BRT T-648001

# การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในอาหารแข็ง

# OPTIMIZATION CONDITION FOR XYLANASE PRODUCTION FROM *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 IN SOLID STATE FERMENTAION

วิบูลย์ศรี เรืองทวีสิน
WIBOONSRI RUANGTAWEESIN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2548

ISBN

2549/0039
RECEIVED
BY [signature] DATE 11/1/49

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/o ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

# การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในอาหารแข็ง

# OPTIMIZATION CONDITION FOR XYLANASE PRODUCTION FROM *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 IN SOLID STATE FERMENTAION


วิบูลย์ศรี เรืองทวีสิน

WIBOONSRI RUANGTAWEESIN


วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2548


ISBN

# OPTIMIZATION CONDITION FOR XYLANASE PRODUCTION FROM *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 IN SOLID STATE FERMENTAION

WIBOONSRI RUANGTAWEESIN

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
2005

ISBN

COPYRIGHT 2005
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในอาหารแข็ง |
| **นักศึกษา** | นางสาววิบูลย์ศรี เรืองทวีสิน |
| **รหัสประจำตัว** | 46063409 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| **สาขาวิชา** | เทคโนโลยีชีวภาพ |
| **อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์** | รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ |
| **อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม** | รศ.อรไท สุขเจริญ |

## บทคัดย่อ


จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและให้ค่ากิจกรรมสูงกว่า *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อเปรียบเทียบการใช้ฟางข้าว รำข้าว ธูปฤาษีและผักตบชวาเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 และเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ให้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 917 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และ 908 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ และเมื่อใช้ฟางข้าวทำพรีทรีทเมนต์ด้วยการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้มากสุดคือ 1,480 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท สำหรับการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟตกับยูเรียในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีกว่าเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 พบว่าภายหลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 40 ถึง 50 จากนั้นนำมาทำการไดอะไลซิส และผ่านการอัลตราฟิวเตรชัน จะได้เอนไซม์ไซลาเนสที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 57.5 เท่า และมีค่ากิจกรรมไซลาเนสจำเพาะ 938 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมคือ 40 องศาเซลเซียส และ7.0 ตามลำดับ เอนไซม์ไซลาเนสมีความคง

ตัวที่อุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอนไซม์ไซลาเนสมีความคงตัวที่ช่วงพีเอชกว้างคือ 2.6-12.0 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับ 47.22 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท ($K_m$) และค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุดเมื่อใช้ oat spelt xylan เป็นสับสเตรท เท่ากับ 14.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 212.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

| | |
|---|---|
| **Thesis Title** | Optimization condition for xylanase production from *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 in solid state fermentation |
| **Student** | Miss Wiboonsri Ruangtaweesin |
| **Student ID.** | 46063409 |
| **Degree** | Master of Science |
| **Programe** | Biotechnology |
| **Thesis Advisor** | Assoc. Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat |
| **Thesis Co-advisor** | Assoc. Prof. Oratai Sukcharoen |

# ABSTRACT

In this study , *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 and *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 were cultured for xylanase production. The result showed that *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 was able to produce higher amout of xylanase and activity than *Aspergillus foetidus* TISTR 3159. When rice straw, rice bran, narrow-leaved cattail and water hyacinth were used as carbon source, it was found that *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 and *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 produced the highest activites of xylanase at 917 and 908 unit/g substrate, respectively on rice straw. Pretreatment of rice straw with 1% sodium hydroxide for 0.5 h before using as substrate, *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 produced xylanase at 1,480 unit/g substrate. When ammonium sulphate and urea were used as nitrogen source , it was found that *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 could produce higher xylanase on ammonium sulphate than on urea.

Some properties of xylanase producing from *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 were studied. After xylanase was precipitated with ammonium sulphate (40 - 50 % saturation), dialysis and ultrafiltration, the xylanase enzyme was more purified (57.5 times) and the specific activity was 938 unit/mg protein. The optimum temperature and pH were 40°C and 7.0, respectively. The xylanase enzyme was stable at temperature 30 - 40 °C with relative xylanase activity at 100 %. The $K_m$ and $V_{max}$ values of xylanase with oat spelt xylan as substrate were 14.88 mg/ml and 212.22 µg/ml/min, respectively.

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแก้ไขข้อบกพร่อง และความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์อรไท สุขเจริญ ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_648001

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

ขอขอบพระคุณ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว อาจารย์ผู้สอนทุกท่าน เพื่อน ๆ รวมถึงผู้ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง และให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจให้สำเร็จการศึกษามาโดยตลอด

วิบูลย์ศรี เรืองทวีสิน

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย....................................................................................I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ....................................................................................III

กิตติกรรมประกาศ....................................................................................IV

สารบัญ.................................................................................... V

สารบัญตาราง.................................................................................... IX

สารบัญรูป....................................................................................XII

บทที่ 1 บทนำ....................................................................................1

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย....................................................................................1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของงานวิจัย....................................................................................2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.................................................................................... 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ....................................................................................3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง....................................................................................4

2.1 โครงสร้างและการทำงานของไซแลน....................................................................................4

2.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยไซแลน....................................................................................4

2.3 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส....................................................................................8

2.4. การใช้วัสดุชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส......... 14

2.5 ประโยชน์ของเอนไซม์ไซลาเนส....................................................................................17

2.6 การทำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อราให้บริสุทธิ์....................................................................................18

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.................................................................................... 21

3.1 อุปกรณ์.................................................................................... 21

3.2 สารเคมี.................................................................................... 22

3.2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ....................................................................................22

3.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์....................................................................................23

# สารบัญ (ต่อ)


หน้า

3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กลูโคซามีน ........ 23

3.2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีน ........ 24

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ ........ 24

3.4 การเตรียมสับสเตรท ........ 24

3.4.1 การอบแห้ง ........ 24

3.4.2 การทำพรีทรีทเมนต์ ผักตบชวา รำข้าวและฟางข้าว ด้วยการต้ม ........ 25

3.4.3 การทำพรีทรีทเมนต์ ผักตบชวา รำข้าวและฟางข้าวด้วยสภาวะการแช่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ........ 25

3.4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำพรีทรีทเมนต์รำข้าว และฟางข้าว ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ........ 25

3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ........ 25

3.5.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ........ 25 ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

3.5.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ........ 26

3.6 การสกัดเอนไซม์ไซลาเนส ........ 26

3.7 การวิเคราะห์

3.7.1 การวัดการเจริญของเชื้อรา ........ 26

3.7.1.1 การสกัดกลูโคซามีนจากตัวอย่าง ........ 26

3.7.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Morgan-Elson ........ 27

3.8 การทำให้เอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) ........ 27

3.9 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส ........ 27

3.9.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส ........ 27

3.9.2 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส ........ 28

3.9.3 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิ ........ 28

3.9.4 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่อพีเอช ........ 28

3.9.5 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท ($K_m$) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูง ........ 29 สุด $v_{max}$ ของเอนไซม์ไซลาเนส

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.9.6 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท ($K_m$) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด $v_{max}$ ของเอนไซม์เซลลูเลส ..... 29

3.10 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ ..... 29

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 โดยแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ..... 30

4.2 ผลการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 โดยแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ..... 36

4.3 ผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลส โดยใช้ฟางข้าว รำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวา เป็นแหล่งคาร์บอน ระหว่างเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 และ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ..... 42

4.4 ผลการเปรียบเทียบกิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลสจากการใช้แหล่งคาร์บอน ผักตบชวา รำข้าวและฟางข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ ด้วยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ..... 45

4.5 ผลค่ากิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลสจากการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน ผักตบชวา รำข้าวและฟางข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ ด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ..... 56

4.6 ผลค่ากิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลส จากการเปรียบเทียบการใช้รำข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ โดยการหมักด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ..... 66

4.7 ผลค่ากิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลส จากการเปรียบเทียบการใช้ฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์โดยการหมักด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ..... 75

4.8 ผลการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา*Fusarium moniliforme* TISTR 3175 โดยการประยุกต์ใช้แหล่งคาร์บอนคือ ฟางข้าว ..... 83

4.9 ผลของแหล่งในโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ..... 86

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.10 ผลการศึกษาการเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จากไซแลน ธูปฤาษี รำข้าว ผักตบชวา 92

4.11 ผลการทดลองการทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน 97

4.12 ผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส 100

4.12.1 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส ที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 100

4.12.2 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส ที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 102

4.12.3 ผลของความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิ 104

4.12.3.1 ผลของความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิ 104

4.12.3.2 ผลของความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิ 105

4.13 การศึกษาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด ของเอนไซม์ไซลาเนส ( $K_m$ , $V_{max}$) 107

4.14 การศึกษาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด ของเอนไซม์เซลลูเลส ( $K_m$ , $V_{max}$) 109

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 111

บรรณานุกรม 114

ภาคผนวก 123

ประวัติผู้เขียน 150

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า


2.1 สมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ........ 6

2.2 การแปรสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมโดยกรรมวิธีต่าง ๆ ........ 14

4.1 การเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ........ 32

4.2 การเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ........ 35

4.3 อัตราส่วนระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด โดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ........ 35

4.4 การเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ........ 38

4.5 การเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ........ 40

4.6 อัตราส่วนระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ........ 41

4.7 ผลการเปรียบเทียบเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 และ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลาเนสทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ........ 42

4.8 ผลการเปรียบเทียบเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 และ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ซึ่งแสดงค่าอัตราส่วนไซลาเนสต่อเซลลูเลสทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ........ 43

# สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.9 การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนด้วยการต้ม และการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ 50

4.10 การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนด้วยการต้ม และการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ 55

4.11 การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนด้วยการต้ม และการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ 60

4.12 การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนด้วยการต้ม และการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ 64

4.13 การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนรำข้าวด้วยการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ 70

4.14 การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนรำข้าวด้วยการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ 74

4.15 การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนฟางข้าวด้วยการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ 79

4.16 การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนฟางข้าวด้วยการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ 82

# สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.17 การเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ........ 86

4.18 การเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ........ 92

4.19 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ให้บริสุทธิ์ ........ 98

4.20 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ให้บริสุทธิ์ ........ 99

# สารบัญรูป

รูปที่ หน้า


2.1 ธูปฤาษี ........................................ 16

2.2 ผักตบชวา ........................................ 17

4.1 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ........................................ 31

4.2 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ........................................ 34

4.3 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ........................................ 37

4.4 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ........................................ 39

4.5 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นผักตบชวาที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับผักตบชวาที่ไม่พรีทรีทเมนต์ ........................................ 46

4.6 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นรำข้าวที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์ ........................................ 47

4.7 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์ ........................................ 47

4.8 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นผักตบชวาที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับผักตบชวาที่ไม่พรีทรีทเมนต์ ........................................ 52

4.9 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นรำข้าวที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์ ........................................ 53

# สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.10 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์ 54

4.11 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นผักตบชวาที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับผักตบชวาที่ไม่พรีทรีทเมนต์ 57

4.12 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นรำข้าวที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์ 58

4.13 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์ 59

4.14 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นผักตบชวาที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับผักตบชวาที่ไม่พรีทรีทเมนต์ 62

4.15 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นรำข้าวที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์ 63

4.16 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์ 64

4.17 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้รำข้าวแช่แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 67

4.18 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้รำข้าวแช่แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 68

4.19 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้รำข้าวแช่แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 69

# สารบัญรูป (ต่อ)


รูปที่ หน้า

4.20 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้รำข้าวแช่แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ............ 72

4.21 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้รำข้าวแช่แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ............ 73

4.22 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้รำข้าวแช่แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ............ 73

4.23 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้ฟางข้าวแช่แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ............ 76

4.24 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้ฟางข้าวแช่แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ............ 77

4.25 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้ฟางข้าวแช่แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ............ 78

4.26 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้ฟางข้าวแช่แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ............ 80

4.27 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้ฟางข้าวแช่แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ............ 81

4.28 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้ฟางข้าวแช่แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ............ 81

4.29 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 จากการประยุกต์ใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ............ 84

4.30 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 จากการประยุกต์ใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ............ 85

4.31 ผลของกิจกรรมไซลาเนส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย เมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ............ 88

4.32 ผลของกิจกรรมเซลลูเลส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย เมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ............ 89

# สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.33 ผลกิจกรรมไซลาเนส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย เมื่อใช้ฟางข้าว แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 .......... 91

4.34 ผลกิจกรรมเซลลูเลส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย เมื่อใช้ฟางข้าว แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 .......... 92

4.35 การเจริญโดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้ ธูปฤาษี รำข้าว ผักตบชวา และไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน .......... 94

4.36 การเจริญโดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้ ธูปฤาษี รำข้าว ผักตบชวา และไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน .......... 95

4.37 ผลกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและปริมาณกลูโคซามีนที่วิเคราะห์จาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน .......... 96

4.38 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 .......... 101

4.39 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 .......... 103

4.40 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในรำข้าวต่ออุณหภูมิ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที .......... 104

4.41 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ต่อพีเอช เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที .......... 106

4.42 ผลค่าระหว่าง 1/ V และ 1/ S ของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 .......... 108

4.43 ผลค่าระหว่าง 1/ V และ 1/ S ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 .......... 110

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ไซแลนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของ ฟางข้าว รำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวา ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลสและลิกนินมีหน้าที่เพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ โดยองค์ประกอบหลักเป็นเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็น heteropolysacccharide ของโมเลกุลดีไซโลส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1,4 เบต้า-ไซโลไพราโนซิลกับสายโซ่หลัก มีหมู่ข้างเคียงคือ อะซิติล อะราบิโนส กรดกลูคูโรนิก กรดคูมาริก (p-coumaric) และเฟอร์รูลิก (Mayorga, 2002)

เอนไซม์ไซลาเนสเป็นไซลาโนไลติกเอนไซม์สามารถย่อยไซแลน โดยย่อยสลายโซ่หลักและปล่อยโมเลกุลของไซโลสออกมานอกเซลล์ จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งเชื้อรา แบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทสามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสเพื่อย่อยสลายไซแลนให้กลายเป็นน้ำตาลไซโลสและโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่าง ๆ ได้ เช่น เชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 และ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยย่อยสลายไซแลนที่มีอยู่ในผนังเซลล์พืช เช่นฟางข้าว รำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวาให้กลายเป็นไซโลส เนื่องจากเชื้อราดังกล่าวเพาะเลี้ยงได้ง่ายสามารถเจริญได้รวดเร็ว ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดี โดยต้องมีสภาวะอาหารที่เหมาะสม เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 2 ชนิด

เนื่องจากแหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งอาหารที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และเนื่องจากประเทศไทยมีวัตถุดิบทางการเกษตรหลากหลายชนิด อีกทั้งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นวัสดุที่มีราคาถูก ดังนั้นจึงเลือกใช้ ฟางข้าว รำข้าว ธูปฤาษีและผักตบชวามาเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 และ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 โดยการศึกษาสภาวะการทำพรีทรีทเมนต์ (pretreatment) แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยการแช่แหล่งคาร์บอนด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และการต้ม ซึ่งการทำพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนจะทำให้ไซแลนและไซโลสออกจากวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสละลายในน้ำเพิ่มขึ้น เชื้อราเจริญและสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ปริมาณมากขึ้น ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นปัจจัยสำคัญเพราะว่าเชื้อราใช้สร้างผนังเซลล์ แต่แอมโมเนียมซัลเฟตมีราคาแพง จึงได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนจากยูเรียเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อเปรียบเทียบปริมาณไซลาเนสที่เชื้อราสามารถผลิตได้

เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีคุณภาพและปริมาณสูงกว่าจากพืชและสัตว์ โดยเอนไซม์ไซลาเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตและเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรททำให้หลีกเลี่ยงปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการได้ และสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่น เพราะว่าเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท จึงมีการนำเอนไซม์ไซลาเนสมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นจนถึงปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การทำให้น้ำผลไม้ใส โดยการเลือกใช้เอนไซม์ไซลาเนสในอุตสาหกรรมอาหาร มีปัจจัยหลายอย่างที่ต้องคำนึงถึง เช่น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและปริมาณสูงสุด ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง ระดับอุณหภูมิ หาได้ง่าย ราคาไม่สูงมาก งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาพีเอช อุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส ความคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอช อัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุด และค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ไซลาเนส นอกจากนี้เอนไซม์ไซลาเนสมีประโยชน์สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ แทนการฟอกสีเยื่อกระดาษโดยการใช้สารเคมีประเภทคลอรีน ทั้งนี้เนื่องจากปัจจุบันแนวโน้มการใช้กระดาษของประเทศไทยมีเพิ่มมากขึ้น โรงงานอุตสาหกรรมจึงมีการผลิตกระดาษมากขึ้นเพื่อรองรับความต้องการ แต่สิ่งที่เกิดปัญหาขึ้น คือ ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดมลพิษทางน้ำ มีผลต่อสัตว์น้ำอาจตายได้ ดังนั้นการใช้เอนไซม์ไซลาเนสจะช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีอีกทั้งการใช้ไซลาเนสยังช่วยเพิ่มความสว่างของเยื่อกระดาษ

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่เป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ เป็นสับสเตรทสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

1.2.2 ศึกษาสภาวะการทำพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอน เพื่อให้เชื้อราเจริญได้ง่ายและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดี

1.2.3 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

1.2.4 ศึกษาการสกัดเอนไซม์ไซลาเนสและการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา

1.2.5 ศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ไซลาเนสเช่น อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม ค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท ($K_m$) อัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุด ($V_{max}$)

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 โดยใช้แหล่งคาร์บอนจาก ฟางข้าว รำข้าวเจ้า ธูปฤาษี

และผักตบชวา ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสแตกต่างกัน นำแหล่งคาร์บอนดังกล่าวมาศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ความคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอชของเอนไซม์ไซลาเนส ความจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสต่อสับสเตรท และอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ไซลาเนส

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพที่จะนำแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่หาง่ายและราคาถูกมาทำให้เกิดประโยชน์ เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราและผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยทำให้ทราบถึงกระบวนการที่เหมาะสมในการเตรียมแหล่งคาร์บอน และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งเอนไซม์ไซลาเนสมีประโยชน์ใช้กับอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ทำให้กระดาษสว่าง จะช่วยลดมลพิษทางน้ำ และปัญหาสิ่งแวดล้อม อีกทั้งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยย่อยเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชทำให้สัตว์ดูดซึมอาหารง่ายขึ้น

# บทที่2
# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไซแลนพบในผนังเซลล์พืช มีองค์ประกอบหลักเป็นพวกเฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เซลลูโลส (cellulose) และลิกนิน

## 2.1 โครงสร้างและการทำงานของไซแลน

โครงสร้างของไซแลนมีลักษณะเป็นสายพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1,4-เบต้า-ดี-ไซโลไพราโนซิล (1,4-β-D-xylopyranosyl) และมีสารประกอบหมู่อื่น ๆ มาเกาะเป็นหมู่ข้างเคียง เช่น L-arabinose,acetyl, glucuronic, 4-0-methylglucuronic, p-coumaric และ fururic acid มาต่อที่สายโซ่หลักไซแลนที่ตำแหน่งต่างกัน เช่นที่ตำแหน่ง O-3 ของไซแลนจะมีหมู่อะซิติลมาเกาะ (Mayorga, 2002)

เอนไซม์ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายไซแลน ซึ่งมีรายงานว่าทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์สามารถผลิตไซลาเนสได้ โดยจุลินทรีย์ต่าง ๆ มักผลิตไซลาเนสออกมามากกว่า 1 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยไซแลนได้ต่างกัน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่มีขนาดต่างกันด้วย โดยเอนไซม์ไซลาเนสมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิดที่จะย่อยสลายทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เช่น แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส (α-L-arabinofuranosidase) อะซิติลไซแลนเอสเทอเรส(acetylxylan esterase) เบต้า-กลูคูโรนิเดส (β- glucuronidase) เป็นต้น (Sunna and Antranikian,1997)

## 2.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยไซแลน

ไซลาเนสเป็นเอนไซม์หลัก ที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายไซแลน ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อราและยีสต์ สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ โดยการย่อยสลายไซแลนสมบูรณ์นั้น จะต้องประกอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ ทำงานร่วมกัน (Dekker and Richards, 1976; Wong and Saddler, 1988) ได้แก่

2.2.1 เอนโดไซลาเนส (endoxylanase) หรือ (1,4-β-D-xylan xylohydrolase , EC 3.2.1.8) เอนไซม์จะสลายพันธะไกลโคซิติก (glycosidic) ในเฮทเทอโรไซแลน ทำให้ได้ไซโลโอลิโกแซ็กคา

ไรด์ (xylooligosaccharide) ที่จะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นไซโลไตรโอส (xylotriose) ไซโลไบโอส (xylobiose) และไซโลส (xylose) ตามลำดับ

2.2.2 เบต้า-ไซโลซิเดส (β-xylosidase) หรือ (β-D-xyloside xylohydrolase EC 3.2.1.37) เป็นเอนไซม์ที่จะย่อยสลายไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์และไซโลไบโอสทีละหน่วย จากปลายนอนรีดิวซ์ (non reducing end) ให้ได้เป็นไซโลส

2.2.3 แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส (α-L-arabinofuranosidase EC 3.2.1.55) แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดสจะย่อยสลายทั้งพันธะ 1,3 และ 1,5 แอลฟา-แอล-อะราบิโนซิลฟิวราโนซิลในอะราบิโนไซแลน (arabinoxylan) โดยจะย่อยพันธะ1,3ที่เชื่อมกับอะราบิโนฟิวราโนซิลก่อนแล้วจะค่อย ๆ ย่อยแอลฟา-แอล-1,5 –อะราบิแนน (α-L-1,5-arabinan) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะราบิโนส (arabinose)

2.2.4 แอลฟา-กลูคูโรนิเดส (α-glucuronidase) แอลฟา-กลูคูโรนิเดสจะย่อยสลายพันธะแอลฟา 1,2 ที่เชื่อมระหว่างกรดกลูคูโรนิก(glucuronic acid) และไซโลสในกลูคูโรโนไซแลน โดยความจำเพาะต่อสับสเตรตของแอลฟา-กลูคูโรนิเดสขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ เช่นเอนไซม์ที่ได้จาก *Agaricus bisporus* ต้องการกลูคูโรโนไซแลนเป็นสับสเตรทที่มีมวลโมเลกุลต่ำ

2.2.5 อะซิติลไซแลน เอสเทอเรส (acetylxylan esterase EC 3.1.1.6) เอนไซม์นี้จะเคลื่อนย้ายหมู่โอ-อะซิติล (O-acetyl) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และที่ 3 ของไซแลน อะซิติลไซแลนเอสเทอเรสจาก *Trichoderma reesei* ซึ่งจะย่อยกรดแอซีติกจากหมู่แทนที่ของอะซิติลของไซโลโอลิโกเมอร์ (xylooligomer)

2.2.6 เฟอร์รูลิก (ferulic) และพารา-คิวเมอร์ริก แอซิด เอสเทอเรส (p-coumarid acid esterase) กรดเฟอร์รูลิกเละพารา-คิวเมอริกเชื่อมด้วยพันธะเอสเทอร์ (Bacon *et al.* 1975) โดยเอนไซม์คิวเมอริก แอซิด เอสเทอเรส จะย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างอะราบิโนส ซึ่งเป็นโซ่ข้างและกรดเฟอร์รูลิกในไซแลน ส่วนพารา-คิวเมอริก แอซิด เอสเทอร์จะแยกพันธะเอสเทอร์ระหว่างอะราบิโนสและกรดพารา-คิวเมอริก

ในปัจจุบันมีการผลิตเอนไซม์หลายชนิดรวมทั้งเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งใช้ในการค้าและใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ

| สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ | ความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสม | ความเสถียรต่อความเป็นกรดเป็นด่าง | อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส) | อุณหภูมิที่ทำให้ activity เกิดสมบูรณ์ |
|---|---|---|---|---|
| *Aureobasidium pullulans* | 4.8 | 4.5 | 54 | 70 องศาเซลเซียส 30 นาที |
| *Aureobasidium pullulans* | 4.0 | 5.0 | 45 | 80 |
| *Bacillus subtilis* | 6.0 | 3.5-9.0 | 45 | - |
| *Bacillus stearothermophilus* | 9.0 | 7.0 | 65 | 65 องศาเซลเซียส มากกว่า 6 ชั่วโมง |
| *Ceratocystis paradoxa* | 6.0 | 5.0-10.0 | 80 | 100 |
| *Chainia* sp. | 5.1 | 5.0-7.0 | 60 | - |
| *Dictyoglomur* sp. | 6.0-7.0 | 9.0 | 90 | - |
| *Fusidium* sp.*BXI* | 5.5 | 4.0-9.0 | 60 | - |
| *Phanerochate crysosporium* | 5.0 | 4.0-9.0 | 50 | - |

**ตารางที่ 2.1 (ต่อ)**

| สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ | ความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสม | ความเสถียรต่อความเป็นกรดเป็นด่าง | อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส) | อุณหภูมิที่ทำให้ activity เกิดสมบูรณ์ |
|---|---|---|---|---|
| *Rhodothermus marinus* | 7.1 | - | 65 | มากกว่า 80องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง |
| *Streptomyces* sp. S 510 | 6.0 | 4.0-11.0 | 60 | - |
| *Streptomyces* HM 15 | 5.0-7.0 | 5.7 | 50-60 | 60องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง- |
| *Streptomyces* sp. | 5.5 | - | 60 | - |
| *Streptomyces* sp.E 86 | 5.5-6.2 | 4.5-10.5 | 55-60 | 70 |
| *Streptomyces* sp. KT23 | 5.5 | 4.0-10.0 | 55 | - |
| *Streptomyces* sp. No.3137 | 5..0-6.0 | 4.0-8.0 | 50-60 | - |
| *Thermomonospora fusca BD25* | 7.0-8.0 | มากกว่า9 | 60 | - |
| *Thermophacus aurantiscus* | 5.0 | 3.0-9.0 | 80 | - |
| *Trichoderma reesi* | 5.5-6.0 | 3.0-7.0 | - | 90 |

ที่มา : ชวนพิศ ดีเอกนามกุล (2536)

## 2.3 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ได้แก่

### 2.3.1 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

แหล่งอาหารที่เชื้อจุลินทรีย์ใช้เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีหลายชนิด เมื่อพิจารณาถึงแหล่งคาร์บอนจะพบว่า ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ในการนำไปสร้างพลังงานและเซลล์ ถ้ามีความเข้มข้นที่น้อยเกินไปจะทำให้เชื้อเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้อย่างไม่เต็มที่ แต่ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนมากเกินไป หรืออาหารที่มีความเข้มข้นมากเกินไป จะทำให้อาหารหนืดและอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตได้ มีการใช้เซลลูโลสธรรมชาติ เช่น รำข้าวสาลี ฟางข้าวสาลี ฟางข้าว กากถั่วเขียว และรำข้าว ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* A99 ซึ่งฟางข้าวสาลี 10 เปอร์เซ็นต์ จะให้ปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุด (Archana and Satyanarayana, 1997)

จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma harzianum* E58 บนอาหารไซแลนที่มีความเข้มข้น 0.1-3.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอาหารผสมระหว่างไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ และ stream-treat aspenwood (SEA-WS) จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน และจะผลิตเอนไซม์เอนโดกลูโคเนสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน และเมื่อเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าไซแลน 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีกิจกรรมสูงกว่าการใช้ solka floc 1 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ใช้เฉพาะไซแลนกับเมื่อใช้ไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ผสมกับ SEA-WS 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ผสมกับ SEA-WS 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้เอนไซม์ไซลาเนสที่มีกิจกรรมสูงสุด (Senior *et al.*, 1989)

การเลี้ยงเชื้อ *Thermatoga marittima* ใน เบิร์ชวูดไซแลน (birchwood) 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสบริสุทธิ์ ที่มีกิจกรรมจำเพาะ 131 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ส่วนการเลี้ยงเชื้อ *Thermomonospora fusca* BD25 เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ 3 ชนิดคือ เบต้า-ไซลาเนส เบต้า-เอนโดกลูโคเนส และเพอร์ออกซิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานระหว่างคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และไซแลน 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แทนการใช้ฟางข้าว พบว่า เชื้อ *T. fusca* BD25 จะผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสลดลงเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนแทนฟางข้าว และไม่พบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเมื่อใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสแทนฟางข้าว แต่พบว่าเอนไซม์ไซลาเนส เบต้า-เอนโดกลูโคเนสยังคงมีกิจกรรมสูงเมื่อใช้ฟางข้าวผสมกับไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน (Trigo and Ball, 1994)

การเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* NCIM 1207 ในอาหารที่มีไซแลนความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับรำข้าวสาลี 4.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ปริมาณ 9.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้รำข้าวสาลี ส่วนไซแลนที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ 10.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แสดงว่าเชื้อราใช้ไซแลนในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงกว่ารำข้าวสาลีเพียง 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติจึงใช้รำข้าวสาลี 4.0 เปอร์เซ็นต์เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และใช้ไซแลน 3 เปอร์เซ็นต์เพื่อผลิตเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส (Gokhale *et al.*, 1986)

การเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus fumigatus* IMI 255091 ในฟางข้าวที่มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์สามารถผลิตเอนไซม์ เบต้า-ดี-กลูโคสซิเดสได้ในปริมาณสูง แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์จะผลิตเอนไซม์ลดลง เนื่องจากความเข้มข้นที่สูงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อหนืดมีผลให้การถ่ายเทมวลและอากาศไม่ดี ทำให้เชื้อเจริญน้อยลงและผลิตเอนไซม์ลดลง (Wase *et al.*, 1985)

เอนไซม์จากเชื้อ *Cyathus stercoreus* ที่เลี้ยงในเฮมิเซลลูโลสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส 1600 ยูนิตต่อลิตร สูงกว่าการใช้ไซแลนความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ากิจกรรมไซลาเนส 760 ยูนิตต่อลิตร แต่การใช้เปลือกข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ให้กิจกรรมสูงถึง 2000 ยูนิตต่อลิตร ส่วนฟางข้าวสาลีเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดคือ 2800 ยูนิตต่อลิตรในฟางข้าวสาลี (Saxena, 1994)

เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Trichoderma viride* โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กันคือ เปลือกข้าวบาร์เลย์ เปลือกข้าว ฟางข้าวสาลี เส้นใยปอกระเจา กระเจา กิ่งปอ (jute stick) กระดาษหนังสือพิมพ์ sulphite pulp, acicel และไซแลน พบว่าเมื่อใช้ sulphite pulp เป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่าสูงสุดคือ 190.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือการใช้เปลือกข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งให้ค่ากิจกรรมไซลาเนสเป็น 111.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Gome *et al.*, 1991)

การใช้สารอาหาร Solka-floc 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Trichoderma reesi* พบว่าได้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุด 207 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ไซแลนจากเนื้อไม้พืชตระกูลสน( larch wood xylan) 1 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสูงกว่านี้ จะยังยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ และถ้าใช้อาหารที่ได้จากน้ำมันเมล็ดพืช (canola meal) เป็นแหล่งคาร์บอนจะพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจะสูงขึ้นตามความเข้มข้นจนถึงความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ และได้ค่ากิจกรรมสูงสุดเป็น 210 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นมากกว่านี้ อาหารจะมีความหนืด ทำให้ยากต่อการกวนและให้อากาศ (Gattinger *et al.*, 1990)

การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus circulans* B6 โดยใช้ไซแลนที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *Bacillus circulans* B6 สามารถใช้ไซแลนที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อสามารถผลิตไซลาเนสได้สูงสุด และเมื่อมีการเติมดี-กาแล็กโทส (D-galactose) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในไซแลนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้ไซแลน 10 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีการเติม ดี-กาแล็กโทส 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะต่อสับสเตรท (specific activity) เท่ากับ 8.1 ยูนิตต่อมิลลิกรัม (Kyu *et al.*, 1994)

**2.3.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส**

แหล่งไนโตรเจนไม่ว่าจะเป็นสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ต่างก็มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเชื้อจุลินทรีย์จะนำไนโตรเจนไปใช้สำหรับเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโนเพื่อสังเคราะห์เซลล์ เช่น การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Cyathus stercoreus* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนคือยูเรีย กรดกลูตามิก เคซีนไฮโดรไลเสท เคซีน เปปโทน แอมโมเนียมไนเตรต และไดแอมโมเนียมซัลเฟต แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน ในอาหารพื้นฐาน (basal medium) โดยเติมไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จะพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากสารอินทรีย์จะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าไนโตรเจนที่ได้จากสารอนินทรีย์ (Saxena, 1994)

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและไซลาเนสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* โดยไม่มีการควบคุมพีเอชเริ่มต้น พบว่าการใช้ยูเรียมีผลทำให้พีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยงมีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 6.7 (ในอาหารที่มียูเรีย 1.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับโปรติเอสเปปโตน 3 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร) และในอาหารที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวในปริมาณ 1.5 กรัมต่อลิตร พีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยงจะเป็น 6.5 ภายใน 10 วัน ในอาหารที่มีโปรติโอสเปปโทน 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว จะมีพีเอชสุดท้ายเป็น 5.9 เมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวในปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตร พีเอชจะเป็น 5.7 แต่ถ้าไม่มียูเรีย พีเอชจะลดลงเป็น 4.7 เป็นที่ทราบกันดีว่าพีเอชมีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสที่พีเอช 4.0 จะผลิตเอนโดกลูคาเนสได้สูงสุด และที่พีเอช 6.0-7.0 โดยเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้สูงสุดคือ 8.020 นาโนคาทาลต้นต่อมิลลิลิตร (nkat /ml) เมื่อใช้เซลลูโลสและไซแลนเป็นสับสเตรท (Happla *et al.*,1996)

แหล่งไนโตรเจนที่ศึกษาว่าเหมาะสมกับการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus fumigatus* IMI 246651 คือ แอมโมเนียมไนเตรต ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร และรองลงมาคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร (Stewart and Parry, 1981)

**2.3.3 ผลของพีเอชที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส**

การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (carboxymethyl cellulase) และเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Cellulomonas* และ *Micrococcus* spp. ในสภาวะที่พีเอชมีความเป็นกรดถึงความเป็นกลาง (6.0-7.0) พบว่าเชื้อจะเริ่มสร้างเอนไซม์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของ *Cyathus stercoreus* คือ 5.6 และพีเอชที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์คือ 5.5 แต่จะเสถียรที่พีเอชในช่วงกว้างคือ 4.5-7.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ 25 องศาเซลเซียส (Saxena , 1994)

*Acidobacterium capsulatum* เป็นแบคทีเรียที่ชอบกรด (acidophillic bacterium) เจริญที่พีเอช 3.0-6.0 และจะไม่เจริญเมื่อพีเอชสูงถึง 6.5 เอนไซม์ที่สร้างขึ้นจะมีกิจกรรมได้ที่ 1.5-8.5 โดยจะทำงานได้ดีที่สุด 5.0 แต่ที่พีเอช 3.0-8.0 ก็ยังสามารถเกิดกิจกรรมเอนไซม์ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (Inagaki *et al.*, 1998)

เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่เกิดจากเชื้อ *Thermomonospora fusca* BD25 จะมีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรรมเอนไซม์ที่ 7.0-8.0 คือที่พีเอช 4.5 และ ที่พีเอช 10.5 เอนไซม์จะทำงานเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ และที่พีเอช 2.0 และ 12.0 กิจกรรมเอนไซม์จะเหลือเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาของ MacCarthy และคณะ (1985) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสคือ 4.5-8.0 สำหรับเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจะมีพีเอชที่เหมาะสมที่ 6.0

เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 จะทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 4.5-6.5 โดยพีเอชที่เหมาะสมคือ 5.0-7.0 เอนไซม์จะเสถียรที่พีเอช 5.0-9.0 ซึ่งเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมน้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ที่พีเอช 12.0 จะสูญเสียกิจกรรม 30 เปอร์เซ็นต์ และที่พีเอชต่ำกว่าเช่นที่ 4.0 พบว่าเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมเช่นกัน โดยเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรม 30 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3 วัน และที่พีเอช 3.0 เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมจนหมดภายในเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (Cesar and Mrsa, 1996)

### 2.3.4 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Acidobacterium capsulatum* อยู่ระหว่าง 20-80 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสอยู่ที่ 65 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เอนไซม์ไซลาเนสเสถียรคือ 20-50 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียสขึ้นไป กิจกรรมจะลดลง เมื่อถึง 70 องศาเซลเซียสเอนไซม์ไซลาเนสจะถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ (Inagaki *et al.*, 1998)

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ของ *Bacillus licheniformis* A99 โดยการทดลองเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 37 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ รองลงมาคือที่ 45 องศาเซลเซียส สำหรับที่ 26 องศาเซลเซียส พบว่าจะผลิตเอนไซม์ได้น้อยที่สุด (Archana and Satyanarayanas, 1997)

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces viridosporus* T7Aคือ 65-70 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษาของ Marui และคณะ (1985) ได้ผลใกล้เคียงกันคืออยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จะเสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส (Magnuson and Crawford, 1997) เชื้อ *Cellulomonas* และ *Micrococcus* sp. จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนกิจกรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่เกิดจากการผลิตของ *Micrococcus* DS15 และ GS2 คือ 30-45องศาเซลเซียส (Saxena *et al.*, 1986)

เชื้อ *Cyathus stercoreus* จะเจริญที่อุณหภูมิตั้งแต่ 45 องศาเซลเซียสลงมา และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสคือที่ 30 องศาเซลเซียส หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 9 ถึง 12 วัน เอนไซม์ไซลาเนสที่เสถียรที่ 25-45 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกทำลาย 60 เปอร์เซ็นต์ และจะถูกทำลายหมดที่ 70 องศาเซลเซียส ในเวลา 10 นาที ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมเอนไซม์คือที่ 45-50 องศาเซลเซียส (Saxena, 1994)

กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากเชื้อ *Thermomonospora fusca* BD25 จะสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเป็น 70 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจะเสถียรดีที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส โดยจะมีครึ่งชีวิต (half-life) เท่ากับ 70 และ 40 นาทีตามลำดับ โดยเอนไซม์ไซลาเนสและเอนโดกลูคาเนสจะสามารถมีความเสถียรได้ที่ 80 องศาเซลเซียสได้นานมากถึง 30 นาที ส่วนเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสเสถียรที่ 65 องศาเซลเซียสนานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Trigo and Ball, 1994)

*Thermomyces lanuginosus* DSM5826 ผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แต่ถ้าเติมกลีเซลรอล (glycerol) β-

mercaptoethanol หรือ polyethylene glycol จะสามารถเก็บได้ถึง 96 ชั่วโมงที่ 60 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกทำลายมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 40 นาที (Cesar and Mrsa, 1996)

**2.3.5 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส**

เมื่อเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีท (actinomyces) คือ *Thermomonospora fusca* BD25 เพื่อผลิตเอนไซม์ 3 ชนิดคือ เอนโดไซลาเนส เอนโดกลูโคเนส และ เพอร์ออกซิเดส พบว่าจะมีการผลิตเอนไซม์ในระยะแรกของการเจริญ และมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจนถึงปลายระยะ expopential phase ประมาณ 48-96 ชั่วโมง (Trigo and Ball, 1994)

Gattinger และคณะ (1990) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้ canola meal เป็นวัตถุดิบใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 9-12 วัน เลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบที่ใช้คือ 200 รอบต่อนาที พบว่าในช่วงวันที่ 9-12 จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด

**2.3.6 ผลของสารยับยั้งและสารเหนี่ยวนำที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส**

Xu และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ไซลาเนสที่ถูกชักนำโดยแอล-ซอร์โบส ในเชื้อรา *Trichoderma ressei* PC-3-5 โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที พบว่าแอล-ซอร์โบสจะมีผลต่อการชักนำไซลาเนส I (xyn I) และไซลาเนส II (Xyn II) ใน *Trichoderma reesei* โดยพบว่าถ้ามีน้ำตาลชนิดนี้อยู่จะทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโซโฟโรส (Sophorose) พบว่าแอล-ซอร์โบสจะชักนำการผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าโซโฟโรส และจากการศึกษาผลของแอล-ซอร์โบสต่อเอนไซม์ชนิดอื่น โดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase activity) กับกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนส (Endogluconase activity) พบว่าแอล-ซอร์โบสความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วง 10 ชั่วโมงแรก กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจะสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนส แต่หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนสจะสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส และเมื่อใช้แอล-ซอร์โบสความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูโคเนสจะสูงกว่ากิจกรรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

การเติมสารพวกกลูโคส มอลต์สกัด เปปโทน น้ำแช่ข้าวโพด และ mustard oil cake อย่างละ 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในรำข้าวสาลีที่ใช้เป็นสับสเตรต สำหรับการผลิตเอนไซม์

ไซลาแนสจาก *Bacillus licheniformis* A99 พบว่ามอลต์สกัด mustard oil cake และเปปโทนจะยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไซลาแนส

### 2.3.7 ผลของทวีน 80 ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาแนส

ทวีน 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาแนสจาก *Cyathus stercoreus* โดยทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างทวีน 80 น้ำมันมะกอก และกลีเซอรอล โดยใช้อย่างละ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าการผลิตเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเป็น 1000ถึง 1350 ยูนิตต่อลิตร ซึ่งทวีน 80 มีผลต่อการผลิตมากที่สุด โดยผลิตได้ถึง 1350 ยูนิตต่อลิตร (Saxena, 1994)

## 2.4 การใช้วัสดุชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาแนส

### 2.4.1 การแปรสภาพ (Pretreatment) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ในการปรับปรุงคุณค่าทางอาหารของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีหลายวิธีที่จะนำมาปรับปรุงเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร ปริมาณการกินของสัตว์เคี้ยวเอื้องสามารถย่อยได้แบ่งออกเป็นวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพซึ่งแสดงในตารางที่ 2.2 (Ibrahim, 1981)

**ตารางที่ 2.2** การแปรสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมโดยกรรมวิธีต่าง ๆ

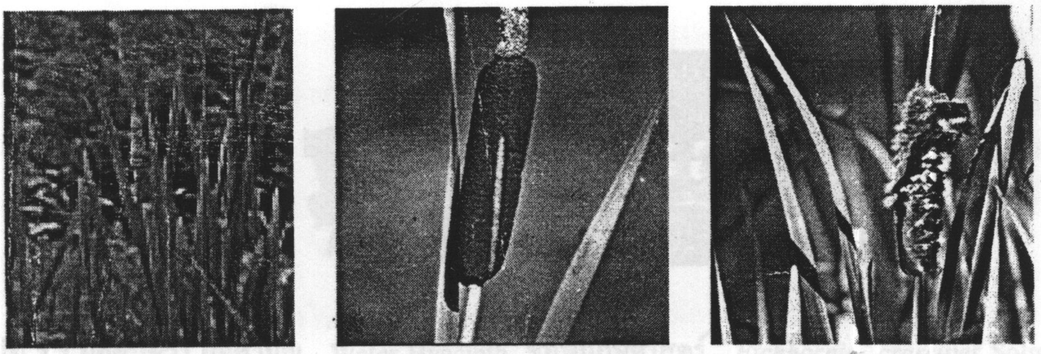
| วิธีทางกายภาพ | วิธีทางเคมี | วิธีทางชีวภาพ |
|---|---|---|
| การแช่น้ำ | โซเดียมไฮดรอกไซด์ | การใช้เอนไซม์ |
| การสับ การบด | แคลเซียมไฮดรอกไซด์ | การหมักด้วยเชื้อรา |
| การอัดเม็ด | โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ | (white-rot fungi) |
| การนึ่ง การต้ม | แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ | |
| การใช้รังสีแกมมา | ยูเรีย/แอมโมเนีย | |
| | โซเดียมคาร์บอเนต | |
| | แก๊สคลอรีน | |
| | ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ | |

วิธีการแปรสภาพต่าง ๆ ได้แก่ การบด เป็นการทำให้อนุภาคของลิกโนเซลลูโลสมีขนาดเล็กลง เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวและลดปริมาณเซลลูโลสรูปผลึก (Jones *et al.*, 1980) วิธีทางเคมีโดยใช้ด่างหรือ

ตัวทำละลายสกัดหรือแยกเฮมิเซลลูโลส หรือการใช้ไอน้ำ อุณหภูมิ 120-180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถึง 2 ชั่วโมง ซึ่งการแปรสภาพด้วยวิธีการให้ความร้อนนี้จะทำให้ไซแลนและไซโลสออกจากวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสละลายในน้ำเพิ่มขึ้น 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ภายใต้ไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและใช้เวลานานจะทำให้ไซโลสเปลี่ยนเป็น Furfural ส่วนไซแลนจะสามารถนำไปใช้เป็นสับสเตรททางเคมี ชีวเคมี หรือกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากกระบวนการหมัก เช่น การใช้กระบวนการที่ใช้ความร้อนสภาวะที่มีน้ำ (Hydrothermolysis) จะได้ของเหลวเรียกว่า ไฮโดรไลเสท (Hydrolysate) ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส รวมทั้งส่วนของลิกนินที่ละลายได้เช่น Conifer alcohol,Syringa aldehyde,4-hydroxybenzoic acid,Vanillin และ Furfural เป็นต้น ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมากน้อยแค่ไหนขึ้นกับชนิดของพวกลิกโนเซลลูโลส ส่วนของแข็งที่เหลือจะมีเพียงเซลลูโลสและลิกนินซึ่งสามารถย่อยด้วยเอนไซม์ (Viikari, 1994)

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีวัสดุเศษเหลือทิ้งทางเกษตรหลายชนิด เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย เป็นต้น วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรเหล่านี้เป็นสารพวกลิกโนเซลลูโลสที่ประกอบด้วย เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนิน เฮมิเซลลูโลสเป็นสารที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ได้ง่ายกว่าเซลลูโลสและลิกนินและมีจำนวนเป็น 20-30 % ของน้ำหนักแห้งของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เฮมิเซลลูโลสจะมีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งเชื้อราแบคทีเรีย และแอคติโนมัยสีทสามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสเพื่อย่อยสลายไซแลนให้กลายเป็นน้ำตาลไซโลสและโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่าง ๆ ได้ (อารี ฤทธิบูรณ์, 2541)

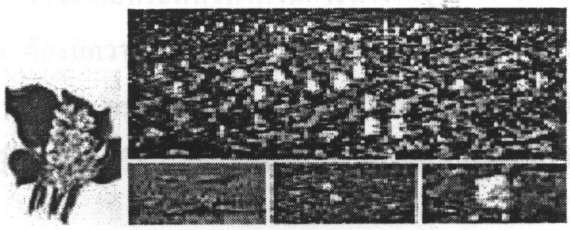
รูปฤาษีมีลักษณะทั่วไปคือ เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุหลายปี เจริญแพร่กระจายเกือบทั่วโลก ชอบขึ้นตามหนองน้ำตื้น ๆ ตามริมบ่อ สระ หรือแหล่งน้ำทั่วไป ลำต้นเป็นเหง้าแข็งอยู่ใต้ดิน ส่วนที่อยู่เหนือดินเป็นกลุ่มใบที่แตกแบบสลับกัน เป็นสองแถว (2-ranked, distichous) ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยวรูปเรียวยาว สีเขียวเข้ม โคนใบแผ่เป็นกาบอวบหนาหุ้มประกอบกัน ใบแก่อยู่ด้านนอกหุ้มใบอ่อนไว้ ดอกเป็นช่อดอกแบบดอกย่อยเรียงชิดกันแน่นบนก้านช่อดอก เมื่อดอกแก่จะมีสีน้ำตาลเข้มมองดูเหมือนธูปขนาดใหญ่ ผลขนาดเล็กเปลือกแข็ง (nutlet) เมล็ดมีเพียง 1 เมล็ดในแต่ละผล และแพร่กระจายได้ไกลเพราะมีขนติดอยู่จำนวนมาก ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (สุชาดา ศรีเพ็ญ, 2542)



**รูปที่ 2.1** ธูปฤาษี

พืชในวงศ์นี้มีเพียง 1 สกุล จำนวน 15 ชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Typha angustifiolia* L. ชื่อพ้อง *T. elephantima* Roxb. ชื่ออื่น narrow-leaved cattail กกช้าง หญ้าสลาบหลวง

ผักตบชวามีลักษณะทั่วไปคือ เป็นวัชพืชน้ำประเภทใบเลี้ยงเดี่ยว ลอยน้ำได้ งอกงามได้ดีโดยไม่ต้องมีที่ยึดเกาะ ดอกสีม่วงแกมเหลืองไม่มีก้านช่อ ดังแสดงรูปที่ 2.2 สามารถแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็วมาก จนสร้างความเสียหายให้กับระบบชลประทาน การประมง และการเกษตร เป็นอย่างมาก ปัจจุบันมีผู้นำผักตบชวามาทำประโยชน์ เช่น ใช้เป็นอาหารสัตว์ นำมาถักเป็นเครื่องเรือน ใช้เป็นวัสดุในการเพาะเห็ดฟาง ผลิตก๊าซชีวภาพ ใช้ทำปุ๋ยหมัก และใช้แก้ปัญหาน้ำเสีย โดยผักตบชวาสามารถอยู่ได้ทุกสภาพน้ำ ทั้งในน้ำสกปรกและน้ำสะอาด เจริญเติบโตได้ดีที่พีเอช 4-10 และอุณหภูมิของน้ำไม่สูงกว่า 34 องศาเซลเซียส และในต้นพืชจะมีน้ำเฉลี่ยประมาณร้อยละ 95 (ในใบร้อยละ 89 และในก้านใบร้อยละ 96.7) ผักตบชวาช่วยในการบำบัดน้ำเสีย โดยอาศัยคุณสมบัติเป็นตัวกรอง ผักตบชวาที่ขึ้นอยู่อย่างหนาแน่น เปรียบได้กับการบรรจุวัสดุพรุน ซึ่งกรองน้ำที่ไหลผ่านกอผักตบชวาอย่างช้าๆ จึงทำให้ของแข็งแขวนลอยต่างๆ ที่ปนอยู่ในน้ำถูกสกัดกั้น นอกจากนั้น ระบบรากที่มีจำนวนมากยังช่วยกรองสารอินทรีย์ที่ละเอียด และจุลินทรีย์ที่อาศัยเกาะอยู่ที่รากจะช่วยดูดสารอินทรีย์ไว้ด้วยอีกทางหนึ่ง รากผักตบชวาจะดูดสารอาหารที่อยู่ในน้ำ ลำเลียงไปยังใบเพื่อสังเคราะห์แสง ในโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำเสียจึงถูกกำจัดไป แต่การใช้ผักตบชวาบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณในโตรเจนและฟอสฟอรัสสูง จะส่งผลให้ผักตบชวาเจริญเร็วขึ้นและปกคลุมพื้นที่ผิวน้ำมากขึ้น จึงควรมีเก็บต้นที่เจริญเต็มที่ขึ้นจากน้ำอย่างสม่ำเสมอ ไม่เช่นนั้น เมื่อผักตบชวาตาย จะเน่าอยู่ในน้ำ ทำให้น้ำเสียนั้นมีในโตรเจนและฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นอีก นอกจากนี้รากของผักตบชวามีแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ออกซิเจน คือ *Azospirillum* spp. ที่มีคุณสมบัติพิเศษคือ สามารถตรึงในโตรเจนได้ประมาณ 2.5 กิโลกรัมต่อเอเคอร์ต่อวัน (วิชิต สุวรรณปรีชา, 2546)



**รูปที่ 2.2** ผักตบชวา ชื่อสามัญ Water Hyacinth ชื่อพฤกษศาสตร์ *Eichhornia crassipes* Solms.ชื่อวงศ์ Pontederiaceaeชื่ออื่น ๆ ผักปอด ผักโป่ง สวะ ผักบัวลอย

## 2.5 ประโยชน์ของเอนไซม์ไซลาเนส

เฮมิเซลลูโลสเป็น non cellulosic polysaccharide เช่นไซแลนและแมนเนส ในธรรมชาติจุลินทรีย์จะย่อยไซแลนเป็นไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์และเป็นไซโลสในที่สุด ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง ไซแลนในเนื้อไม้จะถูกย่อยเป็นไซโลส โดยปฏิกิริยาเคมีรีดักชันในสภาวะด่าง วัตถุดิบอื่น เช่น เปลือกข้าวโพด ข้าวสาลีและเมล็ดฝ้าย ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกสามารถนำมาใช้ได้แต่ปัญหาคือต้องการสารเร่งปฏิกิริยาเคมี และจะเกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่มาจากการไฮโดรไลซิส เฮมิเซลลูโลสเกิดขึ้นมีเอนไซม์เกิดขึ้น 2 ชนิดเพื่อใช้ตอบสนองกับกระบวนการไฮโดรไลซิสคือ เอนโดเบต้าไซลาเนส (E.C.3.2.1.8) และเบต้า-ดี-ไซโลซิเดส (E.C.3.2.1.37) เอนโดไซลาเนสเปลี่ยนไซแลนเป็นไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์และไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นดีไซโลสด้วยเบต้าดีไซโลซิเดส (Cheng *et al.*, 2004)

เอนไซม์จากจุลินทรีย์เป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งในกระบวนการผลิต อาทิเช่น ในการผลิตขนมปัง เบียร์ หรือเนยแข็ง เป็นต้น ข้อดีของการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตอาหารเหนือกว่าการใช้วิธีการทางฟิสิกส์หรือเคมีอื่น ๆ อยู่หลายประการ ประการแรกเอนไซม์จะเร่งเฉพาะปฏิกิริยา หรือมีความจำเพาะต่อสับสเตรท จึงทำให้สามารถหลีกเลี่ยงปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการได้ ประการที่สอง กระบวนการที่ใช้เอนไซม์ไม่ต้องการ พีเอช หรืออุณหภูมิสูงหรือต่ำมากเกินไป ดังในกรณีของกระบวนการทางเคมีหรือฟิสิกส์อื่น ๆ นอกจากนี้ยังสิ้นเปลืองพลังงานน้อยอีกด้วย ประการที่สาม ไม่มีความจำเป็นที่จะแยกเอาเอนไซม์ออก หลังจากกระบวนการผลิต เนื่องจากเอนไซม์มีปริมาณน้อย และหลังจากกระบวนการต่าง ๆ แล้ว เอนไซม์ก็จะเสียสภาพไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีกต่อไป เอนไซม์ที่จะนำมาใช้ทางการค้าให้ได้ประโยชน์อย่างเต็มที่จะต้องมีคุณสมบัติคือ ต้นทุนในการใช้เอนไซม์จะต้องต่ำ เมื่อเทียบกับคุณค่าทางอาหารที่จะได้มาเนื่องจากการใช้เอนไซม์นั้น ๆ การที่จะปรับ

ให้อาหารอยู่ในสภาวะที่เอนไซม์ชนิดหนึ่งทำงานได้ดีมากที่สุดนั้นเป็นการยาก ฉะนั้นสิ่งที่ต้องคำนึงอีกข้อหนึ่งคือ จะต้องเลือกเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการทำงานสูง สำหรับอาหารชนิดนั้น ๆ นอกจากนี้เอนไซม์ที่นำมาใช้จะต้องมีความปลอดภัย ปราศจากสิ่งเป็นพิษ ประการสุดท้ายเอนไซม์จะต้องมีความบริสุทธิ์ มีความอยู่ตัว ตรวจสอบได้ และสามารถควบคุม activity ได้ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จะมีอยู่แล้วในเอนไซม์จากจุลินทรีย์มากกว่าเอนไซม์ที่ได้มาจากพืชหรือสัตว์ (เกรียงศักดิ์ ไชยโรจน์, 2526)

ในปัจจุบันมีการนำไซลาเนสมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเยื่อกระดาษในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ อุตสาหกรรมอาหาร และอาหารสัตว์ ประโยชน์ไซลาเนสช่วยในการฟอกสีเยื่อกระดาษคราฟต์ ลดปริมาณคลอรีนที่ใช้ฟอกสี โดยจะไปช่วยลดปริมาณสาร adsorbable organic halogen ซึ่งเป็นสารพิษที่ย่อยได้ยากมากในธรรมชาติ เป็นสารที่เกิดจากปฏิกริยาระหว่างลิกนินและสารคลอรีน (Sunna and Antranikian , 1997) ในอุตสาหกรรมอาหารเช่นคุ๊กกี้ เค้ก ไซลาเนสจะช่วยเร่ง dough ซึ่งมีรายงานว่าไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่ได้จากการย่อยไซแลนถูกนำไปใช้เป็นสารทดแทนไขมัน (Godfrey and West, 1992) และนำไปผสมในยาเม็ดเพื่อยืดระยะเวลาการออกฤทธิ์ของตัวยา (Wong and Saddler, 1992) นอกจากนี้ไซลาเนสยังมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ช่วยทำให้สัตว์ปีกและสุกรนำเศษพืชต่าง ๆ มาใช้เพราะไซลาเนสช่วยลดความหนืดของสารพวกเฮมิเซลลูโลสในอาหาร ระบบย่อยอาหารและระบบการดูดซึมอาหารของสัตว์จะดีขึ้น ทำให้ได้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น (Gerand *et al.*, 1993)

## 2.6 การทำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อราให้บริสุทธิ์

ในปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ โดยใช้กระบวนการทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้แก่ การใช้ด่างเพื่อสกัดแยกเฮมิเซลลูโลสออกจากวัตถุดิบเพื่อให้เชื้อราใช้เจริญและผลิตไซลาเนสได้ดี ในการผลิตเยื่อกระดาษมีการใช้เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราคือไซลาเนสที่ไม่มีเซลลูเลสแทนคลอรีนในการฟอกสีกระดาษ และหลังฟอกสีเส้นใยกระดาษยังคงความแข็งแรง เชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* เป็นเชื้อราที่ทนต่ออุณหภูมิสูง (thermophilic fungus) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงแล้วจะผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (crude enzyme) ที่มีความบริสุทธิ์ได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และสามารถแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะสูญเสียโปรตีนไปบางส่วนและจะสูญเสียไซลาเนสไป 22 เปอร์เซ็นต์ระหว่างตกตะกอน หลังจากตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตสามารถตรวจสอบปริมาณโปรตีนโดยวิธี lowry method และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ Hundson และคณะ (1992) พบว่าจุลินทรีย์

ประเภทเชื้อราที่ทนอุณหภูมิสูงหลายชนิดสามารถผลิตไซลาเนสได้ ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้เป็นเอนไซม์ที่ส่งผ่านออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) และมีการผลิตโปรตีนเกิดขึ้น เอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จะนำมาทำการฟอกสีและปรับปรุงคุณภาพเยื่อกระดาษ ซึ่งได้รับความสนใจเพราะประสิทธิภาพดีกว่าการผลิตเยื่อกระดาษจากน้ำทิ้งด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (bio-converted) ด้วยการไฮโดรไลซิส Bisson และคณะ (1997) พบว่า เชื้อรา *T. lanuginosus*-SSBP ที่ขึ้นทั่วไปตามธรรมชาติมีความแตกต่างของปริมาณไซลาเนส โดยเชื้อ *T. lanuginosus*-SSBP เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ทนความร้อนและมีกิจกรรมเอนไซม์หลังการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางเคมีชีวภาพของไซลาเนสได้มากถึง 6000 นาโนกิโลคาลตันต่อมิลลิลิตร (nkat/ml) ไซลาเนสจากเชื้อราที่ใช้ได้ดีในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ โดยไซลาเนสทำให้ความสว่างเยื่อกระดาษเพิ่มขึ้น 5 เปอร์เซ็นต์ (Johnson *et al.*, 1999) มีรายงานการแยกเอนไซม์ไซลาเนส 2 ชนิดให้บริสุทธิ์จากเชื้อรา *Cephalosporim sp.* สายพันธุ์ RYM-202 ได้แก่ CX-I และ CX-II โดยนำเชื้อรามาเลี้ยงในอาหารรำข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ 5 ลิตรในถังหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 10.0 และเติม 0.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคาร์บอเนต หลังจากนั้นนำของของเหลวที่กรองออกมา (fitrate) มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 30 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และทำให้เข้มข้นโดยอัลตราฟิวเตรชัน เมื่อได้สารละลาย CX-I และ CX-II จะนำมาแยกต่อด้วย sodium dedecyl sulfate polyacrylamide gel elctrophoresis (SDS-PAGE) หลังจากนั้นนำไปแสดงแถบโปรตีนเซลล์เดียวของไซลาเนสเพื่อตรวจสอบมวลโมเลกุลของ CX-I และ CX-II ค่าโปรตีนที่ได้จากการตรวจสอบโดย SDS-PAGE มีค่าประมาณ 35 และ 24 กิโลดาลตันตามลำดับ ต่อจากนั้นนำมาแยกสารอื่นออกโดยคอลัมน์โครโม-โตรกราฟฟี โดยให้สารละลาย CX-I และ CX-II ผ่านสาร superose 12 HR 10/30 colum ออกมา (Kang and Rhee, 1996) โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนการแยกเอนไซม์

ของเหลวส่วนบนที่ได้จากเซนตริฟิวส์

(Culture supernatant)

↓

ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

($(NH_4)_2SO_4$ fraction)

↓

แยกเอนไซม์โดยใช้ DEAE-Sephadex A-50 เป็นตัวกลาง

↓

แยกเอนไซม์ต่อโดยใช้เจล Sephacryl S-200 HR เป็นตัวกลาง

↓

ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

โดยใช้คอลัมน์ชนิด Superose 12HR 10/30

การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ยังมีวิธีอื่น เช่น การแยกไซแลนที่จับกับไซลาเนสออก โดยทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการเซนตริฟิวส์และทำการไฮโดรไลซิส แล้วนำมาทำให้แห้งโดยการระเหิด (freeze-dried) ซึ่งไซลาเนสที่ได้มาจากเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus firmus* K-1 ที่เกิดจากย่อยเซลล์พืชคือไซแลนเป็นสารประกอบหลักของผนังเซลล์พืชพวกเฮมิเซลลูโลส โดยเชื้อจุลินทรีย์จะย่อยไซแลนที่จับกันด้วยพันธะ 1,4 ของไซโลส และมีการแทนที่ด้วยอะราบิโนสและอะซิเตต ปล่อยสารลิกนินและเซลลูเลสที่อยู่ในเซลล์พืชออกมา

# บทที่ 3
# อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

## 3.1 อุปกรณ์

1. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215
2. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน (autoclave) ของบริษัท HIRAYAMA รุ่น HA-300 MIV
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของบริษัท HACA รุ่น DR/4000V
4. เครื่องอังน้ำ (water bath) ของบริษัท Clifton รุ่น unstirred bath
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ของบริษัท Clifton รุ่น unstirred bath
6. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่น LIBROK EB-4000 H
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S
8. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT123
9. ตู้ดูดควัน ของบริษัท ASTEC รุ่น Astecair 5000 E
10. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert รุ่น BE600
11. เครื่องเขย่า (shaker) ของบริษัท GALLENKAMP
12. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ของบริษัท WTB binder รุ่น ED 53
13. เครื่องผสมสาร (vortex) ของบริษัท IKA รุ่น MS 1 Minishaker
14. แท่งกวน (Hot plate stirrer) ของบริษัท BARNSTAD/THERMOLYNE รุ่น SP46920-26
15. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ของบริษัท GIBTHAI
16. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ของบริษัท Olypus รุ่น CHS3
17. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (heamacytometer) ของบริษัท Bocco (Improved Neubauer)
18. เครื่องอัลตราฟิวเตรชัน ของบริษัท Millipore รุ่น XFUF 047710
19. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
20. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
21. ตู้เย็น ของบริษัท SANYO
22. เครื่องบดอาหาร ของบริษัท Moulinex
23. ถุงไดอะไลซิส ของบริษัท Spectra/Por
24. คิวเวต
25. เดซิกเคเตอร์

26. ปั๊มดูดอากาศ (Suction)

27. เครื่องแก้ว

## 3.2 สารเคมี

### 3.2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. โพเตโตเด็กซ์โตรสอาการ์ (PDA) ของบริษัท Scharlau
2. น้ำตาลไซโลส (xylose) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
3. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2SO_4{\cdot}5H_2O$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
4. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$)ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
5. แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_2HPO_4$)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. แคลเซียมคลอไรด์ไฮเดรต ($CaCl_2{\cdot}2H_2O$)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. โปรติโอสเปปโทน (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. โอต สเปล ไซแลน (oat spelt xylan) ของบริษัท Sigma
25. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Scharlau

26. Congo Red ของบริษัท Merck

### 3.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

1. กรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (dinitrosalicylic acid) ของบริษัท Sigma
2. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrarte) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
4. oat spelt xylan ของบริษัท Sigma
5. คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสโซเดียม (carboxymethylcellulose sodium) ของบริษัท Sigma
6. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Fluka
7. ไซโลส ( xylose) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
8. กรดซิตริก (citric acid) ของบริษัท AnalaR®
9. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตระไฮเดรต ($Na_2HPO_4$•$7H_2O$ initrosalicylic acid) ของบริษัท Merck
10. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($NaH_2PO_4$•$2H_2O$) 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 (glucosamine hydrochloride)ของบริษัท Sigma
3. ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (glucosamine benzaldehyde)ของบริษัท Fluka
4. โซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
5. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท J.T. Baker
6. เอทานอล (ethanol) ขององค์การสุรา กรมสรรพสามิต จังหวัดฉะเชิงเทรา

### 3.2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

1. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ของบริษัท Scharlau
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
3. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต (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

นำเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (ดังภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ถึง 7 วัน เพื่อให้สปอร์เจริญเต็มที่ จากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจะทำการเตรียมเชื้อราโดยการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารวุ้นเอียง Potato Dextrose Agar ลงในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนับจำนวนสปอร์ที่ใช้ให้มีความเข้มข้น $10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยฮีโมไซโตมิเตอร์ (ดังภาคผนวก ข)

## 3.4 การเตรียมสับสเตรท

### 3.4.1 การอบแห้ง

นำฟางข้าว( พันธุ์ กข 60 จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) ธูปฤาษี (จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) และผักตบชวา (จากจังหวัดสมุทรปราการ) ส่วนที่เป็นลำต้นและใบ มาล้างน้ำให้สะอาด หั่นให้ละเอียด จากนั้นนำฟางข้าว ธูปฤาษีและผักตบชวาที่หั่นแล้ว รวมทั้งรำข้าว (พันธุ์ กข 90 จากจังหวัดสุพรรณบุรี) มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำฟางข้าว ธูปฤาษี ผักตบชวา และรำข้าวที่อบแห้ง แล้วมาบดด้วยเครื่องบดอาหารจนละเอียด แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาด 0.2 มิลลิเมตร หรือช่วงขนาด 40 ถึง 60 เมช (mesh) และเก็บในขวดป้องกันความชื้น

### 3.4.2 การทำพรีทรีทเมนต์ ผักตบชวา รำข้าว และฟางข้าว ด้วยการต้ม

นำผักตบชวาที่หั่นแล้ว รำข้าว และฟางข้าว 240 กรัม เติมน้ำประปา 1500 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำผักตบชวารำข้าว และฟางข้าวที่อบแล้วมาปั่นให้ละเอียด ร่อนด้วยตะแกรงให้มีขนาด 40 ถึง 60 เมช (mesh) และเก็บในขวดป้องกันความชื้น

### 3.4.3 การทำพรีทรีทเมนต์ ผักตบชวา รำข้าว และฟางข้าวด้วยสภาวะการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์

นำผักตบชวาที่หั่นแล้ว รำข้าว และฟางข้าวชั่งน้ำหนัก 40 กรัม เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 250 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาล้างด้วยน้ำประปาจนสะอาดแล้ววัดพีเอชให้ได้ค่าที่ได้เป็นกลาง จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำมาปั่นให้ละเอียด ร่อนด้วยตะแกรงให้มีขนาด 40 ถึง 60 เมช (mesh) และเก็บในขวดป้องกันความชื้น

### 3.4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำพรีทรีทเมนต์ รำข้าว และฟางข้าวด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1 และ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วชั่งรำข้าวและฟางข้าว 40 กรัม เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตรจำนวน 250 มิลลิลิตร โดยแปรผันระยะเวลาที่ใช้คือ 0.5, 1 และ 1.5 ชั่วโมง จากนั้นทำการแปรผันความเข้มข้นที่ใช้คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 1.5 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยเปรียบเทียบระยะเวลาการแช่รำข้าวและฟางข้าวเหมือนกับการแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร

## 3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

### 3.5.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

ชั่งไซแลน ฟางข้าว รำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวา ที่เตรียมไว้ดังข้อ 3.4 น้ำหนัก 2 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติม feed solution (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3 ลงในฟลาสก์โดยใช้ปริมาณเชื้อ

ร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วัน เพื่อวิเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนส เซลลูเลส และวัดการเจริญของเชื้อรา

**3.5.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส**

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (ดังสูตร feed solution ภาคผนวก ก) จากนั้นนำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมเชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน และนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลส

## 3.6 การสกัดเอนไซม์ไซลาเนส

นำตัวอย่างมาสกัดเอนไซม์ไซลาเนสโดยเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.8 ที่แช่เย็น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และทวีน 80 (1 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 1 หยดลงในฟลาสก์ที่ทำการหมัก จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสตามวิธีของ Bailey *et al.* (1992) (ภาคผนวก ข) และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mandels และ Weber (1969) (ภาคผนวก ข)

## 3.7 การวิเคราะห์

**3.7.1 การวัดการเจริญของเชื้อรา**

**3.7.1.1 การสกัดกลูโคซามีนจากตัวอย่าง**

นำตัวอย่างที่เก็บได้ในแต่ละวันมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียด ชั่งแต่ละตัวอย่าง 0.25 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วดูดส่วนใส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ที่มีน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ก่อนนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

#### 3.7.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Morgan-Elson

นำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายอะซิติลอะซิโตน ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาต้มเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลาย Ehrlich reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (Loo,1976)

## 3.8 การทำให้เอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification)

นำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวต่าง ๆ ซึ่งในการตกตะกอนแต่ละขั้นของเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัว ใช้ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่คำนวณได้จากตารางปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งกวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่มีความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้มาทำการตกตะกอนซ้ำ ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวเพิ่มขึ้น นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.8 ในปริมาณที่น้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด จากนั้นนำมาแยกเกลือออกโดยทำไดอะไลซิสเป็นเวลานานข้ามคืนในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก จากนั้นวัดปริมาตร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry นำเอนไซม์ที่ได้มา ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องอัลตราฟิวเตรชัน ที่มี molecular weight cut off ขนาด10,000 ดาลตัน เพื่อลดปริมาตรลดครึ่งหนึ่ง แล้วนำมาวัดปริมาตร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry (1951)

## 3.9 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

### 3.9.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส

นำเอนไซม์ที่ได้จาก 3.8 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส จากนั้นนำเอนไซม์ที่เจือจาง ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายสับสเตรท oat spelt xylan ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มให้อยู่ในช่วง

อุณหภูมิ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายไดไนโตรซาลิกไซลิก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (โดยวิธี Nelson ภาคผนวก ข )

