

การผลิตไซแลเนสจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน  
และการประยุกต์ในการผลิตเอทานอลชีวภาพ

นางสาวสร้อยดี โรจนกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2552  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF XYLANASE FROM A TROPICAL ISOLATE OF  
*Aureobasidium pullulans* AND ITS APPLICATION  
IN BIOETHANOL PRODUCTION

Miss Saratsawadee Rotjanagusol

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตไซแลเนสจาก *Aureobasidium pullulans*  
สายพันธุ์เขตร้อนและการประยุกต์ในการผลิตเอทานอล  
ชีวภาพ

โดย

นางสาวสร้อยดี โจนกุลศล

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศธราริน ไฉนตระกูล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ ดร. สีนาท ประสงค์สุข

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศธราริน ไฉนตระกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(อาจารย์ ดร. สีนาท ประสงค์สุข)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร. กัญญ์ กังวานสายชล)

สร้อยดี โรจนกุล : การผลิตไซแลเนสจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน และการประยุกต์ในการผลิตเอทานอลชีวภาพ. (PRODUCTION OF XYLANASE FROM A TROPICAL ISOLATE OF *Aureobasidium pullulans* AND ITS APPLICATION IN BIOETHANOL PRODUCTION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อาจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข, 127 หน้า.

จากตัวอย่างใบพืชชนิดต่างๆ ที่เก็บในพื้นที่ 4 จังหวัด ของประเทศไทย สามารถแยก *Aureobasidium pullulans* (de Bary) ได้ 20 ไอโซเลต เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ไซแลเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง Yeast Malt Xylan Agar พบว่า *A. pullulans* ทุกไอโซเลตสามารถสร้างไซแลเนสได้ เมื่อวัดแอกติวิตีเชิงปริมาณ พบว่าใน 20 ไอโซเลต *A. pullulans* No.109B มีไซแลเนสแอกติวิตีสูงที่สุด และเอนไซม์ที่ผลิตได้ค่อนข้างเสถียรที่อุณหภูมิสูง โดยมีแอกติวิตีเหลืออยู่ ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่าหลังจากบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง *A. pullulans* No.109B ผลิตไซแลเนสได้มากที่สุดในช่วง early log phase โดยมีแอกติวิตี  $439.98 \pm 9.66$  มิลลิยูนิตต่อ มิลลิลิตร สำหรับภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซแลเนส พบว่า *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B สามารถผลิตไซแลเนสได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหารสูตร Xylanase Production Medium ที่มีซังข้าวโพด 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) แอล-แอสพาราจีนโมโนไฮเดรต 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.0 โดยให้ค่าแอกติวิตีไซแลเนส สูงสุด  $559.75 \pm 25.03$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการ ศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์หยาบ พบว่า ไซแลเนสมีการทำงานและความเสถียรดีที่ สุดที่ความเป็นกรดต่าง 7.0 และ 5.0 ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 30-60 องศาเซลเซียส และค่อนข้างเสถียรที่อุณหภูมิห้อง หรือไม่เกิน 28 องศาเซลเซียส ในการผลิตเอทานอลจากวัชพืช 2 ชนิด ได้แก่ หญ้าแฝก และหญ้าคา ด้วย กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง โดยใช้ไซแลเนส จาก *A. pullulans* No.109B  $66.47$  มิลลิยูนิต ร่วมกับ *Pachysolen tannophilus* NRRL-Y2460 เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าผลการหมักหญ้าแฝกและหญ้าคาที่ผ่านการย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยไซแลเนส ให้ ผลผลิตเอทานอล 7.74 และ 7.63 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับการหมักหญ้าแฝกและ หญ้าคาที่ย่อยด้วยกรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่ให้ผลผลิตเอทานอล 8.71 และ 8.50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ตามลำดับ

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....  
 ปีการศึกษา.....2552.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

## 5072498123 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : *Aureobasidium pullulans* / xylanase / agricultural wastes / Ethanol

SARATSAWADEE ROTJANAGUSOL: PRODUCTION OF XYLANASE FROM A TROPICAL ISOLATE OF *Aureobasidium pullulans* AND ITS APPLICATION IN BIOETHANOL PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PONGTHARIN LOTRAKUL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : DR. SEHANAT PRASONGSUK, Ph.D., 127 pp.

From a variety of foliar samples collected in 4 provinces in Thailand, 20 isolates of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) were obtained. Ability to produce xylanase of these yeast isolates was tested using Yeast Malt Xylan Agar. All isolates were positive for xylanase production. When quantitatively assayed for xylanase activity, *A. pullulans* No. 109B showed the highest xylanase activity among these isolates. The enzyme produced by this yeast isolate was relatively stable at high temperature with approximately 60 percent or higher activity remained after incubation at 60°C for one hour. *A. pullulans* 109B produced xylanase during early log phase of growth with the highest activity at  $439.98 \pm 9.66$  mU ml<sup>-1</sup>. For optimal condition of xylanase production, *A. pullulans* 109B gave the best xylanase yield ( $559.75 \pm 25.03$  mU ml<sup>-1</sup>) when grown in Xylanase Production Medium containing 1 percent (w/v) corn cob and 2 percent (w/v) L-asparagine monohydrate with initial pH at 6.0. Crude xylanase was subjected for enzyme characterization. The pH optimum and stability of the enzyme were at 5.0 and 7.0, respectively, whereas its temperature optimum and stability were at 30-60°C and room temperature (not higher than 28°C), respectively. In bioethanol production from 2 weed species, vetiver grass and cogongrass, by simultaneous saccharification and fermentation, xylanase from *A. pullulans* 109B together with *Pachysolen tannophilus* NRRL-Y2460 were used. The fermentation flasks were shaken at 150 rpm and incubated at 30°C for 7 days. Ethanol yields at 7.74 and 7.63 percent (v/v) were obtained from vetiver grass and cogongrass, respectively. These ethanol yields were comparable to those obtained from fermentation of vetiver grass and cogongrass digested by 0.5 percent (v/v) sulfuric acid (8.71 and 8.50 percent (v/v), respectively).

Field of Study : ....Biotechnology.....Student's Signature.....

Academic Year : ...2009.....Advisor's Signature.....

Co-Advisor's Signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. พงศ์ธาริน โฉมดีตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ หลัก เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้ ความรู้ คำปรึกษา และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อ.ดร. สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ร่วม ที่กรุณาให้ ความรู้ คำปรึกษา และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ปรีดา บุญ-หลง หัวหน้าภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่กรุณาเป็น ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร. กัญญ์ กังวา นสายชล ที่กรุณา เป็นกรรมการ (ผู้ทรงคุณวุฒิจาก ภายนอก) ในการสอบวิทยานิพนธ์และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัย การใช้ประโยชน์จากชีวมวล พืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ สมาชิกในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวล พืช บุคลากรใน หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ขอกราบระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ผู้วางรากฐานให้โอกาสทางการศึกษา และญาติพี่น้องผู้มีอุปการคุณทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ ที่ดีตลอดมา ทำให้งานวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุน จาก ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ครั้งที่ 1/2553 (ภาคปลายปีการศึกษา 2552) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	22
3.1. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	22
3.2. สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	23
3.3. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
3.4. วิธีดำเนินงานวิจัย.....	24
3.4.1. การคัดแยกและจำแนกชนิด <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	24
3.4.2. การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลเนส.....	24
3.4.3. การศึกษาการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของ <i>A. pullulans</i> .....	26
3.4.4. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส.....	26
3.4.5. การเตรียมเอนไซม์ไซแลเนสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ.....	27
3.4.6. การย่อยเฮมิเซลลูโลสและการผลิตเอทานอลด้วยการย่อยสลายและ การหมักแบบแยกส่วน (separate hydrolysis and fermentation, SHF) กระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (simultaneous sacchrification and fermentation, SSF).....	29
4. ผลการทดลอง.....	30
4.1. การคัดแยกและจำแนกชนิด <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	30

4.2. การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลเนส.....	59
4.3. การศึกษาการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของ <i>A. pullulans</i> .....	66
4.4. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส.....	68
4.5. การเตรียมเอนไซม์ไซแลเนสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ.....	73
4.6. การย่อยเฮมิเซลลูโลสและการผลิตเอทานอลด้วยการย่อยสลายและ การหมักแบบแยกส่วน (separate hydrolysis and fermentation, SHF) กระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (simultaneous sacchrification and fermentation, SSF).....	79
5. การอภิปรายผลการวิจัย.....	85
5.1. การคัดแยกและจำแนกชนิด <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	85
5.2. การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลเนส.....	87
5.3. การศึกษาการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของ <i>A. pullulans</i> .....	89
5.4. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส.....	90
5.5. การเตรียมเอนไซม์ไซแลเนสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ.....	92
5.6. การย่อยเฮมิเซลลูโลสและการผลิตเอทานอลด้วยการย่อยสลายและ การหมักแบบแยกส่วน (separate hydrolysis and fermentation, SHF) กระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (simultaneous sacchrification and fermentation, SSF).....	94
6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	97
6.1. การคัดแยกและจำแนกชนิด <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	97
6.2. การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลเนส.....	97
6.3. การศึกษาการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของ <i>A. pullulans</i> .....	98
6.4. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส.....	98
6.5. การเตรียมเอนไซม์ไซแลเนสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ.....	99
6.6. การย่อยเฮมิเซลลูโลสและการผลิตเอทานอลด้วยการย่อยสลายและ การหมักแบบแยกส่วน (separate hydrolysis and fermentation, SHF) กระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (simultaneous sacchrification and fermentation, SSF).....	100



ข้อเสนอแนะ.....	101
รายการอ้างอิง.....	102
ภาคผนวก.....	112
ภาคผนวก ก.....	113
ภาคผนวก ข.....	117
ภาคผนวก ค.....	120
ภาคผนวก ง.....	121
ภาคผนวก จ.....	123
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	127

## สารบัญญัตินำ

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถสร้างไซแลเนสได้.....	14
2	ไอโซเลตของ <i>A. pullulans</i> ที่คัดแยกได้ ชนิดของตัวอย่างพืชที่พบ สถานที่และวันที่เก็บตัวอย่าง.....	33
3	สื่อโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA MEA YMA และ YMX เป็นเวลา 3 วัน.....	58
4	ความสามารถในการสร้างวงใสของ <i>A. pullulans</i> 20 ไอโซเลต ภายหลังจากเลี้ยงบนอาหารสูตร YMXA ที่มีไซแลน 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน.....	62
5	องค์ประกอบชีวมวลของวัสดุจากการเกษตรที่ใช้ในการปรับอาหารสูตร XPM...	68
6	การตกตะกอนโปรตีนของไซแลเนส จาก <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.109B ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต.....	75
7	ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยหญ้าคาและหญ้าแฝกบดแห้งด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v).....	82
8	ปริมาณน้ำตาลที่ได้จาก การย่อย หญ้าคาและหญ้าแฝกบดแห้ง ด้วยเอนไซม์ไซแลเนส 66.47 มิลลิลิยูนิต.....	82
9	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบ SHF โดยใช้วัสดุหมักคือ หญ้าคาและหญ้าแฝกน้ำหนักแห้งเริ่มต้น 3 กรัม ที่ผ่านการย่อยเฮมิเซลลูโลส ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการปรับความเป็นกรดต่างด้วย 1 N NaOH ให้ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 ก่อนนำมาหมักด้วย <i>P. tannophilus</i> NRRL-Y2460 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	83
10	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบ SSF โดยใช้วัสดุหมักคือ หญ้าคาและหญ้าแฝกน้ำหนักแห้งเริ่มต้น 3 กรัม ที่ผ่าน การฆ่าเชื้อใน 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์ไซแลเนส 66.47 มิลลิลิยูนิต ร่วมกับ <i>P. tannophilus</i> NRRL-Y2460 ในการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	84

	หน้า
11	พื้นที่ได้กราฟของน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน..... 123
12	พื้นที่ได้กราฟของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน..... 124
13	พื้นที่ได้กราฟของน้ำตาลอะราบิโนสมาตรฐาน..... 125
14	พื้นที่ได้กราฟของเอทานอลมาตรฐานมาตรฐาน..... 126

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	องค์ประกอบโครงสร้างผนังเซลล์พืช.....	4
2	โครงสร้างของ ลิกนินประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็น phenyl propane และ อะลิฟาติก.....	5
3	โครงสร้างของเซลลูโลส ประกอบด้วยมอนอเมอร์คือ ดี-กลูโคสจับกันด้วยพันธะ ปีตา-1,4 ไกโคซิดิก.....	6
4	โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยมอนอเมอร์คือ ดี-ไซโลสจับกันด้วย พันธะปีตา-1, 4-ไซโลซิดิก.....	6
5	โครงสร้างของกลูโคแมนแนนที่เชื่อมต่อกันด้วยแบบปีตา-1,3 ไกโคซิดิก.....	7
6	โครงสร้างของไซแลนเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลดี -ไซโลส (D-xylose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะปีตา-1,4-ไซโลซิดิก.....	8
7	โครงสร้างของอะราบิโน-(4-โอ-เมทิลกลูคูโรโน)-ไซแลน จากไม้เนื้ออ่อน.....	8
8	ลักษณะโครงสร้างของ โอ-แอสี ทิล-(4-โอ-เมทิลกลูคูโรโน )-ไซแลน จากไม้เนื้อแข็ง.....	9
9	ลักษณะโครงสร้างของอะราบิโนไซแลน ในเปลือกของเมล็ดธัญพืช.....	9
10	โครงสร้างของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนโดยเอนไซม์ 1. เอนโดไซแลเนส 2. แอลฟา-แอล-อะราบิโนซิเดส 3. แอลฟา-ดี-กลูคูโรนซิเดส 4. เพอรูโลซิเดส เอส เทอเรส และ5. อะซิทิล (ไซแลน) เอสเทอเรส.....	11
11	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>A. pullulans</i> ในช่วงต่างๆ ของวงชีวิต 1.การสร้าง บลาสโตสปอร์ใหม่โดยการแตกหน่อ 2. การสร้างบลาสโตสปอร์โดยไม่สร้างผนังกัน (aseptate) 3. บลาสโตสปอร์ที่เปลี่ยนเป็นเซลล์พอง และเริ่มสร้างเส้นใย 4. บลาสโตสปอร์ที่เปลี่ยนเป็นเซลล์พอง และเซลล์พองเริ่มสร้างผนังเซลล์ให้หนาขึ้น เปลี่ยนเป็น คลาไมโดสปอร์ 5. คลาไมโดสปอร์เริ่มสร้าง germ tubes และเส้นใย และ6. เส้นใยสร้างเม็ดสีและผนังเซลล์ให้หนาขึ้น.....	16
12	เมตาบอลิซึมไซโลสของ <i>P. tannophilus</i> .....	20
13	สถานที่เก็บตัวอย่าง <i>A. pullulans</i> .....	32
14	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.1.....	38
15	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.2.....	39

