

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสจากเชื้อ *Sporotrichum pulverulentum* ที่เจริญบนฟางข้าว

โดยการหมักในสภาวะของเหลว



โดย	นางตารันทา	อุโฆษอารามิก	36054324
	นางสาวไพลิน	ตั้งไพโรจน์	36054233
	นางสาวรัชณี	หัตถกิจคำเจริญ	36054338

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

ม/ท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ร 426 ก

ปีการศึกษา 2539

เลขหมู่..... 2639

เลขทะเบียน..... 28156

วัน, เดือน, ปี..... 17 ก.ค. 2540

เอกสารนี้จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of Xylanase from *Sporotrichum pulverulentum* During Growth on
Rice Huck in Liquid State Fermentation



Name	Miss Nunta	Ukosaramig	36054324
	Miss Pailin	Tangpairoj	36054333
	Miss Rudchane	Huttakitjumboen	36054338

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut' Institute of Technology Ladkrabang

Academic year 1996

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การผลิตเอนไซม์โซลาเนสจากเชื้อ *Sporotrichum pulverulentum* ที่
เจริญบนฟางข้าวโดยการหมักในสภาวะของเหลว
โดย นางสาวนันทา อุโฆษอารามิก
นางสาวไพลิน ตั้งไพโรจน์
นางสาวรัชณี หัตถกิจจำเริญ
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อารี ฤทธิบูรณ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
ลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์บัณฑิต

.....
(ผศ. ดร. พรรณี รุติภักขิต)

หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงการพิเศษ

.....
(อาจารย์วีณา ชูโชติ)

ประธานกรรมการ

.....
(อาจารย์อารี ฤทธิบูรณ์)

กรรมการ

.....
(อาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล)

กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ <i>Sporotrichum pulverulentum</i> ที่เจริญบนฟางข้าวโดยการหมักในสภาวะของเหลว
โดย	นางสาวนันทา อุโฆษอารามิก นางสาวไพลิน ตั้งไพโรจน์ นางสาวรัชณี หัตถกิจจำเริญ
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อารี ฤทธิบุญรณ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2539

บทคัดย่อ

ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Sporotrichum pulverulentum* โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ ฟางข้าวที่เป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรชนิดหนึ่ง จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราชนิดนี้ พบว่าความเข้มข้นของฟางข้าวที่เหมาะสมที่สุดคือ 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 1.363 ยูนิต/มิลลิลิตร และให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 5.9 ยูนิต/มิลลิกรัม เชื้อจะให้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 5.847 ยูนิต/มิลลิลิตร และให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 9.198 ยูนิต/มิลลิกรัม เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ และที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดโดยจะทำให้เชื้อให้กิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 9.351 ยูนิต/มิลลิลิตร และให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 9.494 ยูนิต/มิลลิกรัม

Special Project Title Production of Xylanase from *Sporotrichum pulverulentum*
 During Growth on Rice Huck in Liquid State Fermentation

Name Miss Nunta Ukosaramig
 Miss Pallin Tangpairoj
 Miss Rudchanee Huttakitjumroen

Special Project Adviser Mrs. Aree Rittiboon

Department Applied Biology

Academic Year 1996

Abstract

The optimization of product of the enzyme xylanase by *Sporotrichum pulverulentum* in liquid state fermentation with rice hucks as the carbon source was undertaken. The variables : 1) carbon concentration : 0, 1, 2 and 3 % 2) nitrogen source : NH_4NO_3 (0.3, 0.4, 0.5, and 0.6 %) and urea (0, 1, 2 and 3%) were compared with the control : polypeptone 0.025% plus yeast extract 0.1% 3) initial pH : 4, 5, 6 and 7.

The optimization for xylanase production was found to be 1% rice huck, 0.3% NH_4NO_3 at pH 5 : the peak activity and specific activity achieved was 9.531 U/ml, 9.494 U/mg, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์อารี ฤทธิบุรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษาระหว่างการค้นคว้าวิจัย และการเขียนโครงการพิเศษฉบับนี้ รวมถึงการตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์วินา ชูโชติ และอาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล ที่เป็นคณะกรรมการในโครงการพิเศษ และช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาคีวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องบดอาหารสัตว์ในการบดฟางข้าวเพื่อใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง และขอขอบคุณเพื่อนๆ และทุกท่านที่มีได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงการพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นนทา อุไรษอารามิก
ไพลิน ตั้งไพโรจน์
รชนี หัตถกิจจำเริญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงการพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงการพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	2
1. ส่วนประกอบเซลล์ของฟางข้าว	2
2. ลิกโนเซลลูโลส	2
3. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเซลลูโลสและ เฮมิเซลลูโลส	6
4. การผลิตเอนไซม์ไฮดรอลิกของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และคุณสมบัติของเอนไซม์	8
5. การแปรสภาพลิกโนเซลลูโลส	8
6. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จาก เชื้อรา	15
7. ลักษณะของเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	22
8. การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไฮดรอลิก	22
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	27
วัสดุ	27
อุปกรณ์	28
วิธีการ	29
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	31
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	49
ก. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์	49

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ข. วิธีการวิเคราะห์
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
1. การเตรียมกราฟมาตรฐานของไฮโดรเจน	50
2. การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน	51



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 คุณสมบัติเกี่ยวกับ pH และอุณหภูมิของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์	10
2 การแปรสภาพวัสดุเศษเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมโดยกรรมวิธีต่างๆ	13
3 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์เบตา-ไซลาเนสของเชื้อ <i>Aureobasidium pullulans</i>	16
4 ผลของกลูโคส และ/หรือ ฟรุคโตสในการชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากไซโลสของเชื้อ <i>Aureobasidium pullulans</i>	16
5 เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	17
6 พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	19
7 กิจกรรมเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสของเชื้อรา	23
8 ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการใช้เอนไซม์จาก <i>Trichoderma</i> sp.	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างไซแลน	3
2	โครงสร้างของสารประกอบอะโรมาติกของลิกนินและโครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน	4
3	ผลการย่อยสลายลิกนินของเชื้อราแต่ละชนิด	6
4	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเศษเหลือพวกเซลลูโลส	14
5	ผลของความเข้มข้นของฟางข้าวต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสของ <i>S. pulverulentum</i> DMMU ที่เลี้ยงในอาหารเหลว เป็นเวลา 3 วัน	33
6	ผลของความเข้มข้นของฟางข้าวต่อกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซแลเนสของ <i>S. pulverulentum</i> DMMU ที่เลี้ยงในอาหารเหลว เป็นเวลา 3 วัน	34
7	ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสของ <i>S. pulverulentum</i> DMMU ที่เลี้ยงในอาหารเหลวในฟางข้าว เป็นเวลา 5 วัน	35
8	ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซแลเนสของ <i>S. pulverulentum</i> DMMU ที่เลี้ยงในอาหารเหลวในฟางข้าว เป็นเวลา 5 วัน	36
9	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสของ <i>S. pulverulentum</i> DMMU ที่เลี้ยงในอาหารเหลวในฟางข้าว เป็นเวลา 5 วัน	37
10	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซแลเนสของ <i>S. pulverulentum</i> DMMU ที่เลี้ยงในอาหารเหลวในฟางข้าว เป็นเวลา 5 วัน	38
รูปผนวกที่		
ข1	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร	53
ข2	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันเอนไซม์ไซลาเนสได้มีบทบาทในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการหมักเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลไม้ อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์และสารเคมีต่างๆ เป็นต้น ซึ่งอุตสาหกรรมเหล่านี้มักใช้สารพวกกลีโคซิลเลสเป็นวัตถุดิบในการผลิต สาร ลิกโนเซลลูโลสส่วนใหญ่ผลว่าเป็นส่วนประกอบของวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร ซึ่งในการทดลองนี้เป็นการใช้ประโยชน์จากฟางข้าว โดยเปลี่ยนสารลิกโนเซลลูโลสที่มีอยู่ในฟางข้าวให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่ามากขึ้น คือ เอนไซม์ไซลาเนส

จากรายงานพบว่า ไซแลน เป็นสารซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ได้ง่ายกว่า เซลลูโลสและลิกนิน (Domsh และ Gomes, 1969 ; Han, 1978) และมีจำนวนเป็น 20-30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร (Karni และคณะ 1993) จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีต และเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสย่อยสลาย ไซแลนให้กลายเป็นน้ำตาลไซโลส และโพลิโกแซคคาไรด์ต่างๆ (Lizuka และ kawaminai, 1965. King และ Fuller, 1968 ; Takahash และ Kutsumi, 1979) ซึ่งจุลินทรีย์สามารถเจริญและผลิตสารที่มีประโยชน์อื่นๆ ได้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการเจริญของเชื้อ *Sporotrichum pulverulentum* DMMU บนฟางข้าวโดยการหมักในสถานะของเหลว
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *S. pulverulentum* ได้แก่ ความเข้มข้นของ ฟางข้าวชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และพีเอชเริ่มต้น

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ส่วนประกอบเซลล์ของฟางข้าว

ฟางข้าวเป็นอาหารหยาบที่มีคุณค่าทางอาหารต่ำสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องมีการย่อยได้ของวัตถุดิบเพียง 45 - 50 เปอร์เซ็นต์

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

2. ลิกโนเซลลูโลส

วัตถุประสงค์หลักของการเกษตรส่วนใหญ่จะเป็นการปลูกพืชฟางข้าวก็เช่นกัน ดังนั้นจึงมีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วนคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

2.1 เซลลูโลส

เป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีมากในผนังเซลล์ของพืช โครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบไม่มีกิ่งก้านสาขา ประกอบด้วยกลูโคสหลายๆ หน่วยมาต่อกันเป็นเส้นยาวด้วยพันธะแบบเบตา-กลูโคซิดิก มีโครงสร้างทางเคมีเป็น $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Goodwin and Mercer . 1972) และโมเลกุลของเซลลูโลสจะเรียงกันอยู่เป็นมัด ๆ (fibril) และเมื่อนำแต่ละมัดมาขยาย พบว่าประกอบด้วยส่วนที่อยู่รวมกันเป็นกระจุก เรียกว่า crystalloid และส่วนที่อยู่รวมกันแบบหลวม ๆ เรียกว่า amorphous region (Goksoyr and Eriksen , 1980) เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์หรือสารละลายต่าง แต่ละลายในกรด เมื่อสลายตัวโดยสมบรูณ์ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าวินิจฉัยสลายตัวไม่สมบรูณ์จะได้เซลโลไบโอสซึ่งเป็นได้แซคคาไรด์และโอลิโกแซคคาไรด์อื่น ๆ

2.2 เฮมิเซลลูโลส

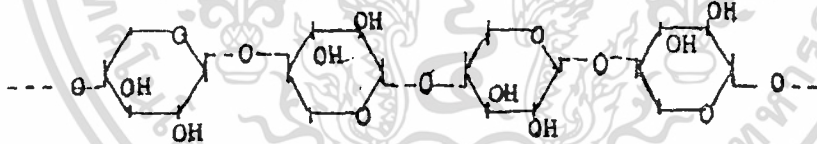
เป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก คือ ดี-ไซโลส ดี-แมนโนส ดี-กาแลคโตส และแอล-อะราบิโนส โดยมีสายโซ่ (side chain) คือ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4-O-methyl-D-glucuronic acid เชื่อมกันด้วยพันธะเบตา-กลูโคซิดิก การแบ่งชนิดของเฮมิเซลลูโลสจึงแบ่งตามชนิดของน้ำตาลได้แก่ ไสแลน แมนแนน กาแลคแทน และอะราบีแนน เป็นต้น

Goodwin และ Mercer (1972) รายงานว่า ไสแลนของพืชต่างชนิดกันมีโครงสร้างหลักเหมือนกัน จะต่างกันเฉพาะชนิด จำนวน และตำแหน่งของสายไซ่ ซึ่งมีสายไซ่ ได้แก่ ดี-ไซโลไพราโนส ฟุราโนส แอล-อะราบีโนส หรือ ดี-กลูโคโรนิก

2.2.1 ลักษณะโครงสร้างของไซแลน

ไซแลนเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ไฮเดรต จัดเป็นสารจำพวกเฮมิเซลลูโลส มีไซแลนเป็นองค์ประกอบประมาณ 7-30 เปอร์เซ็นต์ในผนังเซลล์ของพืช (Whistler and Smart, 1953; Kretoovich, 1966; Goodwin and Mercer, 1972) ทั้งในพืชบกและพืชน้ำ (Whistler and Smart, 1953; Bjorndal, et al., 1965) มักพบอยู่ร่วมกับลิกนิน และเซลลูโลส (Percival, 1962) ลักษณะโครงสร้างหลักของไซแลน คือพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลส (xylopyranose) ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วย 1,4- β -linkage (Hampton, et al., 1929; Haworth, et al., 1931) มีสูตรทางเคมีคือ $(C_5H_8O_4)_n$ (Percival, 1962) ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของไซแลน

ที่มา : Percival (1962)