**3.9.2 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส**

นำเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากข้อ 3.8 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นนำเอนไซม์ที่เจือจาง ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายสับสเตรท oat spelt xylan ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ซึ่งมีพีเอชต่าง ๆ โดยแปรผันพีเอชที่ใช้ในการบ่มให้อยู่ในช่วงพีเอช 2.6 ถึง 9.0 โดยใช้บัฟเฟอร์ที่แตกต่างกันดังนี้ พีเอช 2.6 ถึง 6.0 ใช้ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.0 ถึง 8.0 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 8.0 ถึง 9.0 ใช้ทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และพีเอช 10 ถึง 12 ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 และบ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการวิเคราะห์ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 1 เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายไดไนโตรซาลิกไซลิกปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (โดยวิธี Nelson ภาคผนวก ข )

**3.9.3 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิ**

บ่มเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.8 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน ซึ่งได้จากข้อ 3.9.2 ที่อุณหภูมิในช่วง 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่เหลืออยู่ โดยมีชุดควบคุมเป็นเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่ม ซึ่งใช้สภาวะในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.9.2

**3.9.4 ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่อพีเอช**

บ่มเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.8 ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ระบุในข้อ 3.9.2 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำมาปรับพีเอชให้เหมาะสมต่อการทำงาน ซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 3.9.2 แล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่เหลืออยู่ โดยมีชุดควบคุมเป็นเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่ม ซึ่งใช้สภาวะในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.9.2

**3.9.5 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท ($K_m$) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด $v_{max}$ ของเอนไซม์ไซลาเนส**

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.8 มาเจือจางให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสอยู่ระหว่าง 10 ถึง 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แล้วปิเปตต์มาปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับ oat spelt xylan ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1,2,3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 22.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที และนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่มีต่อไซแลน

**3.9.6 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท ($K_m$) และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด $v_{max}$ ของเอนไซม์เซลลูเลส**

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.8 มาเจือจางให้มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ระหว่าง 10 ถึง 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แล้วปิเปตต์มาปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมกับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.1, 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที และนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

## 3.10 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

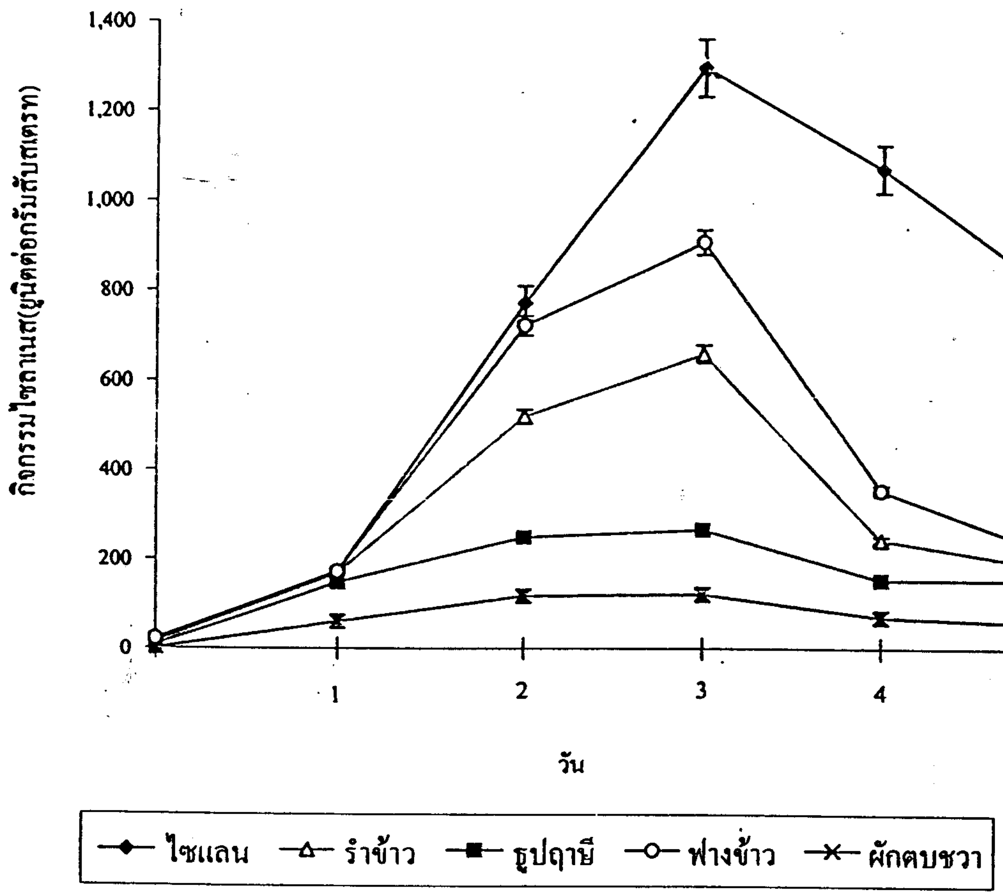
วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและวิจารณ์

## 4.1 ผลการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (feed solution ภาคผนวก ก) ซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับร้อยละ 70 และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ ฟางข้าว รำข้าว ธูปฤาษี ผักตบชวา และมีไซแลนเป็นตัวเปรียบเทียบ ผลการทดลองพบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อรา 3 วัน พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมสูงสุดเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือการใช้รำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวาเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมเฉลี่ยสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 908, 659, 266 และ 128 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 บนไซแลนพบว่ามีค่ากิจกรรมไซลาเนสเฉลี่ยเท่ากับ 1,297 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท (รูปที่ 4.1)

จากผลการทดลองเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอน พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 โดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุดกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.1) ทั้งนี้อาจเนื่องจากฟางข้าวมีสารเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ย่อยง่ายมากที่สุด คือร้อยละ 24 ส่วนรำข้าวมีเฮมิเซลลูโลสอยู่ร้อยละ 11 (Barber *et al.*, 1974) เมื่อเทียบกับธูปฤาษี และผักตบชวาที่มีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 8.7 และ 1.8 ตามลำดับ (ดวงพร สุวรรณกุล. 2537 ; วรพงษ์ โอสถนาคสกุล. 2528)




รูปที่ 4.1 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR3159 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

หมายเหตุ การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

1 ยูนิตของเอนไซม์ไซลาเนส หมายถึงปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสที่สามารถย่อยสับสเตรทและให้ไซโลส 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะทดสอบ

**ตารางที่ 4.1** การเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | กิจกรรมไซลาเนสสูงสุด (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|
| ผักตบชวา | 3 | 128[e] |
| ธูปฤาษี | 3 | 266[d] |
| รำข้าว | 3 | 659[c] |
| ฟางข้าว | 3 | 908[b] |
| ไซแลน | 3 | 1297[a] |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสแตกต่างกัน

จากงานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 โดยใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตของเอนไซม์ไซลาเนสที่มีค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงกว่าเมื่อใช้ธูปฤาษีที่ไม่ผ่านการพรีทรีทเมนต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยรำละเอียดและธูปฤาษีได้ค่ากิจกรรมไซลาเนส 2,000.34 และ 846.17 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ส่วน Bakair (2001) รายงานว่าจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhizopus oryzae* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนจะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสให้ค่าสูงสุด ส่วน Park และคณะ (2004) รายงานว่าจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* โดยการใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนจะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสให้ค่าได้กิจรรม 5,484 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท จากผลของ Bakair (2001) และ Park และคณะ (2004) แสดงว่าซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงกว่าเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากซังข้าวโพดมีสารเฮมิเซลลูโลสสูงและปริมาณลิกนินน้อย

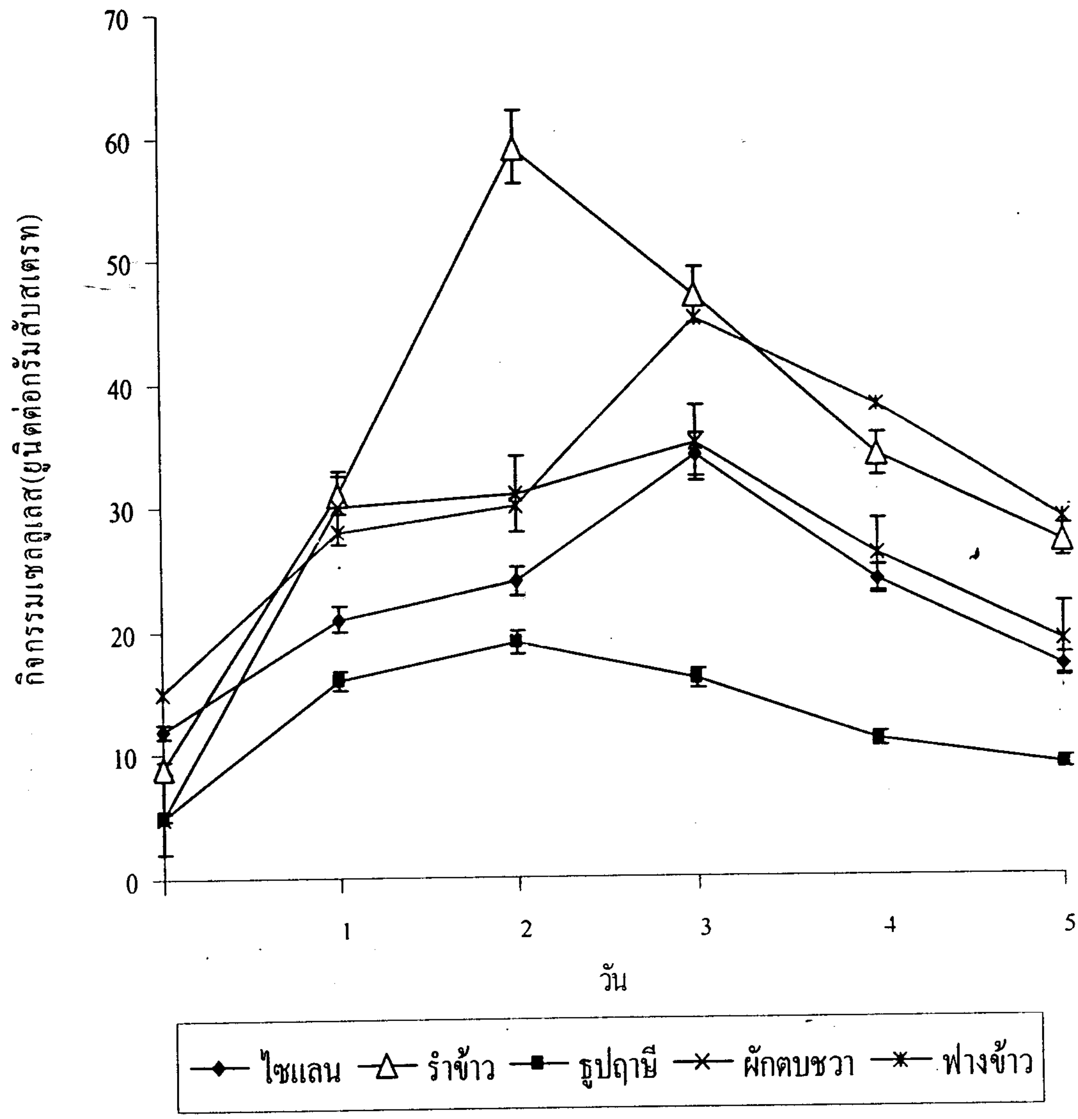
การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด รองลงมาคือการใช้ไซแลน ฟางข้าว ผักตบชวาและธูปฤาษี เป็นแหล่งคาร์บอน และให้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 59, 45, 34 และ 19 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.2 พบว่าเชื้อราผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 3 เมื่อใช้ฟางข้าว ผักตบชวาและไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้กิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ส่วนเมื่อใช้รำข้าว และธูปฤาษีเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 2 และเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอน พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 โดยใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ค่ากิจกรรมที่สูงสุดกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนฟางข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.2) และทั้งนี้อาจเนื่องจากรำข้าวมีสารเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบร้อยละ 34 และลิกนิน 28.2 (ปิยะมาศ สิริแสงสว่าง, 2546) เมื่อเทียบกับฟางข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวาที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ32, 6 และ 3.2 ตามลำดับ และมีลิกนินในฟางข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวาเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 13, 1.6 และ 1.3 ตามลำดับ (ดวงพร สุวรรณกุล,2537 . วรพงษ์ โอสถนาคสกุล, 2528)

จากงานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) พบว่ารำข้าวได้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงสุด 23.4 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนธูปฤาษีได้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงสุด 10.88 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้โดยค่ากิจกรรมเซลลูเลสจากรำข้าวสูงกว่าจากธูปฤาษี

เมื่อทำการเปรียบเทียบสัดส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสกับกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้สูงสุด จากเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 พบว่าสับสเตรทที่ให้สัดส่วนสูงสุดคือ ไซแลน โดยมีค่าอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสกับกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 37.79 ยูนิตไซลาเนสต่อยูนิตเซลลูเลสต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคือธูปฤาษี รำข้าว และผักตบชวาดังตารางที่ 4.3

ในขณะที่งานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ของธูปฤาษีคือ 110.45 ยูนิตไซลาเนสต่อยูนิตเซลลูเลสต่อกรัมสับสเตรท ส่วนรำละเอียดคือ 106.63 ยูนิตไซลาเนสต่อยูนิตเซลลูเลสต่อกรัมสับสเตรท




รูปที่ 4.2 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

<u>หมายเหตุ</u> การวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

1 ยูนิตของเอนไซม์เซลลูเลส หมายถึงปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่สามารถย่อยสับสเตรทและให้กลูโคส 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะทดสอบ

**ตารางที่ 4.2** การเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต) |
|---|---|---|
| ผักตบชวา | 3 | 35[c] |
| ธูปฤาษี | 2 | 19[d] |
| รำข้าว | 2 | 59[a] |
| ฟางข้าว | 3 | 45[b] |
| ไซแลน | 3 | 34[c] |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสไม่แตกต่างกัน

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสแตกต่างกัน

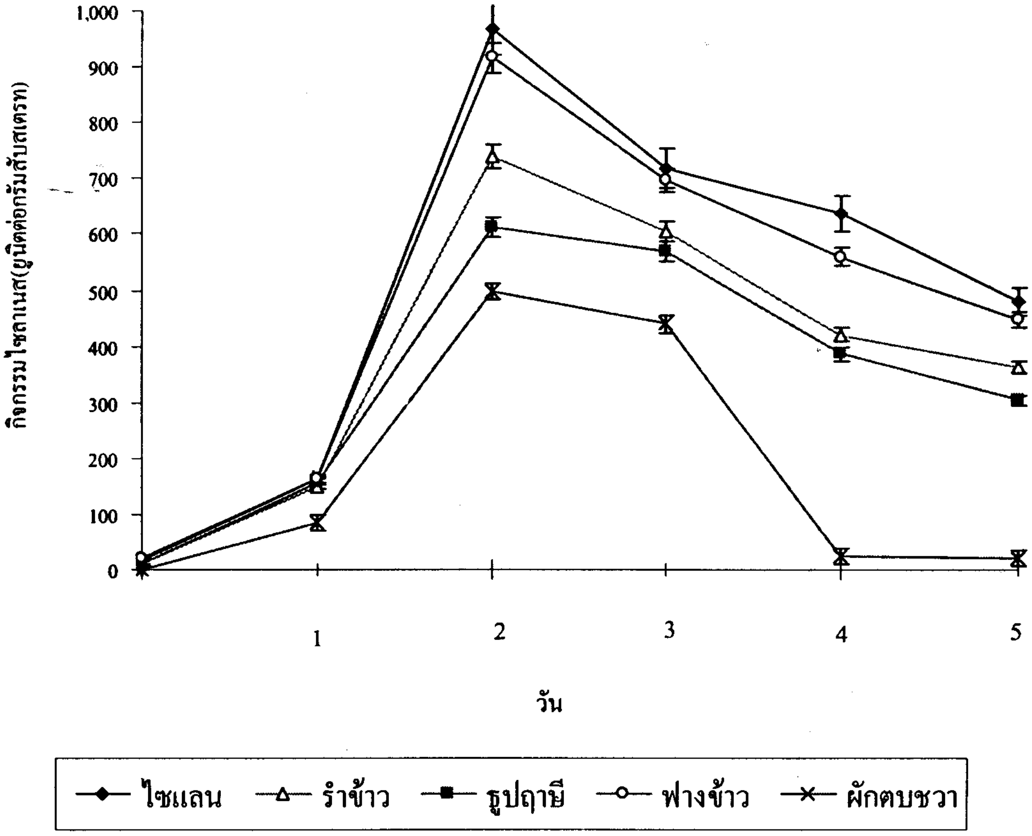
**ตารางที่ 4.3** อัตราส่วนระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด โดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159

| อัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่อเซลลูเลส (ยูนิตไซลาเนสต่อยูนิตเซลลูเลสต่อกรัมสับสับสเตรท) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ผักตบชวา | ธูปฤาษี | รำข้าว | ฟางข้าว | ไซแลน |
| 3.76 | 13.18 | 11.17 | 16.81 | 37.05 |

## 4.2 ผลการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (feed solution ภาคผนวก ก) ซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 โดยแหล่งคาร์บอนคือ ผักตบชวา ธูปฤาษี รำข้าว มีไซแลนเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุด รองลงมาคือการใช้ธูปฤาษี และผักตบชวา ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 917, 740, 611 และ 498 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ โดยเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ค่ากิจกรรมไซลาเนสเฉลี่ยเท่ากับ 970 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ดังแสดงรูปที่ 4.3 จากผลการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยไซแลน ฟางข้าว รำข้าว และธูปฤาษีพบว่าค่ากิจกรรมไซลาเนสจะสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 2 และลดลงตั้งแต่วันที่ 3 ถึง 5 โดยเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ส่วนผักตบชวาพบว่าค่ากิจกรรมไซลาเนสจะสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 3 และลดลงตั้งแต่วันที่ 4 ถึง 5 และผลิตเอนไซม์ไซลาเนสให้กิจกรรมสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุดกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนจากรำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.4




**รูปที่ 4.3** ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR3175 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

**ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์**

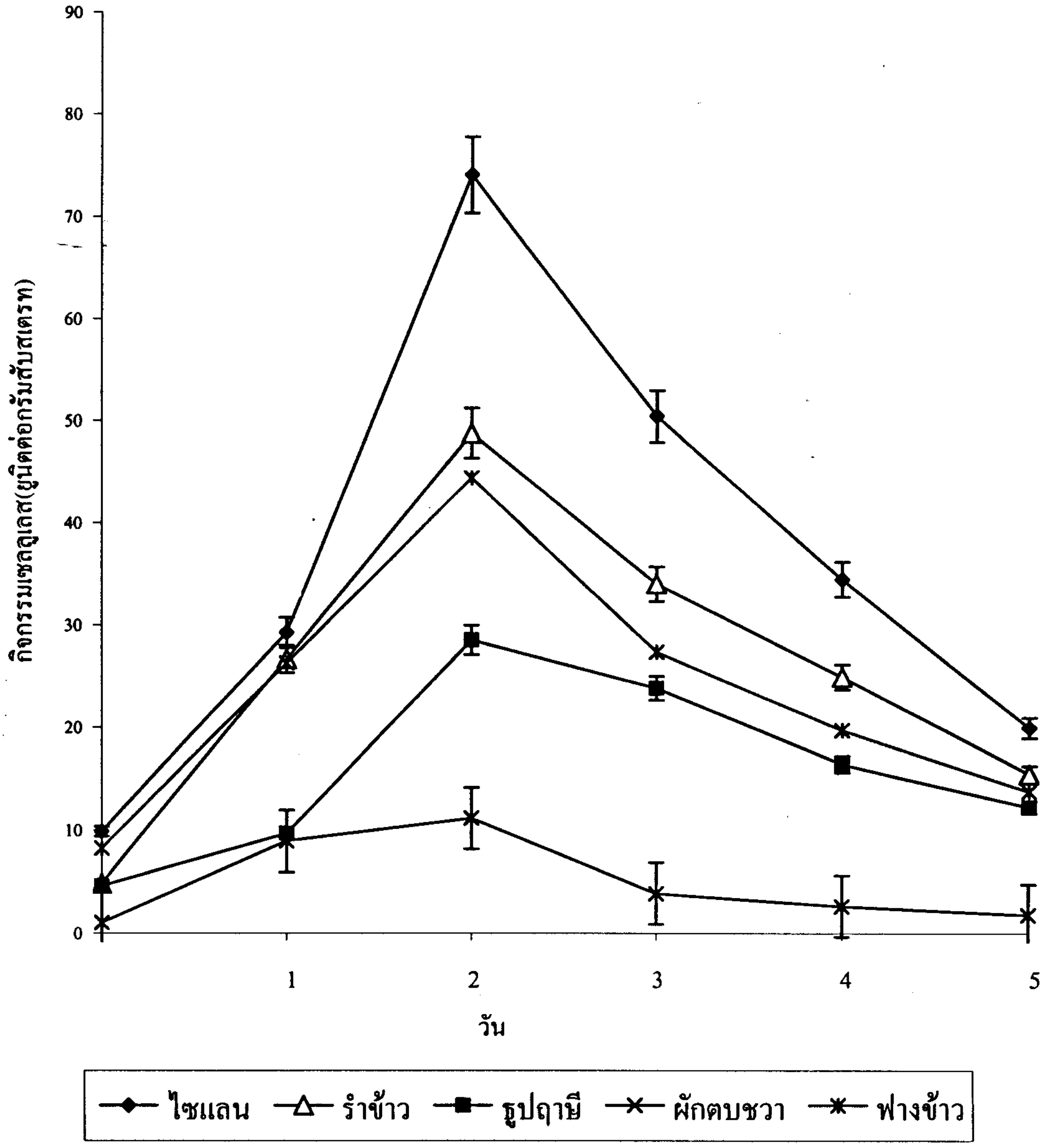
| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | กิจกรรมไซลาเนสสูงสุด (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|
| ผักตบชวา | 2 | 498[e] |
| ธูปฤาษี | 2 | 611[d] |
| รำข้าว | 2 | 740[c] |
| ฟางข้าว | 2 | 917[b] |
| ไซแลน | 2 | 970[a] |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างกัน

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสแตกต่างกัน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 โดยใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด รองลงมาคือการใช้ฟางข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวาเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 49, 44, 29 และ 11 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยง *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 โดยใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 74 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ดังแสดงรูปที่ 4.4 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงตารางที่ 4.5 โดยเชื้อใช้ไซแลน ฟางข้าว รำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวาเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้กิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ

รายงานวิจัยที่สอดคล้องผลการวิจัยนี้คือ งานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) พบว่ารำข้าวจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ได้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุด 343 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และธูปฤาษี ได้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุด 117.56 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท




**รูปที่ 4.4** ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR3175 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

เมื่อเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ พบว่าจากเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้รำข้าวมีค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดกว่าการใช้ธูปฤาษี และผักตบชวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.5

**ตารางที่ 4.5** การเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต) |
|---|---|---|
| ผักตบชวา | 2 | 11[c] |
| ธูปฤาษี | 2 | 29[d] |
| รำข้าว | 2 | 49[b] |
| ฟางข้าว | 2 | 44[c] |
| ไซแลน | 2 | 74[a] |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสไม่แตกต่างกัน

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสแตกต่างกัน

งานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) พบว่าเมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงสุด 29.99 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และเมื่อใช้ธูปฤาษีเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงสุด 7.98 ยูนิตต่อกรัมสับเสตรท ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ที่พบว่าการเมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนเพาะเลี้ยงเชื้อราให้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงกว่าธูปฤาษี

เมื่อทำการเปรียบเทียบสัดส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสกับกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้สูงสุด จากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175พบว่าสับสเตรทที่ให้สัดส่วนสูงสุดคือ ผักตบชวาโดยมีค่าอัตราส่วนเท่ากับ 45.27 ยูนิตไซลาเนสต่อยูนิตเซลลูเลสต่อกรัมสับสเตรท แสดงดังตารางที่ 4.6

จากงานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ของรำละเอียดคือ 15.10 ยูนิตไซลาเนสต่อยูนิตเซลลูเลสต่อกรัมสับสเตรท และธูปฤาษีคือ 29.44 ยูนิตไซลาเนสต่อยูนิตเซลลูเลสต่อกรัมสับสเตรท

**ตารางที่ 4.6** อัตราส่วนระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

| อัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่อเซลลูเลส (ยูนิตไซลาเนสต่อยูนิตเซลลูเลสต่อกรัมสับสเตรท) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ผักตบชวา | ธูปฤาษี | รำข้าว | ฟางข้าว | ไซแลน |
| 45.27 | 29.44 | 15.10 | 20.84 | 13.10 |

## 4.3 ผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลส โดยใช้ฟางข้าว รำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวาเป็นแหล่งคาร์บอน ระหว่างเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 และ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159

จากผลการทดลองเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา 2 ชนิด แล้วพบว่าเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมไซลาเนสที่สูงกว่าจากเชื้อ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนทั้งหมด คือ ฟางข้าว รำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวา โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงตารางที่ 4.7 ส่วนผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับใช้เพาะเลี้ยงเชื้อรา คือ ฟางข้าว ซึ่งพบว่าเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 และ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้ฟางข้าวมีกิจกรรมไซลาเนสที่สูงสุด รองลงมาคือรำข้าว ธูปฤาษีและผักตบชวา ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.7** ผลการเปรียบเทียบเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 และ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

| แหล่งคาร์บอน | กิจกรรมไซลาเนสสูงสุด (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | |
|---|---|---|
| | *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 | *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 |
| ผักตบชวา | 498[d] | 128[d] |
| ธูปฤาษี | 611[c] | 266[c] |
| รำข้าว | 740[b] | 659[b] |
| ฟางข้าว | 917[a] | 908[a] |

หมายเหตุ จากค่ากิจกรรมไซลาเนสที่ได้จากเชื้อราชนิดเดียวกัน
กำหนดให้ จากคอมลัมน์เดียวกัน

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างกัน

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสแตกต่างกัน

จากผลการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ใช้พบว่าฟางข้าว รำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวา มีผลต่อการผลิตปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ดังตารางที่ 4.7 และเมื่อทำการเปรียบเทียบสัดส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสกับกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าผลการเปรียบเทียบเชื้อ 2 ชนิดคือ *Aspergillus foetidus* TISTR 315 และ เชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีค่าอัตราส่วนไซลาเนสต่อเซลลูเลสเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ดังแสดงตารางที่ 4.8 โดยแหล่งคาร์บอนที่เชื้อราใช้แล้วสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสมาก แสดงว่ามีปริมาณไซลาเนสที่ต้องการอยู่มากกว่าเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเมื่อต้องการทำเอนไซม์ไซลาเนสบริสุทธิ์ไม่มีเซลลูเลสจะทำได้ง่ายกว่า เอนไซม์ไซลาเนสที่มีสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่น้อย

**ตารางที่ 4.8** ผลการเปรียบเทียบเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 และ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ซึ่งแสดงค่าอัตราส่วนไซลาเนสต่อเซลลูเลสทางสถิติ โดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

| แหล่งคาร์บอน | อัตราส่วนไซลาเนสต่อเซลลูเลส (ยูนิตไซลาเนสต่อยูนิตเซลลูเลสต่อกรัมสับสเตรท) | |
|---|---|---|
| | *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 | *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 |
| ผักตบชวา | 45.27[a] | 3.76[d] |
| ธูปฤาษี | 29.44[b] | 13.18[b] |
| รำข้าว | 15.10[d] | 11.17[c] |
| ฟางข้าว | 20.84[c] | 16.81[a] |

<u>หมายเหตุ</u> อัตราส่วนกิจกรรมไซลาเนสต่อเซลลูเลสจากเชื้อราชนิดเดียวกัน กำหนดให้จากคอลัมน์เดียวกัน

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่อเซลลูเลสไม่แตกต่างกัน

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่อเซลลูเลสแตกต่างกัน

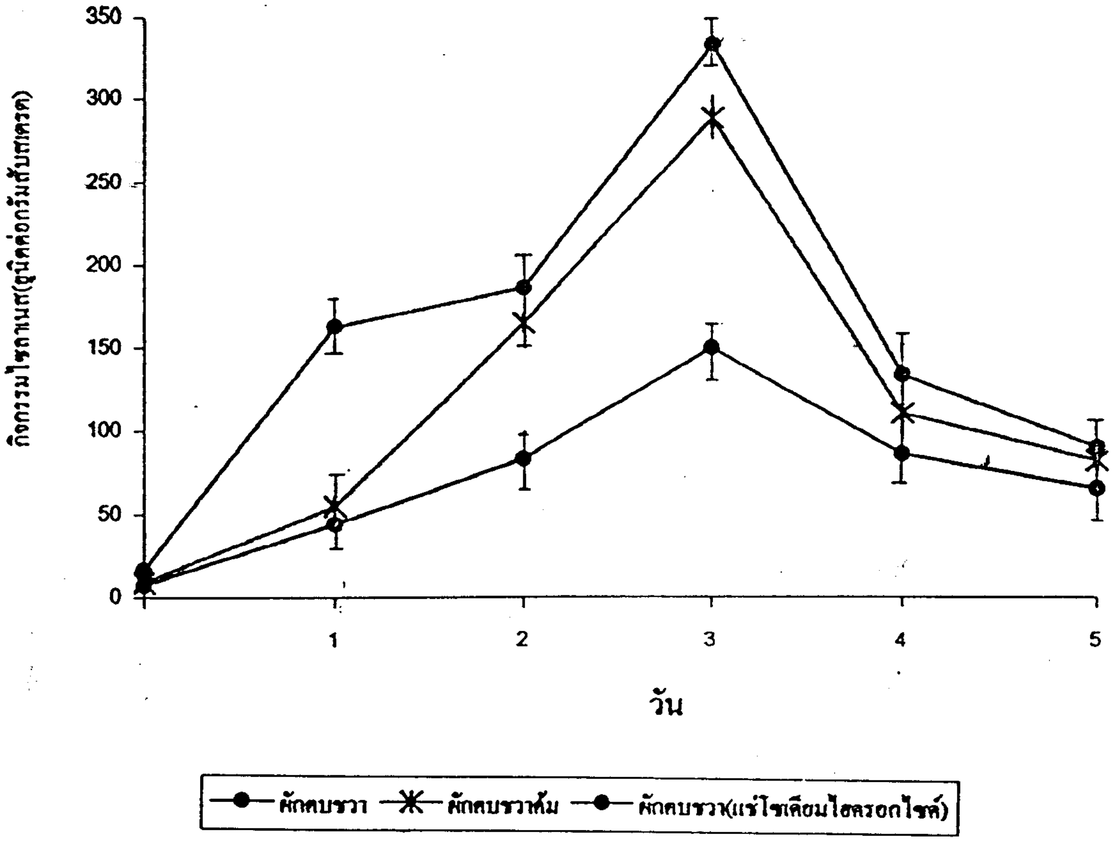
จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ที่เพาะเลี้ยงในรำข้าวมีอัตราส่วนไซลาเนสต่อเซลลูเลสสูงสุด แต่อัตราส่วนไซลาเนสต่อเซลลูเลสโดยเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ผักตบชวามีอัตราส่วนไซลาเนสต่อเซลลูเลสสูงสุด อีกทั้งเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด จึงได้เลือกวัตถุดิบดังกล่าวข้างต้น คือ ฟางข้าว รำข้าว และ ผักตบชวามาศึกษาวิธีการพรีทรีทเมนต์โดยการใช้ความร้อนด้วยการต้มและการแช่ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อแปรสภาพวัตถุดิบโดยการใช้ความร้อนและใช้ด่าง ซึ่งจะทำให้ไซแลนและไซโลสออกจากวัตถุดิบและเฮมิเซลลูโลสละลายในน้ำเพิ่มขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้น

## 4.4 ผลการเปรียบเทียบกิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลสจากการใช้แหล่งคาร์บอน ผักตบชวา รำข้าว และฟางข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ ด้วยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159

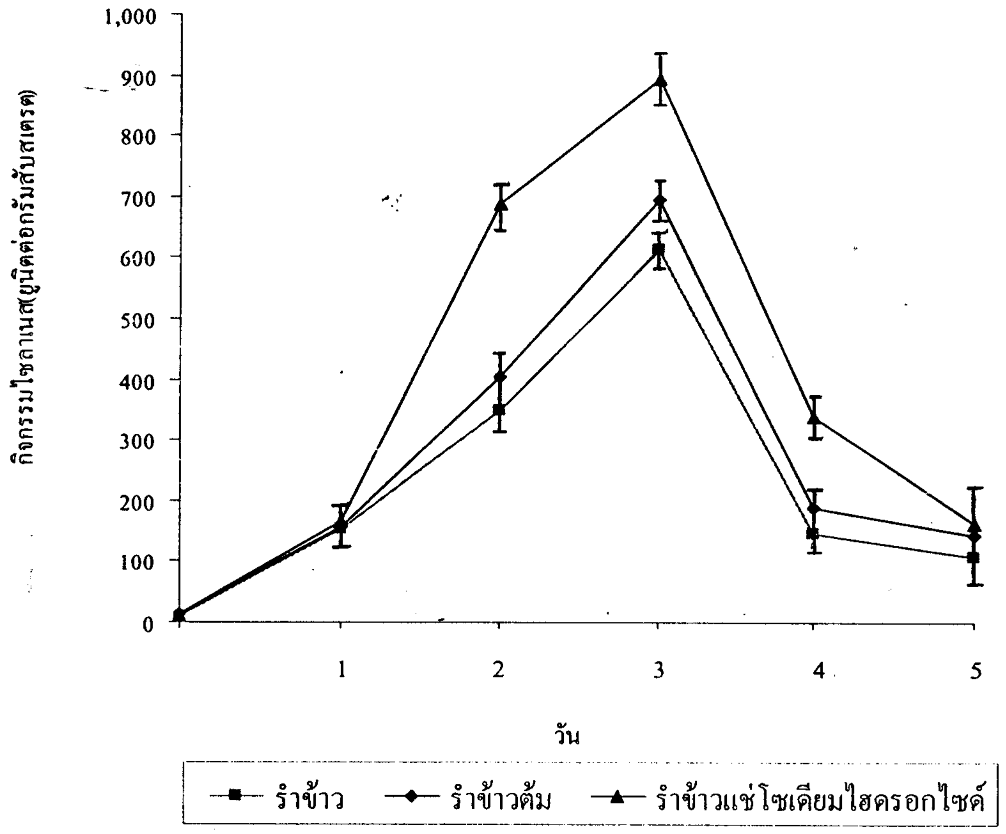
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (feed solution ภาคผนวก ก) ซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์และพีเอชเท่ากับ 7.0 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ ฟางข้าวทำพรีทรีทเมนต์โดยแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ ฟางข้าวต้ม ฟางข้าวที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์ รำข้าวแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ รำข้าวต้ม รำข้าวที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์ ผักตบชวาแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผักตบชวาต้ม และผักตบชวาที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์

จากการศึกษาผลการใช้ผักตบชวาเป็นสับสเตรทในการพรีทรีทเมนต์พบว่าเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 สามารถให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้ผักตบชวาแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือ ผักตบชวาต้ม และ ผักตบชวาที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์ ตามลำดับ ซึ่งเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 340, 290 และ 150 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.5 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.9