รูปที่	หน้า
16	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.15..... 40
17	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.16..... 41
18	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.27..... 42
19	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.55..... 43
20	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.59..... 44
21	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.63..... 45
22	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.66..... 46
23	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.83..... 47
24	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.92..... 48
25	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.98..... 49
26	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.102..... 50
27	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.107..... 51
28	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.109B..... 52
29	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.109P..... 53
30	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.114..... 54
31	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.149..... 55
32	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.150O..... 56
33	ลักษณะโคโลนีของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.150W..... 57
34	การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลเนสของ <i>A. pullulans</i> ด้วยวิธี plate screening การสร้างไซแลเนสสังเกตุได้จากวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี ภายหลังจากเลี้ยงบนอาหารสูตร YMXA ที่มีไซแลน 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน (A) ไอโซเลต No.1, (B) ไอโซเลต No.2, (C) ไอโซเลต No.15, (D) ไอโซเลต No.16, (E) ไอโซเลต No.27, (F) ไอโซเลต No.55, (G) ไอโซเลต No.59, (H) ไอโซเลต No.63, (I) ไอโซเลต No.66, (J) ไอโซเลต No.83, (K) ไอโซเลต No.92, (L) ไอโซเลต No.98, (M) ไอโซเลต No.102, (N) ไอโซเลต No.107, (O) ไอโซเลต No.109B, (P) ไอโซเลต No.109P, (Q) ไอโซเลต No.114, (R) ไอโซเลต No.149, (S) ไอโซเลต No.150O และ (T) ไอโซเลต No.150W..... 61

รูปที่	หน้า	
35	<p>ไซแลเนสแอกติวิตีของ <i>A. pullulans</i> 20 ไอโซเลต ภายหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่เติมน้ำตาลไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน.....</p>	63
36	<p>แอกติวิตีสัมพันธ์ของไซแลเนสที่สร้างโดย <i>A. pullulans</i> 20 ไอโซเลต หลังจากทำการบ่ม เอนไซม์หยาบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดแอกติวิตีที่ภาวะปกติ แอกติวิตีสัมพันธ์อยู่คำนวณโดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน.....</p>	64
37	<p>การเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (EPS) ของ <i>A. pullulans</i> 20 ไอโซเลต ภายหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน.....</p>	65
38	<p>การเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.109B ภายหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่เติมน้ำตาลไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....</p>	67
39	<p>ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไซแลเนสของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.109B ที่เลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่ปรับแหล่งคาร์บอน โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน.....</p>	69
40	<p>ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไซแลเนสของ <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต No.109B ที่เลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่ปรับแหล่งไนโตรเจน โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ</p>	

รูปที่	หน้า
	71
41	72
42	73
43	76
44	77
45	78

รูปที่	หน้า	
46	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของไซแลเนส โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมา วัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ในภาวะปกติเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ.....	79
47	กราฟปริมาณไซโลสมาตรฐาน.....	118
48	กราฟปริมาณโปรตีนมาตรฐาน.....	119
49	ตัวอย่างแนวเส้นของ Haemocytometer.....	121
50	กราฟปริมาณน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน.....	123
51	กราฟปริมาณน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน.....	124
52	กราฟปริมาณน้ำตาลอะราบิโนสมาตรฐาน.....	125
53	กราฟปริมาณเอทานอลมาตรฐาน.....	126



# บทที่ 1

## บทนำ

ชีวมวลพืชประกอบด้วย ลิกนิน (lignin) 23 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) 33 เปอร์เซ็นต์ และเซลลูโลส (cellulose) 40 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง (Pereira et al., 2002) โดยเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งในผนังเซลล์ของพืช ช่วยเสริมโครงสร้างผนังเซลล์ให้หนาและแข็งแรง เฮมิเซลลูโลสเป็นสายพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย น้ำตาลหลายชนิดมาเชื่อมต่อกัน ซึ่งองค์ประกอบจะต่างกันออกไปตามชนิดของพืช โดยในไม้เนื้ออ่อนพบว่า มีกลูโคแมนแนนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส ส่วนไม้เนื้อแข็งพบว่ามีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก (ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์) ไซแลนเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 xylosidic เป็นสายหลักและมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นๆ หรือโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ มาเชื่อมเป็นสายกิ่ง (Nair et al., 2008) ในการย่อยสลายไซแลนให้ได้เป็นน้ำตาลไซโลสสามารถย่อยสลายได้โดย สารเคมี (chemical hydrolysis) หรือโดยการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลาย (enzymatic hydrolysis) ทั้งนี้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะได้ปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงกับสารตั้งต้นมากกว่าการใช้ สารเคมีในการย่อยสลาย จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงมีค่าใช้จ่ายน้อยและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนคือไซแลเนส (xylanase) ซึ่งไซแลเนสจะตัดสายพอลิเมอร์หลักของไซแลนให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลไซโลส (Haltrich et al., 1996)

ในปัจจุบันได้มีการนำไซแลนมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ โดยใช้เพิ่มความหวานเนื่องจากการย่อยไซแลนจะได้น้ำตาลดี-ไซโลส อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลไซลิทอล อุตสาหกรรมอาหารคนและสัตว์ อุตสาหกรรมสิ่งทอ และการผลิตเอทานอลชีวภาพ เป็นต้น ซึ่งการผลิตเอทานอลจากชีวมวลพืชในปัจจุบันได้รับความสนใจมากเนื่องจาก ราคาของน้ำมันเชื้อเพลิงที่เพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งการนำชีวมวลพืชมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอทานอลนั้นมีราคาต้นทุนค่อนข้างต่ำและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปนิยมใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งของน้ำตาลกลูโคสที่จะใช้ในกระบวนการหมักเป็นเอทานอล (Nair et al., 2008) ซึ่งประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นเอทานอลอยู่ที่ประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้หากได้มีการใช้เฮมิเซลลูโลส เช่น ไซแลน เป็นวัตถุดิบเพิ่มเติมก็จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลให้สูงขึ้นได้

ไซแลเนสที่มีการศึกษาในปัจจุบันนั้นผลิตมาจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรียและรา เป็นต้น แต่มีไซแลเนสจากจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่ได้มีการศึกษาในเชิงลึก เช่น *Bacillus subtilis*

(Pereira et al., 2002) *Streptomyces* sp. (Flores et al., 1996) ราบางชนิดในกลุ่มราฟอกขาว (Atik et al., 2006) *Aspergillus fumigatus* (Svarachorn, 1999) *Trichoderma reesei* (เนริสา คุณประทุม, 2543) *Thermomyces lanuginosus* (Christopher et al., 2005) และ *Aureobasidium pullulans* (Leathers et al., 1984) เป็นต้น *A. pullulans* เป็นราชนิดหนึ่งซึ่งพบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งบนผิวใบพืช มีผู้รายงานว่า *A. pullulans* สามารถผลิตไซแลเนสได้ในปริมาณมาก เช่น Leite และคณะ (2007) ศึกษาหาสายพันธุ์ของ *A. pullulans* ที่สามารถผลิตเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสในสภาวะ solid state fermentation โดยใช้ wheat bran เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ พบว่าสามารถให้ผลผลิตเอนไซม์ไซแลเนสสูงสุดที่ 5.0 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร โดยมีภาวะของความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ 5.0 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

สำหรับในประเทศไทย Prasongsuk และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของ *A. pullulans* เพื่อหาสายพันธุ์ที่สามารถผลิตพุลลูแลน (pullulan) ได้ในปริมาณมาก โดยคัดแยกเชื้อจากผิวใบไม้ และผนังห้องน้ำ จัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การใช้สารอาหาร การผลิต เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharide, EPS) และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA internal transcribed spacer (ITS) พบว่าสามารถคัดแยก *A. pullulans* ได้ถึง 15 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้เป็น *A. pullulans* var. *pullulans* 5 สายพันธุ์ นอกจากนี้ Manitchotpisit และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน โดยเปรียบเทียบ *A. pullulans* จำนวน 53 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ 43 สายพันธุ์ จากประเทศไทย 1 สายพันธุ์ใหม่ จากประเทศสหรัฐอเมริกา และ 7 สายพันธุ์อ้างอิง โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS IGS *EF-1 $\alpha$*  *BT2* และ *RPB2* ร่วมกับความสามารถในการผลิต EPS และการผลิตไซแลเนส จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่า สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์เหล่านี้ออกเป็น 12 กลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางชีวภาพของราชนิดนี้ โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่มาจากเขตร้อน เช่น ประเทศไทย

จากรายงานการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่า ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของ *A. pullulans* สูง แต่ อย่างไรก็ดีในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาในเชิงลึกถึงลักษณะสมบัติของเอนไซม์ไซแลเนสที่ผลิตโดย *A. pullulans* ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งที่จะทำการคัดแยก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนที่สามารถผลิตไซแลเนสได้ดี ศึกษาลักษณะสมบัติของไซแลเนส และหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนสให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอลชีวภาพต่อไป

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อผลิตไซแลเนสจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอลชีวภาพ

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ได้ *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ที่ให้แอกติวิตีของไซแลเนส และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอลชีวภาพจากวัชพืชทางการเกษตร

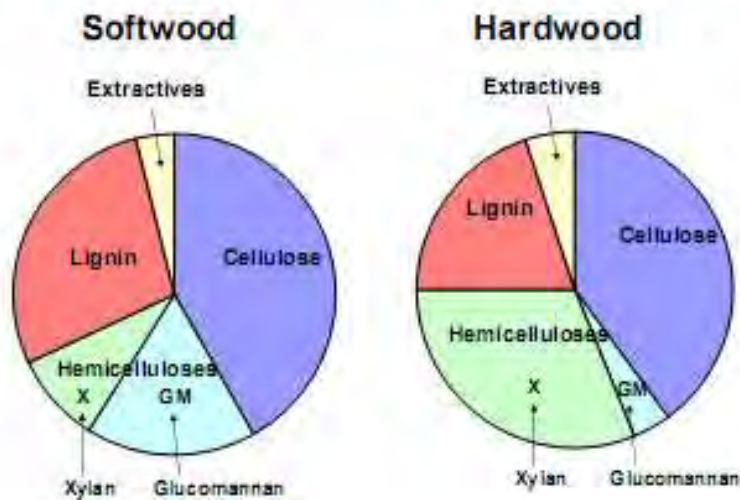
## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### ชีวมวล (Biomass)

ชีวมวล หมายถึงสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้บางส่วนจะอยู่ภายในโพรงท่อน้ำในพืช ในขณะที่ส่วนใหญ่จะพบในผนังเซลล์ของพืช ดังนั้นโดยทั่วไปเมื่อกล่าวถึงชีวมวลจึงมักหมายถึงสารประเภทลิกโนเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Blackburn et al., 1999) (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงาน ประเภทหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ได้ (renewable resource) ที่มีปริมาณมากที่สุดในโลก

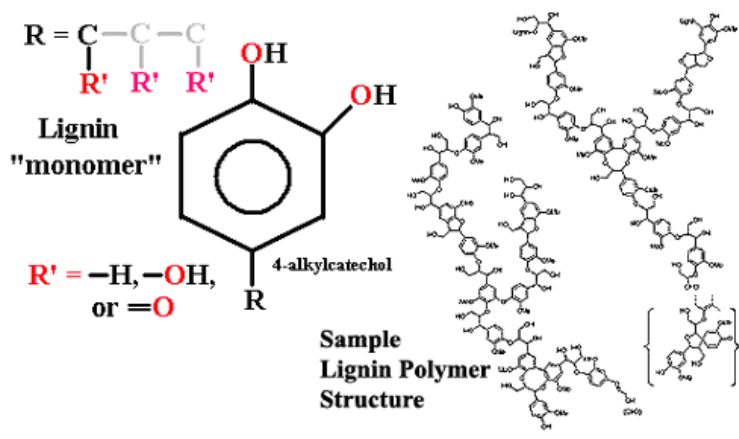
ชีวมวลพืชประกอบด้วย ลิกนิน (lignin) 23 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) 33 เปอร์เซ็นต์ และเซลลูโลส (cellulose) 40 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง (Pereira et al., 2002) โดยเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งในผนังเซลล์ของพืช ช่วยเสริมโครงสร้างผนังเซลล์ให้หนาและแข็งแรง เฮมิเซลลูโลสเป็นสายพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดมาเชื่อมต่อกัน โดยชนิดและปริมาณของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลสจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช



