เกิดการยับยั้ง หรือเนื่องมาจากการขาดสารอาหารในการเลี้ยงเป็นผลให้การเจริญของเชื้อราช้าและการลดการใช้เซลลูโลส และจากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะได้ค่า FPase beta-glucosidase และ xylanase 0.33, 1.52, 30.45 ยูนิต ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงในถังหมักได้ FPase, beta-glucosidase และ xylanase เป็น 0.25, 0.77 และ 24.04 ยูนิต ตามลำดับ

Gomes และคณะ (1989) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ FPase, CMCase และ xylanase สูงสุดใน *T. reesei* MCG 77 แต่กิจกรรมของ beta-glucosidase ของ *A.terreus* และ *A. niger* สูงกว่าของ *T. reesei* MCG 77 3.2 และ 1.2 เท่า ตามลำดับ (ตารางที 7) ถึงแม้ว่า *T. viride*, *G. virens* และ *Aspergillus* ทั้งสองสายพันธุ์จะผลิต FPase ได้น้อย แต่สามารถผลิต CMCase, beta-glucosidase และ xylanase ได้มากพอควร เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยไม่มีการควบคุมพีเอช พบว่าค่าของพีเอชในทุกเชื้อ ยกเว้น *T. phaseolina* ลดลงรวดเร็วจนถึงวันที่ 2 หรือ 3 จากนั้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่พีเอชของ *T. phaseolina* เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ตลอดการเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักแห้งทั้งหมดลดลงในระหว่างการหมักของทุกเชื้อและลดลงมากที่สุดใน *T. reesei* MCG 77 ลดลงน้อยสุดใน *A. niger* และ *T. phaseolina* ปริมาณโปรตีนมากที่สุดใน *T. reesei* MCG 77 ในทุกขั้นตอนของการหมัก โดยการผลิตจะเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 2-3 โดยหลังจากวันที่ 4 ปริมาณโปรตีนจะไม่มีการผลิตเพิ่มขึ้นในเชื้อ *T. viride*, *T. harzianum* และ *G. virens* สันนิษฐานว่าอาจจะขาดสารอาหารบางอย่างในการเลี้ยงเชื้อเนื่องจากการเจริญอย่างรวดเร็วของไมซีเลียม

8. ลักษณะของเชื้อแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลอง

8.1 *Aspergillus niger* ATCC 6275 สปอร์ของเชื้อชนิดนี้มีสีดำเข้ม สปอร์มีลักษณะฟูมาก เมื่อปล่อยทิ้งไว้อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 กิจกรรมเซลลูเลสและเอมิเซลลูเลสของเชื้อรา

Organism	days	FPase	CMCase	beta-glucosidase	xylanase	soluble protein	pH
		(IU/ml)	(IU/ml)	(IU/ml)	(IU/ml)	(IU/ml)	
T. reesei MCG 77	6	1.07	4.20	0.94	27.29	1.50	5.55
T. viride	6	0.19	2.85	0.81	19.87	0.43	5.49
T. harzianum	6	0.17	2.47	0.58	19.44	0.35	5.25
G. virens	4	0.15	2.30	0.49	16.96	0.35	5.13
	6	0.14	1.87	0.84	14.39	0.26	5.26
A. terreus	6	0.29	3.25	3.03	10.83	0.43	5.50
A. niger	6	0.03	1.37	1.16	4.99	0.45	4.95
T. phaseolina	6	0.04	1.49	0.46	5.09	0.23	5.64

ที่มา : ดัดแปลงจาก Gomes และคณะ (1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.2 *Trichoderma reesei* ATCC 13631 สปอร์มีสีเขียวปนเหลือง ไม่ค่อยฟู เมื่อเจริญเติบโตจะเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเขียวเหลือง ๆ

8.3 *Myrothecium verrucaria* UPPC 3345 สปอร์มีสีขาวปนดำ โดย ในช่วงแรกของการเจริญจะมีสีขาว ต่อมาก็จะมีสปอร์สีดำปนเขียวขึ้นประปนอยู่ด้วย ลักษณะของสปอร์ไม่ฟูมาก และไม่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

8.4 *Sporotrichum pulverulentum* สปอร์มีสีขาวขุ่นขึ้นหนาแน่นมาก มีลักษณะฟู เจริญเติบโตเร็วและไม่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกชนิดของเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

วัตถุดิบ

ฟางข้าวที่ใช้ในการทดลองได้มาจากพื้นที่เกษตรกรรมที่ทำนาข้าวในท้องที่ใกล้ๆ ลาดกระบัง บดฟางข้าวด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ (ของภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) และร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาดไม่เกิน 0.25 มม. เก็บในภาชนะที่ปิดมิดชิดที่อุณหภูมิห้อง

ฟางข้าวมีส่วนประกอบ 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นเนื้อเซลล์ (cell content) 21 เปอร์เซ็นต์ และผนังเซลล์ (cell wall) 79 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผนังเซลล์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเซลลูโลส 33 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 26 เปอร์เซ็นต์ ลิกนิน 7 เปอร์เซ็นต์ และซิลิกา 13 เปอร์เซ็นต์ (Jacksun, 1977)

จุลินทรีย์

1. *Aspergillus niger* ATCC 6275
2. *Trichoderma reesei* ATCC 13631
3. *Myrothecium verrucaria* UPCC 3345
4. *Sporotrichum pulverulentum* DMMU

ซึ่งเชื้อราทั้ง 4 ชนิดนี้ได้มาจากสถาบันวิจัยและเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพ ฯ เก็บรักษาเชื้อในหลอดอาหารวุ้นเอียง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6-7 วัน เพื่อให้เกิดสปอร์เต็มที่ แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุก ๆ เดือน และนำสปอร์มาใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมลงในฟางข้าวในการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก) ประกอบด้วย โพลีเปปโตน 1.0 กรัม ยีสต์-สกัด 0.5 กรัม โปรตีโอสเปปโตน 0.5 กรัม และกลูโคส 2.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชเป็น 6.0

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ และโปรตีน (ภาคผนวก ข)

อุปกรณ์

เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง

เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เครื่องเขย่า

เครื่องเหวี่ยง

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และกล้องจุลทรรศน์

เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

เครื่องบดอาหารสัตว์

การวิเคราะห์

1. การนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา เจือจางตัวอย่างของเชื้อเริ่มต้นด้วยน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 เข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หยดตัวอย่างลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ และนับจำนวนสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์ ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร เพื่อเติมสารละลายสปอร์ 1 มล. ในสับสเตรต 5 กรัม

2. ค่าพีเอช นำอาหาร 5 กรัมใส่ในบิกเกอร์ เติมน้ำ 10 มล. คนให้เข้ากัน และวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช

3. ความชื้น (A.O.A.C., 1984) ชั่งตัวอย่างให้มีน้ำหนักแน่นอน อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสข้ามคืน (16 ชั่วโมง) (ภาคผนวก ข)

4. กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ตามวิธีของ Tang และคณะ (1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มล. ผสมกับ 0.5 มล.ของสารละลายไซแลน เข้มข้นร้อยละ 1.0 ในซิเตรตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid reagent (DNS) ลงไป 3 มล. ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นโดยใช้น้ำก๊อก เติมน้ำกลั่น 6 มล. ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร เทียบค่าไซโลสจากกราฟมาตรฐาน (ดังรูปผนวกที่ ข1) ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จะมีชุดควบคุมซึ่งเติมสารละลายต่าง ๆ เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว แต่ไม่บ่ม โดยจะเติมสารละลาย DNS 3 มล.ลงไปทันที นำไปต้มและทำตามวิธีข้างต้น นำค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมไปหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการใช้สารละลายเอนไซม์ก่อนการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ สำหรับ blank จะใช้น้ำกลั่น 1 มล. แทนปริมาตรของตัวอย่าง

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสให้มีหน่วยเป็น ยูนิต/กรัม (ดูตัวอย่างในภาคผนวก ข) โดยใช้สูตร

$$\text{ยูนิต/กรัม} = \frac{\text{ยูนิต/มล.} \times (\text{ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์} + \text{ปริมาตรน้ำที่เหลือหลังปรับความชื้น})}{\text{น้ำหนักฟางข้าวเริ่มต้น (กรัม)}}$$

5. ปริมาณโปรตีน วิเคราะห์ตามวิธีของ Lowry,et al.,(1951)

นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสมมา 0.1 มล. ผสมกับ 0.5 นอร์มัล NaOH 0.9 มล. ต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นเติมน้ำยาเคมี (ที่ผสมระหว่าง 5 % Na_2CO_3 30 มล. กับ 0.5 % $CuSO_4.5H_2O$ ใน 1% sodium potassium tartrate 2 มล.) ลงไป 2.5 มล. ทิ้งไว้ 10 นาที เติมน้ำยาเคมี (ผสมระหว่าง Folin-Ciocaltens Phenol reagent 1 มล. กับน้ำกลั่น 2 มล.) ลงไป 0.5 มล. เขย่าทันที ทิ้งไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร เทียบค่าโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน (ดังรูปผนวกที่ ข2)

วิธีการ

1. การคัดเลือกชนิดของเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

1.1 เตรียมอาหารในการเลี้ยงเชื้อราแบบอาหารแข็ง (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก) เติมลงในฟางข้าว 5 กรัม ที่บรรจุอยู่ในฟลาสต์ขนาด 250 มล. โดยให้มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่อฟางข้าว 5 กรัม

1.2 เลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิดในฟลาสต์ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรข้อ (1.1) โดยปิเปตสารละลายของเชื้อเริ่มต้นที่มีความเข้มข้น 10^7 สปอร์ ลงไป 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง ชุดการทดลองละ 2 ฟลาสก์ สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดเมื่อเชื้อราเจริญเต็มที่แล้ว ให้เริ่มสุ่มตัวอย่างทุก ๆ วัน เป็นเวลา 4 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดเอนไซม์ โดยใช้น้ำกลั่นที่มีส่วนผสมของ Tween 80 เข้มข้นร้อยละ 0.1 (อารี กังแฮ, 2536) นำสารสกัดเอนไซม์ที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ปัจจัยต่าง ๆ ที่ศึกษามีดังนี้

2.1 <u>ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน</u>

ศึกษาผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบผลของการใช้อินทรีย์ไนโตรเจน 2 ชนิด คือ รำข้าว และ ยูเรีย โดยเติมแต่ละชนิดในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ รำข้าว ใช้อัตราส่วนดังนี้ ฟางข้าว : รำข้าว เท่ากับ 4:1, 3:1, 2:1 และ 1:1 ยูเรียใช้อัตราร้อยละ 0, 1.0, 2.0 และ 3.0 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 <u>ปริมาณความชื้นเริ่มต้น</u>

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมชนิด และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้แล้ว โดยศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นเริ่มจากร้อยละ60, 70 และ 80 ตามลำดับ

2.3 <u>พีเอชเริ่มต้น</u>

ศึกษาผลของพีเอช โดยทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแหล่งไนโตรเจน และปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่คัดเลือกได้แล้ว เป็น 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ตามลำดับในขั้นตอนการปรับความชื้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกชนิดของเชื้อราที่มีความสามารถสูงในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลของการเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิดได้แก่ *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Trichoderma reesei* ATCC 13631, *Myrothecium verrucaria* UPCC 3345 และ *Sporotrichum pulverulentum* DMMU ในสภาพอาหารแข็ง โดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิห้อง พบว่ามีเชื้อราเพียงชนิดเดียวที่สามารถเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณเส้นใยบนฟางข้าวได้ คือ *S. pulverulentum* โดยมีลักษณะของเส้นใยเป็นสีขาวกระจายอยู่ทั่วบริเวณพื้นที่ผิวของฟางข้าว เมื่อนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าเชื้อให้ค่ากิจกรรม xylenase สูงสุดเท่ากับ 0.6498 ยูนิต/กรัม หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 13 วัน การที่เชื้อราที่เหลืออีก 3 ชนิด ได้แก่ *A.niger* ATCC 6275, *T. reesei* ATCC 13631 และ *M. verrucaria* UPCC 3345 ไม่สามารถเจริญได้ ทั้งที่เชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้เช่นกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเชื้อเหล่านี้มีความสามารถย่อยสลายลิกนินซึ่งเป็นส่วนประกอบของฟางข้าวในส่วนของผนังเซลล์ได้น้อยจึงทำให้เชื้อเหล่านี้ไม่สามารถใช้สับสเตรตได้อย่างเต็มที่เป็นเหตุให้เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ แต่ถ้าหากมีการทำการแปรสภาพ ด้วยวิธีอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น การใช้สารเคมี กรด หรือด่าง เป็นต้น อาจจะทำให้ลิกนินถูกย่อยสลายได้ดีขึ้น มีการแตกตัวของคาร์บอนระหว่างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Klopfenstein, 1978) ทำให้เฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ซึ่งมีไซแลนเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยละลายได้มากขึ้น ก็จะทำให้เชื้อเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณเส้นใยบนฟางข้าวได้เช่นกัน แต่จะมากหรือน้อยทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4 ลักษณะภายในของตู้บ่มเชื้อที่ใช้ในการทดลอง โดยเป็นตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 5 ลักษณะของการเลี้ยงเชื้อราแบบอาหารแข็งในฟลาสก์ที่อยู่ในตู้บ่ม โดยมีถุงพลาสติกคลุมปิดปากขวดฟลาสก์เพื่อกันความชื้นระเหยออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 6 ลักษณะของการเจริญเติบโตของเชื้อ *Sporotrichum pulverulentum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 7 ลักษณะของสารละลายเอนไซม์ที่เก็บได้หลังจากที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ของเชื้อ *S. pulverulentum* ที่คัดเลือกได้จากข้อที่ (1)