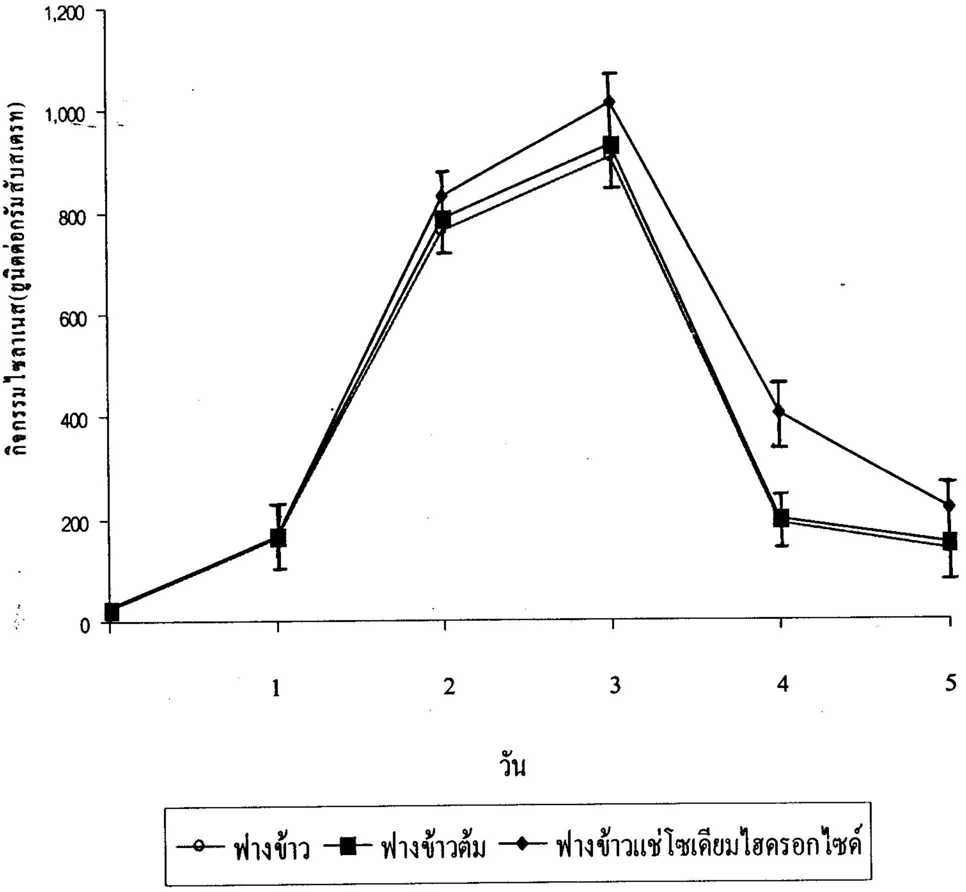
จากผลการทดลองที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นรำข้าว คือ รำข้าวที่แช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง รำข้าวที่ต้มในน้ำเดือด 1 ชั่วโมง และรำข้าวที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์ พบว่าเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 สามารถให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือ รำข้าวต้ม และ รำข้าวที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์ ตามลำดับ ซึ่งเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 830, 680 และ 610 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.9




รูปที่ 4.5 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นผักตบชวาที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับผักตบชวาที่ไม่พรีทรีทเมนต์




**รูปที่ 4.6** ผลกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนรำข้าวที่พรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เทียบกับรำข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์




**รูปที่ 4.7** ผลกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์

จากการเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอน ด้วยการต้ม และการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่พรีทรีทเมนต์ พบว่าเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงกว่าไม่พรีทรีทเมนต์ในทุกแหล่งคาร์บอนคือ ฟางข้าว รำข้าว และผักตบชวา เมื่อเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอน พบว่าการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนด้วยการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง เป็นวิธีที่ทำให้เชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดและสูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนที่พรีทรีทเมนต์ด้วยการต้มในทุกแหล่งคาร์บอนที่ศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 4.9 เมื่อใช้ฟางข้าวที่แช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรม 1140 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ซึ่งมีค่ามากกว่า 1.27 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ต้ม เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมไซลาเนส 907 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนเมื่อใช้รำข้าวที่แช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรม 830 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ซึ่งมีค่ามากกว่า 1.22 เท่า เมื่อเปรียบเทียบการใช้รำข้าวที่ต้มเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้ค่ากิจกรรมเท่ากับ 680 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และเมื่อใช้ผักตบชวาที่แช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรรม 340 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ซึ่งมีค่ามากกว่า 1.17 เท่า เมื่อเปรียบเทียบการต้มรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้ค่ากิจกรรมเท่ากับ 290 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท

รายงานวิจัยที่สอดคล้องผลการวิจัยนี้คือ งานวิจัยของ Zaho และคณะ (2002) ศึกษาการพรี-ทรีทเมนต์ฟางข้าวสาลีด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดคือ 4 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ได้ 2 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนงานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) พบว่าธูปฤาษีที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุด 1,204.06 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ซึ่งมากกว่าธูปฤาษีที่ไม่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ได้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุด 846.17 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท

**ตารางที่ 4.9** การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนด้วยการต้ม และการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | กิจกรรมไซลาเนสสูงสุด (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|
| ผักตบชวา | 3 | 150[i] |
| ผักตบชวา(ต้มน้ำเดือด 1 ชั่วโมง) | 3 | 290[h] |
| ผักตบชวา (แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง) | 3 | 340[g] |
| รำข้าว | 3 | 610[f] |
| รำข้าว(ต้มน้ำเดือด 1 ชั่วโมง) | 3 | 680[e] |
| รำข้าว (แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง) | 3 | 830[d] |
| ฟางข้าว | 3 | 860[c] |
| ฟางข้าว(ต้มน้ำเดือด 1 ชั่วโมง) | 3 | 907[b] |
| ฟางข้าว (แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง) | 3 | 1140[a] |

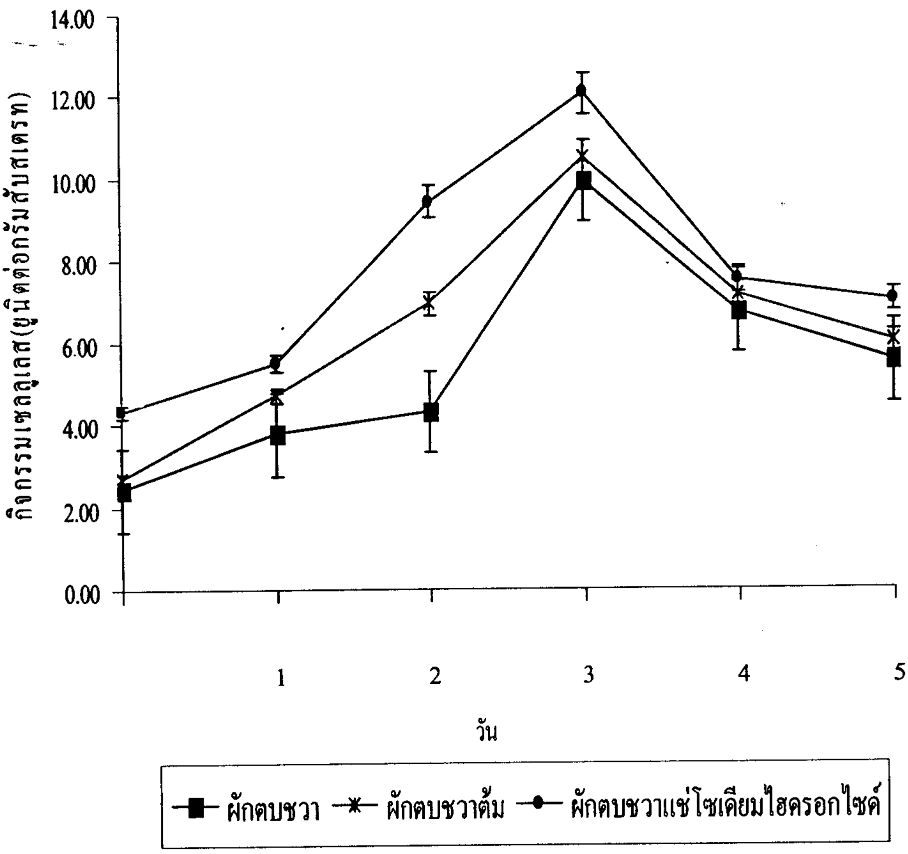
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างกัน

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสแตกต่างกัน

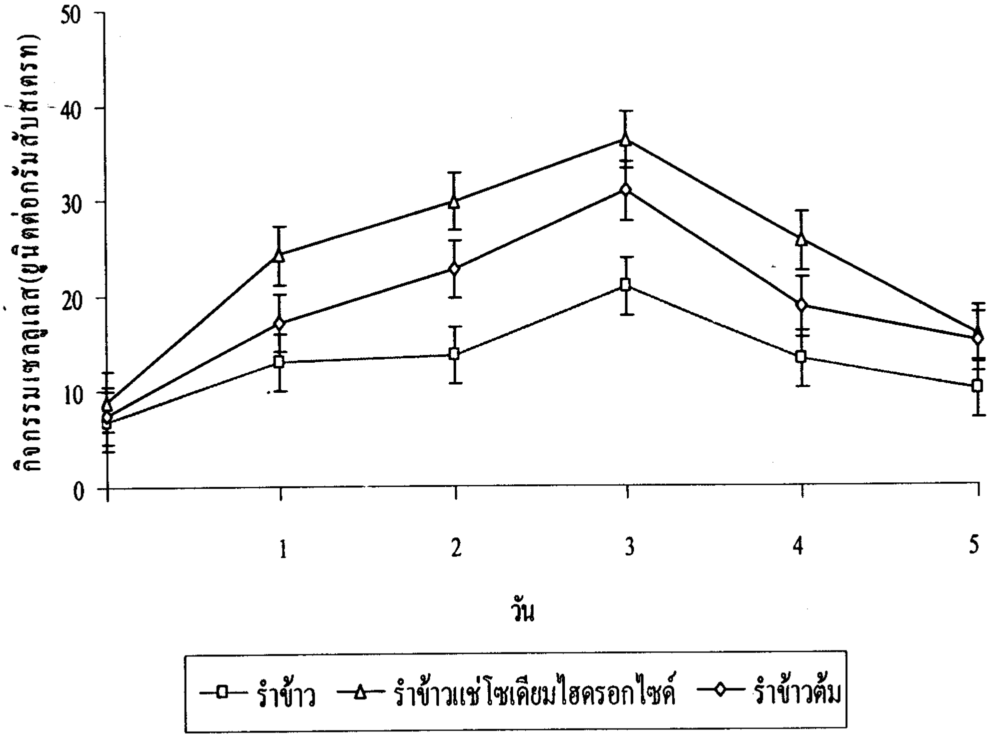
การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน คือ ผักตบชวา รำข้าว และฟางข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และผักตบชวา รำข้าว ฟางข้าวที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์ พบว่าเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 สามารถให้กิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้ ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือ ฟางข้าวต้ม รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ รำข้าวต้ม ฟางข้าว ผักตบชวาแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผักตบชวาต้ม และผักตบชวาที่ไม่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ตามลำดับ ซึ่งเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีค่า กิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 50, 40, 38, 30, 26, 20, 12, 10 และ 9 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตาม ลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.8, รูปที่ 4.9 และ รูปที่ 4.10 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.10

จากผลการเปรียบเทียบการใช้ผักตบชวา รำข้าว และฟางข้าวผ่านการพรีทรีทเมนต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ด้วยฟางข้าวที่แช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน ให้กิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

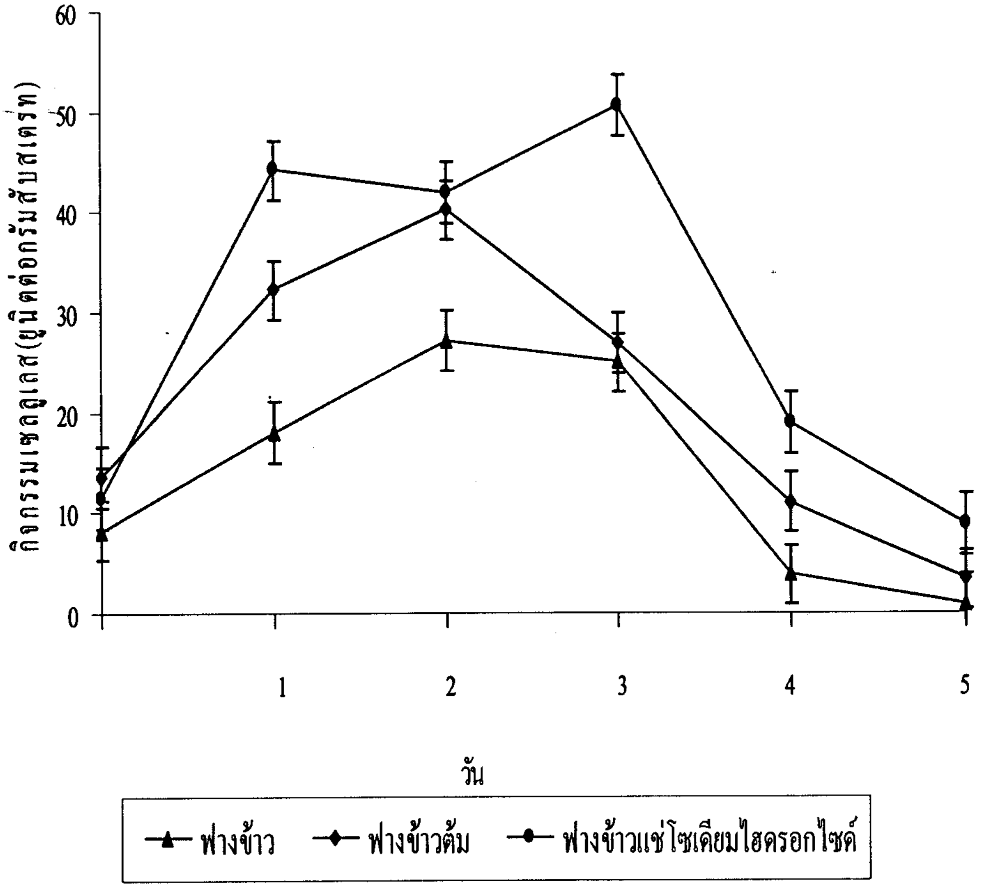
จากงานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) พบว่าจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 โดยธูปฤาษีที่ผ่านการทำพรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์จะให้กิจกรรมเซลลูเลสสูงสุด 10.56 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท




**รูปที่ 4.8** ผลกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นผักตบชวา ที่พรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับผักตบชวาที่ไม่พรีทรีทเมนต์




**รูปที่ 4.9** ผลกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นรำข้าวที่พรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์




**รูปที่ 4.10** ผลกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์

**ตารางที่ 4.10** การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนด้วยการต้ม และการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | กิจกรรมเซลลูเลสสูงสุด (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|
| ผักตบชวา | 3 | $9^{g}$ |
| ผักตบชวา(ต้มน้ำเดือด1 ชั่วโมง) | 3 | $10^{g}$ |
| ผักตบชวา (แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง) | 3 | $12^{gh}$ |
| รำข้าว | 3 | $26^{c}$ |
| รำข้าว (ต้มน้ำเดือด1 ชั่วโมง) | 3 | $30^{d}$ |
| รำข้าว (แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง) | 3 | $38^{c}$ |
| ฟางข้าว | 3 | $38^{bc}$ |
| ฟางข้าว (ต้มน้ำเดือด1 ชั่วโมง) | 2 | $40^{b}$ |
| ฟางข้าว (แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง) | 2 | $50^{a}$ |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสไม่แตกต่างกัน

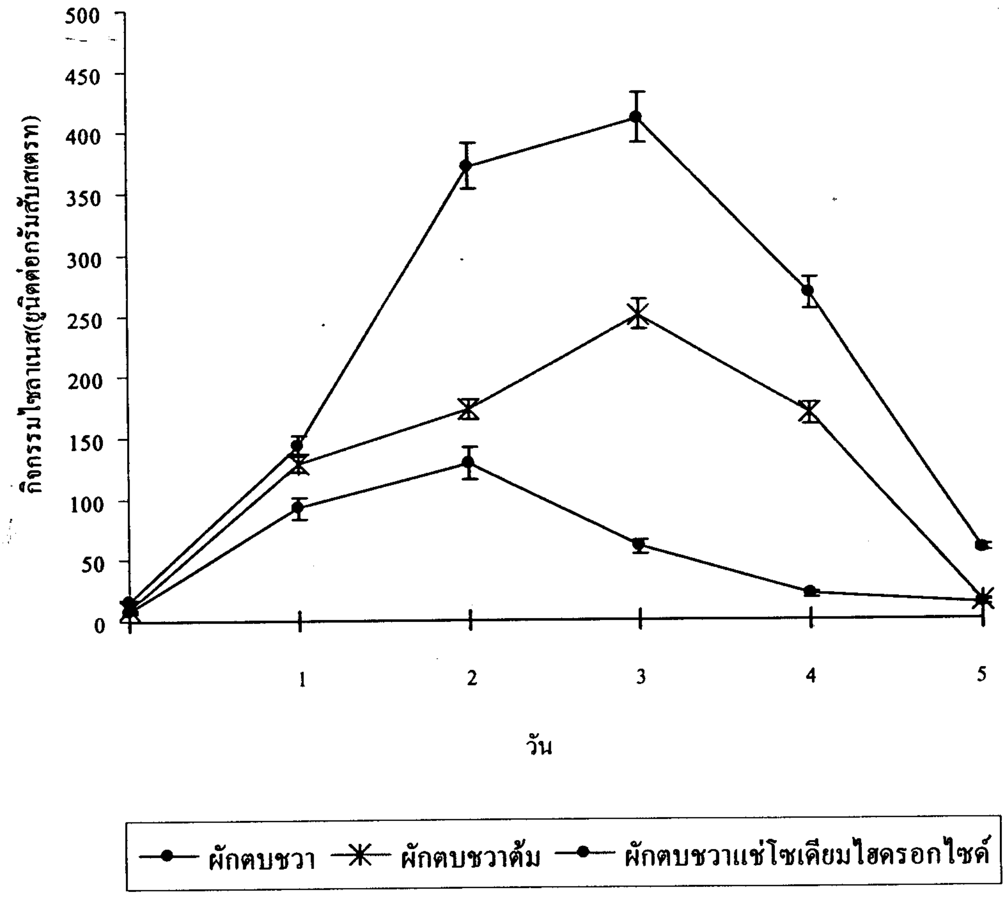
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสแตกต่างกัน

## 4.5 ผลค่ากิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลสจากการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน ผักตบชวา รำข้าว และฟางข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ โดยการหมักด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

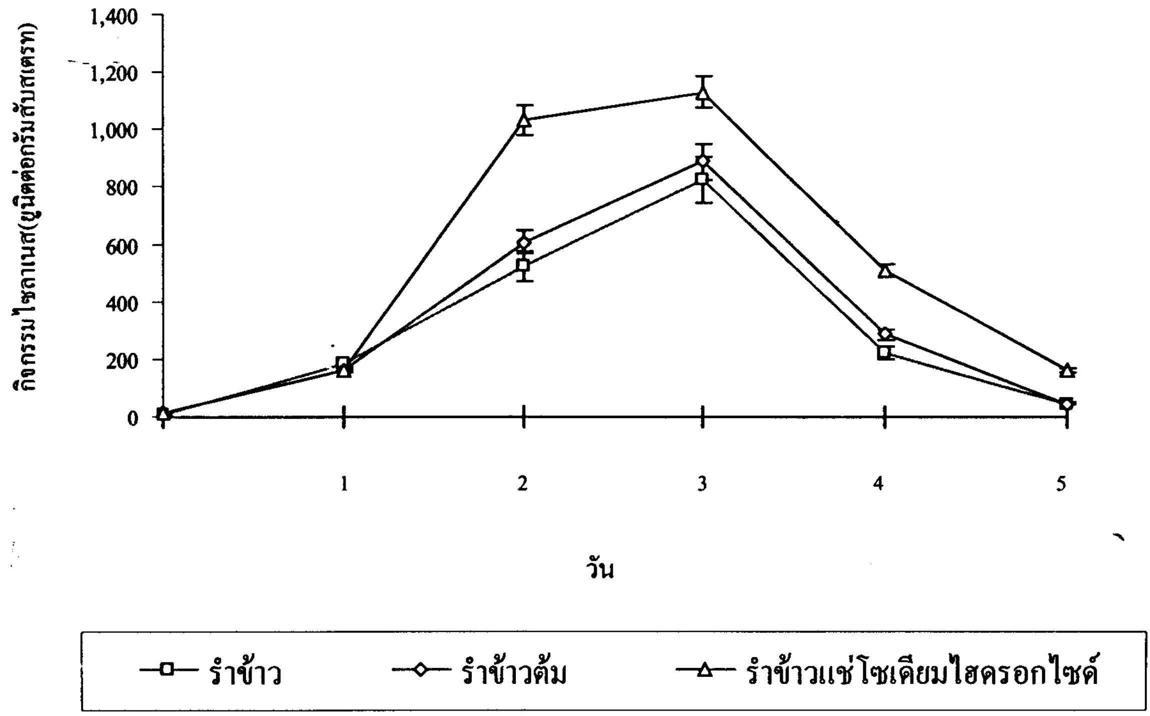
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (feed solution ภาคผนวก ก) ซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์และพีเอชเท่ากับ 7.0 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ ผักตบชวาทำพรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และผักตบชวาที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์

จากการศึกษาการใช้ผักตบชวาเป็นสับสเตรทในการพรีทรีทเมนต์ พบว่าเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้ผักตบชวาแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือ ผักตบชวาต้ม และ ผักตบชวา ตามลำดับ ซึ่งเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 410 , 250 และ 130 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.11 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.11

เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน คือ รำข้าวที่ทำพรีทรีเมนต์ด้วยการต้ม การแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และรำข้าวที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือ รำข้าวต้ม และ รำข้าว ตามลำดับ ซึ่งเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 1,100, 900 และ 800 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.11

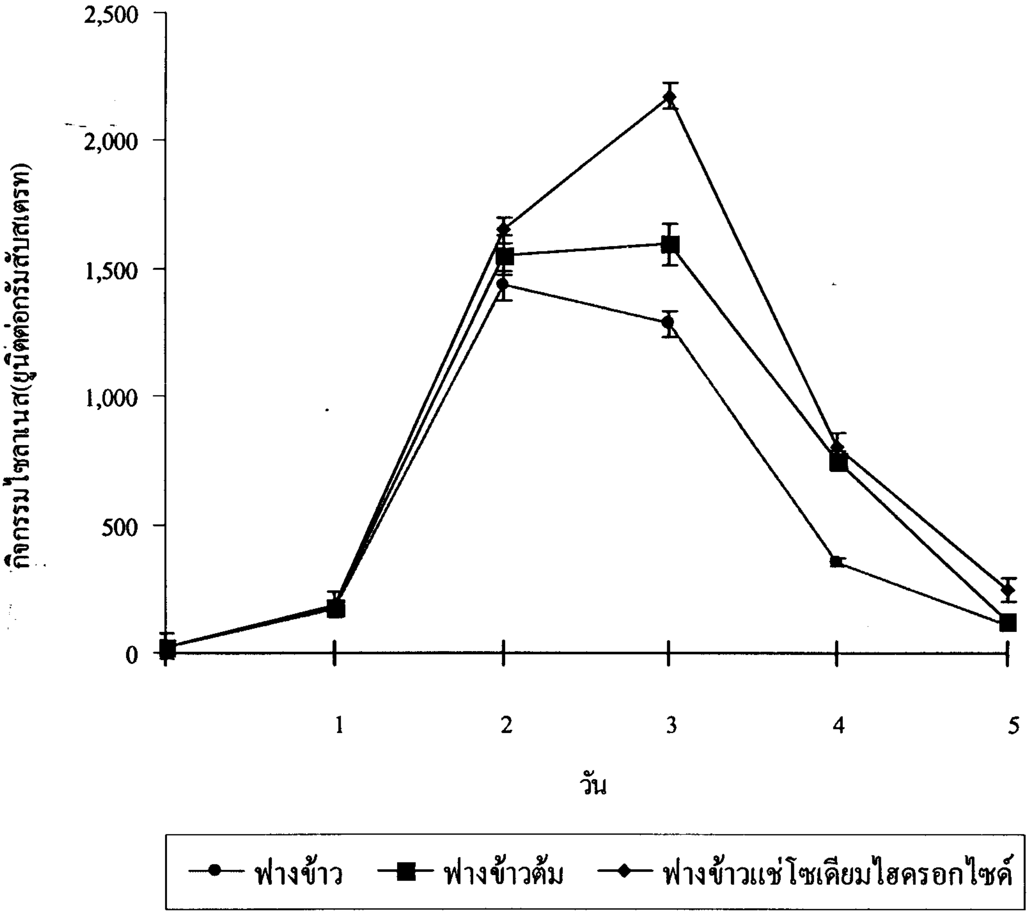



**รูปที่ 4.11** ผลกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นผักตบชวาที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับผักตบชวาที่ไม่พรีทรีทเมนต์




**รูปที่ 4.12** ผลกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นรำข้าวที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์

เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน คือ ฟางข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่ด้วยโซเดียมไฮ-ดรอกไซด์ และฟางข้าวที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือ ฟางข้าวต้ม และ ฟางข้าว ตามลำดับ ซึ่งเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 2200, 1600 และ 1400 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.13 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.11




**รูปที่ 4.13** ผลกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์

**ตารางที่ 4.11** การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนด้วยการต้ม และการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

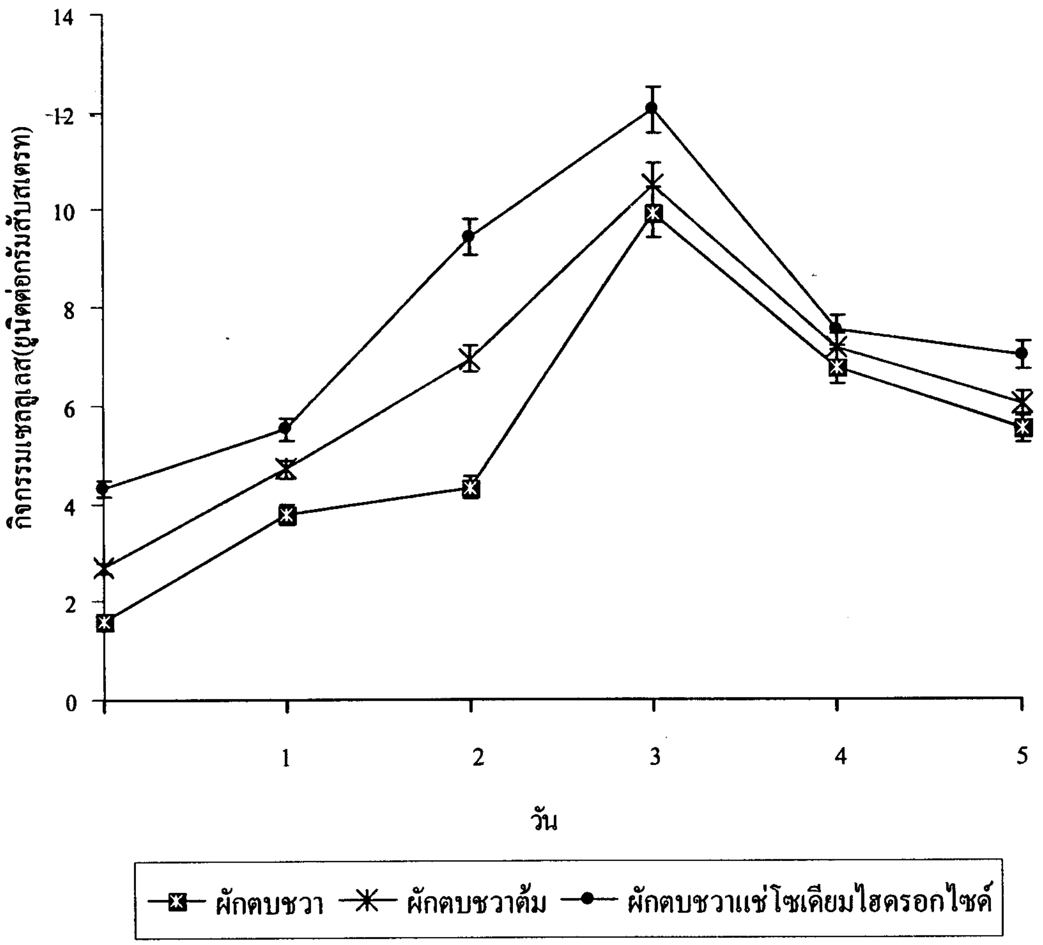
| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | กิจกรรมไซลาเนสสูงสุด (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|
| ผักตบชวา | 3 | 130 [i] |
| ผักตบชวา(ต้มน้ำเดือด 1 ชั่วโมง) | 3 | 250 [h] |
| ผักตบชวา (แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง). | 2 | 410 [g] |
| รำข้าว | 3 | 800 [f] |
| รำข้าว(ต้มน้ำเดือด 1 ชั่วโมง) | 3 | 900 [e] |
| รำข้าว (แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง) | 3 | 1100 [d] |
| ฟางข้าว | 3 | 1400 [c] |
| ฟางข้าว(ต้มน้ำเดือด 1 ชั่วโมง) | 3 | 1600 [b] |
| ฟางข้าว (แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง) | 2 | 2200 [a] |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสแตกต่างกัน

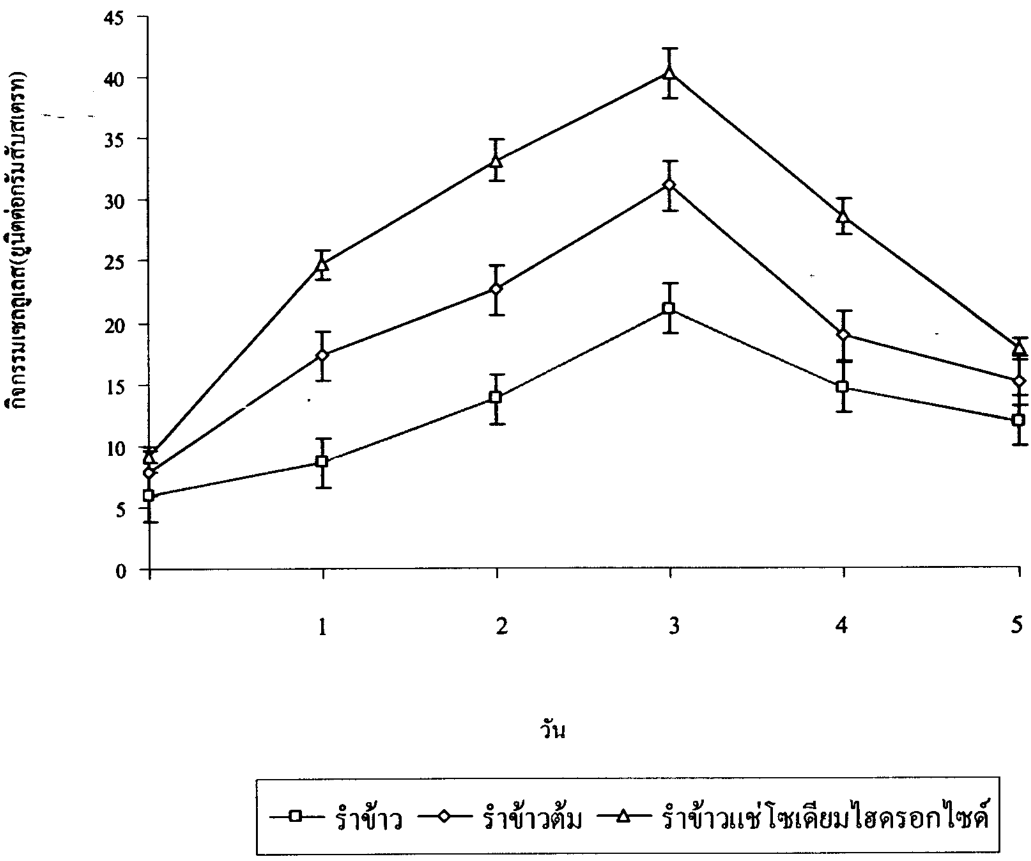
จากการเปรียบเทียบการพรีทรีทเมนต์ฟางข้าวด้วยการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีค่ากิจกรรมไซลาเนสได้สูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน คือ ผักตบชวา รำข้าว และฟางข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และผักตบชวา รำข้าว ฟางข้าวที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถให้กิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้ ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือ ฟางข้าวต้ม รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ รำข้าวต้ม ฟางข้าว ผักตบแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผักตบชวาต้ม และ ผักตบชวา ตามลำดับ ซึ่งเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 60, 50, 40, 32 , 30 , 23 , 13 , 12 และ 9 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.14, 4.15 และ 4.16 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.12

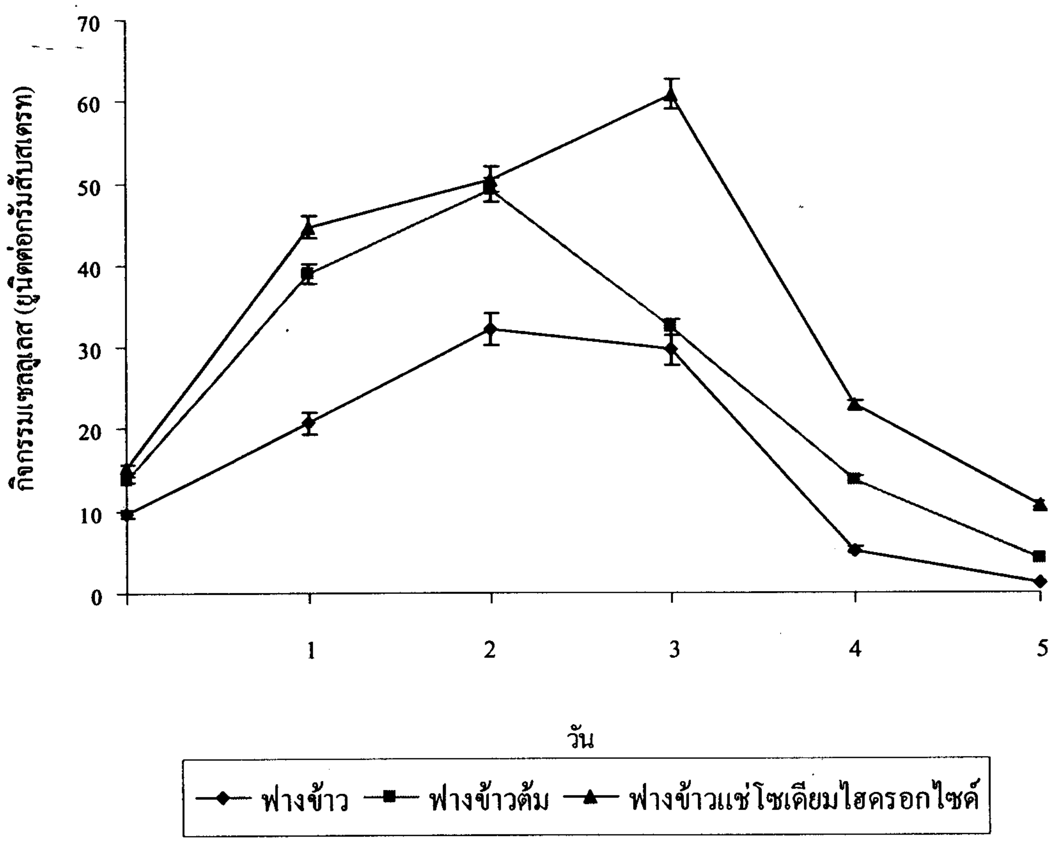
จากผลการเปรียบเทียบการใช้ผักตบชวา รำข้าว และฟางข้าวที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ด้วย ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ




**รูปที่ 4.14** ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นผักตบชวาที่พรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับผักตบชวาที่ไม่พรีทรีทเมนต์




**รูปที่ 4.15** ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นรำข้าวที่พรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์




**รูปที่ 4.16** ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม และการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์

**ตารางที่ 4.12** การเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนที่พรีทรีทเมนต์ ด้วยการต้ม และการแช่โซเดียม ไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | กิจกรรมเซลลูเลสสูงสุด (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|
| ผักตบชวา | 3 | 9[h] |
| ผักตบชวา(ต้มน้ำเดือด1 ชั่วโมง) | 3 | 12[gh] |
| ผักตบชวา (แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง) | 3 | 13[g] |
| รำข้าว | 3 | 20[f] |
| รำข้าว (ต้มน้ำเดือด1 ชั่วโมง) | 3 | 32[d] |
| รำข้าว (แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง) | 3 | 40[c] |
| ฟางข้าว | 3 | 30[e] |
| ฟางข้าว (ต้มน้ำเดือด1 ชั่วโมง) | 2 | 50[b] |
| ฟางข้าว (แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง) | 2 | 60[a] |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสไม่แตกต่างกัน