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

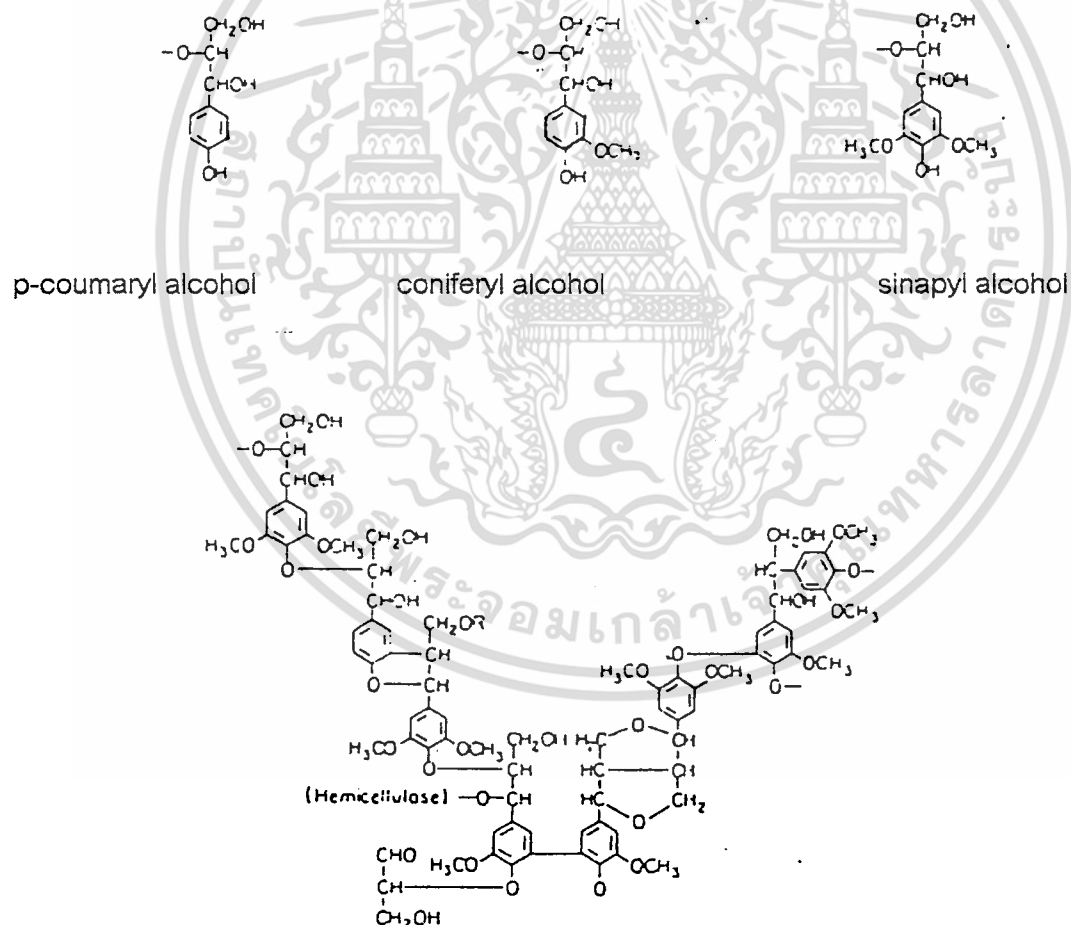
ผนังเซลล์ของพืชล้มลุก โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนที่เป็นวัสดุเค้นเหลือทางการเกษตร อาทิ เช่น ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว แกลบ ฯลฯ มีไซแลนเป็นองค์ประกอบอยู่มากที่สุดคือ ประมาณ 15-30 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 20-25 เปอร์เซ็นต์ และ 7-12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า (Whistler and Smart, 1953)

ไม่วารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ลิกนิน

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

ลิกนินมีลักษณะไม่แน่นอนอน (amorphus polymer) มีโครงสร้าง 3 มิติและไม่ตกผลึก โดยทั่วไปลิกนินไม่ละลายในน้ำ ละลายเล็กน้อยในกรด ละลายได้ดีในสภาพที่เป็นด่างและอาจถูกออกซิไดซ์ได้ในบรรยากาศ (Gottlieb and Pelczar, 1951)



รูปที่ 2 โครงสร้างของสารประกอบอะโรมาติกของลิกนินและโครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน ในรูปพอลิเมอร์ของพืชโดยทั่วไป

ที่มา : Kirk and Alder (1970)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยเหตุที่ลิกนินเป็นโพลีเมอร์ที่ซับซ้อนและเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของพืชที่มีท่อลำเลียงทั้งหมด (Reddy, 1973; Kirk and Alder, 1970) มีหน้าที่ช่วยให้ผนังเซลล์แข็งแรง เซลล์ของพืชเกาะเข้าด้วยกันและยังทนต่อแรงกดที่ทำให้เกิดการโค้งงอ (Crawford, 1976; Janshekar and Fiechter, 1983) ลดการระเหยของน้ำที่อยู่ระหว่างเนื้อเยื่อไซเลมและผนังเซลล์ ป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อของพืชโดยจุลินทรีย์ (Sarkanen and Ludwig, 1971; Crawford, 1976; Janshekar and Fiechter, 1983) เมื่อพืชถูกจุลินทรีย์ทำลายหรือเมื่อพืชมีบาดแผลเกิดขึ้นมาบริเวณนั้นมากเป็นพิเศษ (Hammerschmidt and Kuc', 1982; Janshekar and Fiechter, 1983)

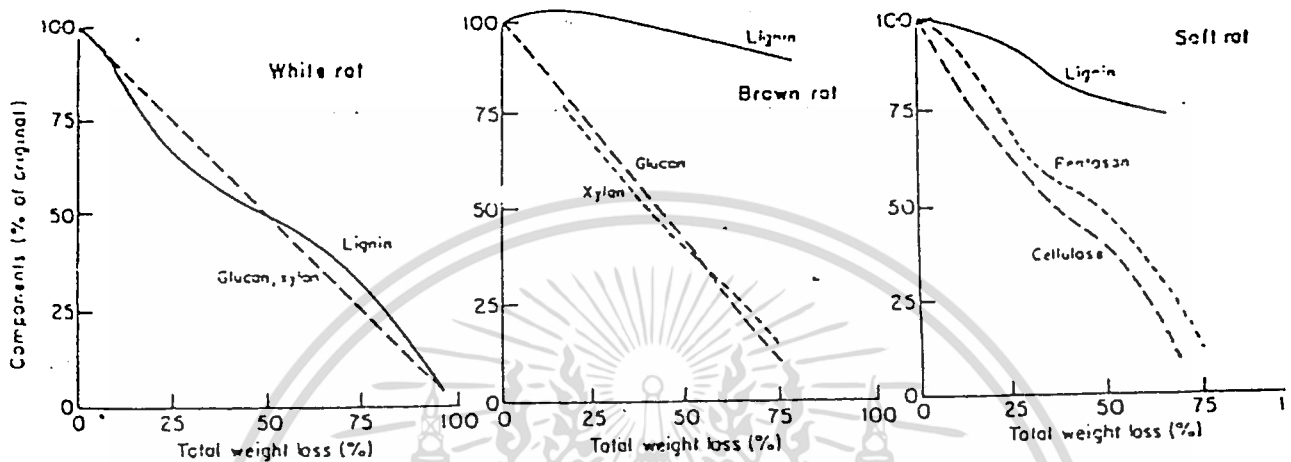
Harkin (1967) รายงานว่า พืชมีลิกนินเป็นองค์ประกอบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส โดยที่ส่วนของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินจะพบมากในส่วนของ middle lamella และมีปริมาณลดลงในส่วนของ secondary cell wall

Janshekar and Fiechter (1983) รายงานว่า มีหลักฐานที่แสดงว่าลิกนินเกิดพันธะโควาเลนต์กับเซลลูโลสจึงเกิดเป็นสารซับซ้อนเรียกว่า ลิกโนเซลลูโลส (Sarkanen and Ludwig, 1971; Adler, 1977; Higuchi, et al., 1977; Abbott and wicklow, 1984) ลิกนินในพืชเกิดพันธะเอสเทอร์จับกับกรดฟีนอลิก (phenolic acid) ในสารประกอบอะโรมาติกแอลกอฮอล์ (Kirk, 1983)

2.3.1 กลไกการย่อยสลายลิกนินด้วยเชื้อรา

กลุ่มของเชื้อรา class Basidiomycetes ที่ย่อยสลายลิกนินมี 3 กลุ่มคือ white rot fungi, soft rot fungi และ brown rot fungi (Cowling, 1961; Kirk and Alder, 1970; Haider and Trojanowaki, 1975; Gilbertson, 1980) โดยที่กลุ่ม white rot fungi (รูปที่ 3) ย่อยสลายลิกนินได้มากกว่าอีกสองกลุ่ม (Cowling, 1961; Savory and Pinion, 1958) กลไกการย่อยสลายลิกนินของแต่ละกลุ่มแตกต่างกันไปแต่โดยหลักใหญ่แล้วมีวิธีการย่อยคล้ายกัน คือ เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินทำงานเหมือนกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่กระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) เอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินประกอบด้วยส่วน iron porphyrin complex หรือที่เรียกว่า ฮีม (heme) เมื่อออกซิเดสด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้วเปลี่ยนเป็นสารออกซิไดซิง (oxidizing agent) สามารถดึงเอาอิเล็กตรอนออกจาก phenolic ring ของลิกนินทำให้พอลิเมอร์ของลิกนินแตกตัวซึ่งผลจะปรากฏชัดเมื่อระดับความเป็นกรดเป็นด่างเหมาะสม (Schoemaker, et al., 1985; Harvey, et al., 1985) และเชื้อรายังมีผลต่อการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ทำให้ปริมาณของเซลลูโลสลดลง เช่นเดียวกับปริมาณลิกนิน (Ander and Eriksson, 1975)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 ผลการย่อยสลายลักษณะของเชื้อราแต่ละชนิด
ที่มา : Kirk and Alder (1970)

3. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส

3.1 เอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีน มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรต:โปรตีน เท่ากับ 1:1 ละลายนํ้าได้ ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์หรือโลหะอื่นในการเข้าทำปฏิกิริยา เป็นเอนไซม์เชิงซ้อน ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ส่วน ซึ่ง Enari (1983) รายงานไว้ดังนี้

3.1.1 endoglucanase (1,4-beta-D-glucan-4-glucanohydrolase; EC 3.2.1.4)

ทำหน้าที่ย่อย beta-1,4- glucosidic linkage แบบสุ่มได้กลูโคส เซลโลไบโอส เซลโลไตรโอส ไม่ย่อยเซลโลไบโอสแต่ย่อยเซลโลเดรกซ์ตริน (CMC) และไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (HEC) และสามารถย่อยเซลลูโลสรูปผลึก (crystalline cellulose) ได้ด้วยความจำเพาะของเอนไซม์ไม่สูงมากนัก วิเคราะห์เอนไซม์นี้ได้โดยใช้ CMC และ HEC เป็นสับสเตรท

3.1.2 cellobiohydrolase (1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase; EC 3.2.1.91)

ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้าน non-reducing end ของเส้นสาย ได้เซลโลไบโอส มีความจำเพาะสูงกว่า endoglucanase ย่อยเซลโลเดรกซ์ตริน แต่ไม่ย่อยเซลโลไบโอส การวิเคราะห์เอนไซม์นี้ใช้

เซลลูโลสที่เป็นอนุกรมที่สามไว้ซึ่งหมักและใช้เป็นตัวกรองเชื้อราเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ล้าลี อวิเชล และ amorphous cellulose เป็นสับสเตรท
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 *beta-glucosidase (beta-D-glucosylhydrolase; EC 3.2.1.21)* ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอส และเซลโล-โอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligosaccharide) ได้กลูโคสแต่ไม่ย่อยเซลลูโลสหรือเซลโลเดรกซ์ทริน วิเคราะห์เอนไซม์นี้โดยใช้เซลโลไบโอสพี-ไนโตรฟีนิล-เบตา-ดี-กลูโคไซด์ (p-nitrophenyl-beta-D-glucoside) หรือซาลิซิน (salicin) เป็นสับสเตรท

Toussaint และ Bataille (1985) รายงานว่าเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์ที่ทำกิจกรรม 3 อย่างคือ cellobiohydrolase (CBH) CX activity ซึ่งมี endo-beta-1,4 glucanase และ exo-beta-1,4 glucan glucosylhydrolase เพื่อที่จะย่อยเซลลูโลสรูปผลึกได้เซลโลไบโอส จากนั้น beta-glucosidase เปลี่ยนเซลโลไบโอสได้กลูโคส

3.2 เอนไซม์เฮมิเซลลูเลส

เป็นเอนไซม์ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสเป็นกิ่งก้านสาขาและประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสที่ส่วนใหญ่เป็นพวก ดี-ไซแลน ฉะนั้นเอนไซม์หลักที่มีผลต่อการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสคือ เอนไซม์ไซแลนส ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Rogalski, et al., 1985) คือ

3.2.1 *endo-1,4-beta-D-xylanase (1,4-beta-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8)* ทำการย่อยสลายพันธะ 1,4 glucosidic ของ beta-D-xylopyranoside ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของไซแลน และให้ผลิตภัณฑ์ออกมาในรูปของไซโล-โอลิโกแซคคาไรด์และไซโลไบโอส วิเคราะห์เอนไซม์นี้ด้วยไซแลน

3.2.2 *exo-1,4-beta-D-xylosidase (1,4-beta-D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.37)* ย่อยสลายเซลโล-โอลิโกแซคคาไรด์และไซโลไบโอส ออกมาได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส การทดสอบเอนไซม์นี้ใช้พี-ไนโตรฟีนิล-เบตา-ดี-กลูโคไซด์ เป็นสับสเตรท

นอกจากเอนไซม์กลุ่มหลัก 2 กลุ่มใหญ่ ๆ แล้ว เพื่อให้การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสสมบูรณ์ยิ่งขึ้นจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์อีกหลายชนิดได้แก่

3.2.3 *D-galactanase* เอนไซม์กลุ่มนี้ย่อย ดี-กาแลคแตน และแอล-อะรามิโน-ดี-กาแลคแตน

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

3.2.5 *acetyl esterase* ในโครงสร้างหลักของเฮมิเซลลูโลสตรงตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 และ 3 ของสายพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลส จะมีกลุ่มของ acetyl เกาะอยู่ ในการย่อย acetyl ออกจากสายพอลิเมอร์ของไซโลสจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ esterase เข้าช่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ และคุณสมบัติของเอนไซม์

4.1 การผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาพบว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) (Gascoigne, 1960; Strobel, 1963; Kusakabe, et al., 1966; Paice, et al., 1978) แต่ก็มีบางชนิดที่เอนไซม์ที่ผลิตเป็นแบบ intracellular enzyme อาทิเช่น *Aspergillus niger* (Iwamoto, et al., 1973) *Aspergillus foetidus* (Whister and Masak, 1955) *Butyrivibrio fibrisolvens* (Clarke, et al., 1969; Gaillard, et al., 1975) และ *Sporocytophagus myxococcoides*

การผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเริ่มผลิตในระยะ stationary growth phase ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas stutzeri* (Toh, 1978) *Streptomyces* sp. (Nakanishi, et al., 1976) *Aspergillus niger* (John, et al., 1979) ยกเว้น *Penicillium variabile* ซึ่ง Matinez, et al. (1974) รายงานว่า การผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสเกิดไปพร้อม ๆ กับการเจริญ