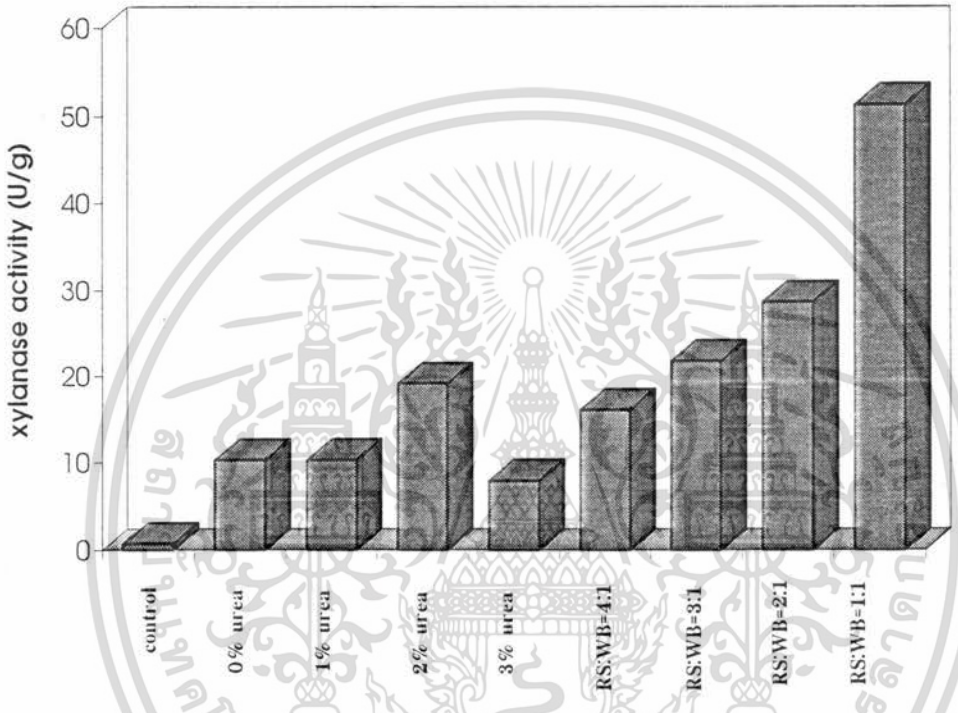
2.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้รำข้าวสาลีหรือยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เปรียบเทียบผลกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก (ชุดควบคุม) ซึ่งมีไนโตรเจน 3 ชนิด เป็นองค์ประกอบ คือ โพลีเปปโตน ยีสต์สกัด และโปรตีโอสเปปโตน (ดังรูปที่ 1) พบว่าค่ากิจกรรมไซลาเนส เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของรำข้าวสาลีและยูเรียที่เพิ่มขึ้นแต่จากการสังเกตการเจริญของเชื้อในการใช้ยูเรียร้อยละ 3 (7.9109 ยูนิต/กรัม) พบว่าค่ากิจกรรมไซลาเนสมีค่าลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าการเพิ่มไนโตรเจนมากเกินไป อาจทำให้ค่าพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูงซึ่งไม่เหมาะในการผลิตเอนไซม์ (Joglekar and Karanth, 1984) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างรำข้าวสาลีกับยูเรียพบว่าการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่า โดยมีค่ากิจกรรมไซลาเนส (51.2197 ยูนิต/กรัม) สูงสุด เมื่อใช้รำข้าวสาลีในอัตราส่วน ฟางข้าว : รำข้าวสาลี เท่ากับ 1:1 ส่วนค่ากิจกรรมไซลาเนสที่สูงรองลงมาได้จากการใช้ ฟางข้าว : รำข้าวสาลี ในอัตราส่วน 2:1 (28.5310 ยูนิต/กรัม), ฟางข้าว : รำข้าวสาลี ในอัตราส่วน 3:1(21.7144 ยูนิต/กรัม) และฟางข้าว : รำข้าวสาลี ในอัตราส่วน 4:1 (16.0071 ยูนิต/กรัม) ตามลำดับ

2.2 ความชื้นเริ่มต้น

ผลของความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ 60, 70 และ 80) ต่อการผลิตเอนไซม์ของ *S. pulverulentum* DMMU (ดังรูปที่ 2) พบว่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ให้ค่ากิจกรรมไซลาเนส สูงสุด (56.8479 ยูนิต/กรัม) หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน ส่วนค่ากิจกรรมไซลาเนสที่สูงรองลงมาได้แก่ การใช้ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 (38.8357 ยูนิต/กรัม) และ 70 (36.7747 ยูนิต/กรัม) ซึ่งจะพบว่าที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 และ 70 ค่ากิจกรรมไซลาเนส ที่ได้ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจากการทดลองนี้ความชื้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

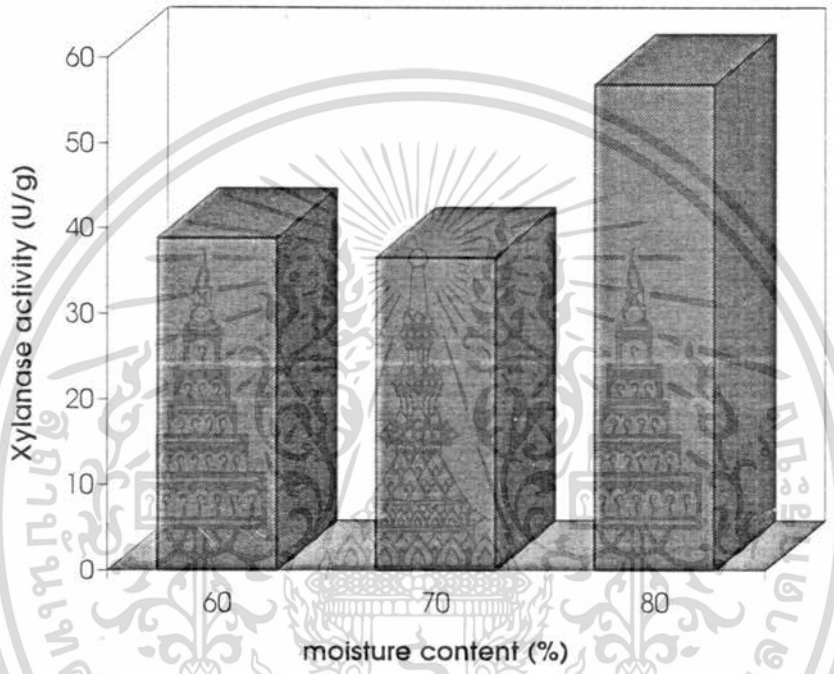


รูปที่ 1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *S. pulverulentum* DMMU ที่เลี้ยงแบบอาหารแข็งในฟางข้าว เป็นเวลา 12 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

control ฟางข้าว + อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก

RS : WB ฟางข้าว + รำข้าวสาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *S.pulverulentum* DMMU ที่เลี้ยงแบบอาหารแข็งในฟางข้าวเป็นเวลา 12 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