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสแตกต่างกัน

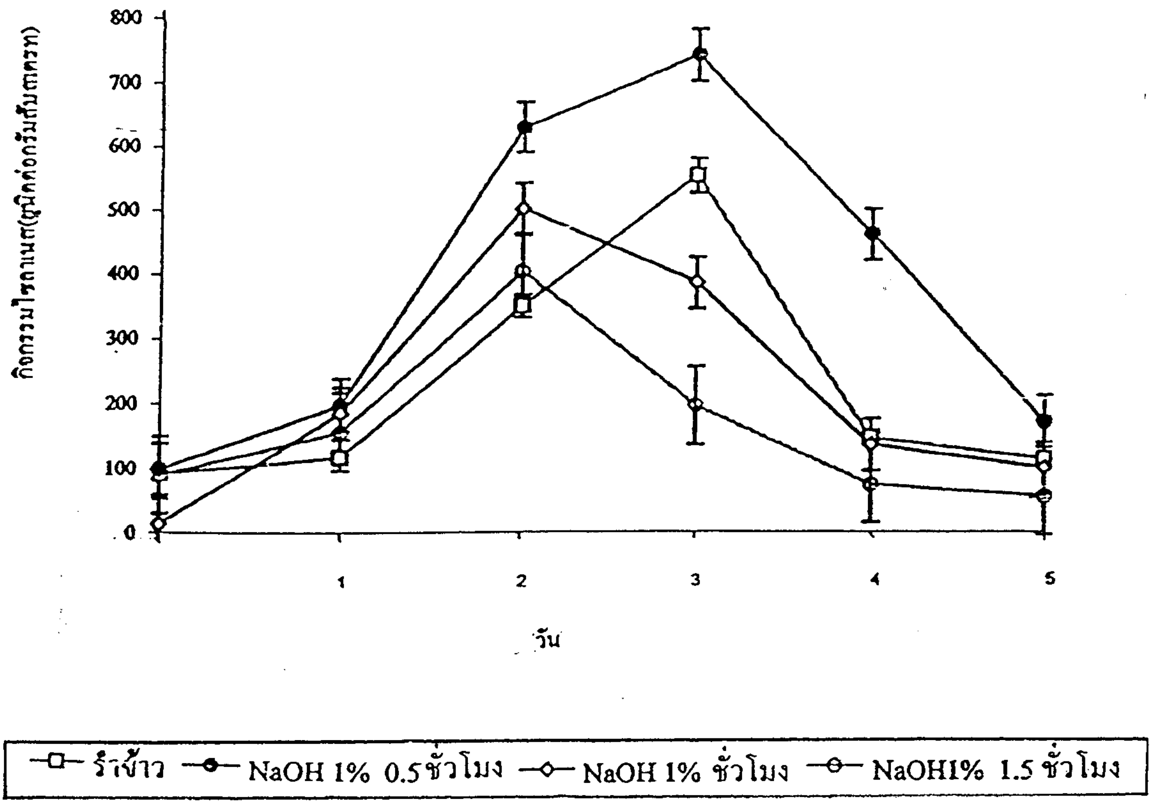
## 4.6 ผลค่ากิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลส จากการเปรียบเทียบการใช้รำข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ โดยการหมักด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (feed solution ภาคผนวก ก) ซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์และพีเอชเท่ากับ 7.0 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ รำข้าวทำพรีทรีทเมนต์ด้วยการแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

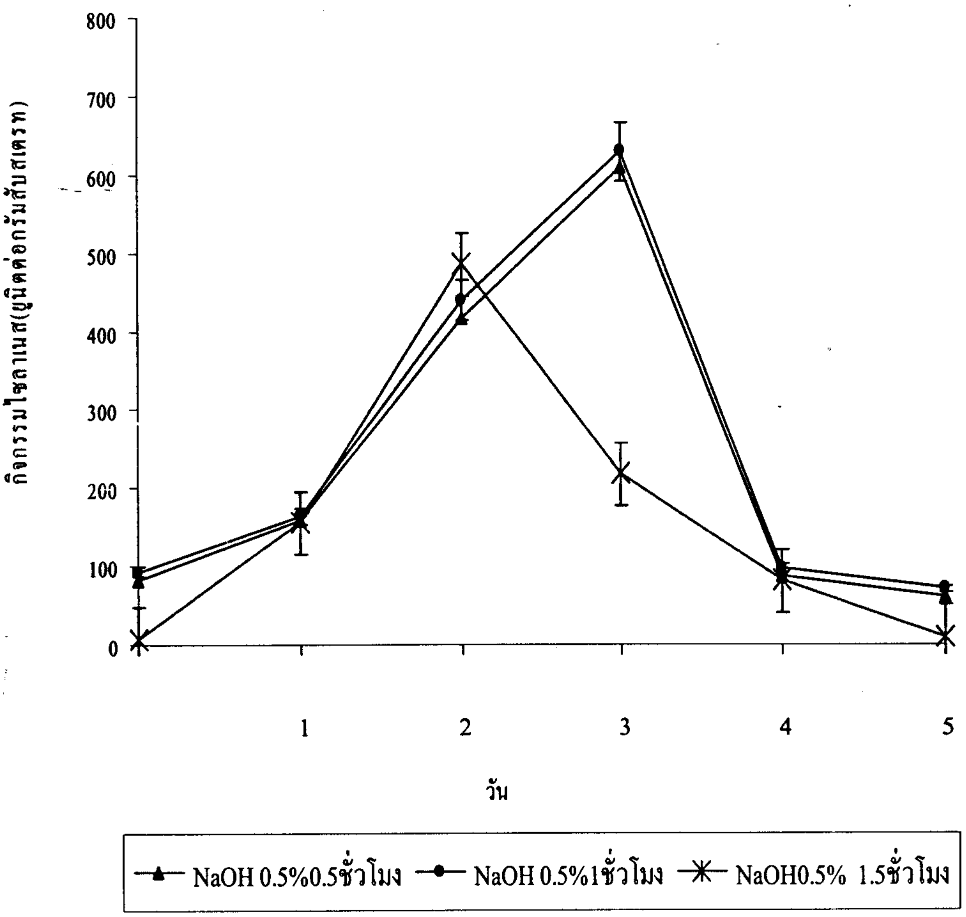
จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรมเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 605 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนเมื่อใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันระยะเวลาในการแช่รำข้าวในโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าที่ระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 740, 689 และ 230 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.17 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.13

จากผลการทดลองโดยการแช่รำข้าวที่ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปรผันระยะเวลา แล้ว พบว่าที่ระยะเวลาการแช่ 0.5 ชั่วโมง, 1 ชั่วโมง และ 1.5 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดวันที่ 3 หลังการเพาะเลี้ยง และได้ค่ากิจกรรมสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 608, 629 และ 485 ตามลำดับ ดังแสดงรูปที่ 4.18 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.13

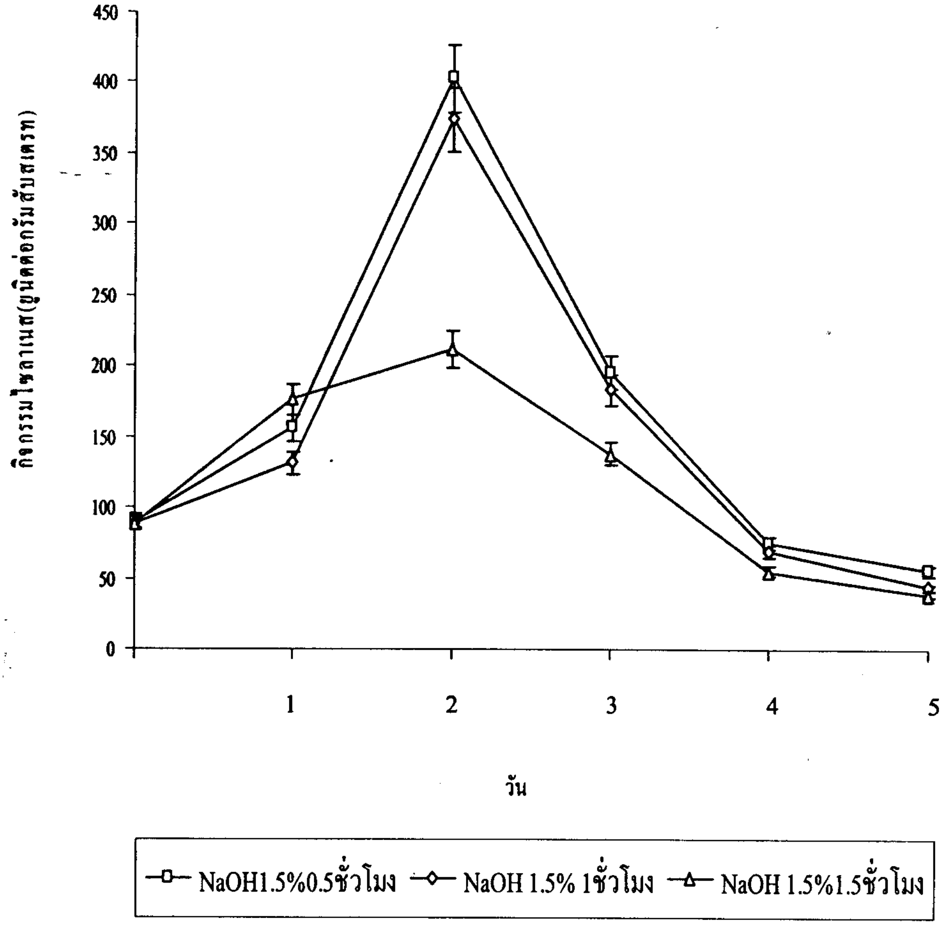
จากผลการทดลองแปรผันความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้แช่รำข้าว พบว่าที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ที่ระยะเวลาการแช่ 0.5 ชั่วโมง, 1 ชั่วโมง และ 1.5 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมสูงสุดวันที่ 2 หลังการเพาะเลี้ยง และได้ค่ากิจกรรมสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 403, 374 และ 212 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.19 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.13




รูปที่ 4.17 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175




**รูปที่ 4.18** ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175




**รูปที่ 4.19** ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

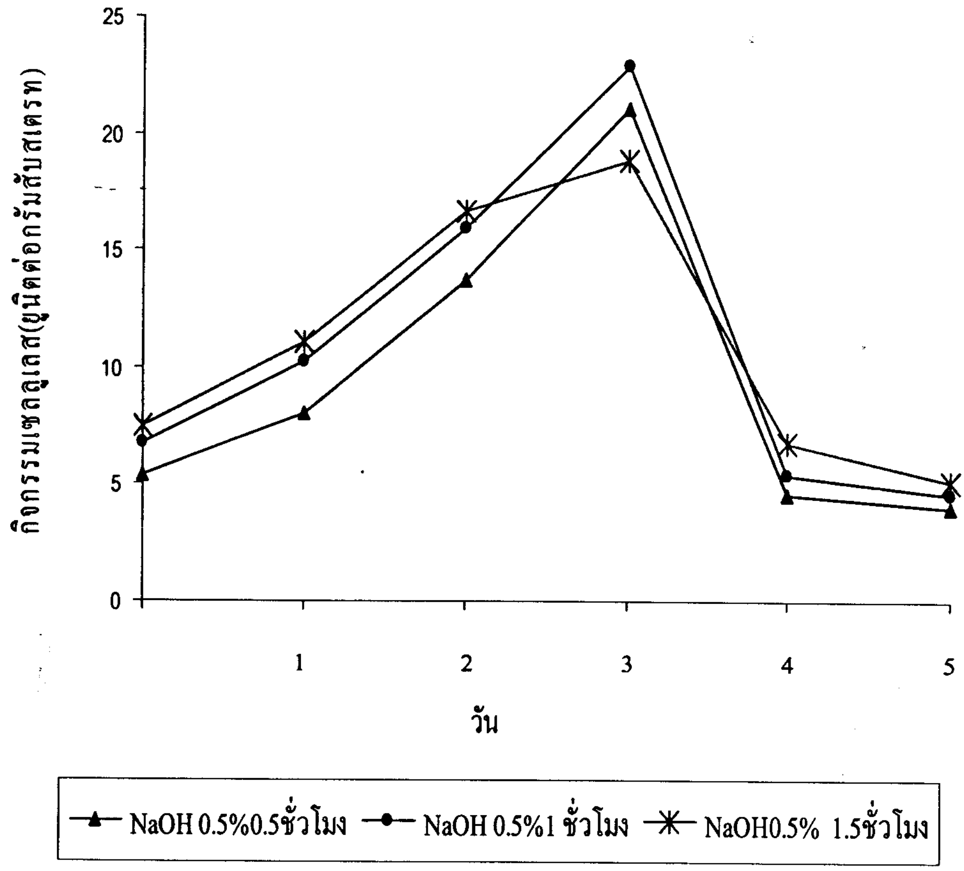
**ตารางที่ 4.13** การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนรำข้าวด้วยการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | กิจกรรมไซลาเนสสูงสุด (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|
| รำข้าว | 3 | $605^{c}$ |
| รำข้าวแช่ด่าง 0.5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง | 3 | $608^{c}$ |
| รำข้าวแช่ด่าง 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1.0 ชั่วโมง | 3 | $629^{d}$ |
| รำข้าวแช่ด่าง 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1.5 ชั่วโมง | 3 | $485^{e}$ |
| รำข้าวแช่ด่าง 1.0 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง | 3 | $740^{a}$ |
| รำข้าวแช่ด่าง 1.0 เปอร์เซ็นต์ 1.0 ชั่วโมง | 3 | $689^{b}$ |
| รำข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 1.5 ชั่วโมง | 3 | $230^{h}$ |
| รำข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง | 3 | $403^{f}$ |
| รำข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 1.0 ชั่วโมง | 3 | $374^{g}$ |
| รำข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 1.5 ชั่วโมง | 3 | $212^{i}$ |

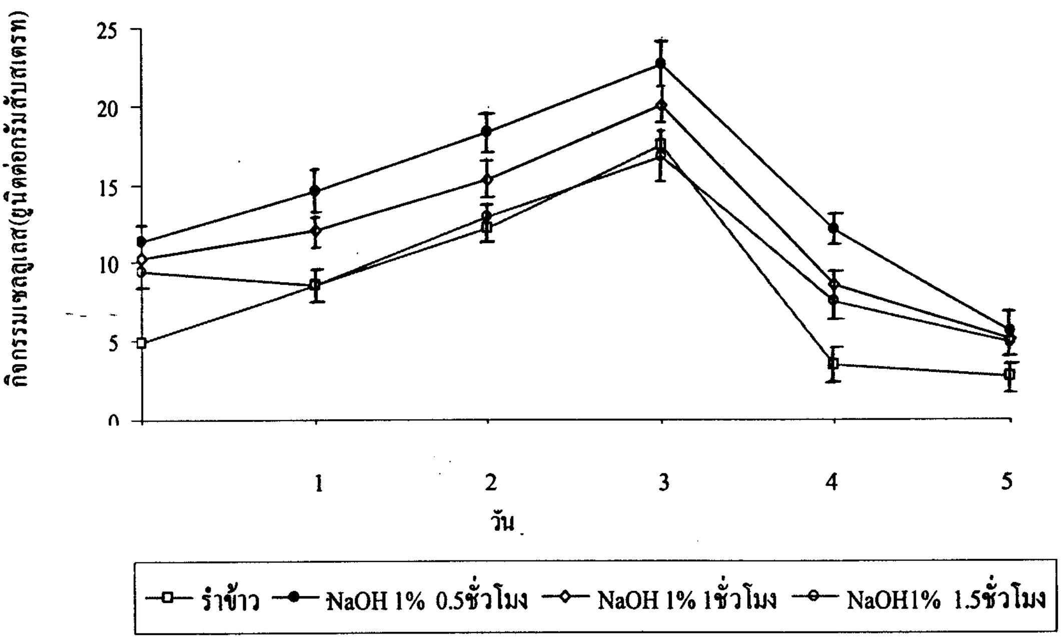
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างกัน

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสแตกต่างกัน

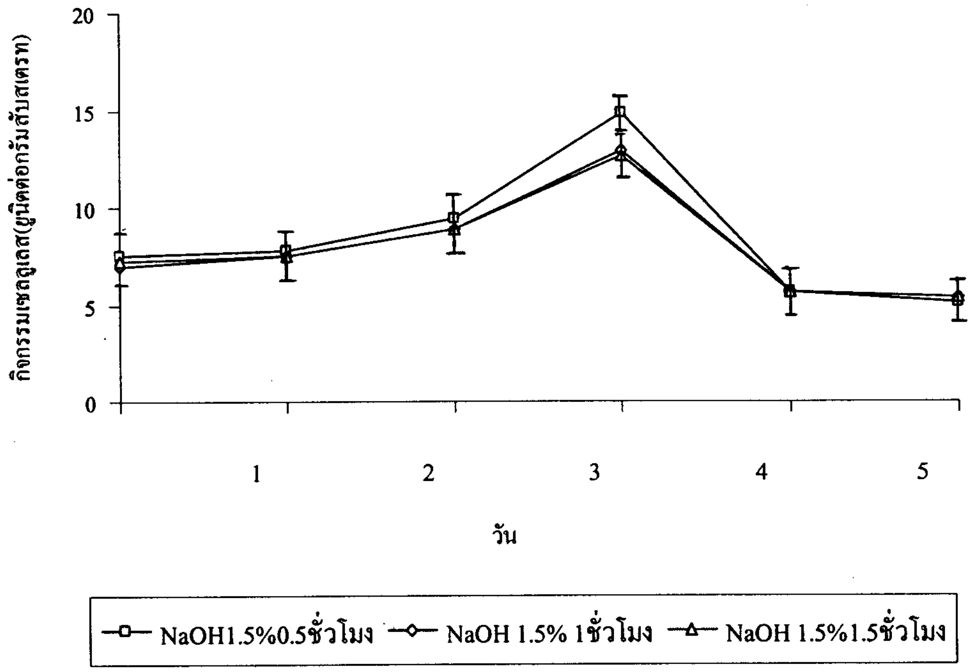
ผลการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อใช้รำข้าวพรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์เป็นสับสเตรท พบว่าเมื่อใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด รองลงมาคือการใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมง และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ รำข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์ รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ,1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และให้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 22.91, 22.64, 21.02, 19.95, 18.87, 17.52, 16.71, 14.82, 12.94 และ 12.67 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับแสดงดังรูปที่ 4.20, 4.21 และ4.22 ส่วนผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.14 จากการใช้รำข้าวที่ไม่พรีทรีเมนต์และ รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 0.5, 1 และ 1.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อราผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง




**รูปที่ 4.20** ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175




**รูปที่ 4.21** ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175




**รูปที่ 4.22** ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

**ตารางที่ 4.14** การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนรำข้าวด้วยการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | กิจกรรมเซลลูเลสสูงสุด (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|
| รำข้าว | 3 | 17.52[d] |
| รำข้าวแช่ด่าง 0.5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง | 3 | 21.02[ab] |
| รำข้าวแช่ด่าง 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1.0 ชั่วโมง | 3 | 22.91[a] |
| รำข้าวแช่ด่าง 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1.5 ชั่วโมง | 3 | 18.87[cd] |
| รำข้าวแช่ด่าง 1.0 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง | 3 | 22.64[a] |
| รำข้าวแช่ด่าง 1.0 เปอร์เซ็นต์ 1.0 ชั่วโมง | 3 | 19.95[c] |
| รำข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 1.5 ชั่วโมง | 3 | 16.71[de] |
| รำข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง | 3 | 14.82[f] |
| รำข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 1.0 ชั่วโมง | 3 | 12.94[g] |
| รำข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 1.5 ชั่วโมง | 3 | 12.67[g] |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสไม่แตกต่างกัน

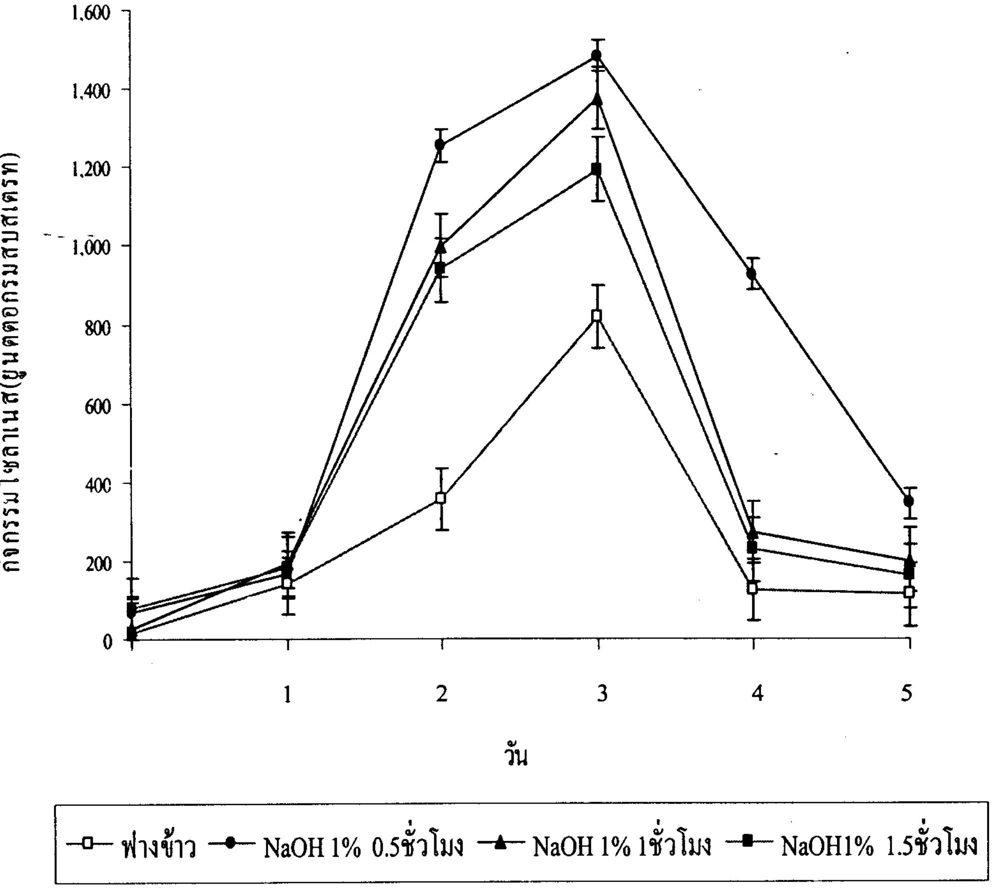
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสแตกต่างกัน

## 4.7 ผลค่ากิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลส จากการเปรียบเทียบพรีทรีทเมนต์ฟางข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ โดยการหมักด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

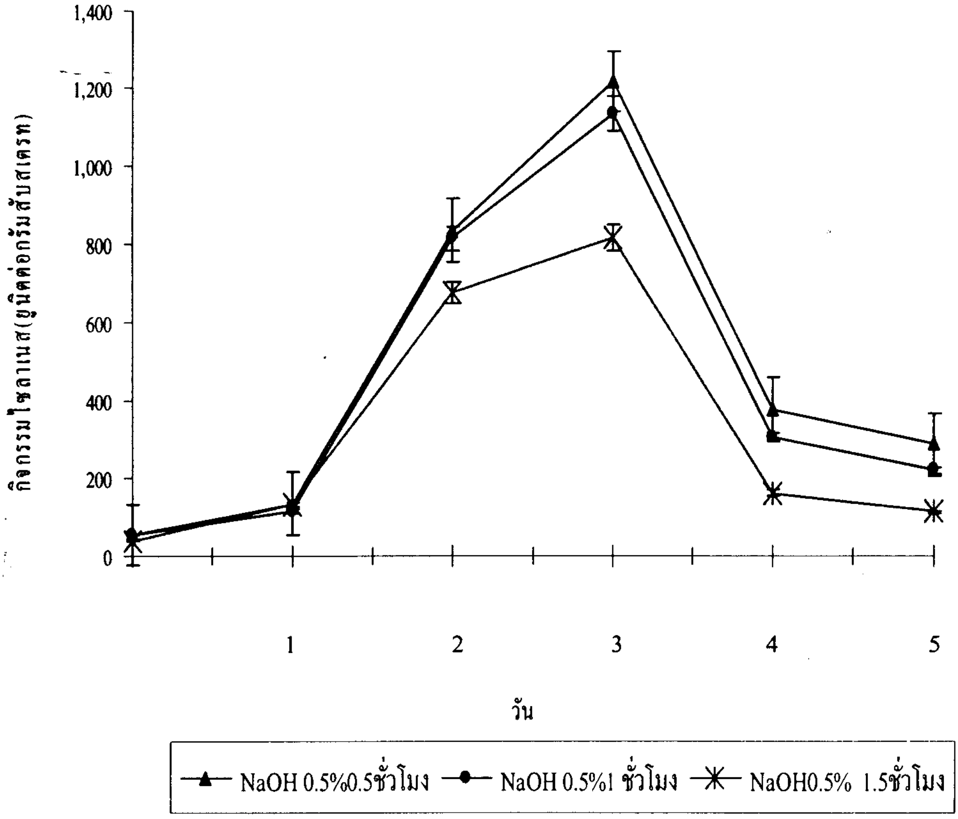
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (feed solution ภาคผนวก ก) ซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์และพีเอชเท่ากับ 7.0 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ ฟางข้าวทำพรีทรีทเมนต์ด้วยการแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้ฟางข้าวเพาะเลี้ยงเชื้อราได้ค่ากิจกรรมเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 820 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนเมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันระยะเวลาในการแช่ฟางข้าวในโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าที่ระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1480 , 1373 และ 1192 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.23 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.15

จากผลการทดลองเมื่อใช้แช่ฟางข้าวแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปรผันระยะเวลาการแช่ 0.5 ชั่วโมง, 1 ชั่วโมง แล 1.5 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดหลังเพาะเลี้ยง 3 วัน และได้ค่ากิจกรรมสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 1217, 1134 และ 817 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ดังแสดงรูปที่ 4.24 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.15
ส่วนเมื่อใช้ฟางข้าวที่แช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่แปรผันระยะเวลาการแช่ 0.5 ชั่วโมง, 1 ชั่วโมง และ 1.5 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรา สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดหลังเพาะเลี้ยง 3 วัน และได้ค่ากิจกรรมสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 518, 485 และ 424 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ดังแสดงรูปที่ 4.25 โดยผลการเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.15

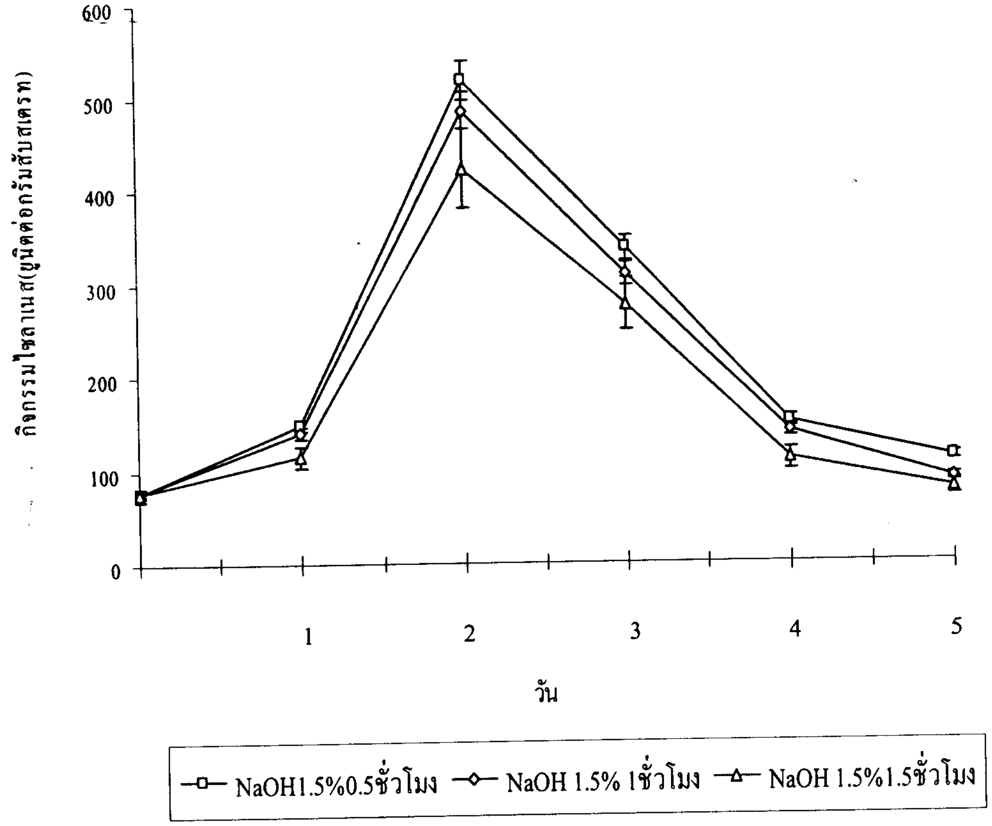
จากผลการทดลองแปรผันความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้แช่ฟางข้าว พบว่าที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาการแช่ 0.5 ชั่วโมง เมื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด รองมาคือที่ระยะเวลาการแช่ 1 ชั่วโมง และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสให้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงกว่าการใช้ฟางข้าวที่มีการแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ




**รูปที่ 4.23** ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175




**รูปที่ 4.24** ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175




**รูปที่ 4.25** ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

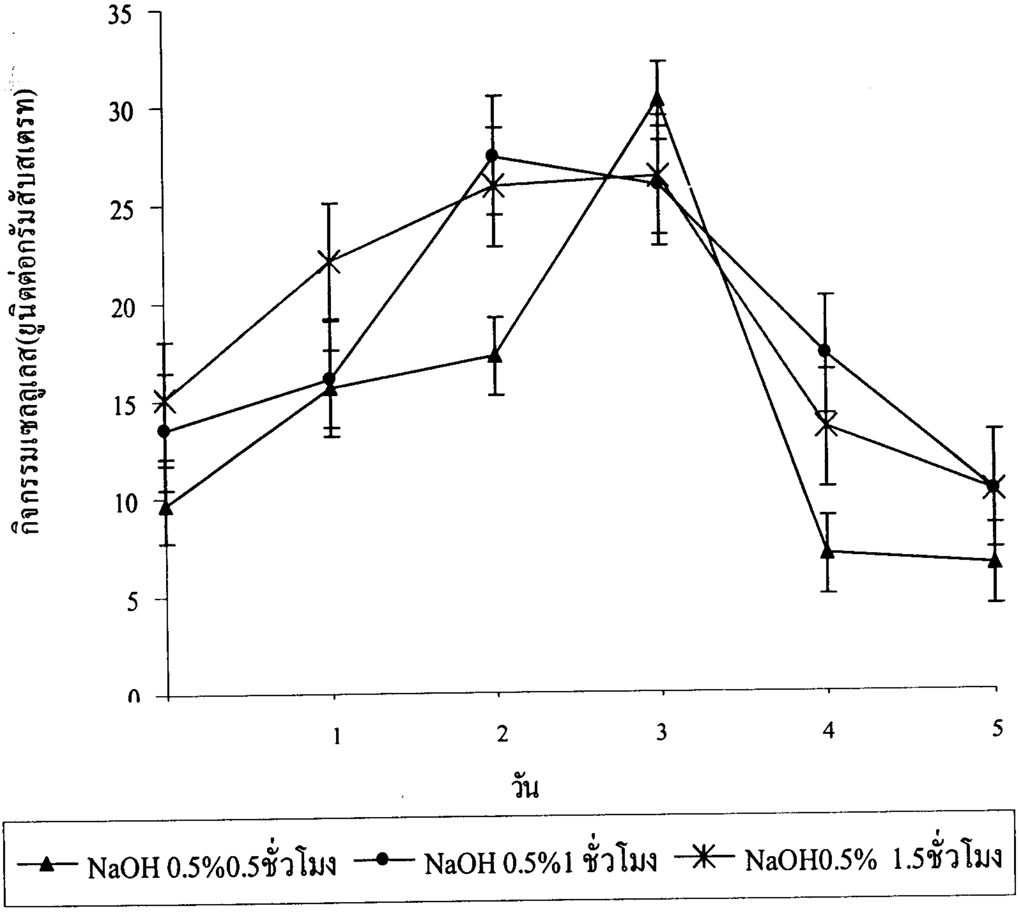
**ตารางที่ 4.15** การเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนฟางข้าวด้วยการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | กิจกรรมไซลาเนสสูงสุด (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|
| ฟางข้าว | 3 | 820[g] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 0.5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง | 3 | 1217[c] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1.0 ชั่วโมง | 3 | 1134[e] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1.5 ชั่วโมง | 3 | 817[f] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 1.0 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง | 3 | 1480[a] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 1.0 เปอร์เซ็นต์ 1.0 ชั่วโมง | 3 | 1373[b] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 1.5 ชั่วโมง | 3 | 1192[d] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง | 3 | 518[h] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 1.0 ชั่วโมง | 3 | 485[i] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 1.5 ชั่วโมง | 3 | 424[g] |

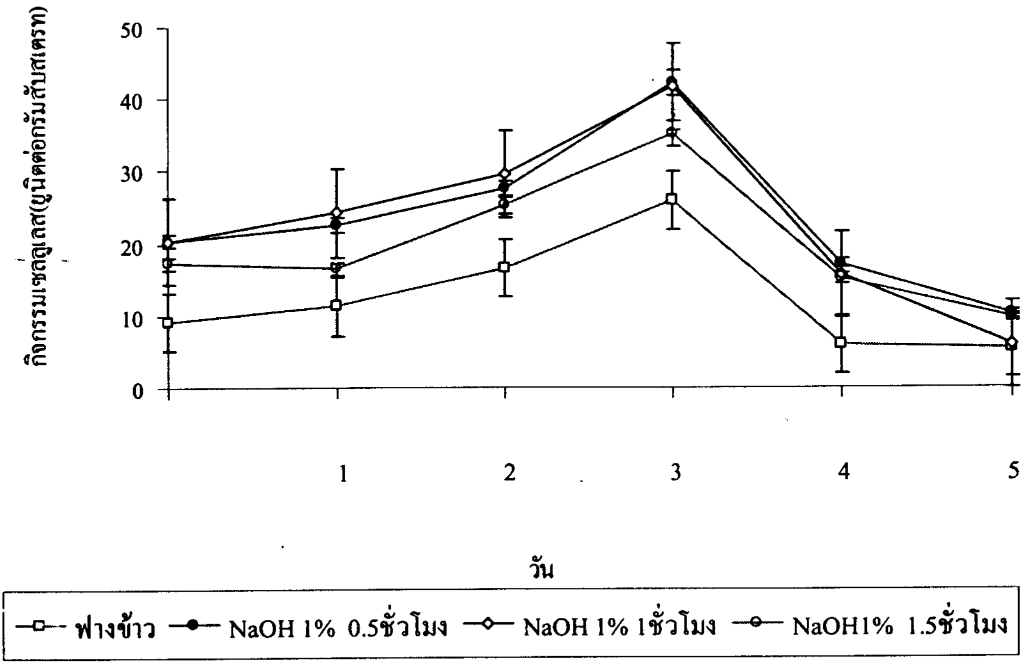
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างกัน

