การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลน

SCREENING OF EFFECTIVE XYLAN DEGRADING MICROORGANISMS

ปรางประไพ รอดบำเรอ

PRANGPRAPAI RODBUMRER

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-927-3

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลน

SCREENING OF EFFECTIVE XYLAN DEGRADING MICROORGANISMS

ป440-ป.449

T048941

ปรางประไพ รอดบำเรอ

PRANGPRAPAI RODBUMRER

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-927-3

เลขหมู่..........
เลขทะเบียน 48941
วัน, เดือน, ปี 13 ม.ค. 2547

b..........
i..........

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SCREENING OF EFFECTIVE XYLAN DEGRADING MICROORGANISMS

PRANGPRAPAI RODBUMRER

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
2003

ISBN 974-324-927-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2003

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT' S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	**การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลน**
นักศึกษา	**นางสาวปรางประไพ รอดบำเรอ**
รหัสประจำตัว	**44065216**
ปริญญา	**วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต**
สาขาวิชา	**เทคโนโลยีชีวภาพ**
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	**รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์**
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	**รศ. อรไท สุขเจริญ**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนโดยใช้ธูปฤาษีเป็นสับสเตรท เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เปรียบเทียบกับ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159, *Aspergillus foetidus* TISTR 3173 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 พบว่าจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสคือ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ซึ่งสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ประกอบด้วยทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 และพีเอชเริ่มต้น 7.0 สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ประกอบด้วยยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 และพีเอชเริ่มต้น 6.0

จากการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 พบว่าภายหลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 50 ถึง 60 จากนั้นนำมาทำการไดอะไลซิส และผ่านการอัลตราฟิวเตรชัน เอนไซม์ไซลาเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 62.25 เท่า โดยมีกิจกรรมจำเพาะ 899.50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 50 องศาเซลเซียส และ 4.0 ตามลำดับ เอนไซม์ไซลาเนสมีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้าง (2.6 ถึง 9.0) และมีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทและค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ oat spelt xylan เป็นสับสเตรท เท่ากับ 476.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ และจากการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 0.80 เท่า ภายหลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 60 ถึง 70 จากนั้นนำมาทำการไดอะไลซิส และผ่านการอัลตราฟิวเตรชัน โดยมีกิจกรรมจำเพาะ 4.05 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สำหรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 50 องศาเซลเซียส และ 4.0 ตามลำดับ เอนไซม์ไซลาเนสมีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้าง (2.6 ถึง 9.0) และมีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทและค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้ oat spelt xylan เป็นสับสเตรท เท่ากับ 14.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 303.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Screening of Effective Xylan Degrading Microorganism
Student	Miss Prangprapai Rodbumrer
Student ID.	44065216
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Oratai Sukcharoen

ABSTRACT

Screening of effective xylan degrading microorganisms was carried out using Narrow-leaved cat tail plant (*Typha angustifolia* Lin) as a substrate for xylanase production in solid state fermentation and compared the efficiency with *Aspergillus foetidus* TISTR 3159, *Aspergillus foetidus* TISTR 3173 and *Fusarium moniliforme* TISTR 3175. The result showed that the effective xylan degrading microorganisms were *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 and *Fusarium moniliforme* TISTR 3175. The suitable medium for enzyme production by *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 was 1% tryptone as nitrogen source, 70% initial moisture content and initial pH 6.0 wheras the suitable medium for enzyme production by *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 contained 1% yeast extract as nitrogen source, 70% initial moisture content and initial pH 7.0.

Some properties of xylanase from *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 and *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 were studied. After precipitation with ammonium sulfate (50% to 60% saturation), dialysis and ultrafiltration, the xylanase from *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 was purified 62.25 times. The specific activity was 899.50 U/mg protein. The optimal temperature and pH for xylanase activity were 50°C and 4.0, respectively. The xylanase was stable at temperature below 40°C and at pH range between 2.6 and 9.0. The K_m and V_{max} values of xylanase with oat spelt xylan as substrate were 454.55 mg/ml and 12,500.00 µg/ml/min, respectively. After precipitation with ammonium sulfate (60% to 70% saturation), dialysis and ultrafiltration, the xylanase from *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 was purified 0.80 times. The specific activity was 4.05 U/mg protein. The optimal temperature and pH for xylanase activity were 50°C and 4.0, respectively. The xylanase was stable at temperature below 40°C and at pH range between 2.6 and 9.0.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The K_m and V_{max} values of xylanase with oat spelt xylan as substrate were 14.58 mg/ml and 303.03 μg/ml/min, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ แก้ไขข้อบกพร่อง และความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ อรไท สุขเจริญ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและใคร่ขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ดร.ปราโมทย์ ศิริโรจน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ดวงใจโอชัยกุล คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเสนอแนะ เพิ่มเติม แก้ไขให้วิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ชมาภรณ์ ธงเพ็ง พี่ทวีสิริ มาลาพันธุ์ พี่สาทินี ซื่อตรง พี่จิราภรณ์ นิลฉวี พี่สายพิณ บุญเกิด อรอุมา สวัสดิ์กิจ และพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ที่มีส่วนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว รวมถึงผู้ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง และให้การสนับสนุน เข้าใจ และเป็นกำลังใจให้สำเร็จการศึกษามาโดยตลอด

ปรางประไพ รอดบำเรอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย......I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ......III

กิตติกรรมประกาศ......V

สารบัญ......VI

สารบัญตาราง......XI

สารบัญรูป......XIV

บทที่ 1 คำนำ......1

1.1. ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย......1

1.2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย......2

1.3. ขอบเขตของงานวิจัย......2

1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ......2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง......3

2.1. การย่อยสลายไซแลน......3

2.1.1. การย่อยสลายไซแลนด้วยสารเคมี......3

2.1.2. การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์......4

2.2. แหล่งของเอนไซม์ไซลาเนส......8

2.3. อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส......11

2.4. ความคงตัวต่อพีเอชและอุณหภูมิของเอนไซม์ไซลาเนส......13

2.5. ความจำเพาะต่อสับสเตรท......14

2.6. ธูปฤาษี......14

2.6.1. ลักษณะทั่วไปของธูปฤาษี......15

2.7. การหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง......16

2.7.1. ข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง......18

2.8. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส......20

2.8.1. ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน......20

2.8.2. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส......22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.8.3. ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส....22

2.8.4. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส....24

2.8.5. ผลของเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส....25

2.8.6. ผลของสารยังยั้งและสารเหนี่ยวนำต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส....25

2.8.7. ผลของทวีน 80 (tween 80) ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส....28

2.9. การทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์....28

2.10. การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในระดับอุตสาหกรรม....29

2.10.1. การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการฟอกสีเยื่อกระดาษ เพื่อกำจัดลิกนินและลดการใช้คลอรีน....29

2.10.2. การผลิตและการนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์ในการไฮโดรไลซิสของเสียทางการเกษตร....30

2.10.3. การใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเพื่อแก้ปัญหาด้านพลังงานและการขาดแคลนอาหาร....31

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง....32

3.1. อุปกรณ์....32

3.2. สารเคมี....33

3.2.1. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ....33

3.2.2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์....34

3.2.3. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กลูโคซามีน....34

3.2.4. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีน....35

3.3. เชื้อจุลินทรีย์....35

3.4. การเตรียมสับสเตรท....35

3.5. การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนจากธรรมชาติ....35

3.6. การเตรียมเชื้อเริ่มต้น....38

3.6.1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย....38

3.6.2. การเตรียมเชื้อรา....38

3.7. การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง....39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.8. การสกัดเอนไซม์.....39
3.9. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....39
3.9.1. ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....39
3.9.2. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....39
3.9.3. ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....40
3.10. ผลการ pre-treatment ธูปฤาษี.....40
3.10.1. การ pre-treatment ธูปฤาษี.....40
3.10.2. การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากสับสเตรทที่ผ่านการ pre-treatment.....40
3.11. ผลการเปรียบเทียบสับสเตรทอื่นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....40
3.12. ผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งกับสภาวะการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบอาหารเหลว.....41
3.13. ผลของการเก็บรักษาเอนไซม์ไซลาเนสในรูปของสารละลาย.....41
3.14. การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.....41
3.14.1. การสกัดกลูโคซามีนจากตัวอย่าง.....41
3.14.2. การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Morgan-Elson (Van de Loo. 1976).....42
3.15. การทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial Purification).....42
3.16. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส.....43
3.16.1. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส.....43
3.16.2. พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส.....43
3.16.3. ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิ.....43
3.16.4. ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่อพีเอช.....43
3.16.5. การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์ไซลาเนส.....44
3.16.6. การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์เซลลูเลส.....44
3.17. การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์....45

4.1. ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนจากธรรมชาติ....45

4.2. ผลของสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง....50

4.2.1. ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส....50

4.2.2. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส....51

4.2.3. ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส....56

4.3. ผลการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากธูปฤาษีที่ผ่านการ pre-treatment....60

4.4. ผลของการเปรียบเทียบสับสเตรทอื่นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส....63

4.5. ผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งกับสภาวะการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบอาหารเหลว....68

4.6. ผลการเก็บรักษาเอนไซม์ไซลาเนสในรูปของสารละลาย....70

4.7. ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส....73

4.8. ผลการทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน....75

4.9. ผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส....77

4.9.1. ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส....77

4.9.2. ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส....80

4.9.3. ผลของความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิ....82

4.9.4. ผลของความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่พีเอชต่าง ๆ....84

4.9.5. การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์ไซลาเนส....86

4.9.6. การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์เซลลูเลส....89

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย....92

บรรณานุกรม....94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก......107

ประวัติผู้เขียน......134

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 องค์ประกอบของวัดสุเหลือทิ้งทางการเกษตรบางชนิด..4

2.2 ตัวอย่างจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส..8

2.3 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ.........11

2.4 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ต่ออุณหภูมิและพีเอช......13

2.5 ค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทของไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ.. 15

2.6 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง................................... 17

3.1 แหล่งที่เก็บตัวอย่างดิน..36

3.2 ลักษณะของตัวอย่างดินแหล่งต่าง ๆ..37

4.1 ขนาดโคโลนี ขนาดวงใส และประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากสภาพธรรมชาติ...45

4.2 การเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95......... 53

4.3 การเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISRT 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95...54

4.4 การเปรียบเทียบผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.....................57

4.5 การเปรียบเทียบผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95......58

4.6 การเปรียบเทียบผลการ pre-treatment สับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95..61

4.7 การเปรียบเทียบผลการ pre-treatment สับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95...61

4.8 อัตราส่วนระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส..64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.9 การเปรียบเทียบผลของการเปรียบเทียบสับสเตรทอื่นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95……………....…………………………………...……………………............65

4.10 การเปรียบเทียบผลของการเปรียบเทียบสับสเตรทอื่นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95……………....……………………………..………………………..65

4.11 การเปรียบเทียบผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งกับสภาวะการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบอาหารเหลวจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95…………….......68

4.12 การเปรียบเทียบผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งกับสภาวะการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบอาหารเหลวจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95…..69

4.13 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ให้บริสุทธิ์...76

4.14 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ให้บริสุทธิ์…………………………………………………………………………..78

ง-1 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน………………………………. 121

ง-2 สัดส่วนของสาร A และสาร B เพื่อปรับบัฟเฟอร์ให้มีพีเอชตามต้องการ……..................... 122

จ-1 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากการศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส………………………………………………………….......................... 123

จ-2 อัตราส่วนระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสกับน้ำหนักเซลล์แห้ง.......................126

จ-3 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส……………………………………..127

จ-4 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส………………………………………128

จ-5 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเปรียบเทียบสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส…………………………………………...130

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

จ-6 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเปรียบเทียบการ pre-treatment ธูปฤาษีที่ใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส....................... 132

จ-7 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเปรียบเทียบสภาวะที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.. 132

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ลักษณะโมเลกุลของไซแลน (ก) และการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน (ข).....5

2.2 กระบวนการย่อยสลายไซแลนโดย *Cryptococcus albidus*.....7

2.3 ลำต้นเหนือดินและการแตกใบของธูปฤาษี (ก) และช่อดอกของธูปฤาษี (ข).....16

2.4 ผลของน้ำตาลแอล-ซอร์โบส (ก) และโซโฟโรส (ข) ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โดย *Trichoderma reesei* PC-3-7.....26

2.5 แนวโน้มของเอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำในแอล-ซอร์โบส (ก, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และโซโฟโรส (ข, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร).....27

4.1 ผลของความชื้นเริ่มต้นของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนเมื่อใช้ธูปฤาษีเป็นสับสเตรท.....52

4.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 3 วัน.....55

4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 4 วัน.....56

4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 1 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 3 วัน.....59

4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 4 วัน.....60

4.6 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 7.0 โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 1 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 3 วัน บนอาหารที่มีธูปฤาษีที่ผ่านและไม่ผ่านการ pre-treatment.....62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.7 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 6.0 โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 4 วัน บนอาหารที่มีธูปฤาษีที่ผ่านและไม่ผ่านการ pre-treatment...63

4.8 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสับสเตรทชนิดต่าง ๆ โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือ ทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้น 7.0 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 3 วัน..................66

4.9 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสับสเตรทชนิดต่าง ๆ โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้น 6.0 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 4 วัน............67

4.10 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีธูปฤาษีเป็นสับสเตรท โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือ ทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้น 7.0 และความชื้นเริ่มต้นของการผลิตเอนไซม์แบบสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งเท่ากับร้อยละ 70 และการผลิตแบบสภาวะอาหารเหลวทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน...69

4.11 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีธูปฤาษีเป็นสับสเตรท โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้น 6.0 และความชื้นเริ่มต้นของการผลิตเอนไซม์แบบสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งเท่ากับร้อยละ 70 และการผลิตแบบสภาวะอาหารเหลวทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน...70

4.12 การเก็บรักษาเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ...71

4.13 การเก็บรักษาเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ...72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.14 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและปริมาณกลูโคซามีนที่วิเคราะห์จาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีธูปฤาษีเป็นสับสเตรท โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้น 7.0 และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70........ 74

4.15 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและปริมาณกลูโคซามีนที่วิเคราะห์จาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีธูปฤาษีเป็นสับสเตรท โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้น 6.0 และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70........ 75

4.16 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159........ 79

4.17 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175........ 79

4.18 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159........ 81

4.19 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175........ 81

4.20 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ต่ออุณหภูมิ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่พีเอช 6.8........ 83

4.21 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ต่ออุณหภูมิ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่พีเอช 6.8........ 84

4.22 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ต่อพีเอช เมื่อบ่มที่พีเอชต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที........ 85

4.23 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ต่อพีเอช เมื่อบ่มที่พีเอชต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที........ 86

4.24 กราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/อัตราเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้น และ 1/ความเข้มข้นของสับสเตรท ของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159........ 88

4.25 กราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/อัตราเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้น และ 1/ความเข้มข้นของสับสเตรท ของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175........ 89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.26 กราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/อัตราเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้น และ 1/ความเข้มข้นของสับสเตรท ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159..............90

4.27 กราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/อัตราเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้น และ 1/ความเข้มข้นของสับสเตรท ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175............91

ค-1 กราฟมาตรฐานไซโลส เมื่อใช้ความเข้มข้นของไซโลส 0 ถึง 16 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร..............117

ค-2 กราฟมาตรฐานกลูโคส เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 0 ถึง 18 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร..............118

ค-3 กราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมินเมื่อใช้ความเข้มข้นของโบวีนซีรัมอัลบูมิน 0 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร...........129

ค-4 กราฟมาตรฐานกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ 0 ถึง 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร..............120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
คำนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นมวลชีวภาพที่สามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้ใหม่และพบมากบนโลก ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ เซลลูโลส (linear homopolymer ของโมเลกุลกลูโคส ซึ่งเชื่อมต่อด้วยพันธะเบต้า-1,4) ซึ่งมีประมาณร้อยละ 40 เฮมิเซลลูโลส (noncellulosic polymer ซึ่งประกอบด้วย กลูแคน แมนแนน อะราบิแนน กาแลคแทน และไซแลน) ซึ่งมีประมาณร้อยละ 33 และลิกนิน (complex polyphenol) ซึ่งมีประมาณร้อยละ 23

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็น heterogeneous polysaccharide ของโมเลกุลดี-ไซโลส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 กับสายโซ่หลัก (backbone) หรืออาจประกอบด้วยอะราบิโนส กรดกลูคูโรนิค และกรดอะราบิโนกลูคูโรนิค เชื่อมต่อกับ D-xylose backbone (Bakir *et al.* 2001)

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ เช่น แอคติโนมัยสีท แบคทีเรีย ยีสต์ รา ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์เหล่านี้มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ทั้งในด้านน้ำหนักโมเลกุล ความจำเพาะต่อสับสเตรท อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน ความคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอช และสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

เนื่องจากไซแลนเป็น heterogeneity ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนจึงต้องการเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งมีเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เบต้า-1,4-เอนโด-ไซลาเนส (EC 3.2.1.8) และเบต้า-ไซโล-ซิเดส (EC 3.2.1.37) สามารถย่อยสลายสายโซ่หลัก (main chain) ได้ โดยขั้นแรกจะจับกับพันธะ xylosidic linkage ภายในสายโซ่หลัก (internal main-chain xylosidic linkage) และขั้นที่สองจะปลดปล่อยโมเลกุลไซโลสออกมา โดยจะจับที่ปลายสุดของสายไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylooligosaccharide) ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นองค์ประกอบหลักของระบบไซลาโนไลติก (xylanolytic system) ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradative microorganism) เช่น *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum*, *Bacillus*, *Clostridium* และ *Streptomyces* อย่างไรก็ตามการย่อยสลายไซแลนอย่างสมบูรณ์จำเป็นต้องมีเอนไซม์หลายชนิดช่วยในการตัดสายโซ่ข้าง (side chain)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไซลาเนสสามารถนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมได้หลายประเภท ซึ่งรวมทั้งการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสในอาหารสัตว์ อาหารมนุษย์ และวัสดุสิ่งทอ โดยสามารถใช้ประโยชน์เอนไซม์ไซลาเนสได้ดีเช่นเดียวกับการใช้ประโยชน์เอนไซม์ไซลาเนสในการฟอกสีกระดาษด้วยวิธีทางชีวภาพและอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนโดยใช้ธูปฤาษีเป็นสับสเตรท
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซแลน
3. ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสในด้านอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน และความคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอชของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซแลน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนเมื่อใช้ธูปฤาษีเป็นสับสเตรท โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และศึกษาลักษณะของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซแลน โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสในด้านอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน ความคงตัวของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิและพีเอช ความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด (V_{max})

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตและสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซแลน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมการฟอกสี เยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมการผลิตอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เซลล์พืชเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งใหญ่ที่สุดในธรรมชาติ ประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic) มีสูตรทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เฮมิเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส และ/หรือน้ำตาลเฮกโซส ได้แก่ กลูแคน (glucan) แมนแนน (mannan) และไซแลน (xylan) โดยมีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนลิกนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทพอลิฟีนอลิก (polyphenolic) เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่และห่อหุ้มเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเอาไว้ข้างใน (Wong *et al.* 1988) ซึ่งในวัดสุเหลือทิ้งทางการเกษตรพบว่ามีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

โครงสร้างของไซแลนเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไซโลไพราโนส (β-1,4-xylopyranose) เป็นสายหลักและมีสารประกอบอื่น ๆ มาเกาะเป็นสายโซ่ข้าง เช่น หมู่อะราบิโนซิล (arabinosyl) กลูคูโรนิล (glucoronyl) หรืออะซิติล (acetyl) โดยเชื่อมต่อกับสายหลักของไซโลสในตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดยหมู่อะราบิโนสต่อกับตำแหน่ง *O*-3 ของไซโลส หมู่กลูคูโรนิลต่อกับตำแหน่ง *O*–2 ของไซโลส ส่วนหมู่อะซิติลต่อกับตำแหน่ง *O*–3 และ *O*-2 ของไซโลส ดังแสดงในรูปที่ 2.1

2.1 การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถย่อยสลายโดยการใช้สารเคมี (chemical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน

2.1.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยสารเคมี

2.1.1.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด

การย่อยสลายไซแลนด้วยกรดเพื่อผลิตน้ำตาลไซโลสเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นรุนแรงและไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่บริสุทธิ์ และเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษ เช่น เฟอร์ฟูรัล ซึ่งมีผลต่อการนำมาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ทนต่อความเป็นกรดและอุณหภูมิที่สูง (ปิยะมาส สิริแสงสว่าง. 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของวัดสุเหลือทิ้งทางการเกษตรบางชนิด

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	องค์ประกอบ (ร้อยละ น้ำหนักแห้ง)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ฟางข้าวสาลี	50	30	15
ฟางข้าว	35	25	17
ซังข้าวโพด	45	35	15
รำข้าวสาลี	36	28.3	20.1
รำข้าว	34	24.5	28.2
ตอข้าวโพด	35	25	35
กาบข้าวโพด	32	28	13
ชานอ้อย	33	22	14

ที่มา : ดัดแปลงจาก ปิยะมาส สิริแสงสว่าง (2543)

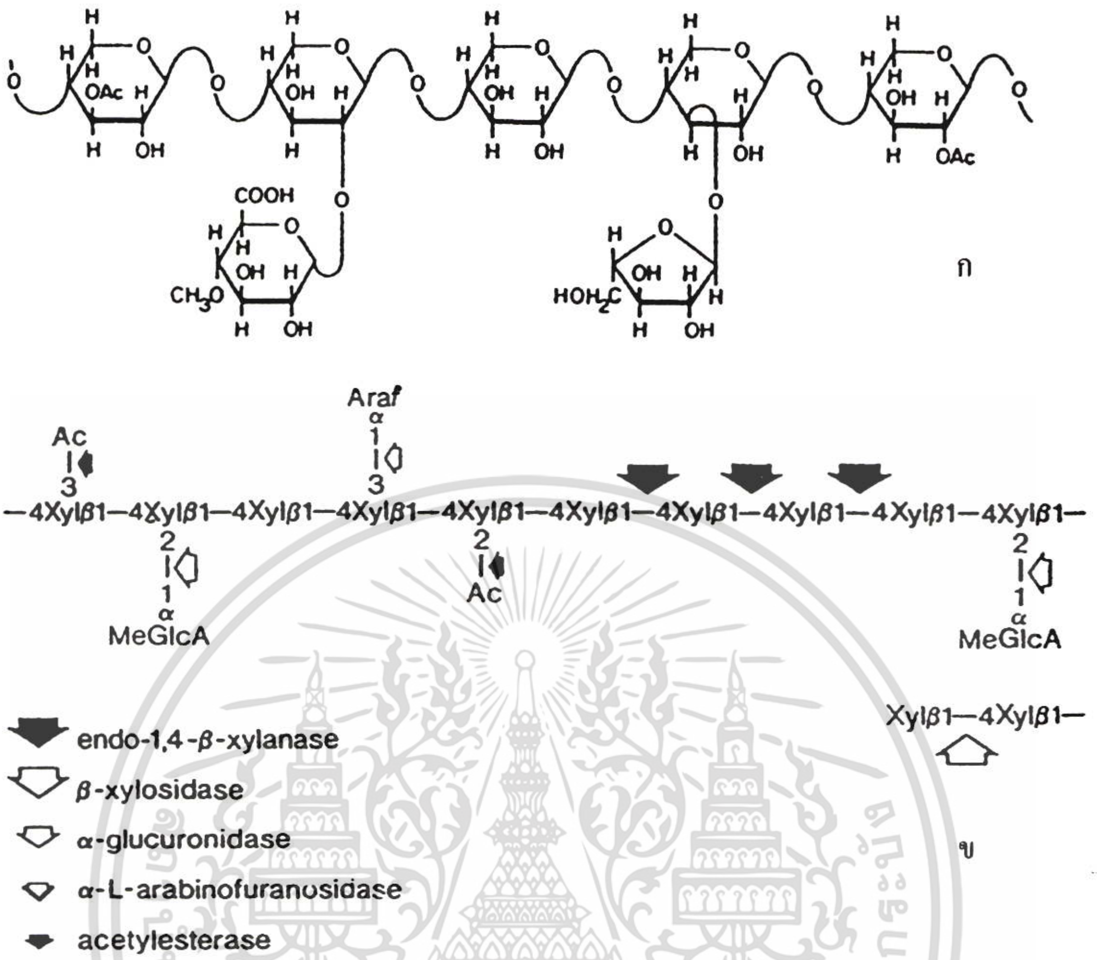
2.1.1.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง

การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการทำกระดาษ ซึ่งจะนำชิ้นของเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เพื่อให้เปลือกไม้ยุ่ย และเป็นการกำจัดลิกนินที่อยู่ในชั้นลิกโนเซลลูโลสออกไปบางส่วน หลังจากนั้นนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยใช้สารเคมีที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide) ก๊าซคลอรีน เป็นต้น แต่วิธีนี้ทำให้เกิดสารประกอบไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบคลอไรด์ที่เป็นพิษชนิดอื่น ๆ (กฤษฎา เวทีวุฒาจารย์. 2542)

2.1.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะมากกว่าการใช้สารเคมี และไม่ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษ เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประเภท เช่น กระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ (Jurasek and Paice. 1992) อุตสาหกรรมอาหาร เช่น การทำน้ำผลไม้ให้ใสขึ้น และใช้ลดความหนืดของอาหารสัตว์ (Wong and Saddler. 1992 ; Gilbert and Hazlewood. 1993) ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนประกอบด้วยเอนไซม์ 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ลักษณะโมเลกุลของไซแลน (ก) และการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน (ข)

Ac	แทน	หมู่อะซิติล
Ara*f*	แทน	แอล-อะราบิโนฟิวราโนส
MeGlcA	แทน	กรด 4-โอ-เมทิล-กลูคูโรนิก
Xyl	แทน	ดี-ไซโลส

ที่มา : ดัดแปลงจาก Biely (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.1 เอนโดไซลาเนส (endo-xylanase) หรือ 1,4-เบต้า-ดี-ไซแลนไซลาโนไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8)

เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-เบต้า-ดี-ไซโลซิดิกแบบสุ่ม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่ากลไกภายใน (endo-mechanism) ได้ไซโลสและโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น ๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Gilbert *et al.* 1993)

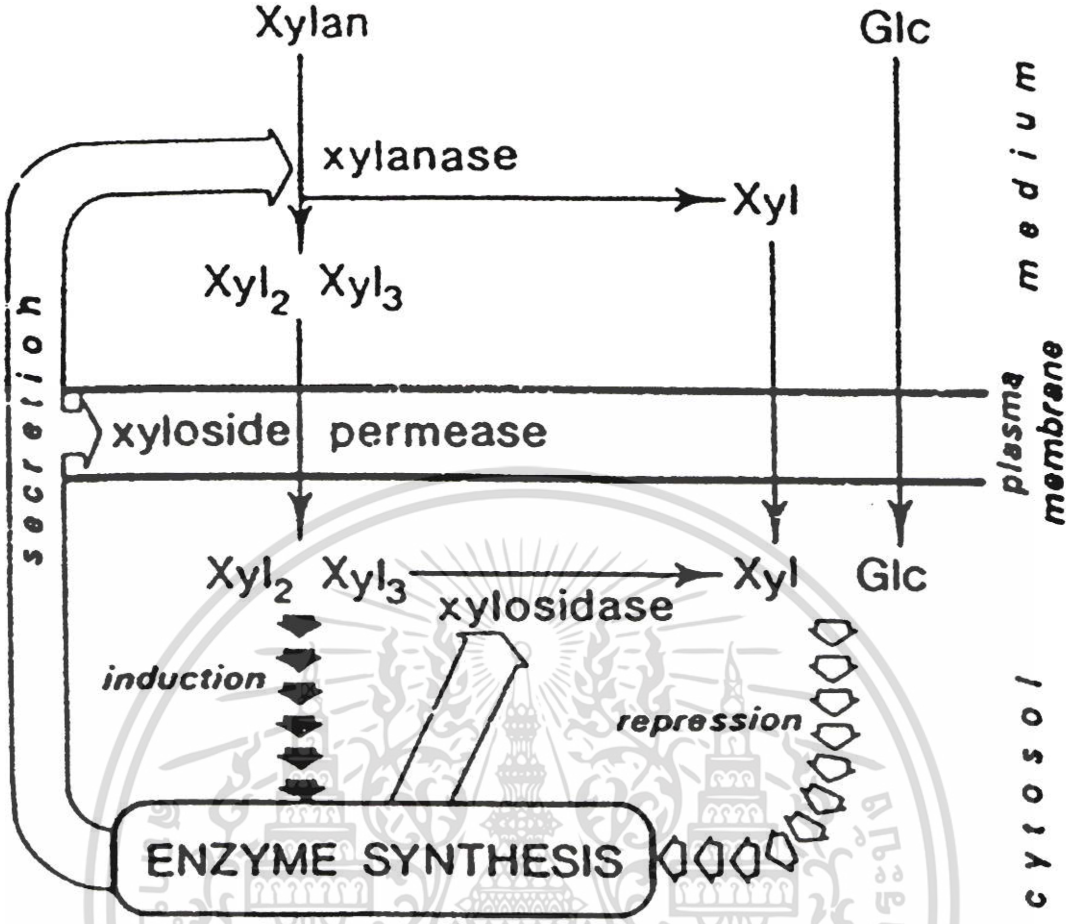
2.1.2.2 เบต้า-ไซโลซิเดส (β-xylosidase) หรือ1,4-เบต้า-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4-β-xylan-xylohydrolase, EC 3.2.1.37)

เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-เบต้า-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ทีละ 1 หน่วย จากปลายด้านนอนรีดิวซ์ (non-reducing end) เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่ากลไกแบบภายนอก (exo-mechanism) ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dekker and Richards. 1976)

นอกจากนี้การย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์ยังต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ได้แก่ แอลฟา-ดี-กลูคูโรโนสิเดส (α-D-glucuronosidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ในกรด 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิก, แอลฟา-แอล-อะราบิโนสิเดส (α-L-arabinosidase) ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,3 ของหมู่นอนรีดิวซ์-แอลฟา-แอล-อะราบิ-โนส ได้น้ำตาลอะราบิโนส และอะซิติลเอสเทอเรส (acetyl esterase) ย่อยสลายพันธะ เบต้า-1,2 และเบต้า-1,3 ที่เชื่อมระหว่างหมู่อะซิติลกับสายหลักให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแอซีติก

Biely (1985) ศึกษาการย่อยสลายไซแลนด้วยไซลาเนสและเบต้า-ไซโลซิเดสในยีสต์ *Cryptococcus albidus* พบว่าเชื้อจะปลดปล่อยไซลาเนสออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยไซแลนให้เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น ๆ จากนั้นจึงนำไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ-ขนส่งที่ต้องใช้พลังงาน (active transport) แล้วใช้เบต้า-ไซโลซิเดสย่อยไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อไป กระบวนการย่อยสลายไซแลนโดย *Cryptococcus albidus* แสดงดังรูปที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 กระบวนการย่อยสลายไซแลนโดย *Cryptococcus albidus*

Glc แทน ดี-กลูโคส

Xyl, Xyl_2 และ Xyl_3 แทน ดี-ไซโลส, ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส ตามลำดับ

ที่มา : Biely (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 แหล่งของเอนไซม์ไซลาเนส

เอนไซม์ไซลาเนส พบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แอคติโนมัยสีท แบคทีเรีย ยีสต์ รา การสร้างเอนไซม์ไซลาเนสโดยจุลินทรีย์เกิดขึ้นภายในเซลล์ จากนั้นจะปลดปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายไซแลนต่อไป ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori	Tenkanen *et al.* 1993
Aspergillus awamori AANTG 19	Smith and Wood. 1991a
Aspergillus foetidus	Bailey *et al.* 1991
Aspergillus fumigatus	Lindner *et al.* 1994
Aspergillus fumigatus Fresenius	Kitpreechavanich *et al.* 1992
Aspergillus kawachii	Ito *et al.* 1992
Aspergillus nidulans	Femandez-Espinar *et al.* 1994
Aspergillus niger	Frederick *et al.* 1985
Aspergillus niger NCIM 1207	Gokhale *et al.* 1986
Aspergillus niger 15	Rodionova and Tavobilov. 1983
Aspergillus oryzae	Tenkanen *et al.* 1993
Aspergillus sojae	Kimura *et al.* 1995
Aspergillus sydowii MG49	Ghosh and Nanda. 1994
Aurebasidium pullulans	Tenkanen *et al.* 1993
Bacillus sp. สายพันธุ์ 41M-1	Nakamura *et al.* 1993
Bacillus sp. สายพันธุ์ BP-23	Blanco *et al.* 1995
Bacillus sp. สายพันธุ์ K-1	Ratanakhanokchai *et al.* 1999
Bacillus ciculans	Ratto *et al.* 1992
Bacillus stearothermophilus	Nanmori *et al.* 1990
Bacillus stearothermophilus T-6	Khasin *et al.* 1993
Bacillus subtilis	Gokhale and Deobagkar. 1989
Bacillus subtilis 5H	Khanongnuch *et al.* 1998
Bacteroides xylanoticus	Schyns and Stams. 1992

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Butyrivibrio fibrisolvens	Utta *et al.* 1991
Cellulomonas sp.	Gokhale and Deobagkar. 1989
Cellulomonas sp. N.C.I.M 2353	Chaudhary and Deobagkar. 1997
Cellulomonas uda	Rapp and Wagner. 1986
Cephalosporium sp. สายพันธุ์ RYM-202	Kang *et al.* 1996
Chaetomium trilaterale	Uziie *et al.* 1985
Clostridium stercorarium	Wolfgang *et al.* 1990
Clostridium thermocellum	Morag *et al.* 1990
Cryptococcus albidus	Biely , 1985
Dictyoglomus sp.	Ratto *et al.* 1994
Emericella nidulans	Matsuo and Yasui. 1984
Fibrobacter succinogenes	Smith and Forsberg. 1991
Fibrobacter succinogenes S85	Matte and Forsberg. 1992
Fusarium moniliforme	Raghukumar *et al.* 1994
Fusarium oxysporum F3	Christakopoulos *et al.* 1996
Humicola lanuginosa	Kitpreechavanich *et al.* 1984
Melanocarpus albomyces IIS 68	Saraswat and Bisaria. 1997
Neocallimastix frontalis	Hebraud and Fevre. 1990
Nocardiopsis dassonvillei	Tsujibo *et al.* 1990
Penicillium funiculosum	Misha *et al.* 1985
Penicillium wortmanni IFO 7237	Win *et al.* 1987
Prevotella ruminicola	Flint *et al.* 1997
Pullularia pullulans	Pou-Llinas and Driguez. 1987
Rhizopus oryzae	Bakir *et al.* 2001
Sclerotinia sclerotiorum	Riou *et al.* 1991
Shizophyllum commune	Tenkanen *et al.* 1993
Streptomyces sp.	Nakanishi *et al.* 1987
Streptomyces sp. CH-M-1035	Flores *et al.* 1997
Streptomyces sp. EC 1	Godden *et al.* 1989