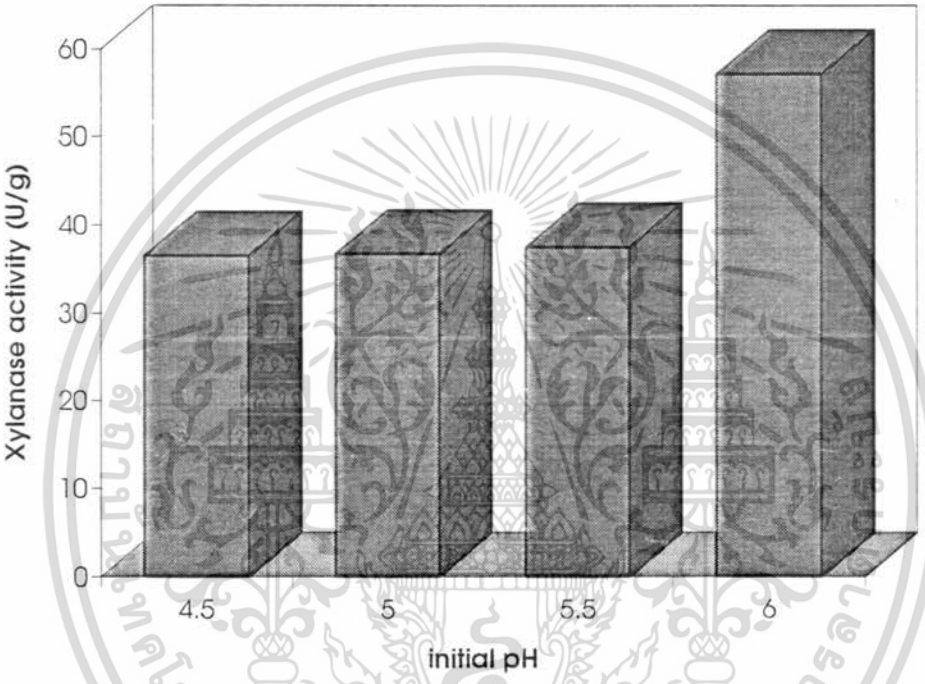
เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ของ *S. pulverulentum* DMMU ในฟางข้าว คือ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80

2.3 พีเอชเริ่มต้น

ผลของพีเอชเริ่มต้น (4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0) ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *S. pulverulentum* DMMU (ดังรูปที่ 3) พบว่าการใช้พีเอชเริ่มต้น 6.0 ให้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุด (57.1054 ยูนิต/กรัม) หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 13 วัน ค่ากิจกรรมไซลาเนสที่สูงรองลงมา คือที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 (37.5154 ยูนิต/กรัม), พีเอช 5.0 (36.7432 ยูนิต/กรัม) และพีเอช 4.5 (36.5047 ยูนิต/กรัม) ตามลำดับ ดังนั้นจากการทดลองนี้พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *S. pulverulentum* DMMU ในฟางข้าว คือที่พีเอชเริ่มต้น 6.0

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *S. pulverulentum* DMMU ที่เลี้ยงแบบอาหารแข็งในฟางข้าวเป็นเวลา 13 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุป

จากการใช้ฟางข้าวซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นสับสเตรตในการเลี้ยงเชื้อราทั้ง 4 ชนิดได้แก่ *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Trichoderma reesei* ATCC 13631, *Myrothecium verrucaria* UPCC 3345 และ *Sporotrichum pulverulentum* DMMU แบบอาหารแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์ โดยเติมสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก ลงในฟางข้าว 5 กรัม ที่ผ่านการบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.25 มม. ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่ามีเชื้อราเพียงชนิดเดียวที่สามารถเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณเส้นใยบนฟางข้าวได้ โดยลักษณะของเชื้อราจะเป็นเส้นใยสีขาวแผ่กระจายอยู่ทั่วบริเวณพื้นที่ผิวของฟางข้าว เมื่อนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 13 วัน เชื้อให้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 0.6498 ยูนิต/กรัม และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.0317 ยูนิต/มก.

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *S. pulverulentum* DMMU ที่เลี้ยงในฟางข้าวที่ผ่านการบดมีขนาดไม่เกิน 0.25 มม. แบบอาหารแข็ง ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์/5กรัมฟางข้าว มีการเติมแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เป็นรำข้าวสาลี ในอัตราส่วนฟางข้าว : รำข้าวสาลี เท่ากับ 1:1 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 และพีเอชเริ่มต้น 6.0 ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมสูงสุดของไซลาเนส เท่ากับ 57.1054 ยูนิต/กรัม และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1.6151 ยูนิต/มก.

ข้อเสนอแนะ

1. ฟางข้าวที่นำมาใช้เป็นสับสเตรตในการเลี้ยงเชื้อราในการทดลองนี้ควรจะทำการแปรสภาพ ด้วยวิธีอื่น ๆ ที่นอกเหนือไปจากการบด เช่น การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้สารเคมี กรดหรือด่าง เป็นต้น ก่อนที่จะนำมาหมักด้วยเชื้อราเพื่อทำให้ลิกนินแยกตัวออกจากเฮมิเซลลูโลส และสามารถละลายได้สูงขึ้น ทำให้เชื้อสามารถใช้สับสเตรตได้อย่างเต็มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เบญจวรรณ ชิตมณี. 2534. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์มโดยเชื้อราที่แยกได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 131 หน้า.

น้อย เกษมสุขสกุล. 2529. การผลิตเซลลูเลสโดยเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูงบนวัสดุที่เป็นของแข็ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 159 หน้า.

วิเชียร กิจปรีชาวนิช. วิเชียร สีสุข. อัญชริดา สวารชร และนภา โล่ห์ทอง. 2535. การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนจากวัสดุเหลือทิ้งจากเกษตรกรรมโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F. ว. เกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์. 26:296-305.

อัญชริดา สวารชร. 2534. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 98 หน้า.

อารี กังแอ. 2536. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากวัสดุเศษเหลือโรงงานน้ำมันปาล์มโดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 127 หน้า.

Abbott, T.P. and Wicklow, D.T. 1984. Degradation of lignin by Cyathus species. Appl. Environ. Microbiol. 47:585-587.

Adler, E. 1977. Lignin chemistry-past, present and future. Wood. Sci. and technol. 11:169-218.

Ander, P. and Eriksson K.E. 1975. Influence of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

carbohydrates on lignin degradation by white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Svensk. Papperstidn. 78:643-692.

Alazard, D. and Raimbault, M. 1981. Comparative study of amylolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid state cultivation. J. Appl. Microbiol Biotechnol. 12:113-117.

A.O.A.C. 1984. Official Method of Analysis of Association of Official Chemists, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., USA.

Barker, T.W., Drouliscos, N.J. and Worgan, J.T. 1981. Composition and nutritional evaluation of *Aspergillus oryzae* biomass grown on palm oil processing effluents. J. Sci. Food Agric. 32: 1014-1020.

Barnett, H.L. 1965. Illustrated Genera of imperfect Fungi. 2nd ed. Minneapolis : Burgess Publishing Co.

Battaglino, R.A., Huergo, M., Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B. 1991. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 35:292-296.

Bjorndal, H., Eriksson K.E., Garegg, P.J., Lindberg, B. and Swan, B. 1965. Studies on the xylan from the red seaweed *Rhodymenia palmata*. Acta. Chem. Scan. 19(10):2309-2315.

Bucht, B. and Eriksson, K.E. 1968. Extracellular enzyme system ultilized by the rot fungus *Stereum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sanguinolentum for the breakdown of cellulose. Arch. Biochem. Biophys. 124:135-141.

Chahal, D.S.1985. Solid state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. Appl. Environ. Microbiol. 49(1):205-210.

Chavanich,S., Yoshioka,H. and Hayashida,S. 1981. A comparative study of cellulase and xylanase produced by some thermophilic fungi Microbial Utilization of Renewable Resources. 2:72-76.

