

การแยกและการคัดเลือกเชื้อราจากดินในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลันเนส

ISOLATION AND SELECTION OF FUNGI FROM SOIL
IN THE EASTERN PART OF THAILAND FOR XYLANASE PRODUCTION

เรวดี ปริบัว

IRAWADEE PREBOUR

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974-9708-40-0

การแยกและการคัดเลือกเชื้อราจากดินในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลันเนส

ISOLATION AND SELECTION OF FUNGI FROM SOIL
IN THE EASTERN PART OF THAILAND FOR XYLANASE PRODUCTION

เรวดี ปรีบัว

RAWADEE PREBOUR

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2547

ISBN 974-9708-49-0

**ISOLATION AND SELECTION OF FUNGI FROM SOIL
IN THE EASTERN PART OF THAILAND FOR XYLANASE PRODUCTION**

RAWADEE PREBOUR

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2004

ISBN 974-9708-49-0

COPYRIGHT 2003

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกและคัดเลือกเชื้อราจากดินในเขตภาคตะวันออกเฉียง ประเทศไทยเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส
นักศึกษา	นางสาวเรวดี ปรีบัว
รหัสประจำตัว	44065204
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	พ.ศ.2547
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ. อารี ฤทธิบุญ
ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	นายสายัณห์ สมฤทธิผล

บทคัดย่อ

จากการแยกและคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากตัวอย่างดิน ในเขตภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้จำนวน 72 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันจำนวน 30 สายพันธุ์ ในเชื้อราจำนวนนี้มีเชื้อราสายพันธุ์ที่ 15 และ 27 ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะอุณหภูมิสูง (45 องศาเซลเซียส) และในสภาพความเป็นด่าง (พีเอช 8.0) ตามลำดับ เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อราทั้ง 30 สายพันธุ์ ด้วยการทดสอบความสามารถของเชื้อราต่อการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง พบว่าภายใต้สภาวะการเจริญที่ค่าพีเอช 6.0 เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุด โดยให้ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาพอาหารแข็งเท่ากับ 3.57 และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาพอาหารเหลวเท่ากับ 33.82 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ในสภาพอาหารเหลว พบว่าการใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงกว่าการใช้เปลือกข้าวโพด ชานอ้อย ไซแลน (oat spelt xylan) และฟางข้าว ตามลำดับ และซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสม คือยูเรีย โปรติโอสเปปโตน และยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.3 , 0.25 และ 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการใช้ไคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงกว่าการใช้แอมโมเนียมไนเตรด แอมโมเนียมซัลเฟตและโซเดียมไนเตรด ตามลำดับ นอกจากนี้ไคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร (1.4 กรัมต่อลิตร) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (ปริมาตรต่อ

ปริมาณ) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่การเติมสารละลายแร่ธาตุผสมของเฟอร์รัสซัลเฟต ซิงค์ซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟตและโคบอลต์-คลอไรด์ ไม่มีผลทำให้เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส คือ พีเอช 6.0

เมื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส โดยการเลี้ยงเชื้อในสภาพอาหารเหลวซึ่งใช้สปอร์เริ่มต้นปริมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้ปรับปรุงสูตรให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสปริมาณ 70 มิลลิลิตร ในเออเลนเมเยอร์ฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ พีเอช 6.0 เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสสูตรตั้งต้นประมาณ 7 เท่า โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสสูงสุด เท่ากับ 236.53 และ 0.22 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน และวัดค่าพีเอชสุดท้ายของน้ำหมักได้เท่ากับ 3.6 เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *A. foetidus* TISTR 3159 ภายใต้สภาวะการเจริญเดียวกัน พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 แต่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 อย่างมีนัยสำคัญ โดย *A. foetidus* TISTR 3159 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 211.90 และ 0.28 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน และวัดค่าพีเอชสุดท้ายของน้ำหมักได้เท่ากับ 3.4 และสามารถจำแนกชนิดของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ได้เป็น *Aspergillus niger*

Thesis Title	Isolation and Selection of Fungi from Soil in the Eastern Part of Thailand for Xylanase Production
Student	Miss Rawadee Prebour
Student ID.	44065204
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2004
Thesis Advisor	Assist. Prof. Aree Rittiboon
Thesis Co-Advisor	Mr. Sayanh Somrithipol

ABSTRACT

Xylanase producing fungi were isolated and selected from soil in Eastern Thailand. Seventy two strains of fungi were isolated, 30 of these strains were different in morphology. In these 30 strains, strain no. 15 and no. 27 were able to grow in high temperature (45°C) and alkaline (pH 8.0) conditions. When potential of using xylan as carbon source in both qualitative and quantitative methods were tested by comparing with *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 (reference strain), it was found that at pH 6, strain no.27 produced xylanase with the highest value of 3.57 when the ratio of the clear zone to that of the colony was determined in solid-state cultivation, and the xylanase activity in liquid-state cultivation was 33.82 U/ml.

Optimal conditions in xylanase production by strain no.27 using liquid-state cultivation were as follows. Corn cobs was the best carbon source compared to corn hull, sugarcane bagasse, xylan and rice straw, respectively. In addition, 3 % (w/v) corn cobs was the most suitable concentration. For organic nitrogen sources, 0.3 g/l urea, 0.25 g/l proteosepeptone and 0.05 g/l yeast extract were the most suitable sources. When diammonium hydrogen phosphate was used as inorganic nitrogen source, the highest xylanase activity was obtained compared to those of NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and NaNO_3 , and 0.3 gm of (N)/l (1.4 g/l) of diammonium hydrogen phosphate was the most suitable concentration. The adding of 0.2% (v/v) tween 80 to the culture was significantly increasing the xylanase activity while adding the mixed mineral solutions of FeSO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 and CoCl_2 were not effective for the production of xylanase by strain no.27. pH 6.0 was found to be the initial pH of the medium for xylanase production.

Studies on production of xylanase under the optimal conditions of strain no.27 were performed by using liquid-state cultivation by incubating initial spores (10^6 spores/ml) in 70 ml xylan liquid medium in a 250 ml Erlenmeyer flask and shaking at 200 rpm. at 30°C for 6 days. It was found that both maximum xylanase (236.53 U/ml) and cellulase (0.22 U/ml) activities were obtained after 5 days. These values were about 7 times higher than those when the original formula of xylan medium was used. The final pH obtained on the fifth day of incubation was 3.6. When these results were compared with those of *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 under the same conditions, strain no.27 gave significantly higher xylanase activity but lower cellulase activity than *A. foetidus* TISTR 3159. The highest xylanase and cellulase activities produced by *A. foetidus* TISTR 3159 on the 5th day of incubation were 211.90 and 0.28 U/ml, respectively. The final pH on the 5th day of incubation of *A. foetidus* TISTR 3159 was 3.4. The fungus strain no.27 was identified as *Aspergillus niger*.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล ประธานคณะกรรมการที่
กรุณาให้คำแนะนำที่ดีและช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี ฐิตาภิชาติ
กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในภาควิชา ที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและการเขียน
วิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เหมาะสมขึ้น ดร. บุญเทียม พันธุ์เพ็ง
กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกภาควิชา ที่กรุณาให้คำแนะนำที่ดีสำหรับการทำวิจัยและช่วย
ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบุรณ์ ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ และ
อาจารย์สายัณห์ สมฤทธิผล ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบ ตลอดจน
แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดทำให้วิทยานิพนธ์นี้
สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะอาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้วิชาความรู้
คำแนะนำที่มีประโยชน์และสิ่งที่ดีต่าง ๆ มากมายสำหรับการศึกษา ให้การอบรมสั่งสอน ตลอดจน
เป็นที่ปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณสมาคมราชกรีฑาสโมสรที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในสังกัดบัณฑิตวิทยาลัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่าน เจ้าหน้าที่ธุรการและนักวิทยาศาสตร์ในสังกัดภาควิชาชีววิทยา
ประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกสำหรับทุก ๆ เรื่องที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ ด้วยความเคารพอย่างสูง ขอขอบพระคุณ
พี่ชายและพี่สาว ตลอดทั้งญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมา

สุดท้ายขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ และผองเพื่อนนักศึกษาปริญญาโททุกท่าน รวมทั้งเพื่อน
ท่านอื่น ๆ อีกมากมาย ซึ่งเป็นมิตรที่ดี ให้ความช่วยเหลือสำหรับทุกเรื่อง พร้อมทั้งเป็นที่ปรึกษา
ปัญหาต่าง ๆ และคอยเป็นกำลังใจให้กันเสมอมา ทั้งในด้านการศึกษาและการดำเนินชีวิตมาโดย
ตลอด และขอขอบคุณทุกท่านที่มีได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้
สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณ
ทุกท่าน

เรวดี ปรีบัว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	XI
สารบัญรูป.....	XIV
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร.....	4
2.2 เฮมิเซลลูโลส.....	5
2.2.1 เฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้ออ่อน.....	6
2.2.2 เฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็ง.....	8
2.2.3 เฮมิเซลลูโลสในไม้ล้มลุกและพืชตระกูลหญ้า.....	9
2.3 ไซเลน.....	9
2.4 ไซลาโนไลติกเอนไซม์.....	12
2.4.1 กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลัก.....	12
2.4.1.1 เบต้า 1,4 เอนโคไซลานเนส.....	12
2.4.1.2 เบต้า-ไซโลซิเดส.....	12
2.4.2 กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างที่เป็นกิ่งก้าน.....	13
2.4.2.1 แอลฟา-แอล-อะราบีโนฟูราโนซิเดส.....	13
2.4.2.2 แอลฟา-กลูคูโรนิเดส.....	13
2.4.2.3 อะซิทิลไซเลนเอสเตอเรส.....	13
2.5 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกเอนไซม์.....	13
2.6 การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆและคุณสมบัติของเอนไซม์.....	15

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.6.1 การผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	15
2.6.2 คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาลเนส.....	15
2.6.2.1 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อเอนไซม์.....	15
2.6.2.2 ผลของความเป็นกรดต่างต่อเอนไซม์.....	16
2.7 ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา.....	21
2.8 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา.....	24
2.8.1 Slide culture technique.....	24
2.8.2 Cover sandwich technique.....	25
2.9 การสังเคราะห์เอนไซม์ไซลาลเนสของเชื้อรา.....	25
2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซลาลโนไลติกเอนไซม์โดยการหมัก.....	27
2.10.1 แหล่งคาร์บอน.....	28
2.10.2 แหล่งไนโตรเจน.....	31
2.10.3 อุณหภูมิ.....	34
2.10.4 พีเอช.....	34
2.10.5 แร่ธาตุ.....	36
2.10.6 สารลดแรงตึงผิว(surfactant).....	37
2.10.7 ความเร็วรอบในการเขย่าและอัตราการให้อากาศ.....	38
2.10.8 สารเหนียวนำเอนไซม์.....	39
2.11 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาลเนสในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ.....	40
2.12 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาลเนสในด้านอื่นๆ.....	41
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย.....	43
3.1 วัสดุ.....	43
3.1.1 วัตถุดิบ.....	43
3.1.2 จุลินทรีย์.....	43
3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	43
3.2 อุปกรณ์.....	43
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	44
3.3.1 อาหารแข็งสูตร Czapek medium.....	44

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.3.2	อาหาร potato dextrose agar.....	44
3.3.3	อาหารแข็งสูตร Xylanmedium.....	44
3.3.4	อาหารเหลวสูตร Xylan medium.....	44
3.4	การแยกเชื้อราที่ย่อยสลายไซเลนจากดิน.....	44
3.5	การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนส.....	45
3.5.1	การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส ในเชิงคุณภาพ	45
3.5.2	การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส ในเชิงปริมาณ	45
3.6	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ของเชื้อราที่คัดเลือกได้	46
3.6.1	ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส.....	46
3.6.2	ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส.....	46
3.6.3	ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อ การผลิตเอนไซม์ไซลานเนส	47
3.6.3.1	ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์.....	47
3.6.3.2	ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์.....	47
3.6.3.3	ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์.....	48
3.6.4	พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส.....	48
3.6.5	ความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมที่มีผลต่อ การผลิตเอนไซม์ไซลานเนส	49
3.6.6	สารลดแรงตึงผิวที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส.....	49
3.7	การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ไซลานเนสที่ผลิตได้ของ เชื้อราที่คัดเลือกได้กับเชื้อราสายพันธุ์เปรียบเทียบในสภาวะการเจริญที่เหมาะสม สำหรับการผลิตเอนไซม์	50
3.8	การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราที่คัดเลือก.....	50
3.9	การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	51
บทที่ 4	ผลการทดลอง.....	52

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.1 การแยกเชื้อราที่ย่อยสลายไขมันจากดิน.....	52
4.2 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไขมันเนส.....	52
4.2.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไขมันเนส.....	52
ในเชิงคุณภาพ	
4.2.2 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไขมันเนส.....	61
ในเชิงปริมาณ	
4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไขมันเนส.....	62
ของเชื้อราที่คัดเลือกได้	
4.3.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไขมันเนส.....	62
4.3.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไขมันเนส.....	64
4.3.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อ.....	66
การผลิตเอนไซม์ไขมันเนส	
4.3.3.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์.....	66
4.3.3.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์.....	68
4.3.3.3 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์.....	70
4.3.4 พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไขมันเนส.....	72
4.3.5 ความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมที่มีผลต่อ.....	73
การผลิตเอนไซม์ไขมันเนส	
4.3.6 สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไขมันเนส.....	75
4.4 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ไขมันเนสที่ผลิตได้ของ.....	78
เชื้อราที่คัดเลือกได้กับเชื้อราสายพันธุ์เปรียบเทียบในสภาวะการเจริญที่เหมาะสม	
สำหรับการผลิตเอนไซม์	
4.5 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราที่คัดเลือก.....	81
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	88
บรรณานุกรม.....	90
ภาคผนวก.....	107
ภาคผนวก ก.....	107

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ข.....	109
ภาคผนวก ค.....	113
ประวัติผู้เขียน.....	117

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ปริมาณขององค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร..... 4
2.2	ปริมาณผลผลิตและเศษวัสดุเหลือใช้หลังการเก็บเกี่ยวที่ประเมินไว้.....5 ในปีพ.ศ. 2539/2540
2.3	คุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ..... 17
2.4	สูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ สำหรับการเพาะเลี้ยง.....32 <i>Trichoderma reesei</i> ที่ตรึงบนเส้นใยในลอน
2.5	ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลานเนสทางการค้าและผู้ผลิตทางอุตสาหกรรม.....41 ของเอนไซม์เหล่านี้
3.1	ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่าง ๆ สำหรับ..... 48 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสม
4.1	สายพันธุ์เชื้อราที่แยกได้จากธรรมชาติในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย.....53
4.2	ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่าง.....54 ขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้และของเชื้อราสายพันธุ์ เปรียบเทียบเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งที่มีไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ พีเอช 6.0 เป็นระยะเวลา 2 วัน
4.3	ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่าง.....55 ขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้และของเชื้อราสายพันธุ์ เปรียบเทียบเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งที่มีไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ พีเอช 7.0 เป็นระยะเวลา 2 วัน
4.4	ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่าง.....56 ขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้และของเชื้อราสายพันธุ์ เปรียบเทียบเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งที่มีไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ พีเอช 8.0 เป็นระยะเวลา 2 วัน

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.5	แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT).....60 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ของค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของ โคโลนีของเชื้อราที่แยกได้ที่มีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของ โคโลนีมากกว่า <i>A. foetidus</i> TISTR 3159 ในการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส ในเชิงคุณภาพ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งที่มีไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่ง คาร์บอน เป็นระยะเวลา 2 วัน
4.6	แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT).....62 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ของการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสใน เชิงปริมาณเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นระยะเวลา 6 วัน
4.7	ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อ.....68 การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลว โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน
4.8	ขนาดของสปอร์, conidiophore และ vesicle ของเชื้อราสายพันธุ์ที่.....82 13, 15, 21, 22, 27 และ 30 เมื่อเจริญบนอาหาร Czapek agar และสายพันธุ์ที่ 20 เจริญบน อาหาร Malt extract agar
4.9	ผลการจัดจำแนกเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่คัดเลือกได้โดยเปรียบเทียบ.....82 กับเอกสารและหนังสือที่จำแนกชนิดของเชื้อราของ Raper and Fennell, 1965) , Raper and Thom, (1949) และ Pitt, (1980)
ก.1	แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT).... 113 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27
ก.2	แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT)....113 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของความเข้มข้นของซังข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค.3	แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT)...114 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27
ค.4	แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT)...114 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ของความเข้มข้นของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27
ค.5	แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT)...114 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ของค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดย เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27
ค.6	แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT)...115 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ของความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมที่เหมาะสมต่อการ ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27
ค.7	แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT)...115 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของความเข้มข้นของ Tween 80 ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27
ค.8	แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT)...116 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสและค่ากิจกรรมเอนไซม์ เซลลูเลสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 กับ <i>A. foetidus</i> TISTR 3159 ในอาหารเหลวสูตรที่มี สถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	โครงสร้างของ galactoglucomannans.....6
2.2	โครงสร้างของ arabinoglucuronoxylan.....7
2.3	โครงสร้างของ arabinogalactan.....8
2.4	โครงสร้างของ glucuronoxylan.....9
2.5	โครงสร้างของ glucomannan.....9
2.6	โครงสร้างของ O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan.....10
2.7	แผนผังของโครงสร้างของไซแลน ซึ่งแสดงความแตกต่างของกลุ่มแทนที่.....11 กับตำแหน่งที่จับ
2.8	ส่วนประกอบของ arabino-4-O-methylglucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้ออ่อน).....11
2.9	ส่วนประกอบของ O-acetyl-4-O-methylglucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้อแข็ง).....12
2.10	(A) การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซแลน.....14 (B) การย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยเบต้า-ไซโลซิเดส
2.11	โครงสร้างของเชื้อรา.....22
2.12	วงจรชีวิตโดยทั่วไปของเชื้อรา.....22
2.13	แสดงการย่อยสลายภายนอกเซลล์ของเชื้อรา เอนไซม์หลังออกมาเพื่อย่อย.....24
	สารพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่ได้เป็นสารตัวกลางเกิดขึ้น และต่อมาจะเกิดการย่อย สลายได้ผลเป็นหน่วยของมอนอเมอร์เพื่อให้เชื้อราดูดซึมต่อไป
4.1	ลักษณะวงไศรอบโคโลนีของ <i>Aspergillus foetidus</i> TISTR 3159.....59 เมื่อเจริญในสภาวะอาหารแข็งที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ใน สภาวะพีเอช 6.0 (บนข้าว) พีเอช 7.0 (บนขวา) และพีเอช 8.0 (ล่าง) เป็นระยะเวลา 2 วัน
4.2	ลักษณะวงไศรอบโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27.....59 เมื่อเจริญในสภาวะอาหารแข็งที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ใน สภาวะพีเอช 6.0 (บนข้าว) พีเอช 7.0 (บนขวา) และพีเอช 8.0 (ล่าง) เป็นระยะเวลา 2 วัน
4.3	ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส..... 63 โดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.4	ผลของความเข้มข้นของซังข้าวโพดที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส..... 65 โดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน
4.5	ผลของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส..... 69 โดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน
4.6	ผลของความเข้มข้นของโคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีต่อ..... 71 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดย การเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน
4.7	ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส..... 73 โดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน
4.8	ผลของความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส..... 74 โดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน
4.9	ผลของ Tween 80 ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส..... 77 โดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน
4.10	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27..... 79 และ <i>A. foetidus</i> TISTR 3159 ในสภาวะอาหารเหลวที่มีการปรับปรุงสูตรให้เหมาะสมต่อการ ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่ม ต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11	80
การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 และ..... 80	
<i>A. foetidus</i> ในสภาวะอาหารเหลว ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับปรุงสูตรให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลันเนส โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน	
4.12	84
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 13.....84	
4.13	85
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 15.....85	
4.14	85
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 20.....85	
4.15	86
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 21.....86	
4.16	86
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 22.....86	
4.17	87
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27.....87	
4.18	87
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 30.....87	
ข.1	111
กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส.....111	
กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร	
ข.2	112
กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคส.....112	
กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร	

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นสารประกอบเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide) มีหน้าที่เป็นตัวค้ำจุนเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์พืช มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก คือ ดี-ไซโลส (D-xylose), ดี-แมนโนส (D-mannose), ดี-กาแลคโตส (D-galactose) และแอล-อะราบินโนส (L-arabinose) โดยมีสายโซ่ (side chain) คือ 4-O-methyl-D-glucuronic acid เชื่อมกันด้วยพันธะ β -glycosidic การแบ่งชนิดของเฮมิเซลลูโลสจึงแบ่งตามชนิดของน้ำตาล ได้แก่ ไซแลน (xylan) แมนแนน (mannan) กาแลคแทน (galactan) และอะราบินแนน (arabinan) เป็นต้น โดยส่วนมากเฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างหลักเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่เรียกว่าไซแลน ซึ่งไซแลนมีโครงสร้างหลักเป็นเบต้า-ดี-ไซโลส (β -D-xylose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic) และมีโซ่กิ่ง (branch chain) เป็นพวกกลุ่มacetyl, 4-O-methyl-D-glucosyl และ L-arabinofuranosyl ไซแลนมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ดังนั้นในการย่อยสลายให้สมบูรณ์ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติก (xylanolytic enzyme) หลายชนิดเข้าช่วยในการทำปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลัก ได้แก่ เอนโด-ไซลานเนส (endo-1,4- β -xylanase) และเบต้า-ไซโลซิเดส (β -xylosidase) ส่วนเอนไซม์ที่ย่อยสลายส่วนที่เป็นโซ่กิ่ง ได้แก่ แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟูราโนซิเดส (α -L-arabinofuranosidase), แอลฟา-กลูคูโรนิเดส (α -glucuronidase) และอะซิลิลไซแลน-เอสเตอเรส (acetylxytan esterase) ดังนั้นเอนไซม์ไซลานเนสจึงมีศักยภาพในการที่จะเปลี่ยนไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสได้เป็นน้ำตาล แอลกอฮอล์ และผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์อื่น ๆ (Wong *et. al.*, 1988)

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพมากที่สุดในการย่อยสลายสารลิกโนเซลลูโลส (Beguin, 1990) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของพืชในสภาพธรรมชาติและเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ใช้แล้วไม่หมดไป (reversible natural resources) แหล่งใหญ่มาก (McCarthy, 1987) แต่ยังมีเชื้อราน้อยชนิดที่สามารถย่อยสลายสารเหล่านี้ และให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอนไซม์ไซลานเนสที่เป็นไปได้ทางเศรษฐกิจ (Bisaria and Ghose, 1981) โดยเอนไซม์ไซลานเนสเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากมีศักยภาพทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและมีการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมอาหาร ยารักษาโรค และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมกระดาษ ถ้าการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากสารลิกโนเซลลูโลสเป็นไปได้ จะเป็นการนำแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกมาใช้แทนแหล่งคาร์บอนเดิมที่ใช้กันอยู่ซึ่งมี

ราคาแพงมาก จึงเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตได้เป็นอย่างมาก เนื่องจากแหล่งคาร์บอนคิดเป็นร้อยละ 50 ของต้นทุนการผลิตเอนไซม์ทั้งหมด (Chahal, 1985)

งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการแยกเชื้อราจากดิน โดยเฉพาะในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทยซึ่งมีลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่หลากหลายและน่าจะมีการแปรผัน (variation) ของเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างมาก เพื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่สามารถย่อยสลายไซเตรนที่เป็นองค์ประกอบของสารลิกโนเซลลูโลสเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซเตรนสที่นำไปได้ในทางเศรษฐกิจ และในประเทศไทยนั้นเป็นประเทศที่มีการทำเกษตรกรรมจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรค่อนข้างมาก ซึ่งมีส่วนประกอบของเฮมิเซลลูโลสอยู่ด้วย จึงคิดว่าน่าจะนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเหล่านี้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อรา เพื่อเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ไซเตรนส

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราจากดินที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซเตรนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซเตรนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซเตรนสของสายพันธุ์เชื้อราที่คัดเลือกได้ โดยศึกษาหาสภาวะที่เชื้อราจะผลิตเอนไซม์ไซเตรนสได้สูงและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้น้อยหรือไม่มีการผลิต โดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ เช่น ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อยและฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ไซเตรนบริสุทธิ์ซึ่งมีราคาสูงเป็นตัวเปรียบเทียบ พร้อมทั้งศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา เช่น ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น ผลของแร่ธาตุและสารลดแรงตึงผิว (surfactant) เป็นต้น

1.2.3 เพื่อศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซเตรนสที่คัดเลือกได้อย่างเหมาะสม การจำแนกเชื้อราจะจำแนกจนถึงระดับสปีชีส์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เก็บตัวอย่างเชื้อราจากดินตามสถานที่ที่แตกต่างกัน เช่น ป่าไม้ ภูเขา เป็นต้น ในเขตท้องที่ภาคตะวันออกของประเทศไทยมาทำการแยกเชื้อ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซเตรนเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อให้ได้สายพันธุ์เชื้อราที่บริสุทธิ์ นำเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเบื้องต้น เช่น สีของเส้นใย สีของสปอร์ และตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อจำแนกความแตกต่างเบื้องต้นของเชื้อรา ทำการเก็บเชื้อราที่แยกได้ในอาหาร

potato dextrose agar (PDA) จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาคัดเลือกโดยการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในสภาพอาหารแข็งที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยวัดจากขนาดของวงใสรอบโคโลนี (clear zone) และขนาดของโคโลนี เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีกับขนาดของโคโลนี ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาพอาหารเหลวโดยมีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีที่สุด นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสโดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร เช่น ชั่งข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อยและฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับการใช้ไซเลน และศึกษาปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้น ผลของแร่ธาตุผสมและผลของสารลดแรงตึงผิว เป็นต้น โดยการเลี้ยงเชื้อในระดับพลาสติก แล้วนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรามาวัดค่าพีเอชและทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ไซลานเนส (Tang *et. al.*, 1987) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Mandels and Weber, 1969) และเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้กับสายพันธุ์อ้างอิง ซึ่งเป็นสายพันธุ์เชื้อราที่ผ่านการกลายพันธุ์เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ได้แก่ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็นที่ต้องการมาศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสมากที่สุดและผลิตเอนไซม์ไซมเซลลูเลสน้อยหรือไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นนำสายพันธุ์ของเชื้อราที่คัดเลือกมาจำแนกชนิดของเชื้อราถึงระดับสปีชีส์ตามวิธีของ Campbell *et. al.* (1985) โดยการเตรียม slide culture plate technique ตรวจสอบรูปร่างลักษณะของเชื้อรารายได้กล้องจุลทรรศน์ ทำการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่มี camera lucida ประกอบอยู่ แล้วเปรียบเทียบกับเอกสารและหนังสือที่จำแนกชนิดของเชื้อรา ได้แก่ The Genus *Aspergillus* (Raper and Fennell , 1965) ; A manual of the *Penicillia* (Raper and Thom , 1949) และ The Genus *Penicillium* (Pitt , 1980)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถแยกและคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราในสภาพธรรมชาติที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลานเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี
- 1.4.2 ทำให้ทราบถึงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อราที่คัดเลือกได้
- 1.4.3 เป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่มีอยู่เป็นปริมาณมากในประเทศไทยเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า ซึ่งเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

บทที่ 2

การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร

วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร เป็นสารพอลิกลินโนเซลลูโลส (lignocellulose) ที่มีองค์ประกอบหลักเป็น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน อยู่ร่วมกันในผนังเซลล์พืช ซึ่งปริมาณองค์ประกอบของสารต่างๆ เหล่านี้ขึ้นกับชนิดของพืช (ตารางที่ 2.1) ในแต่ละปีมีปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั่วโลกประมาณ $10-50 \times 10^9$ ตัน (Kuhad, 1999) ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ในแต่ละปีจึงมีปริมาณวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรประเภทต่างๆ เช่น ฟางข้าว ชัง และเปลือกข้าวโพด ชานอ้อยและเปลือกถั่วเป็นจำนวนมาก ปริมาณผลผลิตและวัสดุเศษเหลือหลังการเก็บเกี่ยวของประเทศไทยที่ประเมินไว้ในปี พ.ศ. 2539/2540 โดยสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร แสดงดังตาราง ที่ 2.2 โดยพบว่าเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในประเทศไทยมีปริมาณมากกว่า 74,765,000 ตัน ซึ่งการนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์มีค่อนข้างน้อย โดยมากจะถูกทิ้งสะสมเป็นของเสีย แต่ในปัจจุบันมีการนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและมีปริมาณมากในแต่ละปี

ตารางที่ 2.1 ปริมาณขององค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (%)

Substrate	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	Ash
Bagasse	33	30	29	4
Barley straw	40	20	15	11
Birch	40	33	21	4
Corn cobs	42	39	14	2
Corn hull	43.8	39.6	14.3	1.6
Oat straw	41	16	11	12
Pine	41	10	27	8
Rice straw	32	24	13	12
Rice hulls	36	15	19	20
Rice bran	13	11	N.D.	21
Saw dust	55	14	21	5
Wheat straw	30	24	18	10

N.D. = not determined

ที่มา : Barber and Benedito de Barder (1974) ; Kuhad (1999)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณผลผลิตและเศษวัสดุเหลือใช้หลังการเก็บเกี่ยวที่ประเมินไว้ในปี

พ.ศ. 2539/2540

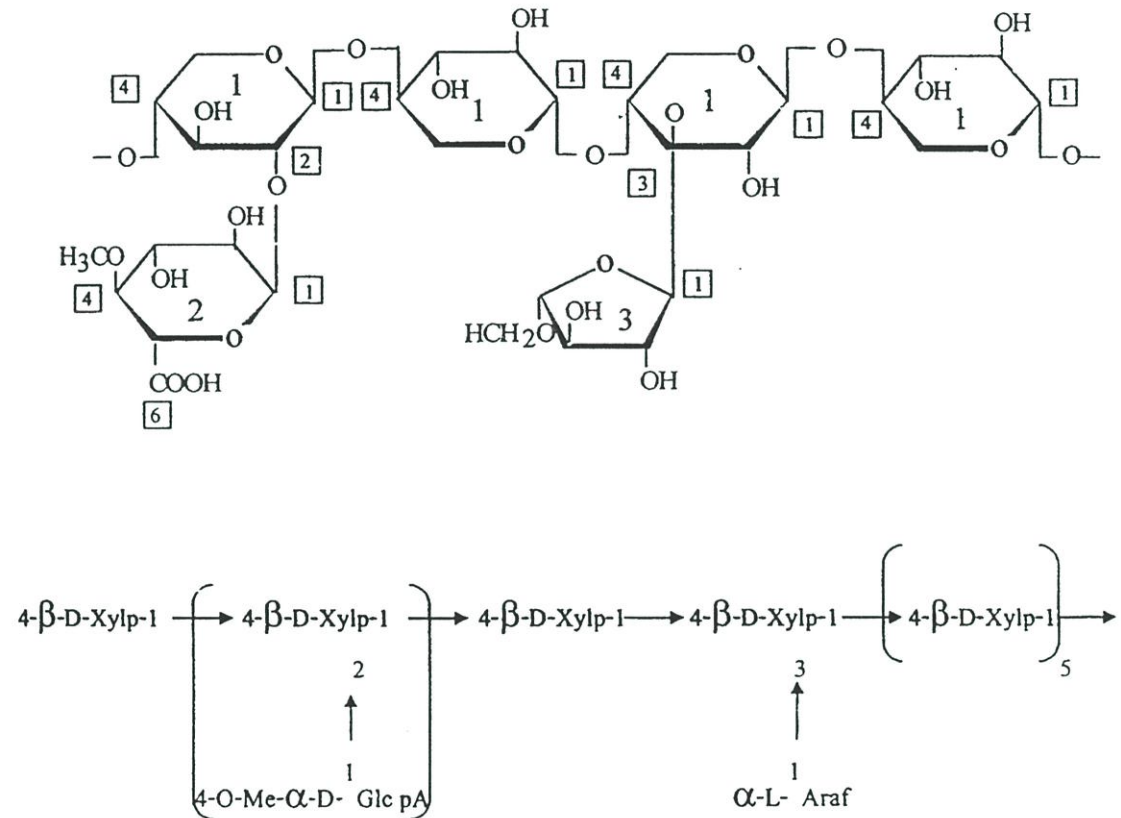
รายการ	ผลผลิต (x 1000 ตัน)	เศษพืช (x 1000 ตัน)
ข้าว	22,332	แกลบ : 2,904 – 8,933 ฟาง : 38,567 – 55,493
ข้าวโพด	4,533	ซัง : 680 ใบและต้น : 6,800 เปลือก : 45
มันสำปะหลัง	18,084	ต้น (สด) : 8,355 ใบ (สด) : 514
อ้อย	56,394	กากอ้อย : 10,906
ข้าวฟ่าง	225	ต้น : 1,027
ถั่วเขียว	218	ต้น : 698
ถั่วเหลือง	359	เปลือก ต้น และ ฟัก : 1,414
ถั่วลิสง	147	เปลือก : 90
ฝ้าย	75	ต้น : 184
มะพร้าว	1,419	กะลา : 428 กาบ : 2,129
สับปะรด	1,987	ใบ จุก และ แขนง : 40 - 18
รวม	105,773	74,765 – 97,729

ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2542)

2.2 เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตประเภทเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ มีหน้าที่เป็นตัวค้ำจุนเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์พืช ต่างจากเซลลูโลสตรงที่เซลลูโลสเป็นสารประกอบประเภทโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ที่ประกอบด้วยกลูโคสเพียงอย่างเดียว เฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก คือ ดี-ไซโลส ดี-แมนโนส ดี-กาแลคโตสและแอล-อะราบิโนส โดยมีสายโซ่ข้าง (side chain) คือ 4-O-methyl-D-glucuronic acid เชื่อมกันด้วยพันธะ β -glycosidic การแบ่งชนิดของเฮมิเซลลูโลสจึงแบ่งตามชนิดของน้ำตาล ได้แก่ ไซแลน แมนแนน กาลแลคแทนและอะราบิแนน เป็นต้น โดยส่วนมากเฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างหลักเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วย

2.2.1.2 อะราบินอกลูคูโรโนไซแลน (arabinoglucuronoxylan) เป็นเฮมิเซลลูโลสที่พบในไม้เนื้ออ่อนประมาณร้อยละ 5 ถึง 10 มีโครงสร้างหลักเป็น β -D-xylopyranose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic มีสายโซ่กิ่งเป็น 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid เชื่อมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของน้ำตาลไซโลส และมี L-arabinofuranose เชื่อมที่ตำแหน่ง C3 ของน้ำตาลไซโลสของสายไซแลน โดยเฉลี่ยมี 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid ประมาณ 2 กลุ่มต่อ 10 หน่วยของไซโลส และมี L-arabinofuranose เฉลี่ย 1.3 กลุ่มต่อ 10 หน่วยของไซโลส ดังรูปที่ 2.2

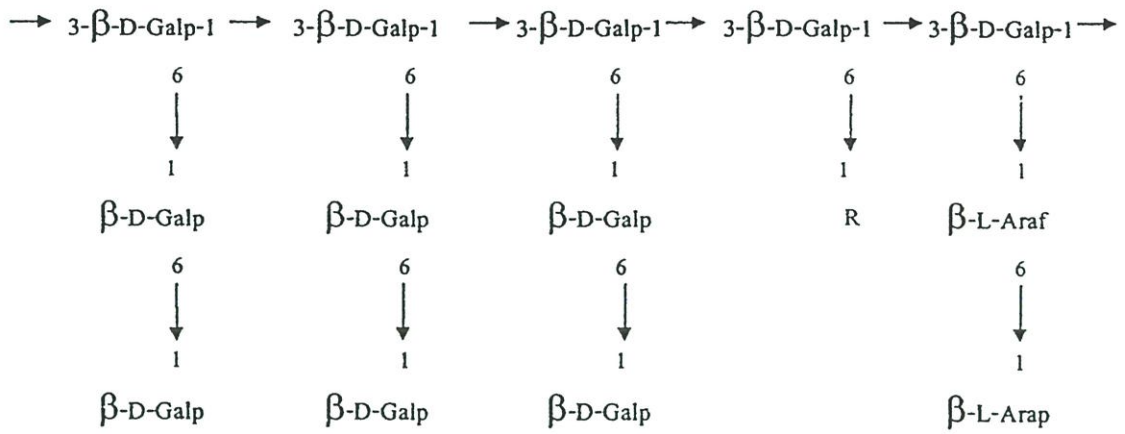


รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ arabinoglucuronoxylan

น้ำตาลตำแหน่งที่ 1, β -D-xylopyranose (Xylp); 2, 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid (Glc pA); 3, α -L-arabinofuranose (Araf)