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Streptomyces sp. S38	Georis *et al.* 1999
Streptomyces chattanoogensis CECT 3336	Lopez-Fernandez *et al.* 1998
Streptomyces halstedii JM8	Ruiz-Arribas *et al.* 1995
Streptomyces lividans	Dupont *et al.* 1998
Streptomyces lividans 1326	Kluepfel *et al.* 1986
Streptomyces olivochromogenes	Tenkanen *et al.* 1993
Streptomyces roseiscleroticus	Grabski and Jeffries. 1991
Talaromyces byssochlamydoides YH-50	Yoshioka *et al.* 1981
Thermoanaerobacter ethanolicus	Shao and Wiegel. 1992
Thermoanaerobacterium saccharolyticum B6A-RI	Lee *et al.* 1993
Thermoascus aurantiacus	Gomes *et al.* 1994
Thermomonospora fusca สายพันธุ์ LL	Ristroph and Humphreyt. 1985
Thermomonospora fusca	McCarthy and Bachmann. 1992
Thermomyces lanuginosa	Gomes *et al.* 1993
Thermotoga maritime	Bronnenmeier *et al.* 1995
Trichoderma harzianum	de Paula Silveira *et al.* 1999
Trichoderma longibrachitum	Royer and Nakas. 1990
Trichoderma reesei	Tenkanen *et al.* 1993
Trichoderma reesei PC-3-7	Xu *et al.* 1998
Trichoderma viride	Beldman *et al.* 1988

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส

โดยทั่วไปเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส แต่สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ค่อนข้างเป็นกลาง ส่วนเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อรามีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานค่อนข้างเป็นกรด

เอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มีสมบัติในด้านอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานค่อนข้างแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ไซลาเนส	สภาวะที่เหมาะสม		เอกสารอ้างอิง
		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พีเอช	
Aspergillus kawachii	XylA XylB XylC	60 55 50	5.5 4.5 2.0	Ito *et al.* 1992
Aspergillus nidulans	-	56	5.3-7.5	Femandez-Espinar *et al.* 1994
Aspergillus niger	I II	45 45	6.0 5.5	Frederick *et al.* 1985
Aspergillus sojae	X-I X-II-A X-II-B	60 60 50	5.5 5.0 5.5	Kimura *et al.* 1995
Aspergillus sydowii MG49	-	60	5.5	Ghosh and Nanda. 1994
Bacillus sp. สายพันธุ์ 41M-1	J	50	9.0	Nakamura *et al.* 1993
Bacillus sp. สายพันธุ์ K-1	-	60	5.5	Ratanakhanokchai *et al.* 1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ไซลาเนส	สภาวะที่เหมาะสม		เอกสารอ้างอิง
		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พีเอช	
Bacillus stearothermophilus T-6	-	-	6.5	Khasin *et al.* 1993
Bacillus subtilis 5H	-	55	7.0	Khanongnuch *et al.* 1998
Cellulomonas sp.	I II III	60-65 60 55	6.5 6.5 5.8	Gokhale and Deobagkar. 1989
Cephalosporium sp. สายพันธุ์ RYM-202	CX-I, CX-II	50	7.5-8.0	Kang *et al.* 1996
Fibrobacter succinogenes S85	Endoxylanase 1 Endoxylanase 2	39 55	7.0 6.3	Matte and Forsberg. 1992
Fusarium oxysporum F3	I II	60 55	6.0 6.0	Christakopoulos *et al.* 1996
Streptomyces roseiscleroticus	-	60	6.5-7.0	Grabski and Jeffries. 1991
Trichoderma harzianum	XYL2	45	5.0	de Paula Silveira *et al.* 1999
Trichoderma reesei PC-3-7	XynIII	55	6.0	Xu *et al.* 1998

<u>หมายเหตุ</u> – หมายถึง ไม่มีการรายงาน

ที่มา : กฤษฎา เวทีวุฒาจารย์ (2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ความคงตัวต่อพีเอชและอุณหภูมิของเอนไซม์ไซลาเนส

เอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มีความคงตัวต่อพีเอชและอุณหภูมิค่อนข้างแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ต่ออุณหภูมิและพีเอช

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ไซลาเนส	ความคงตัวต่อ		เอกสารอ้างอิง
		อุณหภูมิสูงถึง (องศาเซลเซียส)	พีเอช	
Aspergillus kawachii	XylA XylB XylC	- - -	3.0-10.0 3.0-10.0 1.0-9.0	Ito *et al.* 1992
Aspergillus nidulans	-	60	4.0-6.7	Fernandez-Espinar *et al.* 1994
Aspergillus sojae	X-I X-II-A X-II-B	50 50 35	5.0-8.0 5.0-9.0 5.0-8.0	Kimura *et al.* 1995
Bacillus stearothermophilus T-6	-	65	9.0	Khasin *et al.* 1993
Cephalosporium sp. สายพันธุ์ RYM-202	CX-I, CX-II	50	5.5-12.0	Kang *et al.* 1996
Fusarium oxysporum F3	I II	45 45	9.0-10.0 7.0-9.0	Christakopoulos *et al.* 1996
Nocardiopsis dassonvillei	X-I X-II X-III	40 40 40	6.0-10.0 6.0-10.0 8.0-12.0	Tsujibo *et al.* 1990
Streptomyces chattanoogensis CECT 3336	-	50	5.0-8.0	Lopez-Fernandez *et al.* 1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ไซลาเนส	ความคงตัวต่อ		เอกสารอ้างอิง
		อุณหภูมิสูงถึง (องศาเซลเซียส)	พีเอช	
Streptomyces halstedii JM8	Xys1L Xys1S	50 50	4.0-10.0 4.0-10.0	Ruiz-Arribas *et al.* 1995
Trichoderma reesei PC-3-7	XynIII	50	4.5-8.5	Xu *et al.* 1998

<u>หมายเหตุ</u> – หมายถึง ไม่มีการรายงาน

ที่มา : กฤษฎา เวทีวุฒาจารย์ (2542)

2.5 ความจำเพาะต่อสับสเตรท

โดยทั่วไปไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ มีสับสเตรทเป็นไซแลน แต่ไซแลนจากพืชต่างชนิดกันมีองค์ประกอบแตกต่างกัน โดยเฉพาะมีความแปรผันที่สายโซ่ข้างดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น ดังนั้นไซลาเนสจึงมีความจำเพาะต่อไซแลนจากพืชต่างชนิดกันแตกต่าง และแหล่งของไซลาเนสอาจมีผลทำให้เกิดความหลากหลายของความจำเพาะต่อชนิดของไซแลนเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.5

2.6 ธูปฤาษี

ธูปฤาษี หรือกกช้างจัดเป็นพืชเขตร้อน อยู่ในตระกูล Typhaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Typha angustifolia* Lin มีชื่อสามัญว่า Lesser reedmace หรือ Narrow-leaved cat tail (สุรชัย มัจฉาชีพ. 2538) ธูปฤาษีเป็นวัชพืชที่พบทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น ห้วย หนอง และบึง ธูปฤาษีเจริญเติบโตเป็นกอหญ้าหนาทึบ บริเวณที่พบธูปฤาษีจะไม่พบพืชชนิดอื่น ขยายพันธุ์ได้อย่าง-รวดเร็ว ซึ่งจัดเป็นวัชพืชที่ก่อให้เกิดปัญหาทางน้ำ เช่น ปัญหาในคลองชลประทาน เพราะจะขัดขวางการไหลของน้ำ เป็นปัญหาในพื้นที่ตื้นเขินชายฝั่งทะเลสาบและบ่อน้ำ และเป็นอุปสรรคต่อทัศนียภาพของแหล่งน้ำ (มณีทิพย์ ชิ่วกุ้ง. 2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทของไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทต่อไซแลน		เอกสารอ้างอิง
	oat spelt xylan (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	birchwood xylan (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
Aspergillus nidulans	4.15	1.78	Femandez-Espinar *et al.* 1994
Cephalosporium sp. สายพันธุ์ RYM-202	(CX-I) 5.26 (CX-II) 4.16	(CX-I) 3.18 (CX-II) 2.02	Kang *et al.* 1996
Trichoderma reesei PC-3-7	6.25	2.02	Xu *et al.* 1998
เชื้อราที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงสายพันธุ์ HG-1	20.00	8.30	Ishihara *et al.* 1997

ที่มา : กฤษฎา เวทีวุฒาจารย์ (2542)

2.6.1 ลักษณะทั่วไปของธูปฤาษี

ธูปฤาษีเป็นวัชพืชที่แข็งแรงทนทาน มีอายุข้ามปี สูงประมาณ 1 ถึง 3 เมตร (กิติพร พรหมเทศน์ และ สุนันท์ แรมสว่าง. 2544) ลำต้นประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนลำต้นที่อยู่ใต้ดินแบบ Rhizome จะแตกกิ่งก้านสาขามากมาย ระดับความลึกของรากประมาณ 0.3 เมตร หรือ 1 ฟุต ระดับความลึกของน้ำในช่วงที่ธูปฤาษีอยู่ได้ คือ 0.01 ถึง 0.75 เมตร แต่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในระดับน้ำลึกไม่เกิน 0.3 เมตร ส่วนลำต้นที่อยู่เหนือดินประกอบด้วยใบที่แตกออกเป็นแผงสองแนวทางด้านข้าง ใบแก่อยู่ด้านนอกห่อหุ้มใบอ่อนซึ่งอยู่ด้านใน ก้านใบมีเมือกเหนียว ๆ ขอบใบหนา โคนใบอวบและหนากว่าปลายใบ แผ่นใบมีสีเขียวเข้ม ความกว้างของใบประมาณ 6 ถึง 25 มิลลิเมตร ดอกออกเป็นช่อแบบ Spike แน่น ๆ รูปทรงกระบอก หรือ Spadix ที่ปลายก้านช่อดอก ดอกมีสีน้ำตาลเนื้อนุ่ม เกสรตัวผู้มีจำนวน 2 ถึง 5 อัน ก้านชูอับเรณูแยกหรือติดกัน ประกอบด้วยอับเรณู 2 ช่อ ดอกตัวเมียประกอบด้วยกลีบกลมลักษณะเป็นขนเรียวยาวจำนวนมาก รังไข่รูปกระสวยมี 1 ช่อง และมีไข่อ่อนเพียง 1 ใบ ยอดเกสรตัวเมียเมื่อแก่จะปลิวไปได้ไกล เพราะมีขนจำนวนมาก (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530) (รูปที่ 2.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก ข

รูปที่ 2.3 ลำต้นเหนือดินและการแตกใบของธูปฤาษี (ก) และช่อดอกของธูปฤาษี (ข)

2.7 การหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง

การหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง หมายถึง กระบวนการหมักที่อาศัยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารแห้งในสภาวะที่ไม่มีน้ำอิสระ (free liquid) อยู่ในระบบ (Pandey. 1992) น้ำที่อยู่ในระบบการหมักแบบนี้อยู่ในสภาพความชื้นที่ถูกดูดซับอยู่ในวัตถุดิบที่มีในการหมักแบบอาหารแข็งเท่านั้น ซึ่งปฏิกิริยาของจุลินทรีย์จะหยุดลงเมื่อมีปริมาณความชื้นของอาหารน้อยกว่าร้อยละ 12 การหมักในอาหารแข็งนี้ไม่รวมถึงการหมักในอาหารเหลวที่มีของแข็งที่ไม่ละลายน้ำปนอยู่ในปริมาณมาก หรือการหมักที่อยู่ในอาหารเหลว วัตถุดิบส่วนใหญ่ที่ใช้ ได้แก่ เมล็ดธัญพืช รำข้าวสาลี วัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส รวมทั้งของเสียจากกระบวนการผลิตอาหาร เพราะมีโมเลกุลใหญ่ ไม่ละลายน้ำหรือละลายได้น้อย มีปริมาณมาก หาได้ง่าย ราคาถูก และมีสารอาหารมาก (ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2538) ในระบบการหมักแบบสภาวะอาหารแข็งนี้ปริมาณความชื้นหรือน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ (a_w, available water) จึงค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงเหมาะต่อการหมักโดยเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ (วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532)

กระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็งโดยจุลินทรีย์เป็นกรรมวิธีที่เก่าแก่ที่สุด (Hesseltine. 1977) โดยพบว่าชาวอียิปต์เป็นชนชาติแรก ๆ ที่ใช้กระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็งสำหรับการผลิตขนมปังเมื่อ 2,600 ปีก่อนคริสตกาล และมีการกล่าวถึงการใช้กระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็งที่มีมาก่อนการผลิตเนยแข็งโดย *Penicillium roquefortii* โดยกล่าวถึงกระบวนการผลิตโคจิในประเทศจีนระหว่าง 2,500 ปีก่อนคริสตกาล ที่มีการนำไปเผยแพร่ที่ประเทศญี่ปุ่น โดยพระชาวพุทธในศตวรรษที่ 7 จากนั้นมาได้มีการผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ได้รับลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้เพื่อการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

หมักขึ้นอีกหลายชนิดในประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น มิโซะ เทมเป้ เป็นต้น และต่อมามีการผลิตน้ำส้มสายชูจากแอปเปิ้ลในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง ในคริสศตวรรษที่ 18 มีการพัฒนาการใช้กระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็งในการผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ โดยมีการใช้ถังหมักเพื่อการผลิตที่ดีขึ้น (Pandey. 1994) ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแห้งแสดงดังตารางที่ 2. 6

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็งจำเป็นต้องปรับความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญได้ดี และเกิดการพองตัวของอนุภาคของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย โดยขนาด รูปร่าง และความชื้นเริ่มต้นของวัตถุดิบที่ใช้เป็นสับสเตรทต้องสัมพันธ์กันในด้านความพรุนของวัตถุดิบซึ่งต้องมีความพรุนมากพอ เพื่อให้มีการถ่ายเทอากาศได้ดี และสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรต้องสูงพอ เพื่อที่วัตถุดิบไม่เกาะติดกันจนทำให้ชั้นหมักทึบเกินไป (ทวีสิริ มาลาพันธุ์. 2546)

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแห้ง

ตัวอย่าง	จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง	วัตถุดิบ
การผลิตโดขนมปัง (Bread dough formation)	*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus sanfrancisco*	คาร์โบไฮเดรตของโด
การเพาะเลี้ยงเห็ด เห็ด เห็ดฟาง เห็ดหอม	แบคทีเรียและเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย *Agaricus bisporus* *Volvariella volvaceae* *Lentinus edodes*	 เฮมิเซลลูโลส ฟางข้าง ลิกนินและพอลิแซ็กคาไรด์ของไม้
เนยแข็ง (Roquefort)	*Penicillium roquefortii*	ตะกอนโปรตีนที่ได้จากนม (Milk curd)
การผลิต Takadiastase	*Aspergillus oryzae*	รำข้าวสาลี
กระบวนการผลิตโคจิ ซีอิ๊ว (Soy sauce) มิโส (Miso) สาเก (Sake) เทมเป้ (Tempeh)	 *Aspergillus oryzae* *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces rouxii* *Aspergillus oryzae* *Rhizopus* sp.	 รำข้าวและถั่วเหลือง ข้าวและธัญพืชชนิดต่าง ๆ ข้าว ถั่วเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

48941

ตารางที่ 2.6 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง	วัตถุดิบ
กระบวนการผลิตโคจิ ข้าวแดง (Red rice) อองจอม (Ontjom) ราจิ (Ragi)	 *Monascus purpureus* *Neurospora sitophila* *Mucor*, *Rhizopus* และยีสต์	 ข้าว กากถั่วลิสงที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ข้าว
การผลิตกรดซิตริก	*Aspergillus niger*	น้ำตาล กากน้ำตาล
การผลิตอะฟลาทอกซิน	*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*	ถั่วลิสง รำข้าว ข้าว
การย่อยสลายไม้ (Rotting and decay of wood)	เชื้อราชั้นสูง (Higher fungi)	พอลิแซ็กคาไรด์และลิกนินของไม้
การผลิตน้ำส้มสายชู	*Acetobacter* sp.	เอทานอล
การชะสินแร่ (Leaching of sulfide minerals)	*Thiobacillus* sp.	ซัลเฟอร์และเหล็กในสินแร่
การกำจัดของเสีย	แบคทีเรียและโปรโตซัว	สารอินทรีย์ในของเสีย
การย่อยสลายน้ำมันในดิน	แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา	ไฮโดรคาร์บอน และอนุพันธ์ของไฮโดรคาร์บอน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Aidoo *et al.* (1982)

2.7.1 ข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง

Hesseltine (1972) และวราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต (2542) ได้เปรียบเทียบแบบสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งกับการหมักแบบสภาวะอาหารเหลว ดังนี้

2.7.1.1 ข้อได้เปรียบของการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง

1) อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมได้ง่าย ส่วนใหญ่เติมเพียงน้ำลงไปเท่านั้น แต่อาจมีการเติมสารอาหารอื่น ๆ ด้วย

2) ต้องการพื้นที่น้อย

3) ปริมาตรของถังหมักที่ใช้มีขนาดเล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตที่ได้ เนื่องจากใช้น้ำในปริมาณน้อย และมีสารอาหารในปริมาณที่เข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) เครื่องมือที่ใช้สำหรับการขยายสู่ระดับอุตสาหกรรมไม่ยุ่งยาก และไม่แตกต่างจากในห้องปฏิบัติการ

5) อาหารแข็งมีความชื้นต่ำ จึงช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้

6) หัวเชื้อที่ใช้อยู่ในรูปของสปอร์ จึงไม่จำเป็นต้องมีถังหมักสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (seed tank) ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย

7) สภาพการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา มีลักษณะเช่นเดียวกับการเจริญเติบโตแบบที่อยู่ในธรรมชาติ จึงทำให้เชื้อต้องการระยะเวลาในการปรับตัว (lag phase) สั้น การหมักจึงเกิดขึ้นได้ดี

8) ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถสกัดออกได้โดยตรง ใช้วิธีสกัดที่ง่าย และสะดวก

9) ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็งอาจมากกว่าผลผลิตที่ได้จากการหมักในสภาวะอาหารเหลว และผลผลิตที่ได้ค่อนข้างคงที่

10) อากาศสามารถแพร่ไประหว่างช่องว่างของอนุภาคอาหารและอนุภาคจุลินทรีย์ได้

2.7.1.2 ข้อเสียเปรียบของการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง

1) มีความจำกัดต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้

2) การเขย่าหรือการกวนอาหารแข็งตลอดเวลาในการหมักต้องใช้พลังงานสูง

3) มีความร้อนสะสมเกิดขึ้นเมื่อการหมักมีขนาดใหญ่

4) การเติมน้ำลงไปในอาหารแข็งในช่วงแรกของการหมัก อาจเกิดการปนเปื้อนได้

5) การติดตามผลจากการหมัก เช่น พีเอช ความชื้น สามารถทำได้ยาก

6) สปอร์หัวเชื้อเริ่มต้นจำเป็นต้องผ่านการ pre-treatment ก่อน เนื่องจากอาจต้องใช้ปริมาณเริ่มต้นของสปอร์มาก ดังนั้นต้องมีกรรมวิธีการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณสปอร์ และการเก็บเกี่ยวสปอร์ต้องใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ

7) การหาค่ามวลของเส้นใย (mycelia mass) ทำได้ยาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ในปัจจุบันมีการผลิตเอนไซม์หลายชนิดทั้งในการค้าและใช้ในอุตสาหกรรม เอนไซม์ไซลาเนสก็เช่นกัน ซึ่งมีผู้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ดังนี้

2.8.1 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสังเคราะห์เซลล์ และจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ ใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50 ถึง 55 ในการสังเคราะห์เซลล์ (สมใจ ศิริโภค. 2537)

เชื้อราทุกชนิดต้องการคาร์บอน เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ แหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาล พอลิแซ็กคาไรด์ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นต้น (Carlile and Watkinson. 1994) แหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย กลูโคสในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยทำให้เซลล์มีการเจริญที่พอเหมาะไม่มากเกินไป การสร้างเอนไซม์ของเชื้อก็จะดำเนินไปตามปกติ (สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์. 2530) แต่เมื่อปริมาณของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไป จะทำให้เกิดการยับยั้งการแคตาบอไลต์ (catabolic repression) โดยกลูโคส

การเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma harzianum* E58 บนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ถึง 3.0 พบว่าอาหารผสมระหว่างไซแลนร้อยละ 1 และ stream-treat aspenwood (SEA-WE) จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าเอนไซม์เอนโดกลูโคเนส เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน แต่จะผลิตเอนไซม์เอนโดกลูโคเนสได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน และเมื่อแยกแหล่งคาร์บอนและทำการเลี้ยง พบว่าไซแลนร้อยละ 0.5 สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงกว่า Solka floc ความเข้มข้นร้อยละ 1 แต่เมื่อเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ผสมกันกับที่แยกใช้ พบว่าที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างไซแลนร้อยละ 1 กับ SEA-WA ร้อยละ 0.5 ได้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมดีที่สุด (Senior *et al.* 1989)

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Thermatoga marittima* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น birchwood xylan ร้อยละ 1 พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสบริสุทธิ์มีกิจกรรมจำเพาะ 131 ยูนิตต่อมิลลิกรัม (Chen *et al.* 1997a)

การเลี้ยงเชื้อ *Thermomonospora fusca* BD25 เพื่อผลิตเอนไซม์ 3 ชนิดคือ เบต้า-ไซลาเนส เบต้า-เอนโดกลูโคเนส และเพอร์ออกซิเดส โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนระหว่างคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) ร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และไซแลน ร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แทนฟางข้าวที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน พบว่าเชื้อ *Thermomonospora fusca* BD25 จะผลิตเอนไซม์ออกซิเดสลดลงเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แทนฟางข้าว แต่เอนไซม์ไซลาเนสและเบต้า-เอนโดกลูโคเนสยังคงมีกิจกรรมสูงเมื่อใช้ฟางข้าวและไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน (Trigo and Ball. 1994)

เมื่อนำเชื้อ *Aspergillus niger* NCIM 1207 มาเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 เปรียบเทียบรำข้าวสาลีความเข้มข้นร้อยละ 4.0 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถใช้รำข้าวสาลีผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงสุด และไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 4 เชื้อใช้ในการผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าร้อยละ 3 (จาก 9.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็น 10.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจึงใช้รำข้าวสาลีความเข้มข้นร้อยละ 4.0 และไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 3.0 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และเบต้าไซโลซิเดส (Gokhale *et al.* 1986)

เมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้นร้อยละ 4 เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus fumigatus* IMI255091 พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ เบต้า-ดี-กลูโคซิเดสได้ในปริมาณสูง แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 5 จะผลิตเอนไซม์ได้ลดลง เพราะความเข้มข้นมากทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อหนืด การถ่ายเทมวลและอากาศจะไม่ดี ทำให้เชื้อเจริญน้อยลงและผลิตเอนไซม์ลดลง (Wase *et al.* 1985)

เอนไซม์จากเชื้อ *Cyathus stercoreus* ที่เลี้ยงในเฮมิเซลูโลสความเข้มข้นร้อยละ 1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ 1,600 ยูนิตต่อลิตร สูงกว่าการใช้ไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ซึ่งมีกิจกรรม 760 ยูนิตต่อลิตร แต่การใช้แกลบเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ให้กิจกรรมสูงถึง 2,000 ยูนิตต่อลิตร ส่วนฟางข้าวสาลีเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด 2,800 ยูนิตต่อลิตร (Saxena *et al.* 1994)

เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูโลสที่ผลิตจาก *Trichoderma viride* โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กันคือ แกลบข้าวบาร์เลย์ แกลบ ฟางข้าวสาลี เส้นใยปอกระเจา กิ่งปอกระเจา (jute stick) กระดาษหนังสือพิมพ์ sulphite pulp acicel และไซแลน พบว่าเมื่อใช้ sulphite pulp เป็นแหล่งคาร์บอน เอนไซม์ไซลาเนสและเบต้า- กลูโคซิเดสมีกิจกรรมสูงสุด (190.0 ยูนิตต่อลิตร) รองลงมาคือจากฟางข้าวสาลี (111.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) (Gome *et al.* 1992)

Solka floc ร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* โดยมีกิจกรรมสูงสุด 207 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ larch wood xylan ร้อยละ 1 แต่เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสูงกว่านี้จะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ และถ้าใช้ canola meal เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงขึ้นตามความเข้มข้นร้อยละ 8 ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุด 210 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงกว่านี้ อาหารจะมีความหนืด ทำให้ยากต่อการกวนและเพิ่มอากาศ (Gattinger *et al.* 1990)

การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus circulans* B6 โดยใช้ไซแลนความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *Bacillus circulans* B6 สามารถใช้ไซแลนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการผลิตไซลาเนสได้สูงสุด และมีการเติมดี-กาแล็กโทส (D-galactose) ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในไซแลนความเข้มข้น 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไซแลน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมดี-กาแล็กโทส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 8.1 ยูนิตต่อมิลลิกรัม (Kyu *et al.* 1994)

2.8.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8 ถึง 10 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการไนโตรเจนแตกต่างกัน โดยจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ (สมใจ ศิริโภค. 2537)

แหล่งไนโตรเจนไม่ว่าจะเป็นสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ก็มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Gome *et al.* 1992) โดยเชื้อจะนำไนโตรเจนไปใช้สำหรับเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโนเพื่อสังเคราะห์เซลล์ ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่มีการศึกษา เช่น การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cyathus stercoreus* ในอาหารพื้นฐาน (basal medium) โดยเติมไซแลนความเข้มข้นร้อยละ 1 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ ยูเรีย กรดกลูทามิก เคซีนไฮโดรไลเสต เคซีนเปปโตน แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟต แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ไนโตรเจน พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากสารอินทรีย์จะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าไนโตรเจนที่ได้จากสารอนินทรีย์ (Saxena *et al.* 1994)

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูโคเนสและไซลาเนสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* โดยไม่มีการควบคุมพีเอชเริ่มต้น พบว่ายูเรียมีผลทำให้พีเอชเพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 6.7 (ในอาหารที่มียูเรีย 1.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับโปรติโอสเปปโตน 3 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร) และในอาหารที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวในปริมาณ 1.5 กรัมต่อลิตร พีเอชจะเป็น 6.5 ภายใน 10 วัน เนื่องจากมีการกำจัดแอมโมเนียไปเป็นยูเรีย ในอาหารที่ใช้โปรติโอสเปปโตน 3 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร พีเอชสุดท้ายจะเป็น 6.0 ในอาหารที่ใช้โปรติโอสเปปโตน 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว พีเอชสุดท้ายจะเป็น 5.9 ในอาหารที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวในปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตร พีเอชจะเป็น 5.7 แต่ถ้าไม่มียูเรียพีเอชจะลดลงเป็น 4.7 นอกจากนี้พีเอชก็มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส ที่พีเอช 4.0 จะผลิตเอนโด-กลูโคเนสได้สูงสุด และพีเอช 6.0 ถึง 7.0 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูง เมื่อใช้เซลลูโลสและไซแลนเป็นสับสเตรท (Haapala *et al.* 1996)

2.8.3 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

การศึกษาอิทธิพลของพีเอชในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้เซลลูโลสและไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้เซลลูโลสจะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับที่พีเอช 4.0 ในขณะที่จะผลิตไซลาเนสได้มากที่พีเอช 6.0 ถึง 7.0 และเมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ไซแลนเป็นสับสเตรทที่พีเอชสูง ๆ (6.0 ถึง 7.0) เชื้อราจะผลิตไซลาเนสได้มากกว่าที่พีเอช 4.0 เช่นกันและจะผลิตเซลลูเลสได้ต่ำทุกพีเอชที่ทดลองคือ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 7.5 (Bailey *et al.* 1993) และเมื่อพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesei* เท่ากับ 6.0 ถึง 7.0 จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด โดยมีไซลูโลส (xylulose) และไซแลนเป็นแหล่งอาหาร (Haapala *et al.* 1996)

การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Trichoderma longibrachiatum* ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.5 ถึง 6.5 เมื่อเชื้อเจริญจะทำให้พีเอชเพิ่มขึ้นอีก 0.5 ถึง 1.2 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสคือพีเอช 6.5 ถึง 7.7 และพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือพีเอช 4.8 ถึง 5.8 (Roger and Nakas. 1989)

พีเอช 3.5 ถึง 6.0 มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสคือ 4.5 ถึง 4.6 และพีเอชที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ไซลาเนสคือ 5.2 (Gome *et al.* 1992)

การทดลองผลิตเอนไซม์ไซลาโนไลติกจากเชื้อ *Aspergillus ochraceus*-42 ที่พีเอช 6.5 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด โดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (หญ้าบด) ร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Das and Nanda. 1994)

เอนไซม์ดี-ไซลาเนสที่ได้จากการผลิตของเห็ด *Schizophyllum radiatum* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอช 4.9 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคืออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และจะคงตัวในช่วงพีเอชที่แตกต่างกันคือ เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 77.3 ที่พีเอช 4.0 หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 25 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 94.6 ที่พีเอช 4.6 และมีกิจกรรมสัมพัทธ์ ร้อยละ100 ที่พีเอช 5.0 ถึง 7.5 แต่กิจกรรมสัมพัทธ์จะลดลงเหลือร้อยละ 98 ที่พีเอช 8.0 (Cavazzoni *et al.* 1989)

การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (carboxymethylcellulase) และเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Cellulomonas* และ *Micrococous* spp. พบว่ามีการผลิตเอนไซม์เมื่อพีเอชอยู่ในช่วง 6.0 ถึง 7.0 (Saxena *et al.* 1991) และจากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของ *Cyathus stercoreus* พบว่าอยู่ที่ 5.6 และพีเอชที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์คือ 5.5 แต่จะคงตัวที่พีเอชในช่วงกว้างคือ 4.5 ถึง 7.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Saxena *et al.* 1994)

การผลิตเอนไซม์จาก *Bacillus amyloliquefaciens* มีพีเอชที่เหมาะสมประมาณ 6.8 ถึง 7.0 ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 4.0 ถึง 7.5 และจะคงตัวที่พีเอช 9.0 (Breecia *et al.* 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขณะที่เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่ผลิตจากเชื้อ *Thermomonospora fusca* BD25 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ 7.0 ถึง 8.0 แต่ที่พีเอช 4.5 และ 10.5 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 50 และที่พีเอช 2.0 และ 12.0 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 30 (Trigo and Ball. 1994) จากการศึกษาของ McCarthy *et al.* (1992) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสคือ 4.5 ถึง 8.0 เอนไซม์เอนโดกลูโคเนสจะมีพีเอชที่เหมาะสมที่ 6.0

เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* DSM5826 จะทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 4.5 ถึง 6.5 โดยพีเอชที่เหมาะสมคือ 5.0 ถึง 7.0 เอนไซม์จะคงตัวที่พีเอช 5.0 ถึง 9.0 ซึ่งเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมน้อยกว่าร้อยละ 15 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ที่พีเอช 12.0 จะสูญเสียกิจกรรมร้อยละ 30 และที่พีเอชต่ำจะสูญเสียกิจกรรมเช่นกันคือที่พีเอช 4.0 เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมร้อยละ 30 ภายใน 3 วัน และพีเอช 3.0 เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมจนหมดภายในเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (Cesar and Mrsa. 1996)

2.8.4 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces viridosporus* T7A คือ 65 ถึง 70 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ที่ผลิตได้มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส (Magnuson and Crawford. 1997)

เชื้อ *Cellulomonas* และ *Micrococcus* spp. เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดจากการผลิตของ *Micrococcus* DS15 และ GS2 คือที่อุณหภูมิ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส (Saxena *et al.* 1991)

เอนไซม์จาก *Bacillus amyloliquefaciens* MIR32 มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสขึ้นไป เอนไซม์จะถูกทำลาย ถึงแม้ว่าที่อุณหภูมิสูงกิจกรรมของเอนไซม์จะเกิดได้ดี แต่เมื่ออุณหภูมิสูงเกินไปจะทำลายเอนไซม์ซึ่งก็จะไม่สามารถเกิดกิจกรรมได้เช่นกัน (Breccia *et al.* 1998)

เชื้อ *Cyathus stercoreus* จะเจริญที่อุณหภูมิตั้งแต่ 45 องศาเซลเซียสลงมา และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือที่ 30 องศาเซลเซียส หลังจากเลี้ยง 9 ถึง 12 วัน เอนไซม์ที่ได้จะคงตัวที่ 25 ถึง 45 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกทำลายร้อยละ 60 และจะถูกทำลายหมดที่ 70 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 45 ถึง 50 องศาเซลเซียส (Saxena *et al.* 1994)

เห็ด *Schizophyllum radiatum* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ให้กิจกรรมสูงสุดที่ 55 องศา-เซลเซียส และมีครึ่งชีวิตของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นอุณหภูมิที่มีความคงตัวที่สุด และมีความคงตัวน้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยมีครึ่งชีวิตของเอนไซม์ที่ 2.3 ชั่วโมง และเอนไซม์จะมีความไวต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียส (Cavazzoni *et al.* 1989)

กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากเชื้อ *Thermomonospora fusca* BD25 จะสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเป็น 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะคงตัวที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส โดยมีครึ่งชีวิตเท่ากับ 70 และ 40 นาที ตามลำดับ แต่เอนไซม์ไซลาเนสและเอนโดกลูโคเนสจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสูงกว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสคือ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไซลาเนสจะคงตัวที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นานกว่า 30 นาที และเอนไซม์ เอนโดกลูโคเนสคงตัวที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (Trigo and Ball. 1994)

Thermomyces lanuginosus DSM5826 ผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์จะคงตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แต่ถ้าเติมกลีเซอรอล (glycerol) เบต้า-เมอแคปโตเอทานอล (β-mercaptoethanol) หรือพอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) จะสามารถเก็บได้ถึง 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมถึงร้อยละ 70 และเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกทำลายมากกว่าร้อยละ 90 ภายในเวลา 40 นาที (Cesar and Mrsa. 1996)

2.8.5 ผลของเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

การเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีท *Thermomonospora fusca* BD25 เพื่อผลิตเอนไซม์ 3 ชนิด คือเอนโดไซลาเนส เอนโดกลูโคเนส และเพอร์ออกซิเดส พบว่ามีการผลิตในระยะแรกของการเจริญ และกิจกรรมเอนไซม์จะสูงสุดจนถึงปลายระยะเอ็กโพเนนเชียล (exponential phase) ประมาณ 48 ถึง 96 ชั่วโมง (Trigo and Ball. 1994)

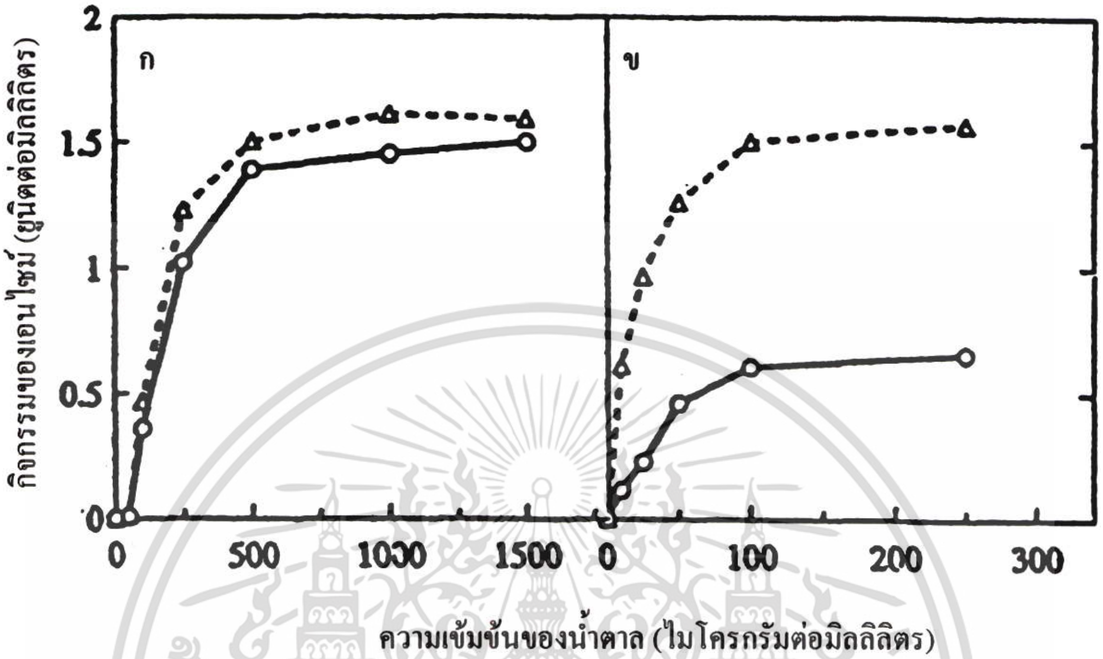
Gattinger *et al.* (1990) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้โคโนลามีล (conola meal) เป็นวัตถุดิบ ใช้ระยะเวลาเลี้ยง 9 ถึง 12 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศา-เซลเซียส และความเร็วรอบที่ใช้คือ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในช่วงวันที่ 9 ถึง 12

