การใช้เซลลูเลสย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

นาย ราบิน เดอร์ ศรีกิจจาภรณ์

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

พ.ศ. 2531

ปพ.
ช AA3ก
2531
เลขหมู่
เลขทะเบียน 12317
วัน, เดือน, ปี 10 มิ.ย. 2532

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DEGRADATION OF AGRICULTURAL RESIDUES

BY CELLULOLYTIC ENZYMES

Mr. Rabin Der Srikijjaporn

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of

the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Industrial Education and Sciences

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1988

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การใช้เซลลูเลสย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร
โดย	นายราบิน เดอร์ ศรีกิจจาภรณ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มาลินี ตันติยาภรณ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มาลินี ตันติยาภรณ์)

หัวหน้าภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

.....

(อาจารย์ มลวิภา เกษแจ้ง)

ประธานกรรมการ

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มาลินี ตันติยาภรณ์)

กรรมการ

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เนาวรัตน์ ปานแย้ม)

กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงาน การใช้เซลลูเลสย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร
นักศึกษา นายราบิน เดอร์ ศรีกิจจาภรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มาลินี ตันติยาภรณ์
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา 2530

บทคัดย่อ

ปัญหาประการหนึ่งที่เป็นอุปสรรคของการใช้เซลลูเลสในการย่อยวัสดุเซลลูโลสเพื่อผลิตเป็นกลูโคส ได้แก่ ต้นทุนการผลิตเอนไซม์ วิธีการที่สามารถลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ลงได้ ได้แก่ การปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้สามารถผลิตเซลลูเลสได้มากขึ้น และการใช้วัสดุราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอนไซม์

แหล่งของเซลลูเลสที่สำคัญ คือ Trichoderma reesei แต่เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ ผลิต β-กลูโคซิเดสนอกเซลล์ในระดับที่ต่ำ จึงมักทำการเติม β-กลูโคซิเดส จากเชื้อ Aspergillus spp. ลงไป ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของ Aspergillus niger เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิต β-กลูโคซิเดส จะใช้รังสีอัลตราไวโอเลตเป็น mutagen และทำการคัดเลือก 3 ขั้นตอน ซึ่งได้มิวแตนท์ที่ผลิต β-กลูโคซิเดสเพิ่มขึ้น จาก 1.77 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็น 4.55 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเพาะเชื้อบนอาหารแข็งรำข้าว

การผลิตเอนไซม์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่ใช้แกลบเป็นสับสเทรท โดยศึกษาสภาพสับสเทรทและความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสม ผลที่ได้ปรากฏว่า ในกรณีของ T. reesei จะทำการผลิตเซลลูเลสสูงสุดเมื่อใช้แกลบบดและผ่านสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นสับสเทรท และการใช้สารอาหารในความเข้มข้นเพียงครึ่งหนึ่ง จะทำให้ได้เอนไซม์สูงกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นสารอาหารครบเต็มตามสูตร ส่วนในกรณีของ A. niger การใช้แกลบที่ผ่านสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และแกลบบดที่ผ่านสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ จะให้เอนไซม์ในระดับที่ใกล้เคียงกัน และความเข้มข้นของสารอาหารไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Degradation of Agricultural Residues by Cellulolytic Enzymes.
Name	Mr. Robin Der Srikijjaporn
Special Project Advisor	Assistant Professor Malinee Tantiyaporn
Department	Applied biology
Academic Year	1987

ABSTRACT

One difficulty in production of glucose by enzymatic hydrolysis of cellulose is the costs of enzyme production. Approaches made in reducing such costs are manyfold and include genetic improvement of microorganisms to give higher yields of celluloses and using low-cost carbon sources.

The major source of cellulase is Trichoderma reesei but this fungus produce low-level of β-glucosidase. In practice, therefore, β-glucosidase from Aspergillus sp. is usually added into the culture filtrate. In genetic improvement of Aspergillus niger, the ultroviolet radiation was used as mutagen and the mutants were sereened in three steps. The mutant A. niger MKL 51 give the highest yield of β-glucosidase (4.55 U/ml) when grown on bran-solid medium.

Hull is used as substrate for the production of enzyme in solid-state fermentation. By studying suitable substrate condition and nutrien concentrotion, it was found that T. reesei would produce highest level of cellulase when milled hull treated with sodium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

hydroxide solution was used as substrate and the use of half concentration of nutrient gave the higher level of enzyme. In case of A. niger, the use of hull which was only treated with sodium hydroxide solution would give the same level of β-glucosidase as hull which was both milled and treated with sodium hydroxide solution. The level of nutrient concentration did not effect the level of enzyme.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญ

หน้า

สารบัญตาราง (2)

บทนำ 1

การตรวจเอกสาร 4

อุปกรณ์และวิธีการ 34

ผลการศึกษา 39

สรุปผลและข้อเสนอแนะ 48

เอกสารอ้างอิง 50

ภาคผนวก

ภาพผนวก ก. 57

ภาคผนวก ข. 60

ภาคผนวก ค. 62

ประวัติ 65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การผลิตเซลลูเลสโดยเชื้อรา *Trichoderma*	13
2	ปริมาณสัมพัทธ์ของเซลลูเลสที่สร้างขึ้นโดย *Trichoderma reesei* และ *Aspergillus niger*	14
3	ค่า MICHAELIS-MENTEN CONSTANT (K_m) และ K_i สำหรับ β-กลูโคซิเดส ที่แยกได้จาก *Trichoderma reesei* และ *Aspergillus niger*	16
4	เซลลูเลสชนิดต่าง ๆ ที่แยกได้จาก *Trichoderma reesei*	17
5	ประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดสจากเชื้อ *T. reesei* และ *A. niger*	39
6	อัตราการรอดตายของเชื้อ *A. niger* ภายหลังจากการฉายรังสีอัลตราเลตในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน	42
7	ขนาดความกว้างของไฮฟาของ *A. niger* สายพันธุ์ต่าง ๆ	43
8	ประสิทธิภาพการผลิต β-กลูโคซิเดส โดยมิวแตนท์ของ *A. niger*	46
9	ผลการผลิตเอนไซม์โดยวิธีการเพาะเชื้อบนอาหารแข็งที่ใช้แกลบเป็นสับสเทรท	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

พลังงานอิสระทั้งหมดที่ระบบเชิงชีวภาพมีการใช้อยู่เป็นประจำนี้ ได้มาจากพลังงานแสงอาทิตย์ทั้งสิ้น (1) สิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสง (PHOTOSYNTHETIC ORGANISMS) จะจับพลังงานแสงอาทิตย์ โดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสง และเปลี่ยนรูปไปเป็นผลผลิตต่าง ๆ พืชเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทหนึ่งที่ดำรงชีวิตโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสง ในแต่ละปีพืชอาศัยพลังงานแสงอาทิตย์ในการสร้างพลังงานอิสระขึ้นมาอย่างน้อยที่สุด 10^7 กิโลแคลอรี ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าพลังงานเชื้อเพลิงซากดึกดำบรรพ์ (FOSSIL-FUEL ENERGY) ที่มนุษย์มีการใช้ไปในแต่ละปีถึง 10 เท่า แม้แต่เชื้อเพลิงซากดึกดำบรรพ์เองก็เป็นผลผลิตของการสังเคราะห์แสงที่เกิดขึ้นเมื่อหลายล้านปีล่วงมาแล้ว (2)

พืชที่ดำรงชีพด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง จะจับพลังงานแสงอาทิตย์ ในรูป ATP และ $NADH_2$ ซึ่งพืชจะนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อสร้างสารคาร์โบไฮเดรต และส่วนประกอบอินทรีย์ของเซลล์จากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ พร้อมกับปลดปล่อยออกซิเจนออกสู่บรรยากาศ (2) เซลลูโลสเป็นรูปหนึ่งของคาร์โบไฮเดรตที่พืชสังเคราะห์ขึ้น ในทางทฤษฎี หนึ่งกิโลแคลอรีของพลังงานแสงอาทิตย์ที่ตกลงบนโลก จะเกิดการสังเคราะห์เซลลูโลสขึ้น 12.9 มิลลิกรัม ตามการประเมินนี้ กำลังผลิตเซลลูโลสจากการสังเคราะห์แสงที่เกิดขึ้นทั่วโลก จะสูงถึง 11.4×10^5 กิโลกรัมในทุก ๆ ปี (3) การที่เซลลูโลสมีอยู่เป็นปริมาณมากและสามารถถูกสร้างขึ้นใหม่ได้อยู่ตลอดเวลาเช่นนี้ จึงทำให้เซลลูโลสเป็นวัสดุที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งของพลังงานและเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตอาหารและเคมีภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ

แนวทางหนึ่งที่เป็นไปได้อย่างมากในการนำเซลลูโลสมาใช้ให้เกิดประโยชน์ก็คือ การใช้เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายเซลลูโลส เพื่อผลิตเป็นกลูโคส แล้วนำกลูโคสไปใช้ใน อุตสาหกรรมอาหาร เคมี และจุลชีววิทยา จุลินทรีย์ที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้กันอย่างกว้างขวาง ก็คือ Trichoderma reesei และ Aspergillus niger ปัญหาและอุปสรรคประการหนึ่งของการผลิตกลูโคสในระดับอุตสาหกรรมนั้นได้แก่การจัดหาเอนไซม์ต้องใช้ต้นทุนสูง (4) วิธีการที่อาจนำมาใช้ในการลดต้นทุนการจัดหาเอนไซม์ เพื่อให้การผลิตกลูโคสในระดับอุตสาหกรรมเป็นจริงขึ้นมาได้นั้น มีอยู่หลายประการคือ

- การนำวัตถุดิบมาผ่านการปฏิบัติการเบื้องต้น (PRETREATMENT) อย่างมีประสิทธิภาพ

- การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสให้สูงขึ้น โดยอาศัยการปรับปรุงสายพันธุ์

- การนำเซลลูเลสกลับมาใช้ใหม่ในขบวนการผลิต

- การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดของกระบวนการหมัก

- การลดต้นทุนอาหารที่ใช้ในการหมัก โดยการใช้เกลือแร่ และแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ศึกษาแนวทางการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร มาใช้ให้เกิดประโยชน์

2. ศึกษาวิธีการผลิตเซลลูเลสจากจุลินทรีย์ Trichoderma reesei และ Aspergillus niger โดยการใช้แกลบเป็นวัตถุดิบ

3. ศึกษาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพเซลลูเลสจาก Aspergillus niger

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. ทำการผลิต B-กลูโคซิเดสจากเชื้อ T. reesei TISTR 3084 และ A. niger TISTR 3092

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ทำการปรับปรุงพันธุ์เชื้อ A. niger TISTR 3092 ให้มีความสามารถในการสร้าง β-กลูโคซิเดส เพิ่มมากขึ้นโดยวิธีการชักนำ

3. ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดสจากสารละลายเอนไซม์ของ T. resei และ A. niger โดยใช้รำข้าวเป็นวัตถุดิบ

4. ตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ของเชื้อ T. reesei และเชื้อ A. niger ที่ปรับปรุงพันธุ์แล้ว จากการใช้วัตถุดิบพวกแกลบ

5. เปรียบเทียบสภาพของวัตถุดิบ และความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลส

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. ทำให้ทราบหลักการในการปรับปรุงพันธุ์เชื้อ A. niger โดยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต

2. ทำให้ทราบหลักการที่ใช้ในการผลิตเซลลูเลส และวิธีการตรวจประสิทธิภาพของเอนไซม์

3. ทำให้ได้แนวทางในการผลิตเซลลูเลส โดยใช้แกลบ เป็นวัตถุดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ชนิดของเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลส (5, 6)

เอนไซม์หลักที่จัดอยู่ในกลุ่มเซลลูเลส มีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิดคือ

2.1.1 เอนโด- β-1,4-กลูคาเนส หรือ β-1,4-กลูแคน กลูคาโนไฮโดรเลส (ENDO-β-1,4-GLUCANASE OR β-1,4 GLUCAN GLUCANOHYDROLASE) (EC. 3.2.1.4) หรือ เรียกสั้น ๆ ว่า เอนโดกลูคาเนส คาร์บอกซีเมธิลเซลลูเลส หรือซีเอ็มเซลลูเลส (CARBOXYMETHYL CELLULASE OR CM-CELLULASE)

เอนโดกลูคาเนส เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์ พันธะ β-1,4-ไกลคอซิดิค ที่อยู่บริเวณภายในพอลิเมอร์เซลลูโลสได้ เอนโดกลูคาเนสที่บริสุทธิ์ จะไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่มีระดับขั้นของการเกิดพอลิเมอร์สูง ได้เป็น กลูโคส เซลโลไบโอส และเซลโลเด็กซตรินอื่น ๆ ที่ละลายน้ำได้ ผลผลิตในขั้นสุดท้ายจากการไฮโดรไลซ์จะได้ กลูโคส เซลโลไบโอส และเซลโลไตรโอสในปริมาณเล็กน้อย

เอนโดกลูคาเนส สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่พองตัวด้วยกรด (ACID-SOWLLEN CELLULOSE) และอนุพันธ์เซลลูโลส (SUBSTITUTED OR DERIVATIVE CELLULOSE) เช่น คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (CARBOXYMETHYL CELLULOSE) และไฮดรอกซีเอธิลเซลลูโลส(HYOROXYETHYL CELLULOSE) ได้ดี แต่ไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่อยู่ในสภาพผลึก (CRYSTALLINE CELLULOSE) ในปริมาณที่จำกัด และไม่ไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสเลย การทำงานของเอนโดกลูคาเนส จะช่วยทำให้เซลโลไบโอไฮโดรเลสย่อยเซลลูโลสในสภาพผลึกได้ดียิ่งขึ้น ลักษณะที่การทำงานของเอนโดกลูคาเนสไปเกื้อหนุนการทำงานของเซลโลไบโอไฮโดรเลส นี้ เรียกว่า ปรากฏการณ์เสริมกันของเซลลูเลส (SYNER GISTIC EFFECT OF CELLULASE)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 เอกโซ- β-1,4-กลูคาเนส หรือ β-1,4-กลูแคน เซลโลไบโอ-ไฮโดรเลส (EXO-β-1,4-GLUCANASE OR β-1,4-GLUCAN CELLOBIO-HYDROLASE) (EC. 3.2.2.92) หรือเรียกสั้น ๆ ว่า เอกโซกลูคาเนส หรือ เซลโล-ไบโอไฮโดรเลส

เซลโลไบโอไฮโดรเลส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพอลิเมอร์ของเซลลูโลส โดยไปทำให้ปลายทางด้านที่ไม่ได้เป็นตัวรีดิวส์ (NON-REDUCING END) ของพอลิเมอร์เกิดแตกตัว ได้ผลผลิตเป็นเซลโลไบโอสเพียงอย่างเดียว เซลโลไบโอสและกลูโคสสามารถยับยั้งการทำงานของเซลโลไบโอโดรเลสได้ แต่กลูโคสจะยับยั้งการทำงานในขอบเขตที่น้อยกว่าเซลโลไบโอส

เซลโลไบโอไฮโดรเลส สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่อยู่ในสภาพผลึกได้ดีกว่าเอนโดกลูคาเนส แต่ไฮโดรไลซ์อนุพันธ์เซลลูโลสในปริมาณที่จำกัด ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่า เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเทรทสูงกว่าเอนโดกลูคาเนส นอกจากนี้ยังไฮโดรไลซ์เซลโลเด็กซตรินได้ แต่ไม่ไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอส

2.1.3 β-1,4-กลูโคซิเดส หรือ β-D-กลูโคไซด์ กลูโคไฮโดรเลส (β-1,4-GLUCOSIDASE OR β-D-GLUCOSIDE CLUCOHYDROLASE) (EC. 3.2.1.21) หรือเรียกสั้น ๆ ว่า β-กลูโคซิเดส หรือเซลโลไบเอส

β-กลูโคซิเดส มีบทบาทสำคัญในการไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอส ที่เป็นผลผลิตจากการย่อยพอลิเมอร์ของเซลลูโลส ได้ผลผลิตขั้นสุดท้ายเป็นกลูโคส นอกจากนั้นยังมีความสำคัญต่อการควบคุมการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เซลลูเลส และต่อการควบคุมการย่อยเซลลูโลส β-กลูโคซิเดสที่เซลล์สร้างขึ้นจะไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสนอกเซลล์ไปเป็นกลูโคส ซึ่งจะไปควบคุมระดับของกลูโคสและเซลโลไบโอสที่อยู่ในเซลล์ อันจะไปมีผลต่อชีวสังเคราะห์เซลลูเลสโดยผ่านกลไกการเหนี่ยวนำและการกดคัน