ที่มา : Sjostrom (1981)

2.2.1.3 อะราบินอกาแลคแทน (arabinogalactan) เป็นเฮมิเซลลูโลสที่สามารถละลายน้ำได้ มีโครงสร้างหลักเป็น D-galactopyranose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,3-glycosidic และมีสายโซ่กิ่งเป็น L-arabinose เชื่อมต่อกับสายของ D-galactopyranose ด้วยพันธะ β -1,6-glycosidic ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ arabinogalactan

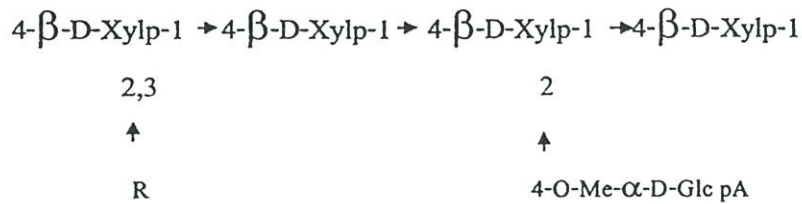
น้ำตาล $\beta\text{-D-galactopyranose}$ (Galp); $\beta\text{-L-arabinopyranose}$ (Arap); $\alpha\text{-L-arabinofuranose}$ (Araf) และ R คือ $\beta\text{-D-galactopyranose}$ หรือ $\alpha\text{-L-arabinofuranose}$ หรือ $\beta\text{-D-glucopyranosyl uronic acid}$

ที่มา : Sjostrom (1981)

2.2.2 เฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็ง

2.2.2.1 กลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) หรือ O-acetyl-4-O-methylglucurono- $\beta\text{-D-xylan}$ ในไม้เนื้อแข็งมีอยู่ประมาณร้อยละ 15 ถึง 30 ของน้ำหนักแห้งของไม้ glucuronoxylan มีโครงสร้างหลักเป็น $\beta\text{-D-xylopyranose}$ ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ $\beta\text{-1,4-glycosidic}$ ไซโลสส่วนใหญ่ประกอบด้วยหมู่อะซิทิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ของน้ำตาลไซโลส ในสายของไซแลนมีหมู่อะซิทิล 7 หน่วย ต่อ 10 หน่วยของไซโลส และมี 4-O-methyl glucuronic acid ที่เชื่อมต่อกับไซโลสด้วยพันธะ 1,4 glycosidic โดยมีกรดยูโรนิก (uronic acid) 1 หน่วย ต่อ 10 หน่วยของ ไซโลส (รูปที่ 2.4) พันธะที่เชื่อมต่อระหว่างไซโลสสามารถย่อยสลายได้ด้วยกรด ส่วนพันธะที่เชื่อมระหว่างไซโลสกับหมู่ acetyl สามารถย่อยสลายได้ด้วยด่าง

2.2.2.2 กลูโคแมนแนน (glucomannan) ในไม้เนื้อแข็งมีอยู่ประมาณร้อยละ 2 ถึง 5 ซึ่ง glucomannan มีโครงสร้างเป็น $\beta\text{-D-glucopyranose}$ และ $\beta\text{-D-mannopyranose}$ เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ $\beta\text{-1,4-glycosidic}$ (รูปที่ 2.5) อัตราส่วนของกลูโคสต่อแมนโนสในสายของ glucomannan เท่ากับ 1 ต่อ 2 หรือ 1 ต่อ 1 ขึ้นอยู่กับชนิดของไม้ glucomannan ถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยกรด



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ glucuronoxylan

น้ำตาล β -D-xylopyranose (Xylp); 4-O-methyl- α -D-glucopyranosyl uronic acid (4-O-Me- α -D-Glc pA); R คือ acetyl group (CH_3CO)

ที่มา : Sjostrom (1981)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ glucomannan

น้ำตาล β -D-glucopyranose (Glcp); β -D-mannopyranose (Manp)

ที่มา : Sjostrom (1981)

2.2.3 เฮมิเซลลูโลสในไม้ล้มลุก และ พืชตระกูลหญ้า

O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan มี degree of polymerization เท่ากับ 70 ความแตกต่างของ O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan ระหว่างไม้เนื้อแข็ง กับพืชตระกูลหญ้า คือในพืชตระกูลหญ้ามักมีพันธะ 1,3-glycosidic ที่เชื่อม 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid น้อยกว่าในไม้เนื้อแข็ง แต่จะมีปริมาณของ L-arabinofuranosyl side chain ที่เชื่อมตรงบริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 หรือทั้งสองตำแหน่งมากกว่าในไม้เนื้อแข็ง และมีหมู่อะซิทธิลเชื่อมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ในน้ำตาลไซโลสของโครงสร้างหลัก ดังรูปที่ 2.6

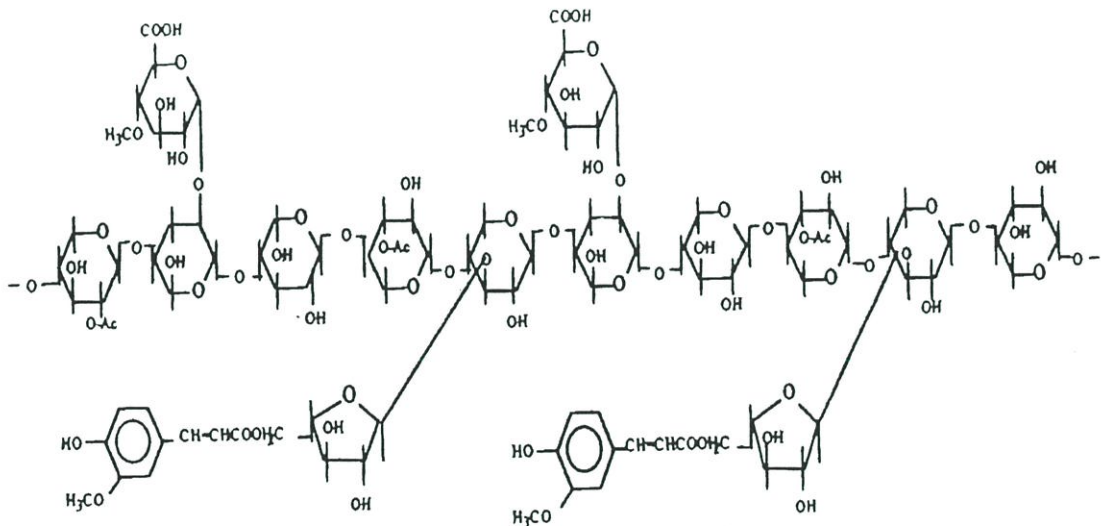
2.3 ไซแลน

ไซแลนเป็นคาร์โบไฮเดรตหลักที่พบในผนังเซลล์พืช ไม้เนื้ออ่อนพบประมาณร้อยละ 7 ถึง 12 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด ไม้เนื้อแข็งพบประมาณร้อยละ 15 ถึง 30 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด และในไม้ล้มลุกพบมากกว่าร้อยละ 30 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (Wong *et. al.*, 1988 and Whistler and Richard, 1970) ไซแลนมีโครงสร้างหลักเป็นเบต้า-ดี-ไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ

β -1,4-glycosidic และมีสายโซ่กิ่งเป็นพวก acetyl, 4-O-methyl-D-glucurosyl และ L-arabinofuranosyl group ดังรูปที่ 2.7

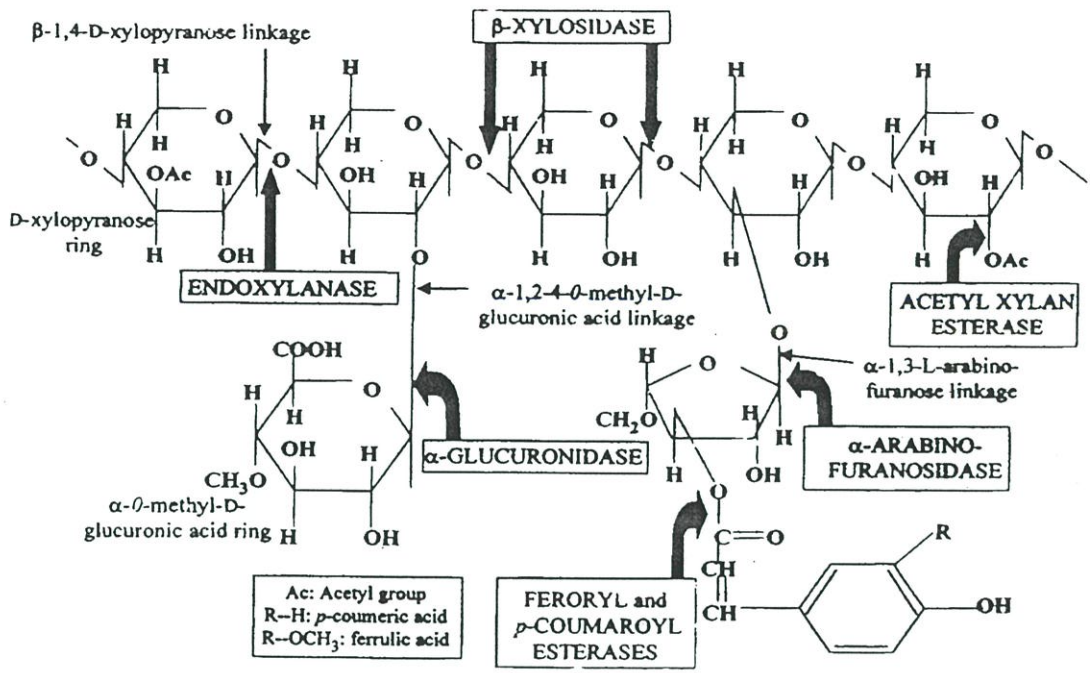
ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนได้แก่ arabino-4-O-methyl-glucuronoxylan (รูปที่ 2.8) 4-O-methylglucuronic acid สร้างพันธะ α -1,2 glycosidic bond ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของไซโลส ในโครงสร้างหลัก และมี L-arabinofuranoside เชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของน้ำตาลไซโลส ด้วยพันธะ α -1,3 glycosidic bond ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนไม่พบหมู่อะซิติก และพบว่ามียัตราส่วนของไซโลส ต่อ 4-O-methylglucuronic acid ต่อ arabinose เท่ากับ 8 ต่อ 1.6 ต่อ 1

ไซแลนในไม้เนื้อแข็งได้แก่ O-acetyl-4-O-methyl-glucuronoxylan (รูปที่ 2.9) ไซแลนในไม้เนื้อแข็งจะมีอัตราส่วนของไซโลส ต่อ 4-O-methylglucuronic acid ต่อ acetic acid เท่ากับ 10 ต่อ 1 ต่อ 7 โดยที่ไซแลนในไม้เนื้อแข็งมีหมู่อะซิติกเชื่อมต่อกับไซโลสในสายโครงสร้างหลัก ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 อยู่เป็นจำนวนมาก และทุก ๆ 10 โมเลกุลของไซโลสพบ 4-O-methylglucuronic acid เชื่อมต่อกับไซโลสที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 ของไซโลส



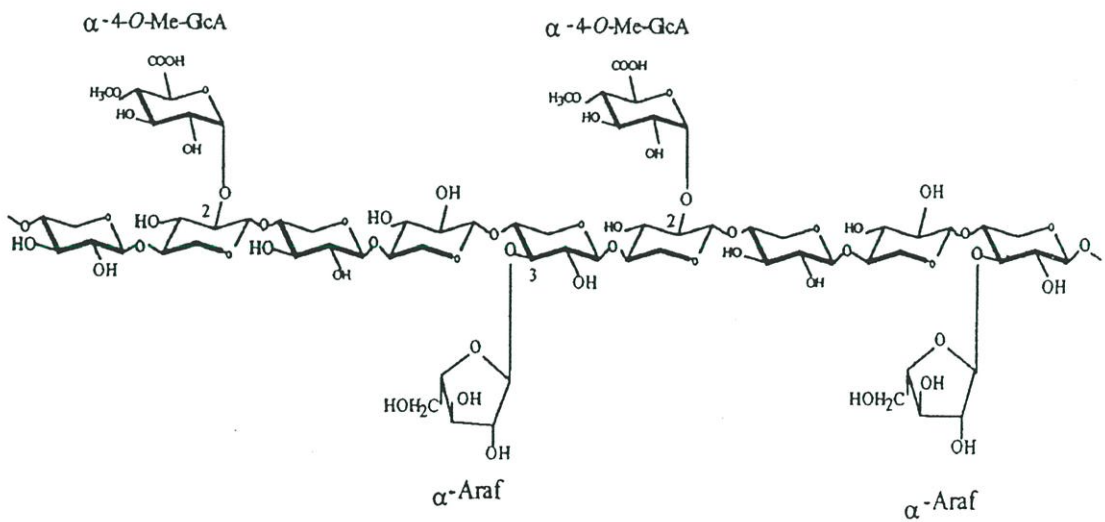
รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan ในพืชล้มลุกและพืชตระกูลหญ้า

ที่มา : Coughlan and Hazlewood (1993)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของไซแลน ซึ่งแสดงความแตกต่างของกลุ่มแทนที่กับตำแหน่งที่จับ

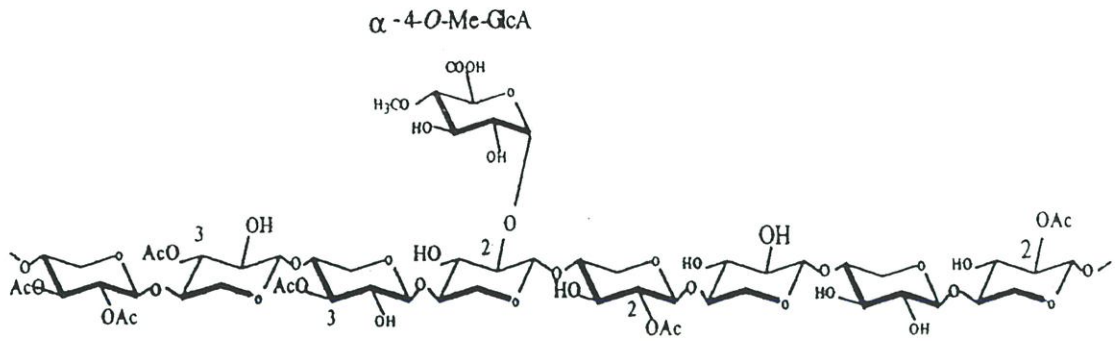
ที่มา : Beg *et. al.* (2001)



รูปที่ 2.8 ส่วนประกอบของ arabino-4-O-methyl-glucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้ออ่อน) ตัวเลขแสดงถึงตำแหน่งไซกิ่งชนิดต่าง ๆ สร้างพันธะกับคาร์บอนอะตอม

α -Araf : α -Arabinofuranose ; α -4-O-Me-GlcA ; α -4-O-methylglucuronic acid

ที่มา : Viilkari *et. al.* (1993)



รูปที่ 2.9 ส่วนประกอบของ O-acetyl-4-O-methyl-glucuronoxylan (ไซแลนในไม้เนื้อแข็ง)

ตัวเลขแสดงถึงตำแหน่งโซ่กิ่งชนิดต่าง ๆ สร้างพันธะกับคาร์บอนอะตอม

Ac : Acetyl group ; α -4-O-Me-GlcA : α -4-O-methylglucuronic acid

ที่มา : Viilkari *et. al.* (1993)

ไซแลนในไม้ล้มลุกและพืชตระกูลหญ้า ได้แก่ O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan (รูปที่ 2.6) ไซแลนในไม้ล้มลุกมีโซ่กิ่งเป็น 4-O-methylglucuronic acid น้อยกว่าในไม้เนื้อแข็ง โดยส่วนใหญ่เป็น L-arabinofuranosyl group ซึ่งเชื่อมต่อกับไซโลสใน โครงสร้างหลักที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 หรือทั้งสองตำแหน่ง นอกจากนั้นพบหมู่อะซิทธิล ร้อยละ 2 ถึง 5 เชื่อมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ในน้ำตาลไซโลสของโครงสร้างหลัก และมี arabinosyl side chain และมี *p*-coumarosyl ประมาณร้อยละ 6 และ 3 ตามลำดับ (Viilkari *et. al.*, 1993)

2.4 ไซลาโนไลติกเอนไซม์ (xylanolytic enzymes)

ไซลาโนไลติกเอนไซม์เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเฮมิเซลลูโลส ไซลาโนไลติกเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.4.1 กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลัก

2.4.1.1 เบต้า-1,4-เอนโดไซแลเนส (1,4- β -D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.8)

ย่อยสลายพันธะ β -1,4 glycosidic ภายในเส้นสายของไซแลนอย่างสุ่ม การย่อยสลายขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น เช่น ความยาวของสายไซแลนและจำนวนโซ่กิ่ง ในช่วงแรกของการย่อยสลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ เมื่อเกิดการย่อยสลายต่อไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จะถูกย่อยสลายเป็นไซโลไตรออส ไซโลไบโอสและไซโลส ตามลำดับ (Sunna and Antranikian, 1997)

2.4.1.2 เบต้า-ไซโลซิเดส (β -D-xyloside xylohydrolase; EC 3.2.1.37) เป็น

exoglycosidase ที่ย่อยสลายไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น ๆ และ ไซโลไบโอสจากปลายด้าน

non-reducing และสามารถย่อยสลายสับสเตรทสังเคราะห์ (artificial substrate) เช่น *p*-nitrophenyl- β -D-xyloside การทำงานของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสต่อการย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ลดลงเมื่อสายของไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายไซแลนได้แต่อัตราการย่อยสลายเกิดขึ้นได้ช้ามากโดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส (Kormelink *et. al.*, 1993)

2.4.2 กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างที่เป็นสายโซ่กิ่ง

2.4.2.1 แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟูรานซิเดส (α -L-arabinofuranosidase; EC 3.2.1.55) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายไซแลนโดยเฉพาะไซแลนในไม้เนื้ออ่อน อะราบินโนฟูรานซิเดสแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ (1) *exo-acting* α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) ซึ่งสามารถย่อยสลาย *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside และสาขาของ arabinan (2) *endo-1,5- α -L-arabinofuranosidase* (EC 3.2.1.99) โดยมีผลเฉพาะต่อ arabinan ที่เป็นเส้นตรงเท่านั้น และพบว่าการทำงานร่วมกันของแอลฟา-แอล-อะราบินโนฟูรานซิเดสกับไซแลเนสทำให้ได้ไซโลส ไซโลไบโอสและอะราบินอส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนเพิ่มขึ้น (Kormelink *et. al.*, 1993)

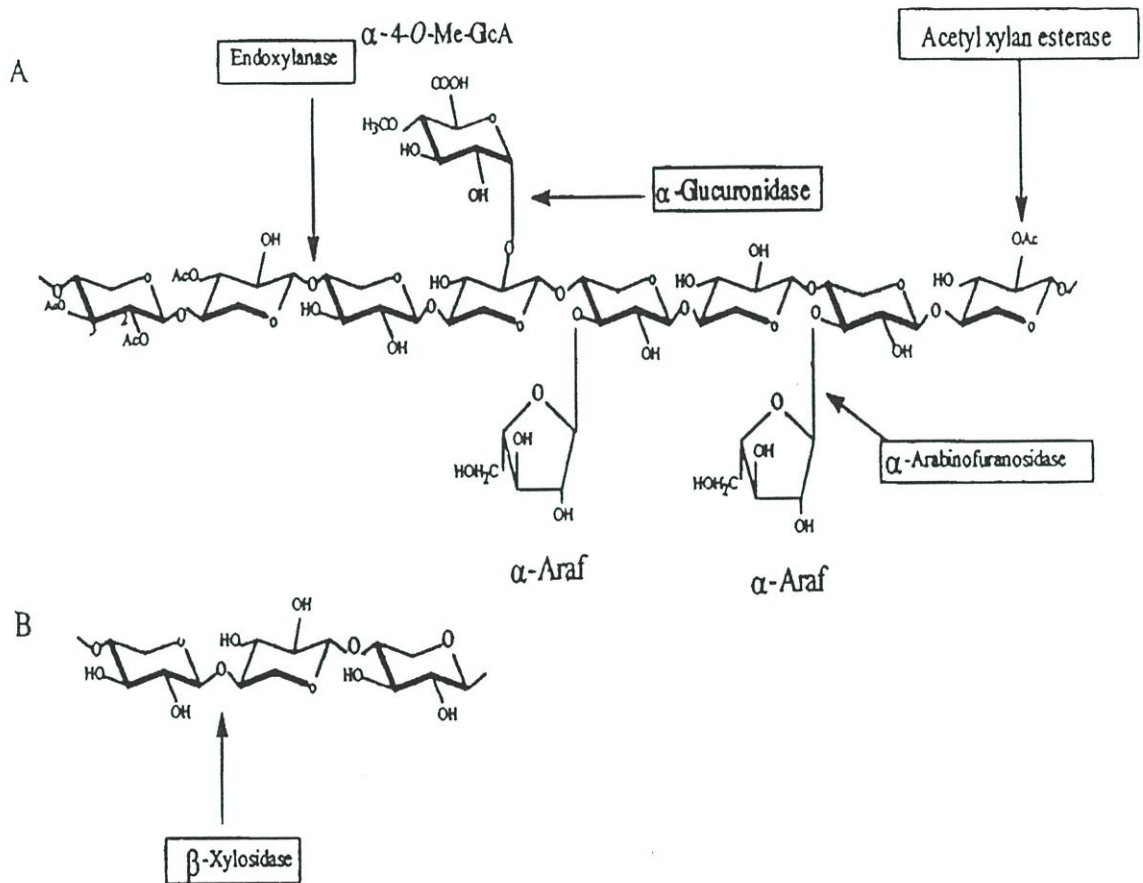
2.4.2.2 แอลฟา-กลูคูโรนิเดส (α -glucuronidase, EC 3.2.1.139) ย่อยสลาย α -1,2 linkage ระหว่างไซโลสและ D-glucuronic acid หรือ 4-O-methyl ether ที่พบในกลูคูโรโน-ไซแลน ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์แอลฟา-กลูคูโรนิเดสขึ้นอยู่กับแหล่งของเอนไซม์ (Kormelink และคณะ, 1993)

2.4.2.3 อะซิทิลไซแลนเอสเทอเรส (acetylxylnan esterase, EC 3.1.1.6) ย่อยสลายพันธะระหว่าง O-acetyl residue ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ในสายของ acetylxylnan (Kormelink *et. al.*, 1993)

2.5 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกเอนไซม์

ไซแลนมีโครงสร้างที่ซับซ้อน การย่อยสลายให้สมบูรณ์จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันในกลุ่มของไซลาโนไลติกเอนไซม์หลายชนิดเข้าช่วยในการทำปฏิกิริยา (ดังรูปที่ 2.10) ซึ่งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลักได้แก่ เอนโดไซแลเนสและเบต้า-ไซโลซิเดส ส่วนเอนไซม์ที่ย่อยสลายส่วนที่เป็นกิ่งก้านได้แก่ แอลฟา-แอล-อะราบินโนฟูรานซิเดส แอลฟา-กลูคูโรนิเดสและอะซิทิลไซแลนเอสเทอเรส ระบบของเอนไซม์ไซแลเนสจะมีเอนไซม์หลายชนิดเกี่ยวข้อง พบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีหน้าที่โดยเฉพาะในการย่อยสลายไซแลน มีการรายงานว่ามิจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกที่ซับซ้อนได้ เช่น

Penicillium purpurogenum (Belancic *et. al.*, 1995) ; *Melanocarpus albomyces* IIS 68 (Sarawat and Bisaria, 1997) ; *Aeromonas caviae* W 61 (Okai *et. al.*, 1998) เป็นต้น ยังมีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกโดย Haltrich *et. al.* (1994) รายงานว่า *Sclerotium rolfii* ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส รวมทั้งมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในการย่อยสลายไซแลนไปเป็นไซโลส



รูปที่ 2.10 (A) การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซแลน

Ac : Acetyl group; α -Araf : α -Arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcA :

α -4-O-methylglucuronic acid

(B) การย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยเบต้าไซโลซิเดส

ที่มา : Sunna and Antranikian (1997)

2.6 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และคุณสมบัติของเอนไซม์

2.6.1 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

เอนไซม์ไซลาเนสพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่นแบคทีเรีย รา ยีสต์ แอคติโนมัยสีท โปรโตซัว พืช แมลงและสัตว์ทะเลบางชนิด เอนไซม์ในกลุ่มนี้ที่นิยมศึกษามักมาจากจุลินทรีย์ เนื่องจากเจริญได้รวดเร็ว เพาะเลี้ยงได้ง่าย ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ดังตารางที่ 2.3 จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) (Gascoigne, 1960 ; Strobel, 1963 ; Kusakabe *et. al.*, 1966 and Paice *et. al.*, 1978) แต่ก็มีบางชนิดที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสอยู่ในเซลล์ (intracellular enzyme) เช่น *Aspergillus niger* (Iwamoto *et. al.*, 1973) *A. foetidus* (Whister and Masak, 1995) และ *Butyrivibrio fibrisovens* (Clarke *et. al.*, 1969) เป็นต้น และการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่จะเริ่มผลิตในระยะที่มีการเจริญคงที่ (Stationary growth phase) เช่น *Pseudomonas stuzeri* (Toh, 1978) *Streptomyces* sp. (Nakanishi *et. al.*, 1976) และ *A. niger* (John *et. al.*, 1979) เป็นต้น

2.6.2 คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

โดยทั่วไปเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน ประมาณ 50 องศาเซลเซียส แต่สำหรับพีเอชที่เหมาะสมพบว่า เอนไซม์ไซลาเนสจากแบคทีเรีย และแอคติโนมัยสีทมีพีเอชที่เหมาะสมค่อนข้างเป็นกลาง แต่ของเชื้อราค่อนข้างจะเป็นกรด ส่วนความคงตัวต่อพีเอชและความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์จะแตกต่างกันตามชนิดของ จุลินทรีย์

2.6.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อเอนไซม์

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสค่อนข้างแปรผัน โดยขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนมากจะสร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่ทำงาน ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส มีการศึกษาของ Trigo and Ball (1994) ได้รายงาน ว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Thermospora fusca* BD25 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน ที่ 60 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงมากกว่า 70 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน Ohno *et. al.* (1994) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Fusidium* BX1 พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและมีความเสถียรต่ออุณหภูมิตั้งแต่อุณหภูมิ 0 ถึง 50 องศาเซลเซียส ความสามารถในการคงตั้งที่อุณหภูมิ สูงของเอนไซม์ส่วนมากจะพิจารณาจากค่าครึ่งชีวิต (half-life ; $T_{1/2}$) ของกิจกรรมเอนไซม์ และ ความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโปรตีนใน

supernatant จากการเลี้ยงเชื้อ เอนไซม์ไฮไลเนสจากเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophilic fungi) ตามปกติจะมีความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงมากกว่าเอนไซม์ไฮไลเนสที่ได้จากเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic fungi) แต่น้อยกว่าแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophilic bacteria) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีค่าครึ่งชีวิต ($T_{1/2}$) ยาวนานที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสหรือที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไฮไลเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียเหล่านี้จะมีระดับต่ำกว่าการผลิตเอนไซม์ไฮไลเนสจากเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูง (Lisching *et. al.*, 1993) มีการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงของพวกเชื้อราชอบอุณหภูมิสูงโดย Sing *et. al.* (2000) รายงานว่าเอนไซม์ไฮไลเนสของ *Thermomyces lanuginosus* SSBP มีความสามารถคงตัวสูงที่สุดซึ่งมีค่าครึ่งชีวิต ($T_{1/2}$) เท่ากับ 337 นาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และสามารถรักษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้สมบูรณ์ที่สุดที่อุณหภูมิสูงถึง 65 องศาเซลเซียส และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ประมาณร้อยละ 45 หลังจากระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อีกทั้งยังสามารถรักษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮไลเนสได้นานที่สุดเป็นระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ยิ่งกว่านั้น Gome *et. al.*, 1993 ได้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงของ *T. lanuginosus* พบว่าความสามารถในการคงตัวที่อุณหภูมิสูงของ *T. lanuginosus* จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารลิกโนเซลลูโลสที่ใช้เป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ซังข้าวโพดและใบข้าวโพดเป็นสับสเตรทเชื้อรานี้จะมีความสามารถคงตัวที่อุณหภูมิสูงได้ดีที่สุด

2.6.2.2 ผลของความเป็นกรดต่างต่อเอนไซม์

เอนไซม์ไฮไลเนสจากแบคทีเรียส่วนใหญ่มีความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงพีเอชที่เป็นกลางถึงด่าง มีการศึกษาของ Khasin *et. al.* (1994) ได้ศึกษาถึงผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮไลเนสจาก *Bacillus stearothermophilus* พบว่าเอนไซม์ไฮไลเนสของจุลินทรีย์นี้ที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 9.0 ขึ้นไป เอนไซม์ไฮไลเนสจากเชื้อราชอบอุณหภูมิสูงส่วนใหญ่มีความสามารถในการคงตัวได้ดีในพีเอชช่วงแคบประมาณ 5.5 ถึง 9.5 แต่จะสามารถคงตัวได้ดีในพีเอชช่วงกว้างขึ้นเมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Sing *et. al.*, 2000) มีกลุ่มเชื้อราที่ชอบด่าง (Alkaliphilic fungi) เช่น *A. fischeri* Fxn 1 สามารถผลิตเอนไซม์ไฮไลเนสที่ทำงานได้ในสภาวะที่เป็นด่าง (Raj and Chandra, 1996)

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซทานเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

Microbial origin	MW (kDa)	pI	pH optimum	substrate	Main end products	Remarks	References
Bacteria							
<i>Bacillus circulans</i>	85.0	5.20	5.5-7.0	Larchwood xylan	X-X ₄		Esteban <i>et. al.</i> (1982)
<i>B. coagulans</i>	15.0	9.10	5.5-7.0		X ₂ -X ₄		Esteban <i>et. al.</i> (1983)
<i>B. pumilus</i>	22.0	10.00	6.0		X ₂ -X ₃	Trans-xylosidase activity	Panbanged, <i>et. al.</i> (1983)
<i>Bacillus sp.</i>	24.0	n. d.	6.5	Larchwood xylan, long chain preferred			Okazaki <i>et. al.</i> (1984)
<i>Streptomyces lividans</i>	n.d.	n. d.	6-7		X-X ₂		Morosoli <i>et. al.</i> (1986)
<i>Streptomyces sp. E-86</i>	43.0	5.20	6.0	Soluble oat splts	Mainly X ₂ , some X _n Little X		
<i>Streptomyces sp. No 3137</i>	40.5	7.30	5.5-6.2	corn-cob arabinoxylan	X and X ₂ , arabinosubst., oligosacch.	Arabinose not liberated	Kusakabe <i>et. al.</i> (1977 a,b)
	50.0	7.10	5.5-6.5				
	25.0	10.14	5.0-6.0	Xylan >> X ₄ >> X ₃	X and X ₂		Marui <i>et. al.</i> (1985)
<i>Streptomyces sp. KY-23</i>	25.0	10.26	5.0-6.0				
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	43.0	6.90	5.5	Larchwood xylan	Mainly X ₂ , little X	High activity towards	Nakajima <i>et. al.</i> (1984)
	65.0	4.45	5.0		X ₂ -X ₅	CMC	Lee <i>et. al.</i> (1987)
<i>C. acetobutylicum</i>	29.0	8.50	5.5-6.0	Larchwood xylan	X3 and X2	No activity towards CMC	

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

Microbial origin	Molecular Mass ^a (kDa)	pI	pH optimum	Main products analysed in the hydrolysates ^c	Remarks	References
Fungi <i>Aspergillus niger</i>	50	n.d.	5.5-6.0	X ₂ , X ₃ , AX ₃	Arabinose released, some cellulase activity	John <i>et. al.</i> (1979)
	50	n.d.	4.0-4.5	X ₂ , X ₃ , AX ₃	Extensive cellulase activity	John <i>et. al.</i> (1979)
	31	n.d.	4.0-4.5	X ₂ , X ₃ , AX ₄	Arabinose released	John <i>et. al.</i> ^b
	31	n.d.	4.0	X ₂ , X ₃ , X ₃	Some arabinose released	John <i>et. al.</i> (1979)
	30	n.d.	6.0-6.5	X ₁ , X ₄ , A	Arabinose released	John <i>et. al.</i> (1979)
<i>A. niger</i>	14	9.0	5.5	X ₃ , X ₅	Low activity against insoluble xylan	Frederick <i>et. al.</i> (1985)
	13	8.6	6.0	X ₃ , X ₅	Low activity against insoluble xylan	Frederick <i>et. al.</i> (1985)
	21	6.7	4.0-6.0	X ₂ , X ₁	Low activity against insoluble xylan	Frederick <i>et. al.</i> (1985)
	14	4.5	4.9	X ₂ , X ₆	Low activity against insoluble xylan	Shei <i>et. al.</i> (1985)
	28	3.65	5.0	X ₃ , X ₅	Hydrolyses insoluble, unsubstituted xylan	Fournier <i>et. al.</i> (1985)
	27	4.2	4.0	X ₂ , X ₃ , X ₁	Xylan solubilization, no cellulase activity	Gorbacheva and Rodionova (1977 a, b)
<i>A. niger</i>	16	4.0	n.d.	X ₃ , X ₅	Transferase activity	Vrsanska <i>et. al.</i> (1982)
<i>A. ochraceus</i>	48	n.d.	6.0-7.0	X ₃ , X ₂	Arabinose released	Biswas <i>et. al.</i> (1990)
<i>A. fumigatus</i>	21	9.5	6.5	X ₂ , X ₃	Hydrolyses insoluble, unsubstituted xylan	Bailey <i>et. al.</i> (1991) and unpublished data
	29	5.7	5.5	X ₂ , X ₃ , X ₁	Hydrolyses insoluble, unsubstituted xylan	Bailey <i>et. al.</i> (1991) and unpublished data
<i>A. oryzae</i>	35	6.9	5.0	(X ₂ , X ₃ , X ₁)	Hydrolyses insoluble, unsubstituted xylan	Bailey <i>et. al.</i> (1991)

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

Microbial origin	Molecular Mass ^a (kDa)	pI	pH optimum	Main products analysed in the hydrolysates ^c	Remarks	References
<i>Trichoderma viride</i>	18 ^b	9.2	4.8	X ₂ , X, A, GAX ₂	Arabinosid	Sinner and Dietrichs (1975, 1976)
	20	8.5	4.5-5.0	X ₂ , X ₃	CMC also hydrolysed	Gibson and McCleary (1987)
	13 ^b	8.6	5.0	X-X ₃	-	Labavitch and Greve (1983)
	22	9.3	5.0	X, X ₂	-	Ujite <i>et. al.</i> (1991)
	22	9.2	n.d.	n.d.	-	Dean and Anderson (1991)
	22	> 9	4.0-5.0	X ₂ , X	-	Lappalainen (1986)
<i>T. reesei</i>	20	9.0	5.0-5.5	X ₂ -X ₆	transferase activity	Tenkanen <i>et. al.</i> (1992)
	19	5.5	4.0-4.5	X ₂ -X ₆	-	Tenkanen <i>et. al.</i> (1992)
<i>T. harzianum</i>	29	9.5	5.0	X-X ₄	-	Tan <i>et. al.</i> (1985a, b)
	20	9.4	5.0	X-X ₄	transferase activity	Tan <i>et. al.</i> (1985a, b)
	22	8.5	4.5-5.0	X-X ₄	-	Wong <i>et. al.</i> (1986a)
	18	7.3	4.9-5.5	X ₂ , X ₃ , AX ₄	-	Wood and McCrae (1986)
<i>T. pseudokoningii</i>	29	7.2	4.9-5.8	X ₂ -X ₃ , X, A	Arabinosid released	Wood and McCrae (1986)
	15	9.6	5.0	X ₂ -X ₅	-	Baker <i>et. al.</i> (1977)
<i>T. lignorum</i>	20	8.7	6.5	X ₂ , AX ₄ (X, X ₃ , AX ₃)	transferase activity	John and Schmidt (1988)
	21	5.1	3.5	X ₂ , AX ₄ (X, X ₃ , AX ₃)	-	John and Schmidt (1988)

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

Microbial origin	Molecular Mass ^a (kDa)	pI	pH optimum	Main products analysed in the hydrolysates ^c	Remarks	References
<i>T. longibrachiatum</i>	22	9.5	5.0	X ₂ - X ₃	transferase activity	Royer (1988)
	33	9.3	5.0	X, X ₂	-	Royer (1988)

^a SDS-PAGE ; ^b gel chromatography ; ^cX, xylose ; A, arabinose ; G, methylglucuronic acid ; n.d., not determined.