รูปที่ 1 องค์ประกอบโครงสร้างผนังเซลล์พืช (ที่มา: Blackburn et al., 1999)

**ลิกนิน**

ลิกนิน เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็น phenyl propane และ อะลิฟาติก ติดเชื่อมต่อกันด้วยพันธะหลายชนิดสานต่อกันอย่าง ไม่มีระเบียบทำให้มีโครงสร้างที่ ซับซ้อนแทรกอยู่ในผนังเซลล์ทุติยภูมิของพืช ทำให้ลิกนินถูกย่อยสลายได้ยาก การสลายตัวของ ลิกนินมักเป็นไปอย่างช้าๆ ดังนั้นลิกนินจึงเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของฮิวมัส ในพืชที่ ทั่วๆ ไปมี ลิกนินอยู่ประมาณร้อยละ 10-30 โดยเฉพาะในพืชที่มีท่อลำเลียงซึ่งลิกนินจะทำหน้าที่เสริมสร้าง ความแข็งแรงและเชื่อมจับเส้นใยของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในผนัง เซลล์เข้าไว้ด้วยกัน (รูปที่ 2) นอกจากนี้ลิกนินยังมีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกจึงลดการผ่านเข้าออกของน้ำผ่านผนังเซลล์ ของเนื้อเยื่อไซเลมในเนื้อไม้ ทำให้เนื้อไม้มีความต้านทานต่อการโจมตีของจุลินทรีย์ ได้ (Eriksson et al., 1990) แต่อย่างไรก็ดีแบคทีเรียและราบางชนิดสามารถย่อยสลายลิกนินได้

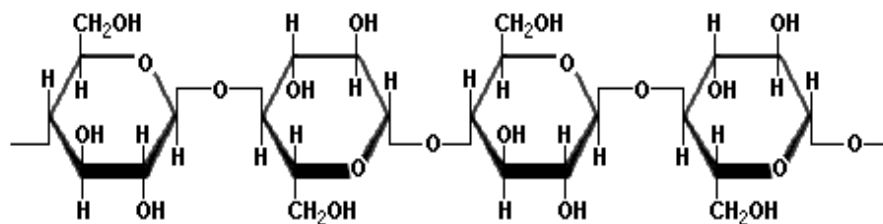


รูปที่ 2 โครงสร้างของลิกนินประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็น phenyl propane และอะลิฟาติก

**เซลลูโลส**

เซลลูโลสเป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีมากในผนังเซลล์ของ พืช ในธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่มักจะพบรวมกับ ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส เพนโตแซน (pentosan) กัม (gum) แทนนิน (tannins) ไขมัน (lipid) และสารเกิดสี (colouring matter) เป็นต้น โครงสร้างของโมเลกุลเซลลูโลสเป็นสายตรงไม่มีกิ่งก้านสาขาประกอบด้วยหน่วยย่อยของ น้ำตาลกลูโคสหลายๆ โมเลกุลมาต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ แบบบีตา-1,4 ไกลโคซิดิก ( $\beta$ -1,4 glycosidic bond) (รูปที่ 3) เซลลูโลสไม่ละลายในน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายต่าง อ่อน แต่จะละลายในกรดและด่างแก่ เมื่อย่อยสลายเซลลูโลสโดยสมบูรณ์ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะ ได้น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว แต่หากการย่อยสลายเกิดอย่างไม่ สมบูรณ์จะได้ เซลโลไบโอส

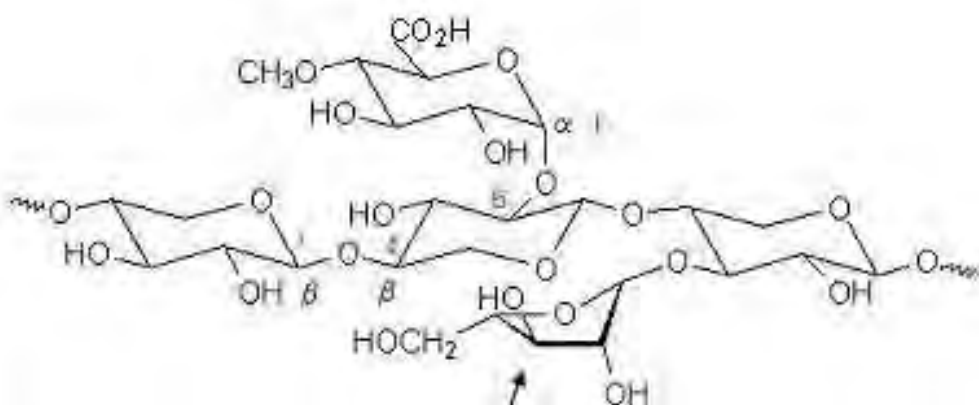
(cellobiose) ซึ่งเป็นไดแซคคาไรด์ (disaccharide) และได้โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) อื่นๆ (Stephens and Heichel, 1975)



รูปที่ 3 โครงสร้างของ เซลลูโลส ประกอบด้วยมอนอเมอร์คือ ดี-กลูโคสจับกันด้วยพันธะบีตา - 1,4 ไกลโคซิดิก

### เฮมิเซลลูโลส

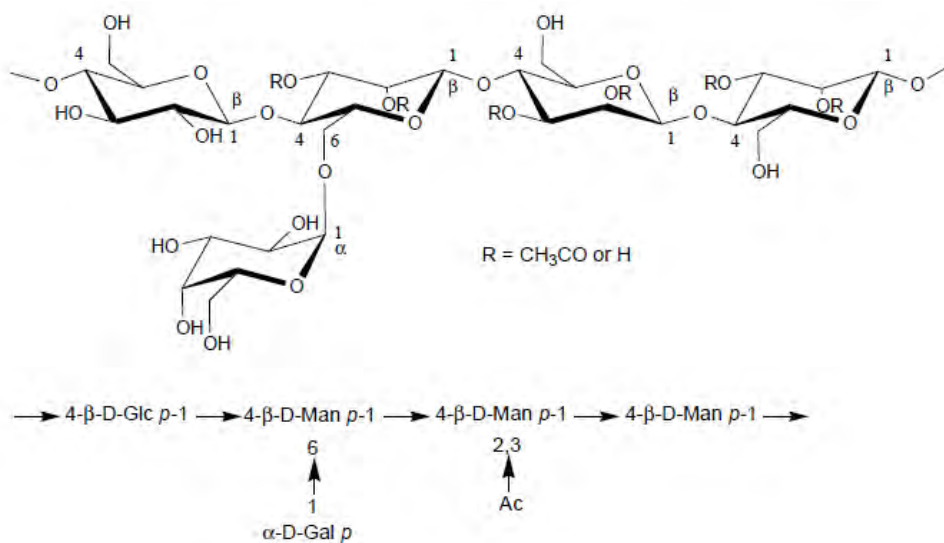
เฮมิเซลลูโลส เป็นสารอินทรีย์ที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสเป็น พอลิแซคคาไรด์ สายตรงที่มีกิ่งก้านสาขา โดยมีหน่วยย่อยตั้งแต่ 40 ถึง 200 หน่วย ประกอบขึ้น จากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่ คือ ดี - กลูโคส (D-glucose) ดี-กาแลคโตส (D-galactose) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-ไซโลส (D-xylose) แอล-อะราบิโนส (L-arabinose) กรดกลูคูโรนิก (D-glucuronic acid) และน้ำตาลเพนโตสชนิดอื่นๆ (Eriksson et al., 1990) (รูปที่ 4) เฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่จะประกอบด้วยน้ำตาล 2-6 ชนิด โดยองค์ประกอบจะต่างกัน ออกไปตามแต่ชนิดของพืช



รูปที่ 4 โครงสร้างของ เฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยมอนอเมอร์คือ ดี-ไซโลสจับกันด้วยพันธะ บีตา- 1, 4-ไซโลสิดิก

## กลูโคแมนแนน

กลูโคแมนแนนเป็นเฮมิเซลลูโลสชนิดหนึ่ง พบได้ในพืชกลุ่มไม้เนื้ออ่อน 14-20 เปอร์เซ็นต์ และพืชกลุ่มไม้เนื้อแข็ง 1-4 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย น้ำตาลดี-กลูโคส และดี-แมนโนส ไฮโดรกลูแคน และแคลโลส (callose) โดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ แบบปีตา-1,4 ไกลโคซิดิก ( $\beta$ -1,4-glycosidic bond) ซึ่งจะพบบริเวณปลายของเซลล์ท่ออาหาร (sieve tubes) (รูปที่ 5) (Hon and Shiraishi, 1990)



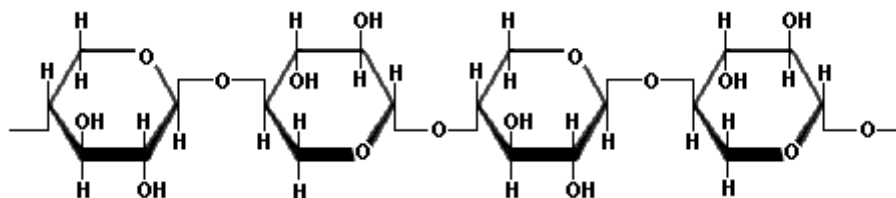
รูปที่ 5 โครงสร้างของ กลูโคแมนแนน ในพืชกลุ่มไม้เนื้ออ่อน ที่เชื่อมต่อกันด้วย แบบปีตา-1,4 ไกลโคซิดิก (Hon and Shiraishi, 1990)

## ไซแลน

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็งหลายชนิด ดังนั้นเมื่อก้าวถึงเฮมิเซลลูโลสก็หมายถึงไซแลน โดยไซแลนจะยึดเกาะกับเฮมิเซลลูโลสชนิดอื่นและเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน พบได้ตามธรรมชาติทั้งในไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง และพืชล้มลุก ซึ่งปริมาณและโครงสร้างจะแตกต่างกันไป ในไม้เนื้อแข็งพบว่าปริมาณไซแลนมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ในไม้เนื้ออ่อนพบว่าปริมาณไซแลนประมาณ 7-12 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง พืชล้มลุกและเศษวัสดุทางการเกษตร เช่น ฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว ชังข้าวโพด และในเปลือกเมล็ดธัญพืชมีปริมาณไซแลนประมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Nair *et al.*, 2008)

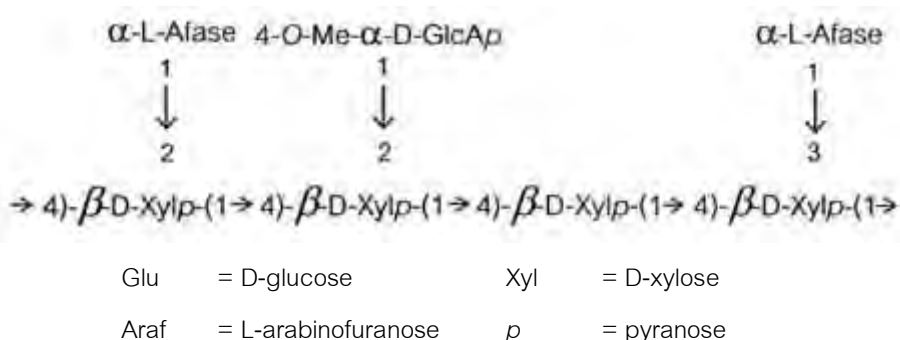
โครงสร้างของไซแลนเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ ปีตา-1,4-ไซโลซิดิก ( $\beta$ -1,4 xylosidic) เป็นสายหลัก และมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นๆ หรือโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ มาเชื่อมเป็นสายกิ่ง

(Nair et al., 2008) ซึ่งสายกิ่งของไซแลนอาจประกอบด้วย น้ำตาลอะราบินโนส (arabinose) กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) หรือ หมู่อะซิทิล (acetyl) ซึ่งองค์ประกอบจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของพืช (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 โครงสร้างของไซแลนเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะปีตา-1, 4-ไซโลสิดิก

โครงสร้างของไซแลน ในไม้เนื้ออ่อนคือ อะราบินโน- (4-โอ-เมทิลกลูคูโรน) -ไซแลน (arabino-(4-O-methylglucurono)-xylan) ซึ่งสายหลักเป็นไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะปีตา-1,4 ไซโลสิดิก และมี 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิด (4-O-methyl- D-glucuronic acid) เชื่อมต่อกับตำแหน่ง คาร์บอนที่-2 และมีหมู่แอล-อะราบินโนส (L-arabinose) เชื่อมต่อกับตำแหน่ง คาร์บอนที่-3 ของไซโลส (Hon and Shiraishi, 1990) (รูปที่ 7)

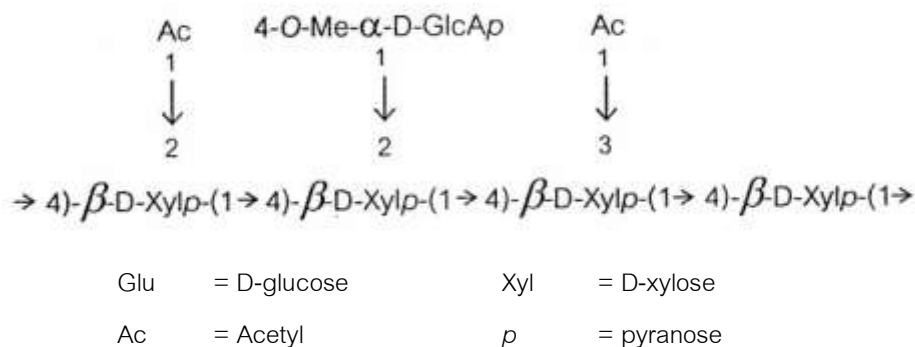


รูปที่ 7 ลักษณะโครงสร้างของอะราบินโน - (4-โอ-เมทิลกลูคูโรน) -ไซแลน จากไม้เนื้ออ่อน (Hon and Shiraishi, 1990)