นอกเหนือจากประสิทธิภาพของเอนไซม์ชนิดหลัก ๆ ที่กล่าวข้างต้นแล้ว ยังพบเอนไซม์ กลูแคน กลูโคไฮโดรเลส (GLUCAN GLUCOHYDROLASE OR 1,4-β-D-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GLUCAN GLUCOHYDROLASE) (EC. 3.2.1.74) อยู่ในระบบ เซลลูเลสด้วย เอนไซม์นี้ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายหน่วยกลูโคสออกไปจากทางปลายที่ไม่ได้เป็นตัวรีดิวส์ของสายโซ่ เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่พองตัวอันเนื่องมาจากกรดฟอสฟอริก เซลโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์ และคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส

2.2 <u>การตรวจสอบประสิทธิภาพของเซลลูเลส</u> (7)

2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจสอบการทำงานของเซลลูเลส มีอยู่ด้วยกันสองประการ คือ

ประการแรก เอนไซม์ที่นำมาตรวจสอบ ส่วนมากจะไม่ใช้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ มักจะเป็นสารละลายที่ประกอบด้วยเซลลูเลสชนิดต่าง ๆ หลายชนิดผสมกัน เนื่องจากกลุ่มเอนไซม์เหล่านี้มีการทำงานที่เกื้อหนุนซึ่งกันและกัน ดังนั้นสัดส่วนของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ จึงมีอิทธิพลอย่างมากต่อการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอมไซด์

ประการที่สอง สับสเทรทที่นำมาใช้วัดนั้น มักเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งทำให้ยากแก่การทำให้ได้มาตรฐาน สับสเทรทที่เหมาะสมควรเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ และมีความจำเพาะ

2.2.2 แนวทางการพัฒนาวิธีการตรวจสอบประสิทธิภาพของเซลลูเลส มีอยู่สองแนวทางคือ

แนวทางเชิงเทคนิค (TECHNICAL APPROACH) การใช้เซลลูเลสเชิงเทคนิคที่สำคัญที่สุด ได้แก่ การผลิตกลูโคสจากวัสดุเซลลูโลสชนิดต่าง ๆ ดังนั้น ตามแนวทางนี้จึงทำให้เกิดวิธีการวัดการทำงานของเซลลูเลสโดยอาศัยสับสเทรทประเภทวัสดุเซลลูโลสที่เหมาะสม (เช่น กระดาษกรอง) และทำการวัดกลูโคสซึ่งเป็นผลผลิตขั้นสุดท้ายที่เกิดขึ้น โดยวิธีการนี้จะทำให้ได้ค่าประสิทธิภาพรวมในการทำงานของเซลลูเลส แต่ไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่า เอนไซม์ตัวใดที่เป็นตัวกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมี วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะที่จะใช้ตรวจวิเคราะห์ความสามารถของสารเชิงซ้อนเอนไซม์ชุดหนึ่ง ๆ ในการไฮโดรไลซ์เซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แนวทางเชิงชีวเคมี (BIOCHEMICAL APPROACH)มีจุดมุ่งหมายเพื่อหาประสิทธิภาพของเอนไซม์แต่ละตัว วิธีนี้จำเป็นสำหรับการค้นคว้าให้เข้าใจถึงกลไกการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ และเป็นประโยชน์อย่างมากในการนำมาใช้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลส รวมถึงการพัฒนาขบวนการผลิตเอนไซม์ สิ่งที่เป็นอุปสรรคต่อการพัฒนาวิธีการที่จะใช้วัดประสิทธิภาพเอนไซม์แต่ละตัว ได้แก่ การขาดสับสเทรทหรือตัวยับยั้งที่จำเพาะ ที่จะใช้วัดประสิทธิภาพของเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ ในขณะที่มีเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ อยู่ด้วย

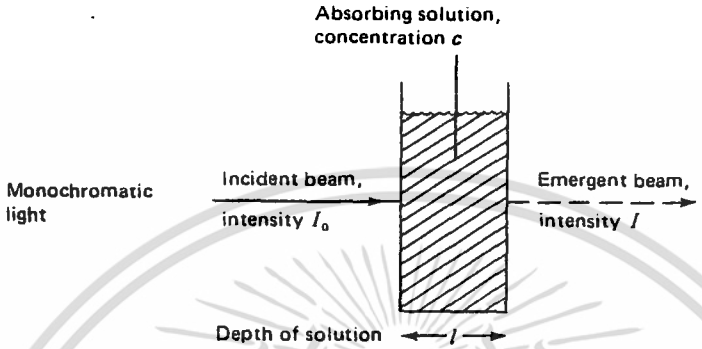
2.2.3 วิธีการตรวจสอบ

การตรวจสอบประสิทธิภาพรวมเชิงย่อยเซลลูโลส สับสเทรทที่นำมาใช้ในการตรวจสอบ ควรจะเป็นวัสดุเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ และถูกไฮโดรไลซ์ได้ไม่ง่ายนัก แต่ในขณะเดียวกันต้องเป็นวัสดุซึ่งสามารถทำให้ได้มาตรฐานได้ด้วย ปัจจัยอีกประการหนึ่งที่เกี่ยวข้องก็คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากสับสเทรทเป็นวัสดุประเภทเส้นใยที่ไม่ละลาย ดังนั้นจึงต้องใช้ระยะเวลาให้เอนไซม์แพร่เข้าไปยังเส้นใยและให้ผลผลิตที่ได้จากการไฮโดรไลซ์แพร่ออกจากเส้นใย อุปสรรคประการหนึ่งที่เกิดขึ้นมาจาก การที่เอนไซม์จะเข้าไปถึงพันธะกลูโคซิดิคที่บริเวณต่าง ๆ กันของเส้นใยได้ยากง่ายไม่เท่ากัน ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ จึงต้องให้นานพอที่จะให้เอนไซม์เข้าไปไฮโดรไลซ์พันธะตรงบริเวณที่เอนไซม์เข้าไปได้ยาก สับสเทรทที่นำมาใช้เพื่อตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ ประกอบด้วย เส้นใยฝ้าย เอวิเซล ซัลไฟท์พัลพ และกระดาษกรอง แต่สับสเทรทซึ่งมีการพิสูจน์แล้วว่าเหมาะสมที่สุด คือ กระดาษกรอง ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ หนึ่งชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะมาตรฐาน

การตรวจสอบประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดส สับสเทรทที่ได้นำมาใช้ในการตรวจสอบ คือ เซลโลไบโอส ซาลิซิน และ p-ไนโตรฟีนิล- β-กลูไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้สเปคโตรสโคปี (8, 9)



การวิเคราะห์โดยวิธีนี้ อาศัยหลักการการดูดกลืนแสงโดยสารละลาย เครื่องมือที่ใช้วัดประกอบด้วย เซลล์แก้วที่มีความหนา b บรรจุสารละลายความเข้มข้น c อยู่เต็ม เมื่อรังสีที่มีความยาวคลื่นเดียวที่มีความเข้ม I_0 ผ่านสารละลายที่บรรจุอยู่ภายในเซลล์ รังสีบางส่วนจะถูกดูดกลืน ซึ่งเป็นผลทำให้ความเข้มของรังสีที่ผ่านออกมา I มีค่าน้อยกว่า I_0 อัตราส่วนระหว่างความเข้มของรังสีที่ผ่านออกมา (I) ต่อความเข้มของรังสีที่ตกกระทบ (I_0) เรียกว่า ทรานส์มิทแทนซ์ (TRANSMITTANCE) นั่นคือ

$$T = I/I_0$$

ในทางปฏิบัติมักแสดงอยู่ในรูปของ เปอร์เซนต์ทรานส์มิทแทนซ์

$$\%\ T = I/I_0 \times 100$$

ความสัมพันธ์ระหว่าง I และ I_0 จะขึ้นอยู่กับความหนาของเซลล์ (b) และความเข้มข้นของสารละลาย (c) โดยทั้งนี้จะเป็นไปตามกฎของแลมเบิร์ดและเบียร์

กฎของแลมเบิร์ด เมื่อรังสีที่มีความยาวคลื่นเดียวผ่านตัวกลางที่ดูดกลืนแสง ความเข้มของรังสีจะลดลงแบบเอ็กซ์โปแนนเชียล เมื่อความหนาของเซลล์เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$I = I_0 c^{-k_1 b}$$

กฎของเบียร์ เมื่อรังสีที่มีความยาวคลื่นเดียวผ่านตัวกลางที่ดูดกลืนแสง ความเข้มของรังสีจะลดลงแบบเอ็กซ์โปแนนเชียล เมื่อความเข้มข้นของตัวกลางที่ดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น

$$I = I_0 c^{-k_1 c}$$

กฎทั้งสองนี้รวมเข้าด้วยกันเรียกว่า <u>กฎของเบียร์-แลมเบิร์ต</u>

$$I = I_0 e^{-k_3 bc}$$

$$\log_c \frac{I}{I_0} = -k_3 bc$$

$$\log_c \frac{I}{I} = k_3 bc$$

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = k_3 bc \ / 2.303$$

$k_3/2.303$ เข้าด้วยกันเป็นค่าคงที่ตัวใหม่ a เพราะฉะนั้น

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = abc = A$$

เมื่อ A = แอบซอร์แบนด์

a = ABSORPTIVITY

b = ความหนาของเซลล์ในหน่วยเซนติเมตร

c = ความเข้มข้นในหน่วย กรัม/ลิตร

ถ้าความเข้มข้น c มีหน่วยเป็นโล/ลิตร ABSORPTIVITY ที่เกี่ยวข้องจะเป็น MOLAR ABSORPTIVITY ซึ่งเป็นผลคูณของ ABSORPTIVITY และมวลโมเลกุลของตัวกลางที่ดูดกลืนแสง

$$A = Ebc$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าของ A จะเป็นอนันต์ ในกรณีที่รังสีทั้งหมดถูกดูดกลืน และจะเท่ากับศูนย์หากไม่มีการดูดกลืนรังสีเลย แต่ตามปกติ A จะมีค่าระหว่าง ศูนย์ถึง 2.0

เนื่องจาก $T = \frac{I}{I_0}$ และ $A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$

เพราะฉะนั้น $A = \log_{10} (\frac{1}{T})$

หรือ $\%\ T = \frac{I}{I_0} \times 100$ และ $A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$

ถ้า I_0 มีค่าเท่ากับ 100 % $\therefore$ % T = I

ดังนั้น $A = \text{lovg}_{10} \frac{100}{\%T} = \log_{10} 100 - \log_{10} \%T$

$A = 2 - \log_{10} \%T$

2.4 <u>การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยใช้รีเอเจนต์ SOMOGYI-NELSON</u> (10)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธีนี้ ขั้นแรกจะเป็นการนำน้ำตาลรีดิวส์ไปปฏิบัติการด้วยสารละลายด่างที่อุณหภูมิสูง ซึ่งในสภาพนี้น้ำตาลจะถูกย่อยและผลผลิตที่เกิดขึ้นจะไปรีดิวส์คิวปริคไอออนที่อยู่ในสารละลายได้เป็นคิวปรัสออกไซด์ การเติมโพแตสเซียมตาร์เตรทลงไป จะช่วยป้องกันไม่ให้คิวปรัสออกไซด์เกิดการตกตะกอน และใช้โซเดียมซัลเฟตในการป้องกันไม่ให้คิวปรัสไอออนเกิดการออกซิเดชันกลับไปโดยอากาศ การหาปริมาณของคิวปรัสออกไซด์ที่เกิดขึ้น กระทำโดยการนำไปทำปฏิกิริยากับฟอสฟอหรืออาร์เซโนโมลิบเดท ซึ่งเป็นรีเอเจนต์ที่ทำให้เกิดสี แล้วนำไปวัดค่าแอบซอร์แบนด์ในช่วงความยาวคลื่น 500-600 นาโนเมตร

2.5 <u>การวัดความเข้มข้นของกลูโคสที่มีเซลโลไบโอสอยู่ด้วย</u>

ในการวัดประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดส โดยใช้เซลโลไบโอสเป็นสับ-สเทรท มักจะทำการวัดปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นโดยวิธีกลูโคสออกซิเดส-เพอร์ออกซิเดส แต่วิธีนี้ต้องการเอนไซม์ถึงสองชนิด และสารประกอบที่ทำให้เกิดสีเช่น o-โทลิดีน หรือ o-ไดเอนซิดีน ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้เป็นสารก่อมะเร็ง วิธีการนี้นับว่าง่าย และเหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเชิงเศรษฐศาสตร์ ได้แก่ การใช้รีเอเจนต์ SOMOGYI-NELSON วัดความเข้มข้นของกลูโคสโดยที่มีเซลโลไบโอสอยู่ด้วย หลักการของวิธีนี้ ประกอบด้วย (11)

การนำเซลโลไบโอสเข้าทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ SOMOGYI-NELSON ความเข้มข้นของเซลโลไบโอส คำนวณได้จากสมการ

$$A_0 = E_c b C_0$$

เมื่อ A_0 = แอบซอร์แบนด์ของเซลโลไบโอสที่ความเข้มข้นเริ่มต้น

C_0 = ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลโลไบโอสในหน่วยไมโครโมล่าร์

E_c = MICROMOLAR ABSORBTIVITY ของเซลโลไบโอส

b = ความหนาของเซลล์ ซึ่งโดยปกติเท่ากับ 1 เซนติเมตร

เซลโลไบโอสที่ถูกไฮโดรไลซ์โดยเซลโลไบเอส และเข้าทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ SOMOGYI-NELSON แอบซอร์แบนด์ของสารละลาย เซลโลไบโอส-กลูโคส (A_t) สามารถแสดงอยู่ในรูป

$$A_t = E(C_o - C_t)_c + E_g G_t$$

เมื่อ C_t = ความเข้มข้นของเซลโลไบโอสที่ถูกไฮโดรไลซ์ (ไมโครโมล่าร์)

G_t = ความเข้มข้นของกลูโคสที่เกิดขึ้น (ไมโคโมล่าร์)

E_g = MICROMOLAR ABSORBTIVITY ของกลูโคส

เนื่องจากในกระบวนการไฮโดรไลซ์ เซลโลไบโอส 1 โมล ทำให้เกิดกลูโคสขึ้น 2 โมล ดังนั้น

$$C_t = \tfrac{1}{2} G_t$$

จากหลักการทั้ง 3 ข้อจะได้ว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$A_t - A_0 = (C_0 - C_t)\ E_c + E_g G_t - C_0 E_c$$
$$= E_g G_t - E_c C_t$$

แทนค่า C_t ด้วย $G_t/2$

$$A_t - A_0 = (E_g - E_c/2)\ G_t$$
$$G_t = \frac{A_t - A_0}{E_g - E_c/2}$$

จากสมการ จึงสามารถคำนวณความเข้มข้นของกลูโคส (G_t) และประสิทธิภาพของเซลโลไบเอส ได้จากแอบซอร์แบนด์เริ่มต้น แอบซอร์แบนด์สุดท้าย (A_o และ A_t) และ MICROMOLAR ABSORBTIVITY (E_g และ E_c)

2.6 <u>แหล่งของเซลลูเลส</u> (12)

จุลินทรีย์ สายพันธุ์ที่จะนำมาใช้ในการผลิตเซลลูเลส ควรมีคุณสมบัติที่เติบโตได้ง่าย ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง สามารถเคลื่อนย้ายเอนไซม์ที่ต้องการออกจากมวลเซลล์ได้ดี ไม่กลายพันธุ์ได้ง่าย และประการสำคัญต้องไม่ทำให้เกิดโรคหรือสร้างสารพิษ จุลินทรีย์ที่นำมาศึกษากันอย่างมากในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ <u>Trichoderma reesei</u> และ <u>Aspergillus niger</u>