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสแตกต่างกัน

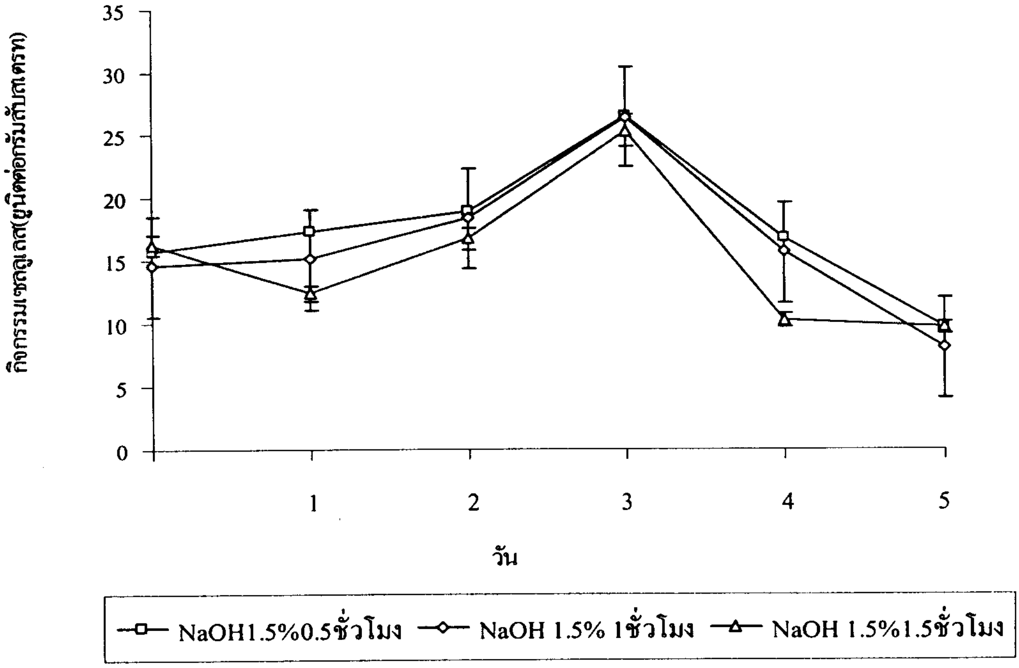
ผลการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อใช้ฟางข้าวพรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด รองลงมาคือการใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมง ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 1.5 ชั่วโมง ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 1 และ 1.5 ชั่วโมง ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง ฟางข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์ ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และให้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 42.05, 41.51, 35.04, 30.19, 27.49, 27.44, 26.47, 26.42, 25.88, และ 25.34 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับแสดงดังรูปที่ 4.26, 4.27 และ 4.28 ส่วนผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.16




**รูปที่ 4.26** ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175




**รูปที่ 4.27** ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175




**รูปที่ 4.28** ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

**ตารางที่ 4.16** การเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนฟางข้าวด้วยการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | กิจกรรมเซลลูเลสสูงสุด (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|
| ฟางข้าว | 3 | 25.88[h] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 0.5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง | 3 | 30.19[c] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1.0 ชั่วโมง | 3 | 27.49[d] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1.5 ชั่วโมง | 3 | 27.44[d] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 1.0 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง | 3 | 42.05[a] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 1.0 เปอร์เซ็นต์ 1.0 ชั่วโมง | 3 | 41.51[ab] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 1.5 ชั่วโมง | 3 | 35.04[b] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง | 3 | 26.47[e] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 1.0 ชั่วโมง | 3 | 26.42[e] |
| ฟางข้าวแช่ด่าง 1.5 เปอร์เซ็นต์ 1.5 ชั่วโมง | 3 | 25.34[ef] |

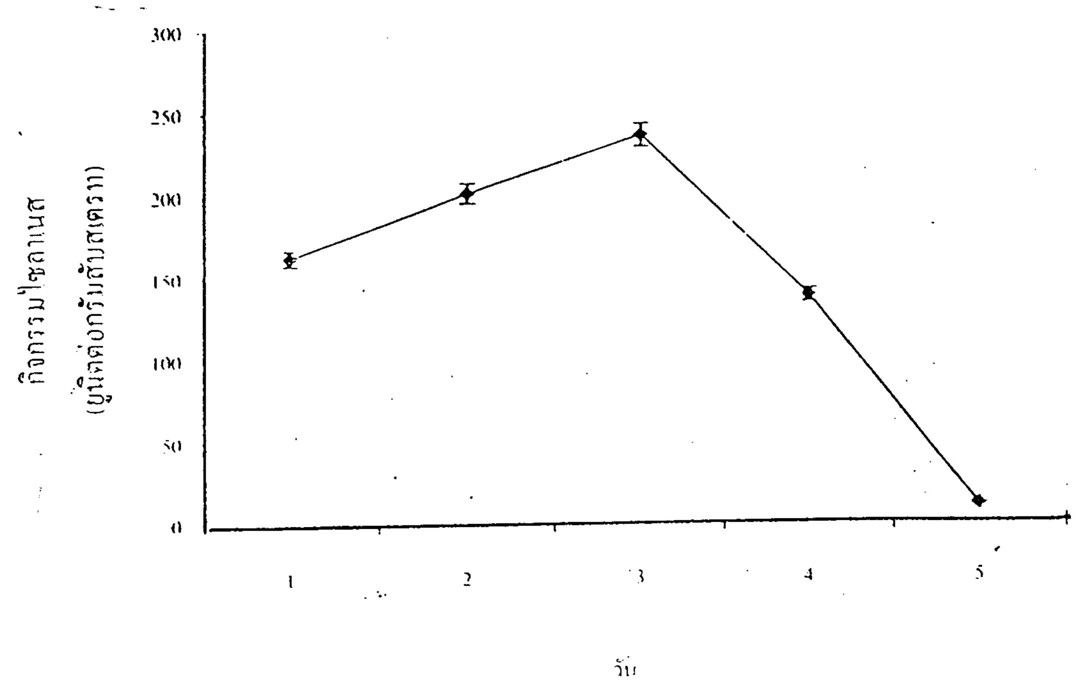
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสไม่แตกต่างกัน

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสแตกต่างกัน

### 4.8 ผลการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 โดยการประยุกต์ใช้แหล่งคาร์บอนคือ ฟางข้าว

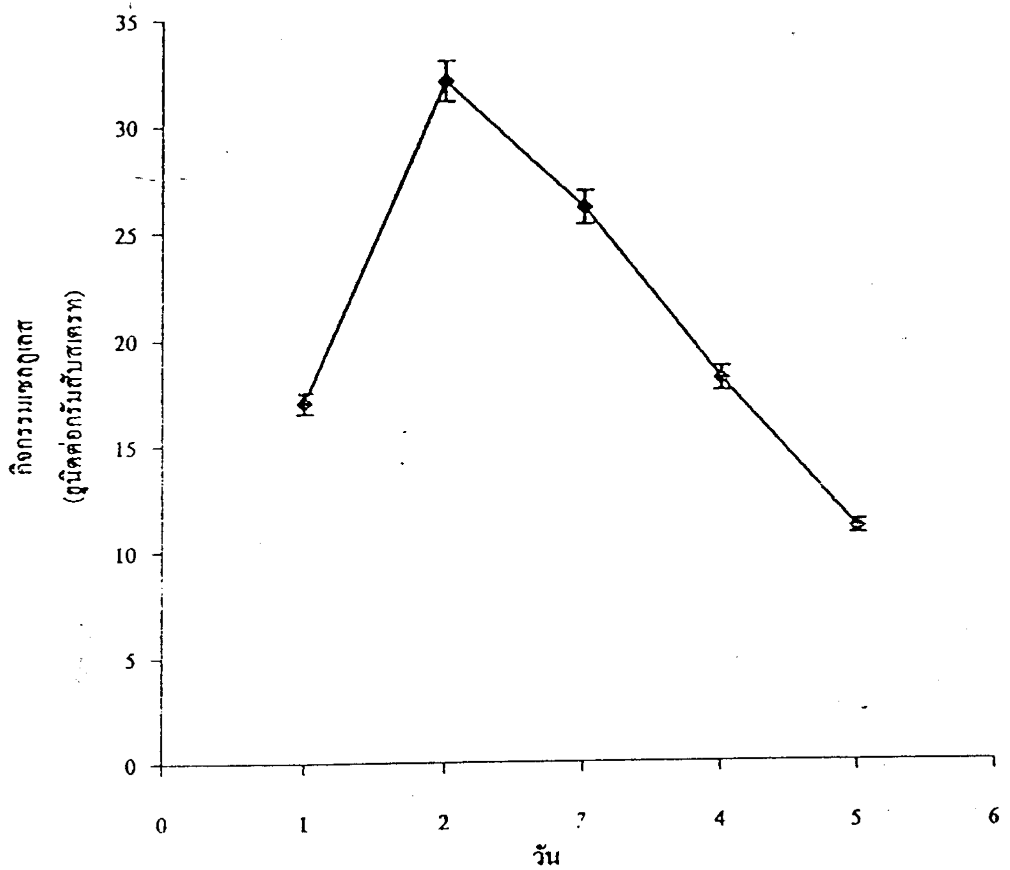
จากผลการทดลองใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 จะได้กิจกรรมไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 162, 201, 236,- 138 และ 102 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในวันที่ 1,2 ,3,4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ดังแสดงรูปที่ 4.29 โดยวันที่ 1 ถึง 5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญและหลังจากเพาะเลี้ยง 3 วันให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้สูงสุดและเริ่มลดลงในวันที่ 3 ถึง 5

จากงานวิจัยของ San และคณะ (2003) พบว่า เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *Streptomyces actuosus* A-151 โดยใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมงได้ค่ากิจกรรมไซลาเนส10.3 ยูนิตต่อกรัมสับสเตท ส่วน รำข้าวได้กิจกรรมไซลาเนส 6.6 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท หลังการเพาะเลี้ยง 4 วัน




รูปที่ 4.29 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 จากการประยุกต์ใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

ส่วนการใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมง ได้ค่ากิจกรรมเซลลูเลส เท่ากับ 17, 32 , 26, 18 และ 11 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในวันที่ 1,2 ,3, 4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ดังแสดงรูปที่ 4.30




รูปที่ 4.30 ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 จาก
การประยุกต์ใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

## 4.9 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

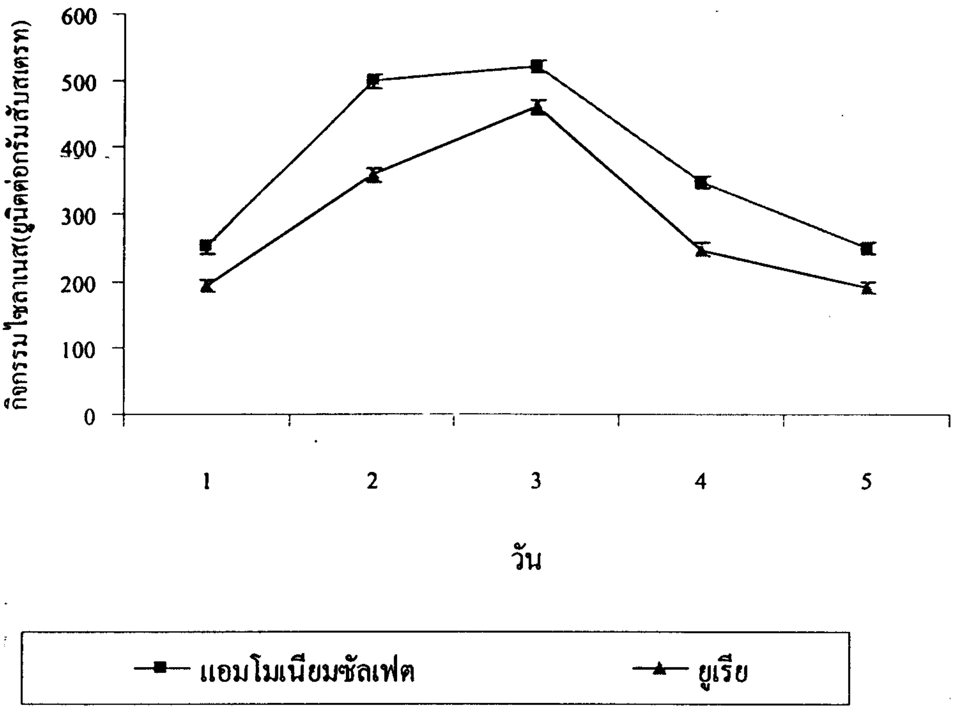
ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยเพาะเลี้ยง *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เมื่อใช้รำข้าวเป็นสับสเตรท โดยมีความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ และมีแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตให้กิจกรรมไซลาเนสสูงกว่ายูเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 2 วัน โดยเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้กิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 520 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมไซลาเนสมีค่าเท่ากับ 460 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ดังแสดงรูปที่ 4.31 และเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราได้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสเท่ากับ 36 และ 25 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ดังแสดงรูปที่ 4.32 โดยเมื่อวัดกิจกรรมไซลาเนส ของรำข้าวได้เท่ากับ 10 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และกิจกรรมเซลลูเลสของรำข้าวได้เท่ากับ 1 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท โดยค่ากิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลสแสดงดังภาคผนวก จ และผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.17

**ตารางที่ 4.17** การเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

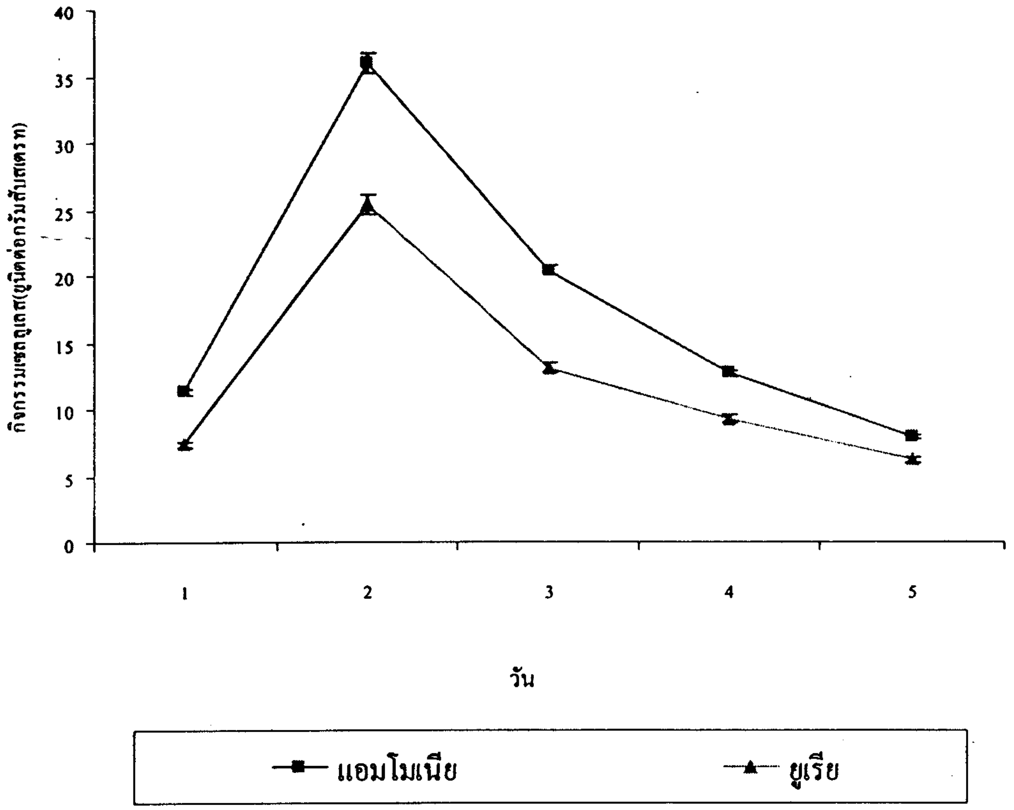
| แหล่งไนโตรเจน | กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต) |
|---|---|
| แอมโมเนียมซัลเฟต | $520^{a}$ |
| ยูเรีย | $460^{b}$ |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส แตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย เมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อราสามารถผลิตไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมสูงกว่าเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังแสดงรูปที่ 4.31 ทั้งนี้เพราะว่าในสารแอมโมเนียมซัลเฟตมีธาตุไนโตรเจนและกำมะถันสูงกว่ายูเรีย จึงทำให้เชื้อราใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีกว่าการใช้ยูเรีย




รูปที่ 4.31 ผลของกิจกรรมไซลาเนส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR3175

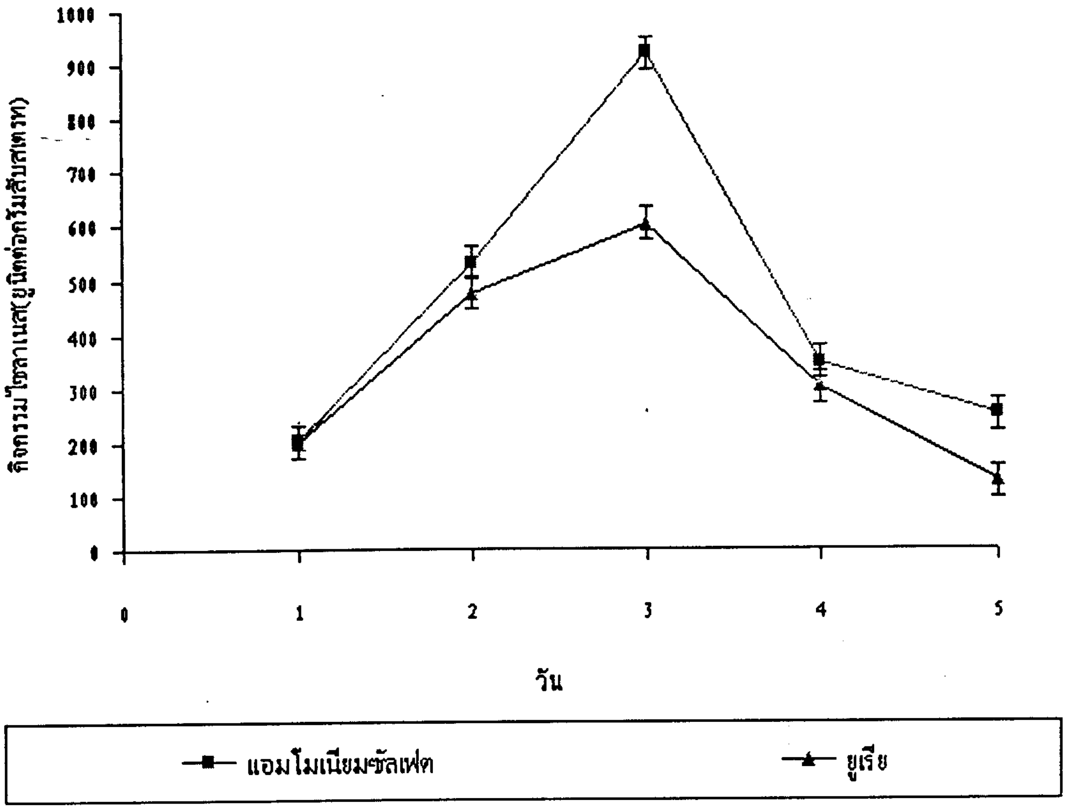



รูปที่ 4.32 ผลของกิจกรรมเซลลูเลส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย เมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR3175

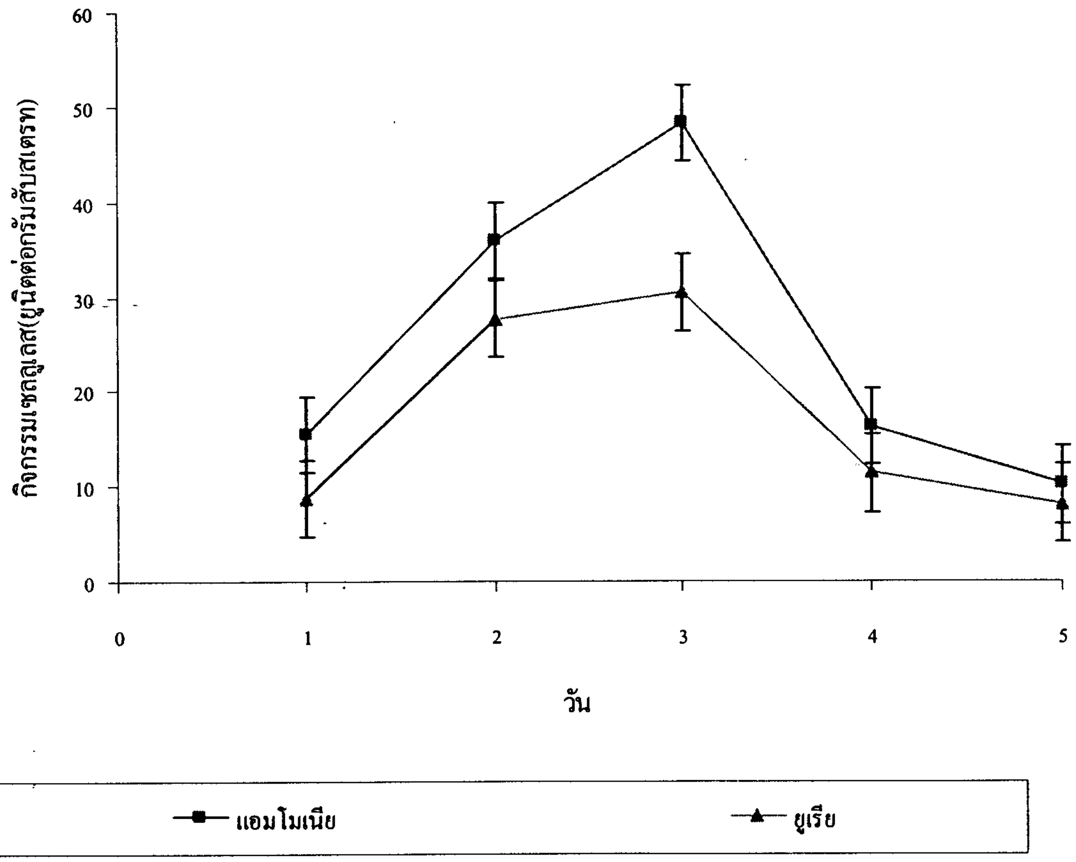
ปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) รายงานว่ากิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลสจากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเป็น 252.82 และ 4.15 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ และเมื่อใช้ยูเรีย กิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลส เท่ากับ 161.53 และ 8.75 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ซึ่งการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงเช่นกัน

จากผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยเพาะเลี้ยง *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เมื่อใช้ฟางข้าวแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เวลา 0.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ และมีแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตให้กิจกรรมไซลาเนสสูงกว่ายูเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 3 วัน โดยเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้กิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 920 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมไซลาเนสมีค่าเท่ากับ 602 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ดังแสดงรูปที่ 4.33 และเมื่อใช้แอมโมเนียมและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพาะเลี้ยงเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ได้ค่ากิจกรรมเซลลูเลสเท่ากับ 48 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และ 30 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ ดังแสดงรูปที่ 4.34 โดยเมื่อวัดกิจกรรมไซลาเนสของฟางข้าวได้เท่ากับ 15 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และกิจกรรมเซลลูเลส 5 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท โดยค่ากิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลสแสดงดังภาคผนวก จ และผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.18

เมื่อเปรียบเทียบแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งพบว่าการผลิตไซลาเนสในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ค่ากิจกรรมไซลาเนสเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนสูงกว่าเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงรูปที่ 4.28 ทั้งนี้เพราะว่าแอมโมเนียมซัลเฟตมีธาตุไนโตรเจนและกำมะถันอยู่สูงกว่ายูเรีย




รูปที่ 4.33 ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย เมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียม1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยเชื้อรา*Fusarium moniliforme* TISTR 3175




**รูปที่ 4.34** ผลของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย เมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียม1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยเชื้อรา*Fusarium moniliforme* TISTR 3175

**ตารางที่ 4.18** การเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน ต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

| แหล่งไนโตรเจน | กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|
| แอมโมเนียมซัลเฟต | 920[a] |
| ยูเรีย | 602[b] |

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างกัน

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสแตกต่างกัน

## 4.10 ผลการศึกษาการเจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จากไซแลน ธูปฤาษี รำข้าว ผักตบชวา

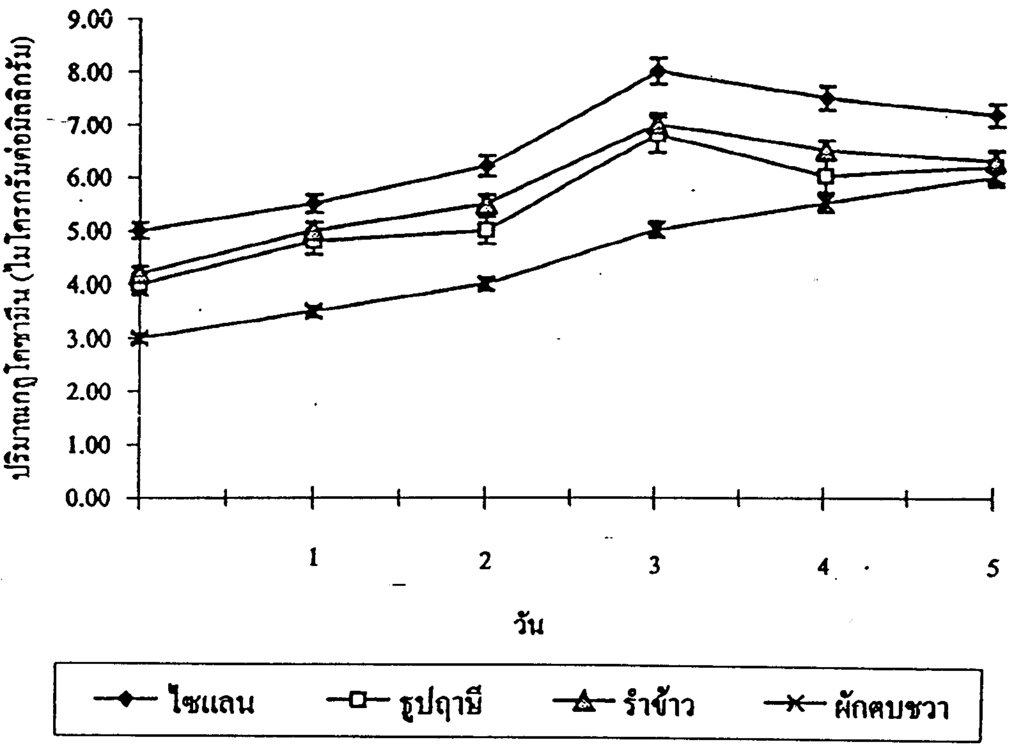
จากการการวิเคราะห์การเจริญของ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

ผลศึกษาการเจริญของ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 โดยการใช้ธูปฤาษีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณกลูโคซามีนที่ได้เป็น 2.2, 2.4, 3, 3.5, 4.2 และ 3.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อราวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ ผักตบชวาเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณกลูโคซามีน 2, 2, 3, 3.6, 4.6 และ 3.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม หลังการเพาะเลี้ยงเชื้อราวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าปริมาณกลูโค-ซามีน 3, 3.4, 3.6, 3.7, 5.7 และ 4.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อราวันที่ 0,1, 2, 3, 4, 5 ตามลำดับ ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า ปริมาณกลูโคซามีน 4, 5, 5.6, 8, 10 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อราวันที่ 0,1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.35

จากผลที่ได้พบว่าศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นไซแลน พบว่าการเจริญของ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มากที่สุด รองมาคือ รำข้าว ธูปฤาษี และ ผักตบชวาตามลำดับ

จากการวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) เมื่อใช้ธูปฤาษีเป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณกลูโคซามีน 2.6, 2.8, 3.4, 4.6 และ 3.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย โดยมีปริมาณกลูโคซามีนสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 3 และมีปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

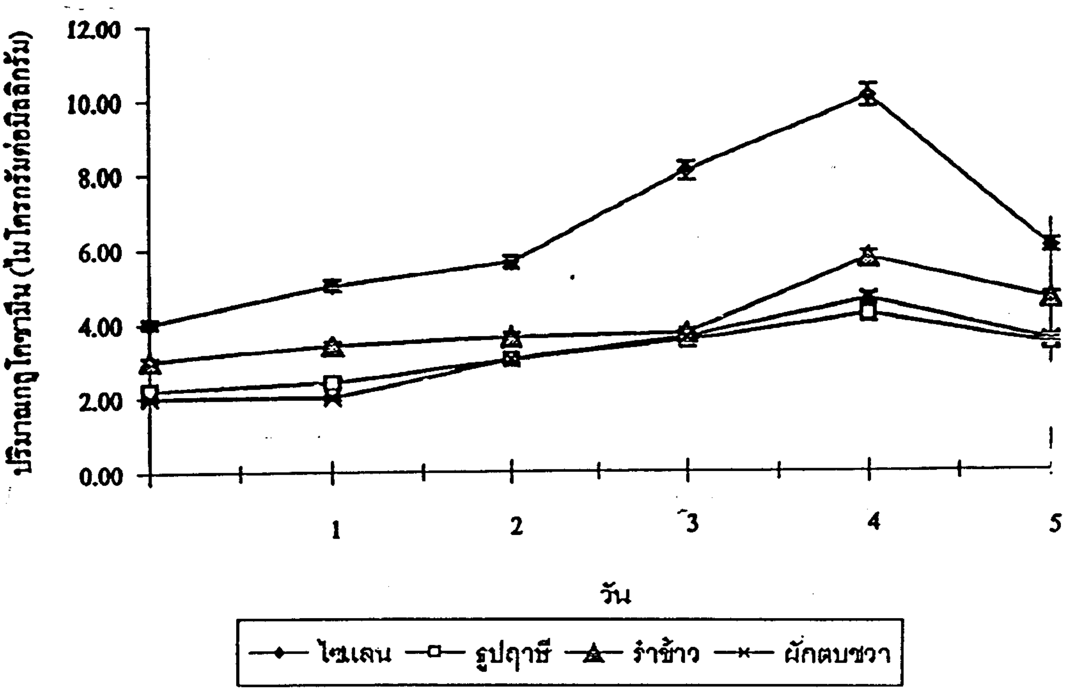
ผลศึกษาการเจริญของ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ธูปฤาษีเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณกลูโคซามีนเป็น 4, 4.8, 5, 6.8, 6 และ 6.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อราวันที่ 0,1, 2, 3, 4, 5 ตามลำดับ ผักตบชวาเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณกลูโคซามีน 3, 3.5, 4, 5, 5.5 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อราวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณกลูโคซามีน 4.2, 5, 5.5, 7, 6.5 และ 6.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อราวันที่ 0,1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณกลูโคซามีน 5, 5.5, 6.2, 8.0, 7.5 และ 7.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อราวันที่ 0,1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.36




รูปที่ 4.35 การเจริญโดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR3175เมื่อใช้ธูปฤาษี รำข้าว ผักตบชวา และไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

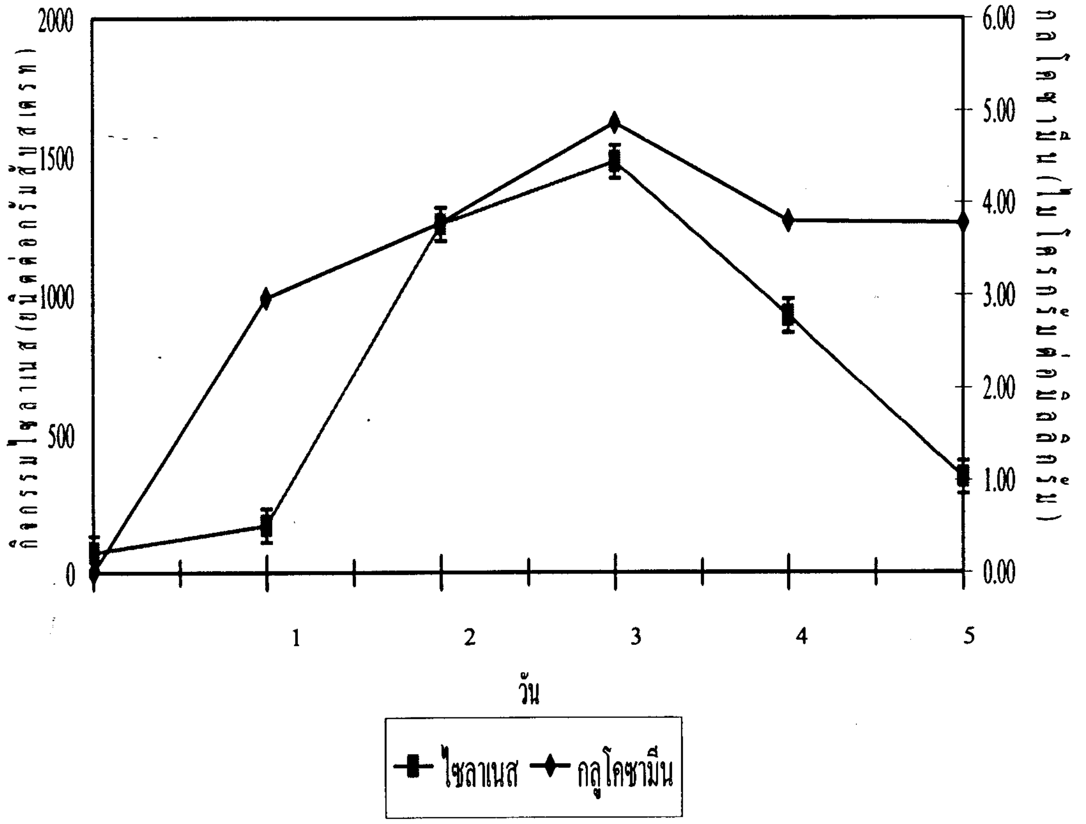
จากผลที่ได้พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นไซแลน พบว่าการเจริญของ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 มากที่สุด รองมาคือ รำข้าว ธูปฤาษี และ ผักตบชวาตามลำดับ

งานวิจัยซึ่งสอดคล้องกันคือ จากการวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) ธูปฤาษี ปริมาณกลูโคซามีนเป็น 4.6, 5 , 5.3, 7.2, 6.2 และ 5.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ โดยมีปริมาณกลูโคซามีนสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 3 และมีปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR 3159




รูปที่ 4.36 การเจริญโดยเชื้อรา *Aspergillus foetidus* TISTR3195 เมื่อใช้ธูปฤาษี รำข้าว ผักตบชวาและไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาการวิเคราะห์การเจริญของ *Fusarium monilieforme* TISTR 3175 เมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราถูกผลิตขึ้นพร้อมกับการเจริญของเชื้อ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.37




**รูปที่4.37** กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและปริมาณกลูโคซามีนที่วิเคราะห์จาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน

## 4.11 ผลการทดลองการทำเอนไซม์ไซลาเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน

จากการตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 0 ถึง 20, 20 ถึง 30, 30 ถึง 40, 40 ถึง 50, 50 ถึง 60, 60 ถึง 70 และ70 ถึง 85 แล้วค่ากิจกรรมไซลาเนส *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เท่ากับ 60, 72, 109, 115, 102, 90 และ 80 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังนั้นผลที่ได้แสดงว่าหลังจากตกตะกอน crude enzyme ด้วยแอมโมเนียซัลเฟตจนอิ่มตัว และทำอัลตราเซนตริฟิวส์ ได้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดในช่วง 40 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ค่ากิจกรรมทั้งหมด 115 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยมีความบริสุทธิ์ 7.95 เท่า และมีผลได้ของเอนไซม์เท่ากับ 3.61 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นพบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 909 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนโดยมีความบริสุทธิ์เท่ากับ 62.82 เท่า ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.19 และแล้วค่ากิจกรรมไซลาเนส *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เท่ากับ 80, 92, 98, 103, 116, 106 และ 99 ยูนิต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังนั้นผลที่ได้แสดงว่าหลังจากตกตะกอน crude enzyme ด้วยแอมโมเนียซัลเฟตจนอิ่มตัว และทำอัลตราเซนตริฟิวส์ ได้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดในช่วง 50 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ค่ากิจกรรมทั้งหมด 116 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยมีความบริสุทธิ์ 7.12 เท่า และมีผลได้ของเอนไซม์เท่ากับ 3.56 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นพบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 938 ยูนิตต่อมิลลิลิกรัมโปรตีนโดยมีความบริสุทธิ์เท่ากับ 57.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.20

ส่วนรายงานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) การตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ช่วงที่ใช้คือความอิ่มตัว 40 ถึง 60 และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความอิ่มตัว 50 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และทำอัลตราฟิวเตรชั่นได้กิจกรรมทั้งหมด 73.18 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนรายงานวิจัยของ Oakley และ คณะ (2003) พบว่า การตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Bacillus subtillis* B230 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ช่วงที่ใช้คือความอิ่มตัว 40 ถึง 50