โครงสร้างของไซแลน ในไม้เนื้อแข็งคือ โอ-แอซิทิล- (4-โอ-เมทิลกลูคูโรน) -ไซแลน (O-acetyl-(4-O-methylglucurono)-xylan) ซึ่งมีสายหลักเป็นไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะปีตา-1,4 ไซโลสิดิก และมี 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิกแอซิด (4-O-methyl-D-glucuronic acid) เชื่อมต่อ

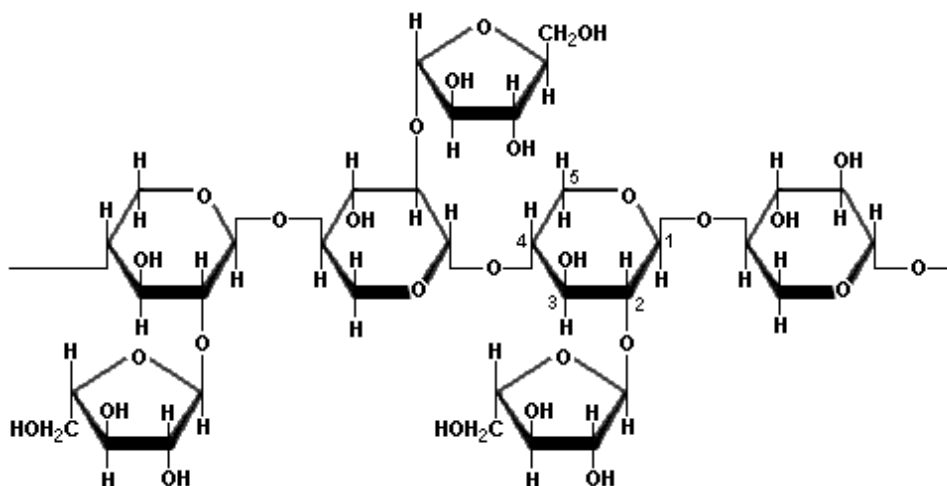


ที่ตำแหน่ง คาร์บอนที่-2 และมีหมู่อะซีทิล (acetyl) ต่อที่ตำแหน่ง คาร์บอนที่-3 และ คาร์บอนที่-2 ของไซโลส (Hon and Shiraishi, 1990) (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ลักษณะโครงสร้างของ ไอ-แอสีทิล-(4-ไอ-เมทิลกลูคูโรโน)-ไซแลน จากไม้เนื้อ แข็ง (Hon and Shiraishi, 1990)

ส่วนไซแลนที่พบในเปลือกของเมล็ดธัญพืช มักจะเป็น อะราบินโนไซแลน (arabinoxylan) โดยมีหมู่ข้างเคียงเป็นน้ำตาลอะราบินอส เพียงโมเลกุลเดียว (รูปที่ 9) (Hon and Shiraishi, 1990)



รูปที่ 9 ลักษณะโครงสร้างของอะราบินโนไซแลน ในเปลือกของเมล็ดธัญพืช

องค์ประกอบหลักของไซแลนคือน้ำตาลดี-ไซโลสซึ่งมีสมบัติเป็นสารให้รสหวาน ดังนั้นจึงสามารถเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า wood sugar หรือ น้ำตาลไม้ (Hon and Shiraishi, 1990) มีสูตรเคมี  $C_5H_{10}O_5$  มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 150.13 มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 144-145 องศาเซลเซียส มักไม่ค่อยพบในรูปของมอนอเมอร์

## การย่อยสลายไซแลน

ในการย่อยสลายไซแลนให้ได้เป็นน้ำตาลไซโลสสามารถย่อยสลายได้โดยสารเคมี (chemical hydrolysis) หรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) หรือการใช้ทั้งสองอย่างรวมกัน (Tsao and Chiang., 1983)

### 1. การย่อยสลายไซแลนด้วยวิธีทางเคมี

#### 1.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด

การย่อยสลายไซแลนด้วยกรดเพื่อให้ได้ไซโลสเป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรุนแรงและไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่สมบูรณ์ เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษเช่น เฟอฟูรัล (furfural) นอกจากนี้การย่อยสลายไซแลนด้วยกรดยังต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อภาวะที่เป็นกรดและอุณหภูมิสูงได้ (Woodward, 1987)

#### 1.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง

การย่อยสลายไซแลนด้วยด่างนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการทำกระดาษ ในขั้นตอน Kraft cooking ซึ่งเป็นการนำชิ้นไม้ไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เพื่อให้เปลือกไม้ยุ่ยและเป็นการขจัดลิกนินที่มีอยู่ในเนื้อไม้บางส่วนด้วย ในขั้นตอนนี้เฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อยออกมาและปนอยู่ในน้ำทิ้ง ซึ่งน้ำทิ้งจากการย่อยสลายด้วยด่างจะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เพราะมีสารเคมีเจือปนอยู่ (Visser et al., 1992)

### 2. การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงกับสารตั้งต้นมากกว่าการใช้สารเคมีในการย่อยสลาย จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง มีค่าใช้จ่ายน้อยและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยเอนไซม์จะทำการกระตุ้นปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะปีตา-1, 4-ไซโลซิติกของสายหลักให้ได้ไซโลสหรือไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนประกอบด้วยเอนไซม์ 2 กลุ่มใหญ่คือ

#### 1 เอนไซม์ย่อยสลายสายหลักของไซแลน

1.1 เอนโดไซแลเนส (endoxylanase) หรือ ปีตา-1, 4-ดี-ไซแลน-ไซลานไฮโดรเลส ( $\beta$ -1, 4-D-xylan-xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) เอนไซม์ชนิดนี้จะทำการ สลายพันธะปีตา-1, 4-ไซโลซิติกในสายหลักของไซแลนแบบสุ่ม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่า กลไกแบบเอนโด (endo-mechanism) ผลของการย่อยจะได้ไซโลสและ โอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Gilbert and Hazlewood, 1993)

1.2 ปีตา-ไซโลซิเดส ( $\beta$ -xylosidase) หรือ ปีตา-1, 4-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส ( $\beta$ -1, 4-D-xylan-xylohydrolase, EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้จะทำการ สลายพันธะปีตา-1, 4-ดี-ไซโลซิติกจากปลายสายด้าน นอนรีดิวซ์ (non-reducing end) และปลดปล่อยน้ำตาลไซโลสมา

ที่ละ 1 โมเลกุล เรียกว่ากระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่า กลไกแบบเอคไซ (exo-mechanism) ผลของการย่อยจะได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dekker, 1976)

## 2 เอนไซม์ย่อยสลายสายกิ่งของไซแลน

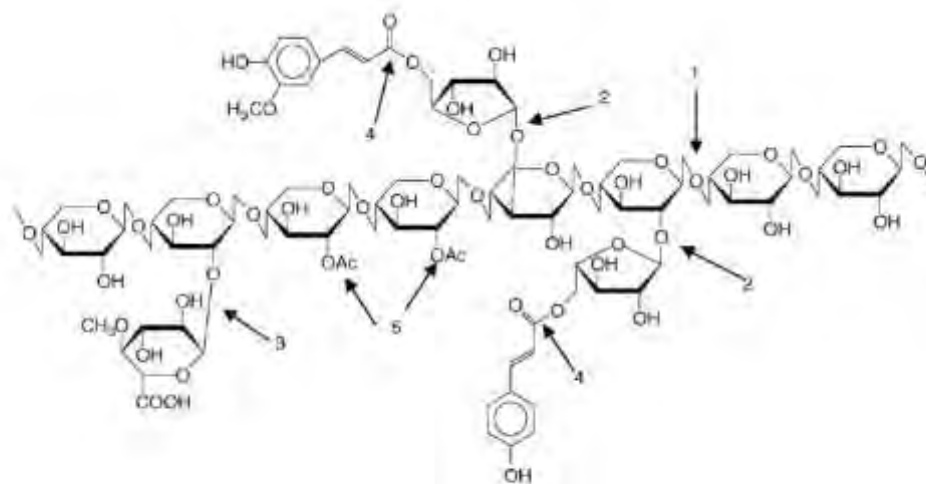
2.1 แอลฟา-แอล-อะราบินอซิเดส ( $\alpha$ -L-arabinosidase, EC 3.2.1.55) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะแอลฟา-1, 2 และแอลฟา-1, 3 จากปลายด้านอนนรีดิวิซ์ของสายกิ่ง แอลฟา-แอล-อะราบินอซิเดสในไซแลน อะราบินอซิแลน และอะราบินอกาแลคแทน (Manin *et al.*, 1994) โดยจะได้อะราบินอซิเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

2.2 แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส ( $\alpha$ -D-glucuronidase, EC 3.2.1.139) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะแอลฟา -1, 2 ในสาย 4-โอ-เมทิล -แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด (Whistler and Richards, 1970) โดยจะได้ 4-โอ-เมทิล-ดี-กลูคูโรนิคแอซิดเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

2.3 อะซิทิล (ไซแลน) เอสเทอเรส (acetyl (xylan) esterase: EC 3.1.1.6) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ ที่เชื่อมระหว่างสายหลักของไซแลนกับหมู่อะซิทิล ทำให้เอนไซม์ย่อยสลายสายหลักชนิดอื่นๆ สามารถเข้าย่อยสลายไซแลนได้ดีขึ้น (Johnson *et al.*, 1988)

2.4 เฟอรูโลอิล เอสเทอเรส (Feruloyl esterase: EC 3.1.1.73) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ ระหว่างอะราบินอซิในสายกิ่งของไซแลนและกรดเฟอรูลิก (Ferulic acid) ของลิกนิน ซึ่งพันธะนี้จะทำหน้าที่เชื่อมลิกนินเข้ากับเฮมิเซลลูโลส

จากเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลนทั้งหมดที่กล่าวมาแล้ว สามารถแสดง แผนภาพรวมการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้เพื่อย่อยสลายโครงสร้างของไซแลน ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 โครงสร้างของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนโดยเอนไซม์ 1. เอนโดไซแลเนส และบีตา-ไซโลซิเดส 2. แอลฟา-แอล-อะราบินอซิเดส 3. แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส 4. เฟอรูโลอิล เอสเทอเรส และ 5. อะซิทิล (ไซแลน) เอสเทอเรส (ที่มา: Chavez *et al.*, 2001)

## ประโยชน์ของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน

ในปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ (เพื่อการย่อยไซแลนให้น้ำผลไม้ใสขึ้น) (Polizeli et al., 2005) อุตสาหกรรมการทำไวน์ (เพื่อเพิ่มกลิ่นรสในไวน์) (Saha, 2000) อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (เพื่อลดความหนืดของอาหารสัตว์ลงทำให้สัตว์ย่อยง่ายขึ้นและช่วยเพิ่มการดูดซึม) อุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ (เพื่อเตรียมเยื่อกระดาษและเพื่อฟอกสีเยื่อกระดาษให้ขาวขึ้น) (Bajpai, 1994) และการแปรสภาพเศษวัสดุทางการเกษตรมาเป็นเชื้อเพลิงและสารเคมี (เพื่อย่อยให้ได้น้ำตาลไซโลสก่อนนำไปแปรรูปให้ได้เอทานอล) (Screenath et al., 2001)

การย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์นั้นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ย่อยสลายกิ่งและเอนไซม์ย่อยสลายหลัก เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือ ไซโลสและอะราบินอส ซึ่งสามารถนำไปใช้ผลิตผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าที่มีประโยชน์และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เช่น ไซโลสสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างไซโลสไอโซเมอเรส (หรือกลูโคสไอโซเมอเรส) เพื่อเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็น ฟรักโทสสำหรับการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทส (High Fructose Syrup) สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตขนมหวานและลูกกวาด การใช้ไซโลสเป็นสารอาหารให้กับจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) (Deshpande et al., 1992) การใช้ไซโลสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไซลิทอล (Barbosa et al., 1988) ซึ่งเป็นสารให้ความหวานทดแทนน้ำตาลในทางการแพทย์ โดยใช้กับผู้ป่วยโรคเบาหวาน หรือใช้เป็นสารให้ความหวานในลูกอม และหมากฝรั่ง ซึ่งจะไม่ทำให้ฟันผุ (Parajo et al., 1997)

นอกจากนี้ยังมีการใช้ประโยชน์จากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเฮมิเซลลูโลส ในแง่ของการผลิตพลังงานทดแทน โดยเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีมูลค่าสูงขึ้นด้วยกระบวนการหมัก เช่น เอทานอล บิวทานอล (Neale et al., 1988) และสารประกอบอื่นๆ การใช้กรดเจือจางที่อุณหภูมิสูงสามารถย่อย เฮมิเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ (Saha and Bothast, 1998) แต่วิธีนี้จะให้ผลผลิตข้างเคียงที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมัก ดังนั้นเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน (xylan-degrading enzyme) จึงมีความสำคัญมากในการย่อยสลายเศษวัสดุทางการเกษตรให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสำหรับเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักให้ได้เอทานอล เพราะเป็นปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรงและมีความจำเพาะสูง จึงไม่ก่อให้เกิดสารข้างเคียงที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์

การผลิตเอทานอลจากเศษวัสดุทางการเกษตรในปัจจุบันเป็นที่สนใจอย่างมากเนื่องจากการช่วยเพิ่มมูลค่าของวัสดุที่ไม่มีและลดการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) แนวโน้มการใช้เอทานอลในอนาคตประเมินกันว่าจะมีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเป็นสารที่ปลอดภัยกับสิ่งแวดล้อม ในการผลิตเอทานอลจะใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งของน้ำตาลกลูโคส โดยเซลลูโลส

สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ถึง 40 – 50 เปอร์เซ็นต์ แต่หากมีการใช้เฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนเป็นวัตถุดิบเพิ่มเติมก็จะเป็นการเพิ่มปริมาณการผลิตเอทานอลให้สูงขึ้นได้ เนื่องจากไซแลนที่พบในผนังเซลล์ของพืชนั้นมีมากถึง 20-30 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามยีสต์ที่ใช้ผลิตเอทานอลในเชิงอุตสาหกรรม เช่น *Saccharomyces cerevisiae* นั้นส่วนใหญ่ไม่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลไซโลส (Kotter and Ciriacy, 1993) ทำให้การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรนั้นได้ไม่เต็มที่ จึงทำให้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลต้องสูญเสียน้ำตาลไซโลสไปอย่างเปล่าประโยชน์

### **แหล่งของไซแลเนส**

ไซแลเนสพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท ยีสต์ รา การสร้างไซแลเนสโดยจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ จากนั้นจึงจะปลดปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายไซแลนต่อไป

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถสร้างไซแลเนสได้

ชนิดจุลินทรีย์	ปริมาณไซแลเนส	เอกสารอ้างอิง
<b>แบคทีเรีย</b>		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	12 U/ml	Breccuia et al., 1998
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	21 U/ml	Nanmori et al., 1990
<i>Bacillus</i> sp. BP-23	26 U/ml	Blanco et al., 1995
<i>Bacillus</i> sp. K-1	58 U/ml	Ratanakhanokchai et al., 1999
<i>Bacillus stearothermophilus</i> T6	73 U/ml	Khasin et al., 1993
<i>Bacillus subtilis</i>	77 U/ml	Pereira et al., 2002
<i>Bacillus subtilis</i>	120 U/ml	Gokhale and Deobagkar, 1989
<i>Bacillus subtilis</i> H5	86 U/ml	Khanongnuch et al., 1999
<i>Cellulomonas</i> sp. NCIM 2353	5.8 U/mg	Chaudhary and Deobagkar, 1997
<i>Streptomyces</i> sp. AMT-3	70 U/ml	Nascimento et al., 2002
<i>Streptomyces</i> sp.	81 U/ml	Belfaquih et al., 2004
<b>รา</b>		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	122 U/ml	Svarachorn, 1999
<i>Aspergillus kawachii</i>	143 U/ml	Ito et al., 1992
<i>Aspergillus nidulans</i>	164 U/ml	Femandez-Espinar et al., 1994
<i>Aspergillus niger</i> NCIM 1207	86 U/ml	Gokhale et al., 1986
<i>Aspergillus sojae</i>	125.14 U/ml	Kimura et al., 1998
<i>Aspergillus sydowii</i> MG49	68 U/ml	Ghosh and Nanda, 1994
<i>Aureobasidium pullulans</i>	2.59-373 U/ml	Leathers et al., 1986
<i>Aureobasidium pullulans</i>	7.70-94.30 U/ml	Manitchotpisit et al., 2009
<i>Aureobasidium pullulans</i> NCIM1050	31 U/ml	Karni et al., 1993
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	121 U/ml	Christakopoulos et al., 1999
<i>Myceliophthora</i> sp.	56 U/ml	Chadha et al., 2004
<i>Penicillium capsulatum</i>	55 U/ml	Ryan et al., 2003
<i>Penicillium herquei</i> IFO 4674	60 U/ml	Ito et al., 2003
<i>Penicillium</i> sp.	71 U/ml	Kimura et al., 2000
<i>Trichoderma harzianum</i>	960 U/ml	De Paula Silveira et al., 1999
<i>Trichoderma reesei</i> PC-3-7	670 U/ml	Xu et al., 1998

***Aureobasidium pullulans***

*A. pullulans* เป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ใน Phylum Ascomycota มีลักษณะคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) สำหรับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของ *A. pullulans* มีดังนี้ (Yurlova et al., 1999; De Hoog and Yurlova, 1994)

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Dothideomycetes

Order Dothideales

Family Dothideaceae

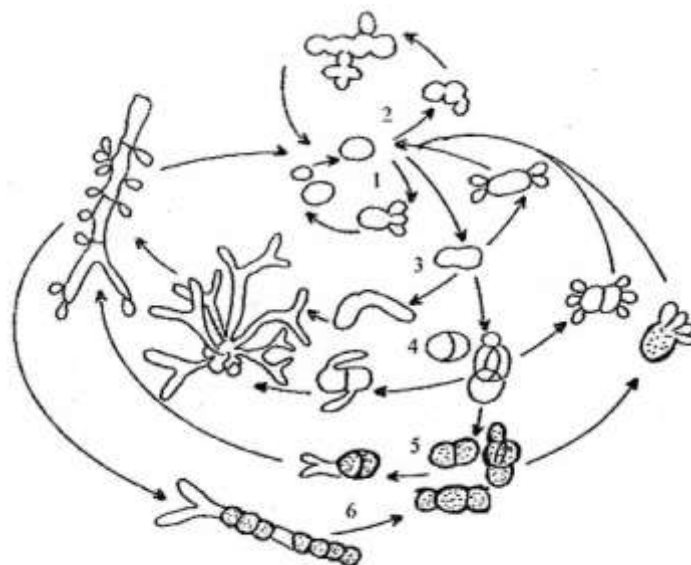
Genus *Aureobasidium*

Species *Aureobasidium pullulans*

*A. pullulans* มีชื่อเดิมว่า *Pullularia pullulans* และมีชื่อสามัญว่า "ยีสต์ดำ" หรือ "Black yeast" เนื่องจากสามารถผลิตเม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) ได้ในระหว่างการเจริญเติบโต ทำให้โคโลนีมีสีดำ *A. pullulans* มีรูปร่างได้หลายลักษณะ (polymorphic) ประกอบด้วย เช่น บลาสโตสปอร์ (blastospore) เซลล์พอง (swollen cell) คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) เส้นใยแท้ (hyphae) หรือ เส้นใยเทียม (pseudohyphae) เป็นต้น (Ramos and Acha, 1975) (รูปที่ 11) ทั้งนี้การเกิดรูปร่างแบบต่างๆ มักจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมเป็นสำคัญ ซึ่ง *A. pullulans* สามารถดำรงชีวิตในธรรมชาติได้ทั้ง ในอากาศ (airborne) (Punnapayak et al., 2003) บนผิวใบไม้ (Prasongsuk et al., 2005; Manitchotpisit et al., 2009) ผนังห้องน้ำ (Prasongsuk et al., 2005; Lotrakul et al., 2009) และในฟองน้ำทะเล (Shigemori et al., 1998) เป็นต้น

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา ในช่วงแรก *A. pullulans* ถูกค้นแยก ในประเทศแถบเขตอบอุ่น เช่น เยอรมนี แคนาดา เดนมาร์ก เนเธอร์แลนด์ ออสเตรเลีย อังกฤษ และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น แต่ต่อมามีรายงานว่าสามารถค้นแยก *A. pullulans* ได้ทั่วไปทั้งในแถบประเทศเขตร้อน เช่น บราซิล อินเดีย มาเลเซีย และจาไมกา เป็นต้น ในเขตแห้งแล้ง เช่น อียิปต์ อิรัก ปากีสถาน และ อัฟริกาใต้ เป็นต้น (Deshpande et al., 1992) และในเขตขั้วโลกเหนือ เช่น นอร์เวย์ (Zalar et al., 2008) ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมาพบว่า *A. pullulans* นั้นสามารถพบได้ในหลากหลายสภาพภูมิอากาศตั้งแต่ร้อนจัดจนถึงหนาวจัด

สำหรับในประเทศไทย มีรายงานว่าสามารถคัดแยก *A. pullulans* ได้จากเขตป่าสนเขา ผ่น้ำห้อยน้ำ และผิวน้ำไม้ (Punnapayak et al., 2003; Prasongsuk et al., 2005; Lotrakul et al., 2009; Manitchotpisit et al., 2009)



รูปที่ 11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* ในช่วงต่างๆ ของวงจรชีวิต 1. การสร้างบลาสโตสปอร์ใหม่โดยการแตกหน่อ 2. การสร้างบลาสโตสปอร์โดยไม่สร้างผนังกัน (aseptate) 3. บลาสโตสปอร์ที่เปลี่ยนเป็นเซลล์ฟอง และเริ่มสร้างเส้นใย 4. บลาสโตสปอร์ที่เปลี่ยนเป็นเซลล์ฟอง และเซลล์ฟองเริ่มสร้างผนัง เซลล์ให้หนาขึ้น เปลี่ยนเป็น คลาไมโดสปอร์ 5. คลาไมโดสปอร์เริ่มสร้าง germ tubes และเส้นใย และ 6. เส้นใยสร้างเม็ดสีและผนังเซลล์ให้หนาขึ้น (ที่มา: Romos and Acha, 1975)

### การจัดจำแนก *A. pullulans*

1. การจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ได้แก่

1.1 ลักษณะของโคโคนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์

เมื่อ *A. pullulans* เจริญเติบโตบนอาหารกึ่งแข็ง Malt Extract Agar (MEA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าโคโคนีของ *A. pullulans* จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 มิลลิเมตร โดยลักษณะโคโคนีเรียบ และเป็นเมือก มีสีครีมหรือชมพูในระยะแรกทีเดียว เมื่อเวลาผ่านไปโคโคนีอาจเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นหรือเปลี่ยนเป็นสีอื่น เช่น สีเขียวมะกอก สีแดง เหลือง น้ำตาลอ่อน และดำ เป็นต้น มีเส้นใยสั้นๆ ขึ้นรอบๆ โคโคนี ลักษณะ ของเส้นใยเรียบ โปร่งใสเห็น septum ชัดเจน ความกว้างเส้นใยประมาณ 3-12 ไมโครเมตร เมื่อเลี้ยงนานขึ้นอาจเปลี่ยนเป็นสีเข้ม และมีผนังเซลล์หนาขึ้น เรียกว่าเป็น คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) มีการสร้างโคโคนีเดียวจากภายใน (endoconidia) ด้านข้างหรือปลายของเส้นใย (Hermandes-Nijhof,



1977) ลักษณะโคนิเดียปฐมภูมิ (primary conidia) เป็นเซลล์เดี่ยว ค่อนข้างกลม ไปรังไข่ ผังเรียบ มีรูปร่างหลากหลายและมีขนาดแตกต่างกัน มักสร้างโคนิเดียทุติยภูมิ (secondary conidia) ขนาดเล็ก หรือ budding cell โดยอาจสร้าง secondary conidia ขนาดเล็กหลาย เซลล์โดยยังติดอยู่กับเซลล์แม่ มีรูปร่างคล้ายกับนิ้วมือ และเมื่อ secondary conidia หลุดออกไป ในบางเซลล์ อาจปรากฏแผลจากการหลุดออกของโคนิเดีย (bud scar) (Hermandes-Nijhof, 1977; Domsch et al., 1993)

### 1.2 การใช้แหล่งอาหารต่างๆ กัน (Substrate utilization)

การใช้แหล่งอาหารต่างๆ กัน สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกได้ถึงในระดับ variety เช่น การใช้แหล่งคาร์บอน โดย *A. pullulans* var. *pullulans* จะสามารถใช้แลคโตส (lactose) และเมทธิลแอลฟาดีกลูโคส (methyl- $\alpha$ -D-glucose) เป็นคาร์บอนได้ แต่ *A. pullulans* var. *aubasidani* จะไม่สามารถใช้แลคโตสและ เมทธิลแอลฟาดีกลูโคส เป็นคาร์บอนได้ (Yurlova and De Hoog, 1997)

### 1.3 การสร้างพอลิแซคคาไรด์

การสร้างพอลิแซคคาไรด์สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนก *A. pullulans* ได้ เนื่องจากว่าลักษณะโครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์ ของแต่ละ variety ต่างกันคือ *A. pullulans* var. *pullulans* นั้นพอลิแซคคาไรด์ที่สร้างขึ้นประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตไตรโอส หรือ มอลโตเตตระโอสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,6 ( $\alpha$ -1,6) linkages) (Leather, 2003) แต่พอลิแซคคาไรด์ที่ *A. pullulans* var. *aubasidani* มีโครงสร้างเป็นกลูแคน (glucan) ที่ต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,4 บีตา 1,6 และ บีตา 1,3 ไกลโคซิดิก (Yurlova and De Hoog, 1997)

2. การจัดจำแนกโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล เช่น การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nuclear ribosomal DNA Internal transcribed spacer (ITS) (Yurlova et al., 1999; Punnapayak et al., 2003) เป็นต้น สำหรับ Manitchotpisit และคณะ (2009) ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ internal transcribed spacer (ITS), intergenic spacer 1 (IGS), translation elongation factor-1 alpha (*EF-1 $\alpha$* ), beta tubulin (*BT2*) และ RNA polymerase II (*RPB2*) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ในการจัดจำแนกโดยใช้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ตำแหน่ง ITS, IGS, *EF-1 $\alpha$*  และ *BT2* สามารถจัดจำแนก *A. pullulans* ได้เป็น 10 Clade แต่ถ้าหากใช้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ตำแหน่ง *RPB2* เข้ามาช่วยด้วยจะทำให้สามารถ จัดจำแนก *A. pullulans* ได้เป็น 12 Clade และ อีก 1 Clade คือ กลุ่มที่ไม่ใช่ *A. pullulans* ทำให้สามารถจัดจำแนก *A. pullulans* ได้อย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้น