<u>Trichoderma reesei</u> เป็นเชื้อราที่ทำการผลิตเซลลูเลสทั้งระบบได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นเชื้อราที่มีการนำมาศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเซลลูเลสกันมากที่สุด สายพันธุ์ที่ใช้กันในปัจจุบัน ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ปรับปรุงมาจาก <u>T. reesei</u> QM 6 A โดย US ARMY NATICK RESEARCH AND DEVELOPMENT COMMAND และโดยอาศัยสายพันธุ์นี้ได้มีการพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ QM 9213 และ QM 9414 ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้เพิ่มขึ้น (6) (ตารางที่ 1) ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในฟิลเทรทของเชื้อ <u>Trichoderma</u> สามารถเก็บไว้ในที่เย็นหรือไลโอฟิไลเซชั่น หรือผงอะซิโตนได้เป็นเวลาหลายเดือนโดยไม่สูญเสียคุณสมบัติ (13) สายพันธุ์กลายเหล่านี้ บางสปีชีส์สามารถสร้างโปรตีนนอกเซลล์ได้สูงถึง 10–20 กรัม/ลิตร ส่วนประกอบหลักของโปรตีนชนิดนี้คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 การผลิตเซลลูเลสโดยเชื้อรา Trichoderma[1] (13)

สายพันธุ์ QM	น้ำหนักแห้ง (mg/ml)[2]	โปรตีนในสภาพละลายได้ (mg/ml)	ประสิทธิภาพเซลลูเลส					
			Cx[3] (U/ml)		FP[4](U/ml)		ฝ้าย(U/ml)	
			F[5]	H[6]	F[5]	H[6]	F[5]	H[6]
6a	2.4	0.7	8	10	0.3	0.3	1.9	1.6
9123	1.6	1.5	22	29	0.9	0.9	3.4	3.5
9414	1.1	1.5	31	32	1.0	1.0	3.0	2.9

1 เชื้อที่เพาะอยู่บน 1 % พัล์พ 0.1 % โปรตีโอส เปปโตน 0.2 % ทวีน 80 0.01 % สารสกัดจากยีสต์ เป็นระยะเวลา 14 วัน

2 รวมถึงเซลลูโลสที่ตกค้าง

3 คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส

4 กระดาษกรอง

5 ทำการวัดประสิทธิภาพจากฟิลเทรท

6 ทำการวัดประสิทธิภาพจากฟิลเทรท + เชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ปริมาณสัมพัทธ์ของเซลลูเลสที่สร้างขึ้นโดย TRichoderma reesei และ Aspergillus niger

เอนไซม์	ปริมาณสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนนอกเซลล์ทั้งหมด)	
	Trichoderma reesei	Aspergillus niger
เซลโลไบโอไฮโดรเลส	50-80	0
แอนโดกลูคาเนส	8-12	2-3
β-กลูโคซิเดส	0.2-1	2-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลโลไบโอไฮโดรเลส ซึ่งมีอยู่ประมาณ 50–80 % ของโปรตีนที่ขับออกมา นอกจากนี้มีเอนโดกลูคาเนสอยู่ในสัดส่วนนี้น้อยกว่า และ β-กลูโคซิเดส อยู่ในระดับที่ต่ำมาก (6,14) (ตารางที่ 2)

เพื่อที่จะขจัดปัญหาที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจาก การที่เอนไซม์ของ T. seesei มี B-กลูโคซิเดสต่ำ จึงมักทำการเติม β-กลูโคซิเดสที่ผลิตแยกต่างหากลงในระบบ เชื้อราที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ผลิต β-กลูโคซิเดส ได้แก่ Aspergillus sp. บางสายพันธุ์ เช่น Aspergillus niger (6, 15) , A. phoenicis (16, 17) ทั้งนี้เพราะเชื้อราเหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ในปริมาณมาก และมีค่า DISSOCIATION CONSTANT (K_i) สูง (ตารางที่ 2 และ 3) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการใช้เซลลูเลสทั้งระบบที่ได้จาก Aspergillus sp. ร่วมกับเซลลูเลสที่ได้จาก T. reesei จะทำให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์สูงกว่าการใช้เฉพาะ β-กลูโคซิเดสชนิดเดียวจาก Aspergillus sp. ร่วมกับ เซลลูเลสจาก T. reesei (15)

2.7 คุณสมบัติของเซลลูเลส

2.7.1 เซลลูเลสของ Trichoderma ressei

เมื่อนำเซลลูเลสที่เตรียมขึ้นจากการเพาะเชื้อ T. reeseiไปแยกออกเป็นส่วนและนำไปทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเซลลูเลสทั้งสามชนิดเกิดขึ้นหลาย ๆ แบบ ดังแสดงในตารางที่ 4

T. reesei มีการสร้างเอนโดกลูคาเนส I และ II และ เซลโลไบโอไฮโดรเลส CBHI และ CBH II (6) เซลโลไบโอไฮโดรเลสแต่ละแบบจะมีปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกัน เซลโลไบโอไฮโดรเลส I (CBH I) สามารถแบ่งย่อยออกได้ 4 ไอโซไซม์ แต่ละไอโซไซม์มีมวลโมเลกุลเท่ากัน และมีชนิดของกรดอะมิโนเหมือนกันและมีปริมาณพอลิแซคคาไรด์อยู่ระหว่าง 1 ถึง 10 % สำหรับเซลโลไบโอไฮโดรเลส II (CBH II)มี 2 ไอโซไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ค่า MICHAELIS-MENTEN CONSTANT (K_m) และ K_i สำหรับ β-กลูโคซิเดสที่แยกได้จาก Trichoderma reesei และ Aspergillus niger

แหล่งที่มาของ β-กลูโคซิเดส	K_m (มิลลิโมล่าร์)	K_i สำหรับตัวยับยั้ง		Vmax[1] in kat/เอนไซม์มิลลิกรัม
		กลูโคส (มิลลิโมล่าร์)	กลูโคโน-แลคโตน (มิลลิโมล่าร์)	
Aspergillus niger	0.8	2.1	0.04	1400
Trichoderma reesei	0.2	0.7	0.04	700

[1] อัตราเร็วสูงสุดของการเกิดปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 เซลลูเลสชนิดต่าง ๆ ที่แยกได้จาก *Trichoderma reesei* (7)

ชนิดเอนไซม์	มวลโมเลกุล	จุดไอโซอิเลกทริค
เซลโลไบโอไฮโดรเลส		
เซลโลไบโอไฮโดรเลส I (CBH I)	60,000	3.9
เซลโลไบโอไฮโดรเลส II (CBH II)	60,000	5.6
เอนโดกลูคาเนส		
เอนโดกลูคาเนส I	20,000	7.5
เอนโดกลูคาเนส II	40,000	4.6
B-กลูโคซิเดส		
-กลูโคซิเดส I	47,700	5.74
-กลูโคซิเดส II	35,000	(-)[1]
-กลูโคซิเดส III	130,000	(-)[1]

[1] ไม่ได้ทำการตรวจสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
12347

2.7.2 เซลลูเลสของ Aspergillus sp.

Clarke and Stone (20) ศึกษาคุณสมบัติของเอนโดกลูคาเนส ที่แยกได้จาก Aspergillus niger พบว่า พีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5-6 และ K_m เท่ากับ 0.25 % เมื่อออกฤทธิ์ต่อสับสเทรทเซลลูโลสเดกซตรินซัลเฟต ในการไฮโดรไลซ์คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส เอนไซม์นี้จะไปทำให้ความหนืดลดลงอย่างรวดเร็ว แต่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ผลผลิตของการไฮโดรไลซ์ประกอบด้วย เซลโลเตตราโอสเซลโลเพนโตส เมื่อใช้เซลโลเดกซตรินเป็นสับสเทรทเอนไซม์จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วย Hg^{2+}ไอออน 1.0 มิลลิโมล่าร์ ฟีนิลเมอร์คิวริคไนเตรท 0.7 มิลลิโมล่าร์ และไอโอดีน 1.0 มิลลิโมล่าร์

Hurst และผู้ร่วมคณะ (21) ได้ทำการแยกเอนโดกลูคาเนสออกจากเซลลูเลสของ A. niger ที่เตรียมขึ้นในเชิงการค้า การแยกครั้งนี้ได้เอนไซม์ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อเซลลูเลสที่ผลิตเชิงการค้า 100 กรัม เอนไซม์ที่แยกได้นี้มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันในอัลตราเซนตริฟิวจ์ที่พีเอช 4.0 และ 8.0 และในโซเดียมโดเดคคิลซัลเฟต/พอลิเอคริลเลไมด์-เจล อิเลกโตรโฟลิซิส แต่จะแสดงแถบหลักหนึ่งแถบ และแถบรองสองแถบ ในดิสคเจลอิเลกโตรโฟลิซิส ในที่นี้ไม่พบว่ามีคาร์โบไฮเดรตอยู่รวมกับโปรตีน เอนไซม์ชนิดนี้มีกรดอะมิโนที่เป็นกรดและเอโรมาติคอยู่ในสัดส่วนที่สูง ซึ่งได้แก่ กรดแอ็สปาร์ติค ทรีโอนีน ซีรีน กรดกลูตามิค โพรลีน ไกลซีน และ เอลานีน และมีกรดอะมิโนที่เป็นเบสและที่มีกำมะถันในสัดส่วนที่ต่ำ การวิเคราะห์ส่วนประกอบและปริมาณกรดอะมิโน และการวิเคราะห์ด้วยโดเดคคิลซัลเฟต/พอลิเอคริลเลไมด์-เจล อิเลกโตรโฟลิซิส ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีมวลโมเลกุล 26000 เอนโดกลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์จะออกฤทธิ์ต่อคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส แต่ไม่พบว่ามีประสิทธิภาพต่อเซลโลไบโอสหรือ p-ไนโตรฟีนิล β-D-กลูโคไซด์ ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ พีเอชที่เหมาะสมแก่การทำงานของเอนไซม์อยู่ระหว่างพีเอช 3.8-4.0 และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีเสถียรภาพในช่วงพีเอช 1.0-9.0 เมื่อทำการทดสอบที่ พีเอช 4.0 เอนไซม์จะแสดงประสิทธิภาพสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส และในที่อุณหภูมิสูงเอนไซม์จะทนความร้อนที่พีเอช 8.0 ได้ดีกว่าที่พีเอช 4.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน 20 ตัวแรก ที่อยู่ทางปลายด้านอะมิโนของเซลโลไบโอไฮโดรเลส 2 แบบ และเอนโดกลูคาเนส (6) พบว่าเอนไซม์ทั้งสามจะมีปลายด้านอะมิโนเป็นกรดกลูตามิคเหมือนกัน ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนถัดจากกรดกลูตามิคของเซลโลไบโอไฮโดรเลส 2 รูปแบบ ไม่พบว่ามีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน แต่จะพบความคล้ายคลึงกันระหว่าง เซลโลไบโอไฮโดรเลส I และเอนโดกลูคาเนส II ในกรณีของเซลโลไบโอไฮโดรเลส I สามารถหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนได้เกือบหมดแล้ว ไอโซเอนไซม์ของเซลโลไบโอไฮโดรเลส I ทุกตัวจะมีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนเหมือนกัน ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า ไอโซเอนไซม์เหล่านี้เกิดมาจากพอลิเปปไทด์สายเดียวกัน

ในการศึกษาเซลโลไบโอไฮโดรเลส ที่แยกได้จากของเหลวที่ได้จากการเพาะเชื้อ T. reesei โดยการใช้ BIOSPECIFIC SORPTION บนเซลลูโลสสภาพอสัณฐาน (AMORPHOUS CELLULOSE) และอิมมิวโนแอฟฟินิตี โครมาโตกราฟี (18) พบว่าเอนไซม์จะแสดงแถบของโปรตีนเพียงแถบเดียวใน พอลิแอคริลลาไมด์-เจล อิเลกโตรโฟลิซิส มวลโมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 65,000 และมี pI เท่ากับ 4.2-3.6 เอนไซม์ที่บริสุทธิ์มีเฮกโซสเป็นส่วนประกอบอยู่ 10 %

β-กลูโคซิเดสที่แยกได้จาก T reecei QM 9414 มีอยู่ด้วยกัน 3 แบบ (19) โดยมีจุดไอโซอิเลกทริคอยู่ที่ pI 8.4, 8.0 และ 7.4 B-กลูโคซิเดส ที่มี pI 8.4 ไม่พบว่ามีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบ มวลโมล่าร์ของเอนไซม์เท่ากับ 7×10^4 กรัม/โมล พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ระยะเวลาทดสอบ 30 นาที ถ้านำเอนไซม์ไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 ในโซเดียมซิเตรท 50 มิลลิโมลาร์ นาน 7 ชั่วโมง เอนไซม์จะสูญเสียกัมมันตภาพ 3 % ค่า K_m ต่อเซลโลไบโอส และ p-ไนโตรฟีนิล-β-D-กลูโคไพราโนไซด์ มีค่าเท่ากับ 0.5 และ 0.3 มิลลิโมล่าร์ ตามลำดับ β-กลูโคซิเดสจะไฮโดรไลซ์ เซลโล-เดกซตริน แซลโลโตรโอส ถึงเซลโลออกตาโอส) โดยการไปสลายหน่วยกลูโคส ออกจากด้านปลายที่ไม่ได้เป็นตัวรีดิวส์ของโอลิโกเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์กลายของ Aspergillus niger VTT-D-77050 ทำการสร้าง B -กลูโคซิเดสคิดเป็นปริมาณ 25 % ของโปรตีนที่ขับออกมา β-กลูโคซิเดสที่บริสุทธิ์มีมวลโมเลกุล 150,000 และประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 2 สาย Km ของเอนไซม์ในการไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอส มีค่าเท่ากับ 1.8 มิลลิโมล่าร์ และมีค่า K_i ต่อกลูโคโน-β-แลคโตนเท่ากับ 0.09 มิลลิโมล่าร์ ในขณะที่ K_m ในการไฮโดรไลซ์ไนโตรฟีนิล-β-กลูโคไซด์มีค่าเท่ากับ 0.8 มิลลิโมล่าร์ และมีค่า K_i ต่อกลูโคสและกลูโคโน-β-แลคโตนเท่ากับ 2.1 และ 0.04 ตามลำดับ (25)

β-กลูโคซิเดสที่แยกได้จาก Aspergillus phoenicis (16) สามารถไฮโดรไลซ์ เอธิล β-กลูโคไซด์ และกลูโคซิล β-กลูโคไซด์ได้อย่างรวดเร็ว และไฮโดรไลซ์อัลคิล β-กลูโคไซด์ได้ในอัตราที่ช้ากว่า เอนไซม์ออกฤทธิ์ต่อเตตราเมอร์ได้ดีกว่าไดเมอร์ และถูกยับยั้งอย่างรุนแรงโดยโนจิริมัยซิน เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์ B-กลูโดไพราโนไซด์ แต่ไม่ไฮโดรไลซ์ β-กลูโคฟิวราโนไซด์ k_m ของเอนไซม์ชนิดนี้มีค่าเท่ากับ 0.75 มิลลิโมล่าร์ ในกรณีที่เซลโลไบโอสเป็นสับสเทรท 0.36 มิลลิโมล่าร์ ในกรณีที่เซลโลเตตราโอสเป็นสับสเทรท และ 44 มิลลิโมล่าร์ในกรณีของเอธิลกลูโคไซด์ อัตราเร็วสูงสุดในการไฮโดรไลซ์ เซลโลไบโอส และเซลโลเตตราโอส มีค่าเท่ากับ 164 และ 95 ไมโครโมลของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมตามลำดับ ถ้าเซลโลไบโอสมีความเข้มข้นมากกว่า 10 มิลลิโมล่าร์ และเซลโลเตรตาโอสมีความเข้มข้นมากกว่า 4 มิลลิโมล่าร์ จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

เซลโลไบเอส ของ Aspergillus foetidus (26) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 130,000 และมีจุดไอโซอิเลกทริคเท่ากับ 4.3 เอนไซม์จะไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสในอัตราสูงสุดที่ พีเอช 4.5 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนความแรงไอออนจาก 0 ถึง 2 โมล่าร์ โซเดียมคลอไรด์ และการมีเกลือโลหะชนิดต่าง ๆ EDTA และ p-คลอโรเมอคิวริเบนโซเอตอยู่ในสารละลายเอนไซม์ จะไม่มีผลใด ๆ ต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ เอนไซม์ทำลายพันธะ β-1,4 ได้ดี และไฮโดรไลม์ o- และ p-ไนโตรฟีนิล- β-D-กลูโคไพราไนไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาแบบแผนการทำงาน และความจำเพาะต่อสับสเทรทของเอนโดกลูคาเนสที่ได้จาก A. niger(22) พบว่า เอนไซม์ไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่อยู่ในสภาพผลึกได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่จะสามารถไฮโดรไลซ์อนุพันธุ์เซลลูโลสที่ละลายในตัวทำละลายและเซลลูโลสที่พองตัวด้วยด่างซึ่งอยู่ในสภาพสัณฐาน (AMORPHOUS-ALKALI-SWOLLEN CELLULOSE) ได้อย่างรวดเร็ว เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์ บาร์เลย์กลูแคน และไลเคนิน (LICHENIN) ได้ดีกว่า คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสและไฮโดรไลซ์ คาร์บอกซีเมธิลแพกไดแมน (CARBOXYMETHYL PACHYMAN) และไซแลนได้เล็กน้อย แต่ไม่ไฮโดรไลซ์ เซลโลไบโอส และ p-ไนโตรฟีนิล β-D- กลูโคไซด์