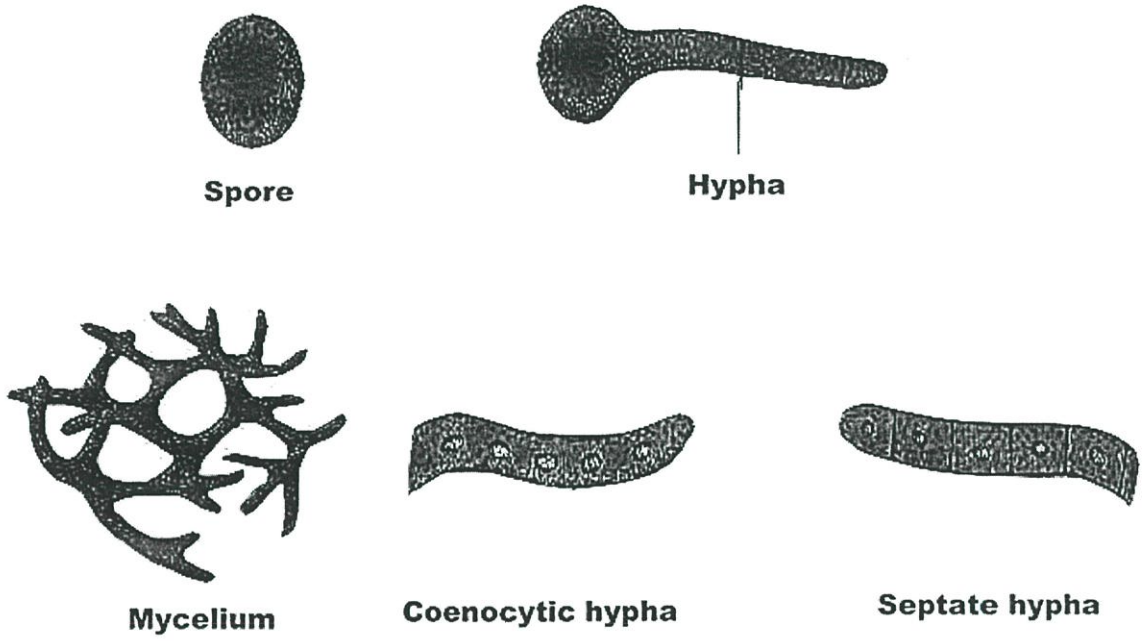
CMC=carboxymethyl cellulose

ที่มา : Tsujibo *et. al.* (1997)

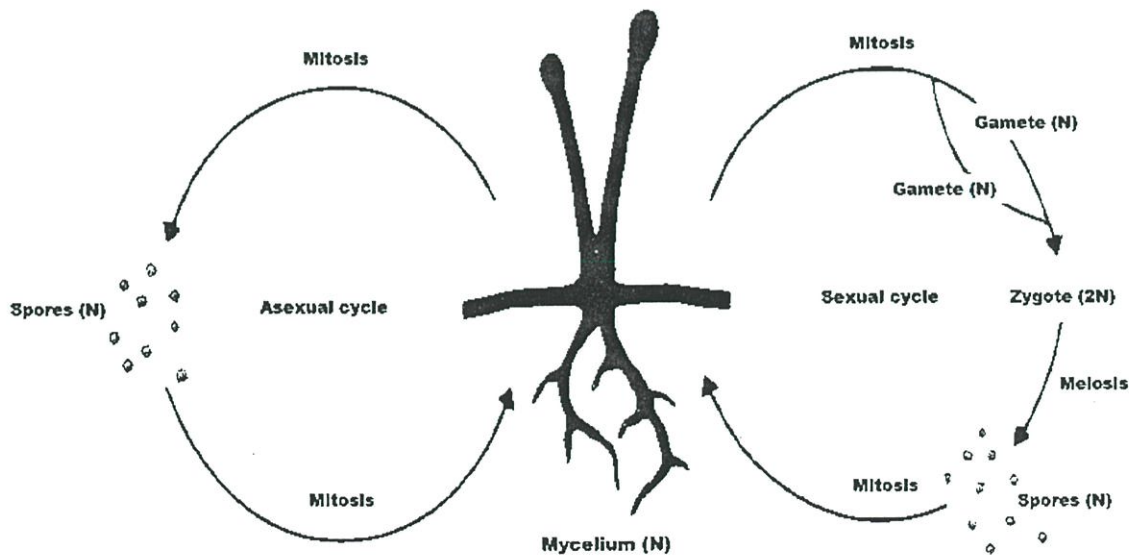
2.7 ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา

เชื้อราที่แท้จริงจัดอยู่ในอยู่ 4 ไฟลัม คือ Chytridiomycota , Zygomycota , Ascomycota และ Basidiomycota (Kirk *et. al.*, 2001) เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ชนิดเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic) ซึ่งแต่ก่อนพิจารณาว่าเป็นพืชชั้นต่ำ ไม่มีคลอโรฟิลล์ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อมีความชัดเจนทางด้านโมเลกุลจึงได้มีข้อเสนอแนะสนับสนุนว่าเชื้อรามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดเกี่ยวกับสัตว์มากกว่ากลุ่มของสิ่งมีชีวิตพวายุคาริโอต (eukaryotes) ชนิดอื่น โดยในความเป็นจริงแล้วเชื้อรามีลักษณะพิเศษอยู่ในตัวเองและมีอยู่เพียงกลุ่มเดียวในโลกจึงกำหนดให้มีอาณาจักรของตัวเอง ซึ่งมีการจัดจำแนกไว้มากกว่า 70,000 สปีชีส์ และในแต่ละปีมีการค้นพบอีกประมาณ 1,700 สปีชีส์ สำหรับการคาดคะเนอย่างคร่าว ๆ พิจารณาว่าจำนวนทั้งหมดของเชื้อรามีกว่า 1.5 ล้าน สปีชีส์ (Hawksworth, 1991) ดังนั้นเชื้อราจึงจัดว่าเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากกลุ่มของพวกแมลง

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีนิวเคลียสแบบยูคาริโอต ไม่มีคลอโรฟิลล์ สร้างสปอร์ได้ มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบมีเพศและไม่มีเพศ โครงสร้างเป็นแบบเซลล์เดี่ยวหรือหลายเซลล์ โดยเซลล์เรียงตัวอยู่ในแนวเดียวกันเป็นเส้นใยที่เจริญขยายตามแนวยาวได้อย่างไม่มีขอบเขตจำกัด ผนังเซลล์ประกอบด้วยสารพวกไคตินหรือเซลลูโลส (บัญญัติ สุขศรีงาม , 2534) เชื้อราที่มีเซลล์เดี่ยวเรียกว่ายีสต์ ส่วนพวกที่มีหลายเซลล์จะประกอบด้วยเซลล์เรียงตัวในแนวเดียวกันเป็นเส้นใยเรียกว่า ไฮฟา (hypha) ดังแสดงในรูปที่ 2.11 เส้นใยจะมีการเพิ่มจำนวนและรวมกลุ่มกันจนมีขนาดใหญ่และมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) เชื้อราส่วนมากมีเส้นใยแบบมีผนังกัน เรียกว่า septate hypha ทำให้มีลักษณะเป็นห้อง ๆ ซึ่งผนังกันนั้นเรียกว่า septa โดยแต่ละเซลล์จะเชื่อมต่อกันด้วยรูตรงกลางของผนังกัน ในแต่ละเซลล์อาจมีหนึ่งนิวเคลียส (uninucleate) หรือหลายนิวเคลียส (multinucleate) ส่วนชนิดของเชื้อราที่เส้นใยไม่มีผนังกัน เรียกว่า coenocytic hypha ทำให้เส้นใยมีลักษณะเป็นท่อทะลุถึงกันโดยตลอด เป็นเซลล์ที่ยาวมีหลายนิวเคลียส เชื้อรามีการเจริญอย่างรวดเร็วที่บริเวณปลายสุดของเส้นใย การแบ่งนิวเคลียสของเชื้อราไม่เหมือนกับจุลินทรีย์ชั้นสูงกว่า เนื่องจากไม่มี centrioles โดยจะไม่แยกออกจากกันระหว่างระยะไมโทซิส (mitosis) (คือ ไมโทซิสแบบ “ปิด” โดยมีลักษณะของการเกิดไมโทซิสน้อยมาก) ซึ่งโดยทั่วไปวงจรชีวิตของเชื้อราจะเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยในระยะดิพลอยด์ (diploid) จะมีการสร้างไซโกต (zygote) หลังจากนั้นจะตามด้วยการแบ่งนิวเคลียสในระยะไมโอซิส (meiosis) และเกิดการสร้างสปอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของเชื้อรา
ที่มา : Vodopich and Moore (2002)



รูปที่ 2.12 วงจรชีวิตโดยทั่วไปของเชื้อรา
ที่มา : Vodopich and Moore (2002)

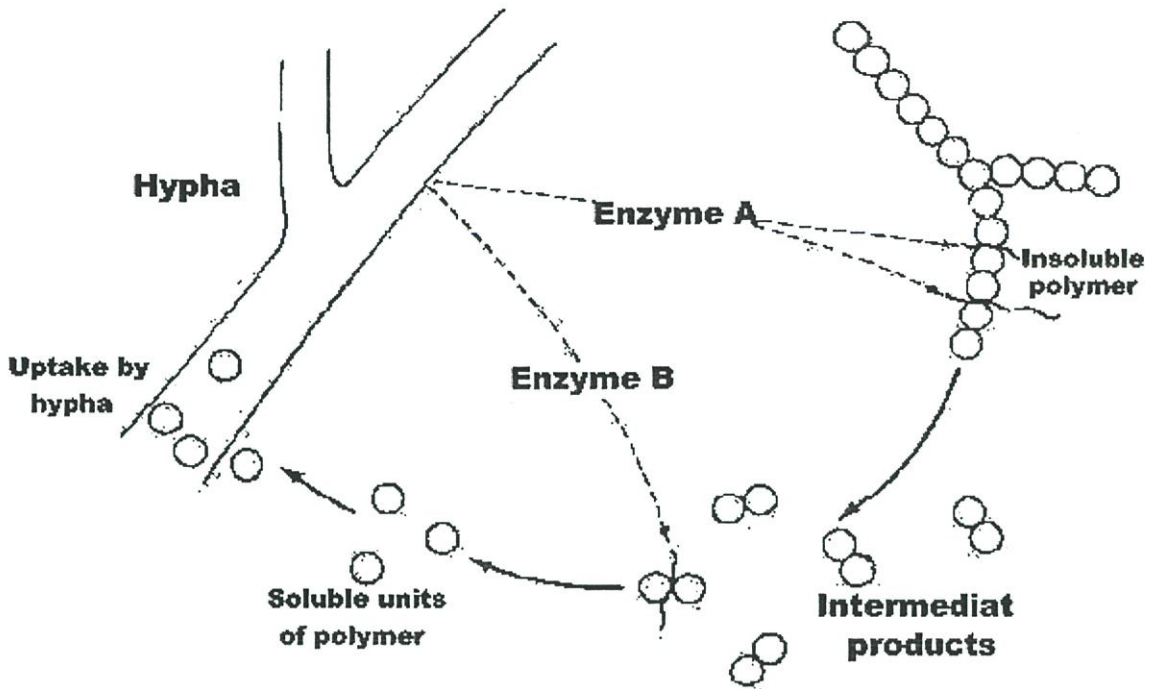
สภาพแวดล้อมในการเจริญของเชื้อราโดยทั่วไปที่สำคัญ ๆ (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534) ได้แก่

1. **อาหาร** อาหารที่จำเป็นในการเจริญเป็นได้ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยทั่วไปเชื้อราจะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ใช้สารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน การเจริญของเชื้อราในอาหารต่าง ๆ นั้นมีการสร้างเอนไซม์ออกมาสองชนิด คือเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์และเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์จะปลดปล่อยออกมาจากเซลล์เพื่อย่อยสลายอาหารที่มีโมเลกุลซับซ้อนให้เป็นสาร โมเลกุลเชิงเดี่ยวเพื่อให้ดูดซึมไปใช้ได้ ส่วนเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์จะย่อยสลายสารอาหารที่ดูดซึมเข้าไปและปลดปล่อยพลังงานออกมาใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์

2. **อุณหภูมิ** เชื้อรามีช่วงอุณหภูมิในการเจริญได้แคบกว่าแบคทีเรีย ส่วนมากเจริญที่อุณหภูมิ 0 ถึง 35 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส และในบางชนิดเป็นพวกเชื้อราชอบอุณหภูมิสูง มีอุณหภูมิสูงสุดเจริญได้ที่ 50 องศาเซลเซียส และในบางครั้งอาจถึง 60 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิต่ำเจริญได้คือ 20 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามสปอร์ของเชื้อราบางชนิดทนต่ออุณหภูมิต่ำมาก ๆ ได้ดี เช่น สปอร์ที่อยู่ในไนโตรเจนเหลวจะทนอุณหภูมิต่ำได้มากถึง -196 องศาเซลเซียส

3. **พีเอช** เชื้อราเจริญได้ในช่วงพีเอช 2 ถึง 10 แต่พีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4 ถึง 6 ซึ่งเป็นกรด ดังนั้นสภาพที่เป็นกรดจะทำให้เชื้อราเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย

เชื้อราทั้งหมดเป็นพวกเฮเทอโรโทรฟิก มีการดำรงชีวิตโดยใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นสารอาหาร ซึ่งมักอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นแหล่งของสารอาหาร สารประกอบคาร์บอนที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยเชื้อรา ได้แก่ สารที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แป้ง ลิกนิน ไคติน เคอราติน โปรตีนและไขมัน เป็นต้น และสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและคู่ กรดไขมันและกรดอะมิโน เป็นต้น โดยเชื้อราจะขนส่งสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กผ่านข้ามเซลล์เมมเบรน ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านไปได้ ในอีกทางหนึ่งเชื้อราจะหลั่งเอนไซม์มาย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนให้เปลี่ยนเป็นสารที่มีโมเลกุลเดี่ยว ต่อมาจะถูกดูดซึมและนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์และแหล่งคาร์บอน ซึ่งเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์สามารถแพร่ออกจากเส้นใยของเชื้อราหรือยึดติดกับผนังเซลล์ของเชื้อรา ดังแสดงในรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 การย่อยสลายภายนอกเซลล์ของเชื้อรา เอนไซม์หลั่งออกมาเพื่อย่อยสารพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่ได้เป็นสารตัวกลางเกิดขึ้น และต่อมาจะเกิดการย่อยสลายได้ผลเป็นหน่วยของมอนอเมอร์เพื่อให้เชื้อราดูดซึมต่อไป

ที่มา : Carlile *et. al.* (2001)

2.8 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา (Campbell *et. al.*, 1985)

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เราจำเป็นต้องนำเชื้อหรือเซลล์หรือชิ้นส่วนที่ต้องการศึกษานั้นมาเตรียมสไลด์ ซึ่งวิธีที่ง่ายที่สุด คือการทำ wet mount แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ อาจทำให้ส่วนประกอบหรือโครงสร้างบางอย่างของเชื้อราเสียหาย เช่นทำให้ใยขาดหักหรือทำให้โคนิเดีย (conidia) หลุดหายจึงทำให้เห็นโครงสร้างที่แท้จริงไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีวิธีการทำสไลด์ที่เลียนแบบการเจริญเติบโตตามธรรมชาติของเชื้อรา เพื่อให้การศึกษาลักษณะของเชื้อราถูกต้องมากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา

2.8.1 Slide culture technique (Microslide culture technique) (Campbell *et. al.*, 1985)

วิธีนี้มีขั้นตอนการเตรียมสไลด์ดังต่อไปนี้ ใช้ใบมีดโกนที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดวุ้น PDA ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร หรืออาจใช้คอร์กบอเรียร์ที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเจาะวุ้นให้เป็น

แท่งกลมนำไปวางบนสไลด์ในงานเลี้ยงเชื้อที่ภายในบุด้วยสำลีและมีแท่งแก้วรูปตัววีที่ด้านบนมีแผ่นแก้วปิดสไลด์วางพาดอยู่ (slide culture plate) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเส้นใยจากเชื้อราที่ต้องการศึกษามาแตะตรงกลางของชิ้นวุ้น แล้วใช้ปากคีบ (forceps) คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ไปจุ่มแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 แล้วลนไฟและปล่อยให้เย็นก่อนที่จะนำไปปิดบนแผ่นวุ้น เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงบนสำลีให้ชื้นเพื่อไม่ให้วุ้นแห้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ถึง 4 วัน โดยพยายามไม่ให้น้ำบนสำลีแห้ง (เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเมื่อจำเป็น) นำ slide culture plate มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบว่ามีโครงสร้างโคนิเดียให้คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ออก แล้วเขี่ยชิ้นวุ้นทิ้งไป จะสังเกตได้ว่ามีเส้นใยและโคนิเดียเกาะบนแผ่นแก้วปิดสไลด์และบนสไลด์ แล้วหยดแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ลงบนบริเวณสไลด์ในบริเวณที่มีเส้นใยเกาะเพื่อไล่ฟองอากาศ หยดสีย้อม lactophenol cotton blue บนสไลด์ที่สะอาดและปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ที่สะอาด จะได้ slide culture ทั้งหมด 2 ชุด จากการเพาะเลี้ยงเชื้อเพียง 1 ชุด

2.8.2 Coverslip sandwich- technique (Campbell *et. al.*, 1985)

วิธีนี้มีขั้นตอนการเตรียมสไลด์ดังต่อไปนี้ ใช้ลูป (loop) เขี่ยเชื้อราโดยให้ได้เส้นใยรา (mycelia) แล้วขีด (streak) ลงบนผิวของอาหาร PDA โดยขีดงานละ 4 ตำแหน่ง คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ (ขนาดเล็ก) 2 แผ่น ต่อรอยขีด 1 ตำแหน่ง แล้วปิดฝาจาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 ถึง 5 วัน เชื้อราจะเจริญบนผิววุ้นก่อนแล้วจึงจะเจริญขึ้นมาทั้ง 2 ด้านของแผ่นแก้วปิดสไลด์ หลังจากนั้นใช้ปากคีบค่อย ๆ คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ (1 แผ่น) ออกมาวางบนสไลด์ที่ได้หยดสี lactophenol cotton blue ไว้แล้ว 1 หยด ต่อไปหยด lactophenol cotton blue 2 ถึง 3 หยดบนแผ่นแก้วปิดสไลด์นั้น ๆ แล้วปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 1 แผ่น ดังนั้นแผ่นแก้วปิดสไลด์ขนาดเล็กซึ่งมีเชื้อราจะถูกประกบด้วยสไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ที่มีขนาดใหญ่กว่าในลักษณะคล้ายแซนด์วิช ดังนั้นจากอาหาร PDA 1 ชุดจะสามารถเตรียมสไลด์ได้ 8 แผ่น

2.9 การสังเคราะห์เอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา

ตามปกติเอนไซม์ไซลานเนสมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์เหนี่ยวนำ (inducible enzyme) ซึ่งจะจับออกมาในอาหารที่มีไซแลนบริสุทธิ์หรือวัสดุเศษเหลือทิ้งที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยไซแลน (Balakrishnan *et. al.*, 1997) ซึ่งลักษณะโดยรวมของการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ย่อยสลายสารจำพวกพอลิเมอร์ (polymeric substances) คือเป็นการสร้างเอนไซม์ในระดับต่ำและจับออกมา โดยปลดปล่อยส่วนที่ละลายได้ของสารพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาเพียงเล็กน้อยแล้วทะลุผ่านเซลล์เมมเบรนออกมาตามความเข้าใจที่เกี่ยวกับจุลินทรีย์ พบว่าสารประกอบหรือโมเลกุลที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะกระตุ้นให้มีการ

สร้างเอนไซม์ในปริมาณที่เพียงพอสำหรับการย่อยสลายของจุลินทรีย์ และบ่อยครั้งจะพบว่า สารเคตาบอไลต์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลน มีผลช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลานเนสทั้งใน เชื้อราและยีสต์ ตัวอย่างที่เด่นชัด เช่นไซโลไบโอโสน่าจะมีความเป็นไปได้ว่าเป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้าง เอนไซม์ไซลานเนสที่มีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับกับกลุ่มจุลินทรีย์ทั้งหมด เช่นเดียวกับ ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น (Hrmova *et. al.*, 1986 ; Hrmova *et. al.*, 1989 ; Royer and Nakas, 1990 and Pinaga *et. al.*, 1994) การย่อยสลายไซโลไบโอโสน่าจะได้ผลลัพธ์เป็นไซโลสซึ่งสามารถแสดง คุณสมบัติเป็นสารเคตาบอไลต์ที่ยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลานเนส ในทางตรงกันข้ามไซโลส สามารถเป็นตัวเหนี่ยวนำที่ดีของการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสได้ด้วย (Maheshwari and Kamalam, 1985 ; Pou-linase and Drigues, 1987 ; Hrmova *et. al.*, 1989 ; Ghosh and Nanda, 1994 ; Pukarthafer and Steiner, 1995)

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไซแลน ได้มักจะสร้างเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลสโลกติก (cellulolytic enzyme) และขับออกมาผสมกับเอนไซม์ไซลานเนส ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้ จากการสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ไม่เพียงแต่จะมีการแสดงออกเมื่อใช้ไซแลนเป็นสับสเตรทเพียงอย่าง เดียว แต่ยังสามารถแสดงออกได้เมื่อมีเซลลูโลสอยู่ด้วย Hrmova *et. al.* (1986) และ Senior *et. al.* (1989a) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจาก *T. reesei* และ *T. harzianum* พบว่าเมื่อเชื้อราทั้งสอง เจริญบนเซลลูโลสการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสเกิดขึ้นน้อยมาก แต่เมื่อเจริญบนไซแลนจะสามารถผลิต เอนไซม์ไซลานเนสได้มากขึ้น ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์บางชนิดจะสามารถควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ไซลานเนสและเซลลูเลสแยกออกจากกันได้ แต่ยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสออกมา พร้อมกับเอนไซม์เซลลูเลสเสมอ ดังเช่นการศึกษาของ Hrmova *et. al.* (1986) ซึ่งได้ศึกษาการผลิต เอนไซม์ไซลานเนสของ *T. reesei* พบว่าไซแลนและไซโลไบโอโสน่าช่วยชักนำการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ของ *T. reesei* แต่เมื่อใช้ sophorose เป็นสับสเตรทจะชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตทั้งเอนไซม์ไซลานเนสและ เซลลูเลสออกมาพร้อมกัน โดยส่วนมากกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเหนี่ยวนำด้วย sophorose จะเป็นการแสดงออกด้วยคุณสมบัติของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสชนิดที่ไม่จำเพาะ ฉะนั้น *T. reesei* เมื่อเจริญบน sophorose ซึ่งเป็นสารประกอบน้ำตาลโมเลกุลคู่จะผลิตเอนไซม์ไซลานเนสชนิดที่ มีความจำเพาะน้อย Hrmova *et. al.* (1989) ยังได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของ *A. terreus* พบว่าเมื่อใช้ไซแลน ไซโลไบโอโสนหรือดี-ไซโลสเป็นสับสเตรท เชื้อราจะสามารถสร้างเอนไซม์ ไซลานเนสได้ แต่เมื่อใช้เซลลูโลสหรือเซลโลไบโอโสนเป็นสับสเตรท เชื้อราจะสร้างทั้งเอนไซม์ไซลานเนส และเซลลูเลสออกมาด้วยกัน มีการศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจาก *Schizophyllum commune* โดย Haltrich *et. al.* (1995) รายงานว่า *S. commune* สามารถสร้างเอนไซม์ไซลานเนสเมื่อใช้เซลลูโลส

หรือสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น เซลโลไบโอสหรือ sophorose และจะเป็นตัวเหนี่ยวนำที่มีประสิทธิภาพในแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งจะยับยั้งไม่ให้เกิดการปะปนของเอนไซม์ไซลานเนส ในทางตรงกันข้ามไซแลนหรือไซโลไบโอสไม่มีประสิทธิภาพในการเป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส แต่เป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลานเนส ยิ่งกว่านั้น Haltrich and Steiner (1994) รายงานว่าการเจริญของ *S. commune* บนอาหารที่ประกอบด้วยส่วนผสมระหว่างเซลลูโลสและไซแลนมีผลทำให้เชื้อราไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเจริญในอาหารที่ประกอบด้วยเซลลูโลสเพียงอย่างเดียว และยังพบว่าการเพิ่มอัตราส่วนของไซแลนต่อเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสลดลงด้วย

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าในการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสมีลักษณะเช่นเดียวกันกับการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ของเอนไซม์เหนี่ยวนำชนิดอื่น ๆ เช่น แมนแนนเนสและเซลลูเลส เป็นต้น ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของยีนควบคุม (regulator gene) อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างสมบูรณ์สำหรับกลไกการควบคุมการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสของจุลินทรีย์ ด้วยเหตุที่ว่าไซแลนไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ การเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจะมีการตอบสนองกับส่วนของไซแลนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งจะนำไปเป็นสับสเตรตสำหรับการผลิตเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้อัตราส่วนประกอบเหล่านี้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถผลิตเอนไซม์ได้ (Bastawde, 1992 and Kulkarni *et. al.*, 1999) และยังพบว่าบนพื้นผิวหน้าของจุลินทรีย์หลายชนิดจะมีสารเชิงซ้อนที่เรียกว่า “ไซลานโซม” (xylanosome) ซึ่งเป็นสารเชิงซ้อนที่อยู่อย่างกระจัดกระจาย มีคุณสมบัติเป็น multienzyme complexes ที่มีหน้าที่หลายอย่าง (multifunctional) และสารเชิงซ้อนนี้มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส (Sunna and Antranikian, 1997)

2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซลานโกลติกเอนไซม์โดยการหมัก

การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสสามารถผลิตได้ทั้งในการหมักในสภาวะอาหารแข็ง (solid-state fermentation systems) และการหมักในสภาวะอาหารเหลว (submerged fermentation systems) การหมักในสภาวะอาหารแข็ง หมายถึง ระบบการหมักที่อาศัยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารแห้งในสภาพซึ่งไม่มีน้ำอิสระ (free liquid) อยู่ในระบบ อย่างไรก็ตามน้ำที่อยู่ในระบบจะอยู่ในรูปความชื้น (moisture) ที่ถูกดูดซับอยู่กับวัตถุดิบเท่านั้น ในระบบการหมักในสภาวะอาหารแข็งเช่นนี้ ปริมาณความชื้นหรือน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ (a_w , available water) จึงค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงเหมาะสมต่อการหมักโดยเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสภาวะของการเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสใน

การหมักในสภาวะอาหารแข็งต้องควบคุมให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อราครั้งนี้คือ วัตถุประสงค์ที่นิยมใช้ในการหมักในสภาวะอาหารแข็งมักเป็นพวกธัญพืช ซึ่งอาจใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการทำอาหาร เป็นต้น โดยมีความสำคัญในการใช้เป็นตัวชักนำ ซึ่งจะเป็นแหล่งคาร์บอนของการผลิตเอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติก สับสเตรตเหล่านี้ต้องใช้ความเข้มข้นสูงมาก โดยขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดซับน้ำของสับสเตรตและขนาดของสับสเตรตต้องควบคุมให้มีความเหมาะสม ทั้งนี้เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างอนุภาคของสับสเตรตเพียงพอที่จะให้อากาศถ่ายเทหมุนเวียนได้ดี นอกจากนี้อาจมีการเติมสารอาหารอื่น ๆ เช่น แร่ธาตุ ไนโตรเจนหรือเกลือแร่ ข้อได้เปรียบของการหมักในสภาวะอาหารแข็งที่ดีกว่าการหมักในสภาวะอาหารเหลว เช่น ปริมาตรของการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมีขนาดเล็กกว่า สับสเตรตมีราคาถูก การเลี้ยงเชื้อมีการลงทุนน้อยกว่าและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนต่ำ มีการศึกษาเกี่ยวกับการปรับปรุงการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดย Gutierrez-Correa and Tengerdy (1998) ซึ่งใช้การเลี้ยงเชื้อราแบบผสมของ *T. reesei* LM-UC4 E 1, *Aspergillus niger* ATCC 10864 และ *A. phoenicis* QM 329 พบว่าให้ผลได้ของเอนไซม์ไซลานเนสสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลได้ของเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากการหมักในสภาวะอาหารเหลวของ *Melanocarpus albomyces* IIS-68 ซึ่งใช้ฟางข้าวสาลีและชานอ้อยเป็นสารตั้งต้น (Jain, 1995) การหมักในสภาวะอาหารเหลว หมายถึง เป็นการหมักที่วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการหมักละลายอยู่ในอาหารเหลว ดังนั้นส่วนประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นน้ำที่มีสารอาหารต่าง ๆ และวัตถุประสงค์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานละลายอยู่ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และทำการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่อไปในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยการหมักในสภาวะอาหารเหลวต้องมีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เช่นเดียวกันกับการหมักในสภาวะอาหารแข็ง

โดยทั่วไปกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมของการหมัก การผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณสูงจะต้องควบคุมปัจจัยต่างๆให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ เอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติกเป็นเอนไซม์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้ผลิตขึ้นได้โดยใช้สารอาหารที่เหมาะสม ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดและปริมาณของสารอาหารให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์จะทำให้ได้เอนไซม์ปริมาณสูง ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ได้แก่

2.10.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์พลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปกระบวนการหมักเพื่อผลิตไซลาโนไลติกเอนไซม์โดยทั่วไปนิยมใช้สารคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน การเลือกใช้สับสเตรตที่เหมาะสมมีความสำคัญมากสำหรับความสำเร็จในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส สับสเตรตไม่เพียงแต่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แต่ยังใช้เป็นสารประกอบ

ที่จำเป็นสำหรับการชักนำการสร้างเอนไซม์ไซทานเนสของจุลินทรีย์ ไซเลนซึ่งเป็นสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำสามารถช่วยเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ไซทานเนสได้ดีมาก ไซเลนบริสุทธิ์สามารถใช้เป็นสับสเตรทที่ดีและบ่อยครั้งมีการนำไปใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์ไซทานเนสในระดับการทดลองขนาดเล็ก ความสำคัญของสับสเตรทไม่เพียงแต่ส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิต (yields) ของเอนไซม์ไซทานเนสเท่านั้น แต่การเลือกใช้สับสเตรทที่มีความสามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ไซทานเนสได้ดีโดยไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วยหรืออาจจะมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณที่น้อยมากจะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ไซทานเนสมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น (Yu *et al.*, 1987 ; Hrmova *et al.*, 1989 ; Senior *et al.*, 1989b ; Biswas *et al.*, 1990 and Gilbert *et al.*, 1992) สำหรับกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซทานเนสขนาดใหญ่ การใช้สับสเตรทที่มีราคาแพงจะไม่มี ความเหมาะสมต่อการผลิต เนื่องจากไม่คุ้มต้นทุน ยกเว้นแต่จะสามารถหาวัตถุดิบที่ใช้ทดแทนสารประกอบไซเลนหรือไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เหล่านี้ได้และต้องมีราคาเหมาะสมกับกระบวนการผลิต จากการพิจารณาเหตุผลดังกล่าว พบว่าการใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรหรือวัสดุเศษเหลือจากป่าไม้ (Senior *et al.*, 1989b and Bailey and Viikari, 1993) หรือใช้ไซเลนที่แยกได้จากผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น ไซเลนที่แยกได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเส้นใยสังเคราะห์เรยอน (Gamerith *et al.*, 1992) สับสเตรทที่มีราคาถูกโดยทั่วไปมักเป็นสารพวกลิกโนเซลลูโลส เช่น เปลือกข้าวบาร์เลย์ ชังข้าวโพด หล้าแห้ง รำหรือฟางข้าวสาลี เป็นต้น มีงานวิจัยที่ผ่านมามากมายได้ทำการศึกษาจำแนกและประเมินค่าสารประกอบเหล่านี้ในด้านการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการผลิตเอนไซม์ไซทานเนส และพบว่าสับสเตรทเหล่านี้บางชนิดมีคุณสมบัติที่ดีกว่าการใช้ไซเลนหรือเซลลูโลสบริสุทธิ์ในการผลิตเอนไซม์ไซทานเนสอย่างมีนัยสำคัญ ฉะนั้นจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ดีสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตขนาดใหญ่ มีการใช้วัสดุพวกเฮมิเซลลูโลสหรือพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ เช่น รำข้าวสาลี ฟางข้าว ชังข้าวโพดและชานอ้อย เป็นต้น ในการชักนำการสร้างเอนไซม์ไซทานเนสโดยเชื้อรา (Kesker, 1992 ; Kuhad *et al.*, 1998 ; Puchart *et al.*, 1999 ; Beg *et al.*, 2000a and Gupta *et al.*, 2001) เช่น Purkarthofer *et al.* (1993b) รายงานว่า ชังข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ไซทานเนสของเชื้อ *T. lanuginosus* DSM 5826 เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น และเมื่อใช้ชังข้าวโพดบดความเข้มข้น 31.2 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวปริมาตร 30 ลิตร อุณหภูมิและพีเอช เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และ 7.5 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซทานเนสสูงสุด 1,950 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นค่าความสามารถในการผลิต (productivity) เท่ากับ 16,525 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง¹ Gasper *et al.* (1997) ได้ศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติกโดย

P. caneseens 10-10c พบว่าการผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ถั่วเหลืองป่นหรือฟางข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนการใช้กลูโคส ไชโลสหรือกาแลคโตส จะให้ผลเป็นสารยับยั้งการผลิตเอนไซม์ ไชลานเนส นอกจากนี้ยังมีข้อเสนอแนะว่าการใช้สารพวกกลีโคซิลโอสซึ่งไม่เพียงแต่ประกอบด้วย เสมิเซลลูโลสอย่างเดียว แต่ยังมีสารชนิดอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย เช่น ลิกนิน เพคตินและ เซลลูโลส เป็นต้น เมื่อนำสารเหล่านี้มาใช้ในการผลิตเอนไซม์โดยเชื้อราจะได้ปริมาณเอนไซม์ ไชลานเนสในระดับต่ำ เนื่องจากไม่สามารถนำสารเหล่านี้ไปใช้ในระบบเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ แต่พบว่าหากมีการแปรสภาพ (pretreatment) สารกลีโคซิลโอสจะช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิต เอนไซม์ ไชลานเนสของเชื้อราได้ วิธีการแปรสภาพวัตถุดิบเหล่านี้มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การแปรสภาพ ลักษณะทางฟิสิกส์ของลิกนินมีผลทำให้ลิกนินละลายน้ำได้ การเพิ่มความสามารถในการใช้ประโยชน์ ของสารเหล่านี้โดยทำให้อนุภาคของสารกลีโคซิลโอสเล็กลง ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวหน้าและขนาด ของรูพรุน การลดปริมาณเซลลูโลสที่อยู่ในรูปผลึก (decrystallization) หรือการลดความเป็น พอลิเมอร์ของเสมิเซลลูโลส (depolymerization) เป็นต้น ดังนั้นการแปรสภาพวัตถุดิบจึงให้ผลที่ดีต่อ การผลิตเอนไซม์ ไชลานเนส มีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับผลของการแปรสภาพวัตถุดิบที่มีต่อการผลิต เอนไซม์ ไชลานเนส เช่น Purkarthofer *et. al.* (1993b) ได้ศึกษาการใช้ขี้ข้าวโพดที่ผ่านการแปรสภาพโดย การลดขนาดให้มีขนาดอนุภาค 2 ถึง 7 มิลลิเมตร เป็นสับสเตรตสำหรับการผลิตเอนไซม์ ไชลานเนสโดย *T. lanuginosus* พบว่ามีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ไชลานเนส ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ไชลานเนสเท่ากับ 26,700 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อใช้ขี้ข้าวโพดที่ผ่านการแปรสภาพให้มีขนาด อนุภาคเป็นผงลักษณะคล้ายแป้ง พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ไชลานเนสลดลง 3 เท่า ได้ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ ไชลานเนส เท่ากับ 7,952 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร ยังมีการศึกษาถึงการเหนี่ยวนำการ ผลิตเอนไซม์ ไชลานเนสจากสับสเตรตที่ละลายน้ำได้ เช่น Sachslehner *et. al.* (1998) และ Xu *et. al.*, (1998) รายงานว่าการใช้แอล-ซอร์โบส (L-sorbose) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถ เหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ ไชลานเนสของ *S. rolfisii* และ *T. reesei* PC-3-7 ได้ ส่วน Liu *et. al.* (1998) รายงานว่าไชโลสสามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ ไชลานเนสของ *T. cutaneum* SL409 แต่เมื่อมีกลูโคส เกิดขึ้นจะยับยั้งการผลิตเอนไซม์ ในทำนองเดียวกันมีการรายงานว่าน้ำตาลที่สามารถหมักแบบไรต์ อย่างสมบูรณ์ เช่นกลูโคสและ/หรือไชโลส มีผลเป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ ไชลานเนส (Fernandez-Epsinar *et. al.*, 1992 ; Ishihara *et. al.*, 1997 ; Bataillon *et. al.*, 1998 ; Liu *et. al.*, 1999 and Beg *et. al.*, 2000a) นอกจากนี้ Purkarthofer and Steiner (1995) รายงานว่าจลนพลศาสตร์ของการ ปลดปล่อยเอนไซม์ ไชลานเนสของจุลินทรีย์ จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรตที่ใช้เป็นตัวชักนำ การสร้างเอนไซม์ ไชลานเนส หากมีการใช้ประโยชน์จากตัวชักนำที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ให้หมดลง