4.2 คุณสมบัติของเอนไซม์ไฮลาเนส

โดยทั่วไปเอนไซม์ไฮลาเนสจากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 50 องศาเซลเซียส แต่สำหรับพีเอชที่เหมาะสม พบว่า เอนไซม์ไฮลาเนสจากแบคทีเรียและแอสคิโนมัยซีดมีพีเอชที่เหมาะสมค่อนข้างเป็นกลาง แต่ของเชื้อราค่อนข้างจะเป็นกรด ส่วนความคงตัวของเอนไซม์และความคงตัวของเอนไซม์จะต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ ดังที่ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 1

5. การแปรสภาพ (pretreatment)

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

วิธีการแปรสภาพต่าง ๆ ได้แก่ การบด เป็นการทำให้อนุภาคของลิกโนเซลลูโลสมีขนาดเล็กลง เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวและลดปริมาณเซลลูโลสรูปผลึก (Jones, et al., 1980) วิธีทางเคมีโดยใช้ต่างหรือตัวทำละลาย (Viikari, et al., 1994) สกัดหรือแยกเฮมิเซลลูโลสออกจากวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส หรือการใช้ไอน้ำ อุณหภูมิ 120-180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถึง 2 ชั่วโมง ซึ่งการแปรสภาพด้วยวิธีการให้ความร้อนนี้จะทำให้ไซแลนและไซโลลซึ่งเป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสละลายในน้ำเพิ่มขึ้นเป็น 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ภายใต้ไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและใช้เวลานานจะทำให้ไซโลลเปลี่ยนเป็น furfural ส่วนไซแลนจะสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบทางเคมี ชีวเคมี หรือกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์ เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากกระบวนการหมัก เช่น การใช้กระบวนการไม่ผ่านการหมักใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้ความร้อนในภาวะที่มีน้ำ (hydrothermolysis) จะได้ของเหลวเรียกว่า ไฮโดรไลเสท (hydrolysate) ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส รวมทั้งส่วนของลิกนินที่ละลายได้ เช่น conifer alcohol, syringa aldehyde, 4-hydroxybenzoic acid, vanillin, furfural เป็นต้น ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมากน้อยแค่ไหนขึ้นกับชนิดของพวกลิกโนเซลลูโลส ส่วนของแข็งที่เหลือจะมีเพียงเซลลูโลสและลิกนินซึ่งสามารถย่อยด้วยเอนไซม์ ดังรูปที่ 4



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 คุณสมบัติเกี่ยวกับ pH และอุณหภูมิของเอนไซม์ xylanase จากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	เอนไซม์	optimal pH	pH-stability	optimal temperature (°C)	temperature of complete thermal-inactivation (°C)
<u>เชื้อรา</u>					
<i>Aspergillus foetidus</i> (Whistler & Nasak, 1955)	medium extract	3.4	-	37	-
	mycelium extract	4.5	-	37	-
	mycelium extract (F-1)	3.8	-	45	-
<i>Aspergillus niger</i> Str. 14 (Gorbacheva and Rodionova, 1977)		4.0	3.0-8.0	50	-
<i>Aspergillus niger</i> (Dekker & Richards, 1976)	I _A	5.5-6.0	-	65-80	> 80
	I _B	4.0-4.5	-	65-80	> 80
	II _A	4.0	-	50	80
	II _B	4.0	-	50	80
	II _C	4.0	-	50	80
	II _D	6.0-6.5	-	50	80

ตารางที่ 1 (ต่อ)

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

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สกุลเชื้อ	แหล่ง	optimal pH	pH- stability	optimal temperature (°C)	temperature of complete thermal- inactivation (°C)
<i>Penicillium janthinellum</i> (Takenishi & Tsujisaka, 1973)	I	5.3	5.0-8.0	-	70
	II	4.7	4.0-9.0	-	80
	III	4.7	5.0-9.0	-	80
<i>Pericularia oryzae</i> (Strobel, 1963)	I	6.4	3.5-6.0	45	-
	II	8.1	6.0-9.5	45	-
<i>Schizophyllum commune</i> (Dekker & Richards, 1975)		4.8-5.4	-	-	6.5
<i>Schizophyllum commune</i> (Paice <u>et al.</u> , 1978)		5.0	-	45-50	-
<i>Trichoderma viride</i> (Paice <u>et al.</u> , 1978)		5.0-6.0	3.0-7.0	-	90
<i>Trichoderma viride</i> (Hashimoto, <u>et al.</u> , 1971)		3.5	2.0-7.0	50	65

ตารางที่ 2 การแปรสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมโดยกรรมวิธีต่างๆ

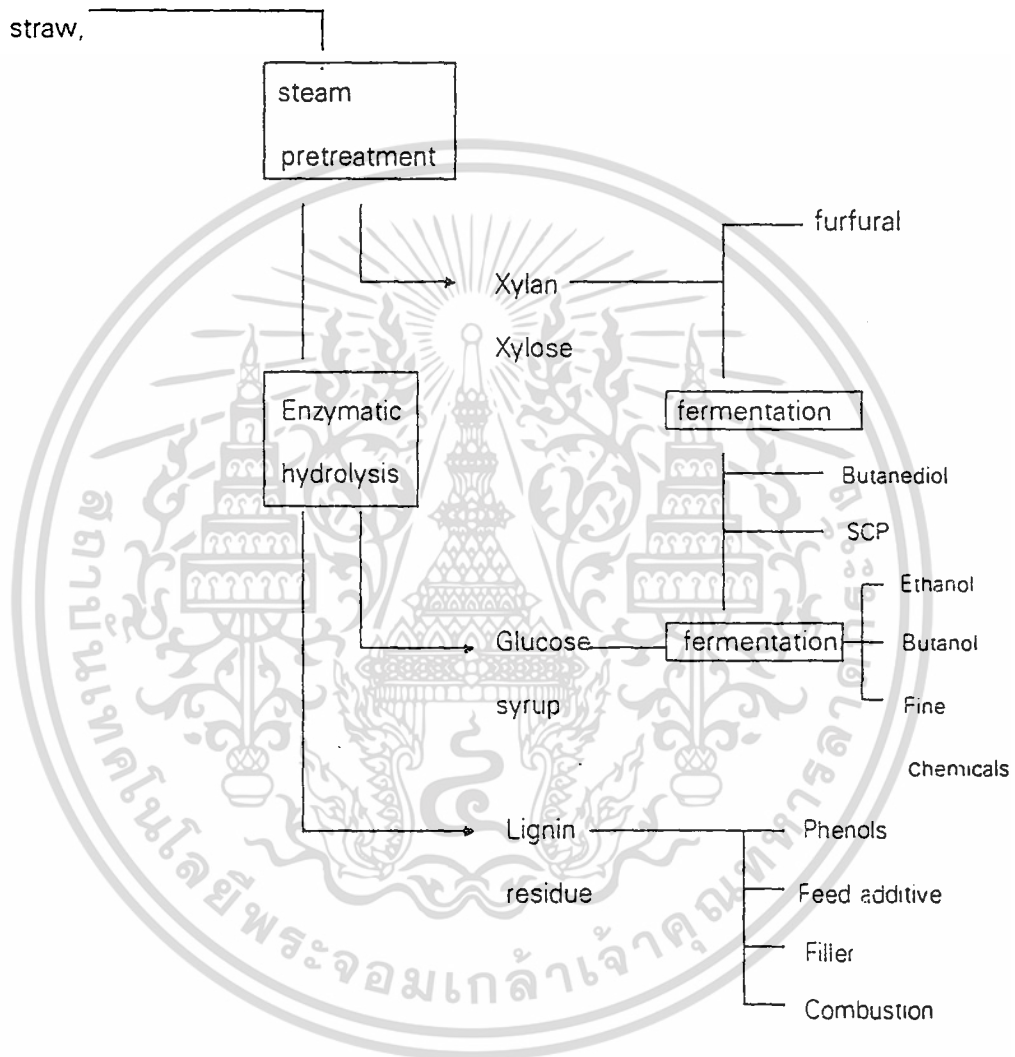
วิธีทางกายภาพ	วิธีทางเคมี	วิธีทางชีวภาพ
การแช่น้ำ	โซเดียมไฮดรอกไซด์	การใช้เอนไซม์
การลั่น, การบด	แคลเซียมไฮดรอกไซด์	การหมักด้วยเชื้อรา
การอัดเม็ด	โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์	(white-rot fungi)
การนึ่ง, การต้ม	แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	
การใช้รังสีแกมมา	ยูเรีย/แอมโมเนีย	
	โซเดียมคาร์บอเนต	
	โซเดียมคลอไรด์	
	แกสคลอรีน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

ที่มา : Ibrahim (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cellulosic waste

(from wood straw,
newspaper)



รูปที่ 4 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเศษเหลือพวกเซลลูโลส

ที่มา : Buchholz , et al. (1980/81)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา

6.1 แหล่งคาร์บอน

มีการผลิตเซลลูโลสโดยใช้เซลลูโลสในธรรมชาติ เช่น ฟางข้าวสาลี (Doppelbauer, et al., 1987) กากชานอ้อย (Kawamori, et al., 1986) เศษกระดาษหนังสือพิมพ์ (Shu Chen and Wayman, 1991) และน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อโรงงานน้ำมันปาล์ม (เบญจวรรณ ชิตมณี, 2534)

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

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

Karni และคณะ (1993) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เบตา-ไซลานเนสจากเชื้อ *Aureobasidium pullulans* ซึ่งเจริญในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของกลูโคส ฟรุ็กโตส หรือไซโลส พบว่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์เบตา-ไซลานเนสผลิตเมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 3) และค่า specific activity สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 4)

Wase และคณะ (1985) เลี้ยง *Aspergillus fumigatus* IMI 255091 แบบอาหารเหลวในฟลาสกโดยใช้ฟางข้าวบดความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ ฟางข้าวบด 4.0 เปอร์เซ็นต์ให้กิจกรรมของ beta-D-glucosidase, endo-1,4-beta-D-glucanase และ D-xylanase สูงสุดในวันที่ 6 หรือ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 5.88, 3.24 และ 67.65 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ

Chahal (1985) เลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesii* QMY 1 ในอาหารเหลวโดยใช้ความเข้มข้นของฟางข้าวสาลีต่างกัน คือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (เซลลูโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์) และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ (เซลลูโลส 2.0 เปอร์เซ็นต์) พบว่า กิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดในฟางข้าวสาลี 1.0 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 1.65 ยูนิต/มิลลิลิตร ได้ผลผลิตของเซลลูเลสเท่ากับ 412 ยูนิต/กรัมเซลลูโลส และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟางข้าวสาลีเป็น 5.0 เปอร์เซ็นต์ เวลาการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 7 วัน เป็น 11 วัน กิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเป็น 6.0 ยูนิต/มิลลิลิตร แต่ผลผลิตของเซลลูเลสลดลงเป็น 300 ยูนิต/กรัมเซลลูโลส ซึ่งการลดลงของผลผลิตอาจจะเนื่องจากการถ่ายเทมวลสารเกิดขึ้นน้อยในสารละลายที่เข้มข้นมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ เบต้า-ไซลาเนส ของเชื้อ *Aureobasidium pullulans*.

แหล่งคาร์บอนเสริม (ความเข้มข้น 1% (w/v))	จำนวนเซลล์ (จำนวนเซลล์ $\times 10^7$ / มิลลิลิตร)	กิจกรรมของเบต้า-ไซลาเนส	
		(ยูนิต/มิลลิลิตร)	(ยูนิต/ 10^7 เซลล์)
ไม่มี	2	Nil	Nil
กลูโคส	26	2.2	0.08
ฟรุกโตส	17	0.6	0.04
แลคโตส	3	0.6	0.2
มอลโตส	3	Nil	Nil
ไซแลน	10	31	3.1
ไซโลส	11	39	3.6

ที่มา : Karni, et al. (1993)

ตารางที่ 4 ผลของกลูโคส และ/หรือ ฟรุกโตส ในการชักนำให้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากไซโลส ของ *Aureobasidium pullulans*.

สัดส่วนที่ใช้ในการเจริญ (ความเข้มข้น 1% (w/v))	จำนวนเซลล์ (จำนวนเซลล์ $\times 10^7$ / มิลลิลิตร)	กิจกรรมของเบต้า-ไซลาเนส	
		(ยูนิต/มิลลิลิตร)	(ยูนิต/ 10^7 เซลล์)
ไซโลส	11	40	3.6
กลูโคส	24	0.3	0.01
ฟรุกโตส	12	0.7	0.06
ไซโลส + กลูโคส	25	8.2	0.3
ไซโลส + ฟรุกโตส	27	13.3	0.9

ที่มา : Karni, et al. (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

Shewale และ Sadana (1978) พบว่า การเติมกลูโคส 0.01-0.02 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยในการเจริญของเชื้อในช่วงต้นแต่ไม่เพิ่มการผลิตเอนไซม์

Chead และ Ooi (1984) พบว่าการใช้กลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อรา cf-27 พบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะถูกยับยั้ง

ขณะเดียวกันก็มีผู้รายงานที่พบเชื้อราหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้เมื่อเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆกัน ดังที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	เอกสารอ้างอิง
<i>Chrysosporium lignorum</i>	cellulose	Eriksson & Rzigowski, 1969
<i>Diplodia viticola</i>	L-arabinose	Strobel, 1963
	D-xylose	
	cellulose	
<i>Stereum sanguinolenum</i>	cellulose	Bucht & Eriksson, 1968
<i>Trichoderma viride</i>	Sophorose	Nisizawa, 1971

6.2 แหล่งไนโตรเจน

Okeke และ Obi (1993) ทำการทดลองผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส และไซแลนโดยเชื้อ *Arthrographis* sp. สายพันธุ์ F4 พบว่า แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Coutts และ Smith (1976), เลี้ยงเชื้อ *Sporotrichum thermophile* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NaNO_3 , NH_4NO_3 และยูเรีย พบว่า NaNO_3 และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และ NaNO_3 ความเข้มข้น 0.05-0.4 เปอร์เซ็นต์ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสไม่แตกต่างกัน

Raimbult และ Alazard (1980) หมัก *A. niger* ในแป้งมันสำปะหลังโดยใช้ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ายูเรียใน 40-50 เปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนทั้งหมดจะกระตุ้นการเจริญของเชื้อรา ซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างโปรตีน การใช้คาร์โบไฮเดรตมีมากขึ้นเมื่ออัตราส่วนของยูเรียเพิ่มขึ้น และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้มีผลต่อพีเอช คือการใช้เกลือ-แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เมื่อเชื้อราเจริญจะเกิดการดออย่างรวดเร็วจะทำให้การเจริญหยุดชะงัก

Stewart และ Parry (1981) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *Aspergillus fumigatus* IMI 246651 คือ NH_4NO_3 ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร และรองลงมาคือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร

Joglekar และ Karanth (1984) เลี้ยง *Aspergillus funiculosus* UV-49 ในอาหารเหลว พบว่ายูเรียและ NaNO_3 (ไนโตรเจน 0.5 กรัมต่อลิตร) ดีกว่า $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NH_4NO_3 และดีกว่าเคซีนและเปลือกถั่วลิสง หากเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนมากกว่า 0.5 กรัมต่อลิตร พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ในไนโตรเจนอินทรีย์ ส่วนการใช้ไนโตรเจนอินทรีย์กิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไปถึง 1-1.2 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามการเพิ่มไนโตรเจนเป็นการเพิ่มต้นทุนและไนโตรเจนมากกว่า 2 กรัมต่อลิตรจะเพิ่มปัญหา คือทำให้ค่าพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูงซึ่งไม่เหมาะในการผลิตเอนไซม์

Gomes และคณะ (1989) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Gliocodium virens* พบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ดีที่สุด คือ bacto-peptone เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ อาจจะเป็นเนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตเซลลูเลสของเชื้อ และถ้าความเข้มข้นมากกว่า 0.4 เปอร์เซ็นต์จะยับยั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์

เบญจวรรณ ชิตมณี (2534) พบว่า การใช้ NH_4NO_3 เข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับโปรตีนโอสเปปโตเนอเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการใช้ NH_4NO_3 เพียงอย่างเดียวในการเลี้ยงเชื้อ *Cladosporium* sp.