2.8.6 ผลของสารยับยั้งและสารเหนี่ยวนำต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

Xu *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ไซลาเนสที่ถูกชักนำโดยแอล-ซอร์โบส (L-sorbose) ในเชื้อรา *Trichoderma reesei* PC-3-7 โดยได้ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศา-เซลเซียส ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที พบว่า แอล-ซอร์โบสจะมีผลต่อการชักนำไซลาเนส I (Xyn I) และไซลาเนส II (Xyn II) ใน *Trichoderma reesei* ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำตาลชนิดนี้อยู่จะทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโซโฟโรส (Sophorose) พบว่าแอล-ซอร์-โบสจะชักนำการผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าโซโฟโรส ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ผลของน้ำตาลแอล-ซอร์โบส (ก) และโซโฟโรส (ข) ที่มีต่อความเข้มข้นของเอนไซม์ใน *Trichoderma reesei* PC-3-7

○ กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

△ กิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนส

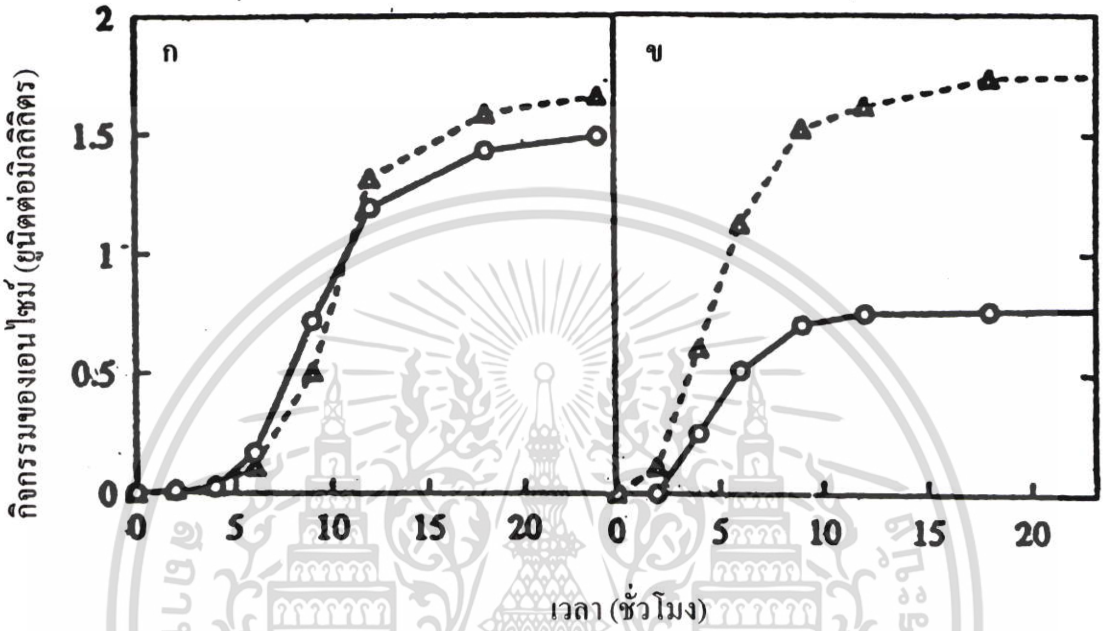
ที่มา : Xu *et al.* (1998)

เมื่อทำการศึกษาผลของแอล-ซอร์โบสต่อการผลิตเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (Xylanase activity) กับกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนส (Endogluconase activity) พบว่าแอล-ซอร์โบส ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วง 10 ชั่วโมงแรก กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจะสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนส แต่หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนสจะสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส และแอล-ซอร์โบส ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนสสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ดังรูปที่ 2.5

เมื่อทดลองใช้ไอออนของโลหะเป็นตัวยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ โดยใช้ Ca^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{2+}, K^{+}, Mg^{2+}, Sn^{2+}, Zn^{2+} และ EDTA แต่ละชนิดในปริมาณ 5 มิลลิโมลาร์ พบว่า Cu^{2+},

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fe^{3+} และ Hg^{2+} จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces viridosporus* T7A โดยไอออนเหล่านี้จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับอะซิดิกอะมิโนแอซิด (Acidic amino acid) ที่บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ ส่วนไอออนตัวอื่น ๆ จะไม่ทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (Magnuson and Crawford. 1997)



รูปที่ 2.5 แนวโน้มของเอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำในแอล-ซอร์โบส (ก, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และโซโฟโรส (ข, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

○ กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

△ กิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนส

ที่มา : Xu *et al.* (1998)

เชื้อ *Aspergillus ochraceus* 42 ที่เจริญบนหญ้าบดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสและเบต้า-ไซโลซิเดสสูงสุดเป็น 6.46 และ 5.00 ตามลำดับ แต่เมื่อความเข้มข้นของอาหารเพิ่มขึ้น กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์จะลดลง เนื่องจากมีการหลั่งโปรตีนที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific protein) ออกมาปนกับอาหารมากขึ้น นอกจากนี้ไอออนของโลหะต่าง ๆ ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Ca^{2+}, Co^{2+}, K^{+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} และ EDTA แต่ละชนิดในปริมาณ 10 โมลาร์ต่อลิตร จะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาแซ็กคาริฟิเคชัน (saccharification) ของลิกโน-เซลลูโลสในหญ้า พบว่าไอออนของโพแทสเซียมและไอออนของสังกะสีจะเหนี่ยวนำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แซ็กคาริฟิเคชันได้ดีกว่าไอออนของแมกนีเซียม แคลเซียม และแมงกานีส ซึ่งไอออนที่เติมลงไปที่มีผลต่อแซ็กคาริฟิเคชันมีดังนี้ Ca^{2+} ร้อยละ 15.12 Co^{2+} ร้อยละ 18.49 K^{+} ร้อยละ 8.43 Mg^{2+} ร้อยละ 20.55 Zn^{2+} ร้อยละ 30.88 และ EDTA ร้อยละ 16.48 (Das and Nanda. 1994)

2.8.7 ผลของทวีน 80 (tween 80) ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ทวีน 80 เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Cyathus stercoreus* โดยทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างทวีน 80 น้ำมันมะกอก และกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าการผลิตเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเป็น 1,000 ถึง 1,350 ยูนิตต่อลิตร ซึ่งทวีน 80 มีผลต่อการผลิตมากที่สุด โดยผลิตได้ถึง 1,350 ยูนิตต่อลิตร (Saxena *et al.* 1994)

2.9 การทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์

มีนักวิจัยหลายท่านศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ซึ่งมีขั้นตอนที่แตกต่างกัน เช่น Tsujibo *et al.* (1990) นำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Nocardiopsis dassonvillei* มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออีเซลลูโลไฟน์ เอ-800 (DEAE-cellulofine A-800) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอ-ไรด์ ความเข้มข้น 0 ถึง 1.0 โมลาร์ และนำมาทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-75 (Sephadex G-75) ซึ่งได้โปรตีน 3 ชนิดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส คือ X-I, X-II และ X-III ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8.01, 7.51 และ 6.02 เท่า ตามลำดับ โดยมีผลได้ (yield) ของเอนไซม์เป็นร้อยละ 3.6, 6.3 และ 3.3 ตามลำดับ

Ito *et al.* (1992) นำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus kawachii* มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 0 ถึง 60 และนำมาผ่านไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) บนดีอีเออี-5พีดับเบิลยู (DEAE-5PW) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0 ถึง 1.5 โมลาร์ และนำมาทำโครมาโท-กราฟีบนจี3000-เอสดับเบิลยู (G3000-SW) ได้โปรตีนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 3 ชนิด คือ XylA, XylB และ XylC ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 5.90, 6.17 และ 2.93 เท่า ตามลำดับ และมีผลได้ (yield) ของเอนไซม์เท่ากับร้อยละ 15, 21 และ 6 ตามลำดับ

Ruiz-Arribas *et al.* (1995) นำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces halstedii* JM8 มาทำให้บริสุทธิ์โดยการกรองผ่าน polysulfone membrane ที่มี molecular weight cut off 10,000 ดาลตัน และนำมาทำฟาสท์เพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (FPLC) จากนั้นชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0 ถึง 0.15 โมลาร์ ได้โปรตีนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 2 ชนิด คือ Xyl1L และ Xyl1S

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ishihara *et al.* (1997) นำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อราที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic fungus) สายพันธุ์ HG-1 มาทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวร้อยละ 20 ถึง 80 แล้วนำมาทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) และซีเอ็ม-เซฟาเด็กซ์ ซี-50 (CM-sephadex C-50) และชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0 ถึง 2.0 โมลาร์ จากนั้นนำมาทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาเด็กซ์จี-150 (Sephadex G-150) ได้ไซลาเนส 1 ชนิด ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.79 เท่า และมีผลได้ของเอนไซม์ร้อยละ 0.7

Lopez-Fernandez *et al.* (1998) ทำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces chattanoogensis* CECT 3336 ให้บริสุทธิ์โดยนำมาทำโครมาโทกราฟีบนซีเอ็ม-ไบโอเจล (CM-Biogel) และทำโครมาโทกราฟีที่ใช้ไซแลนเป็นตัวกลางเพื่อจับกับโปรตีน ซึ่งได้ไซลาเนส 1 ชนิด โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 291.8 เท่า และมีผลได้ของเอนไซม์ร้อยละ 17.7

Breccia *et al.* (1998) นำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* มาทำให้บริสุทธิ์ โดยนำมาทำให้เข้มข้นด้วยดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) และนำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 0 ถึง 40 จากนั้นนำมาทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาโรส 4บี (Sepharose 4B) ได้เอนไซม์ไซลาเนส 1 ชนิด ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.3 เท่า และมีผลได้ของเอนไซม์ร้อยละ 53.9

Xu *et al.* (1998) นำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Trichoderma ressei* PC-3-7 มาทำให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีบนเซฟาคริล เอส-100 (Sephacryl S-100) จากนั้นนำมาทำโครมาโทกราฟีบนซีเอ็ม-เซฟาโรส เอฟเอฟ (CM-Sepharose FF) ซึ่งได้เอนไซม์ไซลาเนส 1 ชนิด ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.3 เท่า และมีผลได้ของเอนไซม์ร้อยละ 7.9

2.10 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในระดับอุตสาหกรรม

2.10.1 การใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการฟอกเยื่อกระดาษ เพื่อกำจัดลิกนินและลดการใช้คลอรีน

การฟอกเยื่อไม้เพื่อผลิตกระดาษมีปริมาณมากที่สุดถึง 160 ล้านเมตริกตันต่อปีทั่วโลก ในขณะเดียวกันก็เป็นการกำจัดลิกนินที่ก่อให้เกิดสีน้ำตาลเข้มในกระบวนการฟอกเยื่อไม้ ซึ่งมีการใช้สารเคมีพวกคลอรีนเบส (chlorine-based) ในการช่วยฟอกลิกนินที่ละลายน้ำที่เกิดจากการผลิต ทำให้น้ำมีสีเข้มขึ้นและก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนั้นยังพบสารพิษไดออกซิน (dioxin) ในน้ำเสียที่เกิดจากการฟอกเยื่อไม้อีกด้วย จึงมีการคิดค้นหาวิธีที่จะลดปริมาณการใช้คลอรีนในการฟอกเยื่อไม้ลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces thermoviolaceus* นำมาใช้ในการทดสอบการฟอกเยื่อไม้ โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึง 10 ปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณสับสเตรทเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด โดยใช้เยื่อไม้ร้อยละ 1, 2, 5, 7 และ 10 กำหนดให้ใช้เอนไซม์ต่อสับสเตรทในสัดส่วน 10 ยูนิต ต่อ 1 กรัมเยื่อไม้ ที่ความเข้มข้นเยื่อไม้ร้อยละ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ค่อนข้างคงที่ เมื่อใกล้เวลาชั่วโมงที่ 6 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สำหรับความเข้มข้นอื่น ๆ เอนไซม์จะหลั่งต่อไปเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 10 จะเริ่มคงที่ ที่ความเข้มข้นของเยื่อไม้ที่ร้อยละ 5 จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 10 ยูนิตต่อกรัมเยื่อไม้ ที่ความเข้มข้นเยื่อไม้ตั้งแต่ร้อยละ 2 ขึ้นไป จะมีการหลั่งน้ำตาลรีดิวซ์อยู่เรื่อย ๆ ขณะที่ความเข้มข้นเยื่อไม้ร้อยละ 1 จะพบน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณเท่าเดิมเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง จากการตรวจน้ำตาลรีดิวซ์นี้ แสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท (Garg *et al.* 1996)

Buchert *et al.* (1994) ได้ทำการศึกษาการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ พบว่ามีปัญหาที่เกิดจากการใช้คลอรีน (Chlorine) ในอุตสาหกรรมฟอกขาวของกระดาษคือคลอรีนส่วนหนึ่งจะกลายเป็นก๊าซและบางส่วนจะกลายเป็นคลอรีนไดออกไซด์ (Chlorine dioxide) ซึ่งเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม จึงได้นำเอนไซม์ไซลาเนสมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกขาวแทนคลอรีนซึ่งจะไม่เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

2.10.2 การผลิตและการนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์ในการไฮโดรไลซิสของเสียทางการเกษตร

ของเสียทางการเกษตรเช่น ฟางข้าว รำข้าวสาลี ฟางข้าวสาลี ผงเซลลูโลส กระดาษ หางนม และอื่น ๆ อีกมากมายที่สามารถนำมาเป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์ แต่มีปัญหาตรงที่ว่ากระบวนการแปรสภาพวัตถุดิบ เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์นั้นต้องใช้ต้นทุนสูง ดังนั้นจึงต้องใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก รำข้าวสาลีและฟางข้าวซึ่งเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งที่ได้จากการเกษตรและมีปริมาณมาก สามารถนำมาใช้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และดี-ไซลาเนส โดยใช้จุลินทรีย์พวกเซลลูโลไลติกเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น *Aspergillus ustus*, *Trichoderma* sp., *Botrytis* sp. และ *Sporotrichum pulverlentum* โดยเปรียบเทียบในสับสเตรทระหว่างฟางข้าวและรำข้าวสาลี ใช้การหมักแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semi solid fermentation)

การย่อยสลายมวลชีวภาพของพืชในธรรมชาติเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ จากการศึกษาการใช้เชื้อผสมระหว่างจุลินทรีย์ 2 ชนิด เพื่อดูกิจกรรมของเบต้า-ดี-กลูโคซิเดส พบว่าไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ได้ เพราะว่าผลผลิตจากการเมตาโบไลต์ของจุลินทรีย์ชนิดแรกจะยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

ฟางข้าวเป็นสับสเตรทที่ดีสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและดี-ไซลาเนสรูปแบบอื่น จากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส พบว่าโปรตีนที่ได้จากฟางข้าวเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นร้อยละ 7 ในขณะที่รำข้าวสาลีปริมาณโปรตีนจะลดลงจากร้อยละ 14 เหลือร้อยละ 10 เป็นไปได้ที่จุลินทรีย์ใช้โปรตีนในรำข้าวสาลีเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายนี้สามารถนำไปใช้เลี้ยงสัตว์ได้ (Shamala and Sreekantiah. 1987)

2.10.3 การใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสเพื่อแก้ปัญหาทางด้านพลังงานและการขาดแคลนอาหาร

ของเสียทางการเกษตรสามารถเปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาลได้โดยเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสจากจุลินทรีย์ 2 ชนิดคือ *Sporotrichum pruinosum* และ *Arthrographis* sp. **โดย** *Sporotrichum pruinosum* และ *Arthrographis* sp. สามารถเกิดไฮโดรไลซิสสูงสุดประมาณร้อยละ 15.1 **และร้อยละ** 7.5 **ตามลำดับ เมื่อใช้เปลือกแตงโมเป็นสับสเตรท ซึ่งการทำสับสเตรทให้มีสภาพเป็นด่างสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ จากการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่ละลายน้ำโดยใช้วิธี** HPLC **จะพบกลูโคสมากที่สุดและไซโลไบโอสในปริมาณเล็กน้อย ส่วนผลผลิตพวก ไซลาโนไลซิสส่วนมากจะเป็นพวกไซโลโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ สำหรับไซโลไบโอสพบว่ามีไซโลสและอะราบิโนสในปริมาณน้อย** (Okeke and Obi. 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. **เครื่องวัดพีเอช ของบริษัท** Denver Instrument **รุ่น** Model 215
2. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน ของบริษัท HIRAYAMA รุ่น HA-300 MIV
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ของบริษัท HACA รุ่น DR/4000V
4. เครื่องอังน้ำ ของบริษัท Clifton รุ่น unstirred bath
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง ของบริษัท Hermle รุ่น z 383 k
6. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LIBROR EB–4000 H
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S
8. ตู้เขี่ยเชื้อ ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT123
9. ตู้ดูดควัน ของบริษัท ASTEC รุ่น Astecair 5000 E
10. ตู้บ่มเชื้อ ของบริษัท Memmert รุ่น BE600
11. เครื่องเขย่า ของบริษัท GALLENKAMP
12. ตู้อบลมร้อน ของบริษัท WTB binder รุ่น ED53
13. เครื่องผสมสาร (vortex) ของบริษัท IKA® รุ่น MS 1 Minishaker
14. Hot plate stirrer ของบริษัท BARNSTAD/THERMOLYNE รุ่น SP46920-26
15. ไมโครปิเปตต์ ของบริษัท GIBTHAI
16. กล้องจุลทรรศน์ ของบริษัท Olypus รุ่น CHS 3
17. เครื่องอัลตราฟิวเตรชัน ของบริษัท Millipore รุ่น XFUF 047710
18. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (heamacytometer) ของบริษัท Boeco (Improved Neubauer)
19. กระดาษกรอง เบอร์ 4 ของบริษัท Whatman
20. กระดาษกรอง เบอร์ 1 ของบริษัท Whatman
21. ตู้เย็น ของบริษัท SANYO
22. เครื่องบดอาหาร ของบริษัท Moulinex
23. ถุงไดอะไลซิส ของบริษัท Spectra/Por®
24. คิวเวต ของบริษัท Starna® Brand
25. เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. โพเตโตเด็กซ์โตรสอาการ์ (PDA) ของบริษัท Scharlau
2. น้ำตาลไซโลส (xylose) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
3. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
4. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
5. แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NH_4HPO_4) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
6. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ของบริษัท Fluka
7. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
8. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
9. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
10. ซิงค์ (II) คลอไรด์ ($ZnCl_2$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
11. เฟอร์รัส (III) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
12. คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
13. แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
14. ยูเรีย (urea) ของบริษัท J. T. Baker
15. เฟอร์รัส (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 5H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
16. ซิงค์ (II) ซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
17. แมงกานีส (II) ซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 5H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
18. โคบอลต์ (II) คลอไรด์ (CoCl) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
19. ยีสต์สกัด (yeast extract) ของบริษัท Scharlau
20. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco
21. โปรติโอสเปปโตน (proteose peptone) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
22. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
23. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4 \cdot 5H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
24. oat spelts xylan ของบริษัท Sigma

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Scharlau
26. Congo Red ของบริษัท Merck
27. โซเดียมบอเรตเดคะไฮเดรต ($NaB_4O_7 \cdot 10H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
28. แอมโมเนียมโมลิบเดรตเตตระไฮเดรต($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) ของบริษัท Fluka

3.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

1. กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid) ของบริษัท Sigma
2. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
4. oat spelts xylan ของบริษัท Sigma
5. คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสโซเดียม (carboxymethylcellulose sodium) ของบริษัท Sigma
6. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Fluka
7. ไซโลส (xylose) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
8. กรดซิตริก (citric acid) ของบริษัท AnalaR®
9. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตระไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)ของบริษัท Merck
10. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Fluka
11. ทริสเบส (Tris-base) ของบริษัท USB
12. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท J. T. Baker
13. ซอร์บิทอล (sorbitol) ของบริษัท Sigma
14. แมนนิทอล (mannitol) ของบริษัท Scharlau

3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กลูโคซามีน

1. อะซิทิลอะซิโตน (acetyl acetone) ของบริษัท Sigma
2. กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (glucosaminehydrochloride) ของบริษัท Sigma
3. ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (dimethylaminobenzaldehyde) ของบริษัท Fluka
4. โซเดียมคาร์บอเนต ของบริษัท (Na_2CO_3) Carlo Erba Reagenti
5. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท J. T. Baker
6. เอทานอล (ethanol) ขององค์การสุรา กรมสรรพสามิต จังหวัดฉะเชิงเทรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

1. **คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตระไฮเดรต** ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) **ของบริษัท** Scharlau
2. **โซเดียมไฮดรอกไซด์** (NaOH) **ของบริษัท** Carlo Erba Reagenti
3. **โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต** (sodium potassium tartrate) **ของบริษัท** Carlo Erba Reagenti
4. **โบวีนซีรัมอัลบูมิน** (bovine serum albumin) **ของบริษัท** Fluka
5. Folin-Ciocalteu's phenol reagent **ของบริษัท** Fluka

3.3 เชื้อจุลินทรีย์

Aspergillus foetidus TISTR 3159, *Aspergillus foetidus* TISTR 3173 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 **จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง** potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) **บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ถึง 7 วัน เพื่อให้ผลิตสปอร์เต็มที่ จากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส**

3.4 การเตรียมสับสเตรท

นำต้นธูปฤาษีส่วนที่เป็นลำต้นและใบมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำต้นธูปฤาษีที่อบแห้งแล้วมาบดด้วยเครื่องบดอาหารจนละเอียด และเก็บในขวดป้องกันความชื้น

3.5 การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนจากธรรมชาติ

นำตัวอย่างดินซึ่งเก็บจากบริเวณที่มีธูปฤาษีเจริญในจังหวัดราชบุรีและจังหวัดนครปฐม (ตารางที่ 3.1 และตารางที่ 3.2) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 90 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจาง และนำตัวอย่างที่มีระดับความเจือจางที่ 10^{-2}, 10^{-3} **และ** 10^{-4} **มา** spread plate **บนอาหาร** minimal medium **ที่มีธูปฤาษีเป็นสับสเตรท (ภาคผนวก ก) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ถึง 3 วัน เก็บโคโลนีที่เจริญนำมา** streak plate **จนได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บในอาหารวุ้นเอียง** minimal medium **ที่มีไซแลนเป็นสับสเตรท จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์มาทดสอบการสร้างวงใส** (clear zone) **โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร** xylan medium **(ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ถึง 3 วัน และวัดขนาดของโคโลนี และขนาดของวงใสรอบโคโลนีที่เกิดขึ้นหลังจากย้อมด้วย** congo red **ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แหล่งที่เก็บตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดิน	แหล่งที่เก็บตัวอย่างดิน
A	ท้าวอู่ทอง ซอย 3 ถนนท้าวอู่ทอง ตำบลดอนตะโก อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี
B	บ้านห้วยหมู หมู่ 4 ทางหลวงหมายเลข 3208 (ราชบุรี-ห้วยไผ่) กิโลเมตรที่ 1.7 ตำบลหน้าเมือง อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี
C	เคหะชุมชนราชบุรี ถนนเพชรเกษม กิโลเมตรที่ 103 ตำบลหน้าเมือง อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี
D	เยื้องเจดีย์หัก ตำบลเจดีย์หัก อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี
E	ทางหลวงหมายเลข 3087 (เขางู-เบิกไพร) ตำบลเขางู อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี
F	หน้าท่าข้าวเขาแร้ง ทางหลวงหมายเลข 3087 (เขางู-เบิกไพร) ตำบลเขาแร้ง อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี
G	ข้างท่าข้าวนางแก้ว ทางหลวงหมายเลข 3087 (เขางู-เบิกไพร) ระหว่างกิโลเมตรที่ 14 ถึง 15 อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี
H	สาย 3089 ใกล้แยกสาย 3089 กับ 3090 (บ้านโป่ง-โพธาราม) ตำบลเตาปูน อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี
I	ทางหลวงหมายเลข 3090 กิโลเมตรที่ 4 ตำบลท่าชุมพล อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี
J	เยื้องสิริเดือนเพ็ญ (ปั๊ม ปตท.) ทางแยกเข้าตลาดโพธาราม อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี
K	ถนนเพชรเกษม (สายเก่า) กิโลเมตรที่ 87 ตำบลบ้านฆ้อง หมู่ 3 อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี
L	หน้าศูนย์การศึกษานอกโรงเรียนภาคกลาง (ค่ายลูกเสือโพธาราม) ถนนเพชรเกษม กิโลเมตรที่ 84.6 อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี
M	บริเวณสามแยกกระจับ ตรงข้ามร้านฉางทอง ถนนเพชรเกษม (สายเก่า) ตำบลหนองอ้อ อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี
N	เยื้องพัฒนบริหารธุรกิจ ถนนเพชรเกษม กิโลเมตรที่ 67.8 ตำบลสระกระเทียม อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	แหล่งที่เก็บตัวอย่างดิน
O	ตรงข้ามฟอร์ด เตชอัมพร ราชบุรี ตำบลวังเย็น อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี
P	ทางหลวงหมายเลข 325 (บางแพ-ดำเนินสะดวก) กิโลเมตรที่ 7 บ้านดอนเซ่ง ตำบลบางแพ อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี
Q	ทางหลวงหมายเลข 325 (บางแพ-ดำเนินสะดวก) กิโลเมตรที่ 11.4 ตำบลหัวโพธิ์ อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี
R	ทางหลวงหมายเลข 325 (บางแพ-ดำเนินสะดวก) กิโลเมตรที่ 18 บ้านโคกวัด อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี
S	เยื้องโรงงานซีอิ๊ว ตราสิงโต ทางหลวงหมายเลข 325 (บางแพ-ดำเนินสะดวก) กิโลเมตรที่ 22.5 ตำบลดอนกรวย อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี
T	หน้าวัดหลวงพ่อสด ทางหลวงหมายเลข 325 (บางแพ-ดำเนินสะดวก) กิโลเมตรที่ 14.3 ตำบลดอนกรวย อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี

ตารางที่ 3.2 ลักษณะของตัวอย่างดินแหล่งต่าง ๆ

ตัวอย่างดิน	ลักษณะของตัวอย่างดิน
A	ดินปนหินเล็กน้อย มีสีดำและสีน้ำตาลเข้ม ดินร่วนปนหินและมีเศษซากพืชปน มีความชื้นเล็กน้อย
B	ดินสีดำน้ำตาล มีเศษซากพืชปน ค่อนข้างมีความชื้น (เกือบเป็นโคลน)
C	ดินเนื้อละเอียด สีน้ำตาลเข้ม มีซากพืชปนเล็กน้อย มีความชื้นมาก (โคลน)
D	ดินสีน้ำตาลอ่อน มีหินทรายปนอยู่มาก มีเศษซากพืชปน มีความชื้นมาก (เกือบเป็นโคลน)
E	ดินสีน้ำตาล มีหินปนเล็กน้อย เนื้อดินละเอียด มีซากพืชปนบ้าง มีความชื้นค่อนข้างมาก
F	ดินสีน้ำตาลเข้ม เนื้อดินละเอียด มีซากพืชปน มีความชื้นค่อนข้างสูง
G	ดินร่วน มีสีน้ำตาลเข้ม ค่อนข้างแห้ง ไม่ค่อยมีซากพืชปน
H	ดินสีน้ำตาลอ่อน เนื้อดินละเอียด มีซากพืชปน มีหินปนเล็กน้อย มีความชื้นค่อนข้างมาก
I	ดินสีน้ำตาล เนื้อดินละเอียด มีเศษซากพืช มีความชื้นมาก (โคลน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	ลักษณะของตัวอย่างดิน
J	ดินทรายสีน้ำตาล มีความชื้นเล็กน้อย มีซากพืชปน
K	ดินสีน้ำตาล เนื้อดินละเอียด มีซากพืชปน มีความชื้นมาก
L	ดินร่วนสีดำ มีซากพืชปน มีความชื้นเล็กน้อย
M	ดินสีดำ มีเศษซากพืชปนค่อนข้างมาก เนื้อดินละเอียด มีความชื้นบ้าง
N	ดินมีหินทรายปนอยู่มาก สีน้ำตาลดำ แห้ง มีซากพืชปนอยู่บ้าง
O	ดินร่วน มีความชื้นเล็กน้อย มีสีน้ำตาลเข้ม มีซากพืชปนเล็กน้อย
P	ดินมีหินทรายปนอยู่มาก มีสีน้ำตาลดำ มีเศษซากพืช แห้ง
Q	ดินสีดำ มีซากพืชปนอยู่มาก ดินร่วนเนื้อละเอียด มีความชื้นเล็กน้อย
R	ดินดำ มีเศษซากพืชปน ดินร่วน มีความชื้นเล็กน้อย
S	ดินละเอียด สีน้ำตาลเข้ม มีซากพืชปนมาก
T	ดินร่วน สีดำ มีเศษซากพืชปน แห้ง

3.6 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

3.6.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติลงบนอาหารวุ้นเอียง minimal medium ที่มีไซแลนเป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ถึง 3 วัน จากนั้นนำมาทำให้เป็นสารละลายโดยการเติมน้ำเกลือร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ จำนวนเซลล์ที่ใช้มีความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.6.2 การเตรียมเชื้อรา

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติลงบนอาหารวุ้นเอียง minimal medium ที่มีไซแลนเป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ถึง 3 วัน จากนั้นนำมาทำให้เป็นสารละลายโดยการเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ และเติมทวีน 80 จำนวน 1 หยด จำนวนสปอร์ที่ใช้มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

ชั่งธูปฤาษี 2 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติม feed solution (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.6 ลงในฟลาสก์โดยใช้ปริมาณร้อยละ 5 (100 ไมโครลิตร) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน

3.8 การสกัดเอนไซม์

นำตัวอย่างมาสกัดเอนไซม์โดยเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.8 ที่แช่เย็น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และทวีน 80 จำนวน 1 หยด ลงในฟลาสก์ที่ทำการหมัก จากนั้นนำตัวอย่างที่สกัดได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสตามวิธีของ Bailey *et al.* (1992) (ภาคผนวก ข) และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mandels and Weber (1969) (ภาคผนวก ข)

3.9 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

3.9.1 ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ความชื้นเริ่มต้นของอาหารที่ศึกษา คือร้อยละ 60, 70 และ 80 ซึ่งปรับความชื้นของอาหารโดยใช้ปริมาตร feed solution จากนั้นนำอาหารที่ปรับความชื้นเริ่มต้นแล้วมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 3.6 ปริมาณร้อยละ 5 (100 ไมโครลิตร) นำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน และนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.9.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

เมื่อทราบความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากข้อ 3.9.1 แล้ว นำมาศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ ยีสต์สกัด โปรติโอสเปปโตน ทริปโตน แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรีย โดยชุดควบคุมใช้แหล่งไนโตรเจน คือ แอมโนเนียมซัลเฟต โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้นนำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 3.6 ปริมาณร้อยละ 5 (100 ไมโครลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน และนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

จากข้อ 3.9.1 และ 3.9.2 เมื่อทราบความชื้นเริ่มต้นและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แล้ว นำมาศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยปรับพีเอชของอาหารเป็นพีเอช 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นนำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 3.6 ปริมาณร้อยละ 5 (100 ไมโครลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน และนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.10 ผลการ pre-treatment ธูปฤาษี

3.10.1 การ pre-treatment ธูปฤาษี

ทำการ pre-treatment ธูปฤาษี โดยชั่งธูปฤาษี 200 กรัม จากนั้นนำมาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออกด้วยน้ำกลั่นจนหมด จากนั้นนำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และนำมาบดให้ละเอียด แล้วเก็บในขวดป้องกันความชื้น

3.10.2 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากสับสเตรทที่ผ่านการ pre-treatment

ชั่งธูปฤาษีที่ผ่านการ pre-treatment แล้ว 2 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติม feed solution สูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้างต้น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมานึ่งฆ่า-เชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.6 ลงในฟลาสก์โดยใช้ปริมาณร้อยละ 5 (100 ไมโครลิตร) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน และนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ เปรียบเทียบกับธูปฤาษีที่ไม่ผ่านการ pre-treatment

3.11 ผลการเปรียบเทียบสับสเตรทอื่นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ชั่งสับสเตรทชนิดต่าง ๆ คือ รำหยาบ รำละเอียด แกลบ ชานอ้อย และเปลือกฝักถั่วเหลือง 2 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติม feed solution สูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้างต้น โดยปรับให้มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อ 3.6 ลงในฟลาสก์โดยใช้ปริมาณร้อยละ 5 (100 ไมโครลิตร) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน และนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ เปรียบเทียบกับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้ธูปฤาษีเป็นสับสเตรท

3.12 ผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งกับสภาวะการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบอาหารเหลว

ชั่งธูปฤาษี 2 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติม feed solution สูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้างต้น โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง feed solution กับน้ำกลั่นเท่ากับ 1 ต่อ 20 นำมาผสมให้เข้ากัน แล้วนำมานึ่ง ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.6 ลงในฟลาสก์โดยใช้ปริมาณร้อยละ 5 (100 ไมโครลิตร) แล้วนำมาเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน และนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ เปรียบเทียบกับการผลิตในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งดังที่กล่าวในข้อ 3.7 โดยใช้สภาวะการผลิตที่ศึกษาข้างต้น

3.13 ผลของการเก็บรักษาเอนไซม์ไซลาเนสในรูปของสารละลาย

นำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องอัลตราฟิวเตรชัน โดยใช้เมมเบรนที่มีขนาด molecular weight cut off เท่ากับ 10,000 ดาลตัน โดยทำการลดปริมาตรลงครึ่งหนึ่ง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาเติมสารช่วยรักษาความคงตัว (stabilizer) ชนิดต่าง ๆ คือ ซอร์บิทอล และแมนนิทอล โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 โมลาร์ โดยมีชุดควบคุมเป็นสารละลายเอนไซม์ที่ไม่มีการเติมสารช่วยรักษาความคงตัว แล้วเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4, 20 และ 30 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ตัวอย่างทุก 10 วัน เป็นเวลา 30 วัน

3.14 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

3.14.1 การสกัดกลูโคซามีนจากตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เก็บได้ในแต่ละวันมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียด ชั่งแต่ละตัวอย่าง 0.25 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 4 แล้วดูดส่วนใส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองอันใหม่ที่มีน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 30 และนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 และนำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

3.14.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Morgan-Elson (Van de Loo. 1976)

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.14.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายอะซิติลอะซิโตน ความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาต้มเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลาย Ehrlich reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

3.15 การทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial Purification)

นำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิ่มตัวต่าง ๆ คือร้อยละ 0 ถึง 20, 20 ถึง 30, 30 ถึง 40, 40 ถึง 50, 50 ถึง 60, 60 ถึง 70 และ 70 ถึง 85 ซึ่งในการตกตะกอนแต่ละขั้นของร้อยละความอิ่มตัว ใช้ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่คำนวณได้จากตารางปริมาณแอมโมเนียมซัลแฟต (ร้อยละความอิ่มตัว) ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนในภาคผนวก ง โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งกวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (megnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนแอมโมเนียมละลายหมด จากนั้นนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่มีความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้มาทำการตกตะกอนซ้ำ ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีร้อยละความอิ่มตัวเพิ่มขึ้น และนำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.8 ในปริมาณที่น้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด จากนั้นนำมาแยกเกลือออกโดยการทำไดอะไลซิสเป็นเวลานานข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก จากนั้นวัดปริมาตร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951) (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำเอนไซม์ที่ผ่านการไดอะไลซิสมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องอัลตราฟิวเตรชันที่มีเมมเบรนขนาด molecular weight cut off เท่ากับ 10,000 ดาลตัน โดยลดปริมาตรลงครึ่งหนึ่ง แล้วนำมาวัดปริมาตร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.16 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

3.16.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.15 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นนำเอนไซม์ที่เจือจาง ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายสับสเตรท ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มให้อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายไดไนโตรซาลิกไซลิก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3.16.2 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.15 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นนำเอนไซม์ที่เจือจาง ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายสับสเตรท ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ซึ่งมีพีเอชต่าง ๆ โดยแปรผันพีเอชที่ใช้ในการบ่มให้อยู่ในช่วงพีเอช 2.6 ถึง 9.0 โดยใช้บัฟเฟอร์ที่แตกต่างกันดังนี้ พีเอช 2.6 ถึง 6.0 ใช้ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ถึง 8.0 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และพีเอช 8.0 ถึง 9.0 ใช้ทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ และบ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการวิเคราะห์ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.16.1 เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายไดไนโตรซาลิกไซลิก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3.16.3 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิ

บ่มเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.15 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน ซึ่งได้จากข้อ 3.16.2 ที่อุณหภูมิในช่วง 10 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทันที จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ โดยมีชุดควบคุมเป็นเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่ม ซึ่งใช้สภาวะในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.16.2

3.16.4 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่อพีเอช

บ่มเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.15 ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ระบุในข้อ 3.16.2 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำมาปรับพีเอชเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน ซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 3.16.2 แล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลืออยู่ โดยมีชุดควบคุมเป็นเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่ม ซึ่งใช้สภาวะในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.16.2

3.16.5 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์ไซลาเนส

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.15 มาเจือจางให้มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 10 ถึง 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แล้วปิเปตต์มาปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับ oat spelt xylan ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ ร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 ปริมาตร 22.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที และนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่มีต่อไซแลน

3.16.6 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์เซลลูเลส

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.15 มาเจือจางให้มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 10 ถึง 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แล้วปิเปตต์มาปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมกับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสโซเดียม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือร้อยละ 0.1, 0.5, 1 และ 1.5 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที และนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

3.17 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนจากธรรมชาติ

ผลของการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนจากธูปฤาษี ซึ่งคัดเลือกจากตัวอย่างดิน 20 แหล่ง ในจังหวัดราชบุรีและจังหวัดนครปฐม พบว่ามีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซแลนจากธูปฤาษีจำนวน 131 ไอโซเลต (isolate) ซึ่งมีขนาดโคโลนี ขนาดวงใส และประสิทธิภาพในการย่อยสลายดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ขนาดโคโลนี ขนาดวงใส และประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากสภาพธรรมชาติ

รหัสเชื้อ	ขนาดของโคโลนี (มม.)	ขนาดของวงใส (มม.)	ประสิทธิภาพ
L 2-3	1.0	9.2	**9.20**
G 2-3	1.3	9.3	**7.15**
G 2-7	1.8	11.1	**6.17**
G 4-1	1.5	8.8	**5.87**
L 3-2	1.6	8.6	**5.38**
R 3-1	2.5	13.6	**5.44**
Q 2-8	1.7	8.9	**5.24**
I 4-3	1.9	9.8	**5.16**
S 2-4	1.9	9.8	**5.16**
L 2-2	1.6	8.2	**5.13**
Q 2-6	1.8	9.2	**5.11**
G 4-5	1.8	8.8	**4.89**
G 3-5	2.6	11.8	**4.54**
H 3-1	1.7	7.7	**4.53**
M 2-9	1.6	7.1	**4.44**
M 2-5	1.5	6.1	**4.07**
F 4-1	2.5	10.1	**4.04**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ขนาดของโคโลนี (มม.)	ขนาดของวงใส (มม.)	ประสิทธิภาพ
G 2-1	2.2	8.8	**4.00**
J 2-2	2.7	10.8	**4.00**
R 2-7	3.5	13.9	**3.97**
F 3-1	3.0	11.4	**3.80**
C4	2.1	7.9	**3.76**
C 4-1	2.6	9.7	**3.73**
I 2-1	2.4	8.4	**3.50**
L 3-5	5.2	18.9	**3.63**
K 2-1	2.0	7.1	**3.55**
C 3-2	2.4	8.4	**3.50**
A 3-1	2.5	8.7	**3.48**
Q 2-12	1.7	5.9	**3.47**
A 3-2	2.2	7.5	**3.41**
Q 4-3	1.7	5.5	**3.24**
A 2-1	2.6	8.4	**3.23**
M 2-4	3.0	9.5	**3.17**
H 3-2	1.9	5.8	**3.05**
G 2-4	2.4	7.3	**3.04**
P 4-2	2.7	8.1	**3.00**
L 2-7	3.2	9.5	**2.97**
Q 2-7	2.5	7.4	**2.96**
D 4-2	5.2	15.2	**2.92**
S 2-2	2.9	8.4	**2.90**
D 3-1	2.7	7.8	**2.89**
M 3-3	1.3	3.7	**2.85**
D 4-1	1.9	5.4	**2.84**
J 2-1	3.9	10.9	**2.79**
C 3-3	2.3	6.4	**2.78**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ขนาดของโคโลนี (มม.)	ขนาดของวงใส (มม.)	ประสิทธิภาพ
P 2-4	2.2	6.1	**2.77**
S 2-5	1.9	5.2	**2.74**
F 3-4	5.5	15.0	**2.73**
G 4-2	2.9	7.9	**2.72**
L 2-10	2.1	5.7	**2.71**
D 2-1	2.3	6.2	**2.70**
M 2-8	2.1	5.5	**2.62**
E 3-1	3.3	8.6	**2.61**
I 2-4	1.0	2.6	**2.60**
O 2-9	2.0	5.2	**2.60**
I 2-2	4.4	11.3	**2.57**
L 3-3	5.3	13.4	**2.53**
T 4-4	4.8	12.1	**2.52**
Q 3-7	1.6	4.0	**2.50**
O 2-8	2.8	6.9	**2.46**
M 2-3	2.2	5.4	**2.45**
H 2-1	4.2	10.3	**2.45**
Q 3-4	3.0	7.2	**2.40**
Q 4-7	4.1	9.7	**2.37**
G 2-5	2.2	5.2	**2.36**
I 4-1	1.7	4.0	**2.35**
F 2-1	6.5	15.2	**2.34**
Q 3-6	2.0	4.6	**2.30**
L 2-6	2.5	5.7	**2.28**
G 4-3	2.7	6.1	**2.26**
F 3-5	1.7	3.8	**2.24**
G 3-4	1.6	3.5	**2.19**
G 3-6	1.7	3.7	**2.18**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ขนาดของโคโลนี (มม.)	ขนาดของวงใส (มม.)	ประสิทธิภาพ
T 3-5	3.4	7.4	**2.18**
R 2-6	2.9	6.3	**2.17**
H 4-1	3.0	6.5	**2.17**
L 2-5	4.3	9.3	**2.16**
O 2-3	2.5	5.4	**2.16**
L 3-4	2.7	5.8	**2.15**
Q 3-3	4.0	8.5	**2.13**
J 3-1	2.6	5.5	**2.12**
Q 4-6	2.9	6.1	**2.10**
Q 3-9	2.4	5.0	**2.08**
M 3-2	2.7	5.6	**2.07**
Q 3-2	1.9	3.9	**2.05**
G 2-2	4.0	8.2	**2.05**
R 2-5	3.5	7.1	**2.03**
L 2-1	8.2	16.6	**2.02**
I 3-1	3.2	6.4	**2.00**
O 2-2	3.3	6.6	**2.00**
L 2-4	6.3	12.5	**1.98**
L 2-8	3.0	5.9	**1.97**
L 4-4	2.6	5.1	**1.96**
R 2-4	2.3	4.5	**1.96**
P 2-1	3.3	6.4	**1.94**
J 4-1	6.2	12.0	**1.94**
N 4-4	3.0	5.8	**1.93**
I 4-4	2.4	4.6	**1.92**
O 2-5	1.8	3.4	**1.89**
T 4-5	2.6	4.7	**1.81**
O 3-5	9.2	16.6	**1.80**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	**ขนาดของโคโลนี (มม.)**	**ขนาดของวงใส (มม.)**	**ประสิทธิภาพ**
F 4-3	9.3	16.3	**1.75**
R 3-2	3.2	5.2	**1.63**
M 2-1	4.4	6.9	**1.57**
T 4-3	3.9	6.1	**1.56**
Q 2-5	4.1	6.3	**1.54**
L 4-3	6.1	9.3	**1.52**
N 4-1	11.9	17.9	**1.50**
J 4-3	4.6	6.9	**1.50**
R 4-1	4.7	7.0	**1.49**
K 2-4	5.2	7.0	**1.35**
P 2-3	7.5	11.1	**1.48**
K 3-1	5.1	7.4	**1.45**
L 2-9	5.6	8.1	**1.45**
T 4-2	5.1	7.1	**1.39**
P 3-7	5.4	7.5	**1.39**
L 4-5	8.3	11.4	**1.37**
L 4-2	7.1	9.7	**1.37**
G 3-1	10.2	13.9	**1.36**
C2	6.8	9.1	**1.34**
L 4-6	4.8	6.2	**1.29**
J 4-2	7.7	9.9	**1.29**
P 3-1	8.4	10.8	**1.29**
B 3-1	9.0	11.5	**1.28**
R 3-3	11.0	13.8	**1.25**
D3	7.0	8.6	**1.23**
I 2-3	13.8	16.5	**1.20**
P 2-5	7.8	9.2	**1.18**
G 4-4	13.7	15.7	**1.15**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ขนาดของโคโลนี (มม.)	ขนาดของวงใส (มม.)	ประสิทธิภาพ
J 4-4	10.8	12.3	**1.14**
L 4-1	15.1	16.8	**1.11**

<u>หมายเหตุ</u> ขนาดของโคโลนี วัดได้จากเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี
ขนาดของวงใส วัดได้จากเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส
ประสิทธิภาพ คำนวณได้จากขนาดของวงใสหารด้วยขนาดของโคโลนี

จากตารางที่ 4.1 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีค่าประสิทธิภาพตั้งแต่ 5.00 มาทำการวิจัยในขั้นตอนต่อมา ซึ่งในการวิจัยนี้มีจุลินทรีย์ที่มีค่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายตั้งแต่ 5.00 จำนวน 11 ไอโซ-เลต คือ L 2-3, G 2-3, G 2-7, G 4-1, L 3-2, R 3-1, Q 2-8, I 4-3, S 2-4, L 2-2 และ Q 2-6 แล้วนำเชื้อทั้ง 11 ไอโซเลต มาผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งจากเชื้อราทั้ง 3 ชนิด คือ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159, *Aspergillus foetidus* TISTR 3173 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

4.2 ผลของสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

4.2.1 ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

จากการทดลองการผลิตเอนไซม์ เพื่อศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากสภาวะธรรมชาติในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งที่มีธูปฤาษีเป็นสับสเตรท และเปรียบเทียบกับการผลิตเอนไซม์จาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159, *Aspergillus foetidus* TISTR 3173 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60, 70 และ 80 พบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง 2 อันดับแรก ซึ่งการคัดเลือกทำได้โดยคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสกับน้ำหนักแห้ง โดยพบว่าจุลินทรีย์ที่มีอัตราส่วนสูงคือ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISRT 3175 ซึ่งแสดงดังตารางภาคผนวกที่ จ-2 และพบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราทั้ง 2 ชนิด คือที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1,015.14 และ 229.98 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 และ 4 วัน ตามลำดับ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.1 ดังนั้นจึงได้คัดเลือกเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้มาทำการทดลองในขั้นตอนต่อมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการวิจัยพบว่าสอดคล้องกับรายงานของ Haltrich *et al.* (1996) ที่กล่าวว่าเชื้อราที่เป็นเส้นสาย (filamentous fungi) มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากกว่ายีสต์หรือแบคทีเรีย และการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราได้รับความสนใจมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นและเอนไซม์ที่ผลิตสามารถเก็บเกี่ยวได้ง่าย เนื่องจากเชื้อปลดปล่อยเอนไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อราที่ได้รับความสนใจเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในระดับอุตสาหกรรม คือ *Aspergillus* sp. และ *Trichoderma* sp.

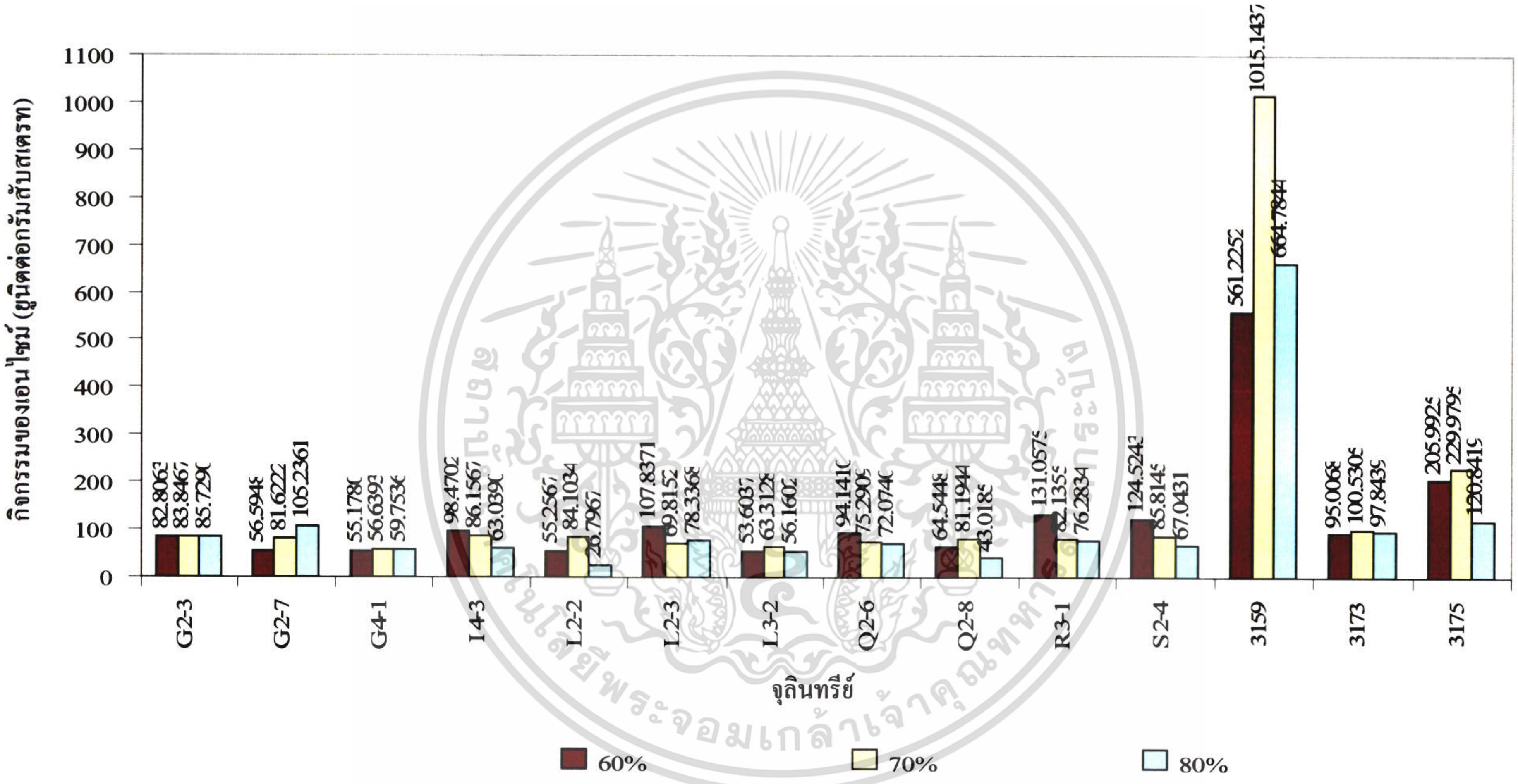
จากการวิจัยนี้พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เท่ากับร้อยละ 70 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Deschamps and Huet (1985) พบว่าความชื้นเริ่มต้นของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* CBS 11042 มีค่าเท่ากับร้อยละ 70 เมื่อเลี้ยงบนฟางข้าวสาลีและรำข้าวสาลีที่ผ่านการ pre-treatment ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

ความชื้นเริ่มต้นของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรามักมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 50 ถึง 80 ซึ่งค่าความชื้นเริ่มต้นของการผลิตจะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราและชนิดของสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์

4.2.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยเพาะเลี้ยง *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISRT 3175 ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งเมื่อใช้ธูปฤาษีเป็นสับสเตรท โดยมีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 และมีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 คือทริปโตน ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส 1,312.03 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 9.35 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมยีสต์สกัด โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 252.82 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 4.15 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และรูปที่ 4.3 และผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.2 และตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ผลของความชื้นเริ่มต้นของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนเมื่อใช้ธูปฤาษีเป็นสับสเตรท

3159 *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 3173 *Aspergillus foetidus* TISTR 3173 3175 *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

จากผลการวิจัยสอดคล้องกับรายงานของ Saxena *et al.* (1994) ซึ่งพบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ซึ่งจากการวิจัยนี้พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISRT 3175 คือยีสต์สกัด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gomes *et al.* (1994) และงานวิจัยของ Singh *et al.* (2000) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Thermoascus aurantiacus* และ *Thermomyces lanuginosus* SSBP คือยีสต์สกัด

จากการวิจัยของ Smith and Wood (1991b) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus awamori* CMI 142717 คือเคซิโตน (casitone) และพบว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นโซเดียมไนเตรต กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสลดลงจากชุดควบคุมซึ่งมียีสต์สกัดและโปรติโอสเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนอย่างมาก และจากการวิจัยของ Haapala *et al.* (1996) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma reesei* สูงสุด เมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งไนโตรเจนคือโปรติโอสเปปโตนและยีสต์สกัด

ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
แอมโมเนียมซัลเฟต	847.88^{d}
แอมโมเนียมไนเตรต	869.27^{d}
ยูเรีย	$1,034.39^{bc}$
ยีสต์สกัด	$1,145.62^{b}$
โปรติโอสเปปโตน	978.78^{cd}
ทริปโตน	$1,312.03^{a}$

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน

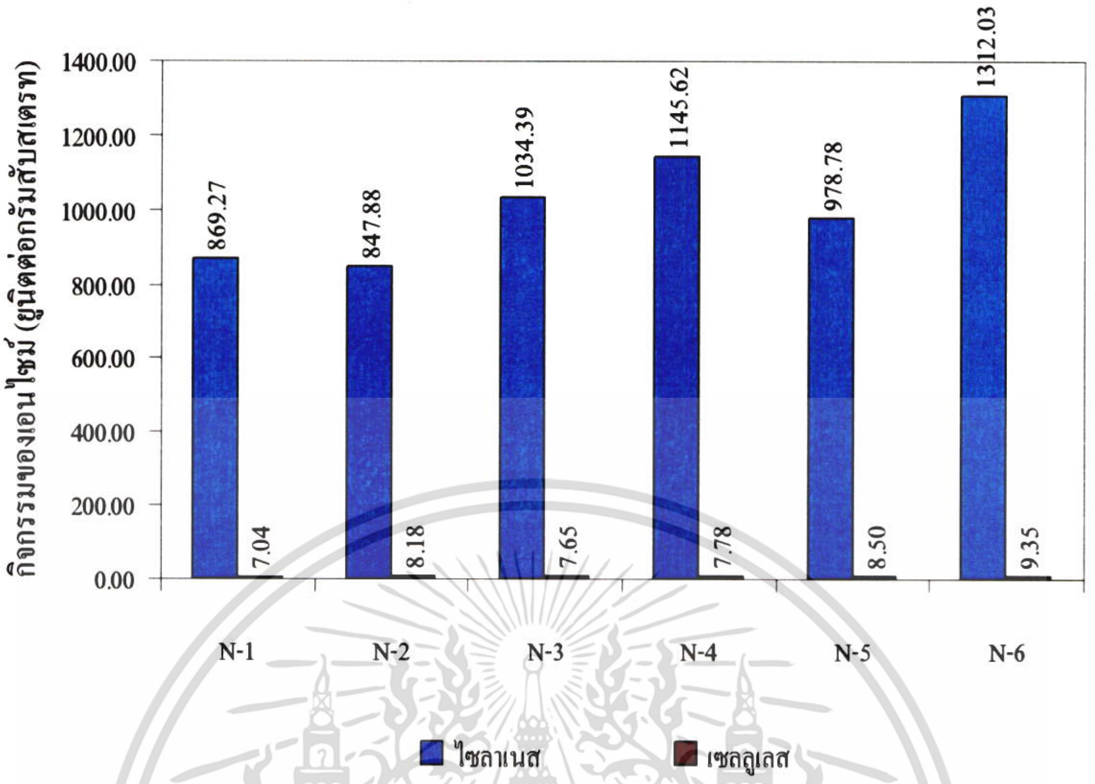
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISRT 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
แอมโมเนียมซัลเฟต	221.17[b]
แอมโมเนียมไนเตรต	185.23[d]
ยูเรีย	161.53[e]
ยีสต์สกัด	252.82[a]
โปรติโอสเปปโตน	206.96[c]
ทริปโตน	141.77[f]

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน

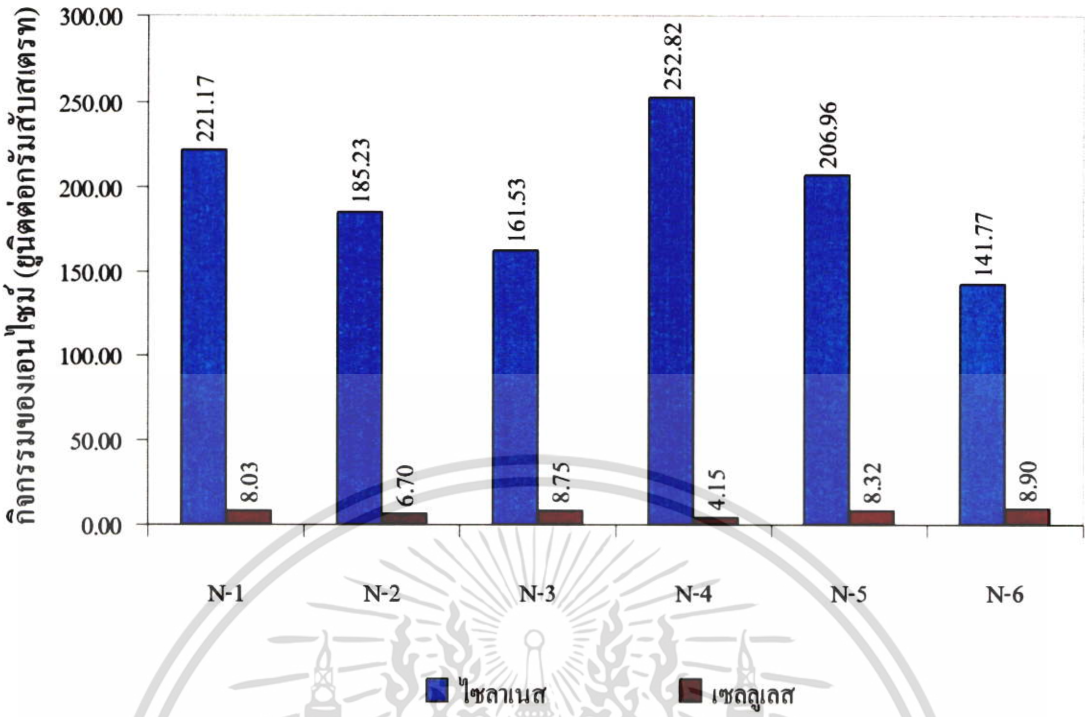
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 3 วัน

N-1 แอมโมเนียมซัลเฟต
N-2 แอมโมเนียมไนเตรต
N-3 ยูเรีย
N-4 ยีสต์สกัด
N-5 โปรติโอสเปปโตน
N-6 ทริปโตน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 4 วัน

N-1 แอมโมเนียมซัลเฟต

N-2 แอมโมเนียมไนเตรต

N-3 ยูเรีย

N-4 ยีสต์สกัด

N-5 โปรติโอสเปปโตน

N-6 ทริปโตน

4.2.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

จากการเพาะเลี้ยง *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในอาหารที่มีฐปฤาษีเป็นสับสเตรท และเติมทริปโตน หรือยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 แล้วปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 70 และปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 พบว่าพีเอชเริ่มต้นที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สูงสุด คือที่พีเอช 7.0 และ 6.0 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1,964.41 และ 320.84 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และมีค่ากิจกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 13.13 และ 13.46 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.4 และรูปที่ 4.5 และผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.4 และตารางที่ 4.5

จากการวิจัยของ Smith and Wood (1991b) พบว่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus awamori* CMI 142717 คือพีเอช 4.0 และจากการวิจัยของ Singh *et al.* (2000) และ Liu *et al.* (1998) พบว่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* SSBP และ *Trichosporon cutaneum* SL409 คือพีเอช 6.5 จากการวิจัยของ Gomes *et al.* (1993) พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือพีเอช 6.0 ถึง 6.5 และจากการวิจัยของ Keskar (1992) พบว่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Streptomyces* T_7 คือพีเอช 7.0

ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

พีเอชเริ่มต้น	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
3.0	$1,214.06^{c}$
4.0	$1,362.08^{bc}$
5.0	$1,805.70^{a}$
6.0	$1,815.54^{a}$
7.0	$1,964.41^{a}$
8.0	$1,649.13^{ab}$

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน

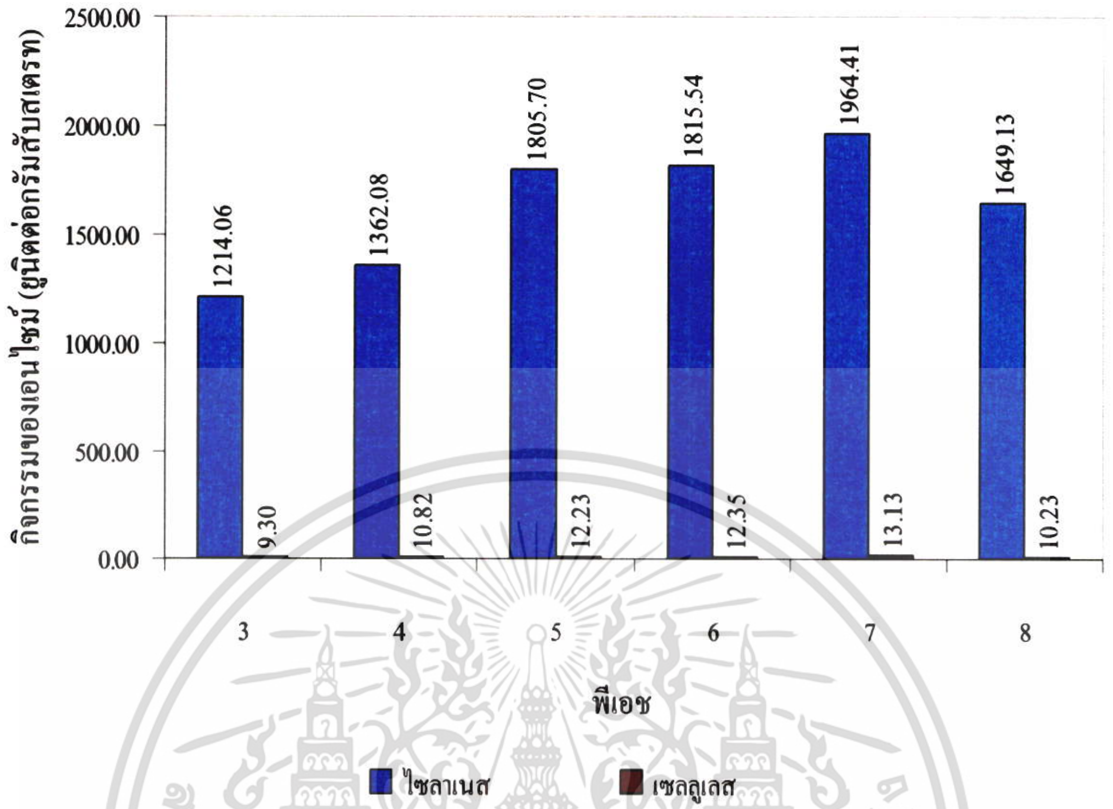
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

พีเอชเริ่มต้น	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
3.0	172.48[e]
4.0	272.07[c]
5.0	294.32[b]
6.0	320.84[a]
7.0	236.14[d]
8.0	232.20[d]

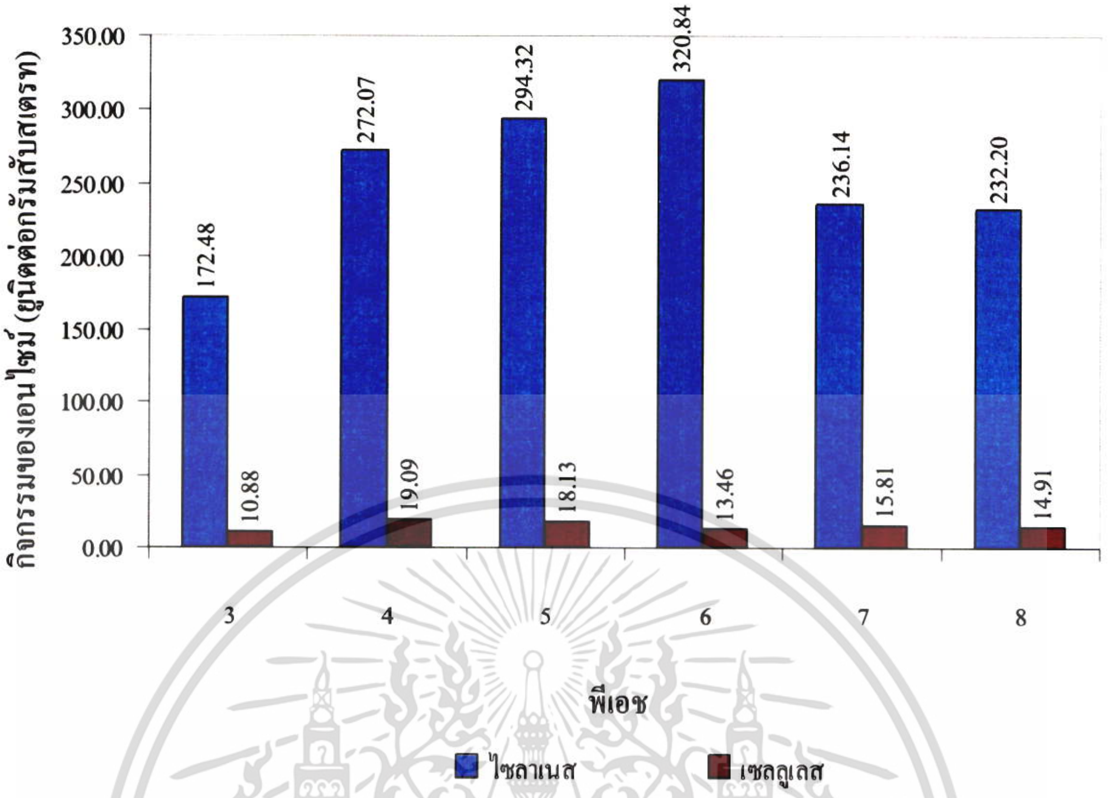
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 1 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 4 วัน

4.3 ผลการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากธูปฤาษีที่ผ่านการ pre-treatment

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารที่มีธูปฤาษีที่ผ่านการ pre-treatment เป็นสับสเตรทเปรียบเทียบกับการผลิตเอนไซม์ในอาหารที่มีธูปฤาษีที่ไม่ผ่านการ pre-treatment เป็นสับสเตรทโดย *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 บนสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วยทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โดย *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ประกอบด้วยยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อทั้ง 2 ชนิด บนอาหารที่มีธูปฤาษีที่ผ่านการ pre-treatment ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าการผลิตเอนไซม์บนอาหารที่มีธูปฤาษีที่ไม่ผ่านการ pre-treatment โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 1,204.06 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และ 470.57 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ และพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเพียงเล็กน้อย โดยมีค่า 10.56 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และ 5.78 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และรูปที่ 4.7 และผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.6 และตารางที่ 4.7

จากการวิจัยของ Biswas *et al.* (1988) เมื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus ochraceus* ในสับสเตรทที่ผ่านและไม่ผ่านการ pre-treatment พบว่าสับสเตรทที่ไม่ผ่านการ pre-treatment ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าสับสเตรทที่ผ่านการ pre-treatment

ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบผลการ pre-treatment สับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การ pre-treatment	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
ผ่านการ pre-treatment	1,204.06[a]
ไม่ผ่านการ pre-treatment	846.17[b]

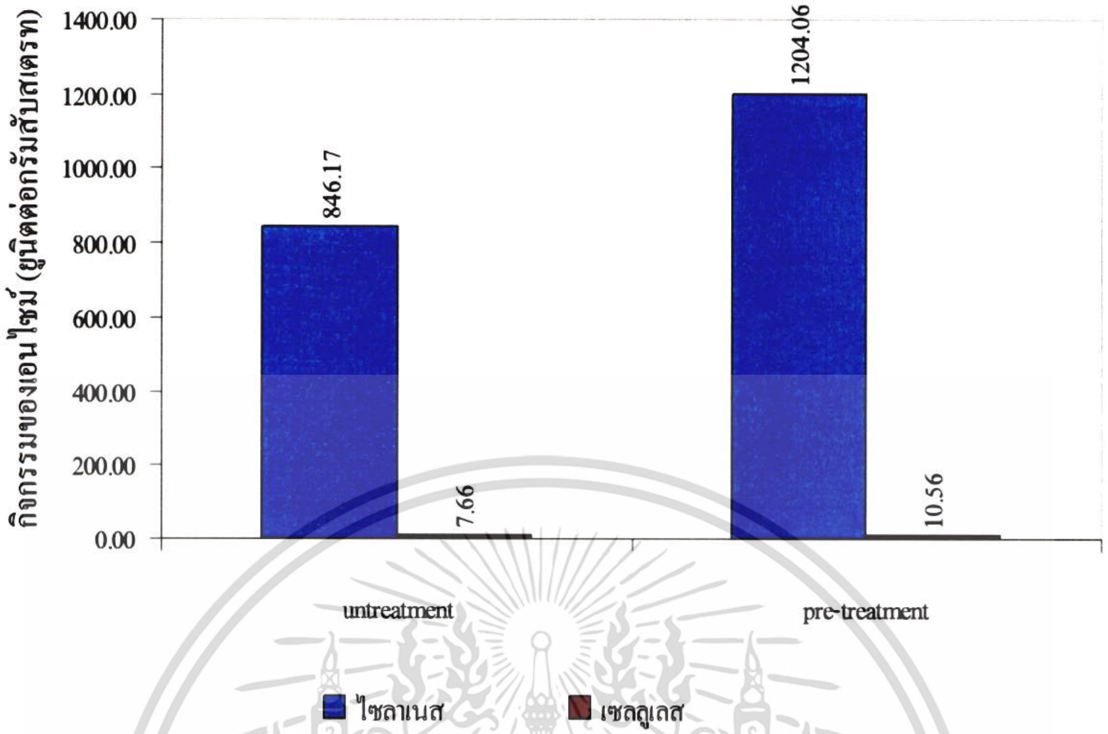
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.7 การเปรียบเทียบผลการ pre-treatment สับสเตรทต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การ pre-treatment	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
ผ่านการ pre-treatment	470.57[a]
ไม่ผ่านการ pre-treatment	117.56[b]