อย่างช้า ๆ โดยตลอดระยะเวลาของการหมัก ซึ่งเป็นการทำให้ระยะเวลาของการหมักยาวนานขึ้น จะช่วยส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงขึ้น มีงานวิจัยที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้โดย Lenartovicz *et. al.* (2003) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการใช้วัสดุเศษเหลือพวกลิกโน-เซลลูโลสหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดใช้ความเข้มข้นร้อยละ 2 และ ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการผลิตเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดสโดย *A. fumigatus* ในกระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารเหลว พบว่าเมื่อใช้ขังข้าวโพดบดความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน จะได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดสสูงสุดเท่ากับ 45.40 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วน Singh *et. al.* (1995) รายงานว่าเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของรำข้าวสาลีจากความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 3 พบว่าปริมาณการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส โดย *Fusarium oxysporum* NTG-19 เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของรำข้าวสาลีมากกว่าร้อยละ 3 จะไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ทั้งสอง

2.10.2 แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8 ถึง 10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป โดยบางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ แต่บางชนิดจะต้องการสารไนโตรเจนอินทรีย์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีสารไนโตรเจนอินทรีย์เป็นองค์ประกอบได้เร็วกว่าในอาหารที่มีสารไนโตรเจนอนินทรีย์เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจึงขึ้นอยู่กับว่าจุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดใดได้ดี โดยต้องพิจารณาควบคู่ไปกับราคาของแหล่งไนโตรเจนและประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิตด้วย เช่นเชื้อราโดยทั่วไปจะสามารถใช้เกลือแอมโมเนียได้ดี จึงนิยมใช้เกลือแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราเป็นต้น (สมใจ สิริโชค, 2537) ในทางตรงกันข้ามหากมีการใช้เกลือแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว พบว่าเมื่อเชื้อราเจริญจะมีการปลดปล่อยกรดออกมาอย่างรวดเร็ว ทำให้การเจริญของเชื้อราหยุดชะงักได้ (Raimbault and Alazard, 1980) มีการศึกษาถึงแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส เช่น Hoq *et. al.* (1994) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่ปราศจากเซลลูโลสโดย *T. lanuginosus* RT9 พบว่าจุลินทรีย์สามารถใช้เปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีมากกว่าการใช้แอมโมเนียมออกโทฟอสเฟสในการผลิตเอนไซม์ ส่วน Haapala *et. al.* (1996) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้อ *T. reesei* ที่ตรึงเซลล์บนเส้นใยไพลอน เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อรดังกล่าวในสูตร Ib (ประกอบด้วยโปรติโอสเปปโตเนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 3.0 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) , Id (ประกอบด้วยโปรติโอสเปปโตเน

ความเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร) และ Ie (ประกอบด้วยยีสต์สกัด ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร) ที่ไม่มี ยูเรียเป็นองค์ประกอบ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสอยู่ในช่วง 1,550 ถึง 1,800 นาโนคาตาลต่อ มิลลิลิตร และเมื่อใช้อาหารสูตร Ic ที่มียูเรียเพียงอย่างเดียว (ยูเรีย ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร) ได้ค่า กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเพียง 1,490 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งไม่เพียงพอต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส และพบว่าสูตรอาหารที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ไซลานเนสสูงสุดคือ Ia ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ประกอบด้วยยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 1.5, 3.0 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด เท่ากับ 8,020 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ (ผลการทดลองดังตารางที่ 2.4) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อน ซึ่งได้แก่ ยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด มีผลช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส โดยโปรติโอสเปปโตนประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นและยีสต์สกัดจะเป็นแหล่งที่ดีของวิตามิน บีรวม ส่วนการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น พบว่ายูเรียจะต้องเปลี่ยนรูปไปเป็นแอมโมเนียโดย เอนไซม์ยูเรียเอสก่อน จากนั้นจุลินทรีย์จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นการใช้ยูเรียที่ความ เข้มข้นต่ำอาจจะไม่เพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ (Stewart, 1980)

ตารางที่ 2.4 สูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ สำหรับการเพาะเลี้ยง *Trichoderma reesei* ที่ ตรีงบนเส้นใยไพลอน

อาหาร	แหล่งไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)			เอนไซม์ไซลานเนส (นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร)
	ยูเรีย	โปรติโอสเปปโตน	ยีสต์สกัด	
Ia	1.5	3.0	1.0	8,020
Ib	0	3.0	1.0	1,800
Ic	1.5	0	0	1,490
Id	0	3.0	0	1,750
Ie	0	0	1.0	1,550

ที่มา : Haapala et. al. (1996)

มีการศึกษาที่ผ่านมามีจำนวนมากที่สนับสนุนการใช้โปรติโอสเปปโตนหรืออีสต์สกัดว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีของจุลินทรีย์ เมื่อใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลิตานเนสของจุลินทรีย์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลิตานเนสสูงขึ้น และแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้สามารถเทียบเคียงได้กับแหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนชนิดอื่น ๆ ที่มีราคาถูก เช่น น้ำแช่ข้าวโพด ฟาร์มามีเดีย กากถั่วเหลือง โปรตีนจากมันฝรั่ง เป็นต้น (Haltrich *et. al.*, 1993 ; Purkarthofer *et. al.*, 1993a ; Haltrich *et. al.*, 1994 and Gomes *et. al.*, 1994b) ยิ่งกว่านี้ยังมีการสนับสนุนการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ไซลิตานเนสของจุลินทรีย์โดย Fernandez-Espinar *et. al.* (1992) รายงานว่าการเพิ่มสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อนมีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลิตานเนสสูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถึงแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นเท่ากันก็ตาม ในทางตรงข้ามมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลิตานเนส เช่น Christakopoulos *et. al.* (1996) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *F. oxysporum* F3 ใน Erlenmeyer flasks ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร minimal medium ปริมาตร 200 มิลลิลิตรโดยใช้ซังข้าวโพดบด ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมฟอสเฟตความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 8.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 4 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลิตานเนสจำเพาะ (specific activity) สูงสุดเท่ากับ 331 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นอกจากนี้ Haapala *et. al.* (1994) รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์มีผลต่อค่าพีเอชของอาหารอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างการหมัก ซึ่งทำให้ค่าพีเอชของอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงและอาจส่งผลให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้ลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ในระหว่างระยะเวลาของการหมักเพื่อป้องกันการสูญเสียของผลผลิต ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Joglekar and Karfanth (1984) ที่รายงานว่าการใช้ในโตรเจนอนินทรีย์ความเข้มข้นสูง โดยเฉพาะความเข้มข้นมากกว่า 2 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จะทำให้พีเอชของอาหารมีค่าเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูงทำให้ไม่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ไซลิตานเนส และเช่นเดียวกันการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตอีกด้วย มีการรายงานที่เกี่ยวข้องกับผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลิตานเนส โดย Biely (1991) รายงานว่าการจำกัดความสามารถในการใช้ประโยชน์ของสารเริ่มต้น (precursors) สำหรับการสังเคราะห์โปรตีน (อยู่ภายใต้ค่าอัตราส่วนความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อความเข้มข้นของคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อ) โดยอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อคาร์บอนที่ต่ำจะทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลิตานเนสถูกควบคุมให้แยกออกจากกันอย่างเด็ดขาด

2.10.3 อุณหภูมิ

ในธรรมชาติจุลินทรีย์สามารถรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนได้ในช่วงอุณหภูมิ 10 ถึง 90 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ช่วงหนึ่ง ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าช่วงนี้จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของจุลินทรีย์ อุณหภูมิที่ส่งผลให้มีการเจริญสูงสุดในช่วงเวลานั้น เรียกว่า optimum growth temperature ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทลงสู่อาหาร ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่งที่จุลินทรีย์ไม่สามารถดำรงกิจกรรมต่อไปได้ ดังนั้นในกระบวนการหมักต่าง ๆ จึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม และอุณหภูมิสูงจะยับยั้งการงอกของสปอร์แต่ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญของไมซีเลียม (Raimbault and Alazard, 1980) มีการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไฮลาเนส เช่น Tuncer *et. al.* (1999) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิกโนเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ (lignocellulolytic enzyme) จาก *Thermomonospora fusca* BD25 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวใน minimal salt-yeast extract โดยเพาะเลี้ยงในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์เอนโดไฮลาเนสและเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสสูงสุด 1.54 และ 0.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Gome *et. al.* (1992) รายงานถึงระดับที่เหมาะสมของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสและเบต้า-กลูโคซิเดส โดยเชื้อ *T. viride* พบว่ามีการสังเคราะห์เอนไซม์ไฮลาเนสและเบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุดที่อุณหภูมิ 34 และ 31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

2.10.4 พีเอช

การเจริญของจุลินทรีย์จะถูกควบคุมโดยกระบวนการเมแทบอลิซึมซึ่งมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและการทำงานของเอนไซม์จะถูกควบคุมโดยพีเอช สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามปกติ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ที่จะช่วยรักษาระดับของพีเอชให้คงที่อยู่แล้ว แต่ในกระบวนการหมักหลายชนิดพีเอชในน้ำหมักเปลี่ยนแปลงเร็วมากจนไม่อาจรักษาพีเอชไว้ได้ เป็นผลให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นในการหมักแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงหนึ่งเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงสุด (Kuhad, 1999) พีเอชจึงมีความสำคัญต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน กระบวนการหมักในระยะแรกค่าพีเอชของการเลี้ยงเชื้อจะเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ในระหว่างการหมักค่าพีเอชจะมีการเปลี่ยนแปลง

แปลงไป ทั้งนี้อาจเนื่องจากการมีกรวยสลายนโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนเกิดขึ้น ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นต่างอื่น ๆ ออกมาหรืออาจมีการย่อยสลายสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตซึ่งทำให้เกิดกรดอินทรีย์ต่าง ๆ จึงส่งผลให้พีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมให้พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ โดยการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงไปในการอาหาร ซึ่งบัฟเฟอร์จะเข้าไปรวมตัวกับกรดหรือด่าง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา (สมใจ ศิริโชค, 2537) จึงทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยทั่วไปเชื้อราสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีที่ค่าพีเอชต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Smith and Wood (1991b) รายงานว่าค่าพีเอชที่เป็นกรดมีความเหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของ *A. awamori* และเมื่อพีเอชมีค่าเท่ากับ 5.0 หรือสูงกว่านี้ จะส่งผลให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลานเนสลดลง Bailey and Viikari (1993) รายงานว่าในระยะเวลาช่วงหลังของการเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนส จะส่งผลให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำกว่า 3.0 ทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสมีระดับต่ำลง Haitrich et. al. (1994) รายงานว่าค่าพีเอชที่ต่ำลงจะส่งผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดย *S. rolfisii* พบว่าในระหว่างการเลี้ยงเชื้อรานี้ พีเอชจะมีค่าลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ไปเป็นค่าพีเอชระหว่าง 3.0 และ 3.5 ซึ่งผลของการลดลงของค่าพีเอชในระหว่างการหมักจะส่งผลให้เชื้อราปลดปล่อยกรดออกซาลิก (oxalic acid) ออกมาภายนอกเซลล์ในปริมาณมาก ซึ่งทำให้ทั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราลดลง จากการที่ค่าพีเอชลดต่ำลงในระหว่างการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนสนี้จึงต้องมีการควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการหมักให้คงที่เพื่อให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ Hop et. al. (1994) ได้ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของสารอาหารในการหมักต่อการผลิตไซลานเนสที่ปราศจากเซลล์โดยเชื้อรา *T. lanuginosus* RT9 ในอาหารเปปโตเนที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งค่าพีเอชที่ทำการศึกษายู่ในช่วง 5.0 ถึง 8.0 พบว่าพีเอช 6.6 เป็นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส และ Xiong et. al. (2003) ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของพีเอชที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดย *T. reesi* Rut C-30 ในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ (batch cultivations) ในอาหาร lactose-based medium ที่มีแลคโตสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และทำการแปรผันค่าพีเอชให้อยู่ระหว่าง 3.5 ถึง 7.5 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 6.0 ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุดเท่ากับ 94.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากระยะเวลา 5 วัน ของการเลี้ยงเชื้อ

2.10.5 แร่ธาตุ

แร่ธาตุ หมายถึงสารอนินทรีย์ที่สิ่งมีชีวิตต้องการในปริมาณเล็กน้อย แร่ธาตุที่มีความสำคัญซึ่งปกติต้องเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียมและคลอรีน นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อย เช่น โคบอลต์ ทองแดง แมงกานีส เหล็ก โมลิบดีนัมและสังกะสี เป็นต้น แต่โดยทั่วไปมักจะพบว่าแร่ธาตุเหล่านี้เจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นในวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรหรือของเหลือทิ้ง (waste) ที่ไม่ต้องการจากกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ เป็นต้น ฉะนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้สารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในการเตรียมอาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) ซึ่งจำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในการเลี้ยงเชื้อโดยตรง และยังพบว่าความเข้มข้นของแร่ธาตุบางชนิดหรือหลายชนิดรวมกันอาจมีอิทธิพลต่อการผลิตสารบางอย่าง (สนใจ ศิริโชค, 2537) มีการศึกษาถึงผลของแร่ธาตุต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส เช่น Haltrich *et. al.* (1994) ได้ศึกษาผลขององค์ประกอบของสารอาหารที่มีต่อการสร้างเอนไซม์ไซลาลเนส โดย *S. rolfssii* ซึ่งใช้การวางแผนการทดลองทางสถิติในการวิเคราะห์ผล พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และการเติมสารละลายแร่ธาตุปริมาณเพียงเล็กน้อยพร้อมกับเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์จากความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็น 60 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถกระตุ้นให้ *S. rolfssii* ผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้มากขึ้น ในทางตรงกันข้ามเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแร่ธาตุให้มากขึ้น พบว่าไม่มีผลทำให้ *S. rolfssii* ผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสเพิ่มขึ้น เนื่องจากโดยทั่วไปแร่ธาตุเป็นสารอนินทรีย์ที่สิ่งมีชีวิตต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อย Siedenberg *et. al.* (1997) ศึกษาผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสโดย *A. awamori* ในถังปฏิกรณ์แบบ airlift tower loop โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ที่มีปริมาณฟอสเฟตเริ่มต้นความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.30, 1.05 และ 2.01 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส และ 4.5 ตามลำดับ อัตราการให้อากาศ 0.2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตเริ่มต้น 0.3 กรัมต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Ratanakhanokchai *et. al.* (1998) พบว่า Fe^{2+} , Ca^{2+} , และ Mg^{2+} มีผลช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนส ส่วน Mn^{2+} มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนส และพบว่า Co^{2+} , Zn^{2+} และ Cd^{2+} มีผลช่วยเพิ่มการยึดเกาะของเอนไซม์ไซลาลเนสกับไซเลนชนิดที่ไม่ละลายน้ำ

2.10.6 สารลดแรงตึงผิว (surfactant)

สารลดแรงตึงผิวนิคมต่าง ๆ เช่น Tween 80 และ sucrose monopalmitate หรือกรดไขมัน ซึ่งบ่อยครั้งจะใช้เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อเพื่อส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไฮไลเนสให้สูงขึ้น คือมีผลโดยตรงต่อคุณสมบัติการซึมผ่านเข้าและออกของสารของเซลล์เมมเบรน ทั้งในการนำสารประกอบต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์เพื่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ง่ายแล้ว ยังสามารถช่วยให้การปลดปล่อยเอนไซม์ออกจากเซลล์ได้ดีขึ้นด้วย โดยทั่วไปนิยมใช้ Tween 80 ซึ่งเป็น nonionic surfactant ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้กับการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา และสารลดแรงตึงผิวมีการตอบสนองที่ดีต่อการผลิตเอนไซม์ที่มีการปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ในทางตรงกันข้ามจะไม่มีประโยชน์ต่อการผลิตเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามในการใช้ประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไฮไลเนสของเชื้อราจะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราด้วย ซึ่งอาจจะให้ผลดีต่อเชื้อราบางชนิดเท่านั้น และยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ด้วย มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการศึกษาผลของ Tween 80 ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไฮไลเนส เช่น Reese and Maguire (1969) รายงานว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* ในสภาวะอาหารเหลว ในอาหารสารละลายเกลือแร่ ที่มีสารตั้งต้นความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ โดยเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 พบว่าสามารถเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮไลเนสได้ 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม Tween 80 และยังพบความสัมพันธ์ของการใช้ Tween 80 กับเปอร์เซ็นต์การเพิ่มของการผลิตเอนไซม์คือ ให้ผลดีที่สุดกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณน้อยมากเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารปกติที่ไม่มีการเติม Tween 80 และ Liu *et. al.* (1998) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไฮไลเนสโดย *T. cutaneum* SL409 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยใช้รำข้าวสาลี ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮไลเนสสูงสุด 39.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮไลเนสเพิ่มขึ้นเป็น 74 หน่วยต่อมิลลิลิตร ยิ่งกว่านี้มีการยืนยันผลของสารลดแรงตึงผิวที่มีต่อเชื้อราบางชนิดโดย Takahashi *et. al.* (1960) รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวสามารถนำมาใช้ได้ดีกับการเลี้ยงเชื้อราในสภาวะอาหารเหลว ซึ่งจะช่วยให้เปลี่ยนรูปของ pellet ไปเป็นไมซีเลียมที่สามารถกระจายได้ทั่วถึงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเช่นเดียวกัน Peunescu *et. al.* (1964) รายงานว่าในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เมื่อใช้ Tween 80 เพิ่มไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถชักนำให้สารประกอบต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์ได้ดี ยังมีการศึกษาผลของ Tween 80 ต่อการผลิตเอนไซม์ไฮไลเนสจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าการใช้ Tween 80 เติมลงไปในการที่ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 ถึง 3 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไฮไลเนส

ได้ประมาณร้อยละ 12 ถึง 60 แต่ในบางกรณีพบว่า Tween 80 ไม่มีผลช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ ไซลานเนสของจุลินทรีย์ (Dubeau *et. al.*, 1987 ; Fernandez-Espinar *et. al.*, 1992 ; Okeke and Obi, 1993 ; Gomes *et. al.*, 1993a and Singh *et. al.*, 1995) ในการที่ Tween 80 มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ ไซลานเนสของจุลินทรีย์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากสาเหตุดังต่อไปนี้ คือ 1) จากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ และการเพิ่มขึ้นของสารประกอบภายในเซลล์อื่น ๆ ที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ และ 2) จากการที่ Tween 80 ให้ผลที่ซับซ้อนมากกว่าการเปลี่ยนคุณสมบัติการซึมผ่านได้ของสารของเซลล์ เมมเบรนเพียงอย่างเดียว (Reese and Maguire, 1969)

2.10.7 ความเร็วรอบในการเขย่าและอัตราการให้อากาศ

การเจริญของจุลินทรีย์และกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนวัตถุดิบหรือสารอาหารใด ๆ ไปเป็นผลิตภัณฑ์อาจเกิดขึ้นได้ในสภาวะมีอากาศหรือไร้อากาศ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการหมักและชนิดของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ ไซลานเนสเป็นกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศ ซึ่งจะใช้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักเพื่อการเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ การควบคุมกระบวนการหมักจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการควบคุมการให้อากาศให้เพียงพอเหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ จะมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ โดยใช้การกวนในอัตราที่เหมาะสม ซึ่งเป็นการทำให้อาหาร จุลินทรีย์และอากาศผสมกันได้อย่างทั่วถึงและช่วยให้ฟองอากาศมีขนาดเล็กกลง โดยในการหมักแบบอาหารเหลว ระบบการกวนที่มีประสิทธิภาพจะทำให้การละลายได้ของออกซิเจนในอาหารเหลวมีปริมาตรเท่า ๆ กันทุกจุดในถังหมัก แต่การกวนจะมีผลทำให้การมีรูพรุนของสับสเตรทลดลง ทำให้อุณหภูมิของสับสเตรทอัดกันแน่น ทำลายการยึดจับสับสเตรทและทำลายไมซีเลียของเชื้อรา ดังนั้นการกวนจึงมักทำเป็นคราว ๆ มากกว่าทำตลอดเวลา (Lonsane *et. al.*, 1992) และการที่ไมซีเลียมถูกทำลาย ทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์ลดลง (Panda, 1989) การปั่นหรือเขย่าที่มีจำนวนรอบของการเขย่าเหมาะสม เป็นการทำให้จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ และในการหมักต้องคำนึงถึงปริมาตรของสารอาหารต่อปริมาตรของถังหมักด้วย มีการศึกษาผลของรอบในการเขย่าและอัตราการให้อากาศ เช่น Hoq *et. al.* (1994) ศึกษาผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ ไซลานเนสและเอนไซม์ เบต้า-ไซโลซิลเดสจาก *T. lanuginosus* RT9 ในถังปฏิกรณ์ขนาด 15 ลิตร ปริมาตรการทำงาน 10 ลิตร ในอาหารเปปโตเนที่มีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 จากการศึกษาพบว่าอัตราการกวน 200 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เป็นสภาวะที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองสูงสุด ยังมีการศึกษาของ Lejeune and Baron (1995) ศึกษาผลของอัตราการกวนต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลานเนสของ *T. reesei*

ในถังปฏิกรณ์ขนาด 15 ลิตร โดยมีแกลกโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที ทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้สูงสุด

2.10.8 สารเหนียวเอนไซม์

เอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์เหนียวน้ำซึ่งจุลินทรีย์สร้างได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีสารเหนียวน้ำ และตามปกติแล้วสารเหนียวน้ำมักเป็นสับสเตรทของเอนไซม์หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรท โดยเอนไซม์ไซลาลเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเหนียวน้ำให้จุลินทรีย์ผลิตขึ้นได้ มีการศึกษาถึงสารเหนียวน้ำการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส เช่น Royer and Nakas (1989) รายงานว่า *T. longibrachiatum* ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาลเนสสูงสุดเท่ากับ 272 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวในระดับฟลาสก์ที่ใช้ Solka Floc ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน Biswas *et. al.* (1990) รายงานว่า *A. ochraceus* NG-13 เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีขานอ้อยความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 28 องศาเซลเซียสและ 6.5 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 7 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาลเนสสูงสุดเท่ากับ 46 หน่วยต่อมิลลิลิตร Gome *et. al.* (1992) รายงานว่า *T. viride* BT 2169 เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มี sulfite pulp ความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 33 องศาเซลเซียสและ 5.5 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาลเนสสูงสุดเท่ากับ 190 หน่วยต่อมิลลิลิตร Milagres and Duran (1992) รายงานว่า *P. janthinellum* 87M-115 เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีไฮโดรไลเซท (hydrolyzate) ของขานอ้อยความเข้มข้น 23 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 30 องศาเซลเซียสและ 5.8 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 12 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาลเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 36.8 และ 0.35 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Wiacek-Zychlinska *et. al.* (1992) รายงานว่า *Chaetomium globosum* II-Ch.g./5 เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีรำข้าวสาลีความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 30 องศาเซลเซียสและ 4.8 เป็นระยะเวลา 9 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาลเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 65.3 และ 1.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Chanadra Raj and Chandra (1995) รายงานว่า *A. fischeri* Fxn1 เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีรำข้าวสาลีความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 9.5 เป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาลเนสสูงสุดเท่ากับ 45 หน่วยต่อมิลลิลิตร Xu และคณะ (1998) รายงานว่า แอล-ซอร์โบส (L-sorbose) สามารถเหนียวน้ำให้ *T. reesei* PC-3-7 ผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้ดีกว่าการใช้ sophorose และไซโลส ยิ่งกว่านั้น Bastawde *et. al.* (1994) รายงานว่า ยีสต์สายพันธุ์ NCIM 3574 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 570 หน่วยต่อมิลลิลิตร และไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสร่วมออกมา เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่ใช้ oat spelt xylan ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

2.11 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลานเนสในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ

กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษที่มีในปัจจุบันมีกระบวนการผลิตโดยใช้ไม้ชนิดต่างๆ เป็นวัตถุดิบในการผลิต จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้นขนาดเล็กๆ เพื่อที่จะนำไปต้มให้แปรสภาพเป็นเยื่อกระดาษด้วยสารละลายต่าง ถ้างด้วยน้ำหลายๆ ครั้ง และทำการฟอกสีเยื่อกระดาษโดยใช้สารเคมีพวก oxidizing agent เช่น คลอรีนและคลอรีนไดออกไซด์ เป็นต้น สุดท้ายจึงนำเยื่อกระดาษที่ได้หลังจากการฟอกสีไปขึ้นรูปเป็นกระดาษ (Buchert *et. al.*, 1994) โดยที่การฟอกสีเยื่อกระดาษเป็นการเพิ่มคุณภาพให้กับกระดาษในด้านการเพิ่มค่าความสว่าง (brightness) โดยทั่วไปแล้วการฟอกสีเยื่อกระดาษทำได้โดยใช้สารเคมีพวก oxidizing agent ร่วมกับสารละลายที่เป็นด่างเข้าไปสกัดเอาลิกนินซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลออก แต่พบว่าการใช้สาร oxidizing agent จะทำให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมเนื่องจากการใช้สารคลอรีนทำให้เกิดสาร adsorbable organic halogen (AOX) ซึ่งเป็นสารที่ย่อยสลายได้ยากมากในธรรมชาติ ดังนั้นเพื่อเป็นการลดผลกระทบกับสภาพแวดล้อมที่เกิดจากการฟอกสีเยื่อกระดาษ จึงได้มีการนำเทคโนโลยีด้านเอนไซม์เข้ามาช่วย โดยมีการใช้เอนไซม์ไซลานเนสในการแปรสภาพเยื่อกระดาษในขั้นตอนแรก (prebleaching) ซึ่งมีรายงานการใช้ครั้งแรกในปี 1986 และมีการนำไปใช้กับโรงงานเยื่อกระดาษครั้งแรกในปี 1991 (Tolan, 1996) การใช้เอนไซม์ไซลานเนสในการแปรสภาพเยื่อกระดาษจะเป็นการเพิ่มรพูนของเยื่อกระดาษและทำให้ลิกนินในเยื่อกระดาษมีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น (flexibility) จึงทำให้สารเคมีที่ใช้ในการฟอกสีเข้าไปสกัดลิกนินออกได้ง่ายขึ้น เป็นการลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ไซลานเนสในการแปรสภาพเยื่อกระดาษยังช่วยเพิ่มค่าความสว่างจากการศึกษาของ Tolan *et. al.* (1996) ได้สำรวจการใช้เอนไซม์ไซลานเนสในโรงงานเยื่อกระดาษในประเทศแคนาดาพบข้อดีหลายประการของการใช้เอนไซม์ในการแปรสภาพเยื่อกระดาษขั้นแรก คือ ประหยัดสารเคมี ลดปริมาณสาร AOX ปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้ง เพิ่มค่าความสว่างและเพิ่มค่าการต้านทานแรงฉีก เป็นต้น

2.12 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลานเนสในด้านอื่นๆ

การประยุกต์ใช้ไซลานโนโลติกเอนไซม์ในอุตสาหกรรมด้านอื่น ๆ เช่น ใช้อธิบายโครงสร้างของไซเลน (complex xylan) ใช้ในการสกัดน้ำมัน กลิ่น เครื่องเทศ น้ำมันและสี ใช้ในกระบวนการที่ทำให้ผลไม้และไวน์ใส ในผลิตภัณฑ์ไซเลนแปรรูป (modified xylan) ใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณ (bulking agent) ในผลิตภัณฑ์อาหาร ปรับปรุงแป้งจากธัญพืชเพื่อเพิ่มคุณภาพด้านปริมาณและลักษณะสัมผัส ปรับปรุงคุณภาพอาหารสัตว์และใช้ในการฟอกเยื่อเพื่อผลิต viscose rayon, cellulose ester และ cellulose ethers เป็นต้น (Coughlan และ Hazlewood , 1993)

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีรายงานเอาไว้สำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสทางการค้าประกอบด้วย *T. reesei* (Tenkanen et al., 1992), *T. lanuginosus* (Bajpai, 1999 and Gubitz et al., 1997), *Aureobasidium pullulans* (Christov et al., 1999a), *Bacillus subtilis* (Khanongnuch et al., 1999) และ *Streptomyces lividans* (Senior et al., 1992 and Ragauskas et al., 1994) และนานกว่า 10 ปี มีการกำหนดจำนวนจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสเอาไว้สำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ผลิตภัณฑ์ทางการค้าหลายชนิดได้ดำเนินการจนประสบความสำเร็จทางการค้า ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลานเนสทางการค้าและผู้ผลิตทางอุตสาหกรรมของเอนไซม์เหล่านี้

ผู้ผลิต	ชื่อผลิตภัณฑ์	การประยุกต์ใช้
Alko Rajamaki, Finland	Ecopulp	การฟอกสีเยื่อกระดาษ
Sandoz, Charlotte, N.C.and Basle, Switzerland	Cartazyme	การฟอกสีเยื่อกระดาษ
Clariant, UK	Catazyme HS 10, Catazyme HT, Catazyme SR 10, Catazyme Ps10, Catazyme 9407 E, Catazyme NS10, Catazyme MP	การฟอกสีเยื่อกระดาษ
Genercor, Finland ; Ciba Giegy, Switzerland	Irgazyme 40-4X/ Albazyme 40-4X, Irgazyme-10A, Albazyme-10A Mulifect xylanase	การฟอกสีเยื่อกระดาษ ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่
Voest Alpine, Austria	VAI Xylanase	การฟอกสีเยื่อกระดาษ
Novo Nordisk, Denmark	Pulpzyme HA, Pulpzyme HB, Pulpzyme HC Biofeed Beta, Biofeed Plus Ceremix	การฟอกสีเยื่อกระดาษ อาหารสัตว์ ผลิตภัณฑ์เบียร์
Bicon India, Bangalore	Bleachzyme F	การฟอกสีเยื่อกระดาษ

ตารางที่ 2.5 (ต่อ)

ผู้ผลิต	ชื่อผลิตภัณฑ์	การประยุกต์ใช้
Rohn Enzyme OY ; Primalco, Finland	Ecoplup X-100, Ecoplup X-200, Ecoplup X-200/400, Ecoplup TX-100, Ecoplup TX-200, Ecoplup XM	การฟอกสีเยื่อกระดาษ
Meito Sankyo, Nogaya Japan	Xylanase	งานวิจัย
Rohm, Germany	Rholase 7118	ผลิตภัณฑ์อาหาร
Solvay Interrox, USA	Optiplup L-8000	การฟอกสีเยื่อกระดาษ
Thomas Swan, UK	Ecozyme	การฟอกสีเยื่อกระดาษ
Iogen, Canada	GS-35, HS70	การฟอกสีเยื่อกระดาษ
Sankyo, Japan	Sanzyme PX, Alpelase F Sanzyme X	อาหารสัตว์ ผลิตภัณฑ์อาหาร
Enzyme Development, USA	Enzeko xylanase	ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่และ อาหารสัตว์

ที่มา : Beg *et. al.* (2001)

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร ได้แก่ ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าว ที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร และไซแลนจาก oat spelt xylan

3.1.2 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองได้จากการเก็บตัวอย่างเชื้อราจากดินในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและทำการแยกเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ รวมทั้งเชื้อราบริสุทธิ์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง (reference strains) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย คือ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เชื้อราทั้งหมดเก็บรักษาในหลอดอาหารวุ้นเอียง potato dextrose agar (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการย้ายเชื้อทุกๆ เดือน

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์ไคลาเนส เซลลูเลส การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข) และสารที่ใช้ย้อมวงใสรอบโคโลนี (clear zone) ของเชื้อ

3.2 อุปกรณ์

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) และกล้องจุลทรรศน์ ของบริษัท Olympus optical, Japan

เครื่องกวนระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น MS 115 ของบริษัท Scientetific industries, Inc

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV 1601 ของบริษัท Shimadzu

ตู้อบเชื้อ (incubator) ของบริษัท Scientific Promotion

ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow) ของบริษัท International Scientific Supply

ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น 1375 FX ของบริษัท Sheldon Manufacturing.Inc

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น Innova 4330 ของบริษัท Scientific Promotion

เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Z 383K ของบริษัท Hermle-Labortechnik, Germany

หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น Tomy SS 325 ของบริษัท Tomy-seiko

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Memmert ของบริษัท United Instrument

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น Cybascan 2000 ของบริษัท United Instrument

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง รุ่น PG 803 ของบริษัท Mettler-Todoco, Thailand

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Mettler-Todoco, Thailand

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) ของบริษัท Scientific industries, Inc

ไมโครปิเปต (micropipette) ของบริษัท Brand, Germany

เครื่องแก้วต่างๆ ของบริษัท Pyrex

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหารแข็งสูตร Czapek medium เป็นอาหารที่ใช้สำหรับแยกเชื้อราจากดิน (ภาคผนวก ก)

3.3.2 อาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นอาหารเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อรา เพื่อเป็น stock culture (ภาคผนวก ก)

3.3.3 อาหารแข็งสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างเอนไซม์ไซลานเนส เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในเชิงคุณภาพ (ภาคผนวก ก)

3.3.4 อาหารเหลวสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างเอนไซม์ไซลานเนส เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสในเชิงปริมาณและใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้ (ภาคผนวก ก)

3.4 การแยกเชื้อราที่ย่อยสลายไซแลนจากดิน

ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อราจากดินในเขตท้องที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ถ้าเป็นตัวอย่างที่มีเชื้อปรากฏอยู่ให้ทำการเขี่ยเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Czapek medium ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้น แยกเชื้อราที่มีลักษณะปรากฏที่แตกต่างกันนำมาเลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar แยกเชื้อจนกระทั่งได้เชื้อราบริสุทธิ์ ส่วนตัวอย่างที่ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อรา ทำการแยกโดยชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเจือจางตัวอย่างให้เป็น 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} ตามลำดับ จากนั้นเปิดสารละลายตัวอย่างที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมาเกลี่ย (spread plate) บนอาหารแข็ง Czapek medium เลี้ยงเชื้อที่

อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อราเจริญจึงทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยใช้คอร์กบอยเลอร์ ตัดเส้นใยราบริเวณขอบโคโลนีซึ่งเป็นเส้นใยที่มีอายุน้อยที่เจริญบนอาหารแข็ง Czapek medium แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA หลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์โดยตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ นำเชื้อบริสุทธิ์เก็บรักษาในอาหารวุ้นแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อไป

3.5 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการคัดเลือกเชื้อราโดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (xylanase activity) ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของเชื้อราที่แยกได้กับ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง

3.5.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในเชิงคุณภาพ

เฉยเส้นใยเชื้อราที่คัดเลือกได้จำนวนทั้งหมด 30 สายพันธุ์ และเส้นใยของ *A. foetidus* TISTR 3159 ที่มีอายุ 18 ชั่วโมงโดยใช้คอร์กบอยเลอร์ (cork boiler) มาเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสที่มีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารแข็งเท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 เลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 2 วัน แล้วบันทึกผลโดยวัดขนาดของโคโลนีที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการย้อมสีด้วยสี congo red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ท่วมอาหารวุ้นเป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสีทิ้งและรดทับด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมล ที่ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งและวัดขนาดของวงใสรอบโคโลนีที่เกิดขึ้น นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนี แล้วนำค่าที่ได้ทั้งหมดของแต่ละพีเอชที่ทำการศึกษามาเปรียบเทียบกับ *A. foetidus* TISTR 3159 เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีอัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมากกว่าเชื้อ *A. foetidus* TISTR 3159 ไปทำการศึกษารับต่อไป

3.5.2 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในเชิงปริมาณ

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 3.5.1) คือ สายพันธุ์ที่ 13, 30, 21, 20, 22, 27 และ *A. foetidus* TISTR 3159 ในเออเลนเมเยอร์ ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสที่มีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 70 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Montenecourt และ Eveligh, 1977) ที่ได้จากการนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา โดยเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำที่ผสม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 หยดลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ และนับจำนวนสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า ทำการเลี้ยงเชื้อราทุกสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 ยกเว้นสายพันธุ์ที่ 27 เลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 ในสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วสุ่มเก็บตัวอย่างปริมาตร