6.3 เกลือแร่

Desrochers และคณะ (1981) ทดสอบผลของความเข้มข้นของ KH_2PO_4 0.13 , 0.20 และ 0.27 เปอร์เซ็นต์ ต่อการผลิตเบตา-กลูโคซิเดส ของเชื้อ *Schizophillum commune* พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.20 เปอร์เซ็นต์

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

6.4 พีเอช

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

Mandel และ Weber (1969) และ Neudoerffer และ Smith (1970) รายงานว่าค่าพีเอชที่เป็นด่างและเป็นกลางไม่เป็นที่ต้องการสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา เพราะการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีปริมาณสูงภายใต้สภาวะที่เป็นกรด และพีเอชที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

จุลินทรีย์	พีเอชที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus fumigatus</i> IMI 246651	6.0	Stewart & Parry (1981)
<i>Aspergillus terreus</i>	5.0	D-souza, et al. (1982)
<i>Aspergillus fumigatus</i> IMI 255091	5.0	Wase et al. (1985)
<i>Penicillium funiculosum</i> UV-49	4.5	Joglekar & Karanth (1984)
<i>Trichoderma reesei</i>	5.3	Chahal (1985)
<i>Trichoderma reesei</i> D1-6 และ <i>Aspergillus wentii</i> Pt 2804	4.6	Panda (1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

แม้จะมีการแก้ไขทุกสิ่งทุกอย่างที่มีให้ที่เปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่สามารถนำไปใช้

Lonsane และคณะ (1985) รายงานการควบคุมฟิเอซในอาหารแห้งมักไม่ค่อยทำกัน มักใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นบัพเพอร์ที่ดี และใช้ประโยชน์จากการปรับฟิเอซเริ่มต้นของอาหารแห้งให้อยู่ในช่วง 4.5-5.0 ในขณะที่ปรับปริมาณความชื้นให้ได้ตามต้องการ และ Lonsane และคณะ (1992) กล่าวว่า การควบคุมฟิเอซในช่วงของการหมัก มักใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมากกว่าเกลือแอมโมเนีย

Trigo และ Ball (1994) เลี้ยง *Thermomonospora fusca* BD 25 เจริญบนอาหารเหลวที่มีฟางข้าวเป็นองค์ประกอบ พบว่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ไซลาเนส-เอ็นโดกลูคาเนส และเพอร์ออกซิเดส เกิดขึ้นในช่วงสุดท้ายของการเจริญในระยะ exponential (48-96 ชั่วโมง) ฟิเอซที่เหมาะสมคือ 7-8

6.5 อุณหภูมิ

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

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

Gomes และคณะ (1992) รายงานถึงระดับความเหมาะสมของอุณหภูมิต่อการผลิต FPase, xylanase และ beta-glucosidase สูงสุดที่อุณหภูมิ 32, 34 และ 31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

6.6 การให้อากาศ

การเจริญของจุลินทรีย์และกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนวัตถุดิบหรือสารอาหารใด ๆ ไปเป็นผลิตภัณฑ์อาจเกิดขึ้นได้ในภาวะมีอากาศหรือไร้อากาศ ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการหมักและชนิดของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสเป็นกระบวนการ

หมักที่ต้องการอากาศ วิธีการที่จะทำให้จุลินทรีย์ได้รับอากาศเพียงพอ ทำได้โดยการให้อากาศ ระหว่างการหมัก ซึ่งต้องควบคุมให้พอเหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ จะมากน้อยเพียงใดขึ้นกับ ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ จำนวนรอบของการเขย่าหรือการกวน และปริมาณของสารอาหาร ต่อปริมาณของถังหมัก

6.7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (inoculum size)

Battaglino และคณะ (1991) ศึกษาขนาดของเชื้อเริ่มต้น (10^4 , 10^5 และ 10^6 สปอร์/กรัม ด้บบสเตรท) ต่อการเจริญของเชื้อ *A. oryzae* ในอาหารแข็ง (แกลบ : รำข้าว เท่ากับ 7:3) พบว่า การเพิ่มขนาดของเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^6 สปอร์/กรัมด้บบสเตรท ทำให้ผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Ofuya and Ukpong (1989) ที่รายงานว่า ความเข้มข้นของอะไมเลส เซลลูเลส และอะไมโลกลูโคซิเดสเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 4 เท่า เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นจาก 7×10^4 เป็น 3.5×10^5 เซลล์

Joglekar และคณะ (1984) เลี้ยง *Penicillium funiculosum* ในถังหมัก พบว่าการเจริญจะเกิดขึ้นรวดเร็วในถังหมักและมีผลให้เกิดมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นหนาแน่นภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งความหนืดของน้ำเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นตามเวลาและมีค่าสูงสุดที่ 72-96 ชั่วโมง จากนั้นลดลง การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มเร็วมากในช่วงเวลา 24-72 ชั่วโมง โดยจะให้ค่า exo-endo-beta-D-glucanase และ beta-glucosidase ภายใน 72 ชั่วโมง เป็น 3, 26 และ 9 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ

Gomes และคณะ (1989) เลี้ยง *Gliocodium virens* ในฟลาสก์เพื่อการผลิตเซลลูเลสและไซลา-เนสในฟางข้าวตาลีที่ผ่านการแปรสภาพด้วยไอน้ำ พบว่าเริ่มมีการสังเคราะห์เอนไซม์ภายใน 24 ชั่วโมงของการบ่ม การเปลี่ยนแปลงพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังการบ่ม 1 วัน และลดลงในวันที่ 2 วันที่ 3 ไมซีเลียมจะเกิดการละลายตัวเอง (autolysis) ปลดปล่อยเอนไซม์ลงสู่อาหาร พีเอชเพิ่มขึ้น ระยะเวลาการปรับตัว (lag phase) ของเชื้อลดลง การใช้แอมโมเนียและการลดลงของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (ลิกโนเซลลูโลสกับไมซีเลียม) ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมักและลดลงช้ามากหรือหยุดในช่วงที่มีการเจริญคงที่ และการใช้ลิกโนเซลลูโลสก็ช้าด้วย ซึ่งอาจเนื่องมาจากการมีน้ำตาลอิสระ ทำให้เกิดการยับยั้ง หรือเนื่องมาจากการขาดสารอาหารในการเลี้ยงเป็นผลให้การเจริญของเชื้อช้าและการลดการใช้เซลลูโลส และจากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมได้ค่า FPase beta-glucosidase และ xylanase 0.33, 1.52, 30.45 ยูนิต ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงในถังหมักได้ FPase beta-glucosidase และ xylanase เป็น 0.25, 0.77 และ 24.04 ยูนิต ตามลำดับ

Gomes และคณะ (1989) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ FPase, CMCase และ xylanase เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า สูงสุดใน *T. reesei* MCG 77 แต่กิจกรรมของ beta-glucosidase ของ *A. terreus* และ *A. niger* ไม่สามารถวัดได้ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

niger สูงกว่า *T. reesei* MCG 77 3.2 และ 1.2 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 7) ถึงแม้ว่า *T. viride*, *G. virens* และ *Aspergillus* ทั้งสองสายพันธุ์จะผลิต FPase ได้น้อย แต่สามารถผลิต CMCase, beta-glucosidase และ xylanase ได้มากพอควร เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยไม่มีการควบคุมพีเอช พบว่าค่าของพีเอชในทุกเชื้อ ยกเว้น *T. phaseolina* ลดลงรวดเร็วจนถึงวันที่ 2 หรือ 3 จากนั้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่พีเอชของ *T. phaseolina* เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ตลอดการเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักแห้งทั้งหมดลดลงในระหว่างการหมักของทุกเชื้อและลดลงมากที่สุด ใน *T. reesei* MCG 77 ในทุกขั้นตอนการหมัก โดยการผลิตจะเพิ่มขึ้นในเชื้อ *T. viride*, *T. harzianum* และ *G. virens* ดังนั้นฐานว่าอาจจะขาดสารอาหารบางอย่างในการเลี้ยงเชื้อเนื่องจากการเจริญอย่างรวดเร็วของไมซีเลียม

7. ลักษณะของเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Sporotrichum pulverulentum เป็นเชื้อราที่สปอร์มีสีขาวขุ่น ขึ้นหนาแน่นมาก มีลักษณะฟู เจริญเติบโตเร็วและไม่เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถย่อยสลายลิกนินได้

8. การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไฮลาเนส (Wong, et al., 1988)

8.1 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (Bioconversion)

กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนวัสดุพวกลิกนินในเซลล์ลูโลสให้เป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาล ซึ่งอาจใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักต่อไป

Walch, et al. (1992) ใช้เอนไซม์ไฮลาเนสจากเชื้อที่แยกมาจากดิน คือ Enzyme B5 และเอนไซม์ไฮลาเนสทางการค้าได้แก่ Roth 5246 และ Rohm EL 182-87 (แอกทิวิตี 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ย่อยสลายละลายไซแลนที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และไฮโดรไลสจากขานอ้อย โดยปมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ Roth, Rohm และ Enzyme B5 ย่อยของเหลวที่ได้จากการแปรสภาพขานอ้อยด้วยกระบวนการที่ใช้ความร้อน แบบ direct flow-through เพียงครั้งเดียว (200 องศาเซลเซียส) จะให้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลไฮโดรไลส 3.0, 2.6 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การที่เอนไซม์แต่ละชนิดย่อยสลายได้ดีกว่าปริมาณน้ำตาลต่างกัน เนื่องจากน้ำตาลไฮโดรไลสที่ได้จะมีลยบยั้งไฮลาเนสแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน นอกจากนี้อุณหภูมิที่ใช้และระยะเวลาเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการย่อยสลาย ซึ่งการใช้เอนไซม์ผสมของ *A. fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F กับ *Humicola lanuginosa* ย่อยสลายฟางข้าว พบว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่เกิดขึ้นสูงสุดที่อุณหภูมิระหว่าง 55-60 และ 50-55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการย่อยสลาย 12 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มปฏิกิริยาเป็น 24 ชั่วโมง น้ำตาลกลูโคสและไฮโดรไลสจะเกิดขึ้นสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในช่วงแรกของการ

ไม่ผ่านการใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 กิจกรรมเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสของเชื้อรา

organism	days	Fpase (1 U/ml)	CMCase (1 U/ml)	beta- glucosi- dase (1 U/ml)	xylanase (1 U/ml)	solution protein (1 U/ml)	pH
<i>T. reesei</i>	6	1.07	4.20	0.94	27.29	1.50	5.55
MCG 77							
<i>T. viride</i>	6	0.19	2.85	0.81	19.87	0.43	5.49
<i>T. harzianum</i>	6	0.17	2.47	0.8	19.44	0.35	5.25
<i>G. virens</i>	4	0.15	2.30	0.49	16.96	0.35	5.13
	6	0.14	1.87	0.84	14.39	0.26	5.26
<i>A. terreus</i>	6	0.29	3.25	3.03	10.83	0.43	5.50
<i>A. niger</i>	6	0.03	1.37	1.16	4.99	0.45	4.95
<i>T. phaseolina</i>	6	0.04	1.49	0.46	5.09	0.23	5.64

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Gome และคณะ (1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการใช้เอนไซม์จาก *Trichoderma* sp. E58 ย่อยเซลลูโลสที่แยกได้จากเนื้อไม้ด้วยวิธีต่าง ๆ

Substrate (100mg/ml)	Pentose originally present as%	Reducing sugars (mg/ml)	Monosaccharides (mg/ml)					
			Xylose	Galactose	Glucose	Mannose	Arabinose	total
Xylan (sigma)	79.5	58.6	22.4	0.5	4.2	1.6	4.8	33.0
SEA	85.5	56.9	26.3	5.0	0.1	2.6	0.1	34.0
SEW-WS2	61.5	33.2	23.6	2.7	0.1	0.1	0.1	26.0
SEW-WS2- 0.1%A	56.3	34.9	28.5	1.6	0.1	1.5	0.1	31.0
SEW-WS2- 0.2%A	51.0	42.9	23.2	7.9	5.7	0.1	0.1	36.0

ที่มา : Saddler, et al. (1983)

หมายเหตุ

SEA : เซลลูโลสที่ได้จากการสกัดเนื้อไม้ aspen ด้วย ethanol-benzene

SEA-WS2 : เซลลูโลสที่ได้จากเนื้อไม้ aspen โดยอบด้วยไอน้ำอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส (560 ปอนด์/ตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 วินาที แล้วสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