Hurst และผู้ร่วมคณะ (23) ยังได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเอนโดกลูคาเนสอันเนื่องมาจากสารเคมีชนิดต่าง ๆ ผลของการศึกษาพบว่า N-โบรโมซัคซินิไมด์จะยับยั้งการออกฤทธิ์ของเอนโดกลูคาเนสอย่างสมบูรณ์ แต่คาร์บอกซิเมธิลเซลลูโลสจะช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการยับยั้งในลักษณะเช่นนี้ได้ นอกจากนี้เอนไซม์ยังถูกยับยั้งด้วย แอคทีฟเบนซิลเฮไลด์ และสารประกอบของไดเอโซคาร์บอนิลที่มี Cu^{2+}ไอออนอยู่ด้วย คาร์บอดิ-อิไมด์ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนโดกลูคาเนสเช่นกัน และการวิเคราะห์เชิงเจลน์พลศาสตร์ได้แสดงให้เห็นว่า ในช่วงที่เกิดการยับยั้งจะมีคาร์บอดิ-อิไมด์ 1 โมลโดยเฉลี่ยไปยึดจับกับเอนไซม์ เมื่อนำเอนไซม์ไปผ่านไดเอธิลไพโร-คาร์บอเนต ปรากฏว่า เอนไซม์มีประสิทธิภาพเหลือเพียง 40 % ของที่เริ่มต้น Ag^{+}และ Hg^{+} ไอออนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยไปเข้าทำปฏิกิริยากับส่วนทริพโทแฟนมากกว่าที่จะเข้าไปทำกับกลุ่มไทออล

การศึกษาของ Vidmar และผู้ร่วมคณะ (24) พบว่า ภายใต้สภาวะที่มีการผลิตกรดซิตริกโดย A.niger จะตรวจพบเอนโดกลูคาเนส 2 ชนิด คือ ชนิด A มีมวลโมเลกุล 43,000 และ ชนิด B มีมวลโมเลกุล 25,000 เอนไซม์ทั้งสองมีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ พีเอชเหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสอยู่ระหว่าง 2 ถึง 7 และไม่สามารถที่จะย่อยเซลลูโลสในสภาพผลึก ในช่วงพีเอชที่เป็นกรดเอนไซม์มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูง ประมาณว่า สูงกว่า 60 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าในช่วงพีเอชที่เป็นด่าง เอนไซม์ทั้งสองนี้ถูกยับยั้งด้วยไอโอดีน $HgCl_2$และ N-โบรโมซัคซินิไมด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 การสังเคราะห์เซลลูเลส (CELLUIASE BIOSYNTHESIS) (14)

การสังเคราะห์เซลลูเลสของเชื้อรา จะถูกควบคุมด้วยกลไกการเหนี่ยวนำ-การกดดัน (INDUCTION-REPRESSION MECHANISM) โดยเซลล์ของเชื้อราจะทำการสร้างเซลลูเลสนอกเซลล์ขึ้นมา ก็ต่อเมื่อ มีสับสเทรทที่เหมาะสมอยู่ในอาหารเพาะเชื้อ และการสังเคราะห์เซลลูเลสนอกเซลล์ที่เกิดขึ้นหลังจากมีการเหนี่ยวนำ จะถูกยับยั้งได้เมื่อมีกลูโคสหรือน้ำตาลอื่น ๆ บางชนิดอยู่ในอาหารเพาะเชื้อ นอกจากนี้ ยังมีกลไกอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูเลส ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้

- กลไกการขนส่งที่ควบคุมการขับเซลลูเลสออกนอกเซลล์

- ระบบเอนไซม์ขนส่ง และ/หรือ ระบบไกลโคซิเดส ที่ควบคุมการขนส่งและการใช้ตัวเหนี่ยวนำพอแทนเชียล (POTENTIAL INDUCER)

- ระบบการขนส่งและกลูโคซิเดสที่ยึดจับอยู่ที่เยื่อเซลล์ จะเป็นตัวควบคุมปริมาณของตัวเหนี่ยวนำที่เข้าสู่เซลล์ ในขณะที่กลูโคซิเดสในเซลล์ จะเป็นตัวควบคุมปริมาณตัวเหนี่ยวนำแอคทีฟ (ACTIVE INDUCER)

- สัมพรรคภาพระหว่างตัวเหนี่ยวนำ และตัวกดดัน (AFFINITY OF INDUCER-REPRESSOR) จะเป็นตัวกำหนดประสิทธิภาพของการเหนี่ยวนำ ในขณะที่การกดดันแคเทบอไลท์ และครึ่งชีวิตของ m-RNA จะเป็นตัวควบคุมประสิทธิภาพที่แท้จริงของการถอดรหัสและการแปลรหัส

- ปริมาณกลูโคสและกลูโคโนแลคโตน (ผลผลิตที่ได้จากการออกซิเดชันกลูโคส) ในเซลล์ จะมีผลต่อประสิทธิภาพของกลูโคซิเดสในเซลล์

2.8.1 การเหนี่ยวนำ (INDUCTION)

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์เหนี่ยวนำชนิดหนึ่ง ตัวเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เซลลูเลสที่รู้จักกันดี คือ เซลลูโลส เซลโลไบโอส โซฟอโรส และแลคโตส ตัวเหนี่ยวนำเหล่านี้โดยทั่วไปจะทำหน้าที่สองประการ คือ ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการจัดจำแนกที่มีความสำคัญมากกว่า ได้แก่ การจัดจำแนกมิวตาเจนตามชนิดของการเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งจะอาศัยปัจจัยสองประการ คือ ชนิดของความเสียหายของ DNA ที่เกิดขึ้นจากมิวตาเจน และกิจกรรมของเซลล์ในการซ่อมแซม DNA ที่เกิดความเสียหาย

ปรากฏการณ์ความจำเพาะของมิวตาเจน กล่าวคือ มิวตาเจนชนิดหนึ่ง ๆ มักจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ส่วนหนึ่ง ๆ ที่จำเพาะของจีโนม ในขณะที่ส่วนอื่น ๆ จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

สภาพแวดล้อมที่ใช้ในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งจะมีผลต่อทั้งวิธีการซ่อมแซมและต่อชนิดของการกลายพันธุ์

การเปลี่ยนแปลงที่ระดับยีน ในปัจจุบัน ยังไม่สามารถทำนายได้ว่า จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประเภทใด ที่ระดับโมเลกุลในการปรับปรุงสายพันธุ์หนึ่ง ๆ ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงมักใช้การกระทำที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหลาย ๆ ประเภทร่วมกัน เพื่อที่จะทำให้เกิดสายพันธุ์ที่ปรับปรุงจำนวนมากที่สุดเท่าที่จะมากได้ หลังจากนั้นจึงนำมาคัดเลือกในขั้นต่อไป

ความสะดวกและความปลอดภัยในการใช้มิวตาเจน ซึ่งทั้งสองประการนี้มักสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน มิวตาเจนทุกชนิดมีอำนาจเป็นสารก่อมะเร็ง (CARCINOGENS) ดังนั้นในระหว่างการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ จึงต้องระมัดระวังอย่างมาก

มิวตาเจนที่นับว่าใช้สะดวกที่สุด และเหนี่ยวนำให้ DNA เกิดความเสียหายได้ทุกชนิด ได้แก่ ช่วงอัลตราไวโอเลตใกล้ นอกจากนี้ยังสามารถระมัดระวังไม่ให้เกิดอันตรายจากบิวตาเจนชนิดนี้ได้ง่ายด้วย

รังสีอัลตราไวโอเลต (ULTRAVIOLET LIGHT) เป็นรังสีที่มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 4-400 นาโนเมตร ซึ่งแบ่งออกได้เป็นสองช่วง ช่วงแรกมีความยาวคลื่นตั้งแต่ 4-200 นาโนเมตร เรียกว่า ช่วงอัลตราไวโอเลตไกล (FAR UV) อีกช่วงหนึ่งมีความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-400 นาโนเมตร เรียกว่า ช่วงอัลตราไวโอเลตใกล้ (NEARUV)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รังสีอัลตราไวโอเลตมีพลังงานประมาณ 4.1 อิเลกตรอนโวลต์ หรือ 96×10^3 แคลอรี/โมล

รังสีอัลตราไวโอเลต เป็นมิวตาเจนที่มีประสิทธิภาพสูง ในการทำให้จุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์ ความยาวคลื่นที่จะทำให้เกิดกลายพันธุ์ได้นั้นอยู่ระหว่าง 200-300 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่กรดนิวคลีอิคสามารถดูดกลืนรังสีได้ดีที่สุด รังสีอัลตราไวโอเลตจะไปทำให้เกิดการสร้างพันธะเคมีขึ้นระหว่างไพริมิดีนนิวคลีโอไทด์ ที่อยู่ติดกันในโมเลกุลของ DNA ลักษณะการที่เบสไพริมิดีน 2 โมเลกุลที่อยู่ในสายเดียวกันเกิดการเชื่อมติดกันนี้ เรียกว่า เกิดไดเมอร์ขึ้น ในไพริมิดีนไดเมอร์ 3 ชนิดที่อาจเกิดขึ้น ซึ่งได้แก่ ไทมีน-ไทมีน ไทมีน-ไซโตรซีน และไซโตซีน-ไซโตซีน ไดเมอร์ โอกาสที่จะเกิด ไทมีน-ไทมีน ไดเมอร์ จะสูงกว่าการเกิดไดเมอร์อีกสองชนิด นอกจากนี้รังสีอัลตราไวโอเลตยังทำให้เกิด ไซโตซีนไฮเดรตขึ้นด้วย ไซโตซีนไฮเดรตนี้จะมีการเปลี่ยนรูปไปเป็นรูปแบบที่อาจไปจับคู่กับอะดีนีน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบ G-C ⟶ A-T TRANSITION

2.10 การหมักสถานะของแข็ง (SOLID STATE FERMENTATION)(27, 28, 29)

การหมักสถานะของแข็ง เป็นกระบวนการเติบโตและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวของสับสเทรท ที่ซึ่งเป็นวัสดุที่มีความชื้นอยู่ในรูปที่ถูกดูดซับไว้ ข้อจำกัดสูงสุดในอันที่จะถือว่าเป็นการหมักสถานะของแข็งจะขึ้นอยู่กับ ความสามารถในการดูดซับ (ABSORBANCY) มากกว่าจะขึ้นอยู่กับปริมาณความชื้น วัสดุแต่ละประเภทมีความสามารถในการดูดซับแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามสับสเทรทส่วนใหญ่ก่อนที่จะมีระดับความชื้นถึง 80 % จะเริ่มมีน้ำในรูปโมเลกุลอิสระปรากฏขึ้น ตัวอย่างของกระบวนการหมักสถานะของแข็งที่พบมากได้แก่ การทำปุยหมัก การเพาะเห็ด การทำเนยแข็ง การทำเต้าเจี้ยว เป็นต้น

2.10.1 ลักษณะเฉพาะของการหมักสถานะของแข็ง

สับสเทรทที่นำมาใช้ในการหมักสถานะของแข็งมาแต่ดั้งเดิม มักเป็นผลผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเซลล์ และทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เซลลูเลส แต่ในบางกรณี โซฟอโรส จะทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำแกรทิวทัส (GRATUITOUS INDUCER) (ตัวเหนี่ยวนำที่ไม่ถูกไฮโดรไลซ์ หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีภายหลังจากที่เข้าสู่เซลล์)

2.8.2 การกดดันแคเทบอไลท์ (CATABOLITE REPRESSION)

การสังเคราะห์เซลลูเลสในเชื้อรา จะถูกกดดันได้จากกลูโคสและแหล่งคาร์บอนที่ถูกย่อยได้ง่าย ถ้าทำการเติมกลูโคสลงในอาหารเพาะเชื้อที่มีตัวเหนี่ยวนำ จะทำให้การสังเคราะห์เซลลูเลสหยุดลงได้ เมื่อกลูโคสที่เติมลงไปถูกใช้ไปจนหมดหรือ ทำการเคลื่อนย้ายเซลล์ออกจากอาหารที่มีกลูโคสไปสู่อาหารที่มีตัวเหนี่ยวนำเพียงอย่างเดียว จะทำให้เซลล์เริ่มต้นการสังเคราะห์เซลลูเลสขึ้นใหม่ได้ Trichoderma reesei สามารถเติบโตได้ดีบนกลูโคส แต่การสังเคราะห์เซลลูเลสจะเกิดขึ้นเมื่ออาหารเพาะเชื้อไม่มีกลูโคสอยู่

2.9 การปรับปรุงการผลิตเซลลูเลส

การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ เป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อการพัฒนากระบวนการหมักเพื่อผลิตสารต่าง ๆ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะการทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง การปรับปรุงสายพันธุ์นี้เป็นการทำให้สายพันธุ์ที่พัฒนานั้น มีอำนาจการผลิตสูงขึ้น มีความสามารถที่จะใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก หรือมีคุณลักษณะพิเศษที่ต้องการเพิ่มขึ้น วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับกันทั่วไป ได้แก่ การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (MUTAGENESIS)

การเลือกชนิดของมิวตาเจนที่จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ขึ้นอยู่กับปัจจัยดังต่อไปนี้

ชนิดของมิวตาเจน มิวตาเจนแบ่งออกได้เป็นสองชนิด คือ มิวตาเจนเชิงกายภาพ เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีแกมมา และรังสี-เอ็กซ์ และมิวตาเจนที่เป็นสาร เช่น เอธิลมีเธนซัลโฟเนต ไนโตรโซเมธิลกวานิดีน และมัสทาร์ด อย่างไรก็ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่าง ๆ ที่ได้จากทางการเกษตร เช่น ข้าวจ้าว ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ถั่วเหลือง เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบัน ได้มีการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ทางการป่าไม้ และทางการแปรรูปอาหารมาใช้มากขึ้น สับสเทรทที่ใช้ส่วนใหญ่ อยู่ในรูปพอลิเมอร์เชิงซ้อนทั้งสิ้น ซึ่งจะต้องถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ก่อนจุลินทรีย์จึงจะสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในเมแทบอลิซึม นอกจากนี้ สับสเทรทมักเป็นสารประกอบคาร์บอนที่มีมวลโมเลกุลสูงหลาย ๆ ชนิดผสมกันอยู่ ซึ่งอาจไปเกี่ยวข้องกับ กลไกการเหนี่ยวนำ การยับยั้ง และการกดดันในเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์

สับสเทรทรูปของแข็งนี้ อาจพิจารณาในลักษณะที่เป็นสารผสมระหว่างก๊าซของเหลว และของแข็ง โดยเฟสที่เป็นของเหลวจะอยู่เกี่ยวเนื่องอย่างใกล้ชิดกับพื้นผิวของของแข็งในสภาพการดูดซับต่าง ๆ กัน และในขณะเดียวกันจะสัมผัสอยู่กับเฟสที่เป็นก๊าซซึ่งติดต่ออยู่กับก๊าซในสภาพแวดล้อมภายนอก น้ำบางส่วนจะยึดจับอยู่กับพื้นผิวของของแข็งอย่างแน่นหนา บางส่วนจะยึดจับอยู่อย่างหนาแน่นน้อยกว่า และบางส่วนอาจอยู่ในสภาพอิสระภายในบริเวณแคพิลารีของของแข็ง ซึ่งการที่จะอยู่ในลักษณะใดมากกว่ากันนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณความชื้นของสับสเทรท พื้นผิวตรงบริเวณที่มีการสัมผัสกันระหว่างก๊าซและของเหลว จะเป็นจุดที่เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจน และเป็นจุดที่เกิดการถ่ายโอนความร้อนด้วย เฟสที่เป็นของแข็งมักจะเป็นแหล่งของสารอาหารของจุลินทรีย์ที่ทำการเพาะ การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีของสับสเทรทอาจทำโดยการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (PROXIMATE ANALYSIS) ในเทอมของปริมาณ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไลพิด และเถ้า หรือโดยการวิเคราะห์เชิงธาตุ (ELEMENTAL ANALYSIS)