5 มิลลิลิตร ในวันที่ 3, 4, 5 และ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ แยกเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ไซลานเนสและเซลลูเลส ตามวิธีของ Tang *et. al.* (1987) และ Mandels and Weber (1969) ตามลำดับ (ภาคผนวก ข) แล้วเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไซลานเนสและเซลลูเลสระหว่างเชื้อที่คัดเลือกได้ กับ *A. foetidus* TISTR 3159 เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไซลานเนสสูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลานเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

3.6.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลานเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้ จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ ไซลานเนสปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่ทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ชั่งข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อย และฟางข้าว ที่มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 1 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 ในสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สุ่มเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในวันที่ 3, 4, 5 และ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ แยกเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไซลานเนสและเซลลูเลส และในการศึกษามีการเลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนโดยกำหนดให้เป็นชุดเปรียบเทียบ นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไซลานเนสและเซลลูเลสทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกับเพื่อคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไซลานเนสสูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลานเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้ จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ ไซลานเนสปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่มีชั่งข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร เป็นแหล่งคาร์บอน และทำการแปรผันความเข้มข้นของชั่งข้าวโพด ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 ขั้นตอนต่อจากนี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไซลานเนสและเซลลูเลสทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกับ เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของชั่งข้าวโพดซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไซลานเนสสูงที่สุดและให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสน้อยหรือไม่มีไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเอส ศึกษาผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น

3.6.3.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิต เอนไซม์ไซลานเอส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือก
ได้จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลานเอสปริมาตร
70 มิลลิลิตร ที่มีขั้วข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน
และทำการแปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
ซึ่งประกอบด้วย ยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด (Haapala *et. al.* , 1996) ที่ความเข้มข้น
แตกต่างกัน ดังตารางที่ 3.1 ขั้นตอนต่อจากนี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1
นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเอสและเซลลูเลสทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกับ เพื่อคัดเลือกชนิดและ
ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเอสสูงที่สุด
และให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสน้อยหรือไม่มีไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.3.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเอส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือก
ได้จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลานเอสปริมาตร
70 มิลลิลิตร ที่มีขั้วข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน
แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ประกอบด้วย ยูเรีย ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร โปรติโอสเปปโตน
ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ทำการแปรผัน
ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ ไคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$
(1.4 กรัมต่อลิตร) โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) (0.91 กรัมต่อลิตร) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)
(0.86 กรัมต่อลิตร) และ แอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ (1.4 กรัมต่อลิตร) ซึ่งแหล่งไนโตรเจน
อนินทรีย์ทั้งหมดกำหนดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร ขั้นตอนต่อจาก
นี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเอสและเซลลูเลส
ทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกับ เพื่อคัดเลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมซึ่งให้
ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเอสสูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่างๆ สำหรับการศึกษานิตและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสม

สูตรอาหาร	ยูเรีย (กรัมต่อลิตร)	โปรติโอสเปปโตน (กรัมต่อลิตร)	ยีสต์สกัด (กรัมต่อลิตร)
A	0.1	0.25	0.1
B	0.2	0.25	0.1
C	0.4	0.25	0.1
D	0.3	0.1	0.1
E	0.3	0.2	0.1
F	0.3	0.3	0.1
G	0.3	0.4	0.1
H	0.3	0.25	0.05
I	0.3	0.25	0.15
J	0.3	0.25	0.2
K	0.3	0.25	0.1

3.6.3.3 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลานเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่มีซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร โปรติโอสเปปโตน ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร และ ยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ทำการแปรผันความเข้มข้นของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร ขั้นตอนต่อจากนี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสและเซลล์เนสทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.4 พิเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสปริมาตร

70 มิลลิลิตร ที่มีซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร โปรติโอสเปปโตน ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ไคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ทำการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.0 และ 8.0 ขั้นตอนต่อจากนี้ ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส ทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวที่เหมาะสมซึ่งให้ค่า กิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.5 ความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้ จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่มีซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร โปรติโอสเปปโตน ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร และ ยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ไคแอมโมเนียมไฮโดรเจน-ฟอสเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 ทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสม (ประกอบด้วย เฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4) 5.0 กรัมต่อลิตร; ซิงค์ซัลเฟต $(\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$ 1.4 กรัมต่อลิตร ; แมงกานีสซัลเฟต $(\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 4.56 กรัมต่อลิตร และ โคบอลต์คลอไรด์ (CoCl_2) 2.0 กรัมต่อลิตร) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 , 0.05 , 0.1 , 0.15 และ 0.2 ขั้นตอนต่อจากนี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายแร่ธาตุผสมซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.6 สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้ จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่มีซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร โปรติโอสเปปโตน ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร และ ยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ไคแอมโมเนียมไฮโดรเจน-ฟอสเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 โดยไม่มีการเติมสารละลายแร่ธาตุผสม และทำการแปรผันความเข้มข้นของ Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 , 0.1 , 0.2 , 0.3 และ 0.4

ขั้นตอนต่อจากนี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 แล้วนำค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไชลานเนสและเซลลูเลสทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกัน เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของ Tween 80 ที่เหมาะสมซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไชลานเนสสูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.7 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ ไชลานเนสที่ผลิตได้ของเชื้อราที่คัดเลือกได้ กับเชื้อราสายพันธุ์เปรียบเทียบในสภาวะการเจริญที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้ และ *A. foetidus* ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์เปรียบเทียบโดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสมปริมาตร 70 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยซังข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรียความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร โปรติโอสเปปโตน ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$ ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ และเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 แต่ไม่มีการเติมสารละลายแร่ธาตุผสม และขั้นตอนต่อจากนี้ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับขั้นตอนในหัวข้อ 3.6.1 และในการศึกษามีการเลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรสภาวะที่เหมาะสมที่มีไชแลน ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยกำหนดให้เป็นชุดเปรียบเทียบ นำส่วนใสที่ได้มาวัดค่าพีเอชและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ไชลานเนสและเซลลูเลส แล้วเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้ทั้งหมด

3.8 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราที่คัดเลือก

นำเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ไชลานเนสได้ปริมาณสูงที่คัดเลือกได้ มาจำแนกชนิดของเชื้อราถึงระดับสปีชีส์ ตามวิธีของ Campbell *et. al.* (1985) โดยการเตรียม Slide culture plate technique ตรวจสอบรูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วัดขนาดของเส้นใย, สปอร์, conidiophore, vesicle และถ่ายภาพของเชื้อราจากกล้องจุลทรรศน์ที่มี camera lucida ประกอบอยู่ แล้วทำเปรียบเทียบกับเอกสารและหนังสือที่จำแนกชนิดของเชื้อรา ได้แก่ The Genus *Aspergillus* (Raper and Fennell, 1965), A manual of the *Penicillia* (Raper and Thom, 1949) และ The Genus *Penicillium* (Pitt, 1980)

3.9 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง) แบบ Duncan 'new Multiple-Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 11.0

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อราที่ย่อยสลายไซแลนจากดิน

ผลการแยกเชื้อราจากดินในเขตท้องที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทั้งในตัวอย่างที่มีและไม่มีเชื้อปรากฏอยู่ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง Czapek medium ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส แยกเชื้อในอาหาร potato dextrose agar จนกระทั่งได้เชื้อราบริสุทธิ์ พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 72 สายพันธุ์ แต่มีเชื้อราที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันจำนวน 30 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และยังพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 15 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ส่วนสายพันธุ์ที่ 27 สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชที่เป็นด่างคือ พีเอชเท่ากับ 8.0

4.2 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซแลเนส

4.2.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสในเชิงคุณภาพ

ผลของการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสในเชิงคุณภาพของเชื้อราที่คัดเลือกได้จำนวนทั้งหมด 30 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์อ้างอิง *A. foetidus* TISTR 3159 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งที่มีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารแข็งเท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 เป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการสร้างเอนไซม์ไซแลเนส ซึ่งสังเกตได้จากวงใสรอบโคโลนีและมีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราทั้งหมดภายใต้สภาวะการเจริญที่ค่าพีเอช 6.0, 7.0 และ 8.0 แสดงดังตารางที่ 4.2, 4.3 และ 4.4

ตารางที่ 4.1 สายพันธุ์เชื้อราที่แยกได้จากธรรมชาติในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

สายพันธุ์เชื้อรา	บริเวณที่เก็บเชื้อรา	ลักษณะภายนอกของเชื้อรา
1	ชลบุรี	เส้นใยสีขาวครีม สปอร์สีน้ำตาลอ่อน
2	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวแก่
3	ชลบุรี	เส้นใยสีขาวครีม สปอร์สีดำ
4	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีน้ำตาลปนเหลือง
5	ชลบุรี	เส้นใยสีครีม สปอร์สีน้ำตาลปนเขียวอ่อน
6	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวขี้ม้า
7	ชลบุรี	เส้นใยสีขาวครีม สปอร์สีน้ำตาล
8	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีน้ำตาลเข้ม
9	ชลบุรี	เส้นใยสีครีม สปอร์สีเทาอ่อน
10	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวขี้ม้า
11	ชลบุรี	เส้นใยสีขาวปนเหลือง สปอร์สีดำ
12	ชลบุรี	เส้นใยขาว สปอร์สีเขียวขี้ม้า
13	ชลบุรี	เส้นใยขาว สปอร์สีเขียวอ่อน
14	ชลบุรี	เส้นใยขาว สปอร์สีเขียวปนเหลือง
15	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวเข้ม
16	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีน้ำตาลปนเทา
17	ชลบุรี	เส้นใยสีครีม สปอร์สีเขียวปนเทา
18	ระยอง	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย สปอร์สีน้ำตาลอ่อนปนขาวครีม
19	ระยอง	เส้นใยสีขาว สปอร์สีดำ
20	ระยอง	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวปนเทา
21	ตราด	เส้นใยสีครีม สปอร์สีดำเข้ม
22	ตราด	เส้นใยสีขาว สปอร์สีดำเข้ม
23	จันทบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเทาดำ
24	ชลบุรี	เส้นใยสีขาวครีม สปอร์สีเขียวปนน้ำตาล
25	จันทบุรี	เส้นใยสีครีม สปอร์สีเขียวแก่
26	ระยอง	เส้นใยสีขาว สปอร์สีน้ำตาลปนเทาดำ
27	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีดำปนน้ำตาลเข้ม
28	ชลบุรี	เส้นใยสีขาว สปอร์สีน้ำตาลปนส้มอ่อน
29	ระยอง	เส้นใยสีครีม สปอร์สีดำปนเทาเข้ม
30	ระยอง	เส้นใยสีขาวปนเหลืองอ่อน สปอร์สีดำปนน้ำตาลเข้ม

ตารางที่ 4.2 ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงไศรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงไศรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้และของเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะพีเอช 6.0 เป็นระยะเวลา 2 วัน

สายพันธุ์เชื้อรา	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงไศรอบโคโลนี (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงไศรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี
1	2.93	3.33	1.14 ^{hi}
2	2.53	2.73	1.08 ^{hi}
3	2.10	3.43	1.64 ^{def}
4	2.76	3.53	1.28 ^{hi}
5	2.90	3.20	1.10 ^{hi}
6	1.50	1.80	1.20 ^{hi}
7	2.63	3.20	1.22 ^{hi}
8	2.93	3.06	1.04 ⁱ
9	2.70	3.00	1.11 ^{hi}
10	2.30	3.13	1.36 ^{fghi}
11	1.66	2.13	1.28 ^{hi}
12	2.23	3.13	1.40 ^{fgh}
13	1.63	3.13	1.92 ^{bcd}
14	1.97	2.50	1.27 ^{hi}
15	2.06	2.90	1.40 ^{fgh}
16	2.83	3.67	1.30 ^{ghi}
17	2.08	3.63	1.75 ^{cde}
18	2.45	4.27	1.74 ^{cde}
19	2.75	4.53	1.65 ^{def}
20	0.83	1.70	2.06 ^b
21	1.94	3.93	2.04 ^{bc}
22	1.87	3.97	2.13 ^b
23	2.87	4.00	1.39 ^{fgh}
24	1.03	1.67	1.62 ^{def}
25	3.40	4.10	1.21 ^{hi}
26	1.27	2.03	1.60 ^{efg}

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อรา	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงใสรอบโคโลนี (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี
27	1.20	4.27	3.57 ^a
28	2.50	3.27	1.31 ^{ghi}
29	4.73	5.27	1.11 ^{hi}
30	1.43	2.87	2.04 ^{bc}
<i>A. foetidus</i> TISTR 3159	2.10	4.00	1.90 ^{bcd}

ตัวอักษรเหมือนกันในสคริปต์เดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ตารางที่ 4.3 ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้และของเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะพีเอช 7.0 เป็นระยะเวลา 2 วัน

สายพันธุ์เชื้อรา	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงใสรอบโคโลนี (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี
1	2.43	2.74	1.13 ^k
2	1.80	2.38	1.32 ^{fgh}
3	---	---	---
4	1.96	2.40	1.22 ^{hijk}
5	2.50	2.97	1.19 ^{ijk}
6	---	---	---
7	2.20	2.55	1.16 ^{jk}
8	2.56	2.97	1.16 ^{jk}
9	2.00	2.34	1.17 ^{jk}
10	2.07	2.80	1.35 ^{fg}
11	1.50	1.95	1.13 ^k
12	1.66	2.09	1.26 ^{ghij}
13	---	---	---
14	1.80	2.07	1.15 ^{jk}
15	1.53	2.40	1.57 ^e

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อรา	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงใสรอบโคโลนี (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี
16	2.68	3.50	1.31 ^{fghi}
17	1.77	2.90	1.64 ^{cde}
18	2.03	3.27	1.61 ^{de}
19	2.42	3.73	1.54 ^c
20	0.77	1.34	1.75 ^c
21	2.17	3.70	1.71 ^{cd}
22	2.00	3.76	1.88 ^b
23	2.37	3.17	1.34 ^{fgh}
24	0.77	1.21	1.57 ^c
25	3.20	3.70	1.16 ^{jk}
26	1.37	1.93	1.41 ^f
27	1.17	3.74	3.20 ^a
28	2.33	3.13	1.34 ^{fgh}
29	3.43	3.77	1.10 ^k
30	1.27	2.37	1.87 ^b
<i>A. foetidus</i> TISTR 3159	1.90	3.23	1.70 ^{cd}

ตัวอักษรเหมือนกันในสทมภ์เดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01
 --- หมายถึง ไม่มีการเจริญ

ตารางที่ 4.4 ขนาดของโคโลนี ขนาดของวงใสรอบโคโลนี และค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้และของเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะพีเอช 8.0 เป็นระยะเวลา 2 วัน

สายพันธุ์เชื้อรา	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงใสรอบโคโลนี (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี
1	---	---	---
2	---	---	---
3	---	---	---

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

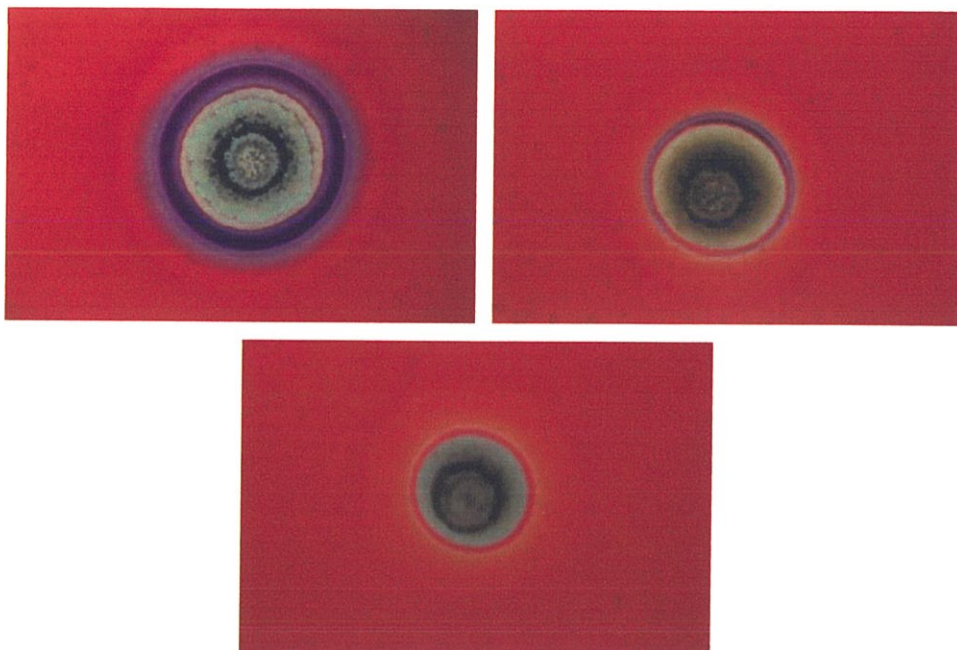
สายพันธุ์เชื้อรา	ขนาดของโคโลนี (ซม.)	ขนาดของวงใสรอบโคโลนี (ซม.)	ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี
4	---	---	---
5	---	---	---
6	---	---	---
7	---	---	---
8	---	---	---
9	---	---	---
10	---	---	---
11	---	---	---
12	---	---	---
13	---	---	---
14	---	---	---
15	---	---	---
16	2.42	3.10	1.28 ^f
17	1.50	2.45	1.63 ^d
18	1.03	1.80	1.75 ^{b,c}
19	1.90	2.67	1.41 ^c
20	---	---	---
21	---	---	---
22	1.90	3.17	1.67 ^{c,d}
23	2.17	2.90	1.34 ^{e,f}
24	---	---	---
25	3.10	3.43	1.11 ^g
26	1.13	1.80	1.60 ^d
27	1.13	3.13	2.77 ^a
28	2.10	2.77	1.32 ^{c,f}
29	2.83	3.03	1.07 ^g
30	1.17	2.14	1.83 ^b
<i>A. foetidus</i>	1.50	2.60	1.73 ^c
TISTR 3159			

ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

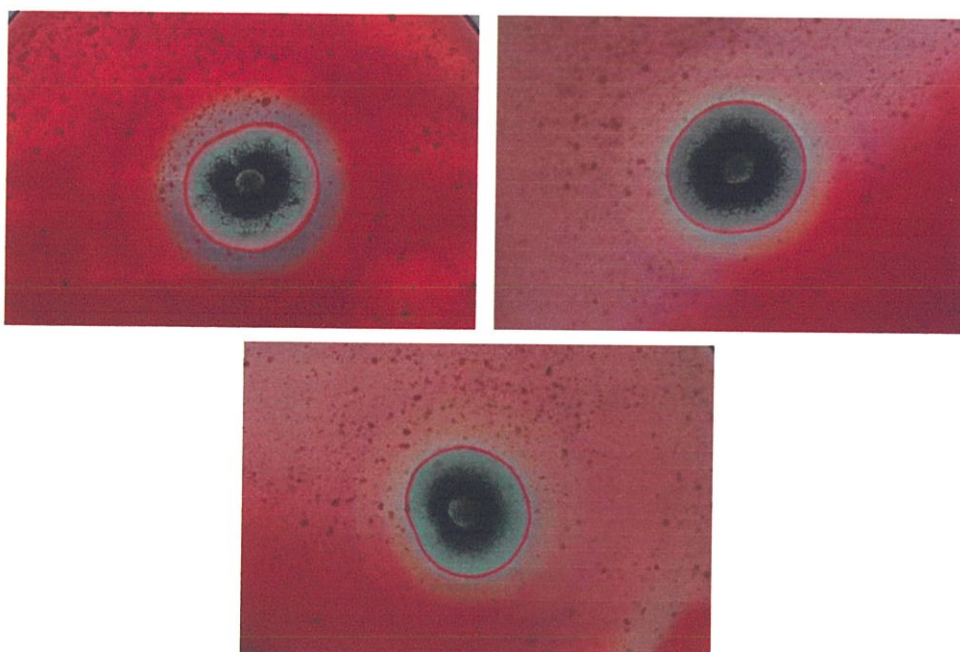
--- หมายถึง ไม่มีการเจริญ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ค่าพีเอช 6.0 เชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการสร้างเอนไซม์ไซแลเนส เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าที่สภาวะการเจริญในอาหารแข็งที่ค่าพีเอช 6.0 7.0 และ 8.0 เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุดเท่ากับ 3.57, 3.20 และ 2.77 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 กับค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์อื่นที่ทำการเปรียบเทียบ ในขณะที่สภาวะการเจริญที่พีเอช 6.0 พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 22, 20, 21, 30 และ 13 ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีรองลงมาจากสายพันธุ์ที่ 27 ตามลำดับ และมากกว่า *A. foetidus* TISTR 3159 โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ส่วนที่พีเอช 7.0 พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 22, 30, 20 และ 21 ให้ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีรองลงมาจากสายพันธุ์ที่ 27 ตามลำดับ และมากกว่า *A. foetidus* TISTR 3159 โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 และในพีเอช 8.0 พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 30 และ 18 ให้ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีรองลงมาจากสายพันธุ์ที่ 27 ตามลำดับ และมากกว่า *A. foetidus* TISTR 3159 โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ฉะนั้นอาจสรุปได้ว่าเชื้อราที่มีค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงน่าจะผลิตเอนไซม์ได้สูงด้วย เนื่องจากค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ (Daigneault - Sylvestre and Kluepfel, 1979) ลักษณะของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 และ *A. foetidus* TISTR 3159 แสดงดังรูปที่ 4.1 และ 4.2

จากผลการทดลองที่ได้นี้จึงคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่มีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีที่มีค่ามากกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสภาวะการเจริญของทุกค่าพีเอช (ดังตารางที่ 4.5) เพื่อนำไปศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสในเชิงปริมาณต่อไป



รูปที่ 4.1 ลักษณะของวงไฮรอปโคโลนีของ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อเจริญในอาหารแข็งที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะพีเอช 6.0 (บนข้าว) พีเอช 7.0 (บนขว) และพีเอช 8.0 (ถ่าง) เป็นระยะเวลา 2 วัน



รูปที่ 4.2 ลักษณะของวงไฮรอปโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเจริญในอาหารแข็งที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะพีเอช 6.0 (บนข้าว) พีเอช 7.0 (บนขว) และพีเอช 8.0 (ถ่าง) เป็นระยะเวลา 2 วัน

ตารางที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ของค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้ที่มีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมากกว่า *A. foetidus* TISTR 3159 ในการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลันเนสในเชิงคุณภาพ เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งที่มีไซเลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นระยะเวลา 2 วัน

สายพันธุ์เชื้อรา	ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนี : ขนาดของโคโลนี
27 (6)	3.57 ^a
27 (7)	3.20 ^b
27 (8)	2.77 ^c
22 (6)	2.13 ^d
20 (6)	2.06 ^{de}
21 (6)	2.04 ^{de}
30 (6)	2.04 ^{de}
13 (6)	1.97 ^{def}
<i>A. foetidus</i> TISTR 3159 (6)	1.90 ^{def}
22 (7)	1.88 ^{def}
30 (7)	1.87 ^{def}
30 (8)	1.83 ^{ef}
18 (8)	1.75 ^f
20 (7)	1.74 ^f
<i>A. foetidus</i> TISTR 3159 (8)	1.73 ^f
21 (7)	1.71 ^f
<i>A. foetidus</i> TISTR 3159 (7)	1.70 ^f

ตัวเลขในวงเล็บ หมายถึง ค่าพีเอชที่เชื้อราเจริญ

4.2.2 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในเชิงปริมาณ

ผลการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในเชิงปริมาณของเชื้อ *A. foetidus* TISTR 3159 กับเชื้อราสายพันธุ์ที่ 13, 30, 21, 20, 22, 27 ที่คัดเลือกได้จากการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในเชิงคุณภาพ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน และจากผลการทดลองในการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในเชิงคุณภาพที่ผ่านมาจึงกำหนดสภาวะพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราได้ดังนี้ คือเชื้อราสายพันธุ์ที่ 13 เลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 เชื้อราสายพันธุ์ที่ 18 เลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 8.0 เชื้อราสายพันธุ์ที่ 20, 21 และ 22 เลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 กับ 7.0 และเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 เช่นเดียวกันกับ *A. foetidus* TISTR 3159 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6 พบว่าเชื้อราทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเพิ่มขึ้นสูงสุดจนถึงวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเจริญที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุดเท่ากับ 33.82 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดของ *A. foetidus* TISTR 3159 ที่มีค่าเท่ากับ 33.42 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์อื่น ๆ ทั้งหมดที่ทำการทดลอง พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

อย่างไรก็ตาม *A. foetidus* TISTR 3159 ที่เป็นเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง เป็นเชื้อราที่ใช้เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรานี้เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่จากเหตุผลที่ว่าในการเปรียบเทียบในเชิงคุณภาพเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 มีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงไฮรอปโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีมากกว่าเชื้อรา *A. foetidus* TISTR 3159 อย่างมีนัยสำคัญ ประกอบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้มีค่าสูงเทียบเท่ากับของ *A. foetidus* TISTR 3159 จากเหตุผลข้างต้นจึงคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้เป็นเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงสุด เพื่อใช้สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสต่อไป

ตารางที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ของการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในเชิงปริมาณ เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่มีไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นระยะเวลา 6 วัน

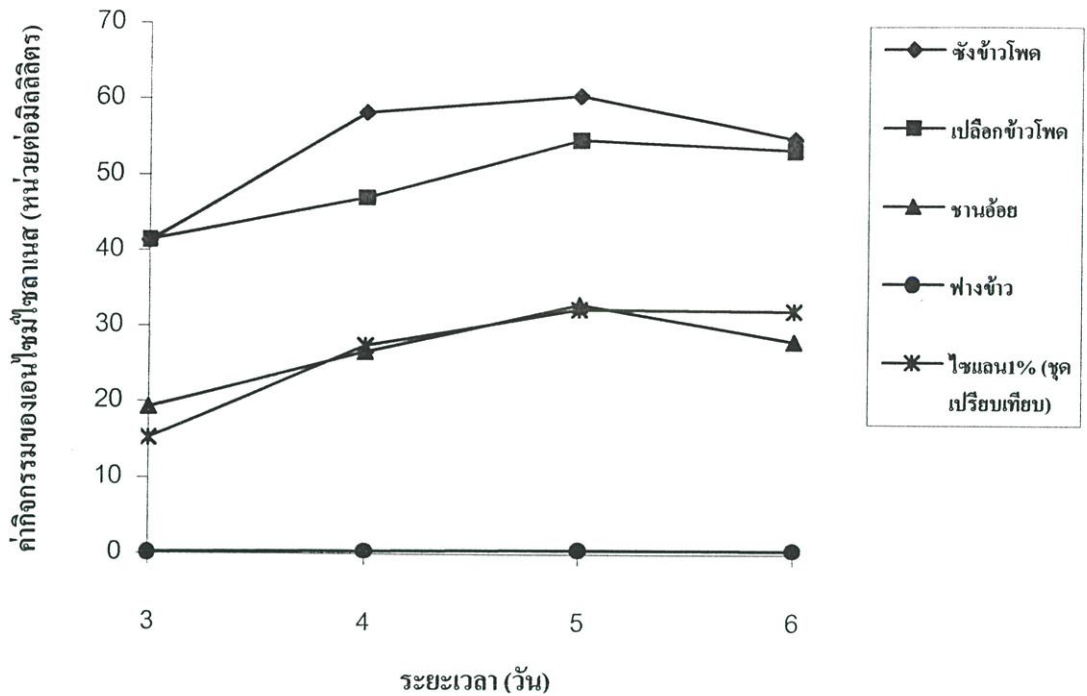
สายพันธุ์เชื้อรา	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
27 (6)	33.82 ^a
<i>A. foetidus</i> TISTR 3159 (6)	33.42 ^a
21 (6)	26.38 ^b
22 (6)	26.31 ^b
30 (6)	24.97 ^b
13 (6)	22.69 ^b
20 (6)	21.28 ^b
27 (7)	8.39 ^c
27 (8)	4.28 ^c

ตัวเลขในวงเล็บ หมายถึง ค่าพีเอชที่เชื้อราเจริญ

4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราที่คัดเลือกได้

4.3.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ผลของการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ชั่งข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ชานอ้อยและฟางข้าวที่ผ่านการบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 1 เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่าเมื่อใช้ชั่งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อรา ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 60.38 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งสูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ก.1) ในขณะที่ชุดเปรียบเทียบซึ่งมีไซเลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 32.23 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 จากผลการทดลองพบว่าฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อราใช้ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้น้อยที่สุด โดยได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 0.59 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกชั่งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27



รูปที่ 4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตอินโดล-3-ไพริวอีนของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

จากการที่เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 สามารถใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและผลิตอินโดล-3-ไพริวอีนได้ดีที่สุด อาจเนื่องจากในซังข้าวโพดมีองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสอยู่มาก คือร้อยละ 39 และมีส่วนของลิกนินซึ่งย่อยสลายได้ยากในปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ (Barber and Benedito de Barder, 1974 and Kuhad, 1999) อีกทั้งอาจเนื่องจากการจัดเรียงตัวของไชนแลนในโครงสร้างของซังข้าวโพดอยู่ในตำแหน่งที่ย่อยสลายได้ง่ายกว่า ส่วนของเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนที่สามารถนำไปใช้ได้ง่ายที่สุดเมื่อเทียบกับเซลลูโลสและลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของซังข้าวโพด (Kuhad, 1999) ดังนั้นจึงเห็นขบวนการผลิตอินโดล-3-ไพริวอีนได้มากที่สุด ประกอบกับในซังข้าวโพดอาจมีแหล่งของสารอาหารอื่น ๆ เช่น แหล่งไนโตรเจน วิตามิน แร่ธาตุ เป็นต้น ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตอินโดล-3-ไพริวอีนของเชื้อรา จึงช่วยส่งเสริมให้เชื้อราผลิตอินโดล-3-ไพริวอีนได้มากขึ้น (Purkarthofer *et. al.*, 1993b) ส่วนสาเหตุที่ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อราใช้ผลิตอินโดล-3-ไพริวอีนได้น้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากฟางข้าวมีองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสน้อยที่สุด คือร้อยละ 24 (Barber and Benedito de Barder, 1974 and Kuhad, 1999) และการจัดเรียงตัวขององค์ประกอบต่าง ๆ ในฟางข้าวอาจจะทำ

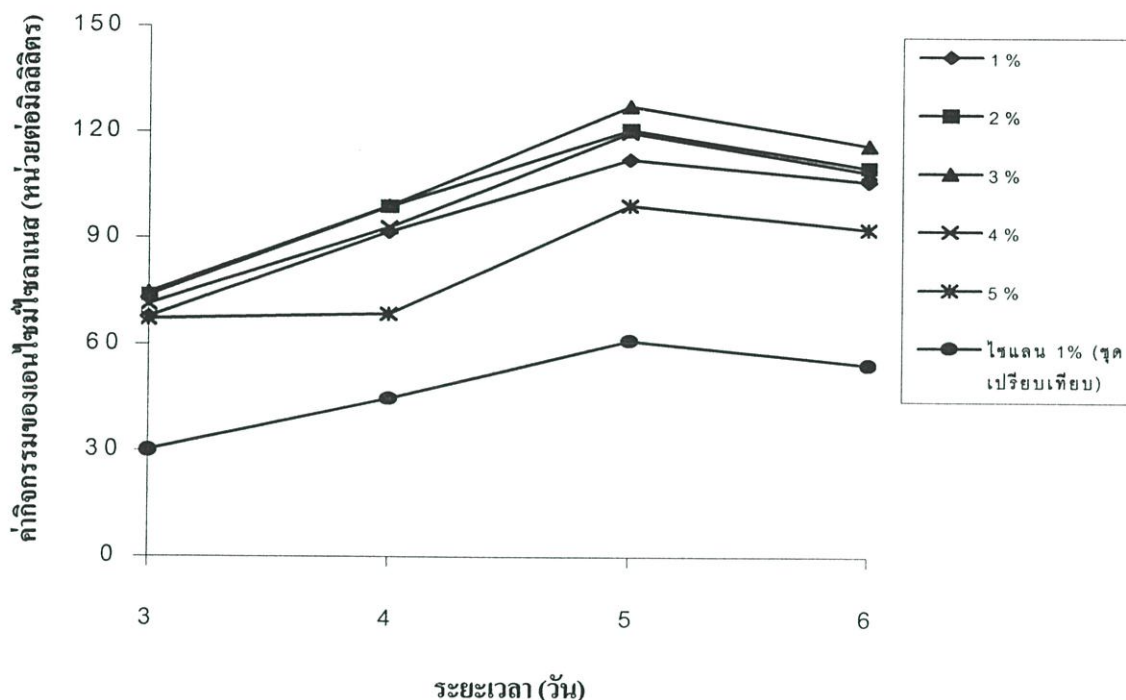
ให้เชื้อรานำไซเลนมาใช้ได้ยากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่นที่ศึกษา (Kuhad, 1999) โดยผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Purkarthofer *et. al.* (1993b) ซึ่งรายงานว่ ช้างข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ *T. lanuginosus* DSM 5826 เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น และเมื่อใช้ช้างข้าวโพดบด ความเข้มข้น 31.2 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวปริมาตร 30 ลิตร อุณหภูมิและพีเอช เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และ 7.5 เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด 1,950 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นค่าความสามารถในการผลิต (productivity) เท่ากับ 16,525 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง¹ ยิ่งกว่านั้นยังมีการรายงานมากมายที่แสดงให้เห็นว่ามีการใช้สารพวกเฮมิเซลลูโลสหรือพอลิกลูโคส ซึ่งเป็นสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ เช่น ไร่ข้าวสาลี ฟางข้าว ช้างข้าวโพดและชานอ้อย เป็นต้น เพื่อเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลานเนส โดยเชื้อรา (Kesker, 1992 ; Kuhad *et. al.*, 1998 ; Puchart *et. al.*, 1999 ; Beg *et. al.*, 2000a and Gupta *et. al.*, 2001)

4.3.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ผลของการใช้ช้างข้าวโพดขนาดไม่เกิน 0.75 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 พบว่าเมื่อใช้ช้างข้าวโพด ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลทำให้เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 127.24 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ใช้ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ก.2) ส่วนชุดควบคุมที่ใช้ไซเลน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 60.94 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าการใช้ช้างข้าวโพดที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ใช้ศึกษาโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

จากผลการทดลองสังเกตได้ว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสจะมีค่าสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อใช้ช้างข้าวโพด ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน จนกระทั่งถึงความเข้มข้นร้อยละ 3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้รับจะมีค่าสูงที่สุด และค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสจะเริ่มลดลงเมื่อความเข้มข้นของช้างข้าวโพดเพิ่มมากกว่าร้อยละ 3 โดยพบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 และ 5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจะมีค่าลดลงเรื่อย ๆ ซึ่งสาเหตุการลดลงของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของช้างข้าวโพดมากขึ้น อาจเนื่องจากการเพิ่มปริมาณช้างข้าวโพดที่มากเกินไปและมีผลทำให้มีปริมาณหรือการถ่ายเทมวลสารของออกซิเจนน้อยลง จึงส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ทำให้การเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราลดลง (Singh *et. al.*, 1995) หรืออาจเกิดจากการสะสมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ

ย่อยสลายของเอนไซม์ไซลานเนสและสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่เชื้อราผลิตขึ้นในปริมาณมาก ที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา (พรพิมล อู๋จันทร์ภักดี, 2533) ดังนั้นจึงเลือกซังข้าวโพด ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของซังข้าวโพดที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

มีงานวิจัยที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้โดย Lenartovicz *et. al.* (2003) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการใช้วัสดุเศษเหลือทิ้งพวกกลีโคไลโนเซลลูโลสหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 และ ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการผลิตเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส โดย *A. fumigatus* ในการหมักแบบสภาวะอาหารเหลว พบว่าเมื่อใช้ซังข้าวโพดความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน จะได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดสสูงสุดเท่ากับ 45.40 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วน Singh *et. al.* (1995) รายงานว่าเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของรำข้าวสาลีจากความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 3 พบว่าปริมาณการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์

เบต้า-ไซโลซิเคส โดย *Fusarium oxysporum* NTG-19 เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของรำข้าวสาลี มากกว่าร้อยละ 3 จะไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ทั้งสอง นอกจากนี้ Purkarthofer and Steiner (1995) รายงานว่าজনপলসাস্ত্রংของการปลดปลอยเอนไซม์ไซลานเอสของจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรทที่ใช้เป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลานเอส หากมีการใช้ประโยชน์จากตัวชักนำที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ให้หมดลงอย่างช้า ๆ โดยตลอดระยะเวลาของการหมัก ซึ่งเป็นการทำให้ระยะเวลาของการหมักยาวนานขึ้น จะช่วยส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเอสได้สูงขึ้น