SEA-WS2-0.1%A : เซลลูโลสที่ได้จากส่วนละลายน้ำได้ของเนื้อไม้ aspen ที่แช่ด้วย H_2SO_4 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ก่อนการสกัดเช่นเดียวกับ SEA-WS2

SEA-WS2-0.2%A : เซลลูโลสที่ได้จากส่วนที่ละลายน้ำได้ของเนื้อไม้ aspen ที่แช่ด้วย H_2SO_4 เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ก่อนการสกัดเช่นเดียวกับ SEA-WS2

Reaction mixture ประกอบด้วย ลับสเตอร์เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายซีเตรทบัฟเฟอร์ซีเตรทเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้าและสารละลายไซของ *Trichoderma* sp. E58 ที่มีปริมาณโปรตีน 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสและไซโลสมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเกิดได้รวดเร็วในช่วงอุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลกลับลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อยสลาย เนื่องจากเอนไซม์จะสูญเสียคุณสมบัติเนื่องจากความร้อน (วิเชียรสิทธิ์, 2532)

Saddler, et al. (1983) ใช้เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำหรือตัวทำละลายจากเนื้อไม้ aspen มาเป็นสับสเตรทและย่อยด้วยเอนไซม์ไชลาเนตจาก *Trichoderma* sp. E 58 ดังตารางที่ 8 พบว่าได้น้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นโมโนแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลักมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล-เบนซีน (SEA ในตารางที่ 8) ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกับ ไชแลนทางการค้าและมากกว่าการใช้เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยกรดก่อนการใช้ไอน้ำ และการย่อยเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยกรดก่อนการใช้ไอน้ำ ซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการสกัดที่ไม่ใช้กรดการใช้ไอน้ำ

Vilkari, et al. (1994) สกัดไชแลนจาก pine kraft pulp ที่สกัดด้วย KOH เข้มข้น 1.32 โมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซไนโตรเจน และทำให้เข้มข้นโดยการระเหยให้เหลือปริมาตรเพียงครึ่งหนึ่ง จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยสารละลายผลของเอทานอลและกรดอะซิติก แล้วล้างด้วยเอทานอลและอีเทอร์ เมื่อทดลองใช้ไชแลนที่สกัดได้และไชแลนที่สกัดจาก birch kraft pulp ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์เป็นสับสเตรทในการย่อยด้วยเอนไซม์ไชลาเนต I และ II จาก *Trichoderma reesei* RUT C-30 ปมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง พบว่าไชลาเนต II (pI 9.0) ย่อยไชแลนจาก birch kraft pulp ได้ผลิตภัณฑ์ 52 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมากกว่าค่าที่ได้จากการใช้ไชลาเนต I (pH 5.5) ถึง 2 เท่า โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส ส่วนการย่อยไชแลนจาก pine kraft pulp พบว่าเอนไซม์ไชลาเนต I และ II ให้ผลิตภัณฑ์ที่ใกล้เคียงกัน (55 เปอร์เซ็นต์) สำหรับคุณสมบัติการละลายน้ำ พบว่าไชแลนจาก birch kraft pulp ละลายน้ำได้ 1 เปอร์เซ็นต์และไชแลนจาก pine kraft pulp ละลายน้ำได้มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมี arabinose side-group ในส่วนแกนกลาง (backbone) ของไชแลนอยู่สูงและมี polymerization ต่ำ

8.2 Biopulping

ในอดีตกระบวนการทำกระดาษจะใช้เชื้อราในการ treat เนื้อเยื่อไม้ เพราะสามารถช่วยลดต้นทุนด้านพลังงานในกระบวนการฟอก (refining) อย่างไรก็ตาม การใช้เอนไซม์ไชลาเนตจะช่วยลดระยะเวลาในการ treat เนื้อเยื่อไม้ และได้เยื่อไม้ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ เนื่องจากสารละลายของเนื้อเยื่อไม้มีเฮมิเซลลูโลสซึ่งระหว่างการทำให้ความร้อนหรือในสภาวะที่เป็นด่างไชแลนบางส่วนจะละลายออกมาในลักษณะสายสั้นๆ ตกตะกอนอยู่บนผิว microfibril ของเซลลูโลส (Rattawanการคำ et al., 1994) จึงมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไชลาเนตในการฟอกเนื้อเยื่อไม้สำหรับทำเยื่อกระดาษ

เพื่อลดการใช้สารเคมี เช่น กลอรีน โดยเอนไซม์จะไปย่อยไฮโดรไลสที่ตกตะกอนเหล่านั้น Christov และ Prior (1993) ใช้เอนไซม์ไฮโดรไลสที่ได้จากเชื้อ *Aureobasidium pullulan* NRRL Y-2311-1 ที่มีแอกทิวิตี 1500 ยูนิต/กรัม (เตรียมสารละลายเอนไซม์ในซีเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.5) ย่อยสารละลายเยื่อไม้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ป้อนและแอกทิวิตีของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นโดยย่อยได้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อไม้ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในช่วงเวลาต่างๆ ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส

8.3 กระบวนการอื่นๆ

เอนไซม์ทำให้น้ำผลไม้ใส ช่วยในการย่อยอาหารสัตว์ ซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าของอาหารสัตว์ มีการใช้เอนไซม์ไฮโดรไลสในการเตรียมวัตถุดิบในการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ใช้ศึกษาคุณสมบัติของโพลีแซคคาไรด์และผนังเซลล์ของพืช (Wong, et al., 1988) และประยุกต์ใช้ในการสกัดน้ำมันปาล์มเช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเพคตินเอส โดยใช้ในอัตรา 200 - 1 000 กรัมต่อตัน ที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง เพื่อแปรรูปเนื้อเยื่อพืชก่อนนำไปสกัดด้วยกระบวนการที่ใช้ปริมาณน้อยและแยกน้ำมันด้วยการหมุนเหวี่ยงในกระบวนการขั้นต่อไป นอกจากนี้ ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันและน้ำทิ้งโดยลดปริมาณเนื้อเยื่อของพืชที่มีโมเลกุลสูง ซึ่งทำให้เกิดความหนืดหรือขุ่น เช่น กลูแคน (glucans) เซมิเซลลูโลส เซลลูโลส และเพคติน ทำให้การแยกน้ำมันในขั้นตอนการทำให้ใส (Clarification) ดีขึ้น (Godfrey, 1983)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

วัตถุดิบ

ในการทดลองนี้ใช้ฟางข้าวที่ได้มาจากพื้นที่เกษตรกรรมนาข้าวบริเวณใกล้กับสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง นำมาบดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ (จากภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) แล้วจึงร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาดของฟางข้าวไม่มากกว่า 0.25 มม. เก็บใส่ภาชนะปิดที่แห้งสนิทวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

จุลินทรีย์

เชื้อรา *Sporotrichum pulverulentum* DMMU จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เก็บรักษาเชื้อในอาหารวุ้นแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จนเกิดสปอร์ที่มีลักษณะเป็นสีขาวของเชื้อเต็มที่แล้วจึงเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 2 เดือน นำสปอร์มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อนี้เป็นอาหารเหลว (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก) ประกอบไปด้วย

โพลีเปปโตน	0.25	กรัม
ยีสต์สกัด	1.0	กรัม
CaCl ₂	0.3	กรัม
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3	กรัม
KH ₂ PO ₄	1.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัม
กลูโคส	2.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.0 แบ่งใส่ฟลาस्कขนาด 250 มล. ฟลาस्कละ 50 มล. ปิดจุก และฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.0 แบ่งใส่ ฟลาลก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาลก์ละ 50 มิลลิลิตร ปิดจุก และฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารเคมี

เป็นสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีน (ภาคผนวก ข)

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
4. เครื่องเขย่า (Shaker)
5. เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge)
6. กล้องจุลทรรศน์และฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)
7. เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer)
8. ถังน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
9. เครื่องบดอาหารสัตว์

การวิเคราะห์

1. การนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา เจือจางตัวอย่างของเชื้อเริ่มต้นด้วยน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หยดตัวอย่างลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ และ นับจำนวนสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์ ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เพื่อ เติมสารละลายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2. การวัดค่าพีเอช นำสารละลายวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช

3. การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลินัส วัดตามวิธีของ Tang และคณะ (1987)

นำสารละลายที่เจือจางแล้วอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายไซแลนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ในไซเดียมซัลเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย-Dinitrosalicylic acid reagent (DNS) 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็น เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววัดค่า การดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยเทียบค่าไซโลลจากกราฟมาตรฐาน (รูปผนวกที่ ข1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า สำหรับ Blank จะใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2. ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมฟางข้าวบดในอัตราที่ได้คัดเลือกไว้แล้ว โดยศึกษาผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ เปรียบเทียบผลระหว่างการใช้แหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด คือ แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) และยูเรีย โดยเติมแต่ละชนิดในความเข้มข้นต่างๆ กัน คือใช้แอมโมเนียมไนเตรต 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ใช้ยูเรีย 0, 1, 2 และ 3 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (สูตรอาหารในข้อ 1)

3. พีเอชเริ่มต้น

ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้น โดยทำการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแหล่งไนโตรเจนและปริมาณฟางข้าวบดที่ได้คัดเลือกเป็น 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Sporotrichum pulverulentum* DMMU ที่เลี้ยงในสภาวะของเหลว

1. ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยใช้ฟางข้าวที่ผ่านการบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.25 มิลลิเมตรเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งไม่มีฟางข้าวเป็นส่วนประกอบ (รูปที่ 5 และ 6) และมีปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^5 สปอร์/75 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการเลี้ยงเชื้อทำได้โดยการนำไปรมที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยเชื้อ *Sporotrichum pulverulentum* จะเจริญในลักษณะเป็นก้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และเมื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ พบว่าเชื้อให้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุดเมื่อใช้ฟางข้าวที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยจะมีค่ากิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 1.271 ยูนิต/มิลลิลิตร และค่ากิจกรรมไซลาเนสที่สูงรองลงมา ได้แก่การใช้ฟางข้าวที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (1.111 ยูนิต/มิลลิลิตร), 0 เปอร์เซ็นต์ (1.055 ยูนิต/มิลลิลิตร) และ 1 เปอร์เซ็นต์ (1.003 ยูนิต/มิลลิลิตร) ตามลำดับ แต่เมื่อทำการวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าเชื้อให้ค่ากิจกรรมจำเพาะนี้สูงสุดเมื่อใช้ฟางข้าวที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (5.9 ยูนิต/มิลลิลิตร) และรองลงมา คือที่ความเข้มข้นของฟางข้าว 0 เปอร์เซ็นต์ (1.914 ยูนิต/มิลลิลิตร), 2 เปอร์เซ็นต์ (1.238 ยูนิต/มิลลิลิตร) และ 3 เปอร์เซ็นต์ (1.186 ยูนิต/มิลลิลิตร) ตามลำดับ ในการทดลองนี้จะใช้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสเป็นหลักในการพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อครั้งนี้ เพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เนื่องจากค่ากิจกรรมนี้เป็นค่าที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นความเข้มข้นของฟางข้าวที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของ *S. pulverulentum* DMMU คือ 1 เปอร์เซ็นต์

2. ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

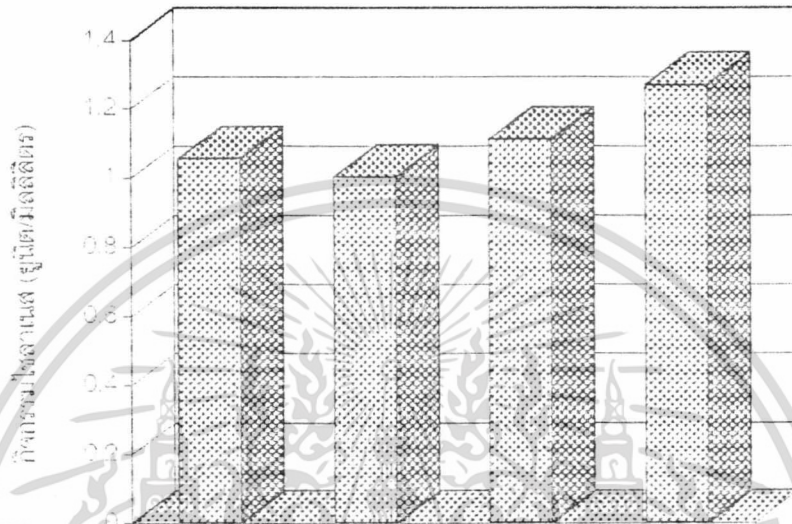
ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เปรียบเทียบผลกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรชุดควบคุม ซึ่งมีไนโตรเจน 2 ชนิด เป็นองค์ประกอบ คือ โพลีเปปไทด์ และ ยีสต์สกัด (รูปที่ 7 และ 8) พบว่ากิจกรรมไซลาเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ผู้ใดเห็นใบแจ้งประวัติการดำเนินการ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์จะมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้แอมโมเนียมในเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนค่ากิจกรรมเหล่านี้จะมีค่าลดลง นั่นคือเชื้อสามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าสารอินทรีย์ (Okeke และ Obi, 1993) โดยจะพบว่าค่ากิจกรรมทั้งสองนี้จะมีค่าสูงสุดเมื่อใช้แอมโมเนียมในเตรทที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งที่ความเข้มข้นนี้เชื้อจะให้กิจกรรมไซลาลเนลเท่ากับ 5.847 ยูนิต/มิลลิลิตร และให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 9.198 ยูนิต/มิลลิกกรัม หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ส่วนค่ากิจกรรมไซลาลเนลและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ถูกรองลงมาได้จากการใช้แอมโมเนียมในเตรทที่ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ (5.461 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 6.193 ยูนิต/มิลลิกกรัม), 0.6 เปอร์เซ็นต์ (3.450 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 4.986 ยูนิต/มิลลิกกรัม) และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (2.284 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 3.245 ยูนิต/มิลลิกกรัม) ตามลำดับ ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ ไซลาลเนลของเชื้อ *S. pulverulentum* DMMU คือ แอมโมเนียมในเตรท โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.3 เปอร์เซ็นต์