Cheah, S.C., Ma, A.N., Ooi, L.C.L. and Ong A.S.H. 1988. Biotechnological Applications for the utilization of wastes from palm oil mills. Fat Sci. Technol. p. 536-540.

Cheah, S.C. and Ooi L.C.L. 1984. Isolation of thermophilic cellulolytic fungi. Paper presented at the regional UNESCO Symposium on Applied Microbiology, Bangkok and Khon Kean, Thailand, 23-27 December, 1984.

Cheah, S.C. and Ooi, L.C.L. 1985. Development of a process for palm oil mill sterilizer condensate ultilization. Paper presented at National Symposium on Oil Palm by-product for Agro-based Industry, Kuala Lumpur, Malaysia, Nov. 5-6, 1985, p.203-220.

Clarke, R.T.J., Bailey, R.W. and Gaillard, B.D.E. 1969. Growth of rumen bacteria on plant cell wall polysaccharide. J. Gen. Microbiol. 56:79-86.

Clermont, S., Charpentier, M. and Percheron, F. 1970. Bull. Soc. Chem. Biol. 52:1481-1495. In Dekker, R.F.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

H. and Richards, G.N. 1976. Hemicellulase : Their occurence, purification, properties and mode of action. Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 32:277-352.

Coutts, A.D. and Smith, R.E. 1976. Factors influencing the production of cellulases by *Sporotrichum thermophile*. Appl. and Environ. Microbiol. 31: 819-821.

Cowling, E.B. 1961. Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by write rot and brown rot fungi. Dep of Agr. Tech Bull No. 12. Washington, D.C. 75 p.

Crawford, J.H. and Crawford R.L. 1976. Microbiol degradation of lignocellulose : the lignin component. Appl. Environ. Microbiol. 31:714-717.

Dekker, R.F.H. and Richards, G.N. 1976. Hemicellulases : Their occurence, purification, Properties and mode of action. Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 32:277-352.

Desrochers, M., Jurasek, L. and Paice, M.R. 1981. High production of beta-glucosidase in *Schizophyllum commune* : Isolation of the enzyme and effect of the culture filtrate on cellulose hydrolysis. Appl. Environ. Microbiol. 41:222-228.

Domsh, K.H. and Gams, W. 1969. Variability and potential of a soil fungus population to decompose pectin. xylan and caboxymethyl-cellulose. Soil Biol.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Biochem. 1:29-36.

Donefer, E. 1973. Effect process. Nutr. Value Feeds. Proc. Symp., 1972. 221-229. *In* Han, Y.W. 1978. Microbial ultilization of straw (a review). Adv. Appl. Microbiol. 23:119-153.

D'souza, J. and Volfova, O. 1982. The effect pH on the production of cellulase is *Aspergillus terreus*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16: 123-125.

Enari, T.M. 1983. Microbial cellulase. Applied Science Publishers, London and New York. p. 183-223.

Eriksson, K.E. and Rzedowski. 1969. Extracellular enzyme system ultilized by the fungus *Chrysosporium lignorum* for the breakdown of cellulose. 1. Studies on the enzyme production. Arch. Biochem. biophys. 129:683-688.

Gaillard, B.D.E., Bailey, R.W. and Clarke, R.T.J. 1975. The action of rumen bacterial hemicellulase on pasture plant hemicellulose fraction. J. Agr. Sci. 64:449-454.

Gascoigne, J.A. and Gascoigne, M.M. 1960. The xylanase of *Fusarium roseum*. J. Gen. Microbiol. 22:242-248.

Gilbertson, R.L. 1980. Wood-rotting fungi of north America. Mycologia. 72:1-49.

Godfrey, T. 1983. Edible oils. In Industial Enzymology : The Application of Enzyme in Industry. (Godfrey, T. and Reichelt, J., eds.) pp. 424-427. New York : The Nature Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Goksoyr, J. and Eriksen, J. 1980. Cellulase : Microbial enzymes and bioconversions, Economic Microbiology, Vol 5. (Rose, A.H., ed.) Academic Press, London. p. 283-330.

Gomes, J., Esterbauer, H., Gomes, I. and Steiner, W. 1989. Screening of some wild fungal isolated for cellulolytic activities. Letters in Appl. Microbiol. 8:67-70.

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

Goodwin, T.W. and Mercer, E.I. 1972. Introduction to plant Biochemistry. 1st ed. Pergamon Press. New York. p. 52-57.

Gottlieb, S. and Pelczar, M.J. Jr. 1951. Microbiological aspects of lignin degradation. Bacteriol. Rev. 15:55-76.

Gorbacheva, I.V. and Rodionova, N.A. 1977. Studies on xylan degrading enzymes. II. Action pattern of endo-1,4-beta-xylanase from *Aspergillus niger* Str. 14 on xylan and xylooligosaccharides. Biochem. et Biophys. Acta. 484:94-102.

Haider, K. and Trojanowski. 1975. Decomposition of specifically 14-labelled phenols and dehydropolymers of coniferyl alcohol as model for lignin degradation by soft and white rot fungi. Archives of Microbiol. 105:33-41.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hammerschmidt, R. and Kuc' J. 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. Physiol. Plant. Pathol. 20:61-71.

Hampton, H.A., Hawarth, W.N. and Hirst, E.L. 1929. Polysaccharides Part IV. The constitution of xylan. J. Chem. Soc. 1739-1753.

Han, Y.W. 1978. Microbial ultilization of straw (a review). Adv. Appl. Microbiol. 23:119-153.

Han, Y.W. and Srinivasan, V.R. 1968. Isolation and characterization of cellulose utilizing bacterium. Appl. Microbiol. 16:1140-1145.

Harkin, J.M. 1967. Lignin natural polymeric product of phenol oxidation. *In* Batlersby A.R. and Taylor A.I. eds. Oxidative Coupling of phenols. Marcel Dekker. Inc., New York. pp. 243-321.

Harvey, P.J., Schoemaker, H.E., Bowen, R.M. and Palmer, J.M. 1985. Single electron transfer process and the relation mechanism of enzymatic degradation of lignin. FEBS Letters. 183:13-16.

Hashimoto, S., Muramatsu, T. and Funatsu, M. 1971. Studies on xylanase from *Trichoderma viride*. Part I. Isolation and some properties of crystalline xylanase. Agr. Biol. Chem. 35:501-508.

Haworth, W.N. and Percival, E.G.V. 1931. Polysaccharides. Part IX. Evidence of the pyranose structure of xylan. J. Chem. Soc. 2850-2854.

Higuchi, T., Shimada, M., Nakatsubo, F. and Tanahashi, M. 1977. Difference in biosynthesis of guaiacyl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and syringyl lignin in wood. Wood sci. Technol. 17:153-167.

Hwang, T.K., Ong, S.M., Scow, C.C. and Tan, H.K. 1978. Chemical composition of palm oil mill effluent. Planter. 54:749-756.

Ibrahim, M.N.M. 1981. Physical, chemical, physio-chemical and biological treatment of crop residues. *In* Pearce, G.R. (ed.). The ultilization of Fibrous Agricultural Residuces as Animal Feed. Univ. Melbourne, Victoria. pp. 53-68.