ตารางที่ 4.19 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 ให้บริสุทธิ์

| ขั้นตอน | ปริมาตร (มิลลิลิตร) | โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม) | กิจกรรมไซลาเนสทั้งหมด (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) | กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) | ความบริสุทธิ์ (เท่า) | ผลได้ (เปอร์เซ็นต์) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| crude enzyme | 500.00 | 1090 | 15560 | 14.44 | 1 | 100 |
| การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัว 40 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ | 11.20 | 4.3 | 561.2 | 115.1 | 7.95 | 3.61 |
| อัลตราฟิวเตรชั่น | 5.90 | 0.229 | 224.3 | 909 | 62.82 | 1.4 |

ตารางที่ 4.20 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ให้บริสุทธิ์

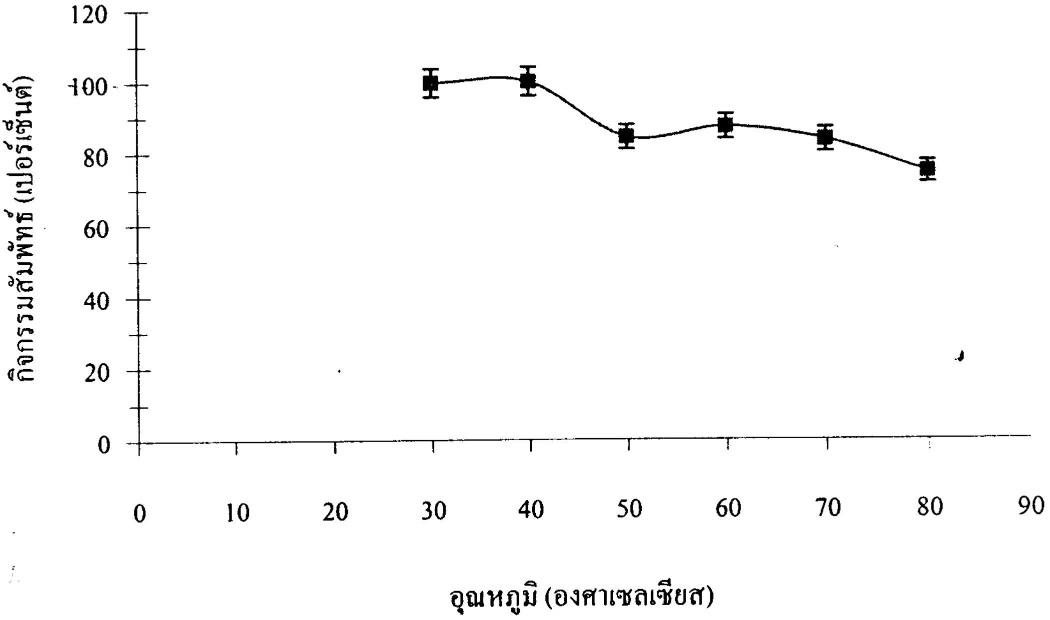
| ขั้นตอน | ปริมาตร (มิลลิลิตร) | โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม) | กิจกรรมไซลาเนสทั้งหมด (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) | กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) | ความบริสุทธิ์ (เท่า) | ผลได้ (เปอร์เซ็นต์) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| crude enzyme | 500.00 | 1135 | 17430 | 16.3 | 1 | 100 |
| การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัว 50 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ | 20.00 | 5.2 | 620.1 | 116 | 7.12 | 3.56 |
| อัลตราฟิวเตรชั่น | 10.50 | 0.36 | 230.2 | 938 | 57.5 | 1.23 |

## 4.12 ผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนส

### 4.12.1ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก

***Fusarium moniliforme* TISTR 3175** อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 40 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสัมพัทธ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออุณหภูมิ 30, 60. 50 ,70 และ 80 ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ 100, 87, 84, 83 และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.38 ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมไซลาเนสที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และเอนไซม์ไซลาเนสสามารถทนอุณหภูมิได้สูงสุดที่ 40 และ30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสต่ำสุด

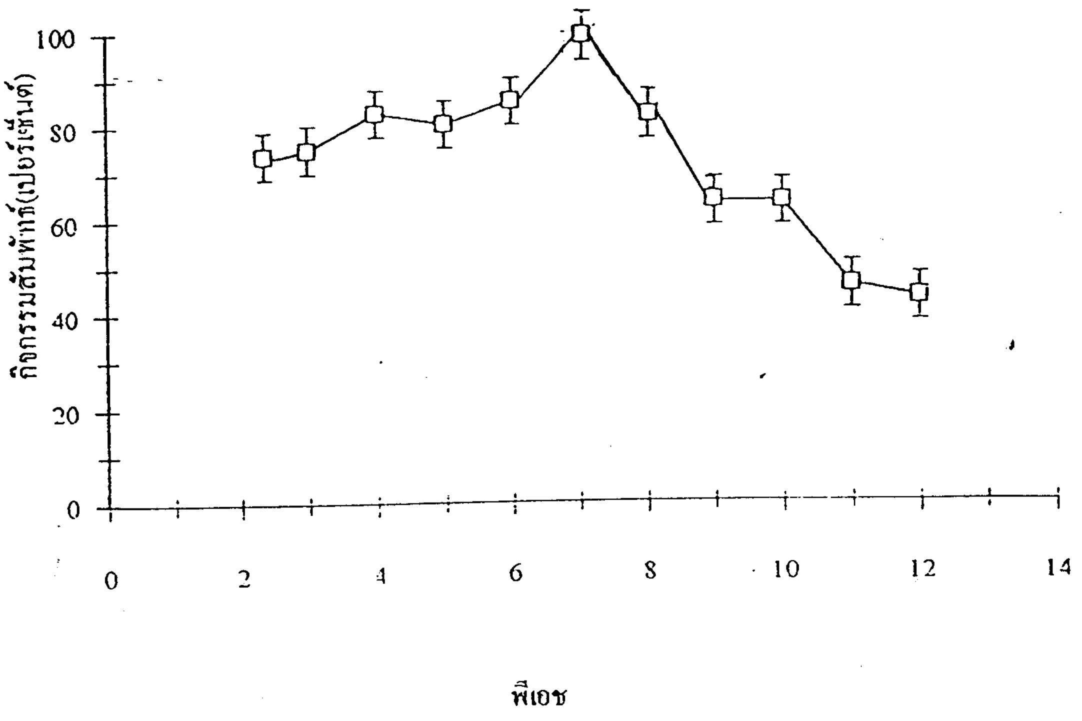
จากการวิจัยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราคือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ 50 องศาเซลเซียส และจากงานวิจัยของ จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ (2546) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus nidulans* KK-99 และ *Bacillus halodurans* เป็น 40 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ ส่วนงานวิจัยของ Kang และ Rhee (1996) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อ *Cephalosporium* sp. คือ 50 องศาเซลเซียส และงานวิจัยของ Evangelos และคณะ (2003) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเอนไซม์ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* คือ 55 องศาเซลเซียส




**รูปที่ 4.38** อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส ที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

**4.12.2 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175** พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือพีเอช 7 โดยมีค่ากิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 371 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคือพีเอช 6, 4, 5, 8, 3, 2.6, 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของไซลาเนสเป็น 100, 89, 85, 82, 80, 75, 72, 63, 63 และ 43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.39

จากผลที่ได้พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส คือ 7 ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) ซึ่งได้พีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 4.0 ส่วนงานวิจัยของ Gianni และคณะ (2002) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *F. oxysporum* คือ 7.0 และงานวิจัยของ Evnagelos และคณะ (2003) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *F. Oxysporum* คือ 7.0 และงานวิจัยของ Johnsonและคณะ (1999) พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Thermomyces lanuginosus*-SSBP พีเอชที่เหมาะสมคือ 7 และจากงานวิจัยของ Kavita และ Saurah (2002) พบว่าความเสถียรของไซลาเนสที่ 55 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillu nidulans* KK พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไซลาเนสคือ 8.0

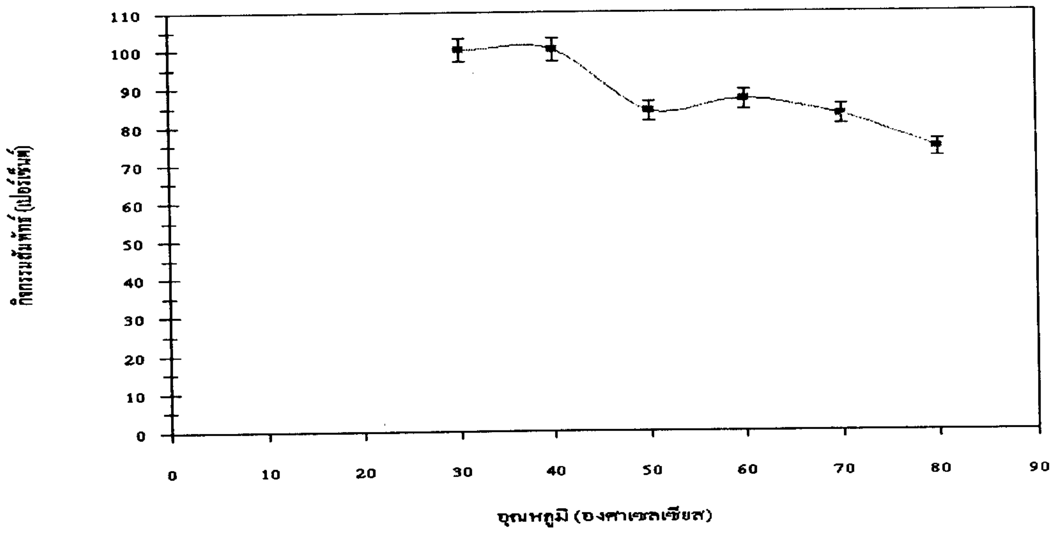



รูปที่ 4.39 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

**4.12.3 ผลของความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิ**

**4.12.3.1 ผลของความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่ออุณหภูมิ** โดยบ่มเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 30, 60, 50, 70 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 70 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 87, 83 และ 74 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.40

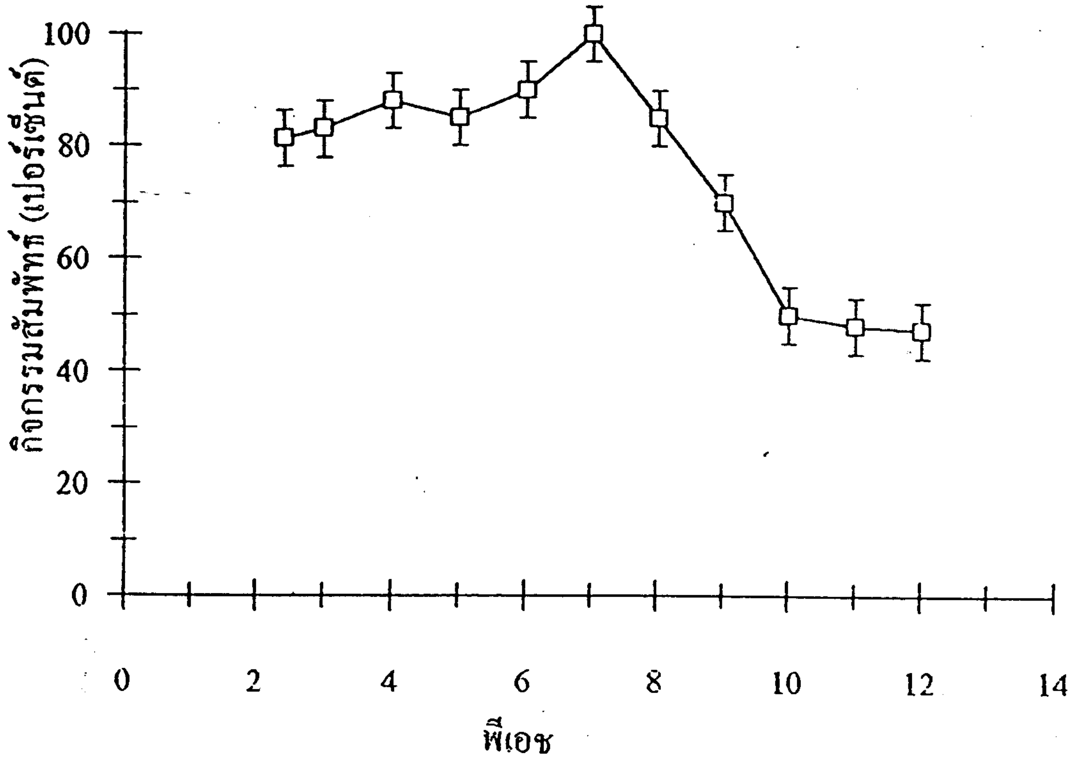
จากการวิจัยนี้พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ (2546) ที่พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสมีเสถียรภาพดีในช่วงอุณหภูมิ 40 ถึง 60 องศาเซลเซียส ส่วนงานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซีย Bengal (2001) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Penicillum griseoroseum* RR-99 มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส San และคณะ (2003) พบว่าอุณหภูมิที่มีความคงตัวต่อเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Streptomyces actyosus* A-151 คือ 40 ถึง 60 องศาเซลเซียส ส่วน Pereira และ คณะ (2003) พบว่าอุณหภูมิที่มีความคงตัวต่อเอนไซม์ไซลาเนสของ *Bacillus subtillis* CCMI คือ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส และจากงานวิจัยของ Kavita และ Saurah (2002) พบว่าอุณหภูมิที่มีความคงตัวต่อเอนไซม์ไซลาเนสของ *Aspergillus nidulans* KK-99 คือ 50 ถึง 55 องศาเซลเซียส




**รูปที่ 4.40** ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนส ที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในรำข้าวต่ออุณหภูมิ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที

**4.12.3.2 ผลของความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสต่อพีเอช** โดยบ่มเอนไซม์ที่พีเอชต่าง ๆ ได้แก่ 2.6, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 และ 12.0 เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิต จาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีความคงตัวที่พีเอชในช่วงกว้าง คือ ช่วงพีเอช 2.6 ถึง 12.0 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 47.22 ถึง 100 สัมพัทธ์ ดังแสดงในรูปที่ 4.41

จากการวิจัยพบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ที่พีเอช 2.6 ถึง 9.0 อยู่ในช่วง 80.62 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยงานวิจัยของปราง ประไพ รอดบำเรอ (2546) เอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อรามีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ที่พีเอช 2.6 ถึง 9.0 อยู่ในช่วง 56.95 ถึง 64.77 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Johnson และคณะ (1999) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่พีเอช 3 ถึง 12 จากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* SSBP คือ 5-95 เปอร์เซ็นต์ และมีความคงตัวที่พีเอช 6 ถึง 12 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kyu และ Ratanakhanokchai (2001) ผลของความคงตัวต่อพีเอชจากเชื้อ *Bacillus* sp. K-1 อยู่ในช่วงพีเอชกว้าง 7 ถึง 11 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ 83-99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ จากงานวิจัยของ Kavita และ Saurah (2002) ผลของความคงตัวที่พีเอชมีช่วงกว้าง 3 ถึง 12 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไซลาเนส 65 ถึง 55 เปอร์เซ็นต์ จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus nidulans* KK-99 ส่วน Antony และคณะ (2002) พบว่า *A. fumigatus* AR1 มีช่วงพีเอชคงตัวที่ช่วง 5 ถึง 9 มีค่ากิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 135 ถึง 30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ Evangelos และคณะ (2003) พบว่า *Fusarium oxysporum* สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสซึ่งมีความเสถียรที่พีเอช 7.0-9.0

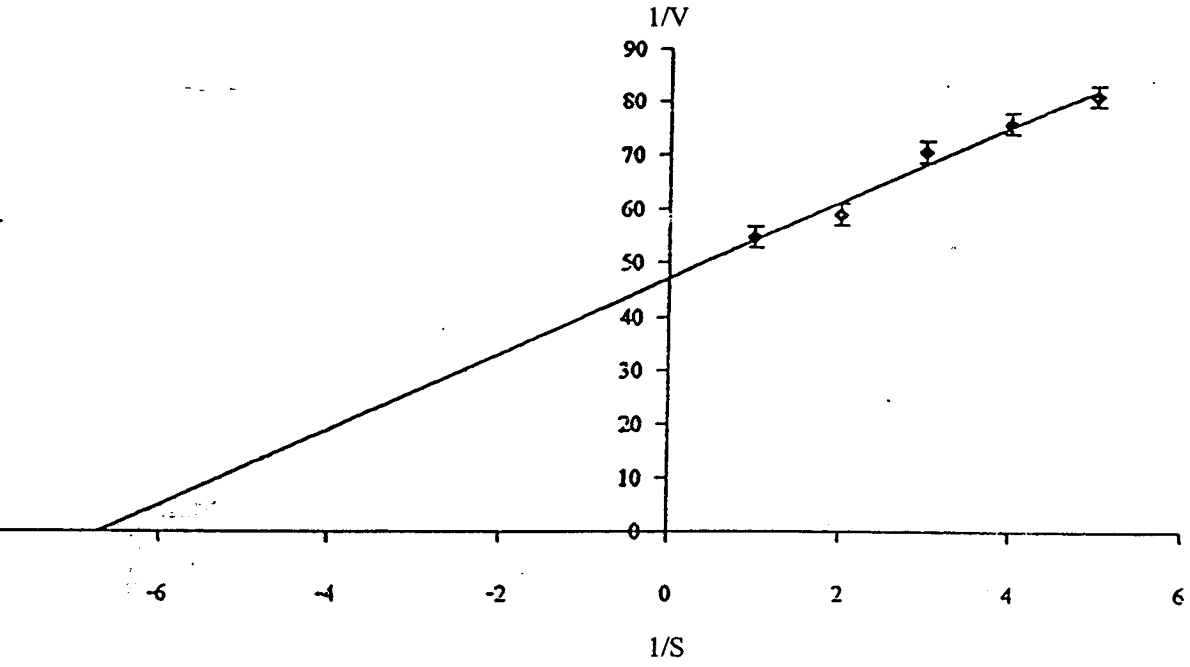



**รูปที่ 4.41** ความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ต่อพีเอชเมื่อบ่มที่พีเอชต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที

## 4.13 การศึกษาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ไซลาเนส( $K_m$, $V_{max}$)

หลังจากทำการบ่มเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175ในรำข้าว กับ ไซแลน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1,2 ,3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเวลาต่าง ๆ คือ ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างน้ำตาลที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ เพื่อศึกษาอัตราเร็วเริ่มต้นปฏิกิริยา และอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ได้มาเขียนกราฟ Lineweave-burk ระหว่าง 1/S และ 1/V เพื่อคำนวณหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทและอัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มต้น ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.42 โดยพบว่า *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 14.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าอัตราเร็วปฏิกริยาเริ่มต้นเท่ากับ 212.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที

จากงานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 14.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้นเท่ากับ 303.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที จากงานวิจัยของ Johnson และคณะ (1999) เชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* –SSBP มีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 3.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้นเท่ากับ 6300 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ส่วนรายงานวิจัยของ Pereira และคณะ (2002) เชื้อ *Bacillus subtilis* มค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 1.56 กรัมต่อลิตร มีอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุดเท่ากับ 11.5 ไมโครโมลต่อนาที



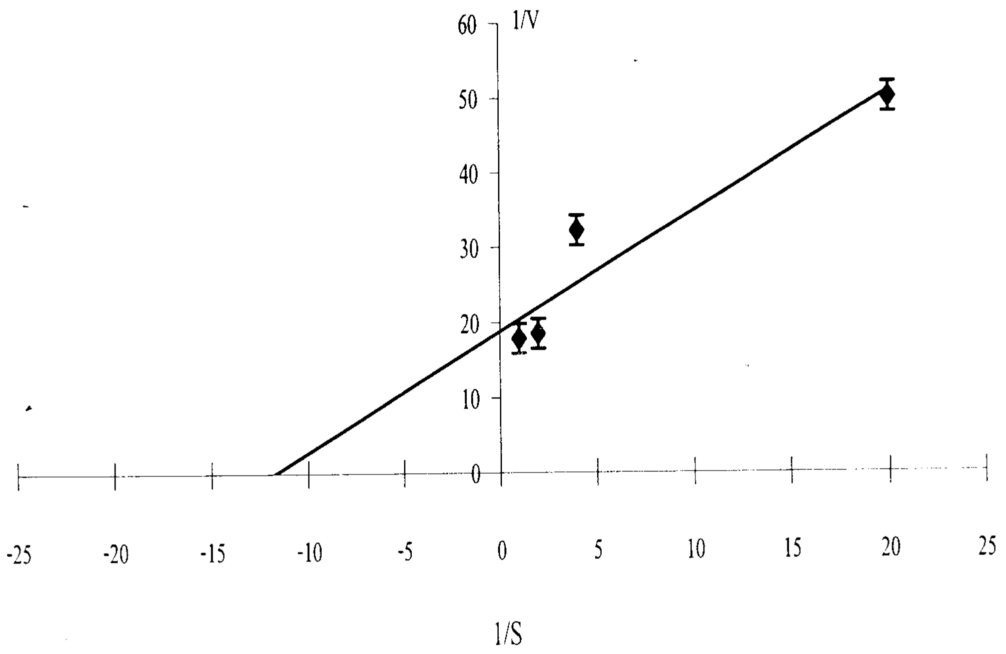

**รูปที่ 4.42** ผลแสดงค่าระหว่าง 1/V และ 1/S ของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

### 4.14 การศึกษาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท และอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด ของเอนไซม์เซลลูเลส ( $K_m$, $V_{max}$)

เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175กับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.1, 0.5 ,1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเวลาต่าง ๆ คือ ที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างน้ำตาลที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ เพื่อศึกษาอัตราเร็วเริ่มต้นปฏิกิริยา และอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ได้มาเขียนกราฟ Lineweave-burk ระหว่าง 1/S และ 1/V เพื่อคำนวณหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทและอัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มต้น ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.43 โดยพบว่า *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 8.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้นเท่ากับ 5.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที

จากงานวิจัยของปรางประไพ รอดบำเรอ (2546) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทเท่ากับ 11.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้นเท่ากับ 15.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที

จากการวิจัยพบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนซึ่งผลิตได้จากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ยังคงมีเอนไซม์เซลลูเลสปนอยู่ และค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์เซลลูเลสมีค่าน้อยกว่าค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ไซลาเนส และมีค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์เซลลูเลสน้อยกว่าค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ไซลาเนส จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซลาเนสมากกว่าเอนไซม์เซลลูเลส




**รูปที่ 4.43** ผลแสดงระหว่าง 1/V และ 1/S ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

# บทที่ 5
# สรุปผลการวิจัย

จากผลงานวิจัยพบว่าจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราในสภาวะที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอช 7.0 ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ คือ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีการผลิตกิจกรรมไซลาเนสสูงกว่าการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อ *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 เมื่อใช้ ฟางข้าว รำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวา เป็นแหล่งคาร์บอนทั้งหมด

จากการเปรียบเทียบการใช้วัสดุชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงกว่า เมื่อใช้ รำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวา ตามลำดับ อาจเนื่องจากฟางข้าวมีเฮมิเซลลูโลสสูงกว่ารำข้าว ธูปฤาษีและผักตบชวา ส่วนผลการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อราสามารถผลิตไซลาเนสให้ค่ากิจกรรมสูงกว่าเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ทั้งนี้เพราะว่ามีธาตุไนโตรเจนและกำมะถันเป็นองค์ประกอบในแอมโมเนียมซัลเฟตสูงกว่ายูเรีย ส่วนการเปรียบเทียบการใช้ฟางข้าว รำข้าว ผักตบชวาที่พรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าเชื้อราสามารถผลิตไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมสูงกว่าการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนด้วยการต้มและการไม่พรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอน และการหาสภาวะการพรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์พบว่า เมื่อใช้รำข้าวและฟางข้าวพรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เมื่อเปรียบเทียบการแปรผันความเข้มข้น พบว่าการใช้รำข้าวและฟางข้าวพรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมสูงกว่าเมื่อใช้รำข้าวและฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ ส่วนเมื่อเปรียบเทียบการแปรผันเวลาที่ใช้แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ของแหล่งคาร์บอนรำข้าว ฟางข้าวที่พรีทรีเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่ารำข้าวและฟางข้าวที่แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสให้ค่ากิจกรรมสูงกว่าที่ระยะเวลาการแช่รำข้าวและฟางข้าวด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เวลา 1 และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 พบว่าภายหลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัวร้อยละ 40 ถึง 50 จากนั้นนำมาทำการไดอะไลซิส และผ่านการอัลตราฟิวเตรชัน เอนไซม์ไซลาเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 57.5 เท่า โดยมีค่ากิจกรรมไซลาเนสจำเพาะ 938 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมและพีเอชที่เหมาะสมคือ 40 องศาเซลเซียส และ7.0 ตามลำดับ เอนไซม์ไซลาเนสมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ไซลาเนสมีความคงตัวที่ช่วงพีเอชกว้างคือ 2.6-12.0 ค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท ($K_m$) และค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุดเมื่อใช้ oat spelt xylan เป็นสับสเตรท เท่ากับ 14.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 212.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

**ข้อเสนอแนะ**

เนื่องจากเอนไซม์ไซลาเนสมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและอาหารสัตว์ แต่ราคาเอนไซม์มีราคาสูง ดังนั้นจึงควรศึกษาหาแหล่งวัตถุดิบที่หาง่าย ราคาไม่แพง เช่น เปลือกสับปะรด เปลือกส้ม เศษใบไม้จากต้นแคแสด มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อให้เชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เจริญและผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้มีความจำเพาะต่อสับสเตรท ดังนั้นจึงควรทดลองการนำเอนไซม์ไปใช้ย่อยกระดาษหรือทดลองการนำไปใช้ย่อยอาหารสัตว์ทำให้สัตว์ดูดซึมอาหารได้ดี เป็นประโยชน์ในการนำไปใช้กับอุตสาหกรรมกระดาษหรืออุตสาหกรรมอาหารสัตว์หรือใช้ทางการค้าได้

# บรรณานุกรม


เกรียงศักดิ์ ไชยโรจน์. 2526. "การนำเอนไซม์ไปใช้." **เอนไซม์ จุลินทรีย์ และเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในอาหาร** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะวิทยาศาสตร์.

จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ. 2546. "สายพันธุ์ C-1 ต่อการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและเยื่อกระดาษคราฟท์ต่าง ๆ" **วารสารวิจัยและพัฒนา** 2: 201-217.

ชวนพิศ ดีเอกนามกุล .2536. "การทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยเชื้อรา." **คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม** กรุงเทพฯ : สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

ดวงพร สุวรรณกุล. 2537 "ผักตบชวา" **วัชพืชในประเทศไทย.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรางประไพ รอดบำเรอ. 2546. "การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลน." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ปิยะมาศ สิริแสงสว่าง. 2546. "การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Humicola lanuginose* ด้วยวิธีการหมักในถังหมักทรงกระบอกขนาด 5 ลิตร." วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2530. "เอนไซม์และการประยุกต์ใช้" **เอกสารประกอบการประชุมปฏิบัติการเรื่องเอนไซม์และการประยุกต์ใช้** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยมหิดล คณะวิทยาศาสตร์.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2542. "พรรณไม้น้ำ." **พฤกษศาสตร์.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรพงษ์ โอสถนเคกุล. 2539. "การใช้ผักตบชวาแห้งระดับต่าง ๆ ในอาหารสำหรับเลี้ยงห่าน." **รายงานประจำปีกองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์** กรุงเทพฯ : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วิชิต สุวรรณ์ปรีชา. 2546. "วัชพืชในไทย." **พฤกษาในวรรณคดี** กรุงเทพฯ : ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2541. "การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Sporotrichum pulverulentum* ในสภาพอาหารเหลว." **วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.** 14 :30-37.

Anthony, T.,Chandra Raj, K., Rajendran, A. and Gunasekaran, P. 2003 . "High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant*Aspergillus fumigatus* AR1". **Enz. Microb. Technol.** 32 : 647–654.

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

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

Bacon, A., Hamer, L. and Stevenson, A. "Purification and characterization of a moderatelythermo-stable xylanase from *Bacillus* sp." **Enz. Microb. Technol**. 26: 187-192.

Bailey, M. J.,Laenen, E. and Smith, J. 1992. "Purification and properties of two xylanase from *Aspergillus oryzae*." **Biotech. Appl. Biochem**. 13 : 380-389.

Bailey, M. J., Buchert, J. andViikari, L. 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. 2001. "An endo-β-1,4- xylanase from Rhizopus oryzae : production, partial purification and biochemical characterization." **Enz. Microb. Technol.** 29 : 328-334.

Barber, S., Weinhardt, A.B. and Roberts, M. 1974. "Basic and applied research needs for optimizing ultilization of rice bran as food and feed." **Agro. Food Technol.** 4: 1-99.

Bengal, W. 2001. "Production of alpha amylase and xylanase an alkalophilic strain of *Penicillum griseorose* RR-99." **Acta Microb. Polonica**. 50 : 3-4.

Bisson, S., Singh, S. and Pillay, B. "Production of xylanase from *Bacillus* sp." **Develop. Biotech. South Africa.** 1 : 1-24.

Castellanos, O. F., Burn, E. and Tomme, P. 1995. "Comparative evalution hydrolytic efficiency toward microcrystalline cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* cellulase." **Bioresource Technol.** 52 : 119-124.

Cesar, A. and Mrsa, R. 1996 "Purification and properties of the xylanase produced by *Thermomyces lanuginorus*." **Enz. Microb. Technol.** 19 : 289-295.

Chandra, R., McIntosh L.P. and Haynes, CA. 2004 . "Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi *Phylosticta* spp. MPS-001 and *Aspergillus* spp. MPS-002". **Process Biochem.** 1-7

Chen, C.C., Sundquist, A and Linko, J. 1997. "Release of lignin from kraft pulp by a hyperthermophilic xylanase from *Thermatoga maritimae*." **Enz. Microb. Technol.** 20 : 39-45.

Chen, G.C., Chen, J.L and Yang,L. 2004. "Purification and characterization of xylanase from *Trichoderma langibrachiatim* for xyloloigosaccharide production." **Enz. Microb. Technol.** 21 : 91-96.

Christov, L.P., Myburgh J., Van, T. A., and Prior, B. 1999. "Modification of the carbohydrate compositon of suflfite pulp by purified and characterization xylanase of *Aureobasidium pulullans*." **Biotechnol Progress.** 15 :196-200.

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." **Adva. Carbohydr. Biochem.** 32 : 277-352.

Evangelos, T., William, J. and McManamey, A. 2003. "Purification and characterization of a *Fusarium oxysporum* feruloyl esterase (FoFAE-I) catalysing transesterification of phenolic acid esters". **Enz. Microb. Technol.** 33 :729–737

Gattinger,L.D., Duvnjak, Z. and Khan, A.W. 1990 "The use of canola meal as a substrate for xylanases production by from *Trichoderma reesei*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 33 : 21-25.

Gerand, A.W., Ronar, F.P. and Denis, R.H., 1993. "Enzyme in the animal-feed industry." **Trends Biotech.** 11 : 424-430.

Ghaneam, K., Jomhoor, J. and Man, R. 2002. "Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid state cultures application of the plecktt-burman experimental design to evaluate nutritional." **Biotechnol.** 2 : 7-105.

Gianni, P., Heburaud, M. and Yoshioka, H. 2002. "Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation." **Ind. Cro. Pro.** 18 : 37 -45

Godfrey, T. and West, S. 1992. "The application of enzymes in industry." New York. **Indust. Enzymol.** 2: 132-141.

Gokhale, DV., Puntambekar, U.S and Deobagkar, D.N. 1986. "Xylanase and beta-xylosidase production by *Aspergillus niger* 1207." **Biotechnol. Lett.** 8 : 137-138.

Gomes, J., Steiner, W. and Esterbauer, H. 1991 . "Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*." **Appl. Microb. Biotechnol.** 36 :701-707.

Happla, R., Parkkinen, E., Suominen, P. and Linko, S. 1996. "Production of endo-1,4 –glucanase and xylanase with nylon-web immobilized and free *Trichoderma reesei*." **Enz. Microb. Technol.** 31: 253-263.

Hundson, R. Reeves, G.H. and Bisson, P.A. 1992 "Application of thermostable xylanase from *Humicola* sp. for pulp improvement." **J. Ferment. Bioeng.** 77 : 109-111.

Ibrahim, M.N.M. 1981. "Physical, chemical, physico-chemical and biological treatments of crop residues." In the ultilization of fibrous agricultural residuces (ed. G.R. Pearce). Watson Ferguson and Co., Brisbane. 1 : 53–68.

Inagaki, K., Kaibuchi, G. and Hatano, K. 1998. "Purification and some properties of xylanase from thermophilic fungus" **Enz. Microb. Technol.** 83: 478-480.

Johnson L., Larry M.N. and Balakrishna. P. 1999. "Purification and biochemical characteristics of β-D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP." **Biotechnol. Appl. Biochem.** 30: 73-79.

Jones, R. P.,Greenfield, P. F. and Nicklin, D. J. 1980. "Cellulose hydrolysis state of the art and near term potential." **Dept. Chem. Eng. Uni. Queenland,** Australia. 10 : 22 – 25.

Kang, M., K. and Rhee H., Y. 1996. "Purification and characterization of two xylanase from alkalophilic *Cephalosporium* sp. Strain RYM-202". **Appl. Environ. Microbiol.** 62 : 3480-3482.

Kavita, A. and Saurah, M. 2002. "Properties and of a xylan – binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1." **Enz. Microb. Technol.** 65: 694-697.

Khin, L. K. 2003. "Specificity of purified xylanase from alkaliphilic *Bacillus halodurans* strain C-1 on hydrolysis of soluble xylanas." **J. Natl. Res. Concil Thailand**. 33: 35-48.

Kyu, K. L., Ratanakhanokchai, K., Uttapap, D. and Tanticharoen, M. 1994. "Induction of xylanase in *Bacillus* sp. strain K-1." **Bioresource Technol**. 48 : 163-167.

Kyu, K.L. and Ratanakhanokchai, K 2001. "Hydrolysis of lignocellulosic materials and kraft pulps by xylanolytic enzymes from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1." **J. Natl. Res. Concil Thailand**. 33: 40-54.

Lee, S.S. 2004 . "In vitro stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture. " **Animal Feed Sci. and Technol**. 115 :215–226.

Loo, V.D. 1976. "Protein concentration determine by the method of Braford." **Mol. Microbiol.** 5 : 813-826.

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

MacCarthy, A.J. ,Peace, E. and Broda, P. 1985. "Effect of pH value on xylanase activity from fungi." **J. Biotechnol.** : 44-46.

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

Mandels, M. and Weber, J. 1969. "The production of cellulose in cellulose and their application." **Adv. Chem. Ser. 95.** American Chemistry Socienty, Washington D.C. : 391-398.

Marui, M., Nakanishi, K. and Yasui, T. 1985 "Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp." **Biotech. Lett.** 7 : 797-785.

Maulin, P. Shah, A., Komel, B. and Gregory, J. 2004 . "Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in solid state fermentation." **Process Biochem.** 1: 1-5.

Mayorga, Lino. 2002 . "*Cellulomonas flavigena* characterization of an endo-1.4-xylanase activity tightly induced by sugar-cane-bagase. " **Fems Lett.** 214 : 250-290.

Milagres ,A.MF., Raymahasay. S. and Aloke, K. 2003. "Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor". **Dept. Biotechnol. Facl. Chem. Eng. Lorena Lorena SP.** Brazil. :12600-970.

Oakley, A.J., Heinrich, T., Thompson, C.A. and Wilce, M.C.J. 2003. "Characterisation of a family 11 xylanase from *Bacillus subtilis* B230 used for paper bleaching. **Acta Cryst.** 59 :627-636.