4.3.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเอส

4.3.3.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเอส

ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ซึ่งประกอบด้วย ยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (ดังตารางที่ 3.1) ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเอสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7 พบว่าเมื่อใช้ในโตรเจนอินทรีย์สูตร G ซึ่งประกอบด้วยยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.3, 0.4 และ 0.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเอสสูงสุดเท่ากับ 191.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าสูตรอื่น ๆ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 กับสูตร H (ประกอบด้วยยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.3, 0.25 และ 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) , K (ประกอบด้วยยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.3, 0.25 และ 0.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) และ J (ประกอบด้วยยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.3, 0.25 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด เป็นพื้นฐาน พบว่าไนโตรเจนอินทรีย์สูตร H มีความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดนี้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตร G, J และ K ซึ่งเป็นการใช้สารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ที่คุ้มค่าไม่สิ้นเปลือง และยังให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเอสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับไนโตรเจนอินทรีย์สูตร G, J และ K ดังนั้นจึงเลือกใช้ไนโตรเจนอินทรีย์สูตร H เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเอส โดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเอสสูงสุด 185.97 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน

ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Haapala *et. al.* (1996) ซึ่งศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเอสของ *T. reesei* ที่ครึ่งเซลล์บนเส้นใยไพลอน โดยการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่มีไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราใน

สูตร Ib (ประกอบด้วยโปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 3.0 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ), Id (ประกอบด้วยโปรติโอสเปปโตน ความเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร) และ Ie (ประกอบด้วยยีสต์สกัด ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร) ที่ไม่มียูเรียเป็นองค์ประกอบ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสอยู่ในช่วง 1,550 ถึง 1,800 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้อาหารสูตร Ic ที่มียูเรียเพียงอย่างเดียว (ประกอบด้วยยูเรีย ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร) ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเพียง 1,490 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งไม่เพียงพอต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส และพบว่าสูตรอาหารที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดคือ Ia ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ประกอบด้วยยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 1.5, 3.0 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 8,020 นาโนคาตาลต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนซึ่งได้แก่ ยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด มีผลช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ซึ่งโปรติโอสเปปโตนประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นและยีสต์สกัดจะเป็นแหล่งที่ดีของวิตามินบีรวม ส่วนการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น พบว่ายูเรียจะต้องเปลี่ยนรูปไปเป็นแอมโมเนียโดยเอนไซม์ยูเรียเอสก่อน จากนั้นจุลินทรีย์จึงจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นการใช้ยูเรียที่ความเข้มข้นต่ำอาจจะไม่เพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ (Stewart, 1980)

มีการรายงานที่ผ่านมาซึ่งสนับสนุนการใช้โปรติโอสเปปโตนหรือยีสต์สกัดว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีของจุลินทรีย์ เมื่อใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของจุลินทรีย์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงขึ้น (Haltrich *et. al.*, 1993 ; Purkarthofer *et. al.*, 1993a ; Haltrich *et. al.*, 1994 and Gomes *et. al.*, 1994b) ซึ่งยังมีการสนับสนุนการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์โดย Fernandez-Espinar *et. al.* (1992) รายงานว่าการเพิ่มสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อนมีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถึงแม้ว่าจะใช้ในความเข้มข้นที่เท่ากันก็ตาม

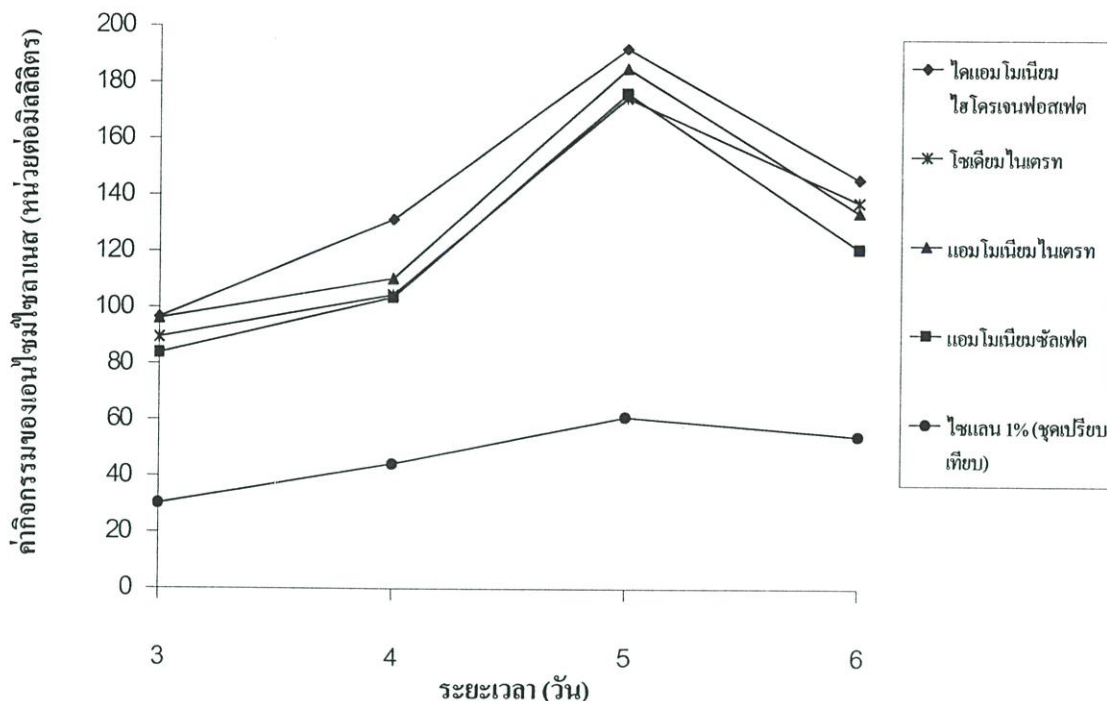
ตารางที่ 4.7 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ ไชลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

ไนโตรเจนอินทรีย์	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ไชลานเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
A	158.98 ^d
B	163.09 ^{cd}
C	171.19 ^{bcd}
D	171.97 ^{bc}
E	164.22 ^{cd}
F	165.43 ^{cd}
G	191.20 ^a
H	185.97 ^a
I	182.08 ^{ab}
J	183.87 ^a
K	184.98 ^a
ชุดเปรียบเทียบ*	69.60 ^c

ชุดเปรียบเทียบ* หมายถึง ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ใช้ไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

4.3.3.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ไชลานเนส

ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ไคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ซึ่งกำหนดให้มีความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร (ความเข้มข้น 1.4 , 0.91 , 0.86 และ 1.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ ไชลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.5 พบว่าเมื่อใช้ไคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ไชลานเนสสูงสุดเท่ากับ 191.60 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ศึกษาโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค.3) และจากการทดลองยังพบว่าน้ำหมักมีค่าพีเอชลดลง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกไคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ไชลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27



รูปที่ 4.5 ผลของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ในสภาวะอาหารโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

จากผลการทดลองพบว่าไคแอม โมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อราใช้ NH_4^+ จากสารประกอบเป็นสารอาหารสำหรับกิจกรรมของเซลล์ก่อน แล้วจะเกิด HPO_4^{-2} ซึ่งเป็นพวกอนุผลของสารพวกฟอสเฟตที่เป็นแร่ธาตุที่จุลินทรีย์ต้องการมากสำหรับการเจริญ เพราะมีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) ของเซลล์หรืออาจจะนำไปใช้เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์บางชนิด หรือเป็นองค์ประกอบของสารบางชนิด และฟอสเฟตยังมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ ซึ่งอาจจะช่วยควบคุมพีเอชของน้ำหมักให้คงที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมได้ จึงอาจจะช่วยส่งเสริมให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีขึ้น (สมใจศิริโชค, 2537) ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้โซเดียมไนเตรทและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์จะได้รับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสน้อยที่สุด (ภาคผนวก ก.3) เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดอื่นที่ใช้ในการทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตทำให้มีการสะสมอนุผลของซัลเฟอร์ และส่งผลให้พีเอชของน้ำหมักลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้การเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ถูกจำกัด (Forage and Righelato, 1979)

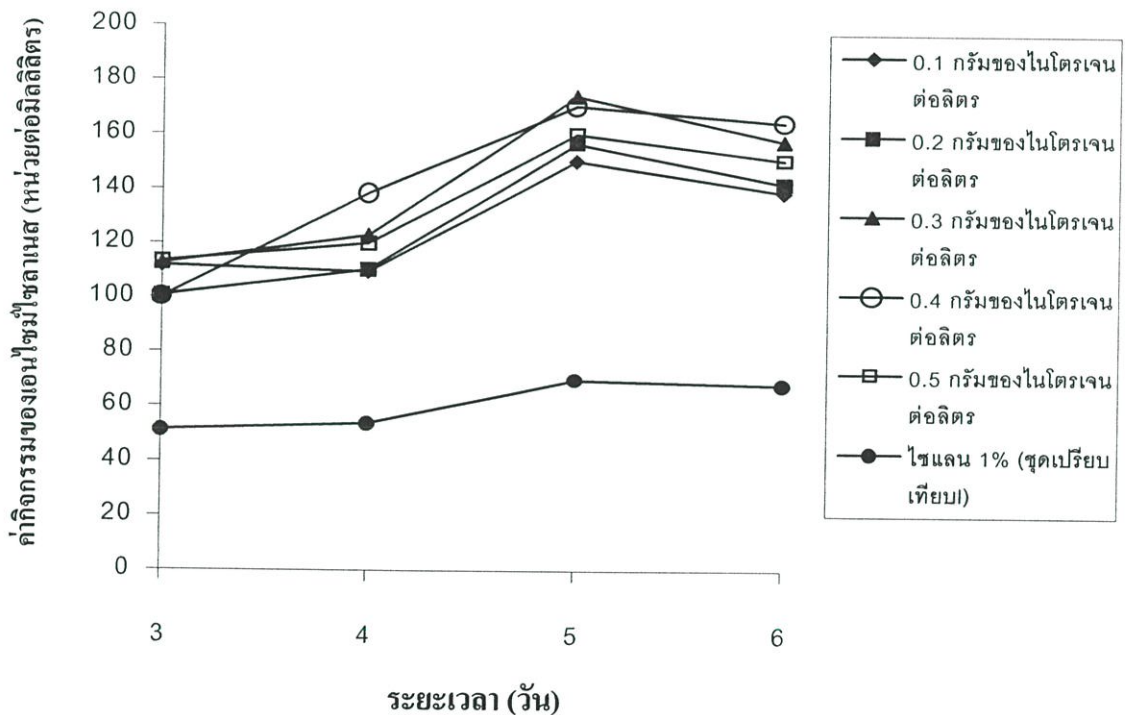
ส่วนการใช้โซเดียมไนเตรท พบว่าจุลินทรีย์จะสามารถใช้ประโยชน์ได้จะต้องมีการเปลี่ยนรูปเป็นแอมโมเนียก่อน ซึ่งต้องใช้ขบวนการเมแทบอลิซึม 2 ขั้นตอน (Stewart, 1980) ฉะนั้นเชื้อราจึงนำไปใช้ได้ช้า จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในระดับต่ำ

มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดย Christakopoulos *et. al.* (1996) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Fusarium oxysporum* F3 ในเออเลนเมเยอร์ ฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร minimal medium ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีซังข้าวโพดบด ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมฟอสเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 เป็นระยะเวลา 4 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสจำเพาะ (specific activity) สูงสุดเท่ากับ 331 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นอกจากนี้ Haapala *et. al.* (1994) รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์มีผลต่อค่าพีเอชของอาหารอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างการหมัก ซึ่งทำให้ค่าพีเอชของอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงและอาจส่งผลให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้ลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ในระหว่างระยะเวลาของการหมัก เพื่อป้องกันการสูญเสียของผลผลิต

4.3.3.3 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ผลของการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของการใช้โคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร (ความเข้มข้น 0.47, 0.94, 1.40, 1.89 และ 2.36 ตามลำดับ) ในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 พบว่าเมื่อใช้โคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 173.89 หน่วยต่อมิลลิลิตรหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งสูงกว่าการใช้โคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ทำการศึกษา แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 กับการใช้โคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 170.34 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในทางตรงกันข้ามพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 กับการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์นี้ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.5 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร (ภาคผนวก ค.4) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้โคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตตั้งแต่ความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งได้รับค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 0.3 หรือ 0.4 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น

0.5 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสที่ได้จะลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อกำหนดถึงความเข้มข้นของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ใช้ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ได้อย่างคุ้มค่าน่ากว่า เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสสูงสุดเทียบเท่ากับการใช้ที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นที่มากกว่า จากเหตุผลดังกล่าวจึงเลือกใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6 และจากการทดลองยังพบว่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าลดลงเรื่อย ๆ ซึ่งมีค่าพีเอชสุดท้ายของน้ำหมักเท่ากับ 3.65, 3.77, 3.89, 3.85 และ 3.74 เมื่อใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ

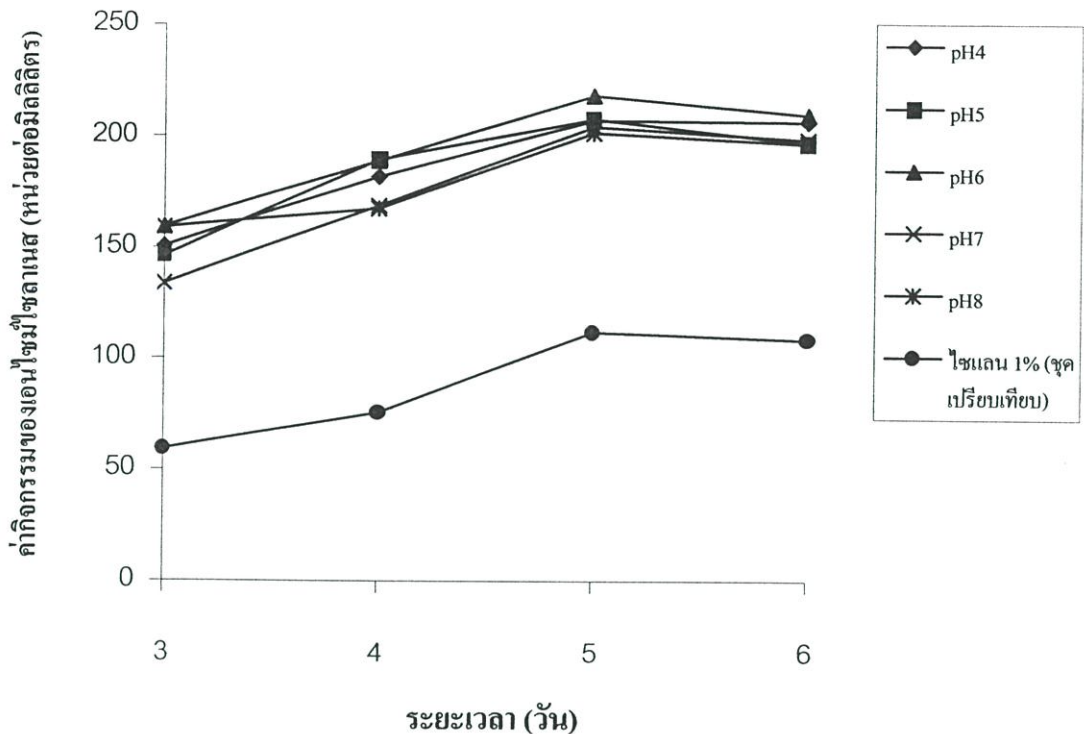


รูปที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

4.3.4 พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 โดยทำการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่สภาวะพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 218.07 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ และสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวอื่น ๆ ที่ได้ศึกษา และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 (ภาคผนวก ก.5) ส่วนการเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชอื่น ๆ พบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสใกล้เคียงกัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7 และยังพบว่าในน้ำหมักมีค่าพีเอชลดลง โดยมีค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 3.14, 3.50, 3.73, 3.79 และ 3.85 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่า เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง แต่พีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (optimum pH) มีค่าอยู่ที่พีเอช 6.0 ดังนั้นจึงเลือกค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอช 6.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27

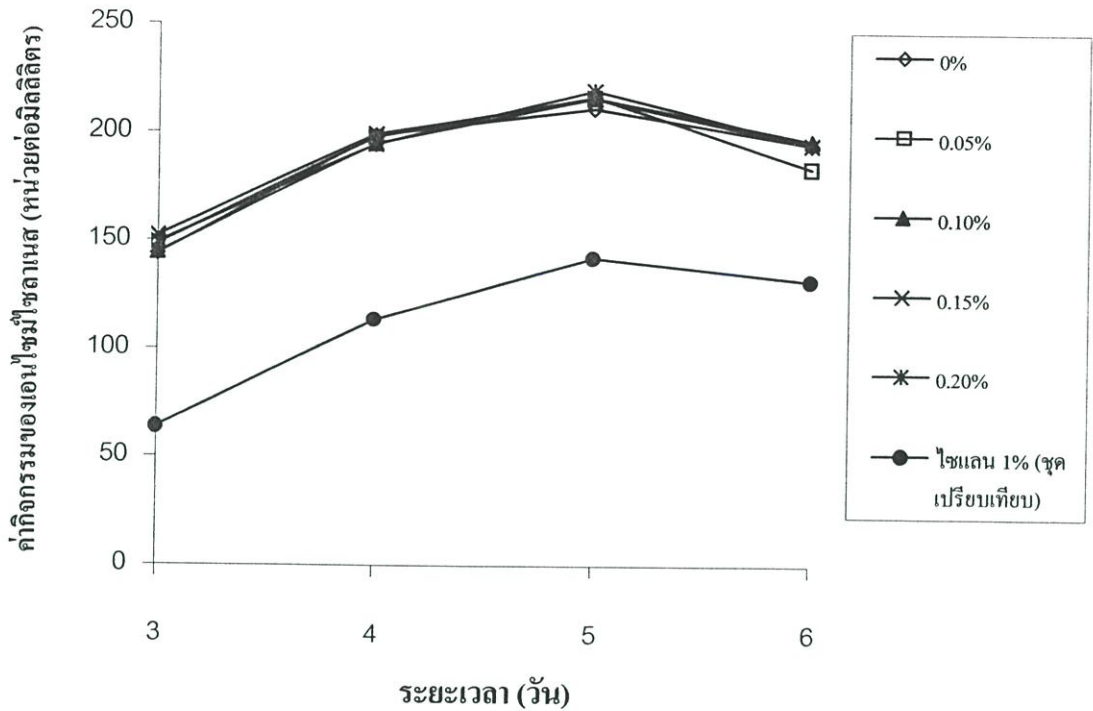
ซึ่งมีงานวิจัยที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้โดย Xiong *et. al.* (2003) ได้ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *T. reesi* Rut C-30 ในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ (batch cultivations) ในอาหาร lactose-based medium ที่มีแลคโตส ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และทำการแปรผันค่าพีเอชให้อยู่ระหว่าง 3.5 ถึง 7.5 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 ได้รับค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 94.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อราสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่ค่าพีเอชต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Smith and Wood (1991b) ที่รายงานว่า ค่าพีเอชที่เป็นกรดมีความเหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *A. awamori* และเมื่อพีเอชมีค่าเท่ากับ 5.0 หรือสูงกว่านี้ จะส่งผลให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสลดลง และจากผลการศึกษาของ Bailey and Viikari (1993) รายงานว่าในระยะเวลาช่วงหลังของการเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จะส่งผลให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำกว่า 3.0 ทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีระดับต่ำลง นอกจากนี้ Haitrich *et. al.* (1994) ได้รายงานว่าค่าพีเอชที่ต่ำลงจะส่งผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *S. rolfsii* พบว่าในระหว่างการเลี้ยงเชื้อรานี้ พีเอชจะมีค่าลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เปลี่ยนไปเป็นค่าพีเอชระหว่าง 3.0 และ 3.5 ซึ่งผลของการลดลงของค่าพีเอชในระหว่างการหมักจะส่งผลให้เชื้อราปลดปล่อยกรดออกซาลิก (oxalic acid) ออกมาภายนอกเซลล์ในปริมาณมาก ทำให้ทั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราลดต่ำลง และจากการที่ค่าพีเอชลดต่ำลงในระหว่างการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสนี้ จึงต้องมีการควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการหมักให้คงที่เพื่อให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 4.7 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน

4.3.5 ความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลจากการเติมสารละลายแร่ธาตุผสมซึ่งประกอบด้วย เฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4) ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และโคบอลต์คลอไรด์ (CoCl_2) ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เพื่อเป็นแหล่งของแร่ธาตุสำหรับการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 พบว่าเมื่อเติมสารละลายแร่ธาตุผสมที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดใกล้เคียงกันโดยประมาณ 215 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกันกับเมื่อไม่เติมสารละลายแร่ธาตุผสม (ร้อยละ 0) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทุกความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค.6) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกการไม่เติมสารละลายแร่ธาตุผสมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อนำไปศึกษาขั้นต่อไป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 ผลของความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

เมื่อพิจารณาผลการทดลองทางสถิติ อาจกล่าวได้ว่าสารละลายแร่ธาตุผสมไม่มีผลในการเพิ่มความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ทั้งนี้อาจเนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งของแร่ธาตุที่เพียงพออยู่แล้วสำหรับการเจริญและผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจอยู่ในรูปของสารประกอบอนินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และแมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ในทำนองเดียวกันซังข้าวโพดที่เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ตามธรรมชาติที่อาจมีส่วนประกอบของสารอาหารจำพวกแร่ธาตุและวิตามินต่าง ๆ อยู่ในปริมาณที่เพียงพอและเหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสของเชื้อรา (สมใจ ศิริโชค, 2537) ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในการเลี้ยงเชื้อ

มีการศึกษาที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้โดย Halthrich *et. al.* (1994) ได้ศึกษาผลขององค์ประกอบของสารอาหารที่มีต่อการสร้างเอนไซม์ไโซลานเนสโดย *S. rolfisii* ซึ่งใช้การวางแผนการทดลองทางสถิติในการวิเคราะห์ผล พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน-

อินทรีย์ และมีการเติมสารละลายแร่ธาตุปริมาณเพียงเล็กน้อย พร้อมกับมีการเพิ่มความเข้มข้นของ เซลลูโลส จากความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็น 60 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถกระตุ้นให้ *S. rolfii* ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้มากขึ้น ในทางตรงกันข้ามเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือแร่ ให้มากขึ้น พบว่าไม่มีผลทำให้ *S. rolfii* ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้เพิ่มขึ้น โดยทั่วไปแร่ธาตุ เป็นสารอินทรีย์ที่สิ่งมีชีวิตต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Ratanakhanokchai *et. al.* (1998) พบว่า Fe^{2+} , Ca^{2+} , และ Mg^{2+} มีผลช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ ไซลานเนส แต่ Mn^{2+} มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส และพบว่า Co^{2+} , Zn^{2+} และ Cd^{2+} มีผลช่วยเพิ่มการยึดเกาะของเอนไซม์ไซลานเนสกับไซเลนชนิดที่ไม่ละลายน้ำ

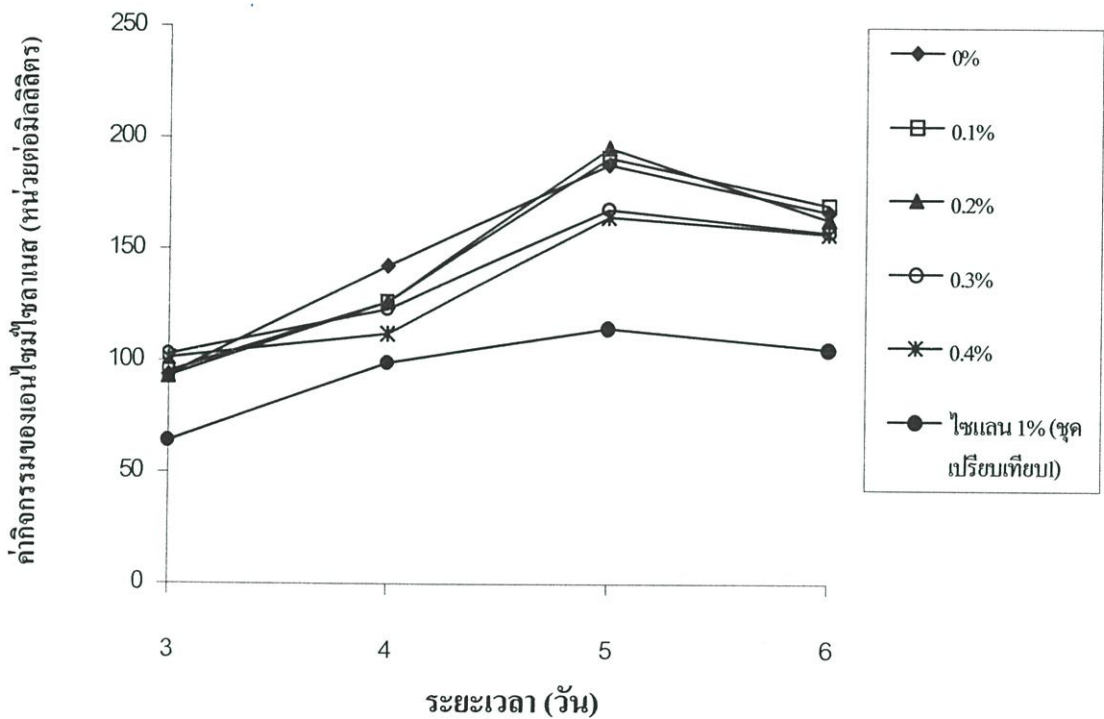
4.3.6 สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ผลจากการเติม Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 พบว่าเมื่อเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงกว่าการเติม Tween 80 ที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค.7) โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 190.84 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อ 5 วัน จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ Tween 80 จากความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ถึง ร้อยละ 0.2 มีผลให้การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติม Tween 80 ในทางตรงกันข้ามเมื่อความเข้มข้นของ Tween 80 มากกว่าร้อยละ 0.2 ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไซลานเนส ยิ่งกว่านั้นยังพบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีการเติม Tween 80 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 187.97 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 0.4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ภาคผนวก ค.7) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.9 ดังนั้นจึงเลือกใช้ Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อพิจารณาผลการทดลองแสดงว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ Tween 80 มากกว่าร้อยละ 0.2 จะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่ Tween 80 มีผลต่อการเพิ่มคุณสมบัติการซึมผ่านได้ของสาร (permeability) ของเซลล์เมมเบรน และส่งผลต่อการปลดปล่อยเอนไซม์ (Okeke and Obi, 1993) ดังนั้นจากการเติม Tween 80 ที่ความเข้มข้นสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้เชื้อราสามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น และทำให้ภายในเซลล์มีอัตราการเมแทบอลิซึมสูงในระยะเวลาที่รวดเร็ว และส่งผลให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลานเนสออกมาภายนอกเซลล์ในปริมาณมาก โดยเอนไซม์ไซลานเนสจะย่อยสลายไซเลนจากขังข้าวโพคได้มากขึ้น และให้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น ๆ แล้วไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์

สายสั้น ๆ นี้จะถูกส่งผ่านเข้าสู่เซลล์ และเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตเอนไซม์ไขมันออกมาอย่างต่อเนื่องในปริมาณสูง ในที่สุดจะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการเมแทบอลิซึมของไขมันในช่วงแรกของการหมัก ซึ่งน้ำตาลไซโลสปริมาณมากที่เกิดขึ้นนี้อาจจะมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา เนื่องจากน้ำตาลไซโลสจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ของเซลล์และเกิดการสร้างผลิตภัณฑ์หลายชนิดออกมาจำนวนมาก เช่น กรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไขมันของเชื้อรา อัตราการเจริญจึงถูกจำกัดและส่งผลให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไขมันได้ต่ำลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก จากเหตุผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การใช้ Tween 80 ความเข้มข้นสูงจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไขมันน้อยกว่าการใช้ Tween 80 ความเข้มข้นต่ำ อย่างไรก็ตามการใช้ Tween 80 ความเข้มข้นต่ำเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไขมันสูง อาจเนื่องจากการซึมผ่านของสารอาหารเข้าสู่เซลล์เกิดขึ้นได้ดีเช่นกัน แต่อาจจะมีกรนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ในอัตราเร็วที่ต่ำกว่า เซลล์จึงมีการเมแทบอลิซึมไขมันอย่างช้า ๆ ทำให้มีการผลิตเอนไซม์ไขมันออกมาในปริมาณที่เหมาะสมและไม่ทำให้อัตราการเจริญถูกจำกัดด้วยไซโลส จึงทำให้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไขมันได้อย่างต่อเนื่องในอัตราการเมตาบอลิซึมอย่างช้า ๆ จากการเหนี่ยวนำของไซโลโโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ เพียงเล็กน้อย จนกระทั่งสารอาหารหมดลงหรืออัตราการเจริญลดลงจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก (Okeke and Obi, 1993)

มีงานวิจัยที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้โดย Reese and Maguire (1969) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* ในสภาวะอาหารเหลว ในอาหารสารละลายเกลือแร่ที่มีสัดส่วนของความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สามารถเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไขมันได้ 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม Tween 80 และยังพบความสัมพันธ์ของการใช้ Tween 80 กับเปอร์เซ็นต์การเพิ่มของการผลิตเอนไซม์ จะให้ผลดีที่สุดกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณน้อยมากเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารปกติที่ไม่มีการเติม Tween 80 ส่วน Liu *et. al.* (1998) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไขมันโดย *T. cutaneum* SL409 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยใช้รำข้าวสาลี ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไขมันสูงสุด 39.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไขมันเพิ่มขึ้นเป็น 74 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในทางตรงกันข้ามการใช้ Tween 80 มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไขมันของจุลินทรีย์ได้เช่นกัน ซึ่งอาจเนื่องจากสาเหตุดังนี้ คือ 1) จากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์และการเพิ่มขึ้นของสารประกอบภายในเซลล์อื่น ๆ ที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ และ 2) จากการที่ Tween 80 ให้ผลที่ซับซ้อนมากกว่าการเปลี่ยนคุณสมบัติการซึมผ่านได้ของสารของเซลล์เมมเบรนเพียงอย่างเดียว (Reese and Maguire, 1969) จากการศึกษาผลของ Tween 80 ต่อการผลิตเอนไซม์

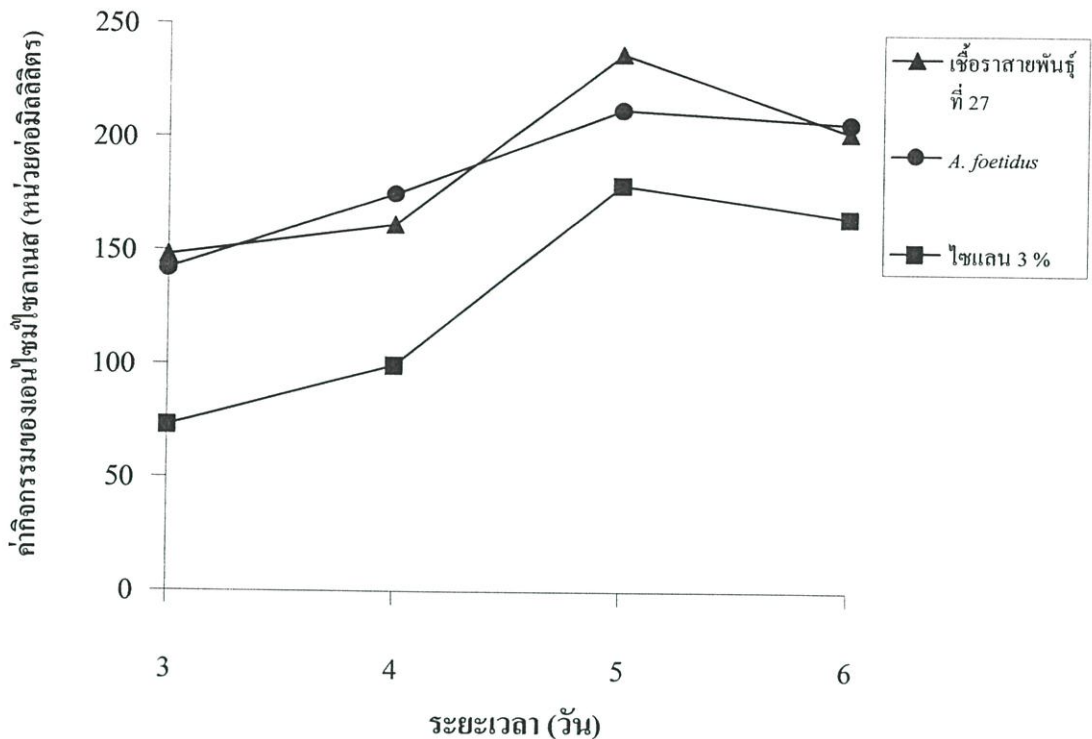
จำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าการใช้ Tween 80 เดิมลงไปในอาหารที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 ถึง 3.0 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้ประมาณร้อยละ 12 ถึง 60 แต่ในบางกรณีพบว่า Tween 80 ไม่มีผลช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสของจุลินทรีย์ (Dubeau *et. al.*, 1987 ; Fernandez-Espinar *et. al.*, 1992 ; Okeke and Obi, 1993 ; Gomes *et. al.*, 1993a and Singh *et. al.*, 1995) ยิ่งกว่านี้มีการยืนยันเกี่ยวกับผลของสารลดแรงตึงผิวที่มีต่อเชื้อราบางชนิดโดย Takahashi *et. al.* (1960) รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวสามารถนำมาใช้ได้ดีกับการเลี้ยงเชื้อราในสถานะอาหารเหลว ซึ่งจะช่วยให้เปลี่ยนรูปของเพลเลต (pellet) ไปเป็นไมซีเลียมที่สามารถกระจายได้ทั่วถึงในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.9 ผลของ Tween 80 ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสถานะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

4.4 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ไซลานเนสที่ผลิตได้ของเชื้อราที่คัดเลือกได้กับเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิงในสภาวะการเจริญที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์

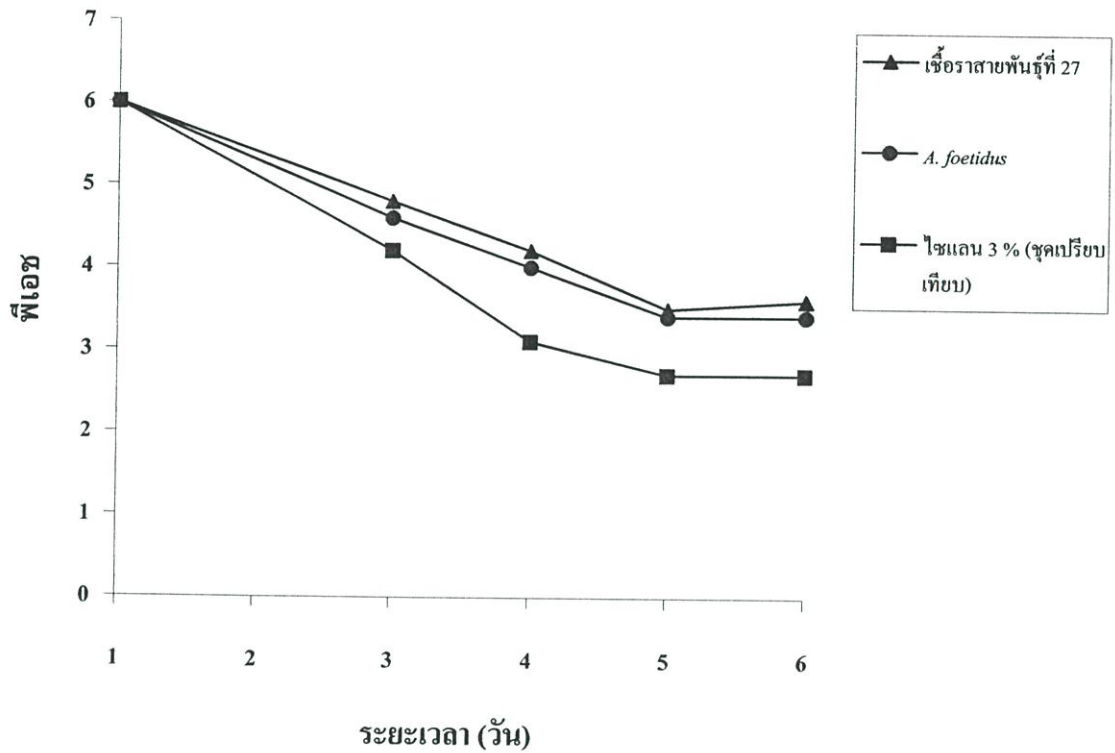
จากผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 คือเลี้ยงเชื้อในเออเลนเมเยอร์ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 70 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในสภาวะการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 6.0 ด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีส่วนประกอบดังนี้ 1) ชั่งข้าวโพคขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน 2) ยูเรีย โปรติโอสเปปโตน และยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.3, 0.25 และ 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ 3) ไคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร (1.4 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ 4) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 2.0 กรัมต่อลิตร ; แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) และแมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้นชนิดละ 0.3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งของเกลือแร่ และ 5) Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ผลการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ที่คัดเลือกได้ พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงที่สุด โดยสูงกว่า *A. foetidus* TISTR 3159 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 (ภาคผนวก ค.8) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากการศึกษา ซึ่งเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส เท่ากับ 236.53 และ 0.22 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน *A. foetidus* TISTR 3159 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 211.90 และ 0.28 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์นี้ได้รับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน ส่วนผลการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ของชุดควบคุม (เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเหมาะสมที่มีไซแลน ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน) พบว่าให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 178.59 และ 0.21 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 และ *A. foetidus* TISTR 3159 ในสภาวะอาหารเหลวที่มีการปรับปรุงสูตรให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

ผลการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบว่า *A. foetidus* TISTR 3159 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.28 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 (ภาคผนวก ก.8) เมื่อพิจารณาผลการทดลองทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสสูงกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 ซึ่งนับว่าเป็นคุณสมบัติที่ดีของจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้ผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากจุดประสงค์ที่สำคัญของการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสนั้น คือต้องการจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้สูงและต้องไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วย หรืออาจจะมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส ส่วนการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 และ *A. foetidus* TISTR 3159

พบว่าพีเอชมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 5 วัน ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นพีเอชจะมีค่าค่อนข้างคงที่ ซึ่งพีเอชสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 และ *A. foetidus* TISTR 3159 เป็นเวลา 6 วัน มีค่าเท่ากับ 3.6 และ 3.4 ตามลำดับ เมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอช 6.0 ผลของการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชแสดงดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 และ *A. foetidus* ในสภาวะอาหารเหลวที่มีการปรับปรุงสูตรให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 6 วัน

มีงานวิจัยที่คล้ายคลึงกับงานวิจัยนี้ ในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีการใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรหรือวัสดุเหลือทิ้ง (waste) จากกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมหลายชนิด ซึ่งประกอบด้วยสารพวกกลีโคซิลโลสที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ โดยเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสที่มีคล้ายคลึงกันกับงานวิจัยนี้ เช่น Biswas *et. al.* (1990) รายงานว่าเมื่อใช้ชานอ้อย ความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร เป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อ *A. ochraceus* NG-13 ในสภาวะ

อาหารเหลว ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส และ 6.5 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 46.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ Singh *et. al.* (1995) รายงานว่าเมื่อใช้รำข้าวสาลี ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อ *F. oxysporum* NTG-19 ในสภาวะอาหารเหลว ที่อุณหภูมิและพีเอชเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 5.0 ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าให้กิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 53.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามยังมีเชื้อราสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ปริมาณสูงกว่า เช่น Royer and Nakas (1989) รายงานว่า *T. longibrachiatum* ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 272 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวในระดับพลาสติกที่มี Solka Floc ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะการเจริญที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เป็นระยะเวลา 6 วัน เป็นต้น ยิ่งกว่านั้น Bastawde *et. al.* (1994) รายงานว่ายีสต์สายพันธุ์ NCIM 3574 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 570 หน่วยต่อมิลลิลิตร และไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสรวมออกมา เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่ใช้ oat spelt xylan ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะการเจริญที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ดังนั้นหากมีการปรับปรุงกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 เช่นใช้ระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง ใช้ระบบการตรึงเซลล์หรืออาจใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมปรับปรุงพันธุ์ อาจทำให้การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นและยังทำให้ราคาของเอนไซม์ไซลานเนสลดลงด้วย (Haltrich *et. al.*, 1996)

4.5 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราที่คัดเลือกได้

จากการตรวจรูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยวัดขนาดของสปอร์ conidiophores และ vesicles ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27, 22, 20, 21, 30 และ 13 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ปริมาณสูงจากการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในเชิงคุณภาพ ตามลำดับ และเชื้อราสายพันธุ์ที่ 15 ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.8 แล้วนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอก (macroscopic) และภายใน (microscopic) มาทำเปรียบเทียบกับเอกสารและหนังสือที่จำแนกชนิดของเชื้อราของ Raper and Fennell (1965) , Raper and Thom (1949) และ Pitt (1980) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.9 และลักษณะของเชื้อราเหล่านี้แสดงดังรูปที่ 4.12 ถึง 4.18

ตารางที่ 4.8 ขนาดของสปอร์, conidiophores และ vesicles ของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 13, 15, 21, 22, 27 และ 30 เมื่อเจริญบนอาหาร Czapek agar และสายพันธุ์ที่ 20 เจริญบนอาหาร Malt extract agar

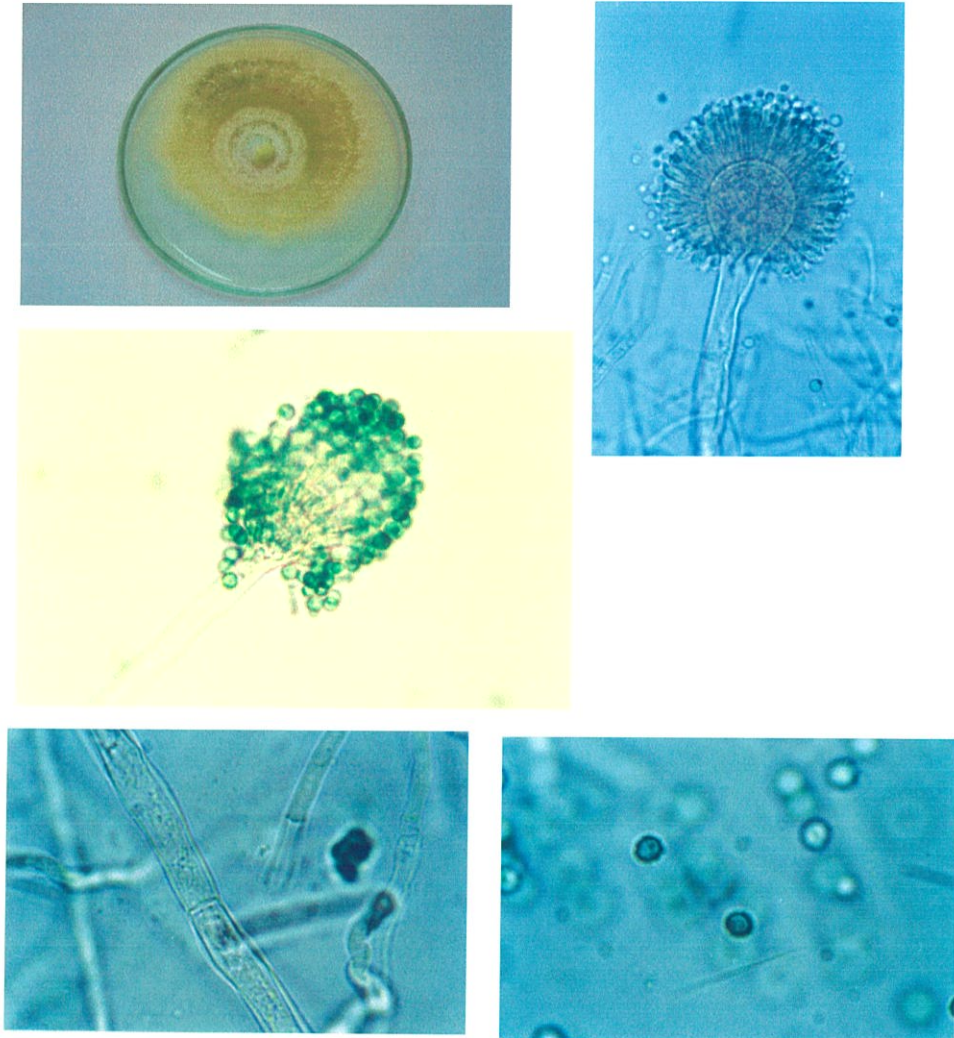
สายพันธุ์เชื้อรา	ขนาด (ไมครอน ; μm)			
	สปอร์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง)	Vesicles (ความกว้าง)	Conidiophores (ความกว้าง x ความยาว)	Phialides (ความยาว)
13	4.0	26-28	7.4x500.0	19.4
15	1.6	15-18	6.0x219.0	11.4
20	2.4	ไม่ได้ตรวจสอบ	6.0x254.0	22.4
21	6.0	42-51	8.0x700.0	ไม่ได้ตรวจสอบ
22	3.2	19-23	8.0x670.4	13.8
27	4.0	45-53	8.0x348.2	9.34
30	4.0	45-60	8.0x310.0	7.12

ตารางที่ 4.9 ผลการจัดจำแนกเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่คัดเลือกได้โดยเปรียบเทียบกับเอกสารและหนังสือที่จำแนกชนิดของเชื้อรา

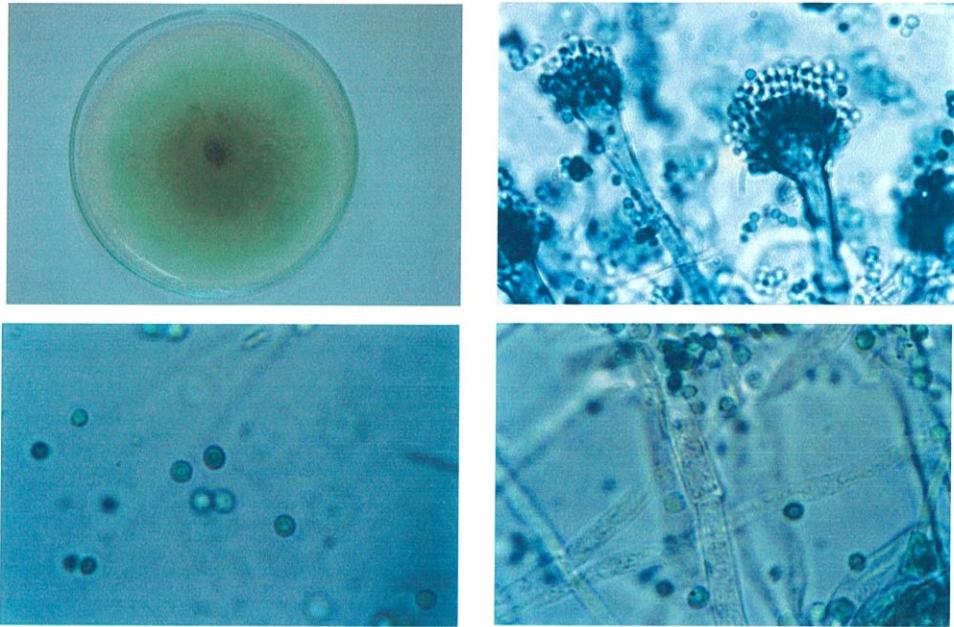
สายพันธุ์เชื้อรา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนก
13	โคโลนีสปอร์สีเขียวอ่อน, เส้นใยสีขาวเป็นชนิดมีผนังกัน (septate hypha), phialides เกิดอยู่บน metula ที่เกิดล้อมรอบ vesicle รูปทรงกลม, จัดอยู่ใน <i>Aspergillus flavus</i> group จำแนกชนิดได้เป็น <i>Aspergillus flavus</i>
15	โคโลนีสปอร์สีเขียวเข้มและมีลักษณะค่อนข้างเป็นผงละเอียด, เส้นใยสีขาวเป็นชนิดมีผนังกัน, conidiophores เป็นรูปทรงกระบอก, phialides เกิดอยู่บน vesicle เฉพาะด้านบนของหัว, จัดอยู่ใน <i>Aspergillus fumigatus</i> group. จำแนกชนิดได้เป็น <i>Aspergillus fumigatus</i>
20	โคโลนีสปอร์สีเขียวปนเทา, เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกัน, ไม่มี vesicle, จำแนกชนิดได้เป็น <i>Penicillium sp.</i>
21	โคโลนีสปอร์สีดำ, เส้นใยมีสีครีมเป็นชนิดมีผนังกัน, จัดอยู่ใน <i>Aspergillus niger</i> group., แต่ลักษณะของ phialides ยังไม่ชัดเจน จำแนกชนิดได้เป็น <i>Aspergillus sp.</i>

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

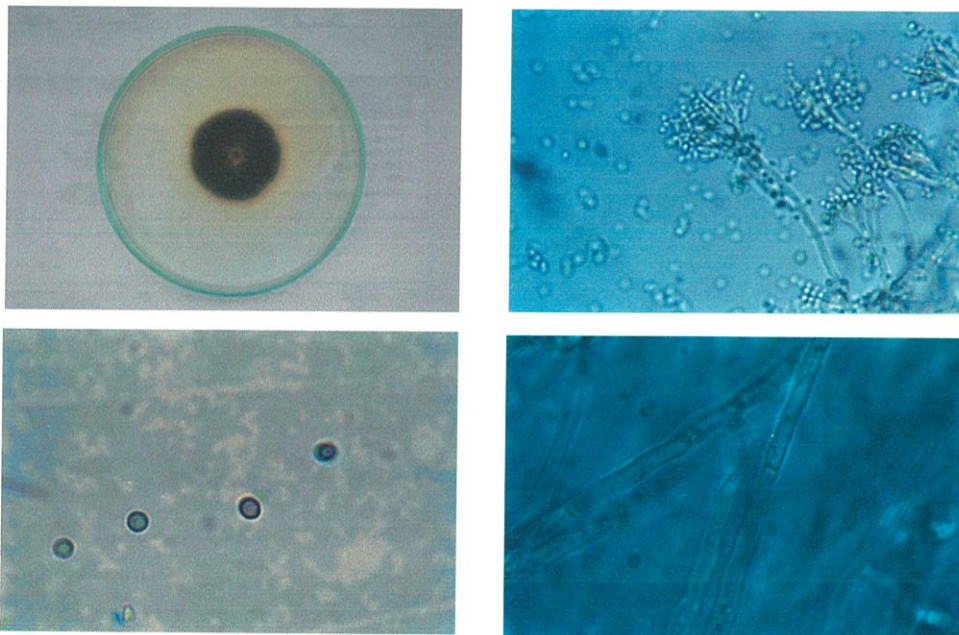
สายพันธุ์เชื้อรา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนก
22	โคโลนีสปอร์สีดำ, เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกัน, จัดอยู่ใน <i>Aspergillus niger</i> group., แต่ลักษณะของ phialides ยังไม่ชัดเจน จำแนกชนิดได้เป็น <i>Aspergillus sp.</i>
27	โคโลนีสปอร์สีดำปนน้ำตาลเข้ม, เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกัน, จัดอยู่ใน <i>Aspergillus niger</i> group. phialides เกิดอยู่บน metula ที่เกิดล้อมรอบ vesicle รูปทรงกลม, สปอร์มีร่องตามแนวยาว จำแนกชนิดได้เป็น <i>Aspergillus niger</i>
30	โคโลนีสปอร์สีดำปนน้ำตาลเข้ม, เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกัน, จัดอยู่ใน <i>Aspergillus niger</i> group. , phialides เกิดล้อมรอบ vesicle รูปทรงกลม จำแนกชนิดได้เป็น <i>Aspergillus japonicus</i>



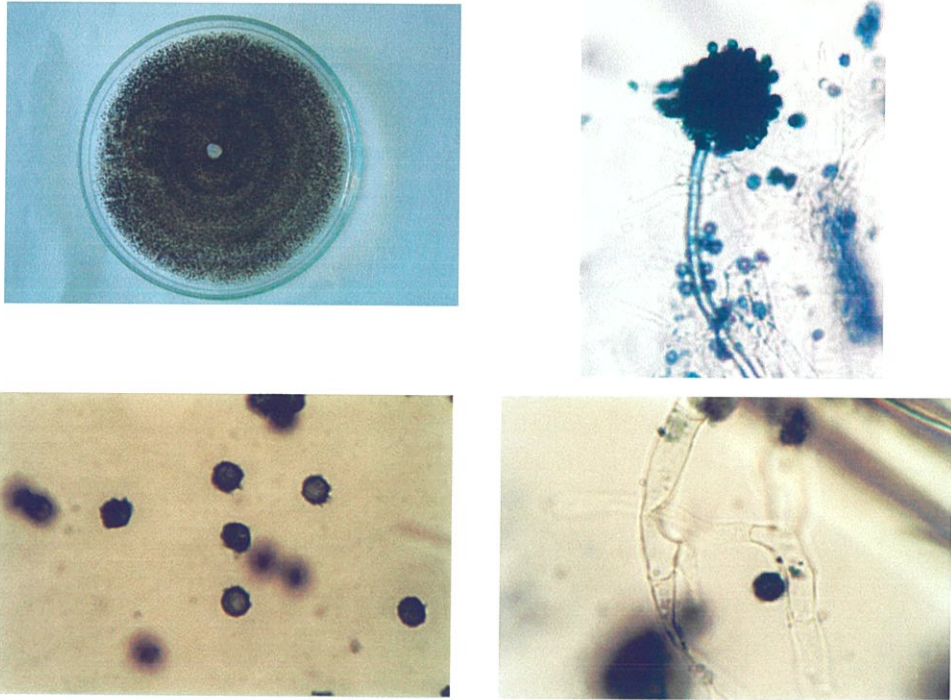
รูปที่ 4.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 13 โคลนีสมีสปอร์สีเขียวอ่อน เส้นใยสีขาวเป็นชนิดมีผนังกัน ด้านหลังของโคลนีสมีสัคริมและ phialides เกิดอยู่บน metula ที่เกิดล้อมรอบ vesicle รูปทรงกลม จัดอยู่ใน *Aspergillus flavus* group จำแนกชนิดได้เป็น *Aspergillus flavus*



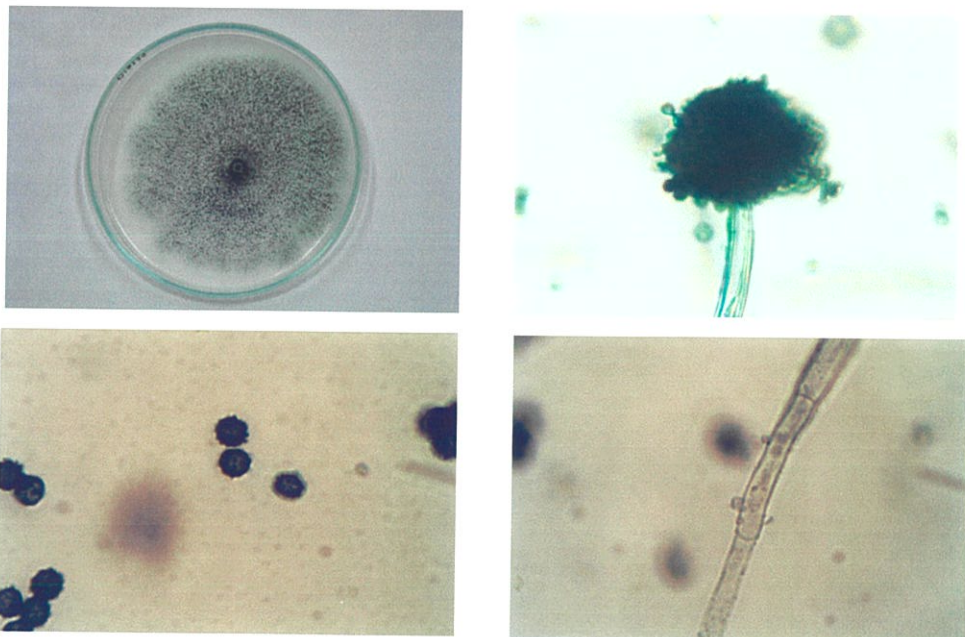
รูปที่ 4.13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 15 โคลนีสปอร์สีเขียวเข้มและมีลักษณะค่อนข้างเป็นผงละเอียด เส้นใยสีขาวเป็นชนิดมีผนังกัน ด้านหลังของโคลนีสปอร์มีสีขาวครีม conidiophores เป็นรูปทรงกระบอกและ phialides เกิดอยู่บน vesicle เฉพาะด้านบนของหัว จัดอยู่ใน *Aspergillus fumigatus* group. จำแนกชนิดได้เป็น *Aspergillus fumigatus*



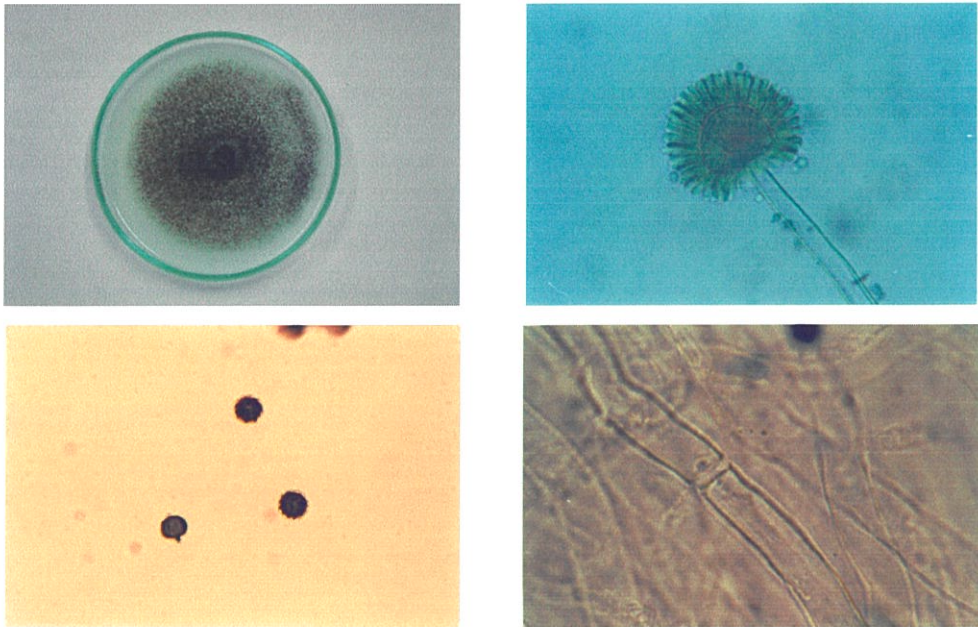
รูปที่ 4.14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 20 โคลนีสปอร์สีเขียวนเทา เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกัน ด้านหลังของโคลนีสปอร์สีขาวครีมและไม่มี vesicle จำแนกชนิดได้เป็น *Penicillium sp.*



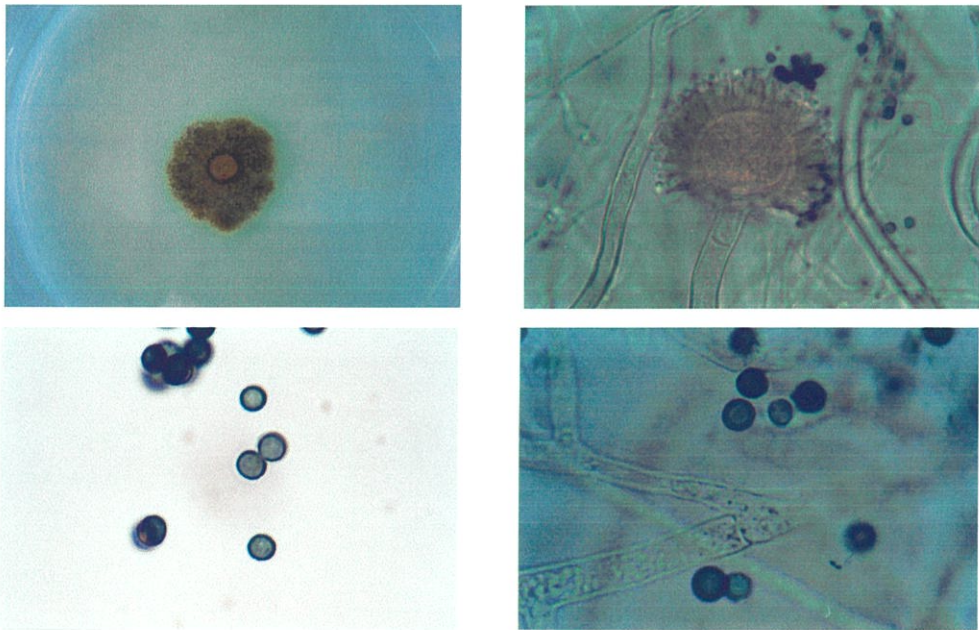
รูปที่ 4.15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 21 โคลนนี้มีสปอร์สีดำ เส้นใยมีสีครีม เป็นชนิดมีผนังกัน ด้านหลังของโคลนนี้มีสีขาวครีม จัดอยู่ใน *Aspergillus niger* group. แต่ลักษณะของ phialides ยังไม่ชัดเจน จำแนกชนิดได้เป็น *Aspergillus* sp.



รูปที่ 4.16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 22 โคลนนี้มีสปอร์สีดำ เส้นใยมีสีขาว เป็นชนิดมีผนังกัน ด้านหลังของโคลนนี้มีสีขาว จัดอยู่ใน *Aspergillus niger* group. แต่ลักษณะของ phialides ยังไม่ชัดเจน จำแนกชนิดได้เป็น *Aspergillus* sp.



รูปที่ 4.17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 โคลนีสปอร์สิดำปนน้ำตาลเข้ม เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกันและด้านหลังของโคลนีสีขาวครีม จัดอยู่ใน *Aspergillus niger* group. และ phialides เกิดล้อมรอบ vesicle รูปทรงกลม สปอร์มีรูปร่างตามแนวยาว จำแนกชนิดได้เป็น *Aspergillus niger*



รูปที่ 4.18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 30 โคลนีสปอร์สิดำปนน้ำตาลเข้ม เส้นใยมีสีขาวเป็นชนิดมีผนังกัน ด้านหลังของโคลนีสีเหลืองอมน้ำตาล จัดอยู่ใน *Aspergillus niger* group. และ phialides เกิดล้อมรอบ vesicle รูปทรงกลม จำแนกชนิดได้เป็น *Aspergillus japonicus*

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการแยกและคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากตัวอย่างดินในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้จำนวน 72 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันจำนวน 30 สายพันธุ์ ในเชื้อราจำนวนนี้มีเชื้อราสายพันธุ์ที่ 15 และ 27 สามารถเจริญได้ในสภาวะอุณหภูมิสูง (45 องศาเซลเซียส) และในสภาพความเป็นด่าง (พีเอช 8.0) ตามลำดับ เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อราทั้ง 30 สายพันธุ์ ด้วยการทดสอบความสามารถของเชื้อราต่อการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณเปรียบเทียบกับ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง พบว่าภายใต้สภาวะการเจริญที่ค่าพีเอช 6.0 เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุด โดยให้ค่าของอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสรอบโคโลนีต่อขนาดของโคโลนีสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารแข็งเท่ากับ 3.57 และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาพอาหารเหลวเท่ากับ 33.82 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ในสภาวะอาหารเหลว คือใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อราจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในเอเจนเมเยอร์ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวปริมาตร 70 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยซังข้าวโพคขนาดไม่เกิน 0.75 มิลลิเมตร ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ยูเรีย โปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.3, 0.25 และ 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ส่วนไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$ ความเข้มข้น 0.3 กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ และเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ภายใต้สภาวะการเจริญที่อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ ด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสนี้พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว xylan medium สูตรตั้งต้นประมาณ 7 เท่า โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 236.53 และ 0.22 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะเวลา 5 วัน และวัดค่าพีเอชสุดท้ายของน้ำหมักได้เท่ากับ 3.6 เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *A. foetidus* TISTR 3159 ภายใต้สภาวะการเจริญเดียวกัน พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 แต่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำกว่าของ *A. foetidus* TISTR 3159 อย่างมีนัยสำคัญ

โดย *A. foetidus* TISTR 3159 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 211.90 และ 0.28 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน และวัดค่าพีเอชสุดท้ายของน้ำหมักได้เท่ากับ 3.4 และสามารถจำแนกชนิดของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 ได้เป็น *A. niger*

ข้อเสนอแนะ

1. การแยกเชื้อราควรให้ได้เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจำนวนมาก เพื่อจะได้นำมาเปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้มากขึ้น
2. การเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ในอาหารเหลว ควรศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ เช่น การควบคุมพีเอช การเติมสารบางตัวที่ช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ ความเร็วรอบในการเขย่า อัตราส่วนของปริมาณอาหารต่อขนาดฟลาสก์ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เป็นต้น นอกจากนี้ควรศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมักด้วย
3. การเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้โดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร ควรทำการแปรผันชนิดของวัสดุเหล่านี้ให้มีจำนวนมากขึ้น เพื่อให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสในปริมาณมาก โดยใช้อุปกรณ์ที่หาง่ายและราคาไม่แพง
4. ควรมีการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยการเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมัก
5. หากมีการปรับปรุงกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส เช่น ใช้ระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง ซึ่งช่วยลดปัญหาการถูกจำกัดของการถ่ายโอนมวลสารอันเนื่องมาจากการใช้ความเข้มข้นของสับสเตรตมากเกินไป การใช้ระบบการตรึงเซลล์หรืออาจใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น เช่น ทำให้จุลินทรีย์สามารถต้านทานการยับยั้งการผลิตเอนไซม์เนื่องจากกระบวนการ carbon catabolite repression ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในระดับใหญ่ขึ้น และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

บรรณานุกรม

- บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- พรพิมล อ้อยจันทร์ภักดี. 2533. “ผลของน้ำตาลในการเหนี่ยวนำและกีดกันการสร้างไซแลนเนสของ *Bacillus circulans* B6” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- สมใจ ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2542. “การพยากรณ์ผลผลิตการเกษตร.” วารสารการพยากรณ์ผลผลิตการเกษตร. 14(4) : 1-8.
- Alam, M., Gomes, I., Mohiuddin, G. and Hoq, M.M. 1994. “Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses.” **Enzyme and Microbial Technology**. 16 : 298-302.
- Bailey, M.J. and Poutanen, K. 1989. “Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*.” **Applied Microbiology and Biotechnology**. 30 : 5-10.
- Bailey, M.J., Plus, J. and Poutanen, K. 1991. “Purification and properties of two xylanases from *Aspergillus oryzae*.” **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 13 : 380-389.
- Bailey, M.J., Biely, P. and Poutanen, K. 1992. “Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity.” **Journal of Biotechnology**. 23 : 257-270.
- Bailey, M. J. and Viikari, L. 1993. “Production of xylanase by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan based media.” **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 9 : 80-84.
- Bajpai, P. 1999. “Application of enzymes in the pulp and paper industry.” **Biotechnology progress**. 15 : 147-157.

- Balakrishnan, H., Srinivasan, M.C. and Rele, M.V. 1997. "Extracellular protease activities in relation to xylanase secretion in an alkalophilic *Bacillus* sp." **Biotechnology Letter**. 18 : 599-601.
- Barber, S. and Benedito de Barder, C. 1974. "Basic and applied research needs for optimizing utilization of rice bran as food and feed." **Proceedings of the rice by-product utilization international conference, Institute of Agrochemistry and Food Technology, Valencia**. 4 : 1-99.
- Bastawde, K.B. 1992. "Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action." **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 8 : 353-368.
- Bastawde, K.B., Puntambekar, U.S. and Gokhale D.V. 1994. "Optimization of cellulasfree xylanase production by a novel yeast strain " **Journal of Industrial Microbiology**. 13 : 220-224.
- Bataillon, M., Cardinali, A.P.N. and Duchiron, F. 1998. "Production of xylanases from a newly isolated alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp." **Biotechnology Letter**. 20 : 1067-1071.
- Beg, O.K., Bhushan, B., Kapoor, M. and Hoondal, G.S. 2000a. "Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3." **Journal of Industry Microbiology and Biotechnology**. 24 : 396-402.
- Beg, O.K., Kapoor, M., Mahajan, L. and Hoondal, G.S. 2001. "Microbial xylanases and their industrial applications : a review." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 56 : 326-338.
- Beguin, P. 1990. "Molecular biology of cellulose degradation." **Annual Reviews of Microbiology**. 44 : 296-305.
- Belancic, A., Scarpa, J., Peirano, A., Diaz, R., Steiner, J. and Eyzayuirre, J. 1995. "*Penicillium purpurogenum* produces several xylanases; purification and properties of two of the enzymes." **Journal of Biotechnology**. 41 : 71-79.
- Biely, P. 1985. "Microbial Xylanolytic System." **Trends in Biotechnology**. 3 : 286-290.

- Biely, P. 1991. "Biotechnological potential and production of xylanolytic systems free of cellulases." 408-416. in. Leatham, G.F. and Himmel, M.E. (eds.) **Advances in Chemistry Serology**. Vol. 460. Washington, D.C. : American Chemical Society.
- Biely, P., Mislovicova, D. and Toman, R. 1985. "Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4- β -xylanases and endo-1,4- β -glucanases." **Analytical Biochemistry**. 144 : 142-146.
- Bisaria, V.S. and Ghose, T.K. 1981. "Biodegradation cellulosic materials : substrate, microorganism enzyme and product." **Enzyme and microbial Technology**. 3 : 90-104.
- Biswas, S.R., Mishra, A.K. and Nanda, G. 1988. "Xylanase and β -xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses." **Biotechnology and Bioengineering**. 31 : 613-616.
- Biswas, S.R., Jana, S.C., Mishra, A.K. and Nanda, G. 1990. "Production, purification, and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*." **Biotechnology and Bioengineering**. 35 : 244-251.
- Buchert, J., Tenkanen, M., Kantelinen, A. and Viikari, L. 1994. "Application of xylanase in the pulp and paper industry." **Bioresource Technology**. 50 : 65-72.
- Campbell, C.K., Davis, C. and Mackenzie, D.W.R. 1985. "Detection and isolation of pathogenic fungi." 329-343. in. Collins, C.H. and Grange, J.M. **Society for Applied Bacteriology Technical**, No. 21. London : Academic Press.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C. and Gooday, G.W. 2001. **Fungi**. 2nd ed. San Diego, California : Academic Press.
- Chahal, D.S. 1985. "Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production." **Applied and Environmental Microbiology**. 49 : 205-210.
- Chandra Raj, K. and Chandra, T.S. 1995. "A cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn 1." **Biotechnology Letter**. 17 : 309-314.

- Christakopoulos, P. Kekos, D., Kolisis, F.N. and Marcris, B.J. 1995. "Controlling simultaneous production of endoglucanase and beta-glucosidase by *Fusarium oxysporum* in submerged culture." **Biotechnology Letter**. 17 (8) : 883-888.
- Christov, L.P., Myburgh, J., O'Neill, F.H., Tonder, A.V. and Prior, B.A. 1999a. "Modification of carbohydrate composition of sulfite pulp by purified and characterized β -xylanase and β -xylosidase of *Aureobasidium pullulans*." **Biotechnology Progress**. 15 : 196-200.
- Clarke, R.T.J., Balley, R.W. and Gaillard, B.D.E. 1969. "Growth of rumen bacteria on plant cell wall polysaccharide." **Journal of General Microbiology**. 56 : 79-86.
- Costa-Ferreira, M., Dias, A., Maximo, C., Morgado, M.J., Sena-Martins, G. and Duarte, J.C. 1994. "Xylanolytic enzyme production by an *Aspergillus niger* isolation." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 44 : 231-242.
- Coughlan, P.M. and Hazlewood, P.M. 1993. " β -1,4-D-xylan-degradating enzyme systems: biochemistry, molecular biology and application." **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 17 : 259-289.
- Daigneault-Sylvestre, N. and Kluepfel, D. 1979. "Method of the rapid screening of cellulolytic streptomycetes and their mutants." **Canadian Journal of Microbiology**. 25 : 858-860.
- Dey, D., Hing, J., Shendye, A. and Rao, M. 1992. "Purification and properties of extracellular endoxylanase from alkalophilic *Bacillus* sp." **Canadian Journal of Microbiology**. 38 : 436-442.
- Doppelbauer, R., Esterbauer, H., Steiner, W., Lafferty, R.M. and Steinmuller, H. 1987. "The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei*." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 26 : 485-494.
- Dubeau, H., Chahal, D.S. and Ishaque, M. 1987. "Xylanase of *Chaetomium cellulolyticum*: its nature of production and hydrolytic potential." **Biotechnology Letters**. 9 : 275-280.
- Fernandez-Espinar, M.T., Ramon, D., Pinaga, F. and Valles, S. 1992. "Xylanase production by *Aspergillus nidulans*." **FEMS Microbiology Letters**. 91 : 91-96.

- Forage, A.J. and Righelato, R.C. 1979. "Biomass from carbohydrates." 289-319. in Rose, A.H. (ed.) **Microbial Biomass**. New York : Academic Press.
- Gamerith, G., Groicher, R., Zeilinger, S., Herzog, P. and Kubicek, C.P. 1992. "Cellulase-poor xylanases produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on hemicellulose substrates." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 38 : 315-322.
- Gascoigne, J. and Gascoigne, M.M. 1960. "The xylanase of *Fusarium roseum*." **Journal of General Microbiology**. 22 : 242-248.
- Gasper, A., Cosson, T. and Thonart, P. 1997. "Study on the production of a xylanolytic complex from *Penicillium caneseens* 10-10c." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 67 : 45-58.
- Ghosh, M. and Nanda, G. 1994. "Physiological studies on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzyme in *Aspergillus sydowii* MG 49." **FEMS Microbiology Letters**. 117 : 151-156.
- Gilbert, M., Breuil, C. and Saddler, J.N. 1992. "Characterization of the enzymes present in the cellulase system of *Thielavia terrestris* 255B." **Bioresource Technology**. 39 : 147-154.
- Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W. and Esterbauer, H. 1992. "Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 36 : 701-707.
- Gomes, J., Purkarthofer, H., Hayn, M., Kapplmuller, J., Sinner, M. and Steiner, W. 1993. "Production of a high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 39 : 700-707.
- Gomes, J., Gomes, I., Kreiner, W., Esterbauer, H., Sinner, M. and Steiner, W. 1993a. "Production of high level of cellulase-free and thermostable xylanase by a wild strain of *Thermomyces lanuginosus* using beechwood xylan." **Journal of Biotechnology**. 30 : 283-297.