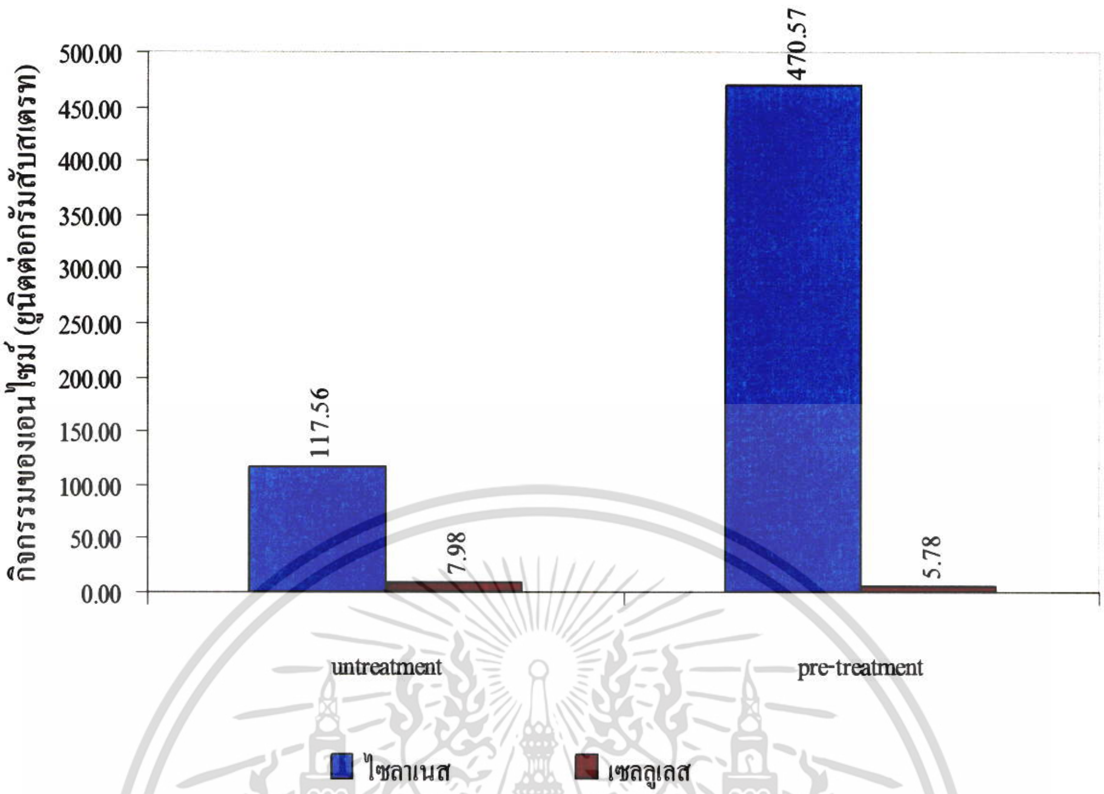
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 7.0 โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 1 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 3 วัน บนอาหารที่มีฐูปฤาษีที่ผ่านและไม่ผ่านการ pre-treatment

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 6.0 โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 4 วัน บนอาหารที่มีธูปฤาษีที่ผ่านและไม่ผ่านการ pre-treatment

4.4 ผลของการเปรียบเทียบสับสเตรทอื่นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส บนอาหารที่มีสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ได้แก่ รำหยาบ รำละเอียด แกลบ ชานอ้อย และเปลือกฝักถั่วเหลือง เปรียบเทียบกับธูปฤาษี พบว่า สับสเตรทที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดสูงสุด คือรำละเอียด โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 2,000.34 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และ 343.09 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และพบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สูงเช่นกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 18.76 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และ 19.97 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท (รูปที่ 4.8 และรูปที่ 4.9) แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบสัดส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสกับกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ในสับสเตรทที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำ คือชานอ้อย ซึ่งมีอัตราส่วน 1 ต่อ 224.76 และการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 พบว่าสับสเตรทที่เหมาะสมคือแกลบ โดยมีอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 1 ต่อ 200.03 ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงในตารางที่ 4.8 และผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.9 และตารางที่ 4.10

จากการวิจัยพบว่ารำละเอียดเป็นสับสเตรทที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสสูง อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของรำละเอียดซึ่งมีปริมาณของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่สูง โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 34 และ 24.5 ตามลำดับ แต่ชานอ้อยและแกลบมีปริมาณของเซลลูโลสที่ต่ำกว่ารำละเอียด จึงทำให้มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่น้อยกว่า ดังนั้นอัตราส่วนระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจึงมีมากกว่าการใช้รำละเอียดเป็นสับสเตรท โดยชานอ้อยและแกลบมีปริมาณของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เท่ากับร้อยละ 33 และ 35 ตามลำดับ และร้อยละ 22 และ 25 ตามลำดับ

จากการวิจัยของ Bakair *et al.* (2001) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* สูงสุดเมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรท และจากการวิจัยของ Gomes *et al.* (1994) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Thermoascus aurantiacus* สูงสุดเมื่อใช้ฟางข้าวสาลี ขนาดประมาณ 0.25 มิลลิเมตร เป็นสับสเตรท และจากการวิจัยของอัญชริดา สวารชร (2542) พบว่าสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* รหัส 4-45-IF คือฟางข้าว และจากการทดลองของ Archana and Satyanarayana (1997) พบว่าสับสเตรทที่ดีที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* A99 ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งคือรำข้าวสาลี

ตารางที่ 4.8 อัตราส่วนระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

จุลินทรีย์	อัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่อเซลลูเลส					
	ธูปฤาษี	รำหยาบ	รำละเอียด	แกลบ	ชานอ้อย	เปลือกฝักถั่วเหลือง
Aspergillus foetidus TISTR 3159	110.45	42.09	106.63	45.73	224.76	17.40
Fusarium moniliforme TISTR 3175	14.73	36.98	17.18	200.03	46.96	14.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 การเปรียบเทียบผลของการเปรียบเทียบสับสเตรทอื่นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สับสเตรท	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
ธูปฤาษี	846.17[c]
รำหยาบ	383.30[d]
รำละเอียด	2,000.34[a]
แกลบ	111.23[e]
ชานอ้อย	1,469.03[b]
เปลือกฝักถั่วเหลือง	208.76[de]

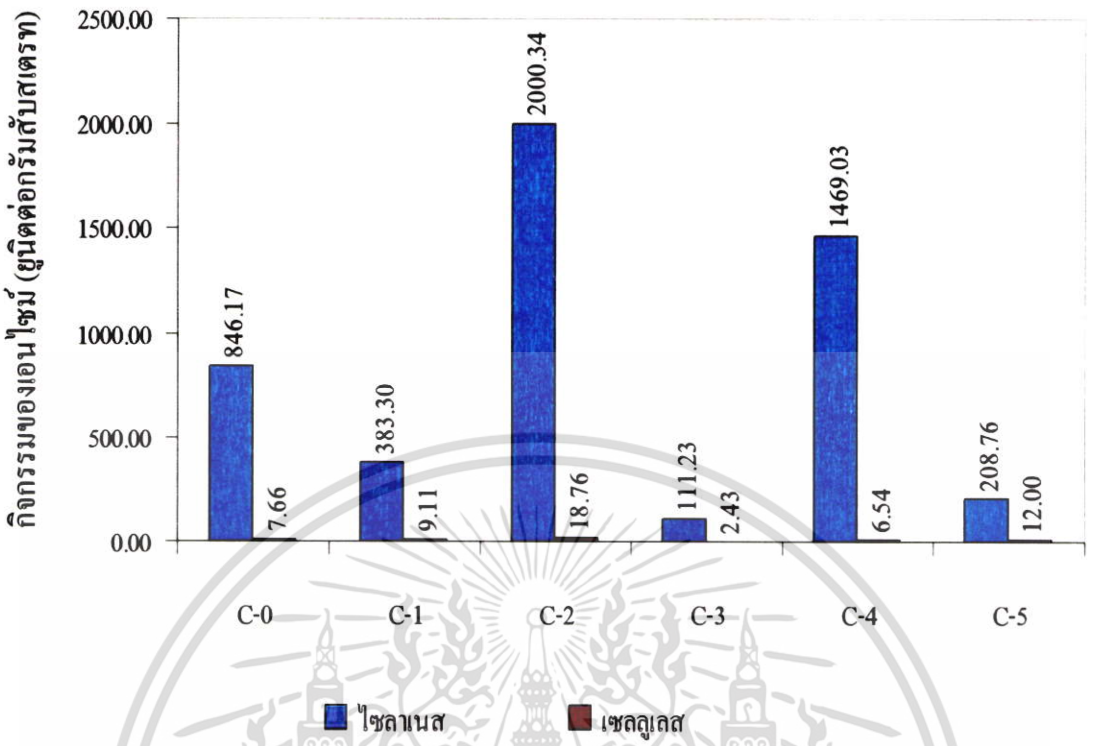
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.10 การเปรียบเทียบผลของการเปรียบเทียบสับสเตรทอื่นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สับสเตรท	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
ธูปฤาษี	117.56[c]
รำหยาบ	208.25[b]
รำละเอียด	343.09[a]
แกลบ	221.25[b]
ชานอ้อย	173.25[bc]
เปลือกฝักถั่วเหลือง	150.58[c]

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน

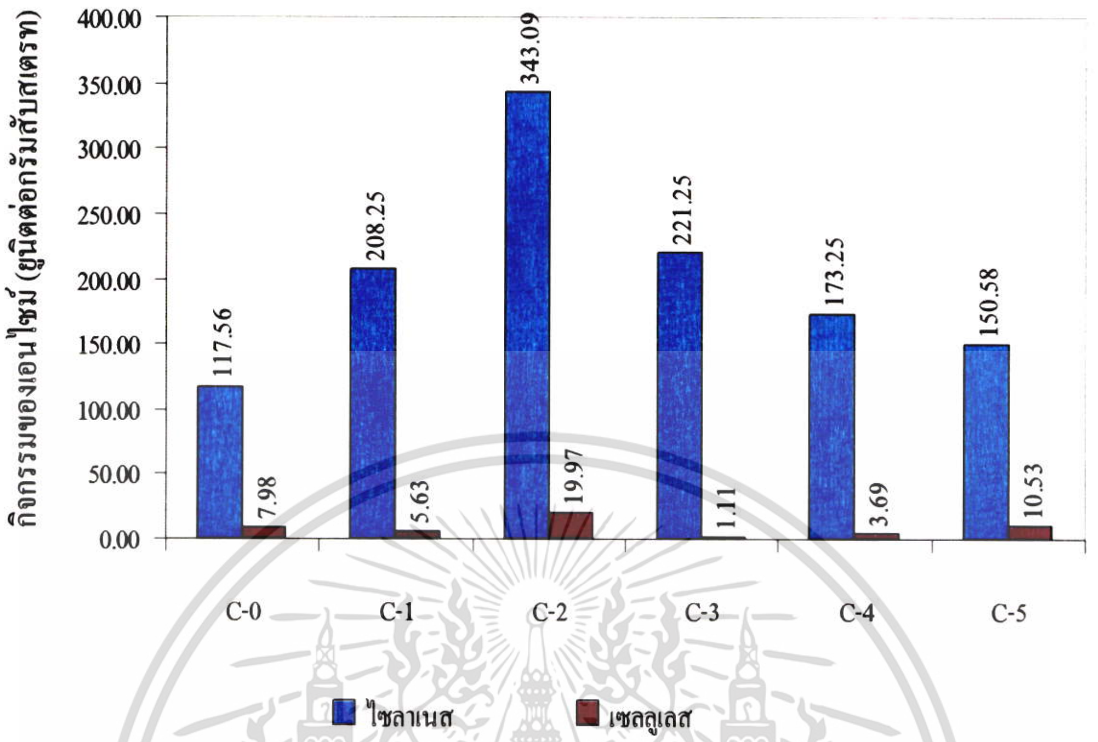
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสับสเตรทชนิดต่าง ๆ โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือ ทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้น 7.0 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 3 วัน

C-0 ธูปฤาษี
C-1 รำหยาบ
C-2 รำละเอียด
C-3 แกลบ
C-4 ชานอ้อย
C-5 เปลือกฝักถั่วเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสับสเตรทชนิดต่าง ๆ โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้น 6.0 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 4 วัน

C-0 ธูปฤาษี

C-1 รำหยาบ

C-2 รำละเอียด

C-3 แกลบ

C-4 ชานอ้อย

C-5 เปลือกฝักถั่วเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งกับสภาวะการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบอาหารเหลว

จากการทดลองการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดย *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เปรียบเทียบกับสภาวะการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบอาหารเหลว พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งและสภาวะการผลิตแบบอาหารเหลวมีค่าเท่ากับ 846.17 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และ 41.27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 7.66 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และ 0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.10 และจากการทดลองการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดย *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เปรียบเทียบกับสภาวะการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบอาหารเหลว พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งและสภาวะการผลิตแบบอาหารเหลวมีค่าเท่ากับ 117.56 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และ 16.49 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 7.98 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และ 0.46 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.11 และผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.11 และตารางที่ 4.12

จากการวิจัยของ Biswas *et al.* (1988) เมื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus ochraceus* ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งกับสภาวะการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบอาหารเหลว พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบอาหารเหลว แต่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งใช้เวลาในการผลิตนานกว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบอาหารเหลว

ตารางที่ 4.11 การเปรียบเทียบผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งกับสภาวะการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบอาหารเหลวจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สับสเตรท	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท, ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
อาหารแข็ง	846.17^{a}
อาหารเหลว	41.27^{b}

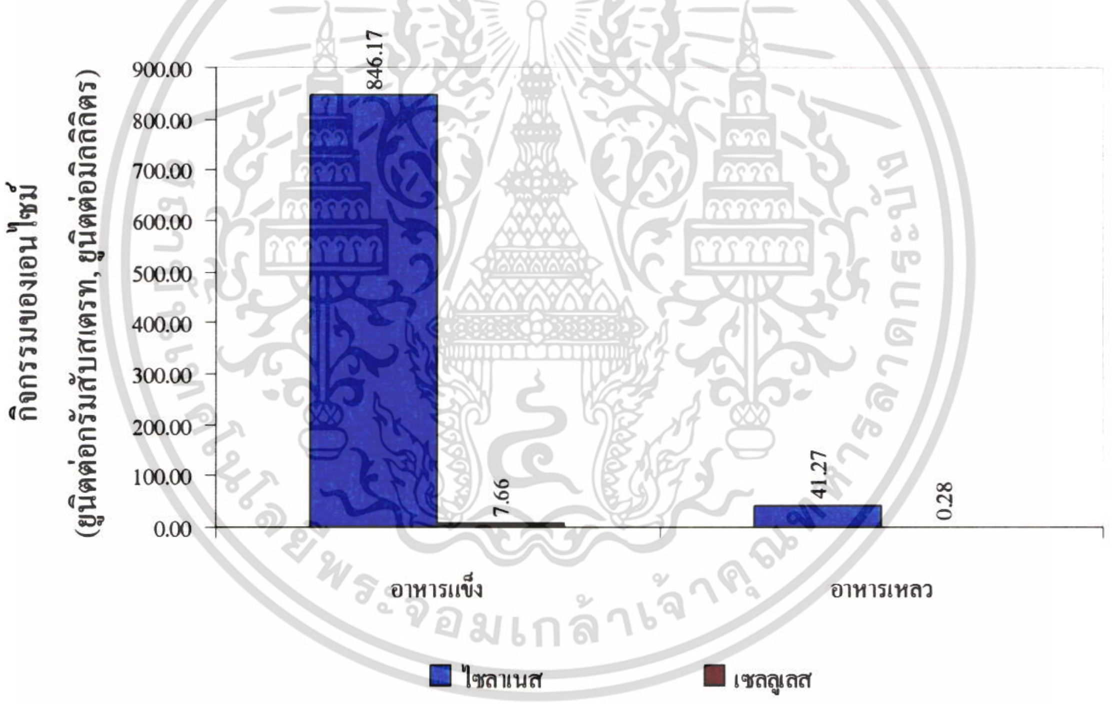
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 การเปรียบเทียบผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งกับสภาวะการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสแบบอาหารเหลวจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

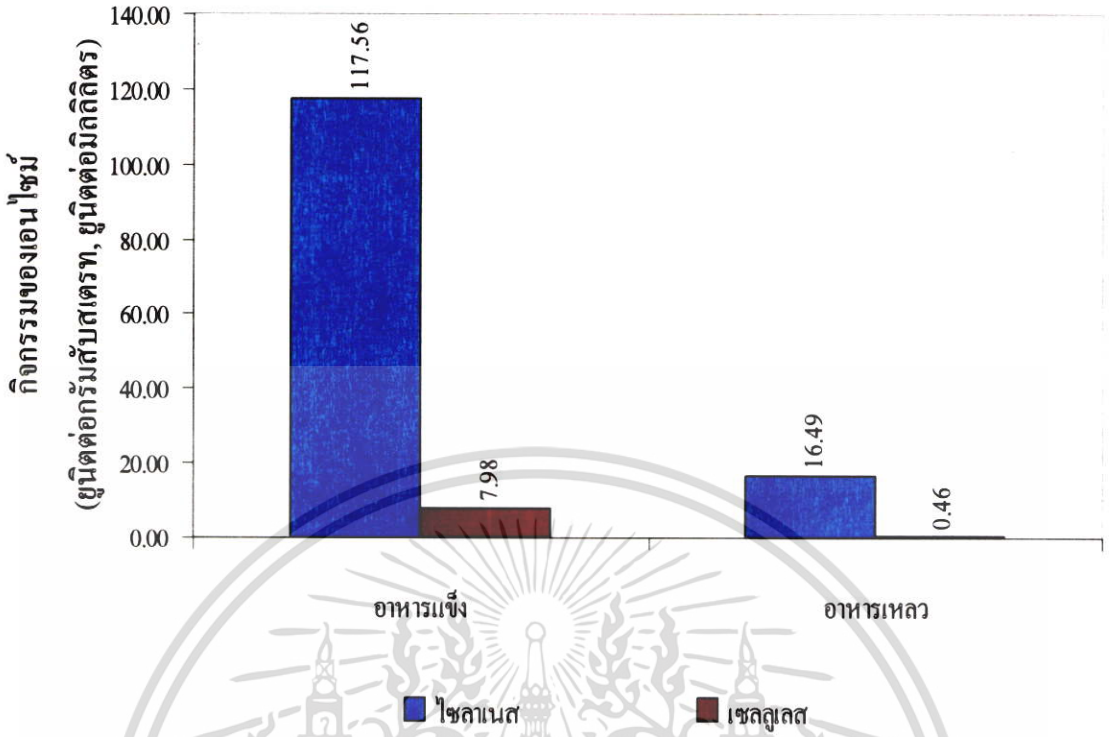
สับสเตรท	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท, ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
อาหารแข็ง	117.56[a]
อาหารเหลว	16.49[b]

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน



รูปที่ 4.10 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีธูปฤาษีเป็นสับสเตรท โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือ ทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้น 7.0 และความชื้นเริ่มต้นของการผลิตเอนไซม์แบบสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งเท่ากับร้อยละ 70 และการผลิตแบบสภาวะอาหารเหลวทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

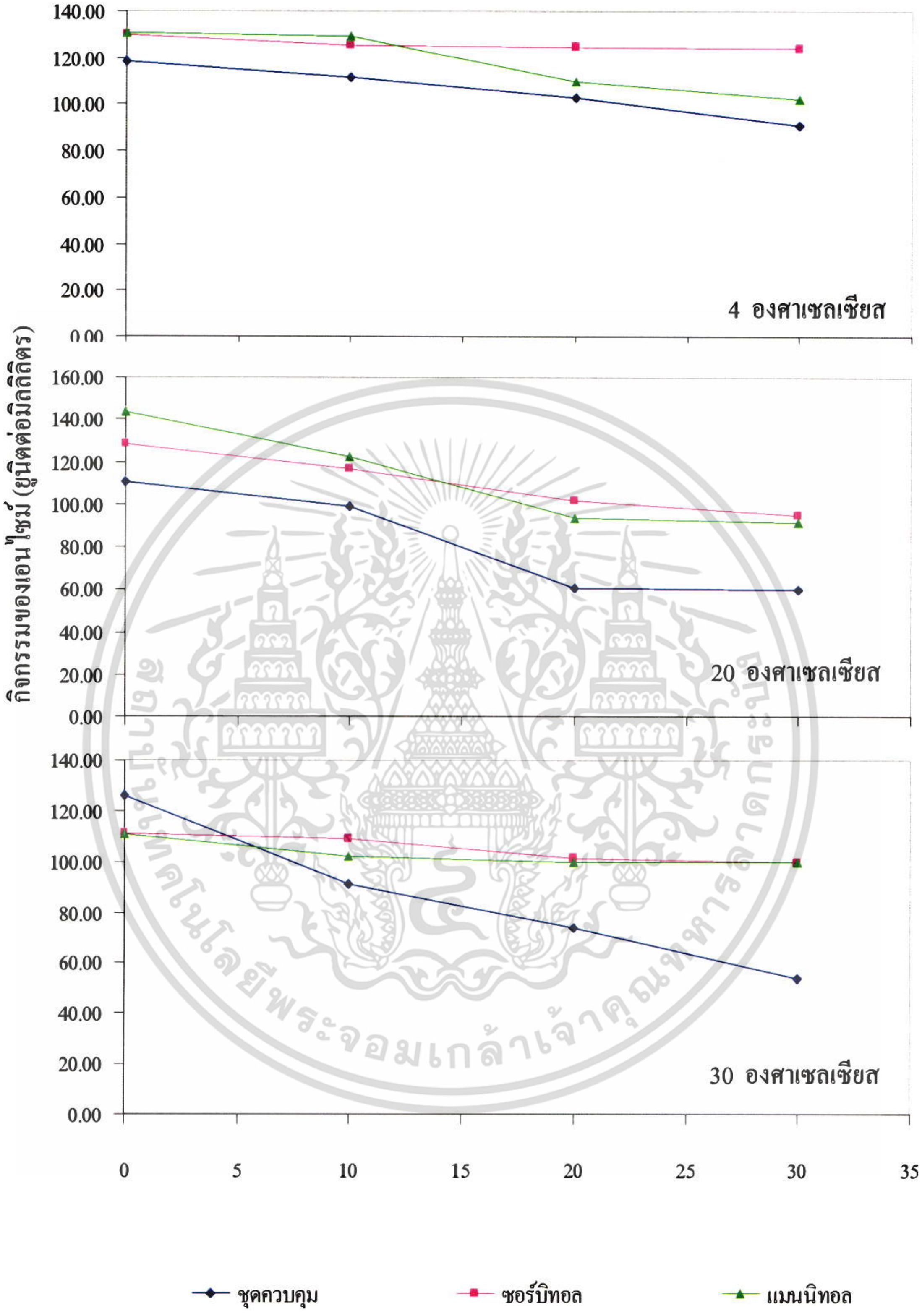


รูปที่ 4.11 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสที่ผลิตโดย *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีธูปฤาษีเป็นสับสเตรท โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้น 6.0 และความชื้นเริ่มต้นของการผลิตเอนไซม์แบบสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งเท่ากับร้อยละ 70 และการผลิตแบบสภาวะอาหารเหลวทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน

4.6 ผลการเก็บรักษาเอนไซม์ไซลาเนสในรูปของสารละลาย

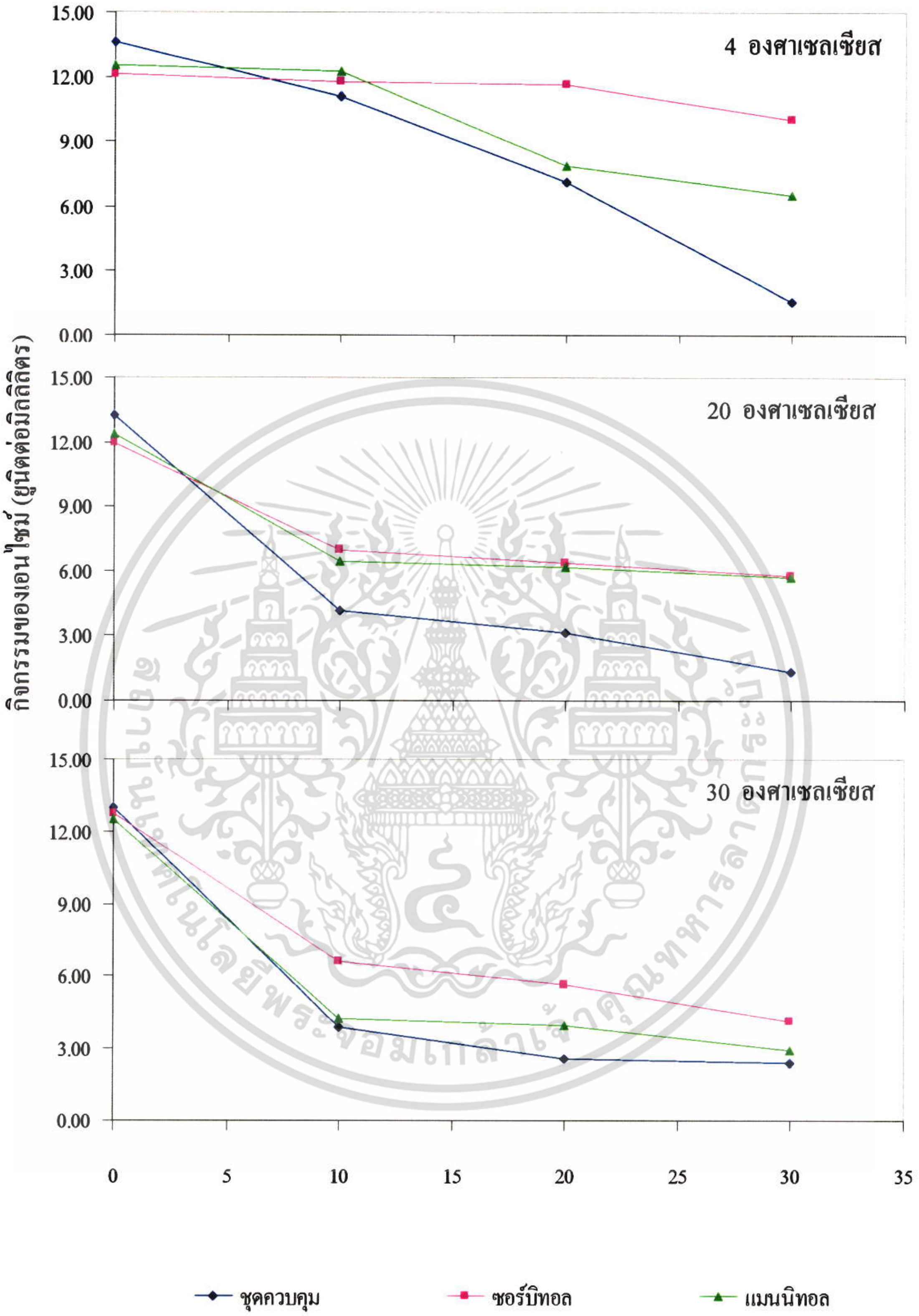
การศึกษาการเก็บรักษาเอนไซม์ไซลาเนสในรูปของสารละลาย โดยนำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อราทั้ง 2 ชนิด มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องอัลตราฟิวเตรชัน จากนั้นนำมาเติมสารช่วยรักษาความคงตัว 2 ชนิด ได้แก่ซอร์บิทอล และแมนนิทอล โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 โมลาร์ ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ และเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาเอนไซม์โดยไม่มีการเติมสารช่วยรักษาความคงตัว พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ซึ่งมีการเติมซอร์บิทอลและแมนนิทอลที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4, 20 และ 30 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์มีการลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.12 และรูปที่ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 การเก็บรักษาเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 การเก็บรักษาเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

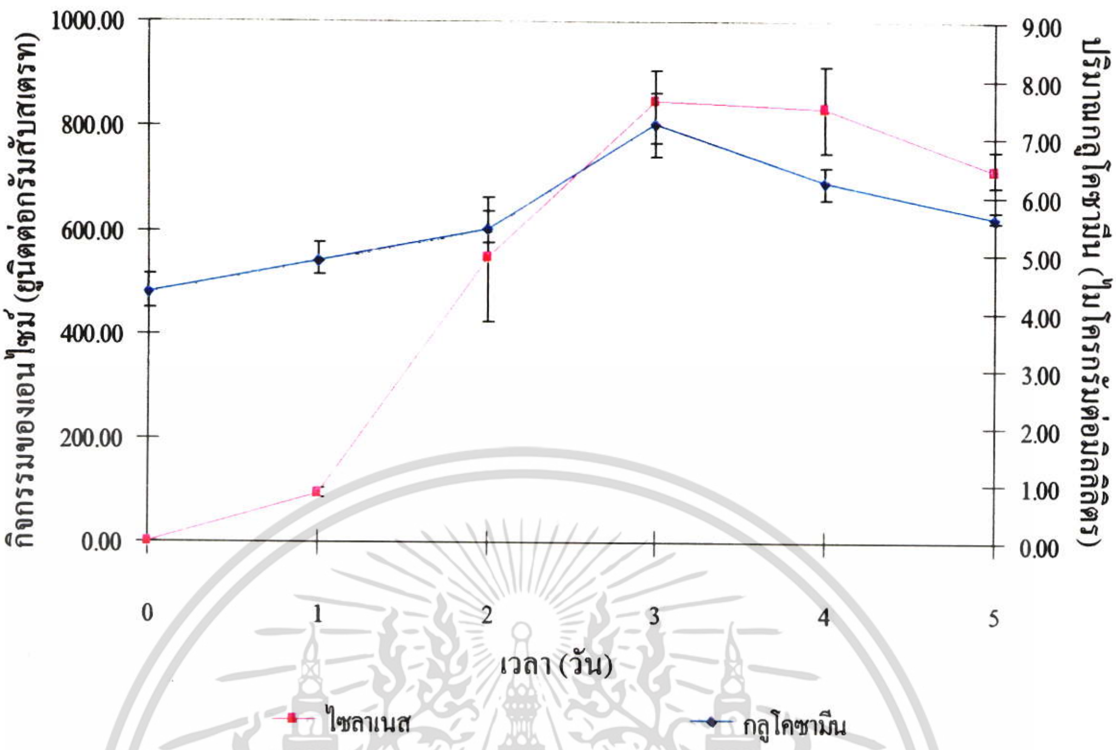
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิจัยของ George *et al.* (2001) พบว่าการเติมซอร์บิทอล แมนนิทอลและกลีเซอ-รอล ความเข้มข้นสุดท้าย 2 โมลาร์ สามารถเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Thermomonospora* sp. ที่อุณหภูมิสูงได้ จากการวิจัยของ Nath and Rao (1995) พบว่าไกลซีน ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ช่วยเพิ่มค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* (NCIM 59) 6 เท่า เมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ที่พีเอช 7.0 ถึง 9.0 และที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส และจากการวิจัยของ Angelo *et al.* (1997) พบว่ากลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 50 เพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus* sp. (2MI strain) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ได้ เมื่อบ่มพร้อมกับ oat spelt xylan และ birchwood xylan ซึ่งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ไม่มีการเติมกลีเซอรอลกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วจนไม่มีค่ากิจกรรมภายในเวลา 1 ชั่วโมงของการบ่มเอนไซม์

4.7 ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

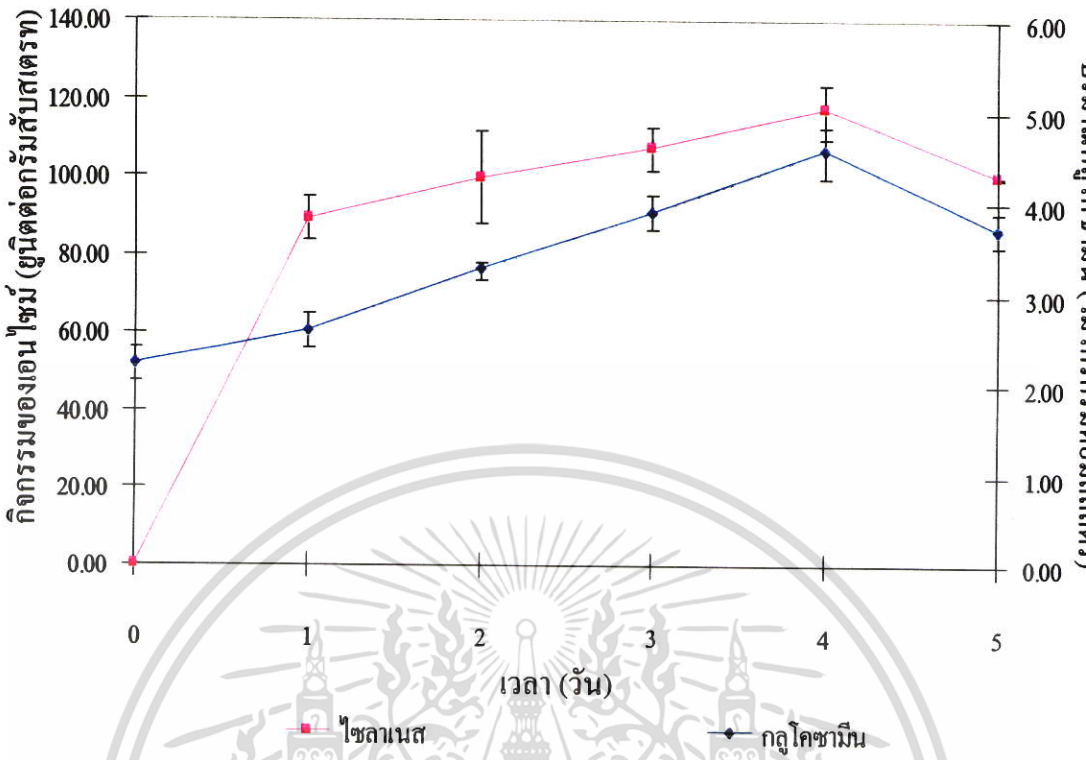
จากการศึกษาการวิเคราะห์การเจริญของ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อทั้ง 2 ชนิด ถูกผลิตขึ้นพร้อมกับการเจริญของเชื้อ ดังนั้นเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 จึงจัดเป็นสารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.14 และรูปที่ 4.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและปริมาณกลูโคซามีนที่วิเคราะห์จาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีธูปฤาษีเป็นสับสเตรท โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้น 7.0 และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและปริมาณกลูโคซามีนที่วิเคราะห์จาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีธูปฤาษีเป็นสับสเตรท โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้น 6.0 และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70

4.8 ผลการทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน

จากการตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 0 ถึง 20, 20 ถึง 30, 30 ถึง 40, 40 ถึง 50, 50 ถึง 60, 60 ถึง 70 และ 70 ถึง 85 ผลปรากฏว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดในช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 50 ถึง 60 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 119.97 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยมีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เท่ากับ 8.30 และมีผลได้ของเอนไซม์เท่ากับร้อยละ 3.28 และเมื่อนำมาทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นพบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 899.50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยมีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เท่ากับ 62.25 และมีผลได้ของเอนไซม์เท่ากับร้อยละ 1.32 ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.3 และจากการตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดในช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 60 ถึง 70 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.44 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยมีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เท่ากับ 0.48 และมีผลได้ของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอน	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	กิจกรรมทั้งหมด (ยูนิต)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ผลได้ (ร้อยละ)
crude enzyme	500.00	1,073.10	15,505.00	14.45	1.00	100.00
การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 50 ถึง 60	10.90	4.23	508.05	119.97	8.30	3.28
อัลตราฟิวเตรชัน	5.70	0.23	204.06	899.50	62.25	1.32