เนื่องจากการหมักสถานะของแข็ง มีปริมาณน้ำอยู่ไม่มากนัก ประเภทของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการหมักส่วนใหญ่ จึงเป็นพวกเชื้อราที่สร้างเส้นใย ทั้งนี้เพราะเชื้อราสามารถเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นต่ำ และบริเวณที่มีความเข้มข้นของสารอาหารสูง ๆ เชื้อราบางสปีชีส์สามารถเติบโตได้แม้แต่ในบริเวณที่มีความชื้นต่ำถึง 14 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.2 จุดเด่นและปัญหาของการหมักสถานะของแข็ง

ในเชิงวิศวกรรมศาสตร์ การหมักสถานะของของแข็งมีจุดเด่นที่น่าสนใจอยู่หลายประการ คือ

ประการแรก การที่การหมักสถานะของแข็ง ไม่มีน้ำในรูปโมเลกุลอิสระปรากฏอยู่ ทำให้ปริมาตรอาหารต่อสับสเทรทหนึ่งกรัมลดลงอย่างมาก ลักษณะเช่นนี้ทำให้เกิดผลดีในด้านต่าง ๆ เช่น

- เครื่องมือที่ใช้ในกระบวนการหมักใช้เนื้อที่ในการติดตั้งน้อย เมื่อเทียบกับผลผลิตที่ได้ (อย่างน้อยที่สุด การหมักสถานะของของแข็งจะทำให้ได้ปริมาณผลผลิตสูงพอ ๆ กับกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง)

- ช่วยขจัดปัญหาที่เกิดขึ้นจากของเสียที่อยู่ในรูปของเหลว

- ส่วนใหญ่ไม่ต้องอาศัยการกรอง เนื่องจากผลผลิตจะรวมกันอยู่อย่างเข้มข้นภายในสับสเทรทและสามารถนำไปใช้ได้โดยตรง

- ถ้าจำเป็นที่จะต้องทำการสกัดผลผลิตออกจากสับสเทรท (เช่น การผลิตเอนไซม์) ปริมาณตัวทำละลายที่ใช้จะน้อยกว่าที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

- บริเวณเก็บรักษาที่ต้องใช้ทันทีภายหลังจากการหมักจะมีเนื้อที่ลดลงอย่างมาก

ประการสอง เนื่องจากแบคทีเรียส่วนมากต้องใช้ระดับความชื้นสูงจึงจะสามารถดำรงชีพอยู่ได้ การหมักสถานะของแข็งจึงขจัดหรือลดปัญหาที่เกิดเนื่องจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียลงไปอย่างมาก กระบวนการเหล่านี้จึงไม่ต้องอาศัยการทำให้ไร้เชื้อ

ประการสาม อาหารที่ใช้เป็นอาหารที่ค่อนข้างง่าย ๆ ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ เช่น ใช้เมล็ดพืชร่วมกับน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประการสี่ การป้อนอากาศทำได้ง่ายเนื่องจากมีช่องอากาศอยู่ระหว่างอนุภาคของสับสเทรท นอกจากนี้การผสมวัสดุที่อยู่ข้างใต้ให้เข้ากับวัสดุที่อยู่ด้านบนอย่างคงที่จะทำให้เกิดการป้อนอากาศได้อย่างพอเพียง

อย่างไรก็ตาม การหมักสถานะของแข็งจะพบปัญหาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องอยู่ ได้แก่

ชนิดจุลินทรีย์ซึ่งสามารถใช้ในการหมักสถานะของแข็ง จะจำกัดอยู่กับเฉพาะจุลินทรีย์ที่สามารถเติบโตได้ในระดับความชื้นต่ำ ซึ่งได้แก่ เชื้อรา ยีสต์บางสปีชีส์ และ สเตรปโตมัยซีต

การหมักสถานะของแข็งที่ดำเนินการในสเกลขนาดใหญ่ จะพบปัญหาเกี่ยวกับการระบายความร้อน

การวัดระดับความชื้น ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ พีเอช และปริมาณผลผลิตทำได้ค่อนข้างลำบาก

ข้อมูลทางด้านการหมักสถานะของแข็งยังมีอยู่ไม่มากนัก

2.11 <u>แกลบ (HUSK OR HULL)</u> (30, 31)

แกลบเป็นผลพลอยได้ หนึ่งในสองชนิด ที่ได้จากการสีข้าวเปลือกให้ได้เป็นข้าวขาว และเกิดขึ้นเป็นปริมาณ 16-25 % โดยน้ำหนักของข้าวเปลือกที่นำไปสี สำหรับในไทยจะเกิดขึ้นเป็นปริมาณ 19-24 % โดยน้ำหนักของข้าวเปลือก

ด้วยเหตุที่แกลบที่ได้จากการสีข้าวทั่วประเทศมีเป็นปริมาณมาก ดังนั้นถ้าสามารถหาวิธีที่จะใช้แกลบเหล่านี้ให้เกิดประโยชน์ขึ้นในเชิงเศรษฐศาสตร์ โดยเฉพาะถ้าพบวิธีที่ทำให้แกลบกลายเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรม จะส่งผลทำให้รายได้จากการทำนาเพิ่มขึ้นได้ทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการพัฒนาการเกษตรและตามด้วยการพัฒนาเศรษฐกิจของชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.1 ลักษณะเชิงกายภาพ

แกลบ ประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นเปลือกชั้นนอก ซึ่งห่อหุ้มเมล็ดข้าว (RICE KERNAL) ไว้ มีสีน้ำตาลออกเทา เหนียว และมีคุณสมบัติสามารถต้านทานต่อสภาพอากาศต่าง ๆ ได้อย่างดี เนื่องจากแกลบมีครูดไฟเบอร์ และเถ้าในสัดส่วนที่สูง ฉะนั้นจึงมีคุณค่าทางอาหารต่ำมาก

แกลบที่ไม่ได้บด จะมีความยาวประมาณ 2 ถึง 4 เท่าของความกว้าง มี BULK DENSITY ประมาณ 0.1-0.16 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร และมีความหนาแน่นแท้จริงประมาณ 0.67-0.74 กรัม/ลูกบาสก์เซนติเมตร แกลบสามารถถูกอัดให้มีความหนาแน่นประมาณ 0.4 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร และการบดจะช่วยเพิ่ม BULK DENSIY ได้ประมาณ 2 ถึง 5 เท่า THERMAL CONDUCTIVITY ของแกลบที่ไม่ได้บด มีค่าประมาณ 0.048 กิโลแคลอรี/เมตร.ชั่วโมง (องศาเซลเซียส) และของแกลบบดมีค่าประมาณ 0.058 กิโลแคลอรี/เมตร.ชั่วโมง (องศาเซลเซียส) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ THERMAL CONDUCTIVITY ของวัสดุที่เป็นฉนวนอย่างดี

2.11.2 ส่วนประกอบของแกลบ

โดยทั่วไปนั้น แกลบจะประกอบไปด้วย ความชื้น เถ้า (ส่วนใหญ่เป็นซิลิกา) ลิกนิน เซลลูโลส เพนโตแซน โปรตีนเล็กน้อย และวิตามินในปริมาณน้อยมาก ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ภายในแกลบมีอยู่เป็นปริมาณถึง 72 % โดยน้ำหนัก ส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในแกลบที่มีรายงานการวิเคราะห์ออกมานั้น มักมีปริมาณไม่แน่นอน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยดังต่อไปนี้

- ชนิดของข้าวเปลือก
- ปริมาณราที่ปนเปื้อน ซึ่งเป็นผลมาจากเทคนิคในการสีข้าว
- สภาวะที่ใช้ในการเพาะปลูก
- ปัจจัยสภาพทางภูมิศาสตร์
- อายุของข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- วิธีการเตรียมตัวอย่างที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์
- วิธีการวิเคราะห์
- ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ ซึ่งจะมีผลต่อปริมาณความชื้นในแกลบ

อย่างไรก็ตาม ค่าเฉลี่ยของปริมาณส่วนประกอบต่าง ๆ อาจพอสรุปได้ ดังนี้ (% น้ำหนักแห้ง) เถ้า 20 % , ซิลิกา , 95 % ของเถ้า , ลิกนิน 22 % , เซลลูโลส 38 % , เพนโตแซน 18 % และสารอินทรีย์อื่น ๆ 2 % ส่วนความชื้นอาจคิดเป็นปริมาณ 9 % (โดยน้ำหนักเปียก) ซึ่งจะสอดคล้องกับความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 50 %

2.12 <u>การผลิตเซลลูเลสโดยวิธีการหมักสถานะของแข็ง</u>

ในประเทศญี่ปุ่น กระบวนการผลิตเซลลูเลสเชิงอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นกระบวนการเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง และสับสเทรทที่มักนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ ได้แก่ รำข้าวสาลี ตั้งแต่ปี 1962 ถึง 1974 ญี่ปุ่นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลลูเลสจาก 400 เป็น 3000 หน่วยกระดาษกรองต่อมิลลิกรัมบนอาหารแข็ง ทั้งนี้เป็นผลมาจากการคัดเลือกสายพันธุ์ <u>Trichoderma reesei</u> และการพัฒนาสถานะที่ใช้ในการเพาะเชื้อ ส่วนเซลลูเลสที่เตรียมขึ้นในเชิงพานิชย์จาก <u>Aspergillus niger</u> มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นจาก 200 เป็น 500 หน่วยต่อมิลลิกรัม

Toyama (32) ได้ทดลองใช้ขี้เลื่อยในการผลิตเอนไซม์ โดยขี้เลื่อยที่ใช้มี 2 ชนิด ชนิดหนึ่งไม่ผ่านการปฏิบัติการใด ๆ ส่วนอีกชนิดหนึ่งนำมาทำการขจัดลิกนินโดยการใช้สารละลายกรดเพอร์อะซิติก และโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง ขี้เลื่อยทั้งสองชนิดนำมาผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 8 : 2 เมื่อทำการบ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลานาน 5 วัน พบว่า ขี้เลื่อยที่ไม่ผ่านการปฏิบัติการใด ๆ จะให้ประสิทธิภาพของเซลลูเลสสูงกว่าขี้เลื่อยที่ผ่านการปฏิบัติการ เมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ประเภทเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว หนังสือพิมพ์ และ CARDBCARD ที่ผสมเข้ากับเพทโทรยีสต์หรือเจิร์มข้าวสาลีมาเป็นสับสเทรทสำหรับการผลิตเอนไซม์ ปรากฏว่าสับสเทรทที่ไม่ได้ผ่านการปฏิบัติการจะทำให้ได้ประสิทธิภาพของเซลลูเลสสูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chahal (33) ได้ชี้ให้เห็นถึงแนวทางการผลิตสารเชิงซ้อน เซลลูเลส โดยอาศัยวิธีการหมักสถานะของแข็ง สับสเทรทที่ใช้ได้แก่ ฟางข้าวสาลี ซึ่งได้นำมาปฏิบัติการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณเล็กน้อย เพื่อละลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสบางส่วน และทำให้ส่วนของเซลลูโลสเปิดเผยออกมา ฟางข้าวที่ปฏิบัติการแล้วนี้ไม่ได้ทำการล้าง และยังคงปล่อยให้ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสอยู่ในอาหารเพาะเชื้อ การปฏิบัติการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะกระทำโดยใช้น้ำในปริมาณน้อยที่สุด เพื่อที่ว่าภายหลังจากที่ทำการเติมสารอาหารและกล้าเชื้อ ปริมาณความชื้นน้อยกว่า 80% (wt/wt) ซึ่งจะปราศจากน้ำอิสระภายในอาหาร ในการศึกษาได้ใช้ Trichoderma reesei QMY-1 เป็นแหล่งของเซลลูเลส

ในกระบวนการหมักจะแบ่งอาหารออกเป็น 2 ชุด ชุดหนึ่งใช้ความเข้มข้นสารอาหารเต็มตามสูตร ในขณะที่อีกชุดหนึ่งใช้ความเข้มข้นของสารอาหารเพียงครึ่งหนึ่งของสูตร ทั้งนี้เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารอาหารที่มีต่อจุลินทรีย์ ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่า T. reesei QMY-1 มีความทนทานต่อสารอาหารที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ได้ เชื้อจะให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์สูงสุด (8.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร) และให้ผลได้เซลลูเลสสูงสุด (430 หน่วยต่อกรัมเซลลูโลส) เมื่อเติบโตบนสารอาหารที่มีความเข้มข้นเต็มตามสูตร เป็นเวลา 22 วัน อย่างไรก็ตามถ้าใช้ความเข้มข้นของสารอาหารเพียงครึ่งเดียว ประสิทธิภาพเซลลูเลสจะตกลงเหลือ 7 หน่วยต่อมิลลิลิตร และผลได้เซลลูเลสเท่ากับ 355 หน่วยต่อกรัมเซลลูโลส และไม่พบว่าผลได้ของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นภายหลังจากการบ่มนานกว่า 14 วัน

แต่ถ้าทำการกวนเชื้อที่เพาะไว้ หลังจากที่ปล่อยให้เติบโต 11 วัน และนำไปบ่มต่ออีก 11 วัน โดยไม่ทำการกวนใด ๆ (รวมเวลาการบ่มทั้งหมด 22 วัน) ประสิทธิภาพของเซลลูเลสจะลดลงเล็กน้อยในกรณีที่ใช้ความเข้มข้นสารอาหารเต็มตามสูตร ในขณะที่การใช้ความเข้มข้นสารอาหารเพียงครึ่งเดียวจะทำให้ประสิทธิภาพของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นค่อนข้างมาก (8.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ความเข้มข้นสารอาหารเพียงครึ่งเดียว เพียงพอที่จะทำให้ได้ประสิทธิภาพของเซลลูเลสที่เหมาะสมรวมทั้งผลได้ของเซลลูเลสด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตเซลลูเลสโดยอาศัยวิธีการหมักสถานะของแข็ง ดูเหมือนว่าจะดีกว่าการหมักสถานะของเหลว ผลได้ของเซลลูเลสในการหมักสถานะของเหลวและของแข็งเท่ากับ 300 และ 430 หน่วยต่อกรัมเซลลูโลส ตามลำดับ เมื่อใช้ฟางข้าวสาลีเป็นสับ-สเทรท ซึ่งค่านี้ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการหมักสถานะของเหลวที่ใช้เซลลูโลสบริสุทธิ์เป็นสับสเทรท การที่ผลได้เซลลูเลสเพิ่มขึ้นจากพิสัย 160-250 หน่วยต่อกรัมเซลลูโลสบริสุทธิ์ไปเป็นพิสัย 300-400 หน่วยต่อกรัมครูดเซลลูโลสที่ใช้ฟางข้าวสาลีเป็นสับสเทรท อาจเนื่องมาจากมีการใช้เฮมิเซลลูโลสในช่วงระยะเริ่มต้นของการเติบโต และทำการผลิตเซลลูโลสในช่วงระยะต่อมาของการเติบโต

ในการศึกษาการผลิตเซลลูเลสจาก CHEMITHERMOMECHANICAL PULP (CTMP) (33) พบว่า การปฏิบัติการ CTMP ด้วยด่างเจือจางไม่มีผลต่อการผลิตเซลลูเลส CTMPที่ผ่านการปฏิบัติการและที่ไม่ผ่านการปฏิบัติการ จะให้ประสิทธิภาพของเซลลูเลสสูงสุด (5.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร) และผลได้เซลลูเลสสูงสุด (232 หน่วยต่อกรัมเซลลูโลส) ใกล้เคียงกัน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า การปฏิบัติการเบื้องต้นของ CTMP ด้วย 5 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ 5 % โซเดียมซัลเฟต เพียงพอที่จะทำให้ ASPEN WOOD เป็นสับสเทรทที่เหมาะสมแก่การผลิตเซลลูเลส