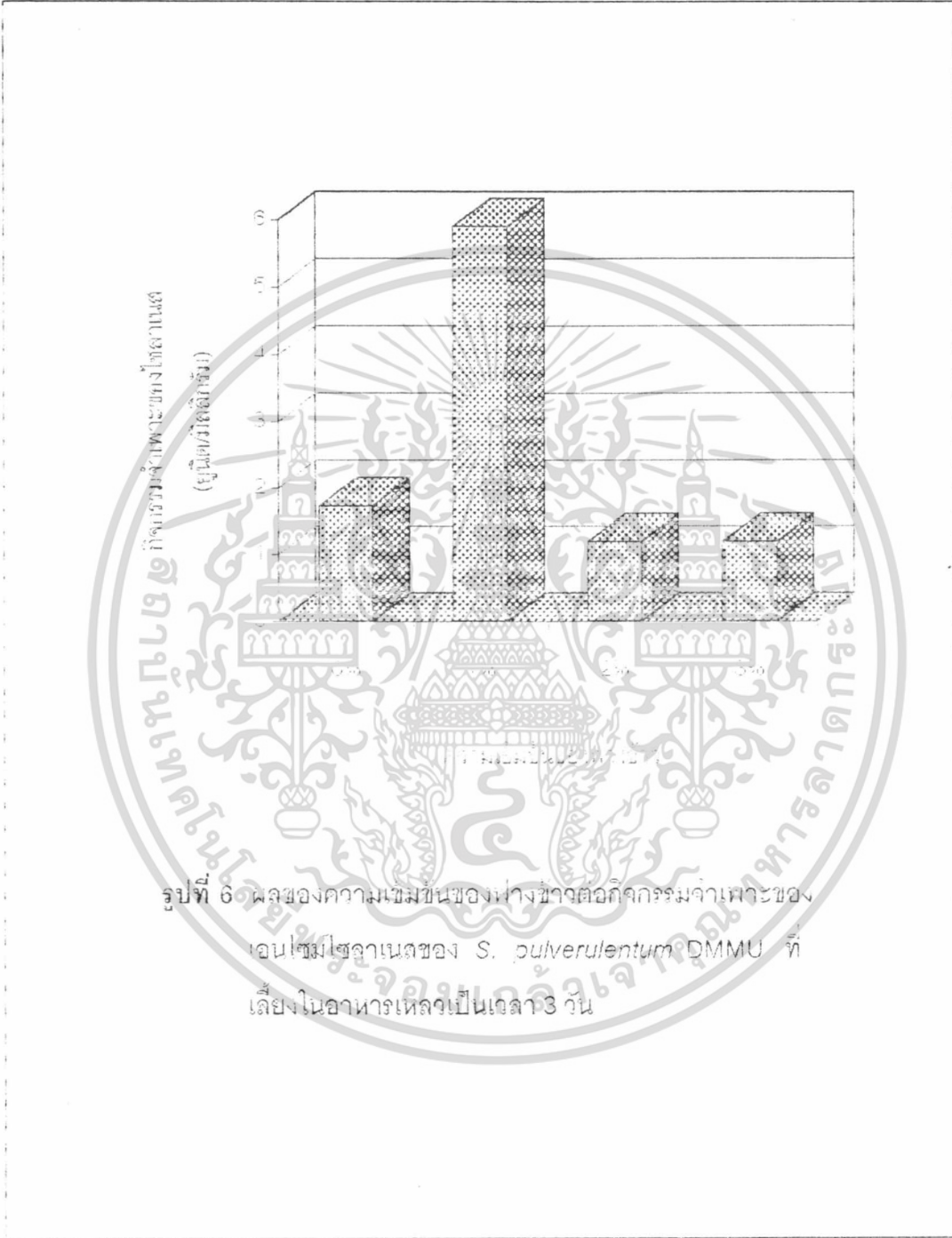
3. พีเอชเริ่มต้น

ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนลของ *S. pulverulentum* DMMU (รูปที่ 9 และ 10) พบว่าภายใต้สภาวะที่เป็นกรดเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนลได้ในปริมาณสูง (Mandel และ Weber, 1969) โดยพีเอชเริ่มต้นที่มีผลทำให้เชื้อให้ค่ากิจกรรมไซลาลเนลและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดคือ 5.0 (9.351 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 9.494 ยูนิต/มิลลิกกรัม) หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน และเชื้อจะให้ค่ากิจกรรมทั้งสองสูงรองลงมาเมื่อใช้พีเอชเริ่มต้น 4.0 (7.952 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 8.405 ยูนิต/มิลลิกกรัม), 6.0 (8.971 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 7.715 ยูนิต/มิลลิกกรัม) และ 7.0 (9.031 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 6.987 ยูนิต/มิลลิกกรัม) ตามลำดับ ดังนั้นพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนลของ *S. pulverulentum* DMMU ในฟางข้าว คือที่พีเอชเริ่มต้น 5.0



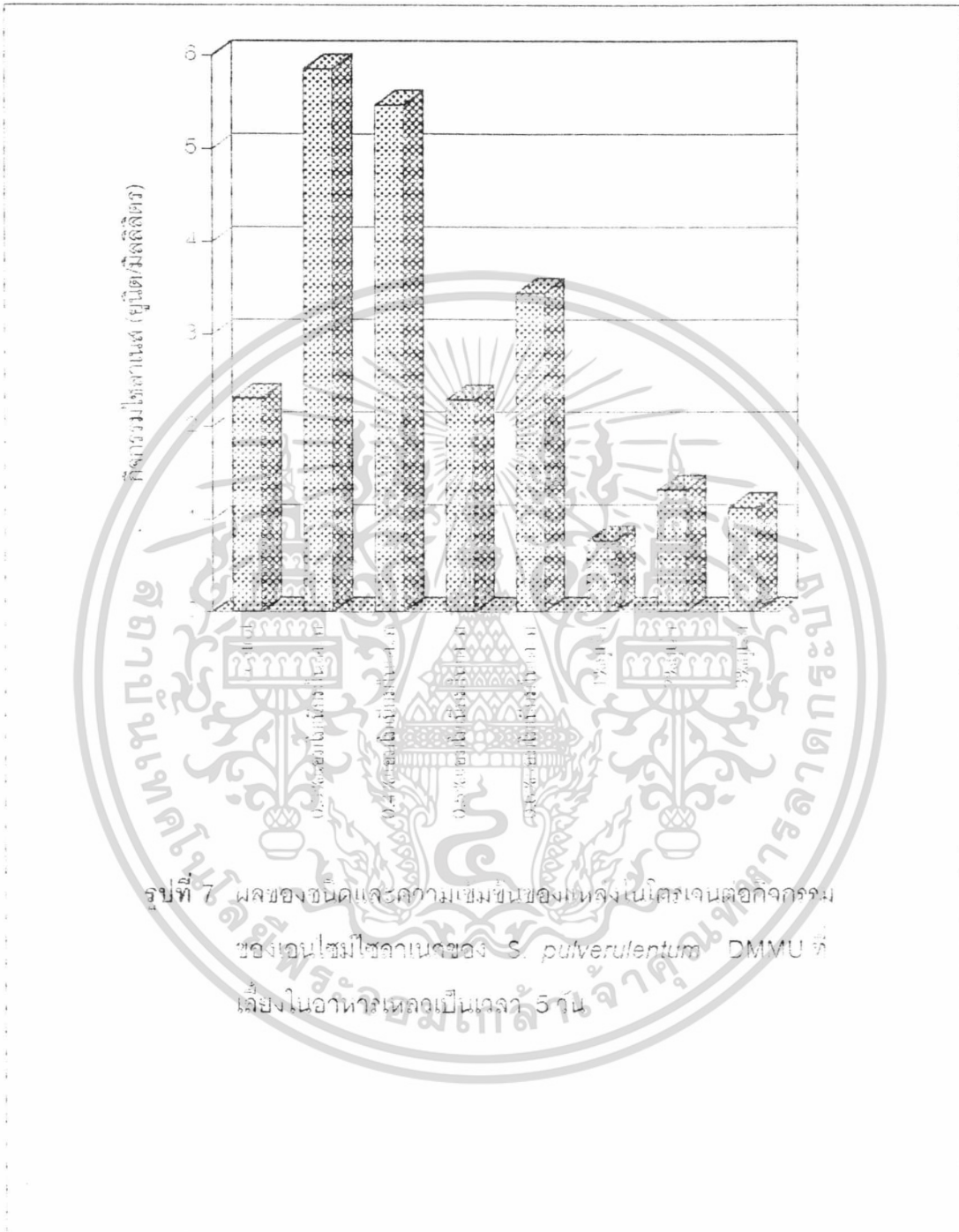
รูปที่ 5 ผลของควมเข้มข้นของฟางขาวต่อกิจกรรมของแอนติไบโอติกของ *S. pulverulentum* DMMU ที่เลี้ยงในอาหารเหลว เป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



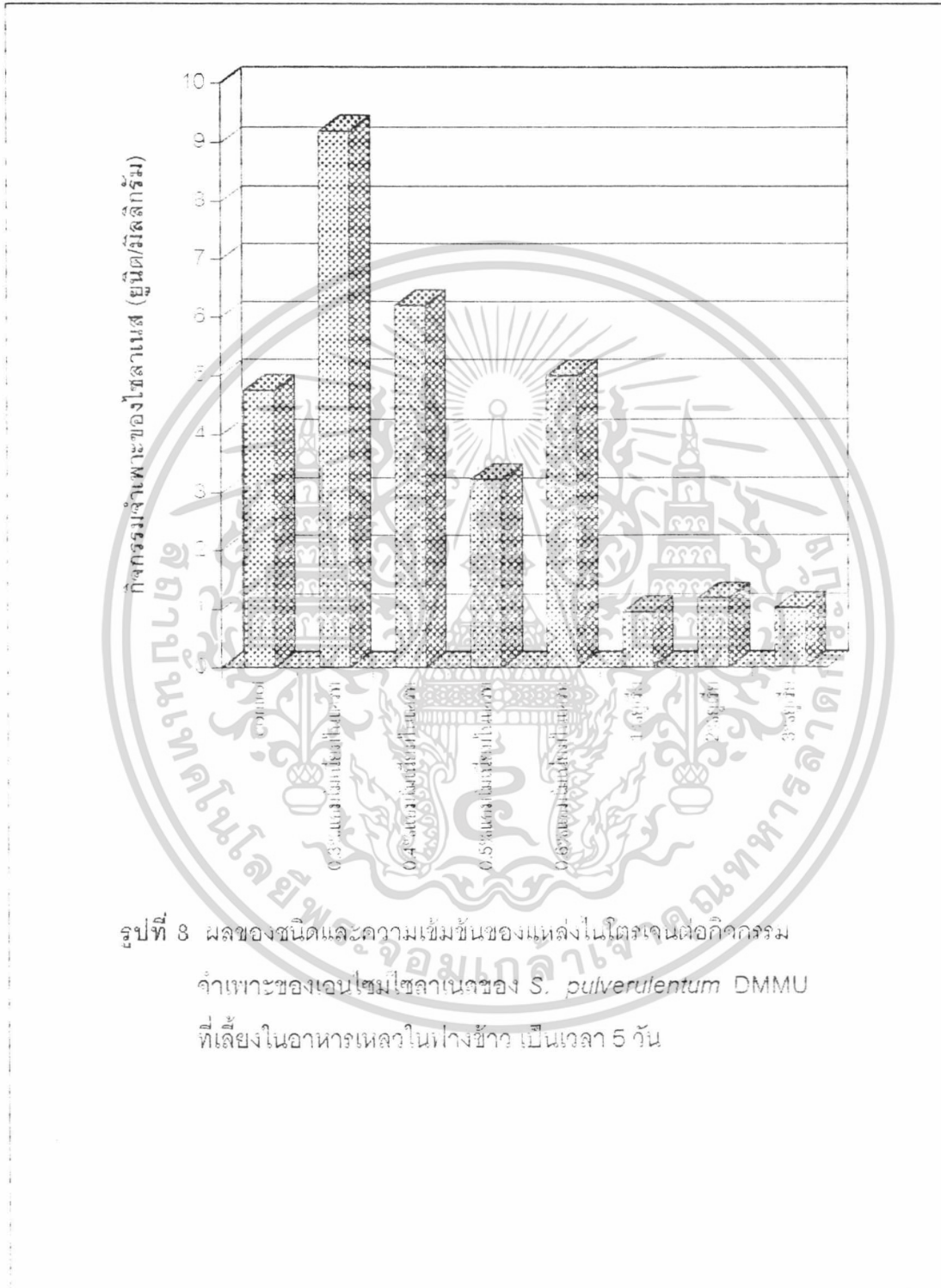
รูปที่ 6 ผลของความเข้มข้นของฟางข้าวต่อกิจกรรมจำเพาะของ เอนไซม์ไซลลันของ *S. pulverulentum* DMMU ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



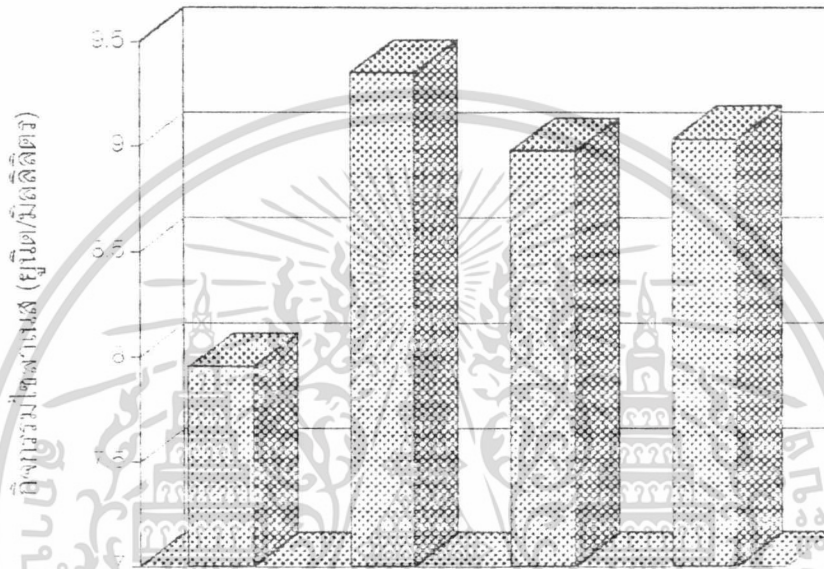
รูปที่ 7 ผลของขนาดและความเข้มข้นของแหล่งในโคโรเนคอกิจกรรมของโคมโซมาเนจของ *S. pulverulentum* DMU ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