ร้อยละ 1.45 และเมื่อนำมาทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้น พบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 4.05 ยูนิต ต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยมีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เท่ากับ 0.80 และมีผลได้ของเอนไซม์เท่ากับร้อยละ 1.56 ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.4

จากการวิจัยของกฤษฎา เวทีวุฒาจารย์ (2542) พบว่าการตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. PC 22 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ช่วงที่ใช้คือช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 40 ถึง 70 และจากการวิจัยของ Chen *et al.* (1997b) พบว่าการตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Trichoderma longibrachiatim* ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้ช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 30 ถึง 50

4.9 ผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

4.9.1 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส

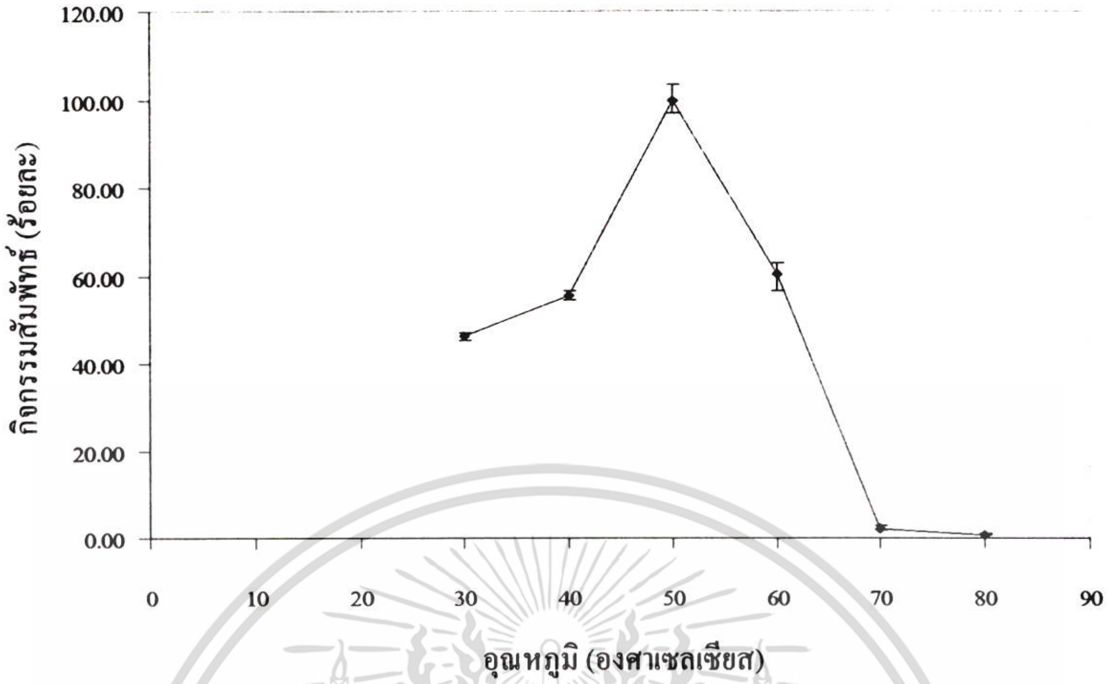
จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน คืออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 100.00 รองลงมาคืออุณหภูมิ 60, 40 และ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 60.42, 55.64 และ 46.27 ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างมาก ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 2.82 และ 0.76 ตามลำดับ ซึ่งดังแสดงในรูปที่ 4.16 ส่วนเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน คืออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 100.00 รองลงมาคืออุณหภูมิ 60, 70 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 50.79, 31.75 และ 30.95 ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 80 และ 30 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าน้อยมาก ซึ่งมีค่าสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 17.46 และ 7.94 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.17

จากการวิจัยนี้พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อราทั้ง 2 ชนิด คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Fujimoto *et al.* (1995) โดยพบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus aculeatus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และจากการวิจัยของ Kormelink *et al.* (1993) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนส I ที่ผลิตจาก *Aspergillus awamori* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อราส่วนมากมักมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 45 ถึง 75 องศาเซลเซียส (de Vries and Visser. 2001)

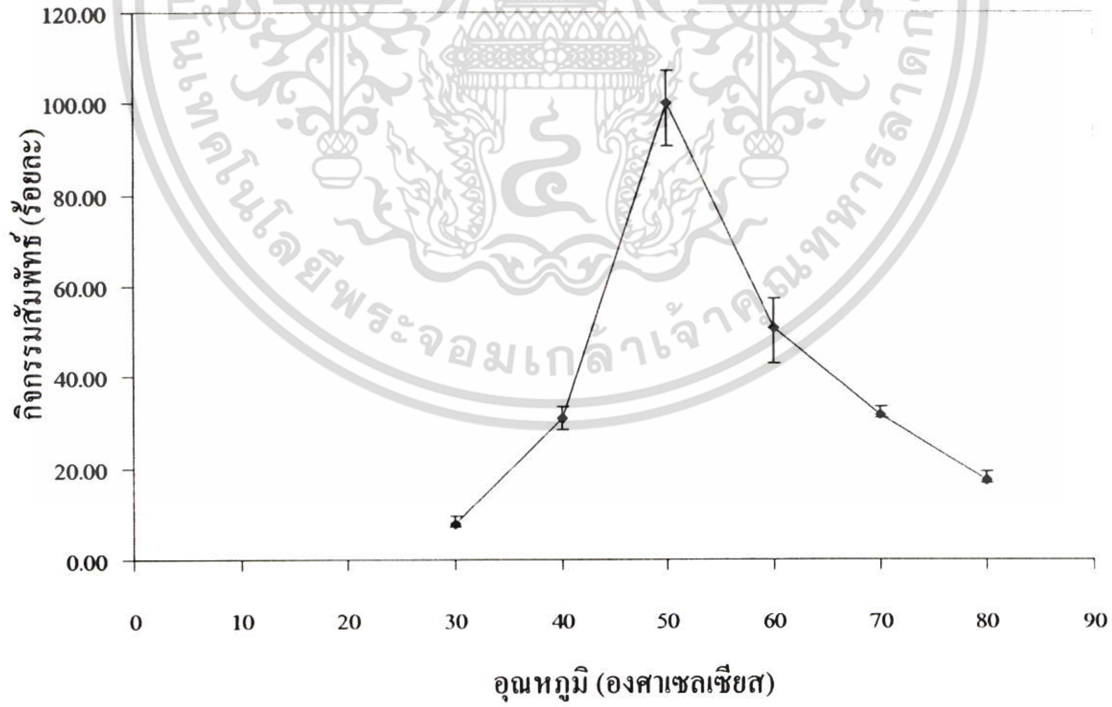
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอน	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	กิจกรรมทั้งหมด (ยูนิต)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ผลได้ (ร้อยละ)
crude enzyme	500.00	927.90	4,635.00	5.00	1.00	100.00
การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 60 ถึง 70	33.30	27.92	94.10	3.37	0.67	1.45
อัลตราฟิวเตรชัน	16.98	18.06	73.18	4.05	0.81	1.56



รูปที่ 4.16 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159



รูปที่ 4.17 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

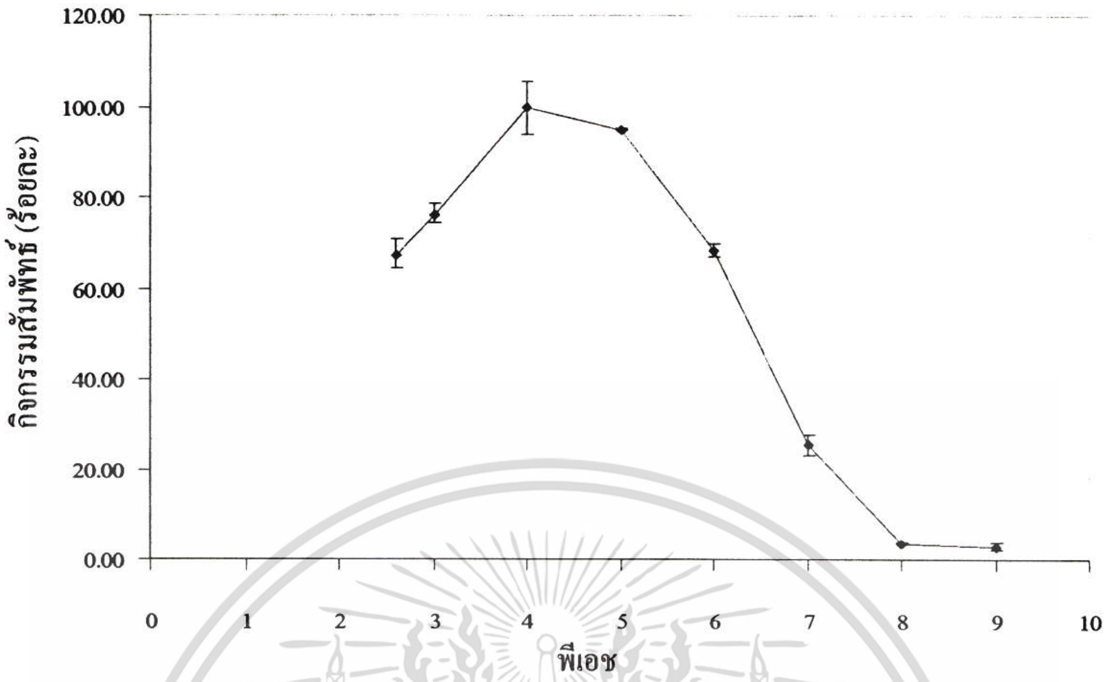
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.9.2 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส

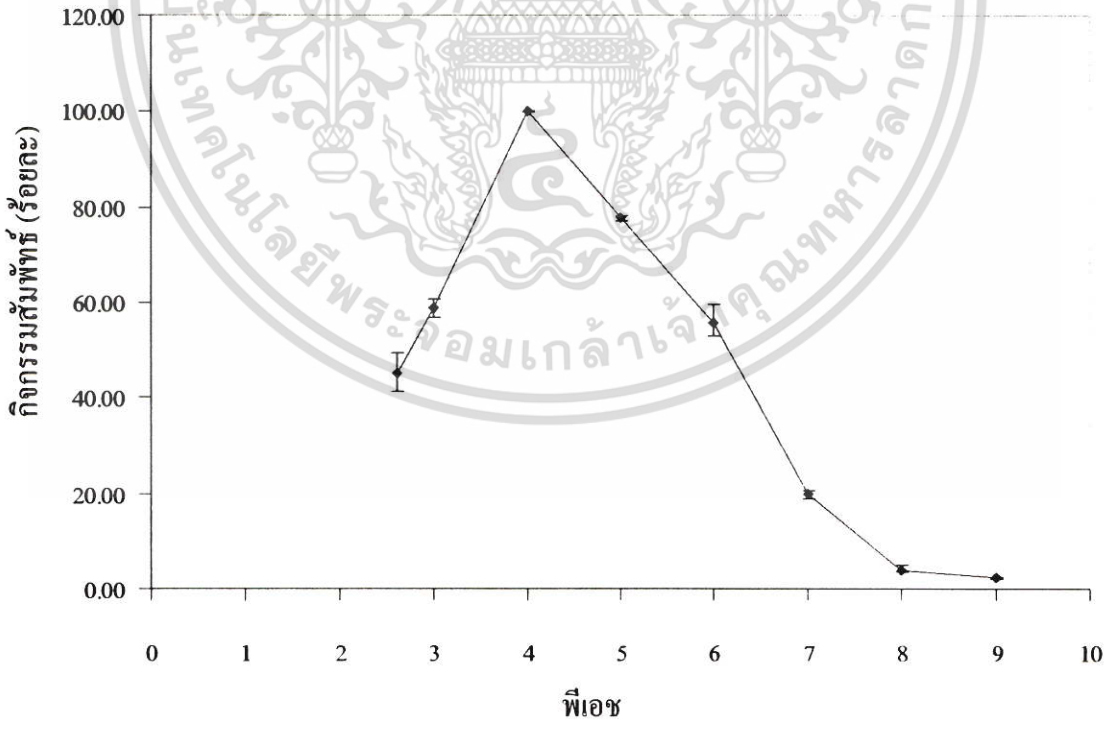
จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 มีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 4.0 โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 100.00 รองลงมาคือที่พีเอช 5.0, 3.0, 6.0, 2.6 และ 7.0 ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 95.04, 76.07, 69.27, 67.52 และ 25.44 ตามลำดับ และที่พีเอช 8.0 และ 9.0 กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับที่พีเอชอื่น ๆ โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 3.91 และ 2.92 ตามลำดับ ซึ่งดังแสดงในรูปที่ 4.18 และเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือที่พีเอช 4.0 เช่นเดียวกัน โดยกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 100.00 รองลงมาคือที่พีเอช 5.0, 3.0, 6.0, 2.6 และ 7.0 ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 77.64, 59.09, 55.88, 45.12 และ 19.72 ตามลำดับ และที่พีเอช 8.0 และ 9.0 กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับที่พีเอชอื่น ๆ โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 4.04 และ 2.37 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.19 จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงที่เป็นกรดถึงเป็นกลาง และที่พีเอชในช่วงที่เป็นด่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน

จากการวิจัยของ Fujimoto *et al.* (1995) และการวิจัยของ Kormelink *et al.* (1993) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนส FIa ที่ผลิตจาก *Aspergillus aculeatus* และเอนไซม์ไซลาเนส III ที่ผลิตจาก *Aspergillus awamori* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือพีเอช 4.0 ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยนี้ และจากการรายงานของ de Vries and Visser. (2001) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อรา มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นกรดถึงเป็นกรดเล็กน้อย คืออยู่ในช่วงพีเอช 2.0 ถึง 6.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159



รูปที่ 4.19 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

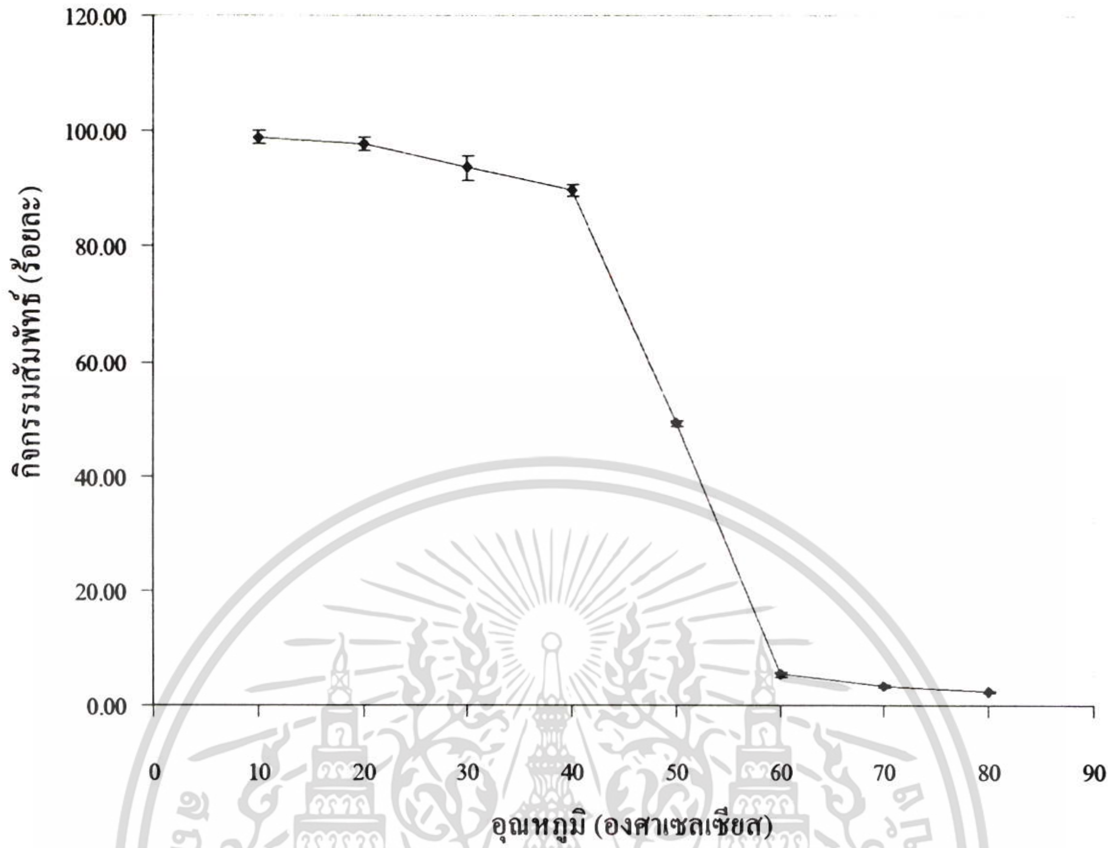
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.9.3 ผลของความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิ

จากการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิ โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 10 ถึง 40 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 98.74, 97.57, 93.40 และ 89.68 ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 49.19 ดังแสดงในรูปที่ 4.20 และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 10 ถึง 40 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 99.41, 97.06, 96.30 และ 91.85 ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 43.11 ดังแสดงในรูปที่ 4.21

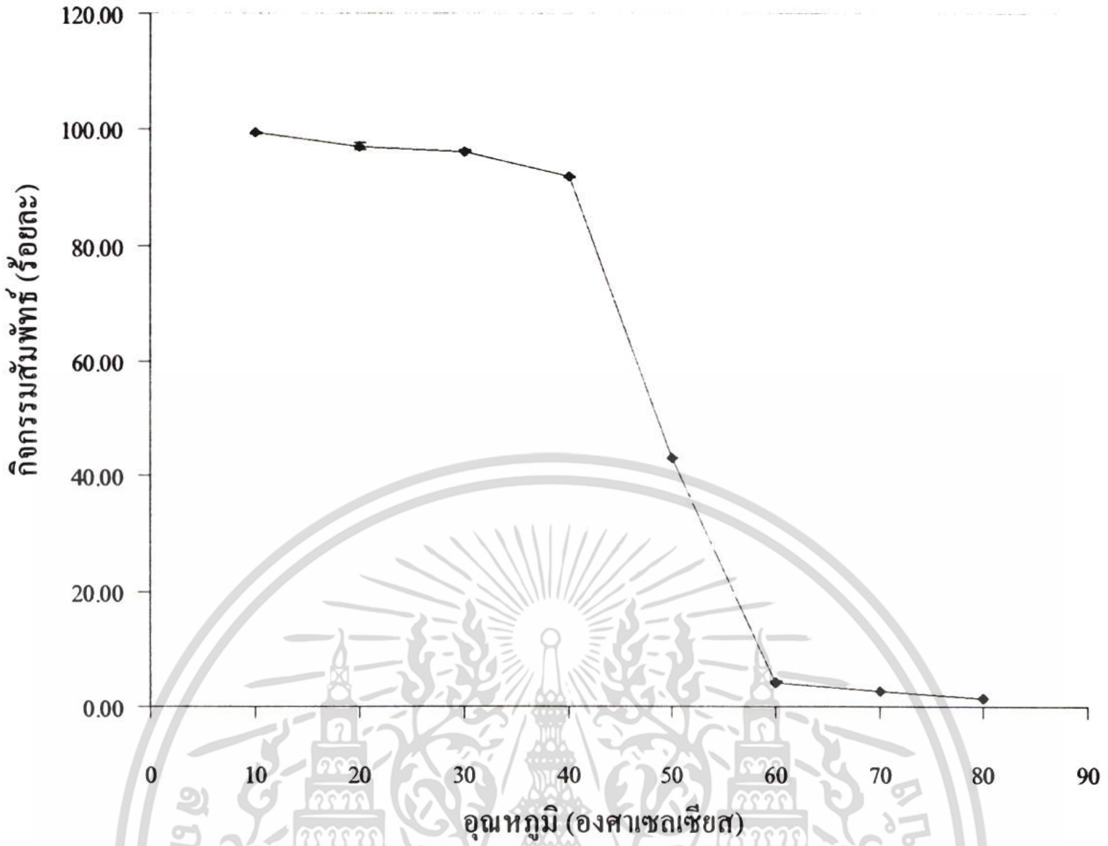
จากการวิจัยนี้พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อราทั้ง 2 ชนิด มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 10 ถึง 40 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Tsujibo *et al.* (1990) ที่ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Nocardiopsis dassonvillei* ที่มีต่ออุณหภูมิ พบว่าเอนไซม์ไซลาเนส X-I, X-II และ X-III มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และจากการวิจัยของ Christakopoulos *et al.* (1996) ซึ่งศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium oxysporum* F3 ต่ออุณหภูมิ พบว่าเอนไซม์ไซลาเนส I และ II มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ต่ออุณหภูมิ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่พีเอช 6.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ต่ออุณหภูมิ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่พีเอช 6.8

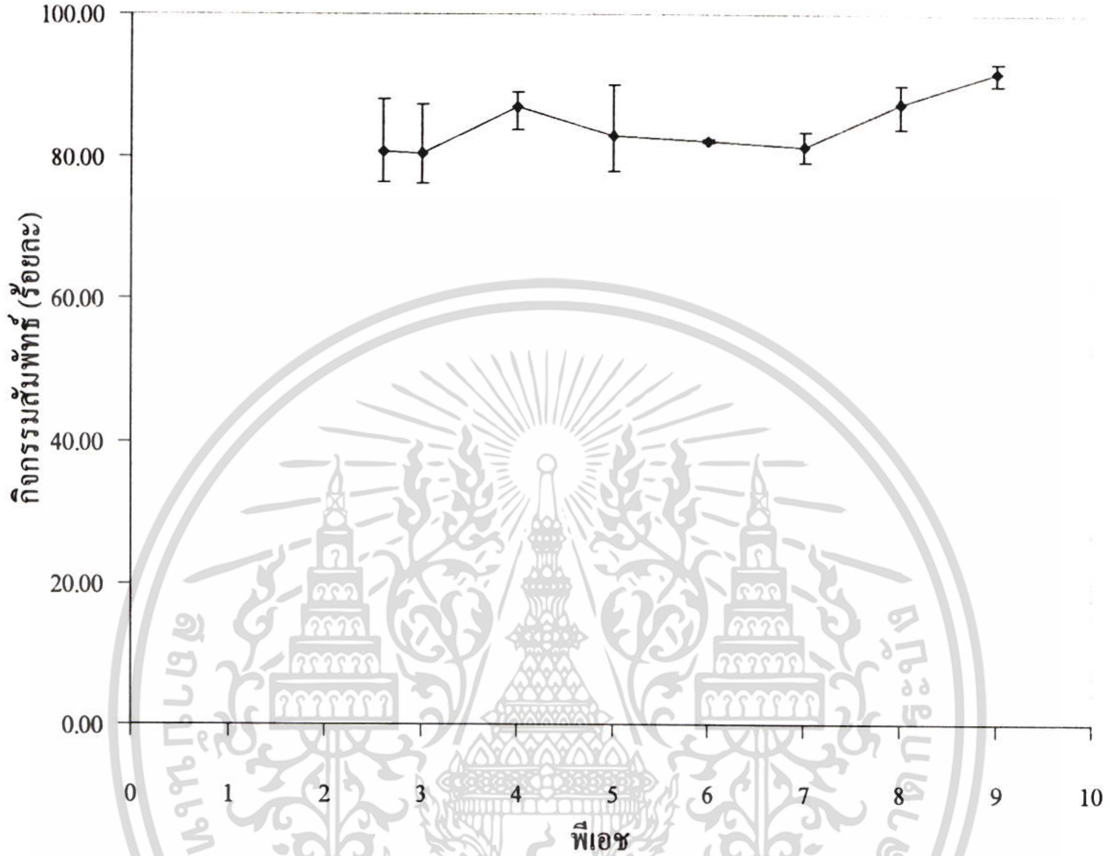
4.9.4 ผลของความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่พีเอชต่าง ๆ

จากการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิ โดยบ่มเอนไซม์ที่พีเอชต่าง ๆ ได้แก่ 2.6, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีความคงตัวที่พีเอชในช่วงกว้าง คือช่วงพีเอช 2.6 ถึง 9.0 โดยเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์อยู่ในช่วงร้อยละ 80.44 ถึง 91.95 ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์อยู่ในช่วงร้อยละ 86.77 ถึง 76.29 ดังแสดงในรูปที่ 4.22 และรูปที่ 4.23

จากการวิจัยของ Ito *et al.* (1992) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนส XylA, XylB และ XylC ที่ผลิตจาก *Aspergillus kawachii* มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้าง โดยมีความคงตัวในช่วงพีเอช 3.0 ถึง 10.0, 3.0 ถึง 10.0 และ 1.0 ถึง 9.0 ตามลำดับ และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของกฤษฎา เวทีวุฒาจารย์ (2542) ซึ่งศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส B ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. PC

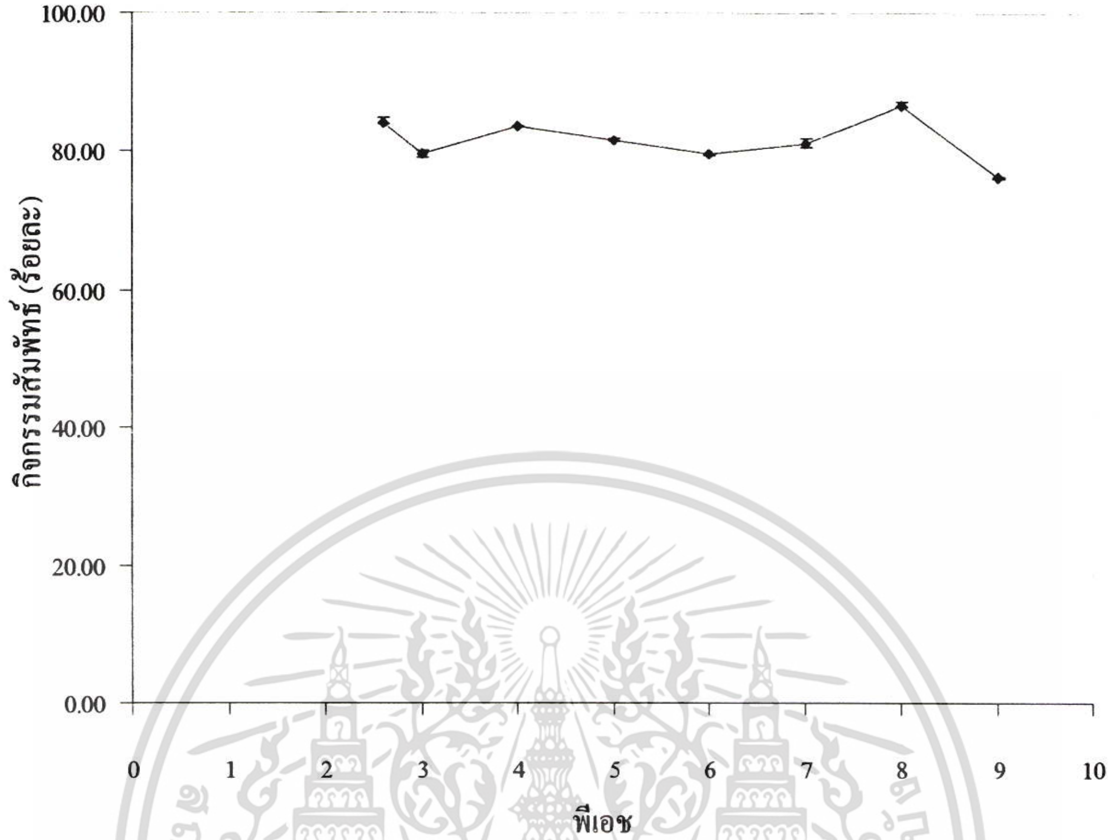
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

22 ที่มีต่อพีเอช โดยพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้าง คือช่วงพีเอช 5.5 ถึง 9.0 ซึ่งแตกต่างจากไซลาเนส U ที่มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วง 5.5 ถึง 6.0



รูปที่ 4.22 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ต่อพีเอช เมื่อบ่มที่พีเอชต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.23 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ต่อพีเอช เมื่อบ่มที่พีเอชต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที

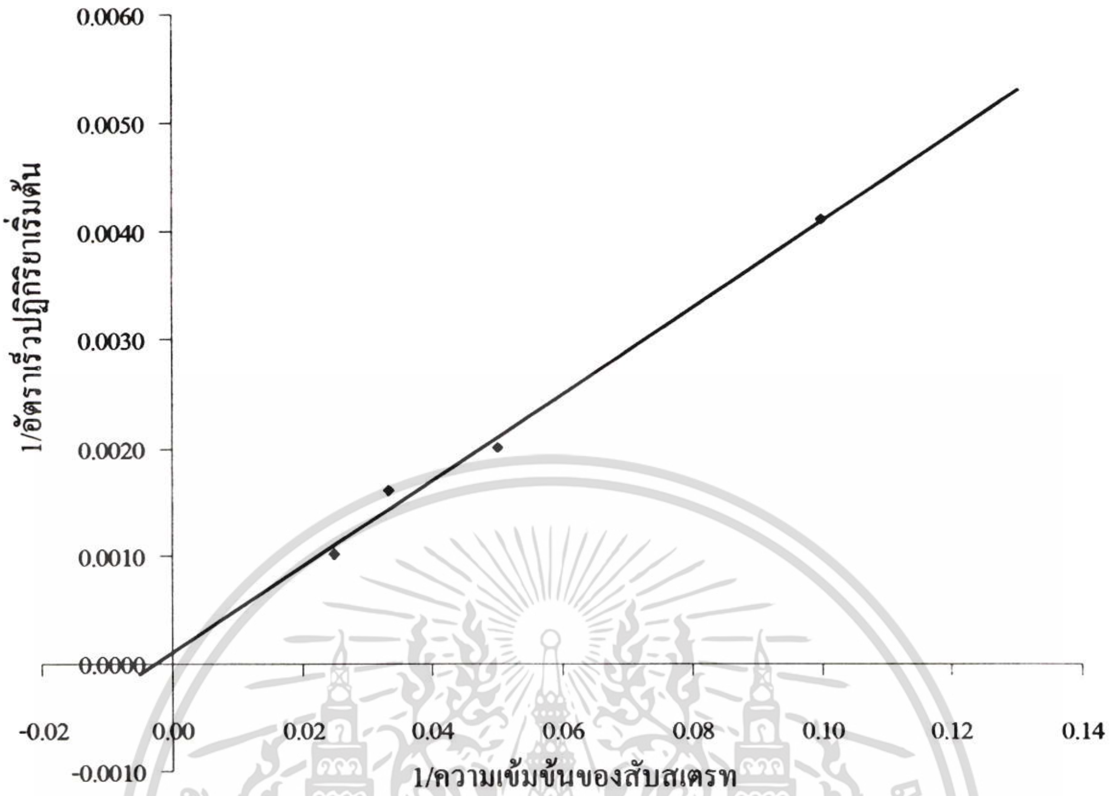
4.9.5 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์ไซลาเนส

หลังจากทำการบ่มเอนไซม์ไซลาเนสกับ oat spelt xylan ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ ร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 ที่พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเวลาต่าง ๆ คือที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างน้ำตาลที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ เพื่อหาค่าอัตราของปฏิกิริยาเร็วเริ่มต้น และนำค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มต้นที่ได้มาเขียนกราฟ Lineweave-Burk ระหว่าง 1/ความเข้มข้นของสับสเตรท และ 1/อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา เพื่อคำนวณหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทและอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.24 และ 4.25 โดยพบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 มีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 476.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดเท่ากับ 10,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที และเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 14.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดเท่ากับ 303.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

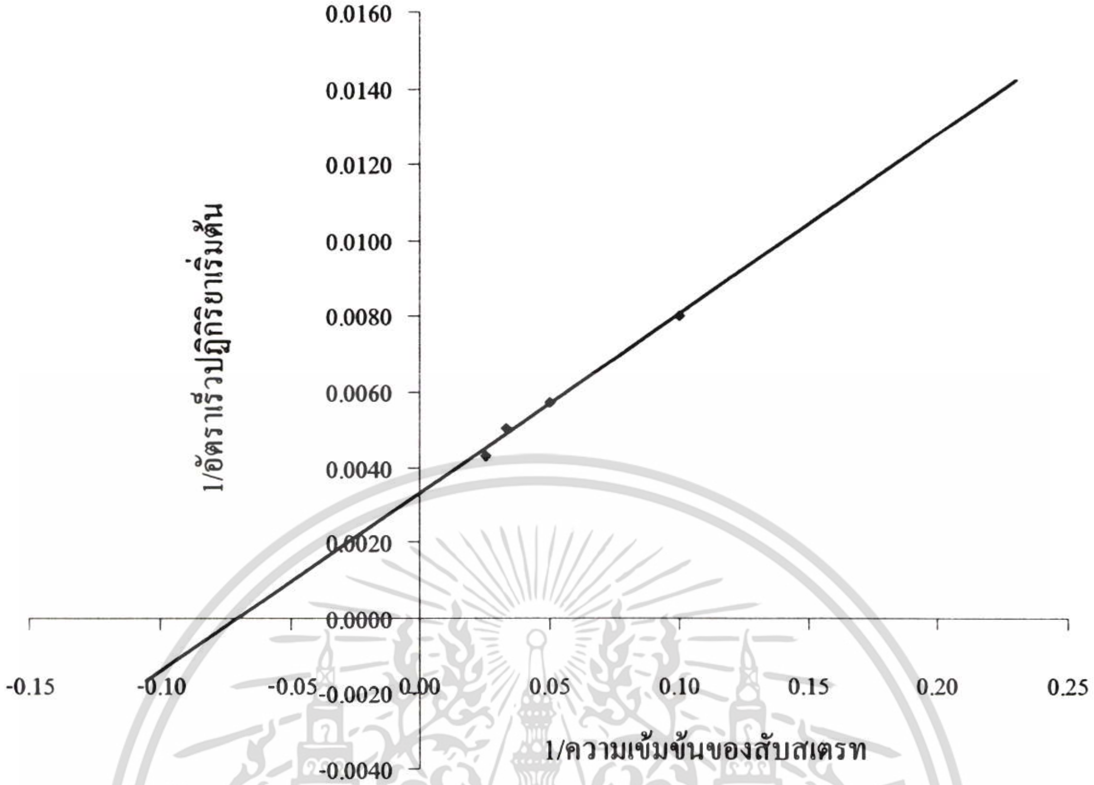
จากการวิจัยของกฤษฎา เวทีวุฒาจารย์ (2542) ซึ่งศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ไซลาเนส B และ U ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. PC 22 พบว่ามีความจำเพาะต่อ oat spelt xylan 1.65 และ 5.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังศึกษาความจำเพาะต่อ birchwood xylan โดยเอนไซม์ไซลาเนส B และ U มีค่าความจำเพาะเท่ากับ 0.63 และ 2.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Lin *et al.* (1999) ซึ่งศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Thermomyces lanuginosus* สายพันธุ์ SSBP โดยใช้ birchwood xylan เป็นสับสเตรท พบว่าค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดเท่ากับ 6,300 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 3.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิจัยของ Bataillon *et al.* (2000) ที่ศึกษาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทและค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. SPS-0 พบว่าค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ brichwood xylan เป็นสับสเตรท และมีค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดเท่ากับ 2,420 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที จากการวิจัยของ Salles *et al.* (2000) ซึ่งศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Acrophialophora nainiana* พบว่ามีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 16.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ brichwood xylan เป็นสับสเตรท จากการวิจัยของ Georis *et al.* (2000) ที่ศึกษาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทและค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. S38 พบว่าค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทของ Xyl1, Xyl2 และ Xyl3 เท่ากับ 2.22±0.06, 1.05±0.08 และ 0.97±0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ และมีค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดเท่ากับ 5,700±600, 620±30 และ 1,050±50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และจากการวิจัยของ Chen *et al.* (1997) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Trichoderma longibrachiatim* มีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 10.14 มิลลิกรัมไซแลนต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ oat spelt xylan เป็นสับสเตรท และมีค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด 4,025 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.24 กราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/อัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มต้น และ 1/ความเข้มข้นของสับสเตรท ของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