Iwamoto, T. Sasaki, T. and Inaoka, M. 1973. Mem. Ehime. Univ. 17:13-25. In Dekker, R.F.H. and Richards. 1976. Hemicellulase : Their occurence, purification, properties and mode of action. Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 32:277-352.

Jackson, M.G. 1977. Review article : The alkali treatment of straws. Anim. Feed. Sci. Technol. 2:105-130.

Janshekar, H. and Fiechter, A. 1983. Lignin : biosynthesis, application and biodegradation. Adv. Biochem. Eng. 27:117-179.

Joglekar, A.V. and Karanth, N.G. 1984. Studies on cellulase production by a mutant *Penicillium funiculosum* UV-49. Biotechnol. Bioeng. 26:1079-1084.

Joglekar, A.V., Srinivasan, M.C., Manchanda, A.C., Jogdand, V.V. and Karanth, N.G. 1983. Studies on cellulase production by a *Penicillium funiculosum* strain in an instrumented fermentor. Enzyme Microb. Technol. 5:22-24.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

John, M., Schmidt, B. and Schmidt, J. 1979. Purification and some properties of five Endo-1,4-Beta-D-xylanase and a beta-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*. Can. J. Biochem. 57:125-134.

Jones, R.P., Greenfield, P.F. and Nicklin, D.J. 1980. cellulose hydrolysis state of the art and near term potential. Department of Chemical Engineering. University of Queensland, Australia. 22 pp.

Kawaminami, T. and Lizuka, H. 1969. Studies on xylanase from microorganisms. Part III. Production of xylanase by *Streptomyces xylophagus* nov. sp. Agr. Biol. Chem. 33:1787-1789.

Kawamori, M., Morikawa, Y., Ado, Y. and Takasawa, S. 1986. Production of cellulases from alkali-treated bagass in *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:454-458.

King, N.J. and Fuller D.B. 1968. The xylanase system of *Coniophora cerebella*. Biochem. J. 108:571-576.

Kirk, T.K. and Alder, E. 1970. Methoxyl deficient structual elements in lignin of sweetgum decayed by a brown-rot fungus. Acta Chemica Scandinavica. 24:337-390.

Klopfenstein, T.J. 1978. Chemical treatment of crop residues. J. Anim. Sci. 46:841-848.

Kretovich, V.L. 1966. Principles of plant Biochemistry 1st ed. New York : Pergamon Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kusakabe, I., Kawaguchi, M., Yasui, T. and Kobayashi, T. 1977. Purification and some properties of extracellular xylanase from *Streptomyces* sp. E-86. (Studies on xylanase system of *Streptomyces* Part VII). Agr. Biol. Chem. (Japan). 51:429-437.

Kusakabe, L., Yasui, T. and Kobayashi, T. 1966. Studies on xylanase of system of *Streptomyces*. Part I Some properties of extracellular xylanase from *Streptomyces* . Agr. Biol. Chem. (Japan). 43: 145-153.

Lizuka, H. and Kawaminami, T. 1965. Studies on the xylanase from *Streptomyces*. Part I. Purification and some properties of xylanase from *Streptomyces xylophagus* nov. sp. Agr. Biol. chem. 29:520-524.

Lonsane, B.K. Ghildyal, N.P. Budiatwan, S. and Ramakrishna, S.V. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme Microb. Technol. 7:258-265

Lonsane, B.K. Saucedo-Castanedo, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzalez, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M., Krishaiah, M.M. 1992. Scale up strategies for solid state fermentation system. Process Biochem. 27:259-273.

Lotong, N., Kitprechavanich, V., Tani, Y. and Okada, H. 1980. Investigation of xylanase producing microorganism in Thailand. Proceeding of JSPS-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NRCT Seminar on Agro-Industry Including Microbial Technology. Microbial Ultilization of Renewable Resource. Osaka, Japan. 1:66-72.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Mandels, M. and Weber, J. 1969. The production of cellulase. In cellulase and Their Application (Gould, R.E. ed.) Adv. Chem. Ser. 95, American Chemistry Society, Washington, D.C. p.391-398.

Matinez, D.V.G., Ogawa, T., Shinmyo, A. and Enatsu, T. 1974. Hydrolytic degradation of bagasses by enzyme produced by *Penicillium variabile*. J. Ferment. Technol. (Japan). 52:378-387.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426-428.

Millett, M.A., Baker, A.J., Feist, W.C., Mellenberger, R.W. and Satter, L.D. 1970. Modifying wood to increase its *in vitro* digestibility. J. Anim. Sci. 31:781-788.

Millett, M.A., Baker, A.J. and Satter, L.D. 1975. Biotechnol. Bioeng. Symp. 5:193-219. In Han, Y.W. 1978. Microbial ultilization of straw (a review). Adv. Appl. Microbiol. 23:119-153.

Moo-Young, M., Moreira, A.R. and Tengerdy, R.p. 1983. Principles of solid substrate fermentation. *In* The filamentous Fungi. Fungal Technology

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B. eds.) pp> 117-144, New York : Edward Arnold Pulishers.

Nakanishi, K., Yasui, T. and Kobayashi, T. 1976a. A preliminary experiment on the xylanase production by *Streptomyces* sp. J. Ferment. Technol. 54: 801-807.

Neudoerffer, T.S. and Smith, R.E. 1970. An evaluation of fungal enzymes for the solubilization of wheat bran constituents. Can. J. Microbiol. 16(3) 139-146.

Nishio, N. and Nagai, S. 1981. Thermostable cellulase production by *Talaromyces* sp. in solid-state cultivation. Microbial Utilization of Renewable Resources. 2:211-216.

Nisizawa, T., Suzuki, H. and Nisizawa, K. 1971. "De novo" synthesis of cellulase induced by sophorose in *Trichoderma viride* cells. J. Biochem. 70: 387-393

Ofuga, C.O. and Vkpong, E.N. 1989. Fungal fermentation of a Nigerian brewery sludge. Biological. Wastes. 30:251-260.

Okada, H., Kinoshita, S. and Panbangred, W. 1980. Xylanase produced by *Bacillus pumilus* isolated from soil of Thailand. Proceeding of JSPS-NRCT semina on Argo-Industry Including Microbial Technology. Microbial ultilization of Renewable Resources. Osaka, Japan. 1:54-65.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Paice, M.G., Jurask, L., Carpenter, M.R. and Smillie, L.H. 1978. Production, characterization and partial amino acid sequence of xylanase. A from *Schizophyllum commune*. Appl. and Env. Microbiol. 36:802-808.

Panda, T. 1989. Simulation of shake flask conditions in a bioreactor for the biosynthesis of cellulase and xylanase by a mixed culture of *Trichoderma reesei* D 1-6 and *Aspergillus wentii* Pt 2804. Process Biochem. 104-108.

Park, J.E. 1970. M.S. Thesis, Oregon State University, Corvallis. In Han, Y.W. 1978. Microbial ultilization of straw (a review). Adv. Appl. Microbiol. 23:119-153.

Paterson, A.J., Klopfenstein, T.J. and Britton, R.A. 1981. Ammonia treatment of corn plant residue : digestibility and growth rate. J. Anim. Sci. 53:1592-1600.