### การประยุกต์ใช้ประโยชน์จาก *A. pullulans*

*A. pullulans* มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ ที่เรียกว่า พูลูลูแลน (pullulan) ได้ ซึ่งพอลิเมอร์ดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมพลาสติก อุตสาหกรรมสิ่งทอ และงานด้านอิเล็กทรอนิกส์ (Chi et al., 2009) อีกทั้งมีการใช้ประโยชน์จาก *A. pullulans* ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) (Deshpande et al., 1992) การนำ *A. pullulans* มาใช้ในการผลิตสารต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. (Lotrakul et al., 2009) นอกจากนี้ *A. pullulans* สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น เอนไซม์อะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่นำมาใช้ย่อยวัตถุดิบพวกแป้งให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีโมเลกุลเล็กลง เช่น น้ำตาล มอลโทส (maltose) กลูโคส (glucose) เดกซ์ตริน (dextrin) ใช้มากในอุตสาหกรรมผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส ลูกกวาด อุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมการหมักที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ อุตสาหกรรมการผลิตแป้งสาลีสำเร็จรูป เอนไซม์เพคตินเอสใช้ในการย่อยสลายสารเพคติน (pectin) ให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหลายอย่าง เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำผลไม้ ไวน์ โกโก้ และกาแฟ เอนไซม์ไซแลเนส มาใช้ในอุตสาหกรรมการฟอก เยื่อกระดาษ เพื่อช่วยลดปริมาณการใช้คลอรีน รวมทั้งการนำไซแลเนสมาใช้ในการย่อยเฮมิ-เซลลูโลส เพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลสสำหรับเป็นวัตถุดิบในการหมักเป็นเอทานอล (Burchhardt and Ingram, 1992)

### การศึกษาการผลิตไซแลเนส โดย *A. pullulans*

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ที่ผลิตเม็ดสีอื่นๆ ที่ไม่ใช่สีดำ (color variant) สามารถผลิตไซแลเนสได้ในช่วง 2.67-373 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Leathers, 1986) ได้มีการศึกษาถึงความสามารถ ของ *A. pullulans* ในการ ผลิตไซแลเนสได้ให้ในปริมาณมาก เช่น ศึกษาหาสายพันธุ์ของ *A. pullulans* ที่สามารถผลิตเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสในภาวะ solid state fermentation โดยใช้ รำข้าวสาลี (wheat bran) เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส โดยสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้ 5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Leite et al., 2007) และการสร้างเอนไซม์ไซแลเนส ของ *A. pullulans* เมื่อใช้วัสดุทางการเกษตร เช่น รำข้าวสาลี ฟางข้าว ชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่า *A. pullulans* สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลเนสอยู่ในช่วง 0.60-10.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Karni et al., 1993) อีกทั้งยังมีการประยุกต์ ไซแลเนส จาก *A. pullulans* มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการทำกระดาษ และการขจัดหมึกพิมพ์จากกระดาษ รีไซเคิล เป็นต้น (Christov et al., 1999) นอกจากนี้ยังมีการศึกษา ของ Li และ Ljungdahl (1995) ถึงสามารถในการนำยีนที่สามารถ สังเคราะห์ ไซแลเนส จาก

*A. pullulans* โดยการใช้ *Escherichia coli* เป็นเวกเตอร์ (vector) เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนใน *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้ GAL1 เป็นโปรโมเตอร์ (promoter) ใน pYES2 ซึ่งพบว่าสามารถผลิตไซแลเนส 26.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

### กระบวนการผลิตเอทานอลจากชีวมวลพืช

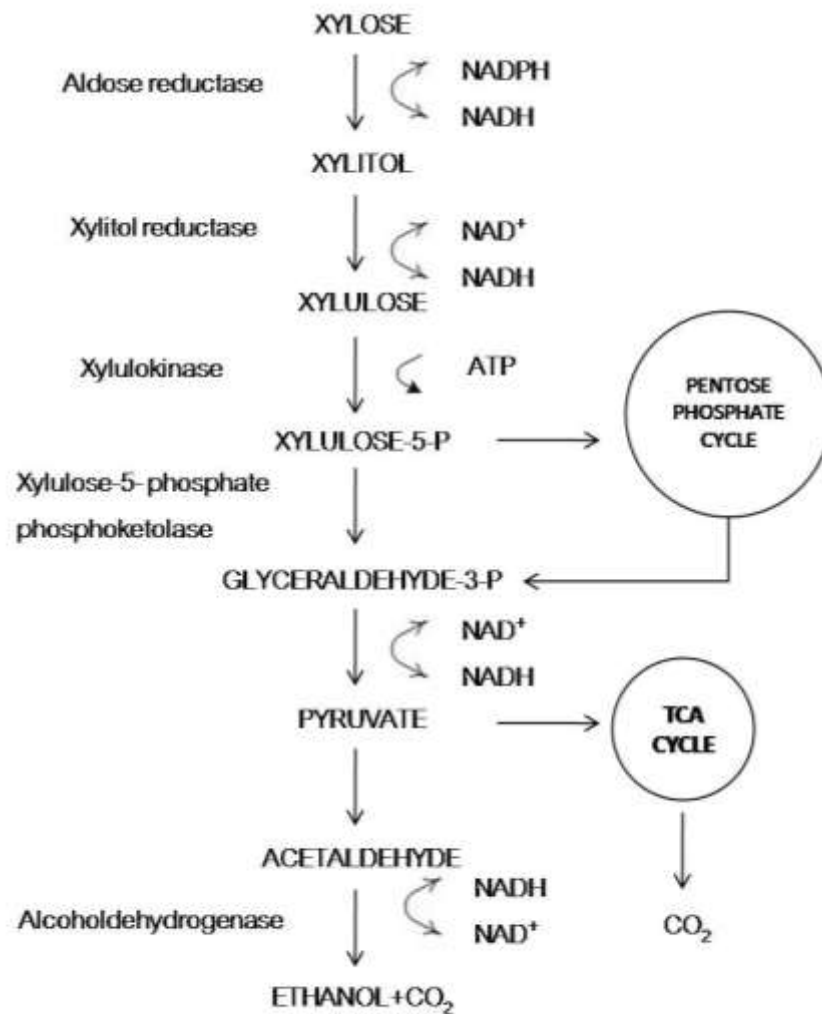
ในการผลิตเอทานอลสามารถผลิตได้โดยการนำชีวมวลพืชที่เป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียนมาเป็นวัตถุดิบ ซึ่งอาจจะเป็นแป้ง น้ำตาล หรือลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) ชีวมวลอาจได้มาจากผลิตภัณฑ์ที่เหลือทิ้งจากกระบวนการอื่นๆ อาจเป็นน้ำทิ้งที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรม หรือผลพลอยได้และเศษวัสดุจากการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด โดยชีวมวลที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลจะเป็นพืชที่ให้ความหวานเนื่องจากมีน้ำตาลเพราะสามารถการนำเข้าสู่กระบวนการหมักได้ง่าย หรือเป็นพืชที่ให้แป้ง เช่น ข้าว ข้าวโพด มันสำปะหลัง จะนำมาบดแล้วจึงย่อยให้แป้งกลายเป็น น้ำตาลก่อน ส่วนวัสดุทางการเกษตรซึ่งเป็นสารประเภท ลิกโนเซลลูโลสต้องนำมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ให้กลายเป็นน้ำตาล และนำเข้าสู่กระบวนการหมักต่อไป (Perego et al., 1990)

### การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลดีไซโลส

สำหรับการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลส จุลินทรีย์ที่ สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสให้เป็นเอทานอล มีหลายชนิด เช่น *Pachysolen tannophilus* (Punnapayak and Emert, 1986) *Pichia stipitis* (Perego et al., 1990) *Pichia besseyi* (Kurtzman and Wickerham, 1972) และ *Candida shehatae* (du Preez et al., 1984) จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลิทอล โดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเตส และจากนั้นไซลิทอลเปลี่ยนเป็นไซลูโลส ซึ่งไซลูโลสที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนต่อไปเพื่อสร้างไพรูเวท ถ้ามีออกซิเจน ไพรูเวทจะเข้าสู่ วัฏจักร Tricarboxylic acid (TCA) cycle เพื่อสร้างพลังงาน แต่ถ้ามีออกซิเจนน้อยไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสนั้น เกิดในสภาพที่มีออกซิเจนจำกัดได้ดีกว่าในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนเลย โดยออกซิเจนนั้นจะช่วยส่งเสริมให้มีการหายใจ แต่ถ้าหากให้ออกซิเจนมากเกินไปจะทำให้มีการหายใจมาก ซึ่งจะส่งผล ทำให้มีการผลิตเอทานอล ได้น้อยลง (du Preez et al., 1984)

กระบวนการหมักเอทานอล โดยใช้ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ 51.10 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.90 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของน้ำตาล นอกจากนั้นยีสต์จะใช้สำหรับการเจริญและเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่นๆ เช่น กลีเซอรอล (glycerol) กรดซัคซินิก (succinic acid) และอะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) เป็นต้น (Barnett et al., 1979)

สำหรับไซโลสเมตาบอลิซึมของ *P. tannophilus* เริ่มจากไซโลสจะถูกเปลี่ยน ไปเป็น ไซลิตอล หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็น ไซลูโลส และไซลูโลส-5-ฟอสเฟต ตามลำดับ ซึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟต จะเข้าสู่วิถีเพ็นโตส ฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) ได้เป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต และเข้าสู่ วิถีไฟ รุเวต จนได้ อะซีตอลดีไฮด์ ซึ่งจะถูก เปลี่ยนเป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นผลิตภัณฑ์ แต่ถ้าเข้าสู่วัฏจักร TCA จะได้เพียงคาร์บอนไดออกไซด์ เท่านั้นตามรูปที่ 12



รูปที่ 12 ไซโลสเมตาบอลิซึมของ *P. tannophilus*

*Pachysolen tannophilus*

จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล จากน้ำตาลดีไซโลส คือ *Pachysolen tannophilus* ซึ่งเป็นเชื้อรา ที่มีการจัดจำแนกอนุกรมวิธานของไว้ดังนี้ (Lodder, 1974)

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Ascomycetes

Order Endomycetales

Family Saccharomycetaceae

Genus *Pachysolen*

Species *Pachysolen tannophilus*

*P. tannophilus* เป็นยีสต์ที่นิยมนำมาใช้ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลส เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลได้ถึง 60-70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบค่าทางทฤษฎี (Schneider et al., 1983)

Slininger และคณะ (1982) ทำการเลี้ยง *P. tannophilus* ในถังหมักเพื่อศึกษาถึงความสามารถในการผลิตเอทานอล เพื่อนำไปประยุกต์ ในระดับอุตสาหกรรม พบว่า *P. tannophilus* เจริญและผลิตเอทานอลได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในภาวะที่ต้องการออกซิเจน *P. tannophilus* จะใช้ออกซิเจนเพื่อใช้ในการเติบโตแต่ไม่ใช้ในการผลิตเอทานอล โดย *P. tannophilus* จะสามารถผลิตเอทานอลได้ เมื่อมีค่าเริ่มต้นปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นไม่เกิน 50 กรัมต่อลิตร และ *P. tannophilus* จะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลมีมากกว่า 20 กรัมต่อลิตรขึ้นไป สำหรับ Deverell (1983) ศึกษา *P. tannophilus* เพื่อผลิตเอทานอลจากการย่อยสลายไม้ (wood hydrolysates) โดยพบว่า *P. tannophilus* สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อผลิตเอทานอลได้ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีอากาศ โดยปริมาณเอทานอลและอัตราการผลิตจะขึ้นอยู่กับปริมาณอากาศ แต่ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากภาวะจริงของการทดลองสูงสุดเพียง 0.4 กรัมเอทานอลต่อกรัมไซโลสเท่านั้น ซึ่งขัดแย้งกับปริมาณเอทานอลจากทางทฤษฎีที่ควรเป็น คือ 0.51 กรัมเอทานอลต่อกรัมไซโลส ซึ่งอาจเป็นเพราะ มีการสร้างผลิตภัณฑ์อื่นๆ อาทิ ไซลิทอล หรือกรดอะซิติกขึ้นมาด้วย

### บทที่ 3

#### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

##### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์	บริษัท / ประเทศ
1. กล้องจุลทรรศน์รุ่น BX-51	Olympus/ Japan
2. กล้องจุลทรรศน์รุ่น CH 30 RF200	Olympus/ Japan
3. เครื่อง Gas Chromatography รุ่น Model 7AG, Shimadzu	Varian/ USA
4. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography รุ่น Prostar	Varian/ USA
5. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น SPL15	Labcon/The Republic of South Africa
6. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BL610	Sartorius/ Germany
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205	Denver Instrument Company/USA
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Rotofix32	Hettich/ Germany
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) รุ่น PP-50	Sartorius/ Germany
10. ชุดกรอง Ultrafiltration รุ่น Viva science 250	Sartorius/ Germany
11. ชุด Membrane Ultrafiltration	Sartorius/ Germany
12. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar Flow รุ่น BV 123	ISSOC/ Thailand
13. ตู้อบ (Hot air oven)	Binder / USA
14. ถุงไดอะไลซิส รุ่น Cello Sep (MWCO 12000-14000)	Membrane Filtration Products, Inc., /USA
15. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	Ta Chang Medical Instrument Factory/ Taiwan
16. อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer)	Brand/ Germany