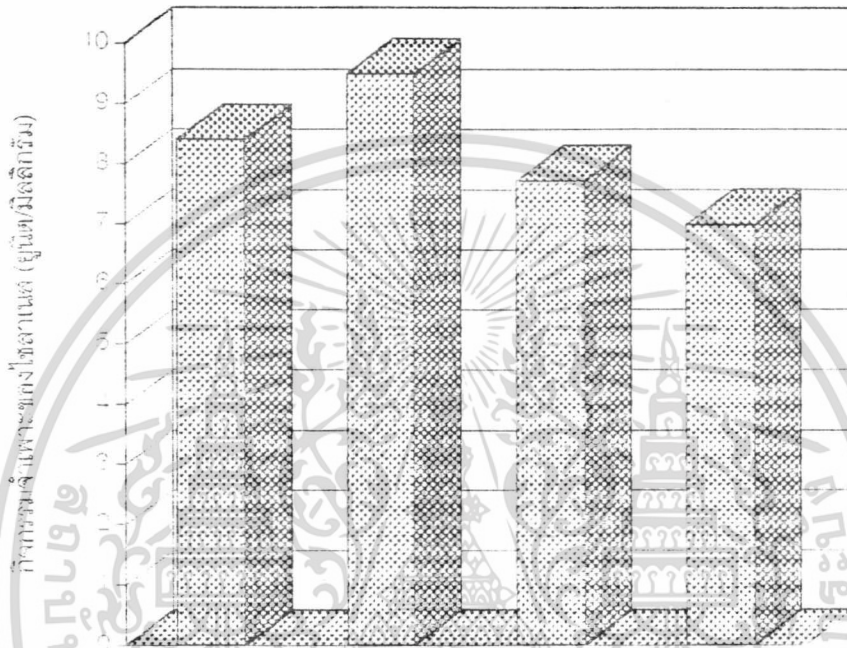
รูปที่ 8 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อกิจกรรม
จำเพาะของเอนไซม์ไฮลาเนสของ *S. pulverulentum* DMMU
ที่เลี้ยงในอาหารเหลวไนโตรเจน เป็นเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 ผลของทีเอชเอ็มดีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนดของ *S. pulverulentum* DMMU ที่เลี้ยงแบบอาหารเหลวใน ฟางข้าว เป็นเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อกิจกรรมจากเพาะของเอนไซม์ไฮโดรไลติกของ *S. palverulentum* DMMU ที่เลี้ยงในอาหารเหลวในฟางข้าว เป็นเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการเลี้ยงเชื้อ *Sporotrichum pulverulentum* DMMU โดยใช้ฟางข้าวซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นต้นสเตรตแบบอาหารเหลว เพื่อให้เชื้อทำการผลิตเอนไซม์ไฮลาเนต โดยเติมฟางข้าวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก ที่จะใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ฟางข้าวที่จะนำมาใช้จะผ่านการบดให้มีขนาดไม่เกิน 0.25 มิลลิเมตร เพื่อเป็นการแปรสภาพซึ่งเชื้อสามารถนำไปให้ได้ดียิ่งขึ้น และมีปริมาณคาร์บอนเริ่มต้นเท่ากับ 10% คาร์บอน 75 มิลลิกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการเลี้ยงเชื้อจะทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญในลักษณะเป็นก้อนภายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และเมื่อนำอาหารไปวิเคราะห์หา กิจกรรมของเอนไซม์ไฮลาเนตและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฮลาเนตของเชื้อ *S. pulverulentum* DMMU คือ การใช้ฟางข้าวที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีผลทำให้เชื้อให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮลาเนตเท่ากับ 1,003 ยูนิต/มิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดคือ 5.9 ยูนิต/มิลลิกรัม นอกจากนี้เชื้อจะให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮลาเนตและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด (5.847 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 9.198 ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ) เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ และ พีเอชเริ่มต้น 5.0 เชื้อจะให้ค่ากิจกรรมสูงสุดของไฮลาเนตเท่ากับ 9.351 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 9.494 ยูนิต/มิลลิกรัม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาอื่นๆ ที่มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ไฮลาเนตของ *Sporotrichum pulverulentum* DMMU ในสภาวะอาหารเหลวที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มมากขึ้น เช่น ปริมาณเชื้อเริ่มต้น, การเติมสารอาหารบางชนิด เป็นต้น

2. ฟางข้าวที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไฮลาเนตควรจะนำมาแปรสภาพด้วยวิธีอื่นๆ นอกจากวิธีการบด เพื่อให้เชื้อสามารถนำฟางข้าวนี้ไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ไฮลาเนตได้มากขึ้น เช่น การใช้สารเคมีในการย่อยสลายฟางข้าว ซึ่งจะช่วยให้ลิกนินแยกตัวออกจากเฮมิเซลลูโลสได้ และทำให้ฟางข้าวนี้สามารถละลายได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

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

Ander, P. and Eriksson K.S. 1975. Influence of carbohydrates on lignin degradation by white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Svensk. Papperstidn.* 78:643-692.

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

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

Buchholz, K., Puls, J., Godelmann, B. and Dietrichs, H.H. 1980-1981. Hydrolysis of cellulosic wastes. *Process Biochem.* 15:37-43.

Bucht, B. and Eriksson, K.E. 1968. Extracellular enzyme system utilized by the rot

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- fungus *Stereum sanguinolentum* for the breakdown of cellulose. Arch. Biophys. 124:135-141.
- Chahal, D.S. 1985. Solid state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. Appl. Environ. Microbiol. 49(1):205-210
- Cheah, S.C., and Ooi L.C.L. 1984. Isolation of thermophilic cellulolytic fungi. Paper presented at the regional UNESCO Symposium on Applied Microbiology, Bangkok and Khon Kean, Thailand, 23-26 December, 1984.
- Christov, L.P. and Prior, B.A. 1993. Xylan removal from dissolving pulp using enzymes of *Aureobasidium pullulans*. Biotechnol. Lett., 15:1269-1274.
- Clarke, R.T.J., Bailey, R.W. and Gaillard, B.D.E. 1969. Growth of rumen bacteria on plant cell wall polysaccharide. J. Gen. Microbiol. 56:79-86.
- Coutts, A.D. and Smith, R.E. 1976. Factors influencing the production of cellulases by *Sporotrichum thermophile*. Appl. and Environ. Microbiol. 31:819-821.
- Cowling, E.B. 1961. Comparative biochemistry of the decay of sweet gum sapwood by white rot and brown rot fungi. Dep of Agr. Tech Bull No. 12. Washington, D.C. 75 pp.
- Crawford, J.H. and Crawford R.L. 1976. Microbiol degradation of lignocellulose : the lignin component. Appl. Environ. Microbiol. 31:714-717.
- Dekker, R.F.H. and Richards, G.N. 1976. Hemicellulose : Their occurrence, purification, Properties and mode of action. Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 32:277-352.
- Desrochers, M., Jurasek, L. and Paice, M.R. 1981. High production of beta glucosidase in *Schizophyllum commune* : Isolation of the enzyme and effect of the culture filtrate on cellulose hydrolysis. Appl. Environ. Microbiol. 41:222-228.
- Domsh, K.H. and Gams, W. 1969. Variability and potential of a soil fungus population to decompose pectin, Xylan and carboxymethyl-cellulose. Soil Biol. Biochem. 1: 29-36.
- Doppelbauer, R., Esterbauer, H., Steiner, W., Iafferty, R.M. and Steinmuller, H. 1987. The use of lignocellulosic wastes for production of cellulose by *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26:485-494.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- D' souza, J. and Volfova, O. 1982. The effect pH on the production of cellulase is *Aspergillus terreus*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16:123-125.
- Enari, T.M. 1983. Microbial cellulase. Applied Science Publishers, London and New York. P. 183-223.
- Eriksson, K.E. and Rzedowski. 1969. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Chrysosporium lignorum* for the breakdown of cellulose. L. Studies on the enzyme production. Arch. Biochem. Biophys. 129:683-688.
- Essilfie, R.j., Bavor, J.H. and Scurray, G. 1986. Protein upgrading of orange peel waste for potential stock feed by solid substrate fermentation. ASEAN Food J. 2(1)25-30.
- Gaillard. B.D.F., Bailey, R.W. and Clarke. R.T.J. 1975. The action of rumen bacterial hemicellulase on pasture plant hemicellulose fraction. J. Agr. Sci. 64:449-454.
- Gascoigne, J.A. and Gascoigne, M.M. 1960. The xylanase of *Fusarium roseum*. J. Gen. Microbiol. 22:242-248.
- Gilbertson, R.L. 1980. Wood-rotting fungi of North America. Mycologia. 72:1-49.
- Godfrey, T. 1983. Edible oils. In Industrial Enzymology: The Application of Enzyme in Industry. (Godfrey, T. and Reichelt, J., eds.) pp. 424-427. The Nature Press : New York.
- Goksory, J. and Eriksen, J. 1980. Cellulase : Microbial enzyme and bioconversions, Economic Microbiology. Vol 5. (Rose, A.H., ed.) Academic Press. London. P. 283-330.
- Gomes, J., Esterbauer, H., Gomes, I. and Steiner, W. 1989. Screening of some wild fungal isolated for cellulolytic activities. Letters in Appl. Microbiol. 8:67-70.
- Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W. and Esterbauer, H. 1992. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:701-707.
- Goodwin, T.W. and Mercer. E.I. 1972. Introduction to plant Biochemistry. 1st ed. Pergamon Press. New York. P. 52-57.
- Gottlieb, S. and Pelczar, M.J. Jr. 1951. Microbiological aspects of lignin degradation. Bacteriol. Rev. 15:55-76.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Gorbacheva, I.V. and Rodionova, N.A. 1977. Studies on xylan degrading enzyme. II. Action pattern of endo 1,4-beta-xylanase from *Aspergillus niger* Str. 14 on xylan and xylooligosaccharides. *Biochem. et Biophys. Acta.* 484:94-102.
- Haider, K. and Trojanowski. 1975. Decomposition of specifically 14-labelled phenols and dehydropolymers of coniferyl alcohol as model for lignin degradation by soft and white rot fungi. *Archives of Microbiol.* 105:33-41.
- Hammerschmidt, R. and Kuc' J. 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiol. Plant. Pathol.* 20:61-71.
- Hampton, H.A., Hawarth, W.N. and Hirst, E.L. 1929. Polysaccharides Part IV. The constitution of xylan. *J. Chem. Soc.* 1739-1753.
- Han, Y.M. 1978. Microbial utilization of straw (a review), *Adv. Appl. Microbiol.* 23:119-153.
- Harkin, J.M. 1967. Lignin natural polymeric product of phenol oxidation. *In* batlersby A.R. and Taylor A.I. eds. *Oxidative Coupling of phenols.* Maarcel Dekker. Inc., New York. P. 243-321.
- Harvey, P.J., Schoemaker, H.E., Brown, R.M. and Palmer, J.M. 1985. Single electron transfer process and the relation mechanism of enzymatic degradation of lignin. *FEBS Letters.* 183:13-16.
- Hashimoto, S., Muramatsu, T. and Funatsu, M. 1971. Studies on xylanase from *Trichoderma viride*. Part I. Isolation and some properties of crystalline xylanase. *Agr. Biol. Chem.* 35:501-508.
- Haworth, W.N. and Percival, E.G.V. 1931. Polysaccharides. Part IX. Evidence of the pyranose structure of xylan. *J. Chem. Soc.* 2850-2854.
- Higuchi, T., Shimada, M., Nakatsubo, F. and Tanahashi, M. 1977. Difference in biosynthesis of guaiacyl and syringyl lignin in wood. *Wood sci. Technol.* 17:153-167.
- Ibrahim, M.N.M. 1981. Physical, chemical. Physio-chemical and biological treatment of crop residues. *In* Pearce, G.R. (ed.). *The utilization of Fibrous Agricultural Residues as animal Feed.* Univ. Melbourne. Victoria. pp. 53-68.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Iwamoto, T. Sasaki, T. and Inaoka, M. 1973. Mem. Ehime. Univ. 17:13-25. In dekker, R.F.H. and Richards. 1976. Hemicellulase : Their occurrence, purification, properties and mode of action. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32:277-352.
- Lackson, M.G. 1977. Review article : the alkali treatment of straws. Anim. Feed. Sci. Technol. 2: 105-130.
- Janshekar, H. and Fiechter, A. 1983. Lignin : biosynthesis, application and biodegradation. Adv. Biochem. Eng. 27:117-179.
- Joglekar, A.V. and Karanth, N.G. 1984. Studies on cellulase production by a mutant *Penicillium funiculosum* UV-49. Biotechnol. Bioeng. 26:1079-1084.
- Joglekar, A.V., Srinivasan, M.C., Manchanda, A.C., Jogdand, V.V. and Karanth, N.G. 1983. Studies on cellulase production by a *Penicillium funiculosum* strain in an instrumented fermentor. Enzyme Microb. Technol. 5:22-24.
- John, M., Schmidt, B. and Schmidt, J. 1979. Purification and some properties of five Endo-1,4-beta-D-xylanase and a beta-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*. Can. J. Biochem. 57:125-134.
- Jones, R.P., Greenfield, P.F. and Nicklin, D.J. 1980. Cellulose hydrolysis state of the art and near term potential. Department of chemical Engineering. University of Queensland, Australia. 22 pp.
- Karni, M., Deopurkar, R.L. and Prale, V.B. 1993. β -Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grow on sugars and agricultural residues. J. Microbiol. Biotechnol. 9:476-478.
- Kawamori, M., Morikawa, Y., Ado, Y. and Takasawa, S. 1986. Production of cellulases from alkali-treated bagass in *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:454-458.
- King, N.J. and Fuller, D.B. 1968. The xylanase system of *Coniophora cerebella*. Biochem. J. 108:571-576.
- Kinoshita, S., Sriyotha, P., Lumyong, S., Sarawek, S. and Chisuksant, Y. 1983. Production of cellulase in solid culture by *Aspergillus* sp. Annual Reports of ICME. 6:289-292.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kirk, T.K. and Alder, E. 1970. Methoxyl deficient structural elements in lignin of sweetgum decayed by a brown-rot fungus. *Acta Chemica Scandinavica*. 24:337-390.
- Kretovich, V.L. 1966. Principles of plant Biochemistry 1st ed. Pergamon Press : New York.
- Kusakabe, L., Yasui, T. and Kobayashi, T. 1966. Studies on xylanase of system of *Streptomyces*. Part I. Some properties of extracellular xylanase from *Streptomyces*. *Agr. Biol. Chem.* 29:520-524.
- Lizuka, H. and Kawaminami, T. 1965. Studies on the xylanase from *Streptomyces*. Part I. Purification and some properties of xylanase from *Streptomyces xylophagus* nov. sp. *Agr. Biol. Chem.* 29:520-524.
- Lonsane, B.K., Ghildyal, N.P., Budiatwan, S. and Ramakrishna, S.V. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 7:258-265.
- Lonsane, B.K., Saucedo-Castanedo, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzalez, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M. and Krishnaiah, M.M. 1992. Scale up strategies for solid state fermentation system. *Process Biochem.* 27:259-273.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Mandels, M. and Weber, J. 1969. The production of cellulase. *In cellulase and Their Application* (Gould, R.E. ed.) *Adv. Chem. Ser.* 95. American Chemistry society, Washington, D.C. p. 391-387.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- Nakanishi, K., Yasui, T. and Kobayashi, T. 1976a. A preliminary experiment on the xylanase production by *Streptomyces* sp. *J. Ferment. Technol.* 54:801-807.
- Neudoerffer, T.S. and Smith, R.E. 1970. An evaluation of fungal enzyme for the solubilization of wheat bran constituents. *Can. J. Microbiol.* 16(3):139-146.
- Nisizawa, T., Suzuki, H. and Nisizawa, K. 1971. "De novo" synthesis of cellulase induced by sophorose in *Trichoderma viride* cells. *J. Biochem.* 70:387-393.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ofuga, C.O. and Vekpong, E.N. 1989. Fungal fermentation of a nigerian brewery sludge. *Biological. Wastes.* 30:251-260.
- Okeke, B.C. and Obi, S.K.C. 1993. Production of cellulolytic and xylanolytic enzyme by an *Arthrographis* species. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9:345-349.
- Paice, M.G., Jurask, L., Carpenter, M.R. and Smillie, L.H. 1978. Production, characterization and partial amino acid sequence of xylanase. A from *Schizophyllum commune*. *Appl. and Env. Microbiol.* 36:802-808.
- Panda, T. 1989. Simulation of shake flask conditions in a bioreactor for the biosynthesis of cellulase and xylanase by a mixed culture of *Trichoderma reesei* D 1-6 and *Aspergillus wentii* Pt 2804. *Process Biochem.* 104-108.
- Percival, E.G.V. 1962. *Structural Carbohydrate Chemistry*. 2nd ed. Glasgow : Robert Maclehose and Co., Ltd.
- Raimbault, M. and Alazard D. 1980. Culture methode to study fungal growth in solid fermentation. *European J. Appl. Microbiol.* 9:199-209
- Ratto, M., Mathrani, I.M., Ahring, B. and Viikari, L. 1994. Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus* sp. In enzymatic treatment of kraft pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:130-133.
- Reddy, C.A. 1973. Microbiol. Degradation of lignin. *Dev. Ind. Microbiol.* 19:13-68.
- Regalski, J., Szedark, J., Dawidowicz, A., Ikezuk, Z. and Leonowicz, A. 1985. Enzyme Microb. Technol. 7:395-400. อ้างโดยโคภิชรุ์ เทพยดกรณ์, 2531. การศึกษาขบวนการผลิตเอนไซม์เซลลูโลสและเซลลูโลสจากเปลือกข้าวโพด โดยแบคทีเรียผสมใน fermentor. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า วิทยาเขตธนบุรี.
- Sarkanen, K.V. and Ludwig, C.H. 1971. Lignin : Occurrence, Formation, Structure and reaction. Wiley-Interscience. New York.
- Savory, J.G. and Pinion, L.C. 1958. Chemical aspect of decay of beech wood by *Chaetomium globosum* *Holzforshung.* 12:99-103.
- Schoemaker, H.E., Harvey, P.J., Bowen, R.A. and Palmer, J.M. 1985. On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. *FEBS Letter.* 183:7-12.
- Shewale, J.G. and Sadana, J.C. 1978. Cellulase and beta-glucosidase production by a
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
- Basidiomyces* sp. *Can. J. Microbiol.* 24:1204-1216.
- ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shu Chen and Wayman, M. 1991. Cellulase production induced by carbon sources derived from waste newspaper. *Process Biochem.* 26:93-100.