Percival, E.G.V. 1962. Structural Carbohydrate Chemistry. 2nd ed. Glasgow : Robert Maclehose and Co., Ltd.

Pew, J.C. and Weyna, P. 1962. Tappi. 45-247. In Han, Y.W. 1978. Microbial ultilization of straw (a review). Adv. Appl. Microbiol. 23:119-153.

Prasertsan, P. and Ooi, S. 1992. Production of cellulolytic enzymes from fungi and use in the saccharification of palm cake and palm fibre. World J. Microbiol. Biotechnol. 8:536-538.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Raimbault, M. and Alazard D. 1980. Culture methode to study fungal growth in solid fermentation. European J. Appl. Microbial. 9:199-209.

Reddy, C.A. 1973. Microbiol. degradation of lignin. Dev. Ind. Microbiol. 19:13-68.

Rogalski, J., Szezodark, J., Dawidowiez, A., Ikezuk, Z. and Leonowise, A. 1985. Enzyme Microb. Technol. 7: 395-400. อ้างโดยโศภิษฐ์ เวทยสุภรณ์. 2531. การศึกษากระบวนการผลิตเอนไซม์เอมิเซลลูเลสและเซลลูเลสจากเปลือกข้าวโพด โดยแบคทีเรียผสมใน fermentor. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า วิทยาเขตธนบุรี.

Sarkanen, K.V. and Ludwig, C.H. 1971. Lignin : Occurence, Formation, Stucture and Reaction. Willy-Interscience, New York.

Savory, J.G. and Pinion, L.C. 1958. Chemical aspect of decay of beech wood by *Chaetomium globosum*. Holzforschung. 12:99-103.

Schoemaker, H.E., Harvey, P.J., Bowen, R.A. and Palmer, J.M. 1985. On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. FEBS Letter. 183:7-12.

Shewale, J.G. and Sadana, J.C. 1978. Cellulase and beta-glucosidase production by a *Basidiomyces* sp. Can. J. Microbiol. 24:1204-1216.

Simpson, F.J. 1959. Microbial pentosanases. III. Some factors affecting the production of pentosanase by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. Can. J. Microbiol. 5:97-107.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stewart, J.C. and Parry J.C.B. 1981. Factors influencing the production of cellulase by *Aspergillus fumigatus*. J. of Gen. Microbiol. 125:33-39.

Strobel, G.A. 1963. A xylanase system produced by *Diplodia viticola*. Phytopathology. 53:592-596.

Takahashi, M. and Kutsumi, S. 1979. Purification and properties of xylanase from *Gliocladium virens*. J. Ferment. Technol. 57:434-439.

Takennishi, S. and Tsujisaka, Y. 1973. Stucture of the oligosaccharides from the enzymic hydrolyzate of rice-straw arabinoxylan by a xylanase of *Aspergillus niger*. Agr. Biol. Chem. 37:1385-1391.

Tan, L.U.L., Yu, E.K.C., Louis-Seize, G.W. and Saddle, J.N. 1987. Inexpensive rapid procedure for bulk purification of cellulase-free beta-1,4-D-xylanase for high specific activity. Biotechnol. Bioeng. 30:96-100.

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

Toh, Suan EE. 1978. Xylanase produced by xylan utilizing microorganisms. International Post-Graduate University Course in Microbiology. Osaka University.

Toussaint, P. and Bataille, P.F. 1985. The effect of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pretreatment on the enzymic hydrolysis of cellulosic industrial waste. J. Chem. Tech. Biotechnol. 35B:205-215.

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

Waiss, A.C., Jr., Guggolz, J., Kohler, G.O., Walker, H.G., Jr. and Garett, W.N. 1972. Improving digestibility of straw for ruminant feed by aqueous ammonia. J. Anim. Sci. 35:109-112.

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

Whistler, R.L. and Smart, C.L. 1953. Polysaccharide Chemistry. New York : Academic Press.

Whistler, R.L. and Masak, E. 1955. Enzymatic hydrolysis of xylan. J. Anim. Chem. Soc. 77:1241-1243.

Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. 1988. Multiplicity of β-1,4-xylanase in microorganisms:function and applications. Microbial. Rev. 52(3):305-317.

Yoshioka, H., Chavanich, S., Nilubol, N. and Hayashida, S. 1981. Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. Annual Reports of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ICME. 4:89-97.

Zadrazil, F. and Burnnert. 1980. The influence of ammonium nitrate supplementation on degradation and *in vitro* digestibility of straw colonized by higher fungi. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9:37-44.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

อาหารวุ้นเอียง PDA (Potato dextrose agar)

ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

วิธีการ

ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือด กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่ได้มาเติมน้ำตาลเดกซ์โทรส และผงวุ้น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาด 16 x 150 มม. หลอดละ 5 มม. ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที (ขณะที่วุ้นยังไม่แข็งตัว ให้นำหลอดมาวางเอียงไว้จนกระทั่งวุ้นแข็งตัวดี) หรือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูป โดยนำมาละลายในน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่ได้ระบุไว้ที่ข้างภาชนะ คนให้ละลาย แล้วบรรจุในหลอดฝาเกลียว ทำเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. ความชื้น (A.O.A.C., 1984)

วิธีการ

1. นำภาชนะอลูมิเนียมพร้อมฝาไปอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นในเดสิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักของภาชนะพร้อมฝา

2. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน (2.0 กรัม) ใส่ในภาชนะที่ชั่งน้ำหนักแล้วเกลี่ยให้เนื้อกระจาย ปิดฝาและชั่งน้ำหนัก

3. นำไปอบในตู้อบโดยให้ฝาปิดไว้บางส่วนอบที่ 105 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (16 ชั่วโมง)

4. นำออกจากตู้อบ ปิดฝาและนำไปใส่ในเดสิเคเตอร์จนเย็น ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ความชื้น(ร้อยละ)} = \frac{100 \times \text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนัก(กรัม)ของตัวอย่างก่อนอบ}}$$

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลสในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์ โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย (ร้อยละ)

1. dinitrosalicylic (DNS) acid	1
2. phenol	0.2
3. sodium potassium tartrate (Rochelle salt)	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Na_2SO_3	0.05
5. NaOH	1

วิธีการเตรียม DNS reagent

ละลาย NaOH ในน้ำตามปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเติมสารละลายอื่นๆ ลงในสารละลาย NaOH

* วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลสสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมไซลาเนส

ก. เตรียม stock solution ของไซโลสให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มก./มล.

ข. ปิเปตสารละลายจากข้อ (ก) มาความเข้มข้นละ 1 มล. (blank ใช้น้ำกลั่น 1มล. แทน)

ค. เติม DNS reagent ลงไป 3 มล.

ง. นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที และทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว โดยใช้น้ำก๊อก

จ. เติมน้ำกลั่นลงไป 6 มล. เขย่าให้เข้ากัน (ใช้ vortex ปั่น) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง กับปริมาณไซโลส ดังแสดงในรูปผนวกที่ ข1

<u>การคำนวณค่ากิจกรรมไซลาเนส</u>

ให้ค่าปริมาณน้ำตาลไซโลสโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน = X มก.

จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์ = Y

$$\text{ยูนิต/มล.} = \frac{\text{มก.ของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลไซโลส} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์}}$$

(กรัม/โมล) (นาที) (มล.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$= \frac{\text{มก.ของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{150.13 \times 10 \times 0.5}$$

$$= 1.332XY = Z$$

เนื่องจากอัตราของฟางข้าวต่อน้ำกลั่นในการปรับความชื้น = 1:1.4
(5 กรัม : 7 มล.)
ดังนั้น ฟางข้าวจะมีน้ำทั้งหมด = 7 มล.

จากการทดลอง ความชื้นเริ่มต้นของฟางข้าว ร้อยละ 59.62
ความชื้นสุดท้ายหลังจากการปรับความชื้น ร้อยละ 54.45

แสดงว่า ปริมาณน้ำเริ่มต้น 59.62 มล. ปริมาณน้ำสุดท้าย 54.45 มล.
ปริมาณน้ำของฟางข้าว 7 มล. ปริมาณน้ำสุดท้าย $= \frac{54.45 \times 7}{59.62}$
ดังนั้น ปริมาตรน้ำที่เหลือหลังปรับความชื้น = 6.39 มล.

$$\text{ยูนิต/กรัม (ลับสเตรต)} = \frac{\text{ยูนิต/มล.} \times (\text{ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์} + \text{ปริมาตรน้ำที่เหลือหลังปรับความชื้น})}{\text{น้ำหนักฟางข้าวเริ่มต้น (กรัม)}}$$

$$= \frac{Z(25+6.39)}{5}$$

$$= (6.28)Z$$

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน ตามวิธีของ Lowry,et al. (1951)

สารเคมี

a. 5 % Na_2CO_3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b. 0.5 % $CuSO_4.5H_2O$ ใน 1 % Sodium potassium tartrate

c. นำสาร (a) 30 มล. ผสมกับสาร (b) 2 มล. แล้วใช้ทันที

d. Folin-ciocaltens phenol reagent 1 มล. ผสมกับน้ำกลั่น 2 มล.

e. Bovine albumin protein

วิธีวิเคราะห์

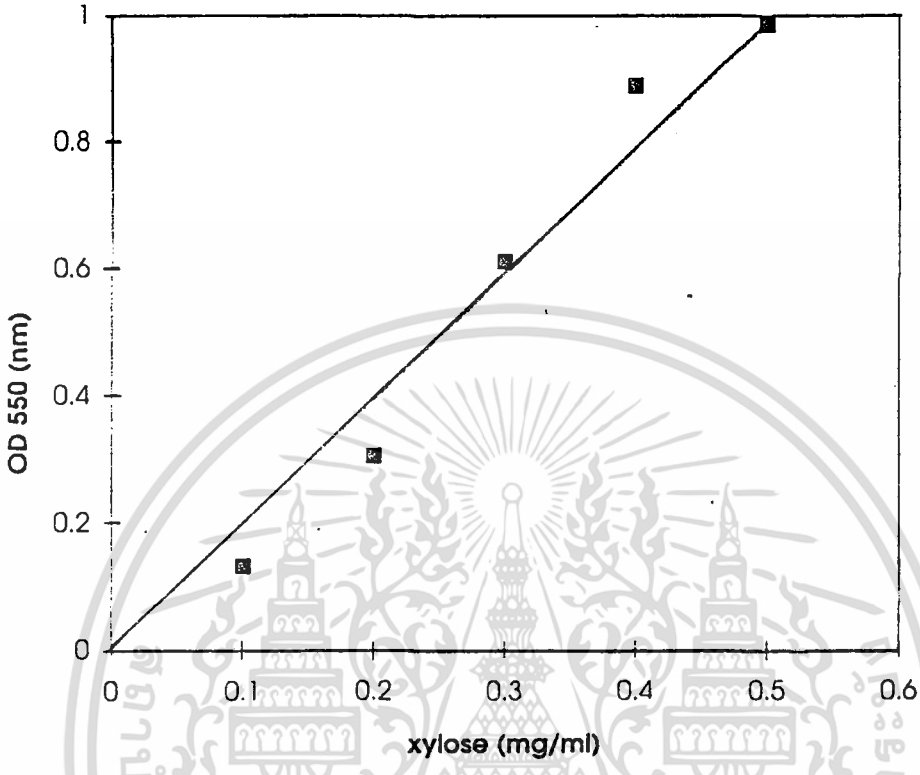
1. ใช้สารละลายมาตรฐาน Bovine albumin protein ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 125, 150 และ 200 ไมโครกรัม/มล. โดยนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มล. ผสมกับ 0.5 นอร์มัล NaOH 0.9 มล. ต้มในน้ำเดือด 5 นาที

2. เติมสารเคมี (c) 2.5 มล. ทิ้งไว้ 10 นาที

3. เติมสารเคมี (d) 0.5 มล. เขย่าทันที ทิ้งไว้ 30 นาที

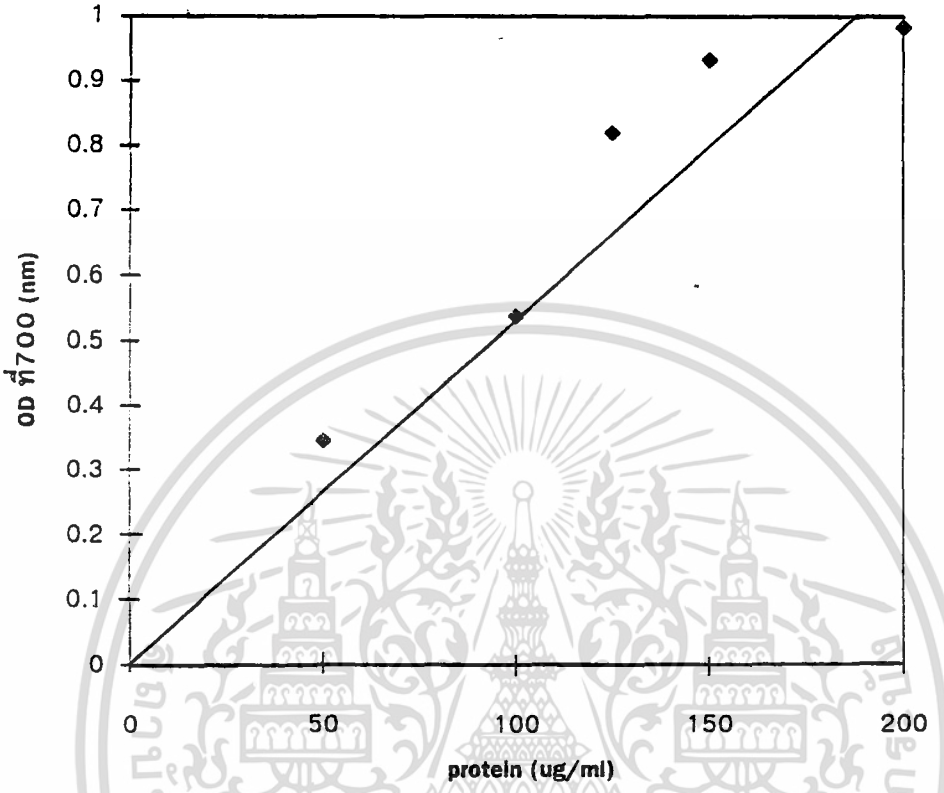
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้