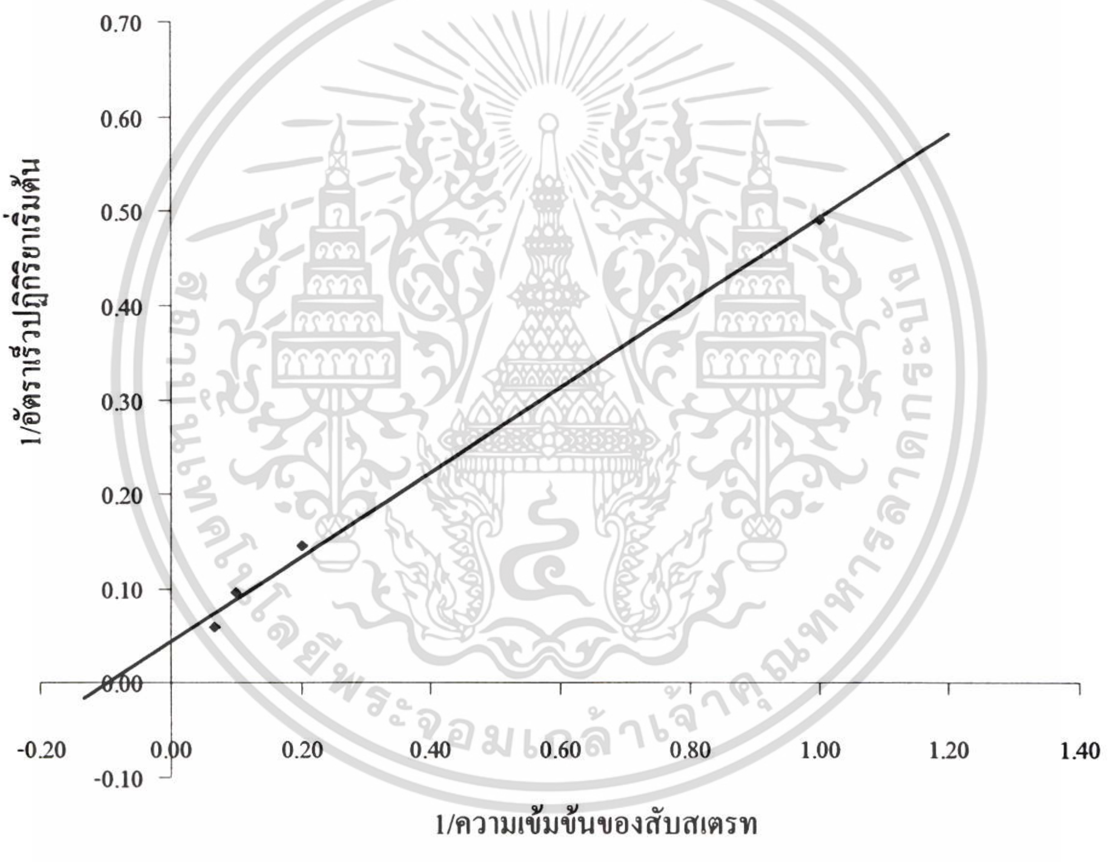
รูปที่ 4.25 กราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/อัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มต้น และ 1/ความเข้มข้นของสับสเตรท ของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

4.9.6 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์เซลลูเลส

หลังจากทำการบ่มเอนไซม์ไซลาเนสกับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือร้อยละ 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 ที่พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเวลาต่าง ๆ คือที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างน้ำตาลที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ เพื่อหาค่าอัตราของปฏิกิริยาเร็วเริ่มต้น และนำค่าอัตราของปฏิกิริยาเร็วเริ่มต้นที่ได้มาเขียนกราฟ Lineweave-Burk ระหว่าง 1/ความเข้มข้นของสับสเตรทและ 1/อัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มต้น เพื่อคำนวณหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทและอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.26 และ 4.27 โดยพบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 มีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 10.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดเท่ากับ 22.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที และเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 11.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดเท่ากับ 15.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที

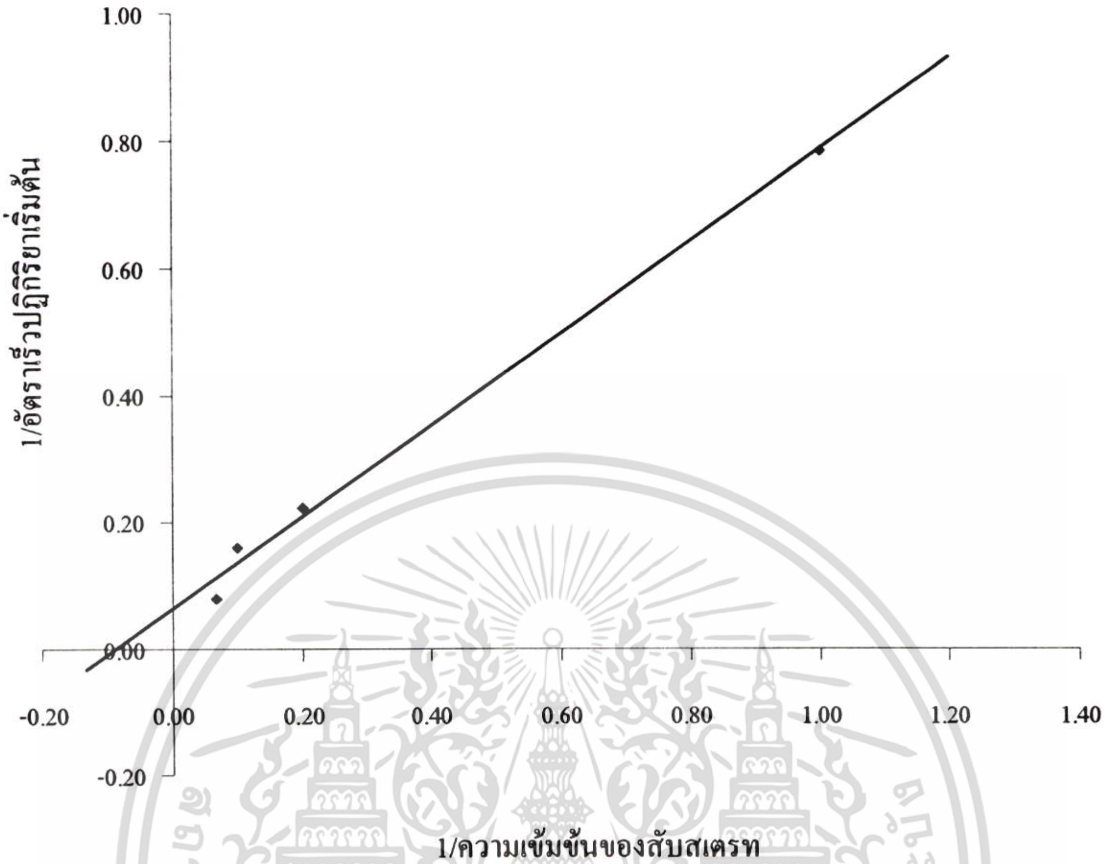
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิจัยพบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนซึ่งผลิตได้จากเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ยังคงมีเอนไซม์เซลลูเลสปนอยู่ และค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์เซลลูเลสมีค่าน้อยกว่าค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ไซลาเนส และมีค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์เซลลูเลสน้อยกว่าค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ไซลาเนสจึงทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดทางเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าเอนไซม์เซลลูเลส จากการวิจัยของ Castellanos *et al.* (1995) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Penicillium* sp. มีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร และมีอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดเท่ากับ 330 ไมโครโมลาร์ต่อนาทีต่อกรัมโปรตีน



รูปที่ 4.26 กราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/อัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มต้น และ 1/ความเข้มข้นของสับสเตรท ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 กราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/อัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มต้น และ 1/ความเข้มข้นของสับสเตรท ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยพบว่าจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งเมื่อใช้ธูปฤาษีเป็นสับสเตรทคือ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISRT 3175 ซึ่งสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ประกอบด้วยทริปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 และพีเอชเริ่มต้น 7.0 ส่วนสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ประกอบด้วยยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 และพีเอชเริ่มต้น 6.0

จากการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยใช้สับสเตรทชนิดต่าง ๆ พบว่าสับสเตรทที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดคือรำละเอียด แต่กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสก็สูงเช่นกัน ซึ่งจากการเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์โดย *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISRT 3175 ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงแต่กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำคือชานอ้อยและแกลบ ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราทั้ง 2 ชนิด โดยใช้สับสเตรทเป็นธูปฤาษีที่ผ่านและไม่ผ่านการ pre-treatment พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากธูปฤาษีที่ผ่านการ pre-treatment มีค่ามากกว่าการใช้ธูปฤาษีที่ไม่ผ่านการ pre-treatment จากการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งกับสภาวะการผลิตแบบอาหารเหลว พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลเนสมากกว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการผลิตแบบอาหารเหลว และจากการศึกษาการเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปสารละลาย พบว่าการเติมสารช่วยรักษาความคงตัวคือ ซอร์บิทอลและแมนนิทอลช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสได้

จากการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 พบว่าภายหลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 50 ถึง 60 จากนั้นนำมาทำการไดอะไลซิส และผ่านการอัลตราฟิวเตรชัน เอนไซม์ไซลาเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 62.25 เท่า โดยมีกิจกรรมจำเพาะ 899.50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 50 องศาเซลเซียส และ 4.0 ตามลำดับ เอนไซม์ไซลาเนสมีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้าง (2.6 ถึง 9.0) และมีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทและค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ oat spelt

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

xylan เป็นสับสเตรท เท่ากับ 476.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10,000.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ และจากการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 0.80 เท่า ภายหลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 60 ถึง 70 จากนั้นนำมาทำการไดอะไล-ซิส และผ่านการอัลตราฟิวเตรชัน โดยมีกิจกรรมจำเพาะ 4.05 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 50 องศาเซลเซียส และ 4.0 ตามลำดับ เอนไซม์ไซลาเนสมีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้าง (2.6 ถึง 9.0) และมีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทและค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้ oat spelt xylan เป็นสับสเตรท เท่ากับ 14.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 303.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กฤษฎา เวทีวุฒาจารย์. 2542. "การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp. PC 22." **วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.**

กิติพร พรหมเทศน์ และ สุนันท์ แรมสว่าง. 2544. "การกำจัดโครเมียมจากน้ำเสียด้วยต้นธูปฤาษี." ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติ วิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

คุษณี ธนะบริพัฒน์. 2538. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ทวีสิริ มาลาพันธุ์. 2546. "การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Aspergillus usamii* TISTR 3258 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ปิยะมาส สิริแสงสว่าง. 2543. "การผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Humicola lanuginose* ด้วยวิธีการหมักในถังหมักทรงกระบอกขนาด 5 ลิตร." วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณีทิพย์ ซิ่วกุ้ง. 2542. "การผลิตกระดาษจากธูปฤาษีในระดับครัวเรือน." ปัญหาพิเศษครุศาสตร-บัณฑิต สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร ครุศาสตร์อุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระ-จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. **เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ : โอ. เอส. พรินติ้งเฮ้าส์.

สมใจ ศิริโภค. 2537. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530. **พันธุ์ไม้น้ำ.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์. 2530. **เทคโนโลยีการหมัก.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

สุรชัย มัจฉาชีพ. 2538. **วัชพืชในประเทศไทย.** กรุงเทพฯ : แพร่พิทยา.

อัญชริดา สวารชร. 2542. "การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมโดยกระบวนการหมักแบบแข็ง." **วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.** 24(1) : 13-20.

Aidoo, K. E. *et al.* 1982. "Solid substrate fermentation." **Adv. Appl. Microbiol.** 28 : 201-237.

Angelo, R. *et al.* 1997. "Stability and chemical modification of xylanase from *Aspergillus* sp. (2MI strain)." **Biotechnol. Appl. Biochem.** 25 : 19-27.

A.O.A.C.. 1990. **Offical Methods of Analysis by the Association of official Analytical Chemists.** 15th ed. Washington D. C. : Georgo Benta.

Archana, A. and Satyanarayana, T. 1997. "Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation." **Enzyme Microbial Technol.** 21 : 12-17.

Bailey, M. J. *et al.* 1991. "Purification and properties of two xylanase from *Aspergillus oryzae*." **Biotechnol. Appl. Biochem.** 13 : 380-389.

Bailey, M. J. *et al.* 1993. "Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan- and cellulose-based media." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 40 : 224-229.

Bakair, U. *et al.* 2001. "An endo-β-1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae* : production, partial purification and biochemical characterization." **Enzyme Microbial Technol.** 29 : 328-334.

Bataillon, M. *et al.* 2000. "Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0." **Enzyme Microbial Technol.** 26 : 187-192.

Beldman, G. *et al.* 1988. "Specific and nonspecific glucanases from *Trichoderma viride*." **Biotechnol. Bioeng.** 31 : 160-167.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Biely, P. 1985. "Microbial xylanolytic systems." **Trends Biotechnol.** 3(11) : 286-290.

Biswas, R. S. *et al.* 1988. "Xylanase and β-xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocellulose." **Biotechnol. Bioeng.** 31 : 613-616.

Blanco, A. *et al.* 1995. "Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23." **Appl. Environ. Microbiol.** 61(12) :4468-4470.

Breccia, D. J. *et al.* 1998. "Purification and characterization of a thermostable xylanases from *Bacillus amyloliquefaciens*." **Enzyme Microbial Technol.** 22 : 42-49.

Bronnenmeier, K. *et al.* 1995. "Purification of *Thermotoga maritime* enzymes for the degradation of cellulosic materials." **Appl. Environ. Microbiol.** 61(4) : 1399-1407.

Buchert, J. *et al.* 1994. "Application of xylanase in the pulp and paper industry." **Bioresource Technol.** 50 : 65-72.

Carlile, M. J. and Watkinson, S. C. 1994. **The Fungi.** New York : Academic Press.

Cavazzoni, V. *et al.* 1989. "D-xylanase produced by *Schizophyllum radiatum*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 30 : 247-251.

Cesar, T. and Mrsa, V. 1996. "Purification and properties of the xylanase produced by *Thermomyces lanuginosus*." **Enzyme Microbial Technol.** 19 : 289-295.

Castellanos, O. F. *et al.* 1995. "Comparative evaluation hydrolytic efficiency toward microcrystalline cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* cellulases." **Bioresource Technol.** 52 : 119-124.

Chaudary, P. and Deobagkar, D. N. 1997. "Purification and characterization of xylanases from *Cellulomonas* sp. N.C.I.M. 2353." **Biotechnol. Appl. Biochem.** 25 : 127-133.

Chen, C.-C. *et al.* 1997a. "Release of lignin from kraft pulp by a hyperthermophilic xylanase from *Thermatoga maritima*." **Enzyme Microbial Technol.** 20 : 39-45.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chen, C. *et al.* 1997b. "Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatim* for xylooligosaccharide production." **Enzyme Microbial Technol.** 21 : 91-96.

Chivero, T. E. *et al.* 2001. "Partial purification and characterisation of a xylanase enzyme produced by a micro-organism isolated from selected indigenous fruits of Zimbabwe." **Food Chemis.** 72 : 179-185.

Christakopoulos, P. *et al.* 1996. "Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3." **J. Biotechnol.** 51 : 181-189.

Das, A. and Nanda, G. 1994. Production of xylanolytic enzyme during growth on pulverized grass by *Aspergillus ochraceus*-42. **Letters Appl. Microbiol.** 20 : 141-144.

Dekker, R. F. and Richards, G. N. 1976. "Hemicellulose : their occurrence, purification, properties and mode of action." **Adv. Carbohydr. Biochem.** 32 : 277-352.

de Paula Silveira, F. Q. *et al.* 1999. "A new xylanase from a *Trichoderma harzianum* strain." **J. Industrial Microbiol. Biotechnol.** 23 : 682-685.

Deschamp, F. and Huet, M. C. 1985. "Xylsnase production in solid-state fermentation : a study of its properties." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 22 : 177-180.

de Vries, R. P. and Visser, J. 2001. "Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides." **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** 65(4) : 497-522.

Dupont, C. *et al.* 1998. "Substrate-binding domain of glycanases from *Streptomyces lividans* : characterization of a new family of xylan-binding domains." **Biochem. J.** 330 : 41-45.

Femandez-Espinar, M. T. *et al.* 1994. "Purification, characterization and regulation of the systhesis of an *Aspergillus nidulans* acedic xylanase." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42 : 555-562.

Flint, H. I. *et al.* 1997. "Interrupted catalytic domain structures in xylanases from two distantly related strains of *Prevotella ruminicola*." **Biochemica et Biophysica.** 1337 : 161-165.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Flores, M. E. *et al.* 1997. "β-xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035." **Lett. Appl. Microbiol.** 24 : 410-416.

Frederick, M. M. *et al.* 1985. "Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points." **Biotechnol. Bioeng.** 27 : 525-532.

Fujimoto, H. *et al.* 1995. "Purification and properties of three xylanases from *Aspergillus aculeatus*." **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 59 : 538-540.

Garg, A. P. *et al.* 1996. "Biobleaching effect of *Streptomyces thermoviolaceus* xylanase preparations on birchwood kraft pulp." **Enzyme Microbial Technol.** 18 : 261-267.

Gattinger, L. D. *et al.* 1990. "The use of canola meal as a substrate for xylanase production by *Trichoderma reesei*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 33 : 21-25.

George, S. P. *et al.* 2001. "A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of additives on thermostability." **Bioresource Technol.** 78 : 221-224.

Georis, J. *et al.* 1999. "Sequence, overproduction and purification of the family 11 endo-β-1,4-xylanases encoded by the *xyl*1 gene of *Streptomyces* sp. S38." **Gene.** 237 : 123-133.

Georis, J. *et al.* 2000. "Purification and properties of three-β-1,4-xylanase produces by Streptomyces sp. Strain S38 which differ in their ability to enhance the beaching of kraft pulps." **Enzyme Microbial Technol.** 26 : 178-186.

Ghosh, M. and Nanda, G. 1994. "Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49." **Appl. Environ. Microbiol.** 60(12) : 4620-4623.

Gilbert, M. *et al.* 1993. "A comparison of 2 xylanases from the thermophilic fungi *Thielavia terrestris* and *Thermoascus crustaceus*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 40(4) : 508-514.

Gilbert, H. J. and Hazzlewod, G. P. 1993. "Bacterial cellulases and xylanases." **J. Gen. Microbiol.** 139 : 187-194.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Godden, B. *et al.* 1989. "Regulation of the production of hemicellulytic and cellulytic enzymes by a *Streptomyces* sp. growing on lignocellulose." **J. Gen. Microbiol.** 135 : 285-292.

Gokhale, D. V. and Deobagkar, D. N. 1989. "Differential expression of xylanases and endoglucanases in the hybrid derived from intergeneric protoplast fusion between a *Cellulomonas* sp. and *Bacillus subtilis*." **Appl. Environ. Microbiol.** 55(10) : 2675-2680.

Gokhale, D. V. *et al.* 1986. "Xylanase and β-xylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207." **Biotechnol. Lett.** 8(2) : 137-138.

Gomes, J. *et al.* 1992. "Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 40 : 224-229.

Gomes, J. *et al.* 1993. "Production of high level of cellulose-free and thermostable xylanase by a wild strain of *Thermomyces lanuginosus* using beechwood xylan." **J. Biotechnol.** 30 : 289-297.

Gomes, J. *et al.* 1994. "Production of highly thermostable xyalnase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme." **J. Biotechnol.** 37 : 11-12.

Grabski, A. C. and Jeffries, T. W. 1991. "Production, purification and characterization of β-(1,4)-endoxylanases of *Streptomyces roseiscleroticus*." **Appl. Environ. Microbiol.** 57(4) : 987-992.

Haapala, R. *et al.* 1996. "Production of endo- 1,4-glucanase and xylanase with nylon-web immobilized and free *Trichoderma reesei*." **Enzyme Microbial Technol.** 18 : 495-501.

Haltrich, D. *et al.* 1996. "Production of fungal xylanase." **Bioresource Technol.** 58 : 137-161.

Hebraud, M. and Ferve, M. 1990. "Purification and characterization of an extracellular beta-xylosidase from the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*." **FEMS Microbiol. Lett.** 17(1) : 11-16.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hesseltine, C. W. 1977. "Solid state fermentation part 1." **Process Biochem.** 12(6) : 24-27.

Ishihara, M. *et al.* 1997. "Purification and some properties of a thermostable xylanase from thermophilic fungus strain HG-1." **J. Ferment. Bioeng.** 83(5) : 478-480.

Ito, K. *et al.* 1992. "Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*." **Biosci. Bioeng.** 56(4) : 547-550.

Jurasek, L. and Paice, M. G. 1992. **Pulp and Paper Cluster.** Washington D.C. : U.S. Environmental Protection Agency.

Kang, M. K. *et al.* 1996. "Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic *Cephalosporium* sp. strain RYM-202." **Appl. Environ. Microbiol.** 62(9) : 3480-3482.

Keskar, S. S. 1992. "High activity xylanase from thermotolerant *Streptomyces* T_7 : cultural conditions and enzyme prpperties." **Biotechnol. Lett.** 14(6) : 481-484.

Khanongnuch, C. *et al.* 1998. "β-mannanase and xylanase of *Bacillus subtilis* 5H active for bleaching of crude pulp." **J. Ferment. Bioeng.** 86(5) : 461-466.

Khasin, A. *et al.* 1993. "Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6." **Appl. Environ. Microbiol.** 59(6) : 1725-1730.

Kimura, I. *et al.* 1995. "Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*." **J. Ferment. Bioeng.** 80(4) : 334-339.

Kitpreechavanich, V. *et al.* 1984. "Production of xylan degrading enzymes by thermophilic fungi, *Aspergillus fumigatus* and *Humicola lanuginose*." **J. Ferment. Technol.** 62(1) : 63-69.

Kitpreechavanich, V. *et al.* 1992. "Production of cellulose and xylan degradind enzymes by *Aspergillus fumigatus* No. 4-45-IF using agricultural wastes as substrate." **The Kasetsart J.** 20(2) : 296-306.

Kluepfel, D. *et al.* 1986. "Characterization of cellulose and xylanase activities of *Streptomyces lividans*." **Appl. Microbiol. Technol.** 24 : 230-234.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kormelink, F. J. M. *et al.* 1993. "Purification and characterization of three endo-(1,4)- β-xylanases and one β-xylosidase from *Aspergillus awamori*." **J. Biotechnol.** 27 : 249-265.

Kyu K. L. *et al.* 1994. "Induction of xylanase in *Bacillus circulans* B6." **Bioresource Technol**. 48 : 163-167.

Lee, Y. E. *et al.* 1993. "Regulation and characterization of xylanolytic enzymes of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI." **Appl. Environ. Microbiol.** 59(3) : 763-771.

Lin, J. *et al.* 1999. "Purification and biochemical characterizations of β-D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP." **Biotechnol. Appl. Biochem.** 30 : 73-79.

Lindner, C. *et al.* 1994. "Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*." **Microbiol.** 140 : 753-757.

Liu, W. *et al.* 1998. "Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409." **Process Biochem.** 33(3) : 331-336.

Lopez-Fernandez, C. L. *et al.* 1998. "Application of the affinity binding of xylanases to oat-spelt xylan in the purification of endoxylanase CM-2 from *Streptomyces chattanoogensis* CECT 3336." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 50 : 284-287.

Lowry, O. H. *et al.* 1951. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." **J. Biol. Chem.** 193 : 265-275.

Mandels, M. and Weber, J. 1969. **The production of cellulose.** ***In*** **Cellulose and their applications.** (Gould, R. E. *et al.*) Adv. Chem. Ser. 95, American Chemistry Society, Washington D. C. 391-398 pp.

Magnuson, S. T. and Crawford, D. L. 1997. "Purification and characterization of an alkaline xylanase from *Streptomyces viridosporus* T7A." **Enzyme Microbial Technol.** 21 : 160-164.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Matsuo, M. and Yasui, T. 1984. "Purification and some properties of β-xylosidase from *Trichoderma viride*." **Argic. Biol. Chem.** 51(5) : 2367-2379.

Matte, A. and Forsberg, C. W. 1992. "Purification, charaterization and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85." **Appl. Environ. Microbiol.** 58(1) : 157-168.

McCarthy, A. J. and Bachmann, S. L. 1992. **Progress in Biotechology. Vol. 7.** Netherlands : Elsevier Science Publisers.

Milagres, A. *et al.* 1993. "Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*." **Enzyme Microbial Technol.** 15 : 248-253.

Misha, C. *et al.* 1985. "Production of highly thermo-stable enzyme in association with the cellulytic activities of *Penicillium funiculosum*." **Enzyme Microbial Technol.** 7 : 295-299.

Morag, E. *et al.* 1990. "Relationship of cellulosomal and non cellulosomal xylanases of *Clostridium thermocellum* to cellulose-degrading enzymes." **J. Bacteriol.** 172(10) : 6098-6105.

Nakamura, S. *et al.* 1993. "Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkalophilic *Bacillus* sp. strain 41M-1." **Appl. Environ. Microbiol.** 59(7) : 2311-2316.

Nakanishi, K. *et al.* 1987. "Induction of membrane bound xylosidase in a *Streptomyces* sp." **J. Ferment. Technol.** 65 (1) : 1-6.

Nanmori, T. *et al.* 1990. "Purification and some properties of thermostable of xylanase and β-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain." **J. Bacteriol.** 172 (12) : 6669-6672.

Nath, D and Rao, M. 1995. "Increase in stability of xylanase from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* (NCIM 59)." **Biotechnol. Lett.** 17(5) : 557-560.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Okeke, B. C. and Obi, S. K. C. 1995. "Saccharification of ago-waste materials by fungal cellulases and hemicellulose." **Biroresource Technol.** 51 : 23-27.

Paice, M. G. *et al.* 1978. "Production, characterization and partial amino acid sequence of xylanase A from *Shizophyllum commune*." **Appl. Envieon. Microbiol.** 36(6) : 802-808.

Pandey, A. 1992. "Recent process development in solid-state fermentation." **Process Biochem.** 27 : 109-117.

Pandey, A. 1994. **Solid state fermentation.** India : New Ageinternational Publishers.

Pou-Llinas, J. and Driguez, H. 1987. "D-xylose as inducer of the xylan-degrading enzyme system in the yeast *Pullularia pullulans*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 27 : 134-138.

Raghukumar, S. *et al.* 1994. "Thraustochytrid and fungal component of marine detritus. IV. Labboratory studies on decomposition of leaves of the mangrove *Rhizophora apiculata* Blume." **J. Experim. Marine Biol. Ecol.** 183(1) : 113-131.

Rapp, P. and Wagner, F. 1986. "Production and properties of xylan-degrading enzymes from *Cellulomonas uda*." **Appl. Environ. Microbiol.** 51(4) : 746-752.

Ratanakhanokchai, K. *et al.* 1999. "Purification and some properties of a xylan-binding endoxylanase from alkalophilic *Bacillus* sp. strain K-1." **Appl. Environ. Microbiol.** 65(2) : 694-697.

Ratto, M. *et al.* 1992. "Production of xylanolytic enzymes by alkalotolerant *Bacillus circulans* strain." **Appl. Microbiol. Technol.** 37 : 470-473.

Ratto, M. *et al.* 1994. "Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus* sp. In enzymatic treatment of kraft pulps." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 41 : 130-133.

Riou, C. *et al.* 1991. "Production of cellwall degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*." **Appl. Environ. Microbiol.** 57(5) : 1478-1484.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ristroph, D. L. and Humphreyt, A. E. 1985. "The β-xylosidase of *Thermomonospora fusca*." **Biotechnol. Bioeng.** 27 : 909-913.

Ritschkoff, A.-C. *et al.* 1994. "Purification and characterization of a thermophilic xylanase from the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*." **J. Biotechnol.** 32 : 67-74.

Rodionova, N. A. and Tavobilov, I. M. 1983. "β-xylosidase of *Aspergillus niger* 15 : purification and properties." **J. Appl. Biochem.** 5 : 300-312.

Roger, J. C. and Nakas, J. P. 1989. "Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*." **Enzyme Microbial Technol.** 11 : 405-410.

Royer, J. C. and Nakas, J. P. 1990. "Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longgibrachiatum*." **Appl. Environ. Microbiol.** 56(8) : 2535-2539.

Ruiz-Arribas, A. *et al.* 1995. "Overproduction, purification and biochemical characterization of a xylanase (*xyl*1) from *Streptomyces halstedii* JM8." **Appl. Environ. Microbiol.** 61(6) : 2414-2419.

Salles, B. C. *et al.* 2000. "Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*." **J. Biotechnol.** 81 :199-204.

Saraswat, V. and Bisaria, V. S. 1997. "Biosysthesis of xylanolytic and xylan-debranching enzymes in *Melanocarpus albormyces* IIS68." **J. Ferment. Bioeng.** 83(4) : 352-357.

Saxena, S. *et al.* 1991. "Production and Iocaisation of carboxymethylcellulase, xylanase and β-glucosidase from *Cellulomonas* and *Micrococous* spp." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 34 : 668-670.

Saxena, A. *et al.* 1994. "Production and characterization of a xylanase from *Cyathus stercoreus*." **World J. Microbiol. Biotechnol.** 10:293-295.

Senior, D. J. *et al.* 1989. "Xylanase production by *Trichoderma harzianum* E58." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 32 : 137-142.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schyns, P. J. Y. M. J. and Stams, A. J. M. 1992. **Progress in Biotechology. Vol. 7.** Netherlands : Elsevier Science Publisers.

Shamala, T. R. and Sreekantiah, K. R. 1987. "Successive cultivation of selected cellulolytic fungi on rice straw and wheat bran for economic production of cellulose and D-xylanase." **Enzyme Microbial Technol.** 9 : 97-101.

Shao, W. and Wiegel, J. 1992. "Purification and characterization of a thermostable β-xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*." **J. Bacteriol.** 174(8) : 5848-5853.

Singh, S. *et al.* 2000. " Production and properties of hemicellulose by a *Thermomyces lanuginosus* strain." **J. Appl. Microbiol.** 88 : 975-982.

Smith, D. C. and Forsberg, C. W. 1991. "α-Glucuronidase and other hemicellulose activities of *Fibrobacter succinogenes* S85 grown on crystalline cellulose or ball-milled barley straw." **Appl. Environ. Microbiol.** 57(12) : 3552-3557.

Smith, D. C. and Wood, T. 1991a. "Isolation of mutants of *Aspergillus awamori* with enhanced production of extracellular xylanase and β-xylosidase." **World J. Microbiol. Biotechnol.** 7 : 343-354.

Smith, D. C. and Wood, T. 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 maintaing low protease production." **Biotechnol. Bioeng.** 38 : 883-890.

Sharma, P. *et al.* 1986. "Limitation of the congo-red staining technique for the detection of cellulolytic activities." **Biotechnol. Lett.** 8 : 579-580.

Tenkanen, M. J. P. *et al.* 1993. "Enzymatic deacetylation of galactoglucomannans." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 39 : 159-165.

Trigo, C. and Ball, A. S. 1994. "Production of extracellular enzymes during the solubilisation of straw by *Thermomonospora fusca* BD25." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 41 : 366-372.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tsujibo, H. *et al.* 1990. "Purification and properties of three types of xylanases produced by an alkalophilic actinomycete." **J. Appl. Bacteriol.** 69 : 398-405.

Utta, E. A. *et al.* 1991. "Sequencing and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* xyl B. Gene encoding novel bifunctional protein with β-D-xylosidase and α-L-arabinofuranosidase of actives." **Appl. Environ. Microbiol.** 57 (4) : 1227-1234.

Uziie, M. *et al.* 1985. "Possible identify of β-xylosidase and β-glucosidase of *Chaetomium trilaterate*." **Agric. Biol. Chem.** 49(4) : 1167-1173.

Wase, D. A. J. *et al.* 1985. "Production of β-D glucosidase, endo-1,4-β-D glucanase and D-xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI255091." **Enzyme Microbial Technol.** 7 : 225-229.

Win, M. *et al.* 1987. "Immunological relationships of four types of β-xylosidase from *Penicillium wortmanni* IFO 7237." **Agric. Biol. Chem.** 51(11) : 3151-3152.

Wolfgang, H. *et al.* 1990. "Xylan degrading thermophilic *Clostridium stercorarium*; cloning and expression of xylanase, β-D-xylosidase and α-L-arabinofuranosidase genes in *Escherichia coli*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 33(1-6) : 368-373.

Wong, K. K. Y. *et al.* 1988. "Multiplicity of β-1,4-xylanase in microorganism : functions and applications." **Microbiol. Rev.** 52(3) : 305-317.

Wong, K. K. Y. and Saddler, J. N. 1992. "*Trichoderma* xylanases, their properties and application." **Crit. Rev. Biotechnol.** 12 : 413-435.

Xu, J. *et al.* 1998. "Xylanase induction by L-sorbose in a fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7." **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 62(8) : 1555-1559.

Yang, X. *et al.* 2001. "Bioconversion of corn straw by coupling and solid-state fermentation." **Bioresource Technol.** 78 : 277-280.