Tanaka และผู้ร่วมคณะ (34) ได้รับสิทธิบัตรในการเตรียมเซลลูเลสจากโคจิของรำข้าวสาลีโดยใช้เชื้อ Aspergillus niger การเตรียมเซลลูเลสโดยวิธีนี้ใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเทรทหลัก และทำให้มีความชื้นสุดท้าย 70 % โคจิของรำข้าวสาลีที่ผ่านการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จะนำไปทำแห้งที่ 55 ถึง 65 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสกัดเอนไซม์ด้วยกรดแลคติค กรดอะซิติค หรือกรดไฮโดรคลอริก 1/10 ถึง 1/50 โมลัล ทำการตกตะกอนเอนไซม์ในสารละลายโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ชอบน้ำ การทำให้แห้งเป็นวิธีที่ช่วยขจัดสีเอนไซม์ และมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์น้อยมาก

ในการผลิต β-กลูโคซิเดสด้วยเชื้อ Aspergillus phoenicis โดยอาศัยวิธีการหมักสถานะของแข็ง (35) พบว่า สับสเทรทที่เหมาะสมที่สุด คือ SUGAR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BEET PULP จุดเด่นของ SUGAR-BEET RULP เมื่อเทียบกับสับสเทรทอื่น ๆ คือไม่จำเป็นจะต้องนำไปผ่านการปฏิบัติการขั้นต้น กัมมันตภาพของ β-กลูโคซิเดสโดยเฉลี่ยเท่ากับ 550 หน่วยต่อกรัมของ SUGAR-BEET PULP เริ่มต้น การหมักสถานะของแข็งทำให้เกิดการผลิต β-กลูโคซิเดสสูงสุดภายในระยะเวลา 3 วัน ของการเติบโต เมื่อเพิ่มปริมาณความชื้นเริ่มต้นของสับสเทรทในช่วงพิสัย 40 ถึง 50 % จะทำให้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และมีค่าคงที่ในช่วงพิสัย 50 ถึง 70 % ในการศึกษาผลของพีเอชปรากฏว่า การเปลี่ยนแปลงพีเอชเริ่มต้นของอาหารแข็งในช่วงพิสัย 3.5 ถึง 4.5 จะไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์มากนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตเซลลูเลส คือ Trichoderma reesei TISTR 3084 และ Aspergillus niger TISTR 3092 ได้รับจาก Microbiological Resourees Center for the Southeast Asian Region

3.2 การหมักเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดสโดยใช้วัสดุหมักรำข้าว

3.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ โดยการเขี่ยเชื้อ T. reesei และ A. niger ลงบน PDA SLANT บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วเติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปเพื่อล้างเอาสปอร์ออก และปรับปริมาณสปอร์ให้เป็น 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สารแขวนลอยนี้จะใช้เป็นกล้าเชื้อ

3.2.2 การเตรียมวัสดุหมัก (34) วัสดุหมักที่ใช้ประกอบด้วย รำข้าว 20 กรัม แกลบบด 4 กรัม และน้ำกลั่น 12 มิลลิลิตร นำวัสดุหมักใส่ถุงพลาสติก ถุงละ 10 กรัม จำนวน 2 ถุง สอดคอพลาสติกไปทางด้านปลายเปิดของถุงพลาสติก พับปากถุงทางด้านนอกหุ้มคอพลาสติกไว้ แล้วรัดด้วยยางรัดให้แน่น ทำการอุดด้วยจุกสำลี (36) นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

3.2.3 นำวัสดุหมักที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.2 มาเติมกล้าเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

3.2.4 การสกัดเอนไซม์จากวัสดุหมัก นำรำข้าวที่หมักแล้ว จากข้อ 3.2.3 มาทำการสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 100 มิลลิลิตร ต่อหนึ่งถุงพลาสติก น้ำสกัดเอนไซม์นี้จะนำไปตรวจประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การคัดเลือกมิวแตนท์ของเชื้อรา A. niger TISTR 3092 โดยวิธีฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

3.3.1 เตรียม CELLULOSE AGAR. เพื่อใช้ในการคัดเลือกโคโลนีของมิวแตนท์โดยพิจารณาจาก CLEAR ZONE และความกว้างของไฮฟา CELLULOSE AGAR ที่ใช้มีอยู่สองสูตร คือ สูตร ก. และสูตร ข. (ภาคผนวก หน้า) (37)

สูตร ก. เป็นสูตรอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกขั้นที่ 1

สูตร ข. เป็นสูตรอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกขั้นที่ 2 มีส่วนประกอบเหมือนสูตร ก. แต่ไม่เติมกลีเซอรอล

3.3.2 เตรียมกล้าเชื้อ โดยเพาะเชื้อลงบน PDA SLANT นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากครบกำหนด นำมาเติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงใน SLANT 10 มิลลิลิตร เติมทวีน 80 1 หยด นำสารแขวนลอยของสปอร์ที่ได้ไปฉายรังสีอุลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน คือ 25 30 45 55 65 75 นาที หลังจากนั้นนำมาทำ SPREAD PLATING ลงบน CELLULOSE AGAR สูตร ก. นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส แล้วคัดเลือกโคโลนีของมิวแตนท์ที่ขึ้นบนอาหาร CELLULOSE AGAR และมีอัตราการอยู่รอดของเชื้อ 0.5-5 %

3.3.3 ย้ายโคโลนีที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.2 โดยใช้ COCK BORER ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร ไปวางลงบน CELLULOSE AGAR สูตร ข. บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 วัน คัดเลือกโคโลนีที่มี CLEAR ZONE หรือไฮฟาที่ขยายออกไปกว้างที่สุด และเก็บไว้ศึกษาต่อไป

3.3.4 นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.3 มาเตรียมกล้าเชื้อ โดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 3.2.1 แล้วบ่มลงในวัสดุหมักรำข้าว เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำมาสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 100 มิลลิลิตร น้ำสกัดเอนไซม์นี้จะนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดส เพื่อทำการคัดเลือก A. niger สายพันธุ์ที่มีการผลิต β-กลูโคซิเดสสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การผลิตเซลลูเลสด้วยเชื้อ Trichoderma reesei TISTR 3084 และการผลิต β-กลูโคซิเดสด้วยเชื้อ Aspergillus niger ที่ปรับปรุงพันธุ์แล้ว โดยใช้วัสดุหมักพวกแกลบ

3.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ คือ T. reesei TISTR 3084 และ A. niger สายพันธุ์ที่ปรับปรุงมาจาก A. niger TISTR 3092

3.4.2 การเตรียมวัสดุหมัก (33) วัสดุหมักประกอบด้วยแกลบ เป็นสับสเทรท และสารอาหารของ Mandel ที่ปรับปรุงโดย Chahal (ภาคผนวก หน้า) ในการทดสอบได้แบ่งแยกแกลบออกเป็น 4 ประเภท เพื่อเปรียบเทียบสภาพของวัตถุดิบและความเข้มข้นสารอาหารที่เหมาะสมแก่การผลิตเอนไซม์

ก. แกลบที่ไม่ผ่านการปฏิบัติการใด ๆ

ข. แกลบที่ผ่านการปฏิบัติการสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (4 % [wt/wt]) ในปริมาตรที่ทำให้ความชื้นของแกลบเท่ากับ 33 % และนำไปนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 30 นาที

ค. แกลบที่ผ่านการปฏิบัติการด้วยการบด

ง. แกลบที่ผ่านการปฏิบัติการด้วยการบด และสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ (4 % [wt/wt]) ในปริมาตรที่ทำให้ความชื้นของแกลบเท่ากับ 33 % และนำไปนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 30 นาที

สับสเทรททั้งสี่ประเภทบรรจุในถุงพลาสติก ถุงละ 10 กรัม

ในแต่ละประเภทของแกลบ จะแบ่งออกเป็น 2 ชุด ชุดหนึ่ง ใช้ความเข้มข้นของสารอาหารครบเต็มตามสูตร อีกชุดหนึ่งใช้ความเข้มข้นของสารอาหารครึ่งหนึ่งของสูตรที่กำหนดไว้ ในแต่ละถุงจะทำการเติมสารอาหารปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมแกลบและสารอาหารให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 เตรียมกล้าเชื้อ โดยการถ่ายเชื้อทั้งสองลงบน MALT EXTRACT AGAR SLANT นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อมีการสร้างสปอร์แล้ว ใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วล้างเอาสปอร์ออก และใช้สารแขวนลอยนี้เป็นกล้าเชื้อ

3.4.4 ผสมกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ลงในวัสดุหมักที่เตรียมในข้อ 3.4.2 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อหนึ่งถุงพลาสติก นำไปเขย่าเป็นระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บน้ำสกัดเอนไซม์มาใช้ในการวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของเอนไซม์ โดยน้ำสกัดเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเชื้อ T. reesei TISTR 3084 นำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์หนึ่ง และน้ำสกัดเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเชื้อ A. niger ที่ปรับปรุงพันธุ์แล้ว นำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดส

3.5 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเซลลูเลส

3.5.1 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์หนึ่ง (FILTER PAPER DEGRADATING ACTIVITY) (38)

เติม 0.05 โมล่าร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ ตัดกระดาษกรองเป็นชิ้นยาวขนาด 1×6 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) ใส่ลงไป และนำไปเขย่าด้วยเครื่องผสม (MIXER) เพื่อให้กระดาษกรองขดเป็นเกลียวอยู่ในบัฟเฟอร์ หลังจากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดสอบ นำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ทำการหยุดปฏิกิริยา โดยนำไปต้มในเครื่องอังน้ำ นาน 5 นาที และนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

3.5.2 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดส (β-glucosidase activity) (39, 40)

เติม 2×10^{-2} โมล่าร์ สารละลายเซลโลไบโอสใน 0.05 โมล่าร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 1 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ นำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที หลังจากนั้น นำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

3.5.3 คำจำกัดความของหนึ่งหน่วยเอนไซม์

ประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรอง 1 หน่วยเอนไซม์ (ONE ACTIVITY UNIT IU) คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเทรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 ชั่วโมง ในสภาพที่ทดสอบ

ประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดส 1 หน่วยเอนไซม์ คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเทรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ในสภาพ ที่ทดสอบ

3.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสและเซลโลไบโอส

3.6.1 เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร และอีกหลอดหนึ่งเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ เติมคอปเปอร์รีเอเจนต์ลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปต้มเครื่องอังน้ำ เป็นระยะเวลา 20 นาที แล้วทำให้เย็นทันที โดยแช่ในน้ำเย็นจัด เติมอาร์เซโนโมลิบเดท ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (MIXER) ช่วย แล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าแอบซอร์แบนด์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

เขียนกราฟระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคส และแอบซอร์แบนด์

3.6.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานเซลโลไบโอสและทดลอง โดยวิธีการเดียวกันกับข้อ 3.6.1

เขียนกราฟระหว่างปริมาณน้ำตาลเซลโลไบโอสและแอบเซอร์แบนด์

3.6.3 คำนวณหาความชันของกราฟทั้งสอง และนำไปคำนวณหา ค่า MICRO-MOLAR ABSORBTIVITY ของกลูโคส (E_g) และเซลโลไบโอส (E_c) ค่าเหล่านี้จะนำไปใช้คำนวณหาความเข้มของกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอส (G_t) และความเข้มข้นของกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการย่อยกระดาษกรอง (G_F)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 กราฟมาตรฐานของกลูโคสและเซลโลไบโอส

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง แอบซอร์แบนด์ กับความเข้มข้นของกลูโคส และกราฟระหว่างแอบซอร์แบนด์ กับความเข้มข้นของเซลโลไบโอสจะได้กราฟเส้นตรงที่มีความชันเท่ากับ 5.922×10^{-6} และ 3.187×10^{-6} ตามลำดับ (รูปที่ 1 และ 2) ดังนั้น MICROMOLAR ABSORBTIVITY ของกลูโคส (E_g) มีค่าเท่ากับ 1.066×10^{-3} และของเซลโลไบโอสมีค่าเท่ากับ 1.090×10^{-3}

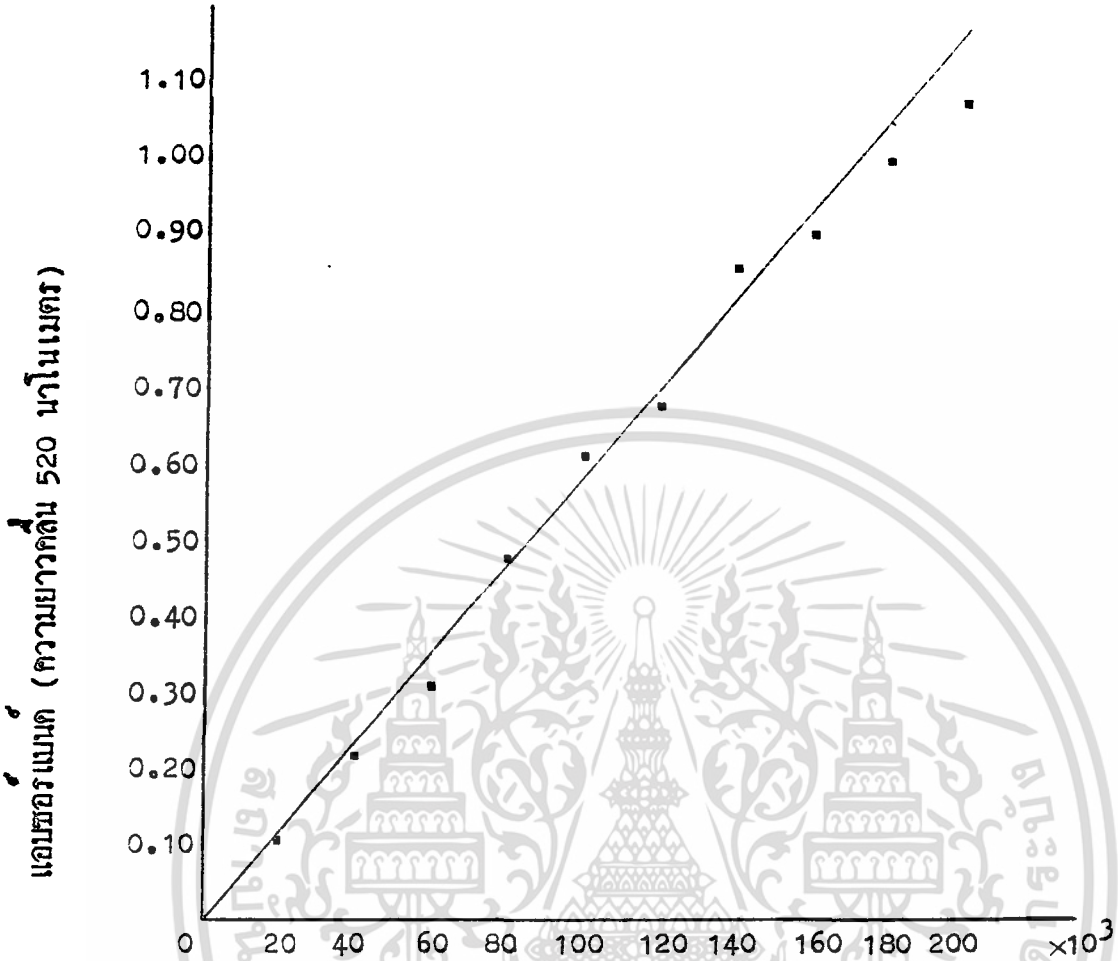
4.2 การหมักเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดส

การเพาะเชื้อ T. reesei TISTR 3084 และ A. niger TISTR 3092 บนอาหารแข็งที่มีรำข้าวปริมาณ 10 กรัม เป็นสับสเทรทหลักสำหรับการผลิตเซลลูเลส และสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำปริมาณ 100 มิลลิลิตร หลังจากที่บ่มเป็นระยะเวลานาน 5 วันที่ 30 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้สารละลายที่มีประสิทธิภาพ β-กลูโคซิเดส เท่ากับ 0.46 หน่วยต่อมิลลิลิตรของสารละลายสำหรับเชื้อ T. reesei 3084 และ 1.77 หน่วยต่อมิลลิลิตรของสารละลายสำหรับเชื้อ A. niger TISTR 3092 ซึ่งจะเห็นได้ว่า เมื่อใช้รำข้าวเป็นสับสเทรท A. niger TISTR 3092 จะให้ β-กลูโคซิเดสนอกเซลล์ สูงกว่า T. reesei TISTR 3084 ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดสจากเชื้อ T. reesei และ A. niger