### 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	บริษัท / ประเทศ
1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck/ Germany
2. กรดอะซิติก (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck/ Germany
3. กลูโคส Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Sigma/ USA
4. คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO <sub>4</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy
5. ซูโครส Sucrose (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Merck/ Germany
7. โซเดียมคาร์บอเนต (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy
8. โซเดียมซัลเฟต (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy
9. โซเดียมไนเตรต (NaNO <sub>3</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy
10. โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต NaK Tartrate (Rochelle salt) (KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	Carlo Erba Reagent/ Italy
11. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO <sub>3</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy
12. โซเดียมอาซีเนทไดเบสิกเฮปตะไฮเดรต (Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	Carlo Erba Reagent/ Italy
13. ไซแลน (birch wood xylan)	Fluka/ Switzerland
14. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy
15. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy
16. ผงมอลท์สกัด (Malt extract)	Difco/ USA
17. ผงยีสต์สกัด (Yeast extract)	Difco/ USA
18. เมทานอล (CH <sub>3</sub> OH)	Carlo Erba Reagent/ Italy
19. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	Carlo Erba Reagent/ Italy
20. ฝุ่นผงตรานางเงือก	พัฒนสินเอนเตอร์ไพรส์/ ประเทศไทย
21. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์	องค์การสุรา กรมสรรพสามิต / ประเทศไทย
22. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck/ Germany
23. แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy และ Schrlau / Spain
24. แอมโมเนียมโมลิบเดต (H <sub>24</sub> Mo <sub>7</sub> N <sub>6</sub> O <sub>24</sub> )	Mallinckrodt/
25. แอล-แอสพาราจิ้นโมโนไฮเดรต (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O)	Fluka/ Switzerland

### 3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

ยีสต์ *Pachysolen tannophilus* สายพันธุ์ NRRL-Y2460 ได้รับมาจาก Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, United States Department of Agriculture ประเทศสหรัฐอเมริกา การเตรียมหัวเชื้อ ทำโดยเลี้ยง *P. tannophilus* สายพันธุ์ NRRL-Y2460 ในอาหารสูตร Yeast Malt Broth (YMB) (Atlas, 1993) (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

สำหรับการเก็บ *P. tannophilus* สายพันธุ์ NRRL-Y2460 ไว้เป็น stock culture ทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร YMB เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเก็บเชื้อในหลอดฝาเกลียวปลอดเชื้อ เติมสารละลายกลีเซอรอลจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จากนั้นนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

### 3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.4.1 การคัดแยกและจำแนกชนิด *Aureobasidium pullulans*

##### 3.4.1.1 การคัดแยก *A. pullulans*

ทำการเก็บตัวอย่างใบไม้ จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย เพื่อนำมาคัดแยก *A. pullulans* ในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างใบไม้มาเจาะด้วยที่เจาะกระดาษ แล้วนำไปวางบนอาหารแข็งสูตร Malt Extract Agar (MEA) (Atlas, 1993) (ภาคผนวก ก) ที่ผสม Rose bengal 0.01 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และเติม Chloramphenicol 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน เมื่อได้โคโลนียีสต์ที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยงแล้ว นำมาเลี้ยงในอาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) (Atlas, 1993) (ภาคผนวก ก) และ Yeast Malt Agar (YMA) (Atlas, 1993) (ภาคผนวก ก) จนได้เชื้อบริสุทธิ์ต่อไป

##### 3.4.1.2 การจำแนกชนิด *A. pullulans*

ทำการจำแนกชนิด *A. pullulans* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยทำการเปรียบเทียบกับลักษณะ *A. pullulans* ที่สังเกตได้กับลักษณะที่ อธิบายโดย Hermanides-Nijhof (1977) โดยนำเชื้อที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร MEA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อศึกษา ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็ง และเตรียมสไลด์ของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YMB เพื่อสังเกตรูปร่างและลักษณะของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

#### 3.4.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลเนส

3.4.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลเนส โดยวิธี plate screening



ทำการเลี้ยง *A. pullulans* ที่คัดแยกได้ บนอาหารสูตร Yeast Malt Xylan Agar (YMXA) (ภาคผนวก ก) เพื่อตรวจการสร้างวงใส (clear zone) (Christov and Prior, 1993)

#### 3.4.2.2 การวัดไซแลเนสแอกติวิตีเชิงปริมาณ

ทำการเตรียมเซลล์เริ่มต้นของ *A. pullulans* โดยเชื้อ *A. pullulans* 1 โคโลนีลงในอาหารสูตร Basal Medium ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Leathers et al., 1984) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในฟลasks ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ทำการนับเซลล์โดยใช้ Haemocytometer (ภาคผนวก ง) จากนั้นเติมเซลล์เริ่มต้น ( $2.5 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตร Xylanase Production Medium (XPM) ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) น้ำตาลไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน (Leathers et al., 1984) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในฟลasks ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาแยกเซลล์ของ *A. pullulans* ออก โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปทำการวัดแอกติวิตีของ ไซแลเนสตามวิธีของ เนริสา คุณประทุม (2543) (ภาคผนวก ข) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของ *A. pullulans* ที่ผลิตไซแลเนสได้มากที่สุด โดยแอกติวิตีของไซแลเนส 1 ยูนิต คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารลดย่อยสลาย ไซแลน ให้เป็น ไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ

#### 3.4.2.3 การคัดเลือก *A. pullulans* ที่ผลิตไซแลเนสที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *A. pullulans* ที่ผลิตไซแลเนสที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง โดยทำการเตรียมไซแลเนสตามวิธีในข้อ 3.4.2.2 นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาทำการวัดแอกติวิตีที่ภาวะปกติ คำนวณแอกติวิตี สัมพัทธ์ โดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ ที่ทำการวัดหลังจากเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำและ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 3.4.2.4 การตรวจทดสอบการสร้าง EPS

ทำการเตรียมเซลล์เริ่มต้นของ *A. pullulans* โดยเติม *A. pullulans* 1 โคโลนีลงในอาหารสูตร YMB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ทำการนับเซลล์โดยใช้ Haemocytometer จากนั้นเติมเซลล์เริ่มต้น ( $2.5 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตร Production Medium (PM) (Ueda et al., 1963) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วน

น้ำใสมาตกตะกอน EPS ด้วยเอทานอล (95 เปอร์เซ็นต์) ในสัดส่วน 2:1 (เอทานอล : ส่วนน้ำใส) เขย่าพลาสติกเพื่อให้ EPS ตกตะกอน ใช้แท่งแก้วเขี่ยตะกอน EPS มาวางบนกระดาษกรอง Whatman No.1 นำ EPS ที่ได้ไปอบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทำการทดลอง 3 ซ้ำแล้วนำข้อมูลน้ำหนักแห้งของ EPS และน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 3.4.2.5 การเก็บรักษา *A. pullulans*

ทำการเก็บ *A. pullulans* ไว้เป็น stock culture โดยทำเช่นเดียวกับวิธีการเก็บ *P. tannophilus* สายพันธุ์ NRRL-Y2460

### 3.4.3 การศึกษาการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของ *A. pullulans*

คัดเลือก *A. pullulans* ที่มีความสามารถในการผลิตไซแลเนสได้มากที่สุดและ/หรือมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงมากที่สุดจากข้อ 3.4.2.3 มาทำการศึกษาอัตราการเติบโตและช่วงเวลาที่ผลิตไซแลเนสโดยเลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) น้ำตาลไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีในข้อ 3.4.2.2 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ทำการนับเซลล์โดยใช้ Haemocytometer และนำส่วนน้ำใสไปวัดแอกติวิตีของไซแลเนส ทำการทดลอง 2 ซ้ำแล้วนำค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์และแอกติวิตีของไซแลเนสที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและช่วงพิสัย พร้อมทั้งสร้างกราฟเทียบกับเวลา

### 3.4.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส

ทำการศึกษหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ไซแลเนส ของ *A. pullulans* ที่คัดเลือกไว้ โดยปรับองค์ประกอบในสูตรอาหาร XPM ทำการเลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารปริมาณ 100 มิลลิลิตรในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างในเวลาที่มีการผลิตไซแลเนสสูงที่สุดตามข้อมูลที่ได้ในข้อ 3.4.3 สำหรับภาวะของการเลี้ยงที่ทำการปรับในแต่ละขั้นตามลำดับมีดังนี้

3.4.4.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (จมูกข้าวสาลี ชั่งข้าวโพด และรำข้าว ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v))

3.4.4.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (เปปโตน ไซเดียมไนเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v))

3.4.4.3 อุณหภูมิ (30 35 และ 40 องศาเซลเซียส)

3.4.4.4 ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหาร (pH 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0)

โดยวัดการเติบโตและแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.4.3 และ 3.4.2.2 ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 3.4.5 การเตรียมเอนไซม์ไซแลเนสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ

#### 3.4.5.1 การเตรียมเอนไซม์ไซแลเนส

ทำการเลี้ยง *A. pullulans* ตามภาวะที่เหมาะสมที่ได้ในข้อ 3.4.4 แยกส่วนน้ำใสมาทำให้มีความเข้มข้นของไซแลเนสสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) จากนั้นตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate precipitation) ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ก่อนนำไปศึกษาลักษณะสมบัติต่อไป

##### 3.4.5.1.1 การทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน

ทำการเลี้ยง *A. pullulans* ตามภาวะที่ได้ในข้อ 3.4 โดยนำอาหารเหลวที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 วัดปริมาตร ส่วนน้ำใสที่ได้ แล้วนำมาทำให้มีความเข้มข้นของไซแลเนสสูงขึ้นด้วยเครื่องอัลตราฟิลเตรชัน Viva Flow 25 (Sartorius, Germany) โดยการใช้ membrane cut off ที่ 10,000 Da ภายใต้ความดันของก๊าซไนโตรเจน 3 บาร์ ทำการวัดแอกติวิตีของไซแลเนสทั้งส่วนน้ำใสที่กรองผ่าน เมมเบรนและส่วนที่กรองไม่ผ่านเมมเบรนตาม วิธีในข้อ 3.4.2.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

##### 3.4.5.1.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำส่วนน้ำใสที่มีแอกติวิตีของไซแลเนสมากที่สุดที่ได้จากข้อ 3.4.5.1.1 มาทำการวัดปริมาตรเริ่มต้นแล้วคำนวณปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ค่อยๆเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงไป พร้อมทั้งกวนเบาๆ เมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมดแล้วทำการกวนทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในกระบวนน้ำแข็ง หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกตะกอนโปรตีนออกจาก สารละลาย นำส่วนของเหลวมาทำการวัดปริมาตร เพื่อตกตะกอนโปรตีนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่สูงขึ้นโดยการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้น 40 60 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นำส่วนตะกอนที่ได้จากแต่ละช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมาละลายใน 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำมาใส่ในถุงไดอะไลซิส (Cello Sep, MWCO 12,000-14,000, Membrane Filtration Products, Inc., USA) ทำการไดอะไลซิสใน 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าเกลือในถุงไดอะไลซิสแพร่ออกมาจนหมด จากนั้นนำเอนไซม์แต่ละส่วนที่ได้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry et al., 1951) โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน และทำการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.4.2.2

#### 3.4.5.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของไซแลเนส

3.4.5.2.1 การศึกษาผลของความเป็นกรดต่าง ที่มีต่อการทำงานของไซแลเนส ทำการวัดแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.4.2.2 แต่ปรับความเป็นกรดต่างของ reaction mixture ให้เป็น pH 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ได้แก่ 50 mM Sodium acetate buffer (pH 4.0 และ pH 5.0) 50 mM Sodium citrate buffer (pH 5.0 และ pH 6.0) และ 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 6.0 7.0 และ 8.0) จำนวนแอกติวิตีสัมพัทธ์ โดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่บ่มใน 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) เป็นเวลา 10 นาที

3.4.5.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของไซแลเนส ทำการวัดแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.4.2.2 โดยบ่ม reaction mixture ที่อุณหภูมิ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส จำนวนแอกติวิตีสัมพัทธ์ โดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่บ่ม reaction mixture ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.4.5.2.3 การศึกษาผลของ pH ที่มีต่อความเสถียรของไซแลเนส นำไซแลเนสไปบ่มในบัฟเฟอร์ที่ pH 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาวัดค่าแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.4.2.2 ในภาวะปกติ จำนวนแอกติวิตี สัมพัทธ์โดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ทำการวัดหลังจากที่บ่มเอนไซม์ใน 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4.5.2.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของไซแลเนส นำไซแลเนส ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 28(อุณหภูมิห้อง) 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาวัดค่าแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.4.2.2 ในภาวะปกติ จำนวนแอกติวิตีสัมพัทธ์โดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ทำการวัดหลังจากที่บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ทำการทดลอง 3 ซ้ำและนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 3.4.6 การย่อยเฮมิเซลลูโลสและการผลิตเอทานอลด้วยการย่อยสลายและการหมักแบบแยกส่วน (separate hydrolysis and fermentation, SHF) กระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (simultaneous sacchification and fermentation, SSF)

#### 3.4.6.1 การย่อยเฮมิเซลลูโลส และการวัดความสามารถในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสในวัชพืช

##### 3.4.6.1.1 การย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยกรด

อบวัชพืชให้แห้งและบดให้เป็นผง ก่อนนำไปร่อนด้วยตะแกรงแล้วนำมาปรับสภาพตามวิธีของ Cheng et al. (2007) โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ผสมกับวัชพืชในสัดส่วน 1:10 (วัชพืช (กรัม): กรดซัลฟูริกเข้มข้น (มิลลิลิตร)) จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บของเหลวที่ได้จากการย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยกรดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลไซโลส กลูโคส และอะราบิโนส ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Lichorocart-NH<sub>2</sub> ขนาด 250×4.0 มิลลิเมตร ใช้ 90 เปอร์เซ็นต์ acetonitrile ในน้ำ เป็น mobile phase และใช้ Refractive Index Detector คำนวณปริมาณน้ำตาลโดยนำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลแต่ละชนิด (ภาคผนวก จ)