Yoshioka, H. *et al.* 1981. "Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50." **Agric. Biol. Chem.** 45(3) : 579-586.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. feed solution (Yang *et al.* 2001)

ส่วนประกอบของ feed solution (กรัม/ลิตร)

แอมโมเนียมซัลเฟต	20.0
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	8.0
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	6.4
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต	0.8

2. อาหารสูตร potato dextrose agar (PDA)

ส่วนประกอบของสูตรอาหาร (กรัม/ลิตร)

มันฝรั่ง	200
เด็กซ์โตรส	20
ผงวุ้น	15

3. สูตรอาหาร minimal medium

ส่วนประกอบของสูตรอาหาร (1 ลิตร)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.4	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต	4.45	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต	0.2	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	1.0	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.01	กรัม
Trace element (10X)	0.10	มิลลิลิตร 1 ลิตร ประกอบด้วย
ซิงค์ (II) คลอไรด์	0.4	กรัม
เฟอร์รัส (III) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	2.0	กรัม
คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ไดไฮเดรต	0.118	กรัม
แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต	0.1	กรัม
โซเดียมบอเรตเดคะไฮเดรต	0.1	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดรตเตตระไฮเดรต	0.1	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สับสเตรท	5.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม

4. สูตรอาหาร xylan medium (Sharma *et al.* 1986)

ส่วนประกอบของสูตรอาหาร (กรัม/ลิตร)

<u>ส่วนที่ 1</u>

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.4
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต	0.3
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.3
ยูเรีย	0.3
โปรติโอสเปปโตน	0.23
ยีสต์สกัด	0.1
ไซแลน	10.0
ผงวุ้น	18-20

<u>ส่วนที่ 2</u> แร่ธาตุผสม ประกอบด้วย (กรัม/ลิตร)

เฟอร์รัส (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	5.0
ซิงค์ (II) ซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต	1.40
แมงกานีส (II) ซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต	4.56
โคบอลต์ (II) คลอไรด์	2.0

วิธีการเตรียม

1. ส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 1 ละลายน้ำตามลำดับรวมกัน ยกเว้นแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต จะต้องเตรียมแยกออกมาเนื่องจากจะทำให้ตกตะกอน

2. ส่วนประกอบของอาหารส่วนที่ 2 ละลายน้ำตามลำดับรวมกัน นำ 1 มิลลิลิตร ไปรวมกับข้อ 1

3. ปรับค่าพีเอชเป็น 6.0 จากนั้นเติมไซแลน และเติมผงวุ้น

4. ต้มให้วุ้นละลาย และเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตระไฮเดรตที่ละลายไว้ตามสัดส่วน คนให้เข้ากัน

5. บรรจุลงขวดบรรจุอาหาร

6. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. **นำแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่แยกไว้นำไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.25 ไมครอน**

8. **เมื่อสารจากข้อ 6 เย็นลงนำไปผสมกับแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ผ่านการกรองจุลินทรีย์แล้วตามสัดส่วน**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. วิธีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (Bailey *et al.* 1992)

1.1. สารเคมี : ไดไนโตรซาลิกไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 1.0 %

เตรียมโดยชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างทีละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Rochelle salt) ลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

<u>หมายเหตุ</u> อาจจะเติมโซเดียมซัลไฟต์อีกร้อยละ 0.05 ก่อนนำสารละลายดีเอ็นเอสไปใช้

1.2. สารละลายสับสเตรท

ละลาย oat spelts xylan ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.8 โฮโมจีไนซ์ไซแลน 1.0 กรัมในบัฟเฟอร์ประมาณ 80 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และนำไปต้มให้เดือดบน heating magnetic stirrer จากนั้นทำให้เย็นด้วยการกวนอย่างต่อเนื่องอย่างช้า ๆ ในอ่างน้ำแข็งข้ามคืน และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยบัฟเฟอร์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ไม่ควรเกิน 1 สัปดาห์) หรือแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และต้องผสมให้ดีหลังจากการละลาย

1.3. วิธีการ

1.3.1. ปิเปตต์สารละลายสับสเตรท 1.8 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

1.3.2. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่าง (ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกแล้ว) ที่ต้องการวิเคราะห์ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

1.3.3. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

1.3.4. เติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.3.5. นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

1.3.6. แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็น

1.3.7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.8. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของไซโลส ในสารละลายตัวอย่าง

1.3.9. ทำกราฟมาตรฐานไซโลส โดยใช้สารละลายไซโลสความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร แทนเอนไซม์ไซลาเนส และวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1 ถึง 7 จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของไซโลส

1.3.10. การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ไมโครโมลของไซโลส x ความเจือจาง}}{\text{ระยะเวลาบ่ม x ปริมาตรเอนไซม์}}$$

$$\text{ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท} = \frac{\text{ยูนิตต่อมล. x (ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด + ปริมาตรน้ำที่เหลือหลังปรับความชื้น)}}{\text{น้ำหนักสับสเตรท (กรัม)}}$$

1 ยูนิตของเอนไซม์ไซลาเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเตรท และให้ไซโลส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ

2. วิธีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (Mandels and Weber. 1969)

2.1. สารเคมี : ไดไนโตรซาลิกไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 1.0 %

เตรียมโดยชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างทีละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Rochelle salt) ลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

<u>หมายเหตุ</u> อาจจะเติมโซเดียมซัลไฟต์อีกร้อยละ 0.05 ก่อนนำสารละลายดีเอ็นเอสไปใช้

2.2. สารละลายสับสเตรท

ละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสโซเดียมร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 กวนอย่างต่อเนื่องอย่างช้า ๆ จนละลายหมด เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3. วิธีการ

2.3.1. ปิเปตต์สารละลายสับสเตรท 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2.3.2. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่าง (ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกแล้ว) ที่ต้องการวิเคราะห์ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.3.3. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.3.4. เติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.3.5. นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

2.3.6. ทำให้เย็นโดยใช้น้ำประปา

2.3.7. เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.3.8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

2.3.9. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคส ในสารละลายตัวอย่าง

2.3.10. ทำกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยใช้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร แทนเอนไซม์ไซลาเนส และวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1 ถึง 7 จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของไซโลส

2.3.11. การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ไมโครโมลของไซโลส x ความเจือจาง}}{\text{ระยะเวลาบ่ม x ปริมาตรเอนไซม์}}$$

$$\text{ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท} = \frac{\text{ยูนิตต่อมล. x (ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด + ปริมาตรน้ำที่เหลือหลังปรับความชื้น)}}{\text{น้ำหนักสับสเตรท (กรัม)}}$$

1 ยูนิตของเอนไซม์ไซลาเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเตรท และให้กลูโคส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry *et al.* 1951)

3.1. สารเคมี

3.1.1. สารละลาย ก

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร

3.1.2. สารละลาย ข

ละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาเทรต 2.7 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร

3.1.3. สารละลาย ค

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตระไฮเดรต 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร

3.1.4. สารละลาย ง

นำสารละลาย ก ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ข ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และสารละลาย ค ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (สารละลายนี้เตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

3.1.5. Folin-Ciocalteu reagent 1 นอร์มัล

นำ Folin-Ciocalteu reagent (2 นอร์มัล) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (สารนี้ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

3.1.6. สารละลายมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน

ละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาทำให้เจือจางโดยให้มีความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ระหว่าง 0 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2. วิธีการ

3.2.1. นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.2.2. เติมสารละลาย ง ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่าง ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

3.2.3. เติม Folin-Ciocalteu reagent 1 นอร์มัล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดสีอย่างสมบูรณ์ นำไปวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาปริมาณโปตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.2.4. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน ความเข้มข้น 0 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 3.2.1 ถึง 3.2.3 และเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโบวีนซีรัมอัลบูมิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. วิธีวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (A.O.A.C.. 1990)

4.1. อุปกรณ์

4.1.1. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น

4.1.2. ตู้อบลมร้อน

4.1.3. โถดูดความชื้น

4.1.4. เครื่องชั่งน้ำหนัก

4.2. วิธีการ

4.2.1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 3 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น รอให้เย็นและชั่งน้ำหนักภาชนะ ทำซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักไม่เกิน 1 ถึง 3 มิลลิกรัม

4.2.2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 ถึง 5 กรัม ใส่ลงในภาชนะสำหรับหาความชื้น ซึ่งทราบน้ำหนักที่แน่นอน

4.2.3. อบตัวอย่างในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 6 ชั่วโมง

4.2.4. นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น รอให้เย็นและชั่งน้ำหนัก

4.2.5. อบซ้ำอีก ครั้งละประมาณ 30 นาที จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งได้ติดต่อกันไม่เกิน 1 ถึง 3 มิลลิกรัม

4.2.6. คำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

5. วิธีการตรวจนับปริมาณสปอร์ของเชื้อราโดยฮีมาไซโตมิเตอร์ และการคำนวณหาปริมาณสปอร์

5.1. เตรียมตัวอย่างที่จะตรวจนับ ถ้าเป็นของเหลวสามารถนำมาตรวจนับได้ทันที แต่ถ้าเป็นของแข็งให้ละลายในน้ำกลั่นในปริมาตรตามต้องการ เช่น ตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร (เจือจาง 1:10) หรือเจือจางมากขึ้นในกรณีที่มีสปอร์จำนวนมาก

5.2. ปิเปตต์ตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในฮีมาไซโตมิเตอร์ 1 ถึง 2 หยด ที่ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์อยู่ หยดตัวอย่างทางด้านข้างของกระจกปิดสไลด์

5.3. ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 40 เท่า

5.4. นับจำนวนโคโลนีในแต่ละช่องเล็ก หรือถ้านับช่องใหญ่ให้นำมาหาค่าเฉลี่ยและนำมาคูณด้วย 4×10^{6} จะได้ปริมาณสปอร์ต่อกรัม หรือต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการคำนวณ

พื้นที่ 1 ช่องเล็กในตารางใหญ่ มีค่าเท่ากับ 0.05x0.05 = 0.0025 ตารางมิลลิเมตร

ความลึกระหว่างกระจกปิดสไลด์และตาราง (ผู้ผลิตกำหนด)= 0.1 มิลลิเมตร

$\therefore$ **ปริมาตร 1 ช่องเล็ก จะมีค่า** = 0.0025x0.1 = 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ปริมาตร 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีเซลล์จุลินทรีย์ = z เซลล์ (สปอร์)

ปริมาตร 1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีเซลล์จุลินทรีย์ $= \frac{zx1000}{0.00025}$

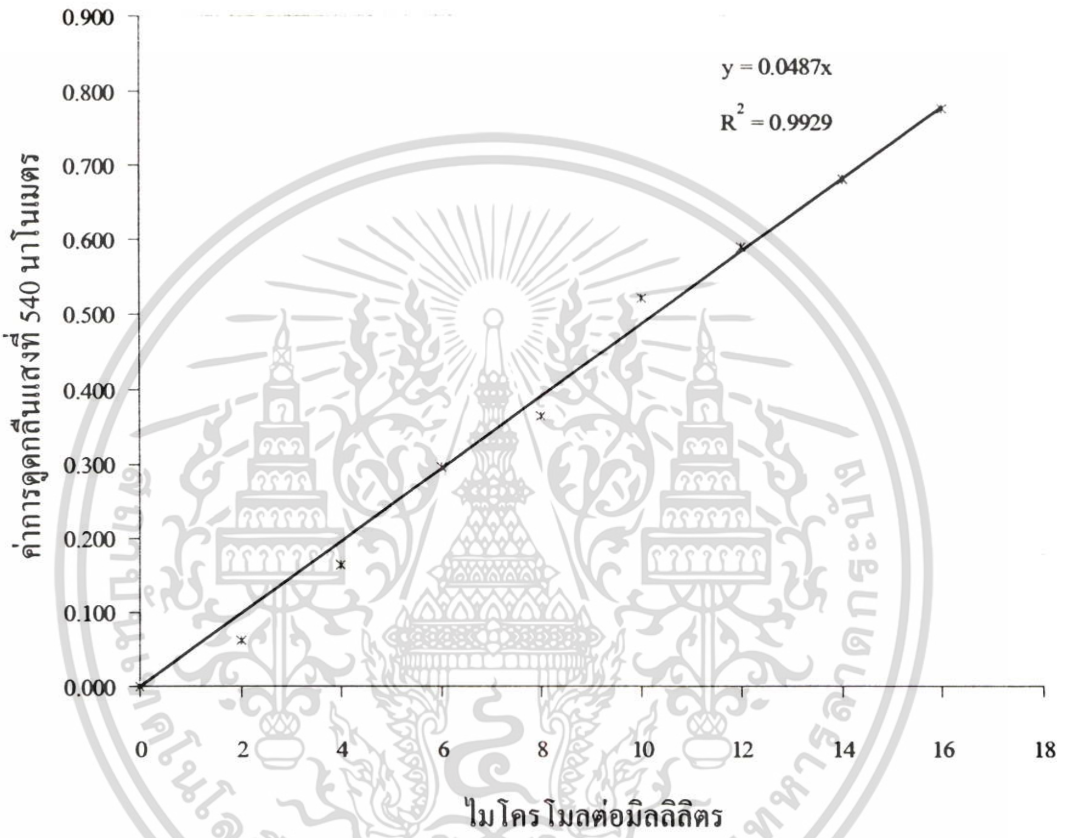
$= zx4x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

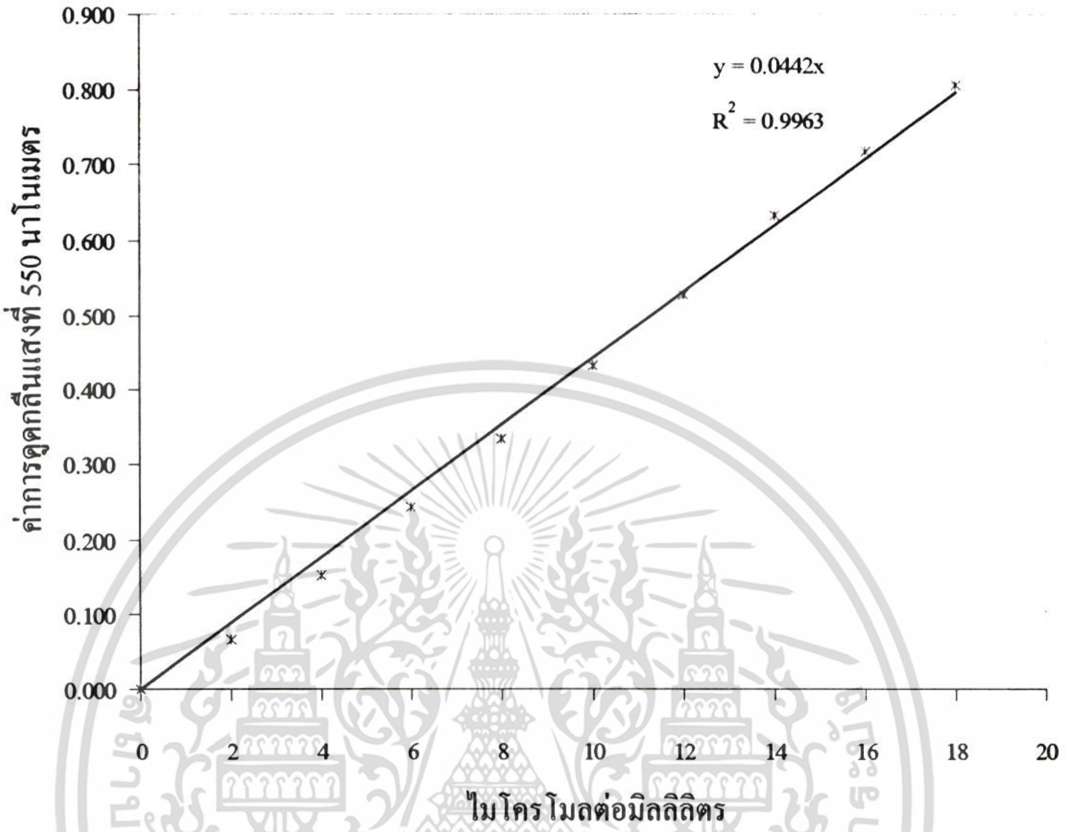
1. กราฟมาตรฐานไซโลส



รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานไซโลส เมื่อใช้ความเข้มข้นของไซโลส 0 ถึง 16 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

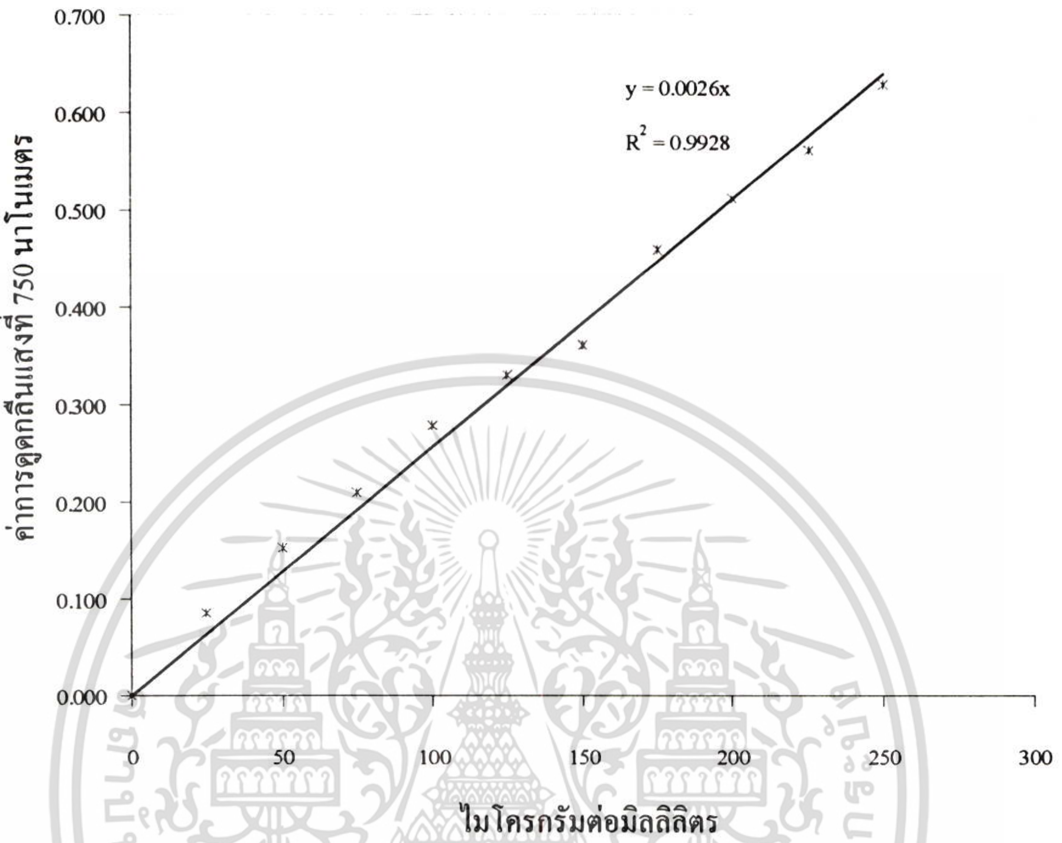
2. กราฟมาตรฐานกลูโคส



รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานกลูโคส เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 0 ถึง 18 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

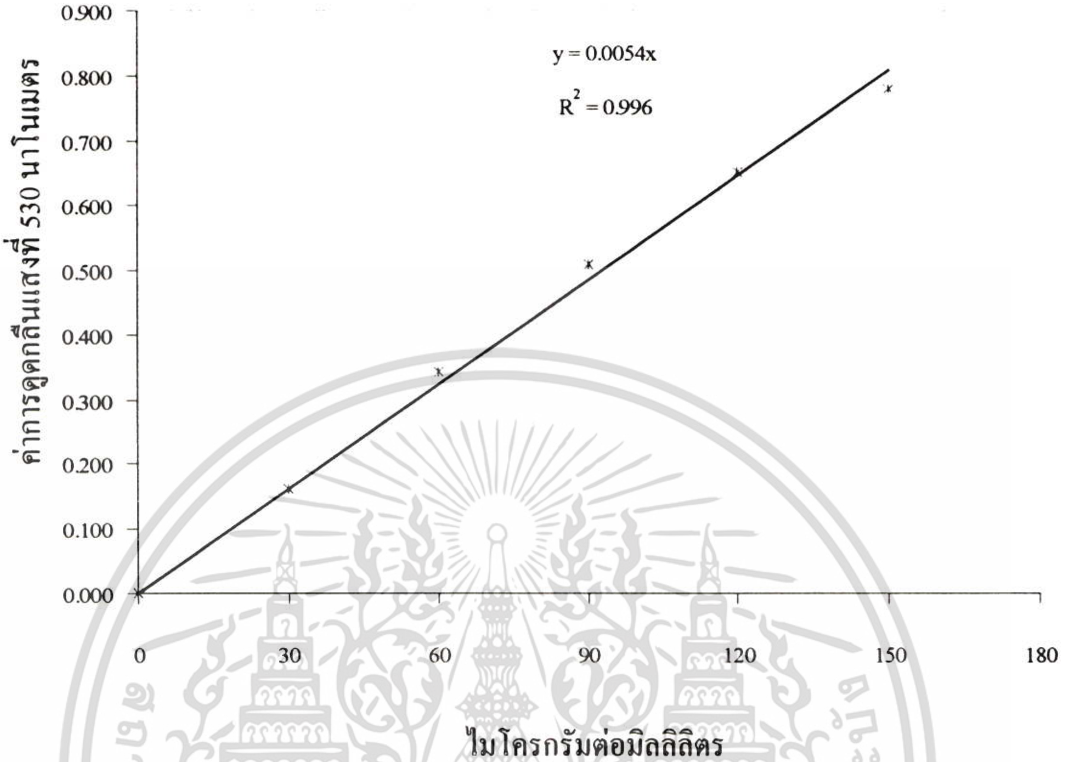
3. กราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน



รูปที่ ค-3 กราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมินเมื่อใช้ความเข้มข้นของโบวีนซีรัมอัลบูมิน 0 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. กราฟมาตรฐานกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์



รูปที่ ค-4 กราฟมาตรฐานกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ 0 ถึง 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์

1. ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละความอิ่มตัว) ที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละความอิ่มตัว ที่ 0 องศาเซลเซียส)	ความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละความอิ่มตัว ที่ 0 องศาเซลเซียส)											
	20	30	40	50	60	70	75	80	85	90	95	100
	กรัมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในสารละลาย 100 มิลลิลิตร											
0	10.7	16.6	22.9	29.5	36.6	44.2	48.3	52.3	56.7	61.1	65.9	**70.7**
10	5.4	11.1	17.1	23.6	30.5	37.6	41.8	45.8	50.0	54.4	58.9	**63.6**
20	0	5.6	11.5	17.7	24.4	31.6	35.4	39.2	43.3	47.5	51.9	**56.5**
30		0	5.7	11.9	18.4	25.3	28.9	32.8	36.7	40.8	45.1	**49.5**
40			0	5.9	12.2	19.0	22.5	26.2	30.0	34.0	38.1	**42.4**
50				0	6.1	12.7	16.1	19.7	23.3	27.2	31.2	**35.3**
60					0	6.3	9.6	13.1	16.6	20.4	24.2	**28.3**
70						0	3.2	6.6	10.0	13.6	17.3	**21.2**
75							0	3.2	6.7	10.2	13.9	**17.6**
80								0	3.3	6.8	10.4	**14.1**
85									0	3.4	6.9	**10.6**
90										0	3.4	**7.1**
95											0	**3.5**
100												**0**

2. การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

A : 0.05 M โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (7.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.05 M ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตระไฮเดรต (13.4125 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม X มิลลิลิตร ของ A กับ Y มิลลิลิตร ของ B ตามที่แสดงในตารางภาคผนวกที่ ง-1 และปรับปริมาตรเป็น 200.0 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ง-2 สัดส่วนของสาร A และสาร B เพื่อปรับบัฟเฟอร์ให้มีพีเอชตามต้องการ

X (มิลลิลิตร)	Y (มิลลิลิตร)	พีเอช
93.5	6.5	5.7
92.0	8.0	5.8
90.0	10.0	5.9
87.7	12.3	6.0
85.0	15.0	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	43.5	6.7
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5
13.0	87.0	7.6
10.5	90.5	7.7
8.5	91.5	7.8
7.0	93.0	7.9
5.3	94.7	8.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ข้อมูล

ตารางภาคผนวกที่ จ-1 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากการศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ตัวอย่าง	วัน	ร้อยละ 60	ร้อยละ 70	ร้อยละ 80
G 2-3	0	0.00	0.00	0.00
	1	37.78	41.92	56.98
	2	82.81	83.85	85.73
	3	80.68	50.39	68.58
	4	75.80	46.97	66.02
	5	48.25	45.52	61.81
G 2-7	0	0.00	0.00	0.00
	1	42.43	41.75	72.07
	2	56.59	81.62	105.24
	3	50.85	53.90	98.05
	4	45.50	44.49	93.94
	5	40.54	40.38	82.85
G 4-1	0	0.00	0.00	0.00
	1	40.38	50.56	43.53
	2	55.18	56.64	59.75
	3	53.37	50.91	45.07
	4	49.51	47.91	42.51
	5	46.44	16.94	35.63
I 4-3	0	0.00	0.00	0.00
	1	44.71	44.15	31.52
	2	49.27	86.16	32.44
	3	44.87	56.30	31.72
	4	44.00	48.34	31.21
	5	38.81	44.06	21.77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	วัน	ร้อยละ 60	ร้อยละ 70	ร้อยละ 80
L 2-2	0	0.00	0.00	0.00
	1	49.04	59.12	24.85
	2	55.26	84.10	26.80
	3	48.72	58.52	23.20
	4	46.05	54.41	22.48
	5	41.56	47.91	21.87
L 2-3	0	0.00	0.00	0.00
	1	81.55	59.72	75.36
	2	107.84	69.82	78.34
	3	87.61	59.89	63.66
	4	86.90	36.88	39.22
	5	83.59	18.39	34.39
L 3-2	0	0.00	0.00	0.00
	1	45.10	59.80	34.09
	2	53.60	63.31	56.16
	3	50.38	59.29	34.70
	4	46.76	57.41	31.42
	5	43.37	24.47	30.80
Q 2-6	0	0.00	0.00	0.00
	1	90.44	67.25	63.35
	2	94.14	75.29	72.07
	3	89.97	60.32	61.19
	4	86.51	55.61	56.47
Q 2-8	0	0.00	0.00	0.00
	1	50.85	66.99	26.18
	2	64.54	81.19	43.02
	3	59.19	61.69	34.80
	4	53.68	54.07	27.72
	5	50.69	51.59	26.59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	วัน	ร้อยละ 60	ร้อยละ 70	ร้อยละ 80
R 3-1	0	0.00	0.00	0.00
	1	83.51	71.95	67.56
	2	131.06	82.14	76.28
	3	93.35	77.17	62.53
	4	90.44	63.06	60.06
	5	87.06	61.86	43.33
S 2-4	0	0.00	0.00	0.00
	1	90.68	59.12	28.75
	2	124.52	85.81	67.04
	3	96.97	64.77	29.16
	4	86.51	58.61	23.82
	5	82.18	55.70	22.38
Aspergillus foetidus	0	0.00	0.00	0.00
TISTR 3159	1	184.19	61.77	101.44
	2	207.02	257.96	212.01
	3	561.23	1,015.14	664.78
	4	201.11	215.18	474.33
	5	174.35	84.96	428.64
Aspergillus foetidus	0	0.00	0.00	0.00
TISTR 3173	1	68.32	43.38	57.49
	2	81.23	65.20	66.74
	3	95.01	100.53	97.84
	4	85.80	45.43	79.16
	5	67.14	38.93	77.41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	วัน	ร้อยละ 60	ร้อยละ 70	ร้อยละ 80
Fusarium moniliforme	0	0.00	0.00	0.00
TISTR 3175	1	78.16	92.57	42.61
	2	153.96	110.54	59.55
	3	180.88	149.04	110.57
	4	205.99	229.98	120.84
	5	174.66	165.64	118.28

ตารางภาคผนวกที่ จ-2 อัตราส่วนระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสกับน้ำหนักเซลล์แห้ง

อัตราส่วนระหว่างกิจกรรมกับน้ำหนักเซลล์แห้ง	วัน	ความชื้นเริ่มต้น ร้อยละ 60	ความชื้นเริ่มต้น ร้อยละ 70	ความชื้นเริ่มต้น ร้อยละ 80
G 2-3	2	1,140.58	1,005.36	1,018.16
G 2-7	2	1,034.64	1,409.71	1,705.61
G 4-1	2	1,692.58	1,437.55	1,446.82
I 4-3	2	1,649.42	1,555.18	1,231.23
L 2-2	2	2,133.46	2,739.52	2,214.60
L 2-3	2	3,757.39	3,543.92	3,840.04
L 3-2	2	1,701.70	1,455.47	1,350.00
Q 2-6	2	1,561.21	1,282.64	1,410.45
Q 2-8	2	914.23	1,057.22	700.63
R 3-1	2	2,605.52	1,659.30	1,790.69
S 2-4	2	2,247.73	2,523.96	2,725.33
3159	2	11,790.45	19,749.88	14,204.79
3173	2	2,043.16	2,111.99	2,346.38
3175	4	5,493.13	5,385.94	3,366.07

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-3 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

แหล่งไนโตรเจน	วัน	*Aspergillus foetidus* TISTR 3159		*Fusarium moniliforme* TISTR 3175	
		ไซลาเนส	เซลลูเลส	ไซลาเนส	เซลลูเลส
แอมโมเนียมซัลเฟต	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	77.86	7.61	186.60	14.18
	2	661.36	4.99	188.23	13.84
	3	869.27	7.04	196.10	13.18
	4	858.15	6.66	221.17	8.03
	5	715.26	8.85	207.05	15.38
แอมโมเนียม-ไนเตรต	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	88.55	7.32	93.00	12.61
	2	830.34	5.44	99.76	7.71
	3	847.88	8.18	119.10	7.64
	4	751.20	8.26	185.23	6.70
	5	700.72	8.98	151.18	8.25
ยูเรีย	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	91.55	6.89	89.32	7.21
	2	889.80	5.58	93.60	7.28
	3	1,034.39	7.65	135.69	6.77
	4	1,029.26	5.96	161.53	8.75
	5	938.57	7.55	123.20	3.70
ยีสต์สกัด	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	110.20	8.73	103.10	7.95
	2	750.34	7.81	103.61	8.30
	3	1,145.62	7.78	103.87	7.70
	4	870.98	8.01	252.82	4.15
	5	656.23	8.40	188.14	8.70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-3 (ต่อ)

แหล่งไนโตรเจน	วัน	*Aspergillus foetidus* TISTR 3159		*Fusarium moniliforme* TISTR 3175	
		ไซลาเนส	เซลลูเลส	ไซลาเนส	เซลลูเลส
โปรติโอส-เปปโตน	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	83.68	7.11	97.54	7.65
	2	947.13	7.32	110.28	6.32
	3	978.78	8.50	133.56	7.78
	4	906.06	8.21	206.96	8.32
	5	863.28	8.91	186.69	9.79
ทริปโตน	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	114.99	8.98	103.70	7.81
	2	825.63	7.97	104.64	7.37
	3	1,312.03	9.35	120.81	8.94
	4	951.40	8.08	141.77	8.90
	5	856.43	8.52	120.89	8.53

ตารางภาคผนวกที่ จ-4 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

พีเอช	วัน	*Aspergillus foetidus* TISTR 3159		*Fusarium moniliforme* TISTR 3175	
		ไซลาเนส	เซลลูเลส	ไซลาเนส	เซลลูเลส
พีเอช 3.0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	138.95	8.87	24.81	7.65
	2	906.06	9.30	80.42	10.40
	3	1,214.07	11.99	125.34	10.46
	4	932.58	11.78	172.48	10.88
	5	826.49	10.39	144.59	10.48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-4 (ต่อ)

พีเอช	วัน	*Aspergillus foetidus* TISTR 3159		*Fusarium moniliforme* TISTR 3175	
		ไซลาเนส	เซลลูเลส	ไซลาเนส	เซลลูเลส
พีเอช 4.0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	107.29	7.72	115.50	15.15
	2	965.09	8.45	140.74	15.91
	3	1,362.08	10.82	195.07	15.80
	4	1,174.28	8.69	272.07	19.09
	5	931.72	11.36	183.95	15.80
พีเอช 5.0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	255.30	15.51	103.52	16.55
	2	1,443.36	9.73	170.69	15.74
	3	1,805.70	12.23	246.83	16.02
	4	1,747.09	11.97	294.32	18.13
	5	1,046.37	10.66	272.93	15.90
พีเอช 6.0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	217.06	13.90	121.92	10.04
	2	1,450.21	8.88	129.19	11.79
	3	1,815.54	12.35	169.15	10.77
	4	1,805.70	12.12	320.84	13.46
	5	1,375.77	13.80	288.33	9.96
พีเอช 7.0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	1,075.72	16.84	87.27	14.43
	2	1,772.76	9.68	116.36	15.06
	3	1,964.41	13.13	147.16	14.56
	4	1,751.80	13.15	236.14	15.81
	5	1,149.04	11.60	183.09	14.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-4 (ต่อ)

พีเอช	วัน	*Aspergillus foetidus* TISTR 3159		*Fusarium moniliforme* TISTR 3175	
		ไซลาเนส	เซลลูเลส	ไซลาเนส	เซลลูเลส
พีเอช 8.0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	110.63	8.57	82.99	14.55
	2	1,464.75	8.72	160.42	14.96
	3	1,649.13	10.17	178.39	15.00
	4	1,476.73	10.22	232.20	14.91
	5	1,364.65	10.63	88.98	14.50

ตารางภาคผนวกที่ จ-5 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเปรียบเทียบสับสเตรทที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

สับสเตรท	วัน	*Aspergillus foetidus* TISTR 3159		*Fusarium moniliforme* TISTR 3175	
		ไซลาเนส	เซลลูเลส	ไซลาเนส	เซลลูเลส
ธูปฤาษี	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	94.11	7.15	89.15	7.10
	2	546.71	10.88	99.67	7.45
	3	846.17	7.66	107.12	6.94
	4	831.62	7.98	117.56	7.98
	5	712.70	8.65	99.85	7.33
รำหยาบ	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	94.03	7.25	33.20	2.44
	2	114.65	4.37	36.19	2.16
	3	383.30	9.11	69.82	5.15
	4	242.98	4.60	208.25	5.63
	5	192.51	10.22	106.86	5.70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-5 (ต่อ)

สับสเตรท	วัน	*Aspergillus foetidus* TISTR 3159		*Fusarium moniliforme* TISTR 3175	
		ไซลาเนส	เซลลูเลส	ไซลาเนส	เซลลูเลส
รำละเอียด	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	345.05	23.40	133.47	15.59
	2	1,130.22	17.46	172.83	14.26
	3	2,000.34	18.76	267.54	15.99
	4	1,026.69	11.24	343.09	19.97
	5	910.76	12.05	299.40	29.29
แกลบ	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	26.78	1.27	2.40	0.85
	2	72.98	1.48	10.52	1.15
	3	111.23	2.43	58.35	1.66
	4	90.69	1.80	221.25	1.11
	5	89.58	1.77	152.81	0.99
ชานอ้อย	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	155.54	6.03	61.43	4.61
	2	546.71	7.22	65.11	4.26
	3	1,469.03	6.54	81.62	4.92
	4	1,359.51	6.20	173.25	3.69
	5	1,214.07	7.33	138.43	3.28
เปลือกฝักถั่ว-เหลือง	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	34.22	11.96	106.35	7.71
	2	153.92	10.43	124.66	6.69
	3	208.76	12.00	133.13	10.62
	4	189.94	13.54	150.58	10.53
	5	121.49	13.38	142.03	10.53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-6 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเปรียบเทียบการ pre-treatment ธูปฤาษีที่ใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

pre-treatment	วัน	*Aspergillus foetidus* TISTR 3159		*Fusarium moniliforme* TISTR 3175	
		ไซลาเนส	เซลลูเลส	ไซลาเนส	เซลลูเลส
untreatment	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	94.11	7.15	89.15	7.10
	2	546.71	10.88	99.67	7.45
	3	846.17	7.66	107.12	6.94
	4	831.62	7.98	117.56	7.98
	5	712.70	8.65	99.85	7.33
pre-treatment	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	168.04	1.67	6.76	0.65
	2	710.13	9.74	26.95	2.08
	3	1,204.06	10.56	385.35	7.33
	4	740.08	13.96	470.57	5.78
	5	621.15	14.69	225.36	7.23

ตารางภาคผนวกที่ จ-7 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเปรียบเทียบสภาวะที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

สภาวะการผลิต	วัน	*Aspergillus foetidus* TISTR 3159		*Fusarium moniliforme* TISTR 3175	
		ไซลาเนส	เซลลูเลส	ไซลาเนส	เซลลูเลส
อาหารแข็ง	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	94.11	7.15	89.15	7.10
	2	546.71	10.88	99.67	7.45
	3	846.17	7.66	107.12	6.94
	4	831.62	7.98	117.56	7.98
	5	712.70	8.65	99.85	7.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ-7 (ต่อ)

สภาวะการผลิต	วัน	*Aspergillus foetidus* TISTR 3159		*Fusarium moniliforme* TISTR 3175	
		ไซลาเนส	เซลลูเลส	ไซลาเนส	เซลลูเลส
อาหารเหลว	0	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	3.37	0.24	4.21	0.30
	2	26.42	0.34	4.85	0.31
	3	41.27	0.28	9.71	0.22
	4	39.01	0.39	16.49	0.46
	5	32.99	0.45	7.07	0.21

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวปรางประไพ รอดบำเรอ เกิดวันที่ 13 พฤศจิกายน 2522 ที่จังหวัดราชบุรี สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต ปีการศึกษา 2543 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร-ลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร ตั้งแต่ปีการศึกษา 2544 จนถึงปีการศึกษา 2546

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้