Paice, M.G.; Haynes A. and Kilburn, DG. 1978. "Production, characterization and partial amino acid sequence of xylanase A from *Sizophyllum commune*." **Appl. Environ. Microbiol.** 36 : 802-808.

Pereira, P. Sofia, A. and Ferreira, M. 2003. "Thermostabilization of *Bacillus subtilis* CCMI 966 xylanase with trehalose study of deactivation kinetics." **Enz. Microb. Technol.** 1: 1-5.

Pereira, P.Ferreira, M. and Raquel, M. 2002. "Enzyme properties of a neutral endo-1,3- xylanase xylI from *Bacillus subtilis*." **J. Biotechnol.** 94: 265-275.

Pandey, W. and Wen, C. W. 1999. "Solid state fermentation for the production of industrial enzymes." **Curr. Sci** 77: 149-162.

Park , Y.S ,Lee, J.S. and Kang, W.S. 2004. "Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass". **Bioresource Technol.** 91: 153–156

Purkurthofer, H. et al. 1993. "Effect of shear rate and culture pH on the production of xylanase by *Thermomyces lanuglinosus*." **Biotech. Lett.** 15 : 405-410.

Ratanakhanokchai, K. 1999. "Purification and application of partially purified alkaline xylanase from an alkaliphilic *Aspergillus nidulans* KK-99." **Bioresoure Technol.** 85: 39-42.

San, L. W., Change, Y. Chingzu ,A. and Yue D. C. 2003. "Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151" **Enz. Microb. Technol.** 33: 917–925.

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

Saxena, R., Rathi, P., and Gupta, R. 1986. "Developments in industrially important thermostable enzymes." **Bioprocess Engi. 70:460-472.**

Senior ,D.J., Mayers, P.R. and Saddler, J.N. 1989. "Xylanase production by *Trichoderma harzianum* E58." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 32: 137-142.

Somogyi, M. 1952. "Notes on Sugar Determinations." **J. Biol. Chem**. 195 : 19-23.

Srinophakum, P. 1995. "Solid state fermentation of xylanase from *Humicola lanuginose* in a 5 liter cylindrical fermenter." **Kasetsart J.** 1: 38-49.

Stewart, J.C. and Parry, J.C.B. 1981. "Factors influencing the production of cellulose by *Aspergillus fumigatus*." **J. Gen. Microbial.** 125 : 33 – 39.

Sunna, A. and Antranikian T. 1997. "Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria" **Crit. Rev. Biotechnol**. 17 :39-67.

Trigo, C. and Ball, A.S. 1994. "Production of extracellular enzymes during the solubilization of straw by *Thermomonospora fusca* BD 25." **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 41: 366-372.

Viikari , L., Kantelinen,A. and Linko, M. 1994. "Xylanase in bleaching from an idea to the industry." **Ferment. Microb. Reviews.** 13 : 335-350.

Wase, D. A., Menzel, K., Zeng, AP., Nesartnam, ST. and Blakebrough, N. 1985. "Production of β-D glucosidase, endo-1,4- β -D glucanase and D- xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI255091." **Enz. Microb. Technol.** 7: 225–229.

Wong, K. K. Y. and Saddler, J.N. 1988 "Multiplicity of β-1,4-xylanase in microorganism function and application." **Microbiol. Rev.** 52 :305- 317.

Xandro H., Julio, K. 2003 . "Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation". **Process Biochem.** 1 : 1-7

Xu, I., Nogawa, M.,Okada, H. and Morikawa, Y. 1998 "Xylanase induction by L-sorbose in a fungus, *Trichoderma reesei* PC-37." **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 62 : 1555-1559.

Zaho, J., Li. X., Qu, Y. and Gao, P. 2002. "Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw." **Enz. Microb. Technol.** 30 : 734-740.

# 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 |

# ภาคผนวก ข

# วิธีการวิเคราะห์

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

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

เตรียมโดยชั่ง DNS 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างทีละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์) 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทต (Rochelle salt) ลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

<u>หมายเหตุ</u> อาจจะเติมโซเดียมซัลไฟต์อีก 0.05 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำสารละลาย DNS ไปใช้

1.2 สารละลายสับสเตรท

ละลาย oat spelt xylan 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 มิลลิลิตรด้วยบัฟเฟอร์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ไม่ควรเกิน 1 สัปดาห์) หรือแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และต้องผสมให้ดีหลังจากการละลาย

1.3 วิธีการ

1.3.1 ปิเปตต์สารละลายสับสเตรท 1.8 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 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 เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.3.5 นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

1.3.6 แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็น

1.3.7 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

1.3.8 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของไซโลส ในสารละลายตัวอย่าง

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

1.3.10 การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

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

$$\text{ยูนิตต่อกรัม (สับสเตรท)} = \frac{\text{ยูนิตต่อมล. X (ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด + ปริมาตรน้ำที่เหลือหลังปรับความชื้น)}}{\text{น้ำหนักสับสเตรท (กรัม)}}$$

1 ยูนิตของเอนไซม์ไซลาเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเตรท และให้ไซโลส 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ

## 2. วิธีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (Mandels and Weber, 1969)

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

เตรียมโดยชั่ง DNS 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างทีละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์) 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทต (Rochelle salt) ลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

<u>หมายเหตุ</u> อาจจะเติมโซเดียมซัลไฟต์อีก 0.05 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำสารละลาย DNS ไปใช้

2.2 สารละลายสับสเตรท

ละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 กวนอย่างต่อเนื่องอย่างช้า ๆ จนละลายหมด เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3 วิธีการ

2.3.1 ปิเปตต์สารละลายสับสเตรท 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 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 เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.3.5 นำหลอดทดลองไปต้มนน้ำเดือดเป็นเวลา 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 เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง

2.3.10 ทำกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยใช้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรแทนเอนไซม์เซลลูเลส และวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 ถึง ข้อ 2.3.8 จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกลูโคส

2.3.11 การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ไมโครโมลของกลูโคส} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์}}$$

$$\text{ยูนิตต่อกรัม (สับสเตรท)} = \frac{\text{ยูนิตต่อมล.} \times \text{(ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด + ปริมาตรน้ำที่เหลือหลังปรับความชื้น)}}{\text{น้ำหนักสับสเตรท (กรัม)}}$$

1 ยูนิตของเอนไซม์เซลลูเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเตรท และให้กลูโคส 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ

## 3. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (A.O.A.C, 1990)

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

3.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 ถึง 5 กรัม ใส่ลงในภาชนะสำหรับหาความชื้น ซึ่งทราบน้ำหนักที่แน่นอน

3.3 อบตัวอย่างในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 6 ชั่วโมง

3.4 นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น รอให้เย็นและชั่งน้ำหนัก

3.5 อบซ้ำอีก ครั้งละประมาณ 30 นาที จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งได้ติดต่อกันไม่เกิน 1 ถึง 3 มิลลิกรัม

3.6 คำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร

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

## 4. วิธีการตรวจนับปริมาณสปอร์ของเชื้อราโดยฮีมาไซโตมิเตอร์และการคำนวณหาปริมาณสปอร์

4.1 เตรียมตัวอย่างที่จะตรวจนับ ถ้าเป็นของเหลวสามารถนำมาตรวจนับได้ทันที แต่ถ้าเป็นของแข็งให้ละลายในน้ำกลั่นในปริมาตรตามต้องการ เช่น ตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร (เจือจาง 1:10) หรือ เจือจางมากขึ้นในกรณีที่มีสปอร์จำนวนมาก

4.2 ปิเปตต์ตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในฮีมาไซโตมิเตอร์ 1 ถึง 2 หยด ที่ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์อยู่ หยดตัวอย่างทางด้านข้างของกระจกปิดสไลด์

4.3 ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 40 เท่า

4.4 นับจำนวนโคโลนีในแต่ละช่องเล็ก หรือถ้านับช่องใหญ่ให้นำมาหาค่าเฉลี่ยและนำมาคูณด้วย $4 \times 10^6$ จะได้ปริมาณสปอร์ต่อกรัมหรือต่อมิลลิลิตร

วิธีการคำนวณ

| | | |
|---|---|---|
| พื้นที่ 1 ช่องเล็กในตารางใหญ่ มีค่าเท่ากับ 0.05 x 0.05 | = 0.0025 | ตารางมิลลิเมตร |
| ความลึกระหว่างกระจกปิดสไลด์และตาราง (ผู้ผลิตกำหนด) | = 0.1 | มิลลิลิตร |
| ∴ ปริมาตร 1 ช่องเล็ก จะมีค่า = 0.0025 x 0.1 | = 0.00025 | ลูกบาศก์มิลลิเมตร |

| | | |
|---|---|---|
| ปริมาตร 0.0025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีเซลล์จุลินทรีย์ | = Z | เซลล์ (สปอร์) |
| ปริมาตร 1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีเซลล์จุลินทรีย์ | = $\frac{Z \times 1000}{0.00025}$ | เซลล์ |
| ปริมาตร 0.0025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีเซลล์จุลินทรีย์ | = Z x 4 x 106 | เซลล์ต่อมิลลิลิตร |

## 5. วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry, 1951)

5.1 สารเคมี

5.1.1 สารละลาย ก

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร

5.1.2 สารละลาย ข

ละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาเทรต 2.7 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร

5.1.3 สารละลาย ค

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต 1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร

5.1.4 สารละลาย ง

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

5.1.5 Folin-Ciocalteu reagent 1 นอร์มัล

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

5.1.6 สารละลายมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน

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

5.2 วิธีการ

5.2.1 นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

5.2.2 เติมสารละลาย ง ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่าง ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

5.2.3 เติม Folin-Ciocalteu reagent 1 นอร์มัล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดสีอย่างสมบูรณ์ นำไปวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

5.2.4 ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน ความเข้มข้น 0 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 5.2.1 ถึง 5.2.3 และเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโบวีนซีรัมอัลบูมิน

## 6. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์วิธี Somogyi Nelson's (Somogyi, 1952)

6.1 การเตรียมสารละลาย Copper reagent ประกอบด้วย

6.1.1 สารละลาย $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ร้อยละ 10 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

6.1.2 Phosphate-tartrate solution เตรียมโดยละลาย $Na_2HPO_4$ 28 กรัม (หรือ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 70.5495 กรัม) ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม sodium potassium tartrate (tetrahydrate) 40 กรัม ทำให้ ละลายแล้วเติม 1 N NaOH 100 มิลลิลิตร ตามด้วย $Na_2SO_4$ (anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอน ให้กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

6.1.3 ผสมสารละลายในข้อ 6.1.1 (100 มิลลิลิตร) และข้อ 6.1.2 (900 มิลลิลิตร) เข้าด้วยกัน

6.2 การเตรียมสารละลาย Nelson's Arsenomolybdate color reagent ประกอบด้วย

6.2.1 ละลาย ammoniummolybdate ($(NH_4)_6Mo7O_{24} \cdot 4H_2O$) 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6.2.2 Disodium arsenate ($Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

6.2.3 ผสมสารละลายในข้อ 1 และ 2 เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะ เวลา 48 ชั่วโมง นำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องไว้ในขวดสีชา

6.3 วิธีการ

6.3.1 เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้ว เติม Copper reagent 1 มิลลิลิตร นำมาต้มในน้ำเดือดประมาณ 15 นาที ควรใช้ลูกแก้ววางบนปากหลอดแก้วเพื่อลดการระเหยของน้ำ

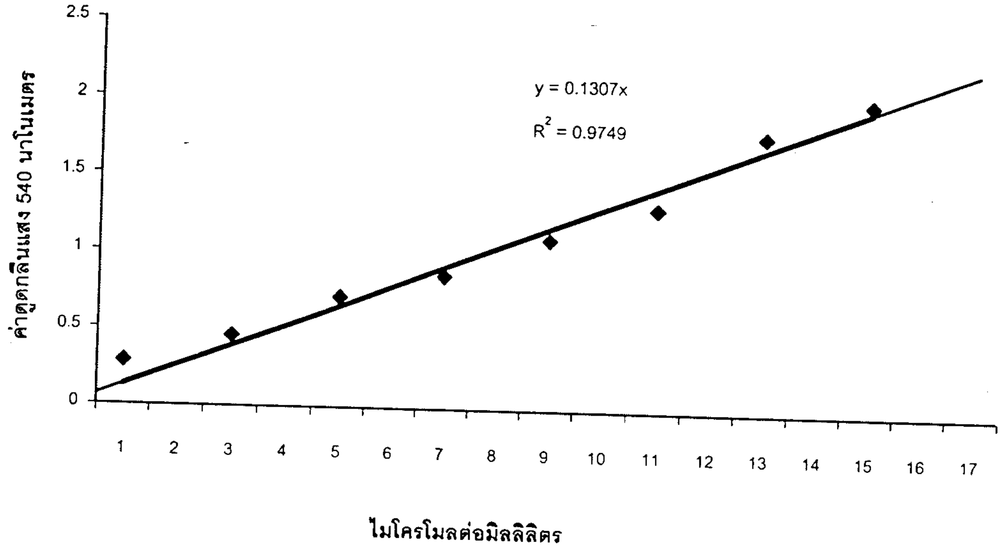
6.3.2 ทำให้เย็นลงทันที เติม arsenomolybdate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จะเห็นสีเขียวหรือสีน้ำเงินขึ้นกับปริมาณน้ำตาล

6.3.3 เติมน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน

# ภาคผนวก ค

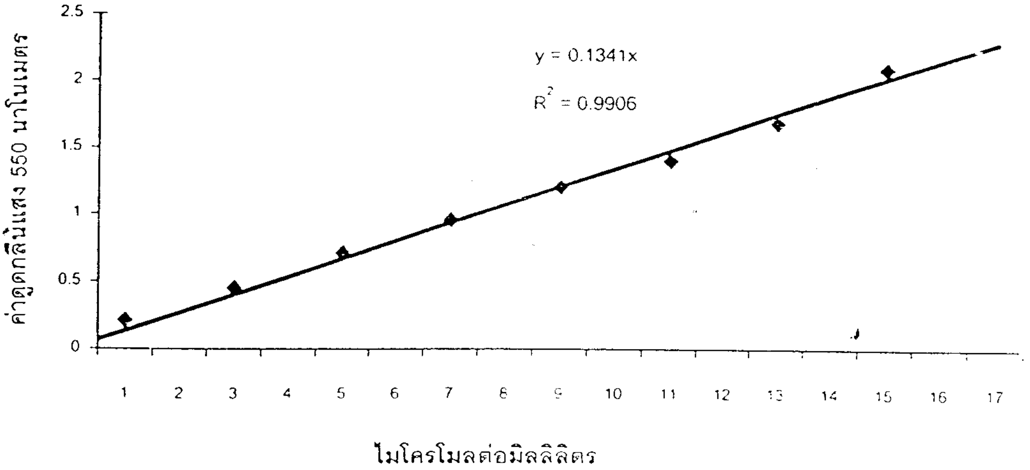
# กราฟมาตรฐาน

## 1. กราฟมาตรฐานไซโลส



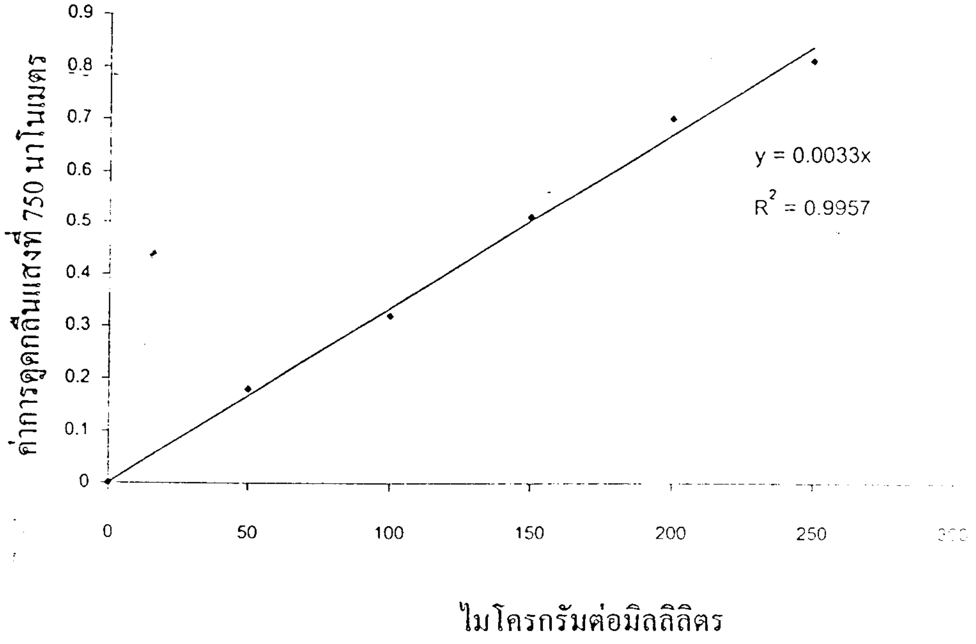

รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานไซโลส เมื่อใช้ความเข้มข้นของไซโลส 0 ถึง 16 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

## 2. กราฟมาตรฐานกลูโคส



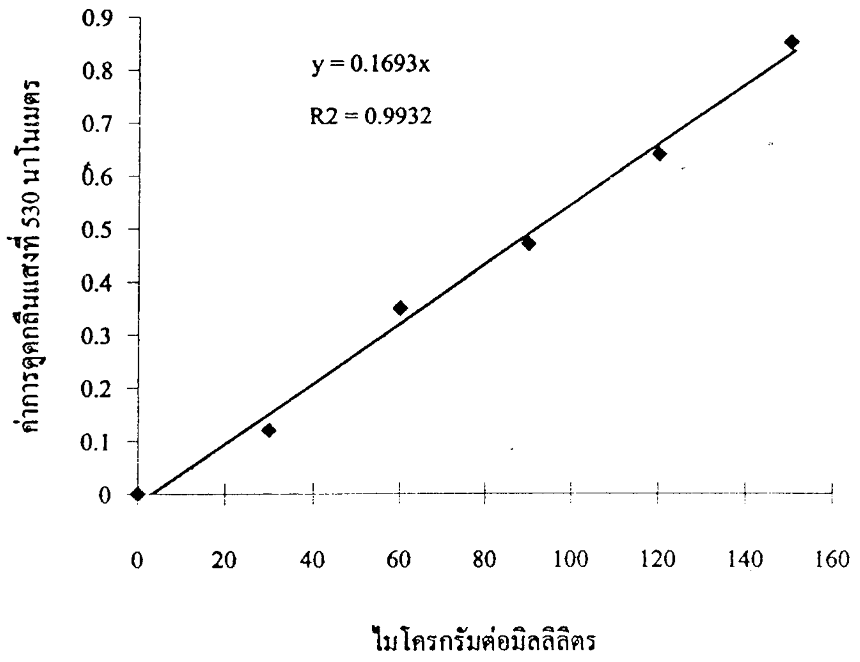

รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานกลูโคส เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 0 ถึง 18 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรและ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

## 3. กราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน




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

**4. กราฟมาตรฐานกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์**




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

# ภาคผนวก ง

# วิธีการวิเคราะห์

## 1. ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละความอิ่มตัว) ที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน

ตารางภาคผนวก 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 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮบตะไฮเดรต (13.4125 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

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

**ตารางภาคผนวก 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 |

# ภาคผนวก จ

# ข้อมูล

**ตารางภาคผนวกจ-1** ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสโดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 | | *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัม) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัม) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัม) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัม) |
| ไซแลน | 0 | 17.82 | 12.00 | 17.82 | 10.00 |
| | 1 | 170.73 | 21.00 | 164.17 | 29.00 |
| | 2 | 770.73 | 24.00 | 969.75 | 74.00 |
| | 3 | 1297.15 | 35.00 | 718.81 | 50.00 |
| | 4 | 1072.26 | 24.00 | 637.61 | 35.00 |
| | 5 | 783.90 | 17.00 | 480.18 | 20.00 |
| ธูปฤาษี | 0 | 7.32 | 5.00 | 8.91 | 8.22 |
| | 1 | 148.41 | 16.00 | 158.30 | 26.00 |
| | 2 | 249.53 | 17.00 | 610.93 | 44.00 |
| | 3 | 266.17 | 16.00 | 569.11 | 27.00 |
| | 4 | 153.66 | 11.00 | 386.96 | 20.00 |
| | 5 | 153.40 | 9.00 | 305.11 | 14.00 |
| รำข้าว | 0 | 11.26 | 9.00 | 11.26 | 4.61 |
| | 1 | 168.29 | 31.00 | 150.09 | 9.69 |
| | 2 | 519.51 | 54.00 | 739.92 | 28.56 |
| | 3 | 658.54 | 47.00 | 605.07 | 23.86 |
| | 4 | 243.60 | 34.00 | 420.67 | 16.44 |
| | 5 | 179.27 | 27.00 | 361.63 | 12.29 |

**ตารางภาคผนวกจ-1 (ต่อ)**

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 | | *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัม) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัม) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัม) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัม) |
| ผักตบชวา | 0 | 1.03 | 5.00 | 1.00 | 5.00 |
| | 1 | 60.79 | 30.00 | 86.00 | 27.00 |
| | 2 | 118.20 | 31.00 | 498.00 | 49.00 |
| | 3 | 121.58 | 35.00 | 440.00 | 34.00 |
| | 4 | 70.64 | 26.00 | 26.00 | 28.00 |
| | 5 | 56.96 | 19.00 | 21.00 | 16.00 |
| ฟางข้าว | 0 | 23.03 | 15.00 | 23.03 | 1.00 |
| | 1 | 173.16 | 28.00 | 162.34 | 9.00 |
| | 2 | 720.46 | 30.00 | 916.81 | 11.00 |
| | 3 | 907.53 | 45.00 | 698.82 | 4.00 |
| | 4 | 355.98 | 38.00 | 560.00 | 3.00 |
| | 5 | 208.41 | 29.00 | 448.36 | 2.00 |

ตารางภาคผนวก จ-2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสโดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่พรีทรีทเมนต์

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 | | *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัม) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัม) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัม) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัม) |
| ฟางข้าว | 0 | 23.03 | 8.29 | 23.03 | 9.68 |
| | 1 | 162.83 | 0.11 | 172.70 | 20.72 |
| | 2 | 762.34 | 0.07 | 1,433.19 | 32.27 |
| | 3 | 905.43 | 0.08 | 1,286.32 | 29.74 |
| | 4 | 189.35 | 0.08 | 355 98 | 5.18 |
| | 5 | 140.13 | 0.03 | 109.77 | 1.24 |
| ฟางข้าวต้ม | 0 | 25.49 | 13.58 | 25.49 | 13.89 |
| | 1 | 165.30 | 0.20 | 180.92 | 38.98 |
| | 2 | 785.36 | 0.10 | 1,555.02 | 49.24 |
| | 3 | 930.92 | 0.09 | 1,595.72 | 32.47 |
| | 4 | 198.40 | 0.22 | 753.08 | 13.82 |
| | 5 | 149.67 | 0.11 | 121.80 | 4.20 |
| ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ | 0 | 26.23 | 11.43 | 26.23 | 15.26 |
| | 1 | 166.94 | 0.26 | 189.14 | 44.61 |
| | 2 | 830.59 | 0.10 | 1,652.88 | 50.48 |
| | 3 | 1,011.51 | 0.15 | 2,176.56 | 60.89 |
| | 4 | 407.07 | 0.19 | 810.07 | 22.89 |
| | 5 | 217.11 | 0.20 | 248.42 | 10.76 |

**ตารางภาคผนวก จ-2** (ต่อ)

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 | | *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัม) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัม) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัม) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัม) |
| รำข้าว | 0 | 9.87 | 6.99 | 9.87 | 5.92 |
| | 1 | 154.61 | 0.08 | 180.92 | 8.65 |
| | 2 | 349.51 | 0.08 | 524.26 | 13.76 |
| | 3 | 614.04 | 0.10 | 826.48 | 21.11 |
| | 4 | 147.62 | 0.36 | 221.42 | 14.69 |
| | 5 | 106.91 | 0.47 | 45.39 | 11.97 |
| รำข้าวต้ม | 0 | 12.34 | 7.50 | 12.34 | 7.89 |
| | 1 | 157.07 | 0.11 | 162.83 | 17.30 |
| | 2 | 405.02 | 0.11 | 607.52 | 22.64 |
| | 3 | 696.27 | 0.13 | 888.16 | 31.13 |
| | 4 | 189.97 | 0.39 | 284.95 | 18.90 |
| | 5 | 144.57 | 0.52 | 45.89 | 15.12 |
| รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ | 0 | 13.98 | 9.05 | 13.98 | 9.21 |
| | 1 | 165.30 | 0.15 | 163.65 | 24.69 |
| | 2 | 688.73 | 0.09 | 1,033.10 | 33.18 |
| | 3 | 896.38 | 0.12 | 1,130.76 | 40.29 |
| | 4 | 339.02 | 0.30 | 508.53 | 28.57 |
| | 5 | 162.01 | 0.49 | 162.58 | 17.79 |

**ตารางภาคผนวก จ-2 (ต่อ)**

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | *Aspergillus foetidus* TISTR 3159 | | *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัม) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัม) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัม) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัม) |
| ผักตบชวา | 0 | 7.40 | 2.43 | 7.40 | 1.617 |
| | 1 | 44.41 | 0.08 | 92.11 | 3.77 |
| | 2 | 83.47 | 0.10 | 128.29 | 4.33 |
| | 3 | 149.67 | 0.20 | 59.76 | 9.96 |
| | 4 | 86.35 | 0.31 | 20.56 | 6.79 |
| | 5 | 65.79 | 0.42 | 13.16 | 5.55 |
| ผักตบชวาต้ม | 0 | 9.05 | 2.695 | 9.05 | 2.695 |
| | 1 | 55.10 | 0.09 | 128.29 | 4.72 |
| | 2 | 164.88 | 0.08 | 172.70 | 6.95 |
| | 3 | 287.83 | 0.11 | 250.00 | 10.52 |
| | 4 | 111.02 | 0.26 | 168.59 | 7.20 |
| | 5 | 82.24 | 0.37 | 14.80 | 6.03 |
| ผักตบชวาแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ | 0 | 16.69 | 4.313 | 16.69 | 4.313 |
| | 1 | 162.83 | 0.03 | 143.91 | 5.53 |
| | 2 | 185.86 | 0.10 | 371.71 | 9.43 |
| | 3 | 331.69 | 0.11 | 411.18 | 13.34 |
| | 4 | 133.63 | 0.23 | 267.27 | 7.55 |
| | 5 | 90.46 | 0.39 | 57.57 | 7.04 |

**ตารางภาคผนวกจ-3** ผลกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส และเซลลูเลส เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนรำข้าวที่พรีทรีทเมนต์ด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|---|
| รำข้าว | 0 | 92.11 | 4.85 |
| | 1 | 116.78 | 8.63 |
| | 2 | 349.51 | 12.16 |
| | 3 | 550.99 | 17.52 |
| | 4 | 147.62 | 3.50 |
| | 5 | 114.64 | 2.70 |
| รำข้าว แช่ 0.5 % 0.5 ชั่วโมง | 0 | 82.24 | 5.39 |
| | 1 | 160.36 | 8.09 |
| | 2 | 417.35 | 13.75 |
| | 3 | 608.55 | 21.02 |
| | 4 | 87.38 | 4.58 |
| | 5 | 60.86 | 4.04 |
| รำข้าว แช่ 0.5 % 1 ชั่วโมง | 0 | 93.50 | 6.74 |
| | 1 | 164.47 | 10.24 |
| | 2 | 439.97 | 15.90 |
| | 3 | 629.11 | 22.91 |
| | 4 | 97.66 | 5.39 |
| | 5 | 71.55 | 4.58 |
| ำข้าว แช่ 0.5 % .5 ชั่วโมง | 0 | 8.22 | 7.55 |
| | 1 | 156.25 | 11.05 |
| | 2 | 485.20 | 16.71 |
| | 3 | 217.93 | 18.87 |
| | 4 | 81.72 | 6.74 |
| | 5 | 11.48 | 5.12 |

**ตารางภาคผนวก จ-3(ต่อ)**

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|---|
| รำข้าว แช่ 1 % 0.5 ชั่วโมง | 0 | 99.51 | 11.32 |
| | 1 | 197.37 | 14.56 |
| | 2 | 627.06 | 18.33 |
| | 3 | 740.13 | 22.64 |
| | 4 | 462.58 | 12.13 |
| | 5 | 172.70 | 5.66 |
| รำข้าว แช่ 1 % 1 ชั่วโมง | 0 | 13.98 | 10.24 |
| | 1 | 185.03 | 12.13 |
| | 2 | 499.59 | 15.36 |
| | 3 | 385.14 | 19.95 |
| | 4 | 136.72 | 8.63 |
| | 5 | 100.33 | 5.12 |
| รำข้าว แช่ 1 % 1.5 ชั่วโมง | 0 | 92.93 | 9.43 |
| | 1 | 164.47 | 8.63 |
| | 2 | 468.75 | 12.94 |
| | 3 | 230.26 | 16.71 |
| | 4 | 114.10 | 7.55 |
| | 5 | 80.59 | 4.85 |

**ตารางภาคผนวก จ-3(ต่อ)**

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|---|
| รำข้าว แช่ 1.5 % 0.5 ชั่วโมง | 0 | 90.46 | 7.55 |
| | 1 | 156.25 | 7.82 |
| | 2 | 402.96 | 9.43 |
| | 3 | 196.00 | 14.82 |
| | 4 | 75.04 | 5.66 |
| | 5 | 55.92 | 5.12 |
| รำข้าว แช่ 1.5 % 1ชั่วโมง | 0 | 88.82 | 7.01 |
| | 1 | 131.58 | 7.55 |
| | 2 | 374.18 | 8.89 |
| | 3 | 183.66 | 12.94 |
| | 4 | 69.90 | 5.66 |
| | 5 | 44.41 | 5.39 |
| รำข้าว แช่ 1.5 % 1.5ชั่วโมง | 0 | 88.82 | 7.28 |
| | 1 | 176.81 | 7.55 |
| | 2 | 211.76 | 8.89 |
| | 3 | 138.43 | 12.67 |
| | 4 | 55.51 | 5.66 |
| | 5 | 39.47 | 5.39 |

**ภาคผนวก จ-4** ผลกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|---|
| ฟางข้าว | 0 | 16.64 | 9.16 |
| | 1 | 143.91 | 11.32 |
| | 2 | 357.73 | 16.71 |
| | 3 | 819.63 | 25.88 |
| | 4 | 126.44 | 5.93 |
| | 5 | 113.65 | 5.39 |
| ฟางข้าว แช่ 0.5 % 0.5 ชั่วโมง | 0 | 55.18 | 9.70 |
| | 1 | 134.87 | 15.63 |
| | 2 | 834.70 | 17.25 |
| | 3 | 1,217.11 | 30.19 |
| | 4 | 380.35 | 7.01 |
| | 5 | 286.18 | 6.47 |
| ฟางข้าว แช่ 0.5 % 1 ชั่วโมง | 0 | 55.95 | 13.48 |
| | 1 | 118.42 | 16.17 |
| | 2 | 814.14 | 27.44 |
| | 3 | 1,134.87 | 25.88 |
| | 4 | 304.28 | 17.25 |
| | 5 | 220.39 | 10.24 |
| ฟางข้าว แช่ 0.5 % 1.5 ชั่วโมง | 0 | 41.12 | 15.09 |
| | 1 | 131.58 | 22.10 |
| | 2 | 678.45 | 25.88 |
| | 3 | 816.89 | 26.42 |
| | 4 | 163.45 | 13.48 |
| | 5 | 114.80 | 10.24 |

**ภาคผนวก จ-4** (ต่อ)

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|---|
| ฟางข้าว แช่ 1 % 0.5 ชั่วโมง | 0 | 69.90 | 20.49 |
| | 1 | 169.41 | 22.64 |
| | 2 | 1,254.11 | 27.49 |
| | 3 | 1,480.26 | 42.05 |
| | 4 | 925.16 | 17.25 |
| | 5 | 345.39 | 10.24 |
| ฟางข้าว แช่ 1 % 1 ชั่วโมง | 0 | 23.77 | 20.49 |
| | 1 | 192.43 | 24.26 |
| | 2 | 999.18 | 29.65 |
| | 3 | 1,373.36 | 41.51 |
| | 4 | 273.44 | 15.63 |
| | 5 | 200.66 | 5.93 |
| ฟางข้าว แช่ 1 % 1.5 ชั่วโมง | 0 | 78.99 | 17.30 |
| | 1 | 184.21 | 16.60 |
| | 2 | 937.50 | 25.34 |
| | 3 | 1,192.43 | 35.04 |
| | 4 | 228.21 | 15.09 |
| | 5 | 161.18 | 9.70 |

ภาคผนวก จ-4 (ต่อ)

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|---|
| ฟางข้าว แช่ 1.5 % 0.5 ชั่วโมง | 0 | 76.89 | 15.63 |
| | 1 | 148.03 | 17.25 |
| | 2 | 518.09 | 18.87 |
| | 3 | 337.17 | 26.47 |
| | 4 | 150.08 | 16.71 |
| | 5 | 111.84 | 9.70 |
| ฟางข้าว แช่ 1.5 % 1 ชั่วโมง | 0 | 75.49 | 14.56 |
| | 1 | 139.80 | 15.09 |
| | 2 | 485.20 | 18.33 |
| | 3 | 309.76 | 26.42 |
| | 4 | 139.80 | 15.63 |
| | 5 | 88.82 | 8.09 |
| ฟางข้าว แช่ 1.5 % 1.5 ชั่วโมง | 0 | 75.49 | 16.17 |
| | 1 | 115.13 | 12.40 |
| | 2 | 423.52 | 16.71 |
| | 3 | 276.86 | 25.34 |
| | 4 | 111.02 | 10.24 |
| | 5 | 78.95 | 9.70 |

**ภาคผนวก จ-5** ผลกิจกรรมเอนไซม์ไซลลาเนส เชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย และใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

| แหล่งไนโตรเจน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|---|
| แอมโมเนียมซัลเฟต | 1 | 192 | 7 |
| | 2 | 358 | 25 |
| | 3 | 460 | 13 |
| | 4 | 247 | 9 |
| | 5 | 273 | 6 |
| ยูเรีย | 1 | 251 | 11 |
| | 2 | 498 | 36 |
| | 3 | 520 | 20 |
| | 4 | 347 | 13 |
| | 5 | 249 | 8 |

**ตารางภาคผนวก จ-6** ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|---|
| ฟางข้าว + ยูเรีย | 1 | 199.38 | 15.44 |
| | 2 | 475.31 | 36.00 |
| | 3 | 602.47 | 48.28 |
| | 4 | 300.93 | 16.36 |
| | 5 | 127.16 | 10.15 |
| ฟางข้าว + แอมโมเนียมซัลเฟต | 1 | 201.23 | 8.82 |
| | 2 | 530.86 | 27.68 |
| | 3 | 919.75 | 30.44 |
| | 4 | 347.38 | 11.40 |
| | 5 | 249.14 | 8.24 |

**ตารางภาคผนวก จ-7** ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลส หลังเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ด้วยฟางข้าวและรำข้าว

| แหล่งคาร์บอน | วันที่เพาะเลี้ยง (วัน) | ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) | เซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) |
|---|---|---|---|
| ฟางข้าว | 1 | 162 | 7 |
| | 2 | 201 | 18 |
| | 3 | 236 | 13 |
| | 4 | 138 | 10 |
| | 5 | 102 | 4 |

# ประวัติผู้เขียน

นางสาววิบูลย์ศรี เรืองทวีสิน เกิดวันที่ 11 ธันวาคม 2517 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ปีการศึกษา 2538 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เข้าทำงานบริษัทไทยเทพรสผลิตภัณฑ์อาหารจำกัด (มหาชน) ตำแหน่งซุปเปอร์ไวเซอร์หน่วยประกันคุณภาพ ตั้งแต่ปี 2539 ถึง 2546 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตั้งแต่ปีการศึกษา 2546 จนถึงปีการศึกษา 2548