- Gomes, D.J., Gomes, J. and Steiner, W. 1994a. "Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme." **Journal of Biotechnology**. 37 : 11-22.
- Gorbacheva, I.V. and Rodionova, N.V. 1977. "Studies on xylan degrading enzymes.I. Purification and characterization of endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* str.14." **Biochemical Biophysical Acta**. 484 : 79-93.
- Gubtiz, G.M., Lisching, T., Stebbing, D. and Saddler, J.N. 1997. "Enzymatic removal of hemicellulose from dissolving pulps." **Biotechnology Letter**. 19 : 491-495.
- Gutierrez-Correa, M. and Tengerdy, R.P. 1998. "Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugarcane bagasse." **Biotechnology Letter**. 20 : 45-47.
- Haapala, R., Linko, S., Parkkinen, E. and Suominen, P. 1994. "Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam." **Biotechnology Techniques**. 8 : 401-406.
- Haapala, R., Parkkinen, E., Soominer, P. and Linko, S. 1996. "Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase with nylon-web immobilized and Free *Trichoderma reesei*." **Enzyme and Microbial Technology**. 18 : 495-501.
- Haarhoff, J., Moes, C.J., Cerff, C., Van Wyk, W.J., Gerischer, G. and Janse, B.J.K. 1999. "Characterization and biobleaching effect of hemicellulose produced by thermophilic fungi." **Biotechnology Letters**. 21 : 415-420.
- Haltrich, D., Preib, M. and Steiner, W. 1993. "Optimization of a culture medium for increased xylanase production a wild strain of *Schizophyllum commune*." **Enzyme and Microbial Technology**. 15 : 854-860.
- Haltrich, D., Laussamayer, B. and Steiner, W. 1994. "Xylanase formation by *Sclerotium rolfsii* : Effect of growth substrates and development of a culture medium using statistically designed experiments." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 42 : 522-530.

- Haltrich, D. and Steiner, W. 1994. "Formation of xylanase by *Schizophyllum commune*: effect of medium components." **Enzyme and Microbial Technology**. 16 : 229-235.
- Haltrich, D., Sebesta, B. and Steiner, W. 1995. "Introduction of xylanase and cellulase in *Schizophyllum commune*." 305-318. in Saddler, J.N. and Penner, M.H. (eds.) **Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates**. Vol. 618. Washington : American Chemical Society.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, D.K., Steiner, W. and Zupancic, S. 1996. "Production of fungal xylanases." **Bioresource Technology**. 58 : 137-161.
- ✓ Hawksworth, D.L. 1991. "The fungal dimension of biodiversity : magnitude, significance, and conservation." **Mycological Research**. 95 : 641-655.
- Hoq, M.M., Hempel, C. and Deckwer, W.D. 1994. "Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9 : Effect of agitation and medium components on production." **Journal of Biotechnology**. 37 : 49-58.
- Hoq, M.M. and Deckwer, W.D. 1995. "Cellulose-free xylanase by thermophilic fungi : a comparison of xylanase production by two *Thermomyces lanuginosus* strains" **Applied Microbiology and Biotechnology**. 43 : 604-609.
- ✓ Hrmová, M., Biely, P. and Vršanská, M. 1986. "Specificity of cellulase and β -xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414." **Archives of Microbiology**. 144 : 307-311.
- ✓ Hrmová, M., Biely, P. and Vršanská, M. 1989. "Cellulose and xylan-degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*." **Enzyme and Microbial technology**. 11 : 610-616.
- Ishihara, M., Tawata, S. and Toyama, S. 1997. "Purification and some properties of a thermostable xylanase from thermophilic fungus strain HG-1." **Journal of fermentation and Bioengineering**. 83 : 478-480.

- Iwamoto, T., Sasaki, T. and Inaoka, M. 1973. "Hemicellulase : Their occurrence, purification, properties and mode of action." **Advance Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.** 32 : 277-352.
- Jain, A. 1995. "Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS 68." **Process Biochemistry.** 30 : 705-709.
- Joglekar, A.V. and Karanth, N.G. 1984. "Studies on cellulase production by a mutant *Penicillium funiculosum* UV-49." **Biotechnology and Bioengineering.** 26 : 1079-1084.
- John, M., Schmidt, B. and Schmidt, J. 1979. "Purification and some properties of five endo-1,4- β -D-xylosidase and a β -D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*." **Canadian Journal of Biochemistry.** 57 : 125-135.
- Johnson, K.G., Silva, M.C., Mackenzie, C.R., Schnedier, H. and Fontana, J.D. 1989. "Microbial degradation of hemicellulosic materials." **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 20/21 : 245-258.
- Kang, S.W., Kim, S.W. and Lee, J.S. 1995. "Production of cellulase and xylanase in a bubble column using immobilized *Aspergillus niger* KKS." **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 53 : 101-106.
- Kendrick, B., editor. 1979. **The Whole Fungus.** Vol. 2. Ottawa : National Museums of Canada and the Kananaskis Foundation.
- Khan, A.W., Tremblay, D. and LeDuy, A. 1986. "Assay of xylanase and xylosidase activities in bacterial and fungal cultures." **Enzyme and Microbial technology.** 8 : 373-377.
- Khanongnuch, C., Lumyong, S., Ooi, T. and Kinoshita, S. 1999. "A non-cellulase producing strain of *Bacillus subtilis* and its potential use in pulp biobleaching." **Biotechnology Letter.** 21 : 61-63.
- Khasin, A., Aichanati, I. and Shoram, Y. 1994. "Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6." **Applied and Environmental Microbiology.** 59(6) : 1725-1730.

- Khowala, S., Mukherjee, M. and Sengupta, S. 1988. "Carboxymethyl xylan-a specific substrate directly differentiating backbone-hydrolysing and side-chain-reacting β -D-(1 4)-xylanases of the mushroom *Termitomyces clypeatus*." **Enzyme and Microbial technology**. 10 : 563-567.
- Kirk, P.M., Cannon, P.E., David, J.C. and Stalpers, J.A. 2001. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 9th** (ed.) CAB Publishing; UK.
- Kormelink, F.J.M., Searle-van Leeuwen, M.J.F., Wood, T.M. and Voragen, A.G.J. 1993. "Purification and characterization of three endo-(1,4)- β -xylanase and one β -xylosidase from *Aspergillus awamori*." **Journal of Biotechnology**. 27 : 249-265.
- Kuhad, R.C., Manchanda, M. and Singh, A. 1998. "Optimization of xylanase production by a hyper-xylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*." **Process Biochemistry**. 33 : 641-647.
- Kuhad, R.C. 1999. "Lignocellulose biotechnology : Current and future prospects." **Critical Reviews in Biotechnology**. 13 : 151-172.
- Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. 1999. "Molecular and biotechnological aspects of xylanases." **FEMS Microbiology Reviews**. 23 : 411-456.
- Kusakabe, L., Yasui, T. and Kobayashi, T. 1966. "Studies on xylanase of system of *Streptomyces*. Part I. Some properties of extracellular xylanase from *Streptomyces*." **Agricultural Biology and chemistry**. 29 : 520-524.
- Lee, M.J. 1992. **Biochemical Engineering**. Eaglewood Cliffs : Prentice-Hall.
- Lejeune, R. and Baron, G.V. 1995. "Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 43 : 249-258.
- Lemos, J.L.S., Fontes Almeida de Carolina, M. and Nei Pereira, Jr. "Xylanase production by *Aspergillus awamori* and the influence of different nitrogen sources." [Online]. Available : http://www.ct.ornl.gov/symposium/22nd/index_files/poster06.32.htm. 2003.

- Lenartovicz, V., Marques de Souza, C.G., Moreira, F.G. and Peralta, R.M. 2003. "Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*." **Process Biochemistry**. 38 : 1775-1780.
- Lillie. 1948. **Histopathologic technique**. Blakiston, Philadelphia and Toronto.
- Lischinig, T., Purkarthofer, H. and Steiner, W. 1993. "Thermostability of endo- β -xylanase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*." **Biotechnology Letter**. 15 : 411-414.
- Liu, W., Zhu, W., Lu, Y., Kong, J. and Ma, G. 1998. "Production, Partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL 409." **Process Biochemistry**. 33 : 331-326.
- Liu, W., Lu, Y. and Ma, G. 1999. "Induction and glucose repression of endo- β -xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL 409." **Process Biochemistry**. 34 : 67-72.
- Lonsane, B.K., Saucedo-Castanedo, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzalez, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M. and Krishnaiah, M.M. 1992. "Scale up strategies for solid state fermentation system." **Process Biochemistry**. 27 : 259-273.
- Maheshwari, R. and Kamalam, P.T. 1985. "Isolation and culture of a thermophilic fungus, *Melanocarpus albomyces*, and factors influencing the production and activity of xylanase." **Journal of General Microbiology**. 131 : 3017-3027.
- Mandels, M. and Weber, J. 1969. "The production of cellulase" 391-398. in Gould, R.E. (ed.) **Advances in Chemistry Serology**. Washington, D.C. : American Chemistry Society.
- McCarthy, A.J. 1987. "Lignocellulose-degradation actinomyces." **FEMS Microbiology Reviews**. 46 : 145-163.
- McCleary. 1992. "Measurement of endo-1,4- β -D-xylanase." **Progress in Biotechnology**. 7 : 161-169.
- Milagres, A.M.F. and Duran, N. 1992. "Xylanolytic enzymes from *Penicillium janthinellum* and its applications in bleaching of pulp." **Progress in Biotechnology**. 7 : 539-545.

- Miller, G.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." **Analytical Chemistry**. 31 : 426-428.
- Montenecourt, B.S. and Eveleigh, D.E. 1977. "Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production." **Applied and Environmental Microbiology**. 134 : 777-782.
- Nakanishi, K., Yasui, T. and Kobayashi, T. 1976. "A preliminary experiment on the xylanase production by *Streptomyces* sp." **Journal of Fermentation and Technology**. 65(1) : 1-6.
- Nummi, M., Perrin, J.M., Niku-Paavola, M.L. and Enari, T. M. 1985. "Measurement of xylanase activity with insoluble xylan substrate." **Biochemistry Journal**. 226 : 617-620.
- Ohno, N., Fujiwara, K., Shinoyama, H. and Fujii, T. 1944. "Xylanase produced by a Peculiar imperfect fungus, *Fusidium* sp. BX-1." **Enzyme and Microbial technology**. 72(1) : 13-19.
- Okai, N., Fukasaku, M., Kaneko, J., Tomita, T., Muramotu, K. and Kamio, Y. 1998. "Molecular properties and activity of a carboxyl-terminal truncated form of xylanase 3 from *Aeromonas caviae* W-61." **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 62 : 1560-1567.
- Okeke, B. C. and Obi, S. K. C. 1993. "Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an *Arthrographis* species." **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 9 : 345-349.
- Paice, M.G., Jurask, L., Carpenter, M.R. and Smillie, L.H. 1978. "Production, characterization and partial amino acid sequence of xylanase A. from *Schizophyllum commune*." **Applied and Environmental Microbiology**. 36 : 802-808.
- Panda, T. 1989. "Simulation of shake flask conditions in a bioreactor for the biosynthesis of cellulase and xylanase by a mixed culture of *Trichoderma reesei* D 1-6 and *Aspergillus wentii* Pt 2804." **Process Biochemistry**. 104-108.

- Paunescu, E., Ciolac-Negocseu, A. and Pisica, G. 1964 "The effect of Tween 80 and penicillin on the physiochemical properties of the cell wall in mycobacteria " **Populare Romine Studii Cercetari Biochim.** 7 : 83-89.
- Pinaga, F., Fernandez-Espinar, M.T., Valles, S. and Ramon, D. 1994. "Xylanase production in *Aspergillus nidulans*: induction and carbon catabolite repression." **FEMS Microbiology Letters.** 115 : 319-324.
- Pitt, J. 1980. **The Genus Penicillium.** New York : Academic Press.
- Pou-Llinas, J. and Driguez, H. 1987. "D-Xylose as inducer of the xylan-degrading enzyme system in the yeast *Pullularia pullulans*" **Applied Microbiology and Biotechnology.** 27 : 134-138.
- Puchart, V., Katapodis, P., Biely, P., Kremnický, L., Christakopoulos, P., Vrsanska, M., Kekos, D., Macris, B.J. and Bhat, M.K. 1999. "Production of xylanase, mannanase, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*." **Enzyme and Microbial technology.** 24 : 355-361.
- Purkharthofer, H., Sinner, M. and Steiner, W. 1993a. "Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* : Optimization of production in submerged and solid-state culture." **Enzyme and Microbial Technology.** 15 : 677-682.
- Purkharthofer, H., Sinner, M. and Steiner, W. 1993b. "Effect of shear rate and culture pH on the production of xylanase by *Thermomyces lanuginosus*." **Biotechnology Letters.** 15 : 405-410.
- Purkharthofer, H. and Steiner, W. 1995. "Induction of endo- β -xylanase in the fungus *Thermomyces lanuginosus*." **Enzyme and Microbial Technology.** 17 : 114-118.
- Ragauskas, A.J., Poll, K.N. and Cesternino, A. 1994. "Effect of xylanase pretreatment procedures on non-chlorine bleaching." **Enzyme and Microbial Technology.** 16 : 492-495.

- Raimbault, M. and Alazard, D. 1980. "Culture method to study fungal growth in solid fermentation." **European Journal of Applied Microbiology.** 9 : 199-209.
- Raj, K.C. and Chandra, T.S. 1996. "Purification of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fisheri* Fxn 1." **FEMS Microbiology Letters.** 15 : 457-461.
- Raper, K.B. and Thom, C. 1949. **A. manual of the Penicillia.** Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.
- Raper, K.B. and Fennell, D.I. 1965. **The Genus Aspergillus.** Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.
- Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L. and Lertwerawat, Y. 1998. "Cellulosome structure of thermophilic cellulolytic and alkaliphilic xylanolytic microorganism." **Final report : NRCT-JSPS large-scale cooperative research program in the field of biotechnology, Submitted to National Research Council of Thailand.** 33-40.
- Reese, E.T. and Maguire, A. 1969. "Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms." **Applied Microbiology.** 17(2) : 242-245.
- Roby, J.F. and Whelan, W.F. 1972. "Reducing values methods for maltodextrins I. Chain-length independence of alkaline 3,5-dinitro-salicylate and chain length independence of alkaline copper." **Analytical Biochemistry.** 45 : 510-516.
- Rotto, M., Poutanen, K. and Viikari, L. 1992. "Production of xylanolytic enzymes by an alkalitolerant *Bacillus circulans* strain." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 37 : 470-473.
- Royer, J.C. and Nakas, J.P. 1989. "Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*." **Enzyme and Microbial Technology.** 11 : 405-410.
- Royer, J.C. and Nakas, J.P. 1990. "Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum*." **Applied and Environmental Microbiology.** 56 : 2535-2539.

- Sachslehner, A., Nidetzky, B., Kulbe, K.D. and Haltrich, D. 1998. "Induction of mannanase, xylanase and endoglucanase activities in *Sclerotium rolfsii*" **Applied and Environmental Microbiology**. 64 : 594-600.
- Saraswat, V. and Bisaria, V.S. 1997. "Biosynthesis of xylanolytic and xylan-debranching enzymes in *Melanocarpus albomyces* IIS 68." **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 83 : 352-357.
- Sengupta, S., Khowala, S. and Goswami, P.K. 1987. "Assay of endo- β -D-xylanase activity with a soluble *O*-(carboxymethyl) derivative of larch-wood D-xylan." **Carbohydrate Research**. 14 : 341-353.
- Senior, D.J., Mayers, P.R. and Saddler, J.N. 1989a. "Production and purification of xylanases" 641-654. in Lewis, N.G. and Paice, M.G. (eds.) **Biogenesis and Biodegradation of Plant Cell Wall Polymers**. ACS Symp. Series, Vol. 399. Washington : American Chemical Society.
- Senior, D.J., Mayers, P.R. and Saddler, J.N. 1989b. "Xylanase production by *Trichoderma harzianum* E58." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 32 : 137-142.
- Senior, D.J., Hamilton, J. and Bernier, R.L. Jr. 1992. "Use of *Streptomyces lividans* xylanase for biobleaching of kraft pulps." 555-557. In Visser, J., Beldman, G., vanSomeren, M.A.K. and Voragen, A.G.J. (eds.) **Xylans and xylanases**. Amsterdam : Elsevier.
- Siendenberg, D., Gerlach, S.R., Weigel, B., Schugerl, K., Giuseppin, M.L.F. and Honik, J. 1997. "Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in stirred tank and airlift tower loop reactors : The influence of stirrer speed and phosphate concentration." **Journal of Biotechnology**. 56 : 103-114.
- Singh, A., Kuhad, R.C. and Kumar, M. 1995. "Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*." **Enzyme and Microbial Technology**. 17 : 551-553.
- Singh, S., Pillay, B. and Prior, B.A. 2000. "Thermal stability of β -xylanase produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains." **Enzyme and Microbial Technology**. 26 : 502-508.

- Singh, S., Pillay, B., Dilsook, V. and Prior, B.A. 2000. "Production and properties of hemicellulases by *Thermomyces lanuginosus* strains." **Journal of Applied Microbiology.** 88 : 975-982.
- Singh, S., Reddy, P., Haarhoff, J., Biely, P., Janse, B., Pillay B., Pillay, D. and Prior, B.A. 2000. "Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase." **Journal of Biotechnology.** 81 : 119-128.
- Sjostrom, F. 1981. **Wood Chemistry (fundamentals and application).** New York : Academic Press.
- Smith, D.C. and Wood, T.M. 1991b. "Xylanase production by *Aspergillus awamori*. Development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and β -xylosidase while maintaining low protease production." **Biotechnology and Bioengineering.** 38 : 883-890.
- Stewart, W.D.P. 1980. "Transport and utilization of nitrogen source by algae." 585-586. in Payne, J.W. (ed.) **Microorganisms and Nitrogen Source.** Great Britain : Page Bros Ltd.
- Strobel, G.A. 1963. "A. xylanase system produced by *Diplodia viticola*." **Phytopathology.** 53 : 592-596.
- Sunna, A. and Antranikian, G. 1997. "Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria." **Critical Reviews in Biotechnology.** 17 : 39-67.
- Suumakki, A., Tenkanen, M., Buchert, J. and Viikari, L. 1997. "Hemicelluloses in the bleaching of chemical pulps." **Advances Biochemical engineering and Biotechnology.** 57 : 261-287.
- Takahashi, J., Abekawa, G. and Yamada, K. 1960. "Effect of non-ionic surface active agents on mycelial form and amylase production of *A. niger*." **Nippon Nozei Kogaku Korishi.** 34 : 1043-1045.

- Tang, L.U.L., Yu, E.K.C., Louis-Seize, G.W. and Saddler, J.W. 1987. "Inexpensive, rapid procedure for bulk purification of cellulase-free beta, 1-4, D-xylanase for high specific activity." **Biotechnology and Bioengineering**. 30 : 96-106.
- Toh, Suan EE. 1978. **Xylanase produced by xylan utilizing microorganisms**. International Post-Graduate University Course in Microbiology. Osaka University.
- Tolan, J.S. 1996. "Pulp and paper" 327-338. in Godfrey, T. and West, S. (eds.) **Industrial Enzymology**. London : Macmillan Press
- Tolan, S.J., Olson, D. and Dines, E.R. 1996. "Survey of mill usage of xylanase" 25-35. in Thomas, W.J. and Viikari, L. (eds.) **Enzyme for pulp and paper processing**. Washington : American Chemical Society..
- Trigo, C. and Ball, A.S. 1994. "Production of extracellular enzyme during the solubilisation of xylan lignocellulose materials." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 41 : 124-129.
- Tsujibo, H., Sakamoto, T., Nishino, N., Hasegawa, T. and Inamori, Y. 1990. "Purification and properties of three types of xylanase produced by an alkalophilic actinomycete." **Journal of Applied Bacteriology**. 69 : 398-405.
- Tsujibo, H., Ohtsuki, T., Ito, T., Yamasaki, I., Miyamoto, K., Sugiyama, M. and Inamori, Y. 1997. "Cloning and sequence analysis of gene encoding xylanase and acetyl xylan esterase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520." **Applied and Environmental Microbiology**. 63 : 615-620.
- Tuncer, M., Ball, A.S., Rub, A. and Wilson, M.T. 1999. "Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD 25." **Enzyme and Microbial Technology**. 25 : 38-47.
- Viikari, L., Tenkanen, M., Buchert, J., Ratto, M., Bailey, M., Siika-aho, M. and Linko, M. 1993. "Hemicellulase for industrial application" 113-182. in Saddler, J.N. and Wallingford, C.A.B. (eds.) **Bioconversion of forest and agricultural plant residues**. New York : International public.

- Vodopich and Moore. 2002. **Biology Laboratory Manual**. 5th ed. Boston, Massachusetts : McGraw-Hill Companies, Inc.
- Webster, J. 1980. **Introduction to Fungi**. Cambridge : University Press.
- Whistler, R.L. and Richards, E.L. 1970. "Hemicellulose" 447-469. in Pigman, W. and Horton, D. (eds.) **The carbohydrates**. New York : Academic Press.
- Whistler, R.L. and Masak, E. 1995. "Enzymatic hydrolysis of xylan." **Journal of Animal and Chemistry Society**. 77 : 1241-1243.
- Wiacek-Zychlinska, A., Czajak, J., Jedrychowska, B. and Sawicka-Zukowska, R. 1992. "Production of xylanases by *Chaetomium globosum*" **Progress in Biotechnology**. 7 : 493-496.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. 1988. "Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganism : functions and applications." **Microbiology Reviews**. 52 : 305-517.
- Xiong, H., Weymarn, Nv., Leisola, M. and Turunen, O. 2003. "Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30." **Process Biochemistry**. 1-6.
- Xu, J., Nogawa, M., Okada, H. and Morikawa, Y. 1998. "Xylanase induction by L-sorbose in a fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7." **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 62 : 1555-1559.
- Yu, E.K.C., Tan, L.U.L., Chan, M.K.H., Deschatelets, L. and Saddler, J.N. 1987. "Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*." **Enzyme and Microbial Technology**. 9 : 16-24.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. อาหารสูตร Potato dextrose agar (PDA)

ประกอบด้วย

potato dextrose agar	39	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย potato dextrose agar ในน้ำกลั่น แล้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตร Czapek medium

ประกอบด้วย

โซเดียมไนเตรด	3.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.5	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.01	กรัม
ยีสต์สกัด	5.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนประกอบตามลำดับ ในน้ำกลั่นแล้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารสูตรสำหรับการสร้างเอนไซม์ไซลันเนส

ส่วนประกอบอาหารส่วนที่ 1

ประกอบด้วย

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.0	กรัม
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)	1.4	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.3	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.3	กรัม
ยูเรีย (urea)	0.3	กรัม

โปรติโอสเปปโตน (proteose peptone)	0.23	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบอาหารส่วนที่ 2

ประกอบด้วย

เฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4)	5.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.4	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4.56	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์ (CoCl_2)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

นำส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 1 ละลายน้ำตามลำดับรวมกัน ยกเว้นโคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต จะต้องเตรียมแยกออกมาเนื่องจากจะทำให้ตกตะกอน แล้วนำส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 2 ละลายน้ำตามลำดับรวมกัน หลังจากนั้นนำส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 2 ร้อยละ 0.1 เดิมลงไปในส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 1 ปรับค่าพีเอชเป็น 6.0 จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 1 และเติมผงวุ้นร้อยละ 18 ถึง 20 ต้มวุ้นให้ละลาย และเติมแมกนีเซียมซัลเฟตที่ละลายไว้ตามสัดส่วน คนให้เข้ากันแล้วบรรจุลงขวดอาหารหนึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนของโคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่แยกไว้ไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.25 ไมครอน ที่หนึ่งมาเชื้อแล้ว เมื่ออาหารเย็นลงนำไปผสมกับโคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ผ่านการกรองจุลินทรีย์แล้วตามสัดส่วน ส่วนอาหารเหลวทำการเตรียมเช่นเดียวกัน แต่ไม่เติมวุ้น

4. การเตรียมซีเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ตามวิธีของ Lillie (1948)

เตรียม stock solution :

(A) : สารละลายของกรดซิตริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

(B) : สารละลายของโซเดียมซีเตรต ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.05 โมลาร์

วิธีการ

เติมสารละลายของกรดซิตริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาณ 230 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายของโซเดียมซีเตรต 0.05 โมลาร์ ปริมาณ 270 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนตามวิธีของ Tang *et. al.* (1987)

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย (ร้อยละ)

1. dinitrosalicylic (DNS) acid	1.0
2. phenol	0.2
3. sodium potassium tartrate	20.0
4. sodiumsulphite (Na_2SO_3)	0.05
5. sodiumhydroxide	1.0

วิธีการเตรียม DNS reagent

ละลาย sodiumhydroxide ในน้ำกลั่นตามปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเติม sodium potassium tartrate , phenol และ dinitrosalicylic (DNS) acid ลงในสารละลาย sodiumhydroxide จากนั้นทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในขวดสีชาเก็บไว้ในที่มืด ก่อนใช้ให้เติม sodiumsulphite 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ DNS reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายไซแลนเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในซเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมล พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร แล้วต้มในน้ำเดือด 5 นาที

3. ทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำก๊อก

4. เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไซโลส

(ชุดควบคุม : นำเอนไซม์ไปต้มเดือด 5 นาที แล้วทำการเติมสารละลายไซแลน แต่ไม่บ่ม โดยเติม DNS reagent ลงไปทันที นำไปต้มแล้วทำตามวิธีการข้างต้น)

การคำนวณค่ากิจกรรมไซลानเนส

$$\text{ยูนิตต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลไซโลส} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

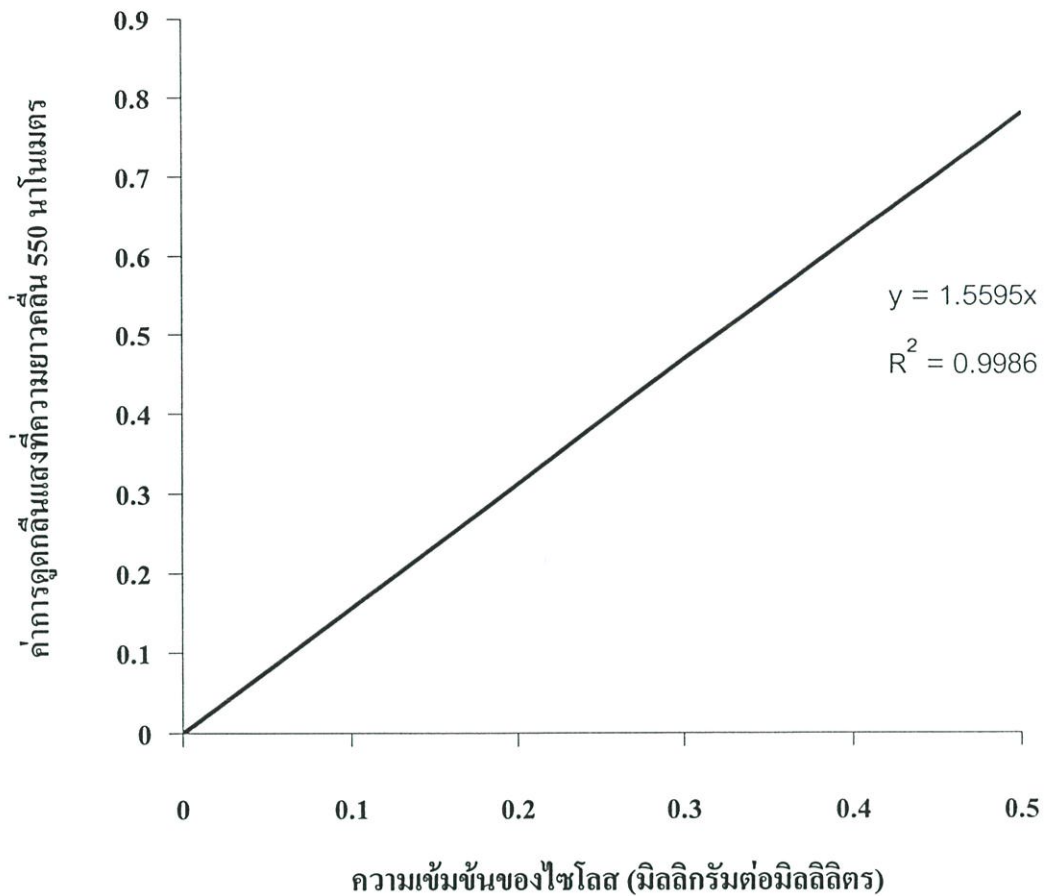
(กรัมต่อ โมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

- 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

1.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลสในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส

1. เตรียม stock solution ของไซโลสให้มีความเข้มข้น 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร (blank ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทน)
3. เติม DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร
4. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบทำให้เย็นด้วยน้ำก๊อก
5. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของไซโลส



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mandels *et. al.* (1969)

เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส (Carboxymethylcellulose; CMC) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ที่ละลายในซีเตรเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมล พีเอช 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ข้อ 1)

การคำนวณค่ากิจกรรมเซลลูเลส

$$\text{ยูนิตต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของกลูโคส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

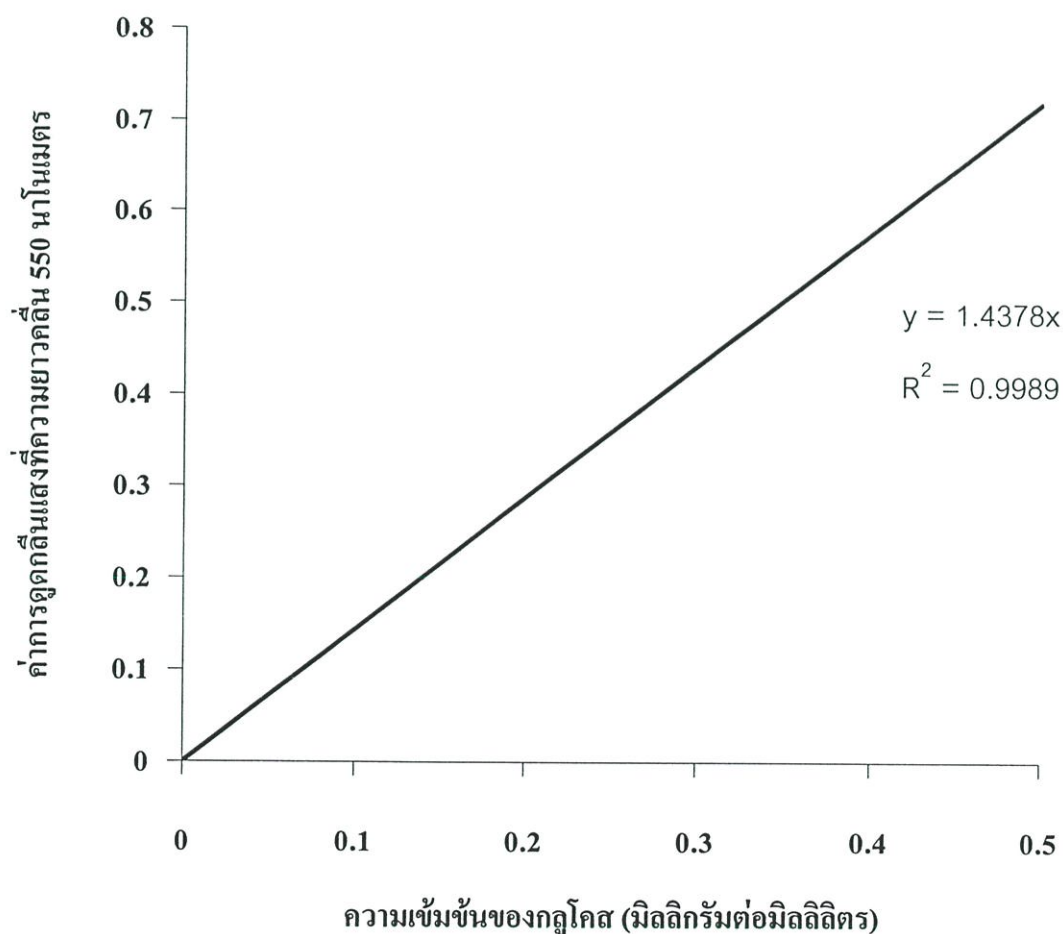
(กรัมต่อโมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

2.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคสในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคส

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส (ข้อ 1.1) แต่ใช้สารละลายกลูโคสแทนสารละลายไซโลส นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกลูโคส



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติโดย Duncan ‘New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 หรือ 0.05

ตารางที่ ค.1 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan ‘New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลันเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ชุดเปรียบเทียบ*	ซังข้าวโพด	เปลือกข้าวโพด	ชานอ้อย	ฟางข้าว
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลันเนส (หน่วยต่อมิลลิเมตร)	32.23 ^c	60.38 ^a	54.56 ^b	32.86 ^c	0.59 ^d

ชุดเปรียบเทียบ* หมายถึง ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ใช้ไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ ค.2 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan ‘New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของความเข้มข้นของซังข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลันเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27

ความเข้มข้นของซังข้าวโพด (ร้อยละ)	ชุดเปรียบเทียบ*	1	2	3	4	5
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลันเนส (หน่วยต่อมิลลิเมตร)	60.94 ^c	112.13 ^c	120.54 ^b	127.24 ^a	119.77 ^b	99.12 ^d

ชุดเปรียบเทียบ* หมายถึง ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ใช้ไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ ค.3 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27

ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์	ชุดเปรียบเทียบ	(NH ₄) ₂ HPO ₄	NaNO ₃	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	60.94 ^d	191.60 ^a	174.05 ^c	184.60 ^b	175.70 ^c

ชุดเปรียบเทียบ* หมายถึง ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ใช้ไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ ค.4 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ของความเข้มข้นของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ((NH₄)₂HPO₄) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27

ความเข้มข้นของ (NH ₄) ₂ HPO ₄ (กรัมของไนโตรเจนต่อลิตร)	ชุดเปรียบเทียบ	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	69.76 ^d	150.25 ^c	156.61 ^{bc}	173.89 ^a	170.34 ^a	160.05 ^b

ชุดเปรียบเทียบ* หมายถึง ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ใช้ไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ ค.5 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ของค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27

ค่าพีเอชเริ่มต้น	ชุดเปรียบเทียบ	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	111.69 ^c	206.73 ^b	207.25 ^b	218.07 ^a	204.11 ^b	201.25 ^b

ชุดเปรียบเทียบ* หมายถึง ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ใช้ไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ ค.6 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของความเข้มข้นของสารละลายแร่ธาตุผสมที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27

ความเข้มข้นของ สารละลายแร่ธาตุผสม (ร้อยละ)	ชุดเปรียบเทียบ*	0	0.05	0.10	0.15	0.20
ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	141.81 ^b	210.77 ^a	215.03 ^a	215.62 ^a	215.20 ^a	219.01 ^a

ชุดเปรียบเทียบ* หมายถึง ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ใช้ไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ ค.7 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan 'New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของความเข้มข้นของ Tween 80 ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27

ความเข้มข้นของ Tween 80 (ร้อยละ)	ชุดเปรียบเทียบ*	0	0.1	0.2	0.3	0.4
ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	114.37 ^d	187.97 ^b	190.84 ^{ab}	195.55 ^a	167.84 ^c	164.55 ^c

ชุดเปรียบเทียบ* หมายถึง ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ใช้ไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ ค.8 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดย Duncan ‘New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสและค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราสายพันธุ์ที่ 27 กับ *A. foetidus* TISTR 3159 ในอาหารเหลวสูตรที่มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

สภาวะสำหรับการเจริญของเชื้อรา	ชุดเปรียบเทียบ*	เชื้อราสายพันธุ์ที่ 27	<i>A. foetidus</i> TISTR 3159
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	178.59 ^c	236.53 ^a	211.90 ^b
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	0.21 ^b	0.22 ^b	0.28 ^a

ชุดเปรียบเทียบ* หมายถึง ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตรที่มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 หรือ 0.05

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 หรือ 0.05

ประวัติผู้เขียน

นางสาวเรวดี ปรีบัว เกิดเมื่อวันที่ 19 เมษายน 2522 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาวិทยาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ปีการศึกษา 2542