##### 3.4.6.1.2 การย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

นำผงวัชพืช ที่อบแห้ง แล้ว 3 กรัม ของน้ำหนักแห้ง ใส่ลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร เติม 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมเอนไซม์ไซแลเนส 66.47 มิลลิลิยูนิต นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วเก็บของเหลวที่ได้จากการย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วย เอนไซม์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลไซโลส กลูโคส และ อะราบิโนส ด้วยเครื่อง HPLC

#### 3.4.6.2 การผลิตเอทานอลด้วยการย่อยสลายและการหมัก แบบแยกส่วน (separate hydrolysis and fermentation, SHF) และ กระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (simultaneous sacchification and fermentation, SSF)

เตรียมเซลล์เริ่มต้น *P. tannophilus* สายพันธุ์ NRRL-Y2460 โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับ *P. tannaophilus* (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในพลาสติกขนาด 250

มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง (Cheng et al., 2007) จากนั้นทำการนับเซลล์ *P. tannophilus* โดยใช้ Haemocytometer

#### 3.4.6.2.1 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

นำฟลาสก์วัชพีชที่ผ่านการย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยกรด มาปรับให้เป็นกลางด้วย 1 N NaOH จากนั้นเติมเซลล์เริ่มต้น ( $2.5 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและอาหาร สูตร Fermentation Medium (Cheng et al., 2007) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

#### 3.4.6.2.2 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

นำฟลาสก์วัชพีชที่เติม 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านน้ำฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมเอนไซม์ไซแลเนส 66.47 มิลลิลิตร และเติมเซลล์เริ่มต้น ( $2.5 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของ *P. tannophilus* ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และอาหารอาหารสูตร Fermentation Medium (Cheng et al., 2007) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบปริมาณของแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นในวันที่ 3 5 และ 7 ของการหมักโดยเทคนิค Gas Chromatography (สุภาภรณ์ โสภณพัฒนะโกศา , 2546) โดยใช้คอลัมน์ Porapak Q column แบบ ionization detector แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาคำนวณ ปริมาณเอทานอลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำและนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

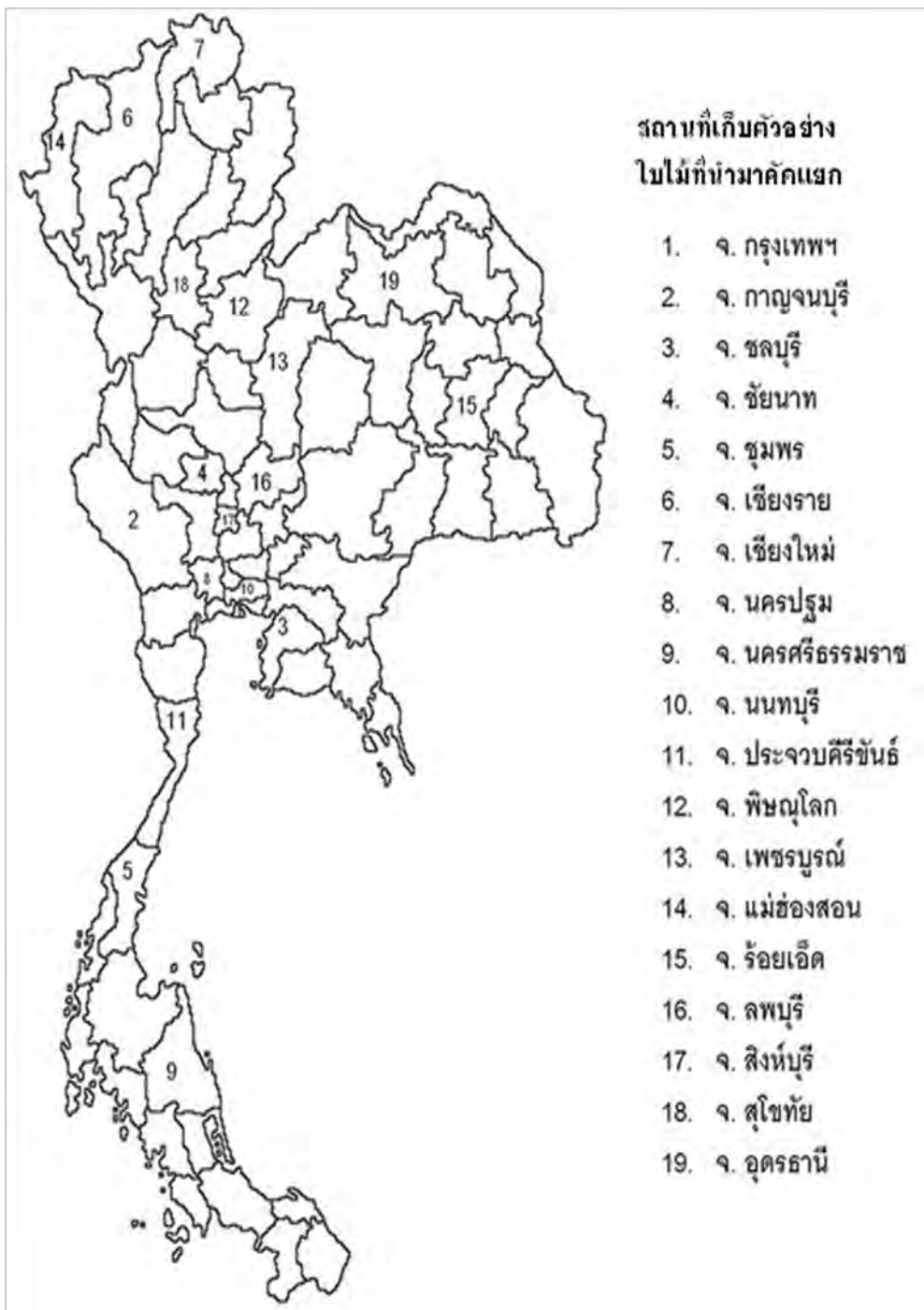
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การคัดแยกและจำแนกชนิด *Aureobasidium pullulans*

##### 4.1.1 การคัดแยก *A. pullulans*

จากการสำรวจ เก็บตัวอย่าง และคัดแยก *A. pullulans* จากใบไม้ชนิดต่างๆ จำนวน 239 ตัวอย่างใบไม้ (ช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2550 – พฤษภาคม พ.ศ. 2551) ในพื้นที่ 19 จังหวัด คือ กรุงเทพฯ กาญจนบุรี ชลบุรี ชัยนาท ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ นครปฐม นครศรีธรรมราช นนทบุรี ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ แม่ฮ่องสอน ร้อยเอ็ด ลพบุรี สิงห์บุรี สุโขทัย และอุดรธานี (รูปที่ 13) พบว่าสามารถคัดแยกกรามีลักษณะคล้าย *A. pullulans* ได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต จากใบไม้ของพืช 16 ชนิด ดังนี้ หูกวาง ปลาหมึกยักษ์ โมก เล็บครุฑ มะขาม แก้ว ชงโค เข็ม แคน มะละกอ อินทนิล ชงโค พิกุล กระถินณรงค์ ไทร และกันเกรา ซึ่งใบไม้เหล่านี้เก็บจากพื้นที่ 4 จังหวัด ดังนี้ กรุงเทพฯ ชลบุรี นครปฐม และร้อยเอ็ด (ตารางที่ 2)



รูปที่ 13 สถานที่เก็บตัวอย่างใบไม้ที่นำมาคัดแยก *A. pullulans*



ตารางที่ 2 ไอโซเลตของ *A. pullulans* ที่คัดแยกได้ ชนิดของตัวอย่างพืชที่พบ สถานที่และวันที่เก็บตัวอย่าง

Isolates	ชนิดของใบไม้	ชื่อวิทยาศาสตร์	จากสถานที่	วันที่เก็บตัวอย่าง
No.1	หูกวาง	<i>Terminalia catappa</i> Linn.	เขตปทุมวัน จ.กรุงเทพฯ	20 พ.ย. 50
No.2	ปลาหมึกยักษ์	<i>Scheffler actinophylla</i>	เขตปทุมวัน จ.กรุงเทพฯ	20 พ.ย. 50
No.15	โมก	<i>Wrightia religiosa</i> Benth.	เขตปทุมวัน จ.กรุงเทพฯ	10 ก.พ. 51
No.16	เล็บครุฑ	<i>Polyscias fruticosa</i> (L.) Harms	เขตปทุมวัน จ.กรุงเทพฯ	10 ก.พ. 51
No.27	มะขาม	<i>Tamarindus indica</i> Linn.	เขตลุมพินี จ.กรุงเทพฯ	22 เม.ย. 51
No.55	แก้ว	<i>Murraya paniculata</i> .	อำเภอเกาะสีชัง จ.ชลบุรี	18 เม.ย. 51
No.59	ชงโค	<i>Bauhinia purpurea</i> Linn.	อำเภอเกาะสีชัง จ.ชลบุรี	18 เม.ย. 51
No.63	เข็ม	<i>Ixora chinensis</i> Lamk.	อำเภอเกาะสีชัง จ.ชลบุรี	18 เม.ย. 51
No.66	แค	<i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Steud.	อำเภอสสามพราน จ.นครปฐม	21 เม.ย. 51
No.83	มะละกอ	<i>Carica papaya</i> Linn.	อำเภอธวัชบุรี จ.ร้อยเอ็ด	21 เม.ย. 51
No.92	อินทนิล	<i>Lagerstroemia speciosa</i> (L.) Pers.	อำเภอธวัชบุรี จ.ร้อยเอ็ด	21 เม.ย. 51
No.98	ชงโค	<i>Bauhinia purpurea</i> Linn.	อำเภอธวัชบุรี จ.ร้อยเอ็ด	21 เม.ย. 51
No.102	พิกุล	<i>Mimusops elengi</i> Linn.	อำเภอธวัชบุรี จ.ร้อยเอ็ด	21 เม.ย. 51
No.107	กระถินณรงค์	<i>Acacia auriculaeformis</i> , Cunn.	อำเภอธวัชบุรี จ.ร้อยเอ็ด	23 เม.ย. 51
No.109B	ไทร	<i>Ficus altissima</i> Blume.	อำเภอธวัชบุรี จ.ร้อยเอ็ด	23 เม.ย. 51
No.109P	ไทร	<i>Ficus altissima</i> Blume.	อำเภอธวัชบุรี จ.ร้อยเอ็ด	23 เม.ย. 51
No.114	กันเกรา	<i>Millingtonia hortensis</i> Linn.	อำเภอธวัชบุรี จ.ร้อยเอ็ด	23 เม.ย. 51
No.149	หูกวาง	<i>Terminalia catappa</i> Linn.	อำเภอศรีราชา จ.ชลบุรี	4 พ.ค. 51
No.150 O	กระถินณรงค์	<i>Acacia auriculaeformis</i> , Cunn.	อำเภอศรีราชา จ.ชลบุรี	4 พ.ค. 51
No.150 W	กระถินณรงค์	<i>Acacia auriculaeformis</i> , Cunn.	อำเภอศรีราชา จ.ชลบุรี	4 พ.ค. 51

#### 4.1.2 การจำแนกชนิด *A. pullulans*

นำเชื้อ *A. pullulans* ที่ทำการคัดแยกจนได้โคโลนีเดี่ยวแล้วจำนวน 20 ไอโซเลตมาเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA MEA YMA และ YMX ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหารแข็ง (ตารางที่ 2) และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการเตรียมสไลด์ของ *A. pullulans* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YMB ที่บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* แต่ละไอโซเลตมีความคล้ายคลึงกันหลายประการ คือ เซลล์มีการเจริญโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์แบบแตกหน่อ โดยลักษณะของเซลล์ที่เกิดขึ้นมีทั้งแบบบลาสโตสปอร์ เซลล์พอง โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย คลาไมโดสปอร์ เส้นใยสร้างเม็ดสี และแบบเส้นใย นอกจากนี้พบว่ามี *A. pullulans* จำนวน 5 ไอโซเลตสามารถสร้างเม็ดสีชนิดอื่นที่ไม่ใช่สีดำ (color variants) (ตารางที่ 3) ทั้งนี้พบว่า *A. pullulans* 7 ไอโซเลต สามารถวงสี (color ring) ได้ เมื่อ *A. pullulans* เติบโตในภาวะที่ได้รับแสงสลับกับภาวะที่ไม่ได้รับแสง ซึ่งลักษณะที่ได้จะเห็นเป็นวงสีเข้มสลับกับวงสีที่อ่อน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* ทั้ง 20 ไอโซเลต ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YMA และที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YMB มีดังนี้

ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. pullulans* ไอโซเลต No.1 (รูปที่ 14) โคโลนีสีชมพูอ่อนและจะเปลี่ยนเป็นสีดำ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ปรากฏเส้นใยเป็นเส้นสั้นๆ รอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบบลาสโตสปอร์ เซลล์พอง การแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ และโคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย

ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. pullulans* ไอโซเลต No.2 (รูปที่ 15) โคโลนีสีครีมและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เหลืองเข้ม แล้วเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มจนเกือบดำ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ปรากฏเส้นใยสั้นๆ รอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบบลาสโตสปอร์ เส้นใยเทียม เซลล์พอง คลาไมโดสปอร์ และโคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย

ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. pullulans* ไอโซเลต No.15 (รูปที่ 16) โคโลนีเป็นสีครีมและเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มและน้ำตาลอ่อนจนเกือบดำ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันขึ้นไป ปรากฏเส้นใยสั้นๆ รอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบบลาสโตสปอร์ เซลล์พอง คลาไมโดสปอร์ โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย การแตกหน่อ และเส้นใย