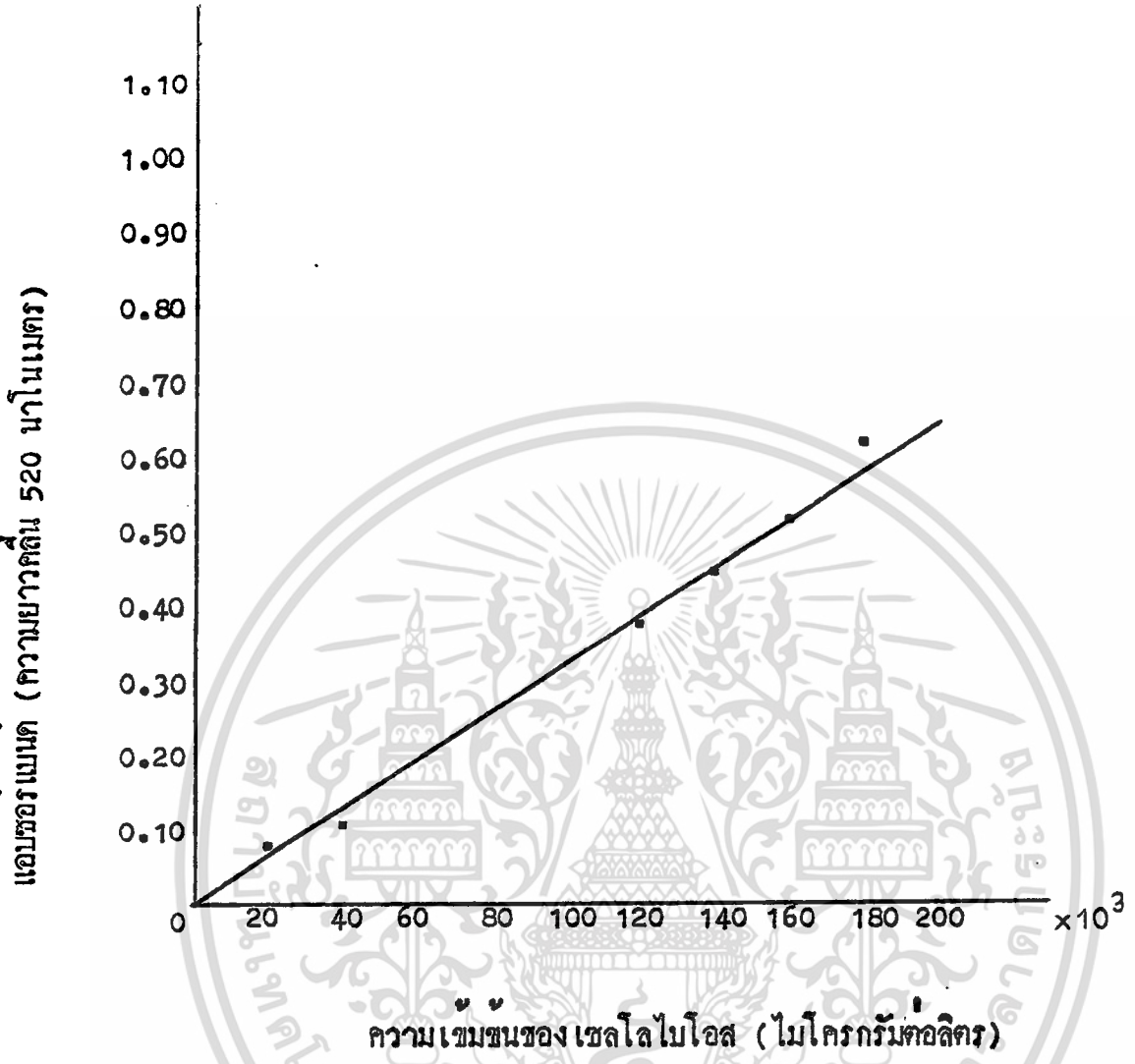
เชื้อ	ประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
T. reesei TISTR 3084	0.46
A. niger TISTR 3092	1.77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 กราฟระหว่างแอบซอร์แบนด์กับความเข้มข้นของกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 กราฟระหว่างแอบซอร์แบนด์กับความเข้มข้นของเซลโลไบโอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลา และอัตราการอยู่รอดของเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการทำให้เกิดมิวแตนท์โดยวิธีการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

อัตราการรอดตายของเชื้อ A. niger ภายหลังจากการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต ได้แสดงในตารางที่ 6 ซึ่งจะเห็นได้ว่า การฉายรังสีเป็นระยะเวลานาน 75 นาที มีอัตราการรอดตาย 4.3 % เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับทำให้เกิดมิวแตนท์

ตารางที่ 6 อัตราการรอดตายของเชื้อ A. niger ภายหลังจากการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

เวลา (นาที)	จำนวนรอดตาย (สปอร์/มิลลิลิตร)	อัตราการรอดตาย (%)	อัตราการตาย (%)
0	1.56×10^6	100	0.0
25	1.01×10^6	64.6	35.4
35	7.60×10^5	48.8	51.2
45	6.10×10^5	39.5	60.5
55	4.37×10^5	28.0	72.0
65	1.56×10^5	10.0	90.0
75	6.8×10^4	4.3	95.7

4.4 การคัดเลือกมิวแตนท์ของ A. niger TISTR 3092 ที่ผลิต β-กลูโคสได้ดีขึ้น

เมื่อนำสารแขวนลอยของสปอร์ที่ผ่านรังสีอัลตราไวโอเลต มาทำ SPREAD PLATING ลงบนอาหารสูตร ก. ปรากฏว่า ไม่สามารถที่จะคัดเลือกสายพันธุ์กลาย โดยพิจารณาจากความกว้างของ CLEAR ZONE ที่เกิดขึ้น เนื่องจากเห็นได้ไม่ชัดเจน ฉะนั้นจึงทำการคัดเลือกโคโลนี โดยพิจารณาจากลักษณะกายภาพที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งทำการคัดเลือกมาทั้งสิ้น 52 โคโลนี และได้นำมาเพาะเชื้อบนอาหารสูตร ข. พร้อมกับบ่มเป็นระยะเวลา 4 วัน นำมาวัดขนาดความกว้างของไฮฟา ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อส่วนใหญ่มีความกว้างของไฮฟาอยู่ระหว่าง 1.5 ถึง 2.0 เซนติเมตร รวมทั้ง A. niger TISTR 3092 ที่เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ แต่อย่างไรก็ตาม มีอยู่ 13 สายพันธุ์ ที่มีความกว้างของไฮฟา มากกว่า 2.0 เซนติเมตร จึงได้ทำการเคลื่อนย้ายโคโลนีของเชื้อเหล่านี้มาเก็บไว้บนอาหารสูตร ข.

สายพันธุ์ที่คัดเลือกเพื่อนำมาศึกษาต่อคือ A. niger MKL 1

A. niger MKL 17 A. niger MKL 19 A. niger MKL 21

A. niger MKL 23 A. niger MKL 33 A. niger MKL 37

A. niger MKL 37 A. niger MKL 42 A. niger MKL 43

A. niger MKL 47 A. niger MKL 49 A. niger MKL 50

A. niger MKL 51 แต่ในระหว่างการเพาะเชื้อขั้นต่อมาปรากฏว่า สายพันธุ์ MKL 49 ไม่เติบโต ฉะนั้นจึงไม่ได้นำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 7 แสดงขนาดความกว้างของไฮฟาของ A. niger สายพันธุ์ต่าง ๆ

A. niger	ความกว้างไฮฟา (เซนติเมตร)	A. niger	ความกว้างไฮฟา (เซนติเมตร)
TISTR 3092	2.0	MKL 1	3.0
MKL 2	2.0	MKL 3	1.5
MKL 4	1.3	MKL 5	1.8
MKL 6	1.2	MKL 7	2.0
MKL 8	2.0	MKL 9	2.0
MKL 10	2.0	MKL 11	1.0
MKL 12	2.0	MKL 13	1.5
MKL 14	1.5	MKL 15	1.3
MKL 16	1.5	MKL 17	2.9
MKL 18	1.5	MKL 19	2.5
MKL 20	1.6	MKL 21	2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 (ต่อ)

A. niger	ความกว้างไฮฟา (เซนติเมตร)	A. niger	ความกว้างไฮฟา (เซนติเมตร)
MKL 22	2.3	MKL 23	2.4
MKL 24	1.4	MKL 25	1.8
MKL26	1.6	MKL 27	1.5
MKL 28	1.5	MKL 29	1.9
MKL 30	1.4	MKL 31	1.5
MKL 32	1.4	MKL 23	2.5
MKL 34	1.9	MKL 35	1.4
MKL 36	1.0	MKL 37	2.2
MKL 38	2.1	MKL 39	2.0
MKL 40	1.8	MKL 41	1.5
MKL 42	2.5	MKL 43	2.7
MKL 44	1.5	MKL 45	1.4
MKL 46	1.7	MKL 47	2.2
MKL 48	1.5	MKL 49	3.5
MKL 50	3.0	MKL 51	3.9
MKL 52	1.0		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิต β-กลูโคซิเดสของสายพันธุ์ A. niger ที่คัดเลือกมาได้

การคัดเลือกขั้นนี้ มุ่งเน้นที่จะคัดเลือกเชื้อซึ่งสามารถผลิต β-กลูโคซิเดสนอกเซลล์สูงสุด โดยใช้อาหารแข็งที่มีรำข้าวเป็นสับสเทรทสำหรับการผลิตเอนไซม์ ผลการศึกษาได้แสดงในตารางที่ 8 จากตารางจะพบว่า มิวแตนท์ที่มีประสิทธิภาพ β-กลูโคซิเดส นอกเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (A. niger TISTR 3092) ได้แก่ A. niger MKL 19 A. niger MKL 21 A. niger MKL 23 A. niger MKL 37 A. niger MKL 43 A. niger MKL 52 เนื่องจากมิวแตนท์ A. niger MKL 51 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิต β-กลูโคซิเดสนอกเซลล์สูงสุด ฉะนั้นจึงได้เลือกสายพันธุ์นี้มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.6 การหมักเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเซลลูเลสด้วยเชื้อ T. reeseiTISTR 3084 และการผลิต β-กลูโคซิเดสด้วยเชื้อ A. niger MKL 51 โดยวิธีการเพาะเชื้อบนอาหารแข็งที่ใช้แกลบเป็นสับสเทรท

ในการศึกษาขั้นนี้ มีจุดมุ่งหมายหลัก เพื่อพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการที่จะใช้แกลบเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอนไซม์ ทั้งนี้เพราะว่าแกลบ เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก และสามารถที่จะรวบรวมเข้าด้วยกันได้ง่ายกว่าฟางข้าว และยังได้ทำการเปรียบเทียบสภาพวัตถุดิบ และความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ดังปรากฏผลในตารางที่ 9

จากตารางจะพบว่า T. reesei จะผลิตเซลลูเลสนอกเซลล์ได้สูงสุดเมื่อใช้แกลบบดและผ่านสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นวัตถุดิบ และการใช้สารอาหารความเข้มข้นเพียงครึ่งหนึ่ง จะทำให้ได้เอนไซม์สูงกว่าเมื่อใช้สารอาหารครบเต็มตามสูตร ส่วนในกรณีของ A. niger จะผลิต β-กลูโคซิเดส นอกเซลล์ เฉพาะเมื่อใช้แกลบที่ผ่านสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และแกลบบดที่ผ่านสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นวัตถุดิบ และได้เอนไซม์ในระดับที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารอาหารจะไม่มีผลต่อการผลิต β-กลูโคซิเดส โดยเชื้อ A. niger

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 แสดงประสิทธิภาพการผลิต β-กลูโคซิเดส โดยมิวแตนท์ของ A. niger

A. niger	หน่วย/มิลลิลิตรของสารละลาย
MKL 1	0.98
MKL 17	0.18
MKL 19	3.34
MKL 21	2.30
MKL 23	2.30
MKL 33	0.63
MKL 37	3.08
MKL 42	1.70
MKL 43	2.19
MKL 47	0.49
MKL 50	0.63
MKL 51	4.55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 ผลการผลิตเอนไซม์โดยวิธีการเพาะเชื้อบนอาหารแข็งที่ใช้แกลบเป็นสับสเทรท

สับสเทรท	สายพันธุ์จุลินทรีย์	
	T. reesei (ประสิทธิภาพการย่อยย่อยกระดาษกรอง หน่วย/มิลลิลิตร)	A. niger (ประสิทธิภาพ β-กลูโคซิเดส หน่วย/มิลลิลิตร)
แกลบที่ไม่ผ่านการปฏิบัติการใด ๆ		
ใส่สารอาหารครบเต็มตามสูตร	0	0
ใส่สารอาหารครึ่งหนึ่ง	0	0
แกลบที่ผ่านสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์		
ใส่สารอาหารครบเต็มตามสูตร	0.18	1.00
ใส่สารอาหารครึ่งหนึ่ง	0.36	1.00
แกลบบด		
ใส่สารอาหารครบเต็มตามสูตร	0	0
ใส่สารอาหารครึ่งหนึ่ง	0	0
แกลบบดและผ่านสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์		
ใส่สารอาหารครบเต็มตามสูตร	0.21	1.29
ใส่สารอาหารครึ่งหนึ่ง	0.53	1.29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

การทำให้เกิดการกลายโดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต และการใช้วิธีการที่เหมาะสมในการคัดเลือกมิวแตนท์ จะช่วยทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต β -กลูโคซิเดสของเชื้อรา Aspergillus niger ได้ มิวแตนท์ของ A. niger MKL 51 ที่คัดเลือกได้นี้มีประสิทธิภาพของ β -กลูโคซิเดส เพิ่มขึ้นประมาณ 2.6 เท่าเมื่อทำการเพาะเชื้อบนอาหารแข็งที่ใช้รำข้าวเป็นสับสเทรท

ในการศึกษา แนวโน้มการใช้แกลบเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเซลลูเลส พบว่าแกลบที่ผ่านการปฏิบัติการเบื้องต้นบางส่วน สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอนไซม์โดยเฉพาะการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ Trichoderma reesei

5.2 ข้อเสนอแนะ

แกลบนับเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบ สำหรับการผลิตเซลลูเลส ทั้งนี้เพราะในปีหนึ่ง ๆ ประเทศไทยมีแกลบเหลืออยู่เป็นจำนวนมาก และยังมีการนำมาใช้ประโยชน์ไม่มากนัก

ในการศึกษาขั้นเบื้องต้นนี้ พบว่าแกลบสามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเซลลูเลส โดยเฉพาะการผลิตโดยวิธีการหมักสถานะของแข็ง แม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้ผลผลิตของเซลลูเลสที่ได้อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ แต่มีความเป็นไปได้อย่างมากที่จะเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น วิธีการที่เป็นไปด้วยอย่างมากที่จะใช้เพิ่มผลผลิต ได้แก่

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเติบโตของเชื้อ และของการผลิตเอนไซม์ เช่น ปริมาณความชื้น WATER ACTIVITY อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การนำแกลบมาผ่านการปฏิบัติการเบื้องต้น ให้มากขึ้น

3. การเติมแหล่งคาร์บอนที่ย่อยง่ายเพิ่มเติมลงไป เพื่อให้เชื้อมีการเติบโตได้ดีขึ้น เช่น การใช้รำข้าวร่วมกับแกลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. Stryer, L. Biochemistry, 2nd edition. p. 431. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1981.

2. Lehninger, A.L. Principles of Biochemistry., 1st Indian edition. pp. 645-646. CBS Publishers and Distributors, Delhi, 1984.

3. Ghose, T.K. Cellulase Biosynthesis and Hydrolysis of Cellulosics Substances. In : Advance in Biochemical Engineering, vol. 6 (Ghose, T.K., Fiechter, A. and Blakebraugh, N., eds.). pp. 39-76. Springer-Verlag, Berlin, 1977.

4. Klyosov, A.A. and Rabinowitch, M.L. Enzymatic Conversion of Cellulose to Glucose : Present State of the Art and Potential. In : Enzyme Engineering, Future Direction (Wingard, L.B., Jr., Berezin, I.V. and Klyosov, A.A. eds.). pp. 83-165. Plenum Press, New York, 1980.

5. Doppelbauer, R., Esterbauer, H., Steiner, W., Lofferty, R.M. and Steinmmiiller, H. "The Use of Lignocellulosic Wastes for Production of Cellulase by Trichoderma reesei" Applied Microbiology and Biotechnology. 26(1987) : 485-494.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. Enari, T.M. and Markkanen, P. Production of Cellulolytic Enzymes by Fungi. In : Advance in Biochemical Engineering, vol. 5 (Ghose, T.K., Fiechter, A. and Blakebraugh, N., eds.). pp. 1-24. Springer-Verlag, Berlin, 1977.