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

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

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

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

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

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

Toussaint, P. and Betaille, P.F. 1985. The effect of pretreatment on the enzymic hydrolysis of cellulosic industrial waste. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 35B:205-215.

Trigo, C. and Ball, A.S. 1994. Production of extracellular enzyme during the solubilisation of xylans lignocellulose materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:124-129.

Vilhari, L. Kantelinen, A. Buchert, J. and Puls, J. 1994. Enzymatic accessibility of xylans lignocellulosic materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:124-129.

Walch, E., Zemann, A., Schinner, F., Boon, G. and Bobleter, O. 1992. Enzymatic saccharification of hemicellulose obtained from hydrothermally perterated sugae cane bahasse and beech bark. *Biol. Technol* 39:172-177.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

อาหารวุ้นเลี้ยง Potato Dextrose Agar (PDA)

ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาล dextrose	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

วิธีการ

ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือด กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่ได้มาเติมน้ำตาล dextrose และผงวุ้น ต้มจนผงวุ้นละลาย ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร บรรจุในหลอดทดลองขนาด 16×150 มม. หลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยล้าลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอนอาหารวุ้นมีอุณหภูมิลดลงพอให้มือสามารถจับได้ (ระวังอย่าให้เย็นจนขึ้นแข็งตัว) นำไปวางเลี้ยงจนวุ้นแข็งตัวดี หรือ อาจใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูป นำมาละลายน้ำ กลั่นตามอัตราส่วนที่ระบุไว้ที่ภาชนะ คนให้ละลาย แล้วบรรจุลงในหลอดทดลอง ทำเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวมาข้างต้น

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลสในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์โดยใช้ DNS reagent ตามวิธีของ Miller (1959)

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย

	เปอร์เซ็นต์
1. dinitrosalicylic acid	1
2. phenol	0.2
3. sodium potassium tartrate (Rochelle salt)	20
4. Na_2SO_3	0.05
5. NaOH	1

วิธีการเตรียม DNS reagent

ละลาย NaOH ในน้ำตาลปริมาณที่ต้องการจนหมด เติมสารเคมีตัวอื่นๆ ละลายตามลงไป แล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับจำนวนที่ต้องการ

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลสสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมไซลาเนล

1. เตรียม stock solution ของไซโลสให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1 มาความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร (สำหรับแปลงค่าน้ำกลั่นแทน)

3. เติมสารละลาย DNS reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร

4. ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็น

5. เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าหลอด (vortex)

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร แล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการ

ดูดกลืนแสงที่หาได้กับปริมาณไซโลส ดังแสดงในรูปผนวกที่ ข1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ประโยชน์ในหน่วยงานเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. สำหรับสารละลายตัวอย่างที่ต้องการจะหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ให้ปฏิบัติตามข้อ 2-6 ถ้าตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่สูง ให้เจือจางตัวอย่างจนสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในช่วง 0.3-0.8 แล้วจึงนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

- การคำนวณค่ากิจกรรมไซลาเนส

คำนวณได้จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{ยูนิต/มิลลิลิตร} &= \frac{\text{มิลลิกรัมของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของไซโลส} \times \text{ระยะเวลาการปฏิกิริยา} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}} \\ & \quad \text{(กรัม/โมล)} \quad \quad \quad \text{(นาที)} \quad \quad \quad \text{(มิลลิลิตร)} \\ &= \frac{\text{มก.ของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{150.13 \times 10 \times 0.5} \end{aligned}$$

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Lowry, et al. (1951)

สารเคมี

- 5% Na_2SO_3
- 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน 1% sodium potassium tartrate
- นำสาร (a) 30 มิลลิลิตร ผสมกับสาร (b) 2 มิลลิลิตร แล้วใช้ทันที
- Folin-Ciocalteu's Phenol reagent 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร
- Bovin albumin protein

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

- ใช้สารละลายมาตรฐาน Bovin albumin protein ที่ระดับความเข้มข้น 0, 500, 1000, 1250 และ 1500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 นอร์มัล NaOH 0.9 มิลลิลิตร
- ต้มในน้ำเดือด 5 นาที
- เติมสารเคมี (c) 2.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- เติมสารเคมี (b) 0.5 มิลลิลิตร เขย่าทันที ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

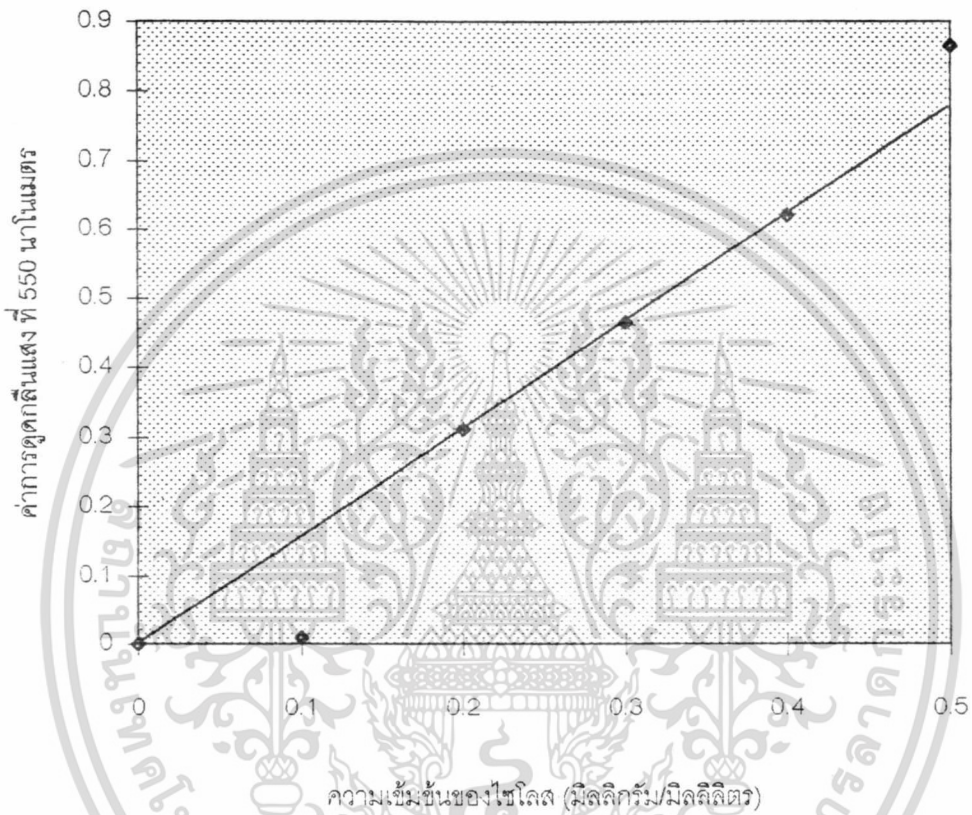
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูอาจารย์และบุคลากรศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. นำค่าที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง

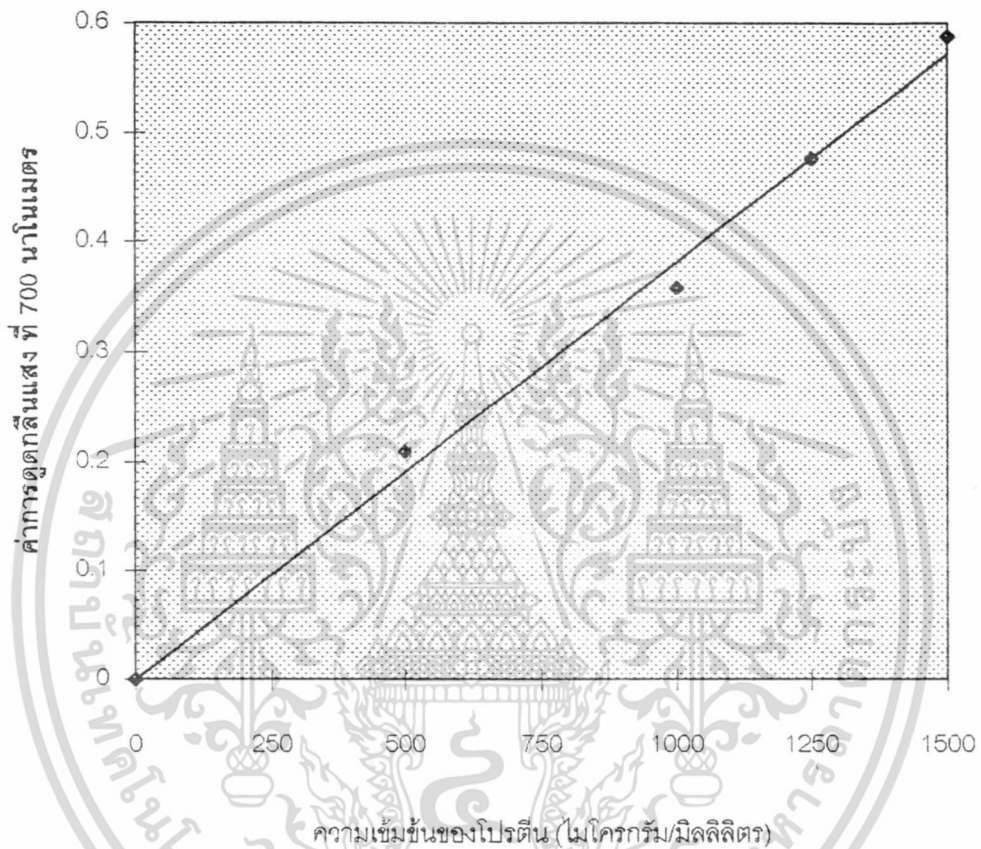


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น
ไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 550
นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผนวกที่ ๒2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้