8. Plummer, D.T. An Introduction to Practical Biochemistry, 2nd edition. pp. 122-125. McGraw-Hill Book Company(UK) Limited, Berkshire, 1987.

9. Pomerany, Y. and Meloan, C.E. Food Analysis : Theory and Practice. pp. 63-65. AVI Publishing Company, Inc, Westport, Connecticut, 1978.

10. Pomerany, Y. and Meloan, C.E. Food Analysis : Theory and Practice. pp. 582-585. AVI Publishing Company, Inc., Westmport, Connecticut, 1978.

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

12. Schwimmer, S. Source Book of Food Enzymology. p. 95. AVI Publishing Company, Inc., Westpart, Connecticut, 1981.

13. Sternberg, D. "Production of Cellulase by Trichoderma" Biotechnology and Bioengineering Symposium No.6. pp. 35-53. John Wiley and Sons, Inc. 1976.

14. Gong, C.S. and Tsao, G.T. Cellulase and Biosynthesis Regulation. In : Annual Report on Fermentation Process, vol. 3.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pp. 111-140. Academic Press, United State of America, 1979.

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

16. Sternberg, D., Vijayakumar, P. and Reese, E.T. "B-Glucosidase; Microbial Production and Effect on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose" Canadian Journal of Microbiology. 23(1977) : 139-147.

17. Alen, A. and Sternberg, D. "B-Glucosidase Production by Aspergillus phoenicis in Stirred-Tank Fermenters" Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 10. pp. 189-197. John Wiley and Sons, Inc.

18. Nummi, M., Niku-Paavola, M.L., Lappalainen, A., Enari, T.M. nad Raunio, V. "Cellobiohydrolase from Trichoderma reesei" Biochemical Journal 215(1983) : 677-683.

19. Schmid, G. and Wandrey, C. "Purification and Partial Characterization of a Cellodextrin Glucohydrolase (β-Glucosidase) from Trichoderma reesei Strain QM 9414" Biotechnology and Bioengineering 30(1987) : 571-585

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20. Clarke, A.E. and Stone, B.A. "Properties of a β(1→4)-Glucan Hydrolose from Aspergillus niger" Biochemical Journal. 96(1965) : 802-807.

21. Hurst, P.L., Nielsen, J., Sullivan, P.A. and Shepherd, M.G. "Purification and Properties of a Cellulase from Aspergillus niger" Biochemical Journal. 165(1977) : 33-41.

22. Hurst, P.L., Sullivan, P.A. and Shepherd, M.G. "Substrate Specificity and Mode of Action of Cellulase from Aspergillus niger" Biochemical Journal. 169(1978) : 389-395.

23. Hurst, P.L., Sullivan, P.A. and Shepherd, M.G. "Chemical Modification of a Cellulase from Aspergillus niger" Biochemical Journal. 267(1977) : 549-556.

24. Vidmar, S., Turk, V. and Kregar, I. "Cellulolytic Complex of Aspergillus niger under Conditions for Citric Acid Production. Isolation and Characterization of Two β-(1→4)-Glucan Hydrolases" Applied Microbiology and Biotechnology. 20(1984) : 326-330.

25. Enari, T.M., Niku-Paavola, M.L., Harju, L., Lappalainen, A. and Nummi, M. "Purification of Trichoderma reesei and Aspergillus niger β-Glucosidase" Journal of Applied Biochemistry. 3(1981) : 157-163.

26. Mar' yanovskaya, I.G., Ivanova, G.S. and Kulaev, I.S. "Properties of Cellobiase from Aspergillus foetidus" appeared in Applied Biochemistry and Microbiology. 23(1987) : 45-49.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

27. Mudgett, R.E. Solid-state Fermentation. In : Mannual of Industrial Microbiology and Biotechnology (Demain, A.L. and Solomon, N.A. eds.). pp. 66-83. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1986.

28. Cannel, E. and Moo-Yong, M. "Solid State Fermentation Systems" Process Biochemistry. June/July (1980) : 2-7.

29. Cannel, E. and Moo-Yong, M. "Solid State Fermentation Systems" Process Biochemistry. August/September (1980) : 24-28.

30. Govindarao, V.M.H. "Utilization of Rice Husk-A Preliminary Analysis" Journal of Scientific and Industrial Research. 39(1980) ; 495-515.

31. Hauston, D.F. Rice Hulls. In : Rice Chemistry and Technology (Hauston, D.F. ed.). p. 307. American Association of Cereal Chemist, St. Paul, Minnessota.

32. Toyama, N. "Feasibility of Sugar Production from Agricultural and Urban Cellulosic Wastes with Trichoderma viride Cellulase". Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 6. pp. 207-219. John Wiley and Sons, Inc., 1976.

33. Chahal, D.S. "Solid-State Fermentation with Trichoderma reesei for Cellulase Production" Applied and Environmental Microbiology. 49(1985) ; 205-210.

34. Tanaka, I., Sawada, J., Misaki, T., Kouchiwa, S. and Fukuda, K. "Production of Cellulase by Aspergillus niger" U.S. Patent 3,251, 750 May 17, 1966.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35. Deschamps, F. and Hivt, M.C. "β-Glucosidase Production by Aspergillus phoenicis in Solid State Fermention". Biotechnology letters 6(1984) ; 55-60.

36. Lotong, N. and Suwanarit, P. "Production of Soy Sauce Koji Mold Spore Inoculum in Plastic Bag." Applied Environmental and Microbiology. 46(1983) : 1224-1226.

37. Halliwell, G. Cellulose. In : Methods of Enzymatic Analysis vol 3 (Rergmeyer, V. ed.). p. 1142. Academic Press, Inc, New York, 1974.

38. Mandels, M., Andreotu, R. and Roche, C. "Measurement of Saccharifying Cellulose." Biotechnology and Bioengineering Symposium No.6. pp. 21-33. John Weliy and Sons, Inc. 1976.

39. Mar' yanovskaya, I.G., Ivanova, G.S. and Kulaev, I.S. "Properties of Cellulase from Aspergillus foetidus". Applied Biochemistry and Microbiology. 23(1987) ; 45-49.

40. Breuil, C., Mayers, P. and Saddler, J.N. "Substrate Conditions that Influence the Assays Used for Determiniing the β-Glucosidase Activity of Cellulolytic Microorganisms." Biotechnology and Bioengineering. 33(1986) ; 1653-1656.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

อาหารเพาะเชื้อ

อาหารที่เตรียมขึ้นตามสูตรเหล่านี้ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

2. วัสดุหมักรำข้าว

รำข้าว	50	กรัม
แกลบบด	10	กรัม
น้ำกลั่น	30	มิลลิลิตร
พีเอช	4.0-4.5	

3. Cellulose agar สูตร ก.

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	(KH_2PO_4)	2.15	กรัม
โพแทสเซียมฟอสเฟตไดเบสิก	(K_2HPO_4)	0.15	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	(Na_2HPO_4)	1.50	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรท	(NH_4NO_3)	0.60	กรัม
โซเดียมไนเตรท	($NaNO_3$)	3.80	กรัม
มักเนเซียมซัลเฟต	($MgSO_4.7H_2O$)	0.30	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต	($ZnSO_4.7H_2O$)	5.0	มิลลิกรัม
ไอออน (III)ซัลเฟต	($Fe_2(SO_4)_3.6H_2O$)	5.4	มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต	($CuSO_4$)	0.3	มิลลิกรัม
มังกานีส (II) ซัลเฟต	($MnSO_4$)	0.6	มิลลิกรัม
กรดบอรก	(H_3BO_3)	5.0	มิลลิกรัม
แอมโมเนียมเฮปตาโมลิบเดต		2.4	มิลลิกรัม
โคบอลท์คลอไรด์	($CoCl_2$)	2.0	มิลลิกรัม
เซลลูโลส		2	กรัม
กลีเซอรอล		30	มิลลิลิตร
ทวีน 80		1	มิลลิลิตร
วุ้น		20	กรัม
น้ำกลั่นจนครบ		1000	มิลลิลิตร
พีเอช		6.6	

4. Cellulose agar สูตร ข.

ส่วนผสมเหมือนสูตร ก. แต่ไม่เติมกลีเซอรอล

5. Malt extract agar

malt extract	30	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่นจนครบ	1000	มิลลิลิตร

6. ส่วนประกอบทางเคมีของแกลบ

เซลลูโลส	28-36	%
เพนโตแซน	21-22	%
เฮมิเซลลูโลส	12	%
ลิกนิน	9-20	%
ซิลิกา	18.8-22.3	%
ความชื้น	7	%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. สูตรอาหาร Mandel ปรับปรุงโดย Chahal

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	(KH_2PO_4)	28.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	($(NH_4)_2SO_4$)	19.6	กรัม
ยูเรีย		4.2	กรัม
มักเนเซียมซัลเฟต	($MgSO_4.7H_2O$)	4.2	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์	($CoCl_2$)	4.2	กรัม
ไอออน (II) ซัลเฟต	($FeSO_4.7H_2O$)	70.0	มิลลิกรัม
มังกานีส (II) ซัลเฟต	($MnSO_4.7H_2O$)	21.84	มิลลิกรัม
ซิงค์ (II) ซัลเฟต	($ZnSO_4.7H_2O$)	19.60	มิลลิกรัม
คัลเซียมคลอไรด์	($CaCl_2$)	28.0	มิลลิกรัม
สารสกัดจากยีสต์		3.5	กรัม
BEEF EXTRACT		3.5	กรัม
น้ำกลั่นจนครบ		200	มิลลิลิตร
พีเอช		6.0	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

สารเคมีที่ใช้ทดลอง

1. Somogyi-Nelson reagent

1.1 คอปเปอร์รีเอเจนต์ (Somogyi's copper reagent)

คอปเปอร์รีเอเจนต์ I ละลาย Na_2CO_3 (ปราศจากน้ำ) 25 กรัม โซเดียมโพแทสเซียมตาร์เตรท (เกลือ Rochelle) 20 กรัม $NaHCO_3$ 20 กรัม และ Na_2SO_4 (ปราศจากน้ำ) 200 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร และทำการเจือจางให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร

คอปเปอร์รีเอเจนต์ II ละลาย $CuSO_4$ 15 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร และเติม H_2SO_4 (เข้มข้น) หนึ่งถึงสองหยดลงไป ผสมให้เข้ากัน

คอปเปอร์รีเอเจนต์ ผสม I เข้ากับ II ในอัตราส่วน 25:1 (เตรียมในวันที่จะนำมาใช้)

1.2 สารละลายอาร์เซโนโมลิบเดตคัลเลอร์ (Nelson's arsanomolybdate color reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติม H_2CO_4 (เข้มข้น) ลงไป 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม $Na_2HAsO_4.7H_2O$ 3 กรัม ที่ละลายอยู่ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง สารละลายควรเก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ละลายกลูโคส 0.02 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สารละลายเซลโลไบโอสมาตรฐาน

ละลายเซลโลไบโอส 0.02 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเซลโลไบโอส ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

4. สารละลายเซลโลไบโอสใน 0.05 โมล่าร์ ซิเทรทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8

ละลายเซลโลไบโอส 6.84 กรัม ใน 0.05 โมล่าร์ ซิเทรทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเซลโลไบโอส ความเข้มข้น 2×10^{-2} โมล่าร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

การวิเคราะห์ผล

1. การคำนวณ MICROMOLAR ABSORBTIVITY

เส้นกราฟที่เขียนขึ้นระหว่าง แอบซอร์แบนด์ กับความเข้มข้นของกลูโคส มีความชันเท่ากับ 5.922×10^{-6} และกราฟระหว่าง แอบซอร์แบนด์กับความเข้มข้นของเซลโลไบโอส มีความชันเท่ากับ 3.187×10^{-6}

MICROMOLAR ABSORBTIVITY ของกลูโคส (E_g) $= 5.922 \times 10^{-6} \times 180$

$= 1.066 \times 10^{-3}$

MICROMOLAR ABSORBTIVITYของเซลโลไบโอส (E_c) $= 3.187 \times 10^{-6} \times 342$

$= 1.090 \times 10^{-3}$

จากสมการ

$$G_t = \frac{A_t - A_o}{E_g - E_c/2}$$

แทนค่า $E_g = 1.066 \times 10^{-3}$; $E_c = 1.090 \times 10^{-3}$ และ $A_o = 14.5$ (แอบซอร์แบนด์ของเซลโลไบโอสที่ความเข้มข้นเริ่มต้น)

$$G_t = \frac{A_t - 14.5}{1.066 \times 10^{-3} - \frac{1.090 \times 10^{-3}}{2}}$$

$$= \frac{A_t - 14.5}{5.22 \times 10^{-4}}$$

สมการข้างต้นนี้นำไปใช้ในการหาความเข้มข้นกลูโคสในหน่วยไมโครโมล่าร์ที่เกิดขึ้นจากการไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอส และนำไปใช้หาประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดส อีกทีหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจาก

$$A_F = E_g G_F$$

ฉะนั้น

$$G_F = \frac{A_F}{E_g} = \frac{A_F}{1.066 \times 10^{-3}}$$

เมื่อ G_F = ความเข้มข้นของกลูโคสในหน่วยไมโครโมล่าร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยกระดาษกรอง

A_F = แอบซอร์แบนด์ของกลูโคสในส่วนที่เกิดขึ้นจากการย่อยกระดาษกรอง

$E_g = 1.066 \times 10^{-3}$

สมการข้างต้นนี้ นำไปใช้ในการหาความเข้มข้นของกลูโคสในหน่วยไมโครโมล่าร์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยกระดาษกรอง และนำไปคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรองอีกทีหนึ่ง

2. <u>การคำนวณประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรอง</u>

1 หน่วยเอนไซม์ คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเทรทให้เป็น กลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 ชั่วโมง ในสภาพที่ทดสอบ

สารละลาย 1000 มิลลิลิตร มีกลูโคส = G_F ไมโครโมล

สารละลาย 1.5 มิลลิลิตร มีกลูโคส = $\frac{G_F \times 1.5}{1000}$ ไมโครโมล

ปริมาณเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ได้กลูโคส = $\frac{G_F \times 1.5}{1000}$ ไมโครโมล

ปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ได้กลูโคส = $\frac{G_F \times 1.5}{1000 \times 0.5}$ ไมโครโมล

$= G_F \times 3 \times 10^{-3}$ หน่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การคำนวณประสิทธิภาพของ β-กลูโคซิเดส

1 หน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ ที่สามารถย่อยสับสเทรท ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

สารละลาย 1000 มิลลิลิตร มีกลูโคส = G_t ไมโครโมล

สารละลาย 1.5 มิลลิลิตร มีกลูโคส = $\frac{G_t \times 1.5}{1000}$ ไมโครโมล

ระยะเวลาบ่ม 15 นาที ได้กลูโคส = $\frac{G_t \times 1.5}{1000}$ ไมโครโมล

ระยะเวลาบ่ม 1 นาที ได้กลูโคส = $\frac{G_t \times 1.5}{1000 \times 15}$ ไมโครโมล

ปริมาณเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ได้กลูโคส = $\frac{G_t \times 1.5}{1000 \times 15}$ ไมโครโมล

ปริมาณเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ได้กลูโคส = $\frac{G_t \times 1.5}{1000 \times 15 \times 0.5}$ ไมโครโมล

= $G_t \times 2 \times 10^{-4}$ หน่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติ

นาย ราบินเดอร์ ศรีกิจจาภรณ์ เกิดเมื่อวันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2509 โรงพยาบาล ศิริราช จบชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น ที่โรงเรียน ศิริธนศึกษาเมื่อ พ.ศ. 2524 จบชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย ที่โรงเรียน เตรียมอุดมศึกษาเมื่อ พ.ศ. 2527 เคยได้รับทุนยกเว้นค่าหน่วยกิต เมื่อ พ.ศ. 2523 ใบแสดงว่าเป็นผู้มีความประพฤติดี เมื่อ พ.ศ. 2523 เข้าร่วมทำกิจกรรมในชุมนุมวิทยาศาสตร์และเป็นหัวหน้าทางฝ่ายชีววิทยาในการจัดงานนิทรรศการ เมื่อ พ.ศ. 2526 เป็นรองประธานจัดงานนิทรรศการฝ่ายนักศึกษาในงานนิทรรศการวันวิทยาศาสตร์แห่งชาติ และรับผิดชอบในเรื่อง โยเกิร์ต เมื่อ พ.ศ. 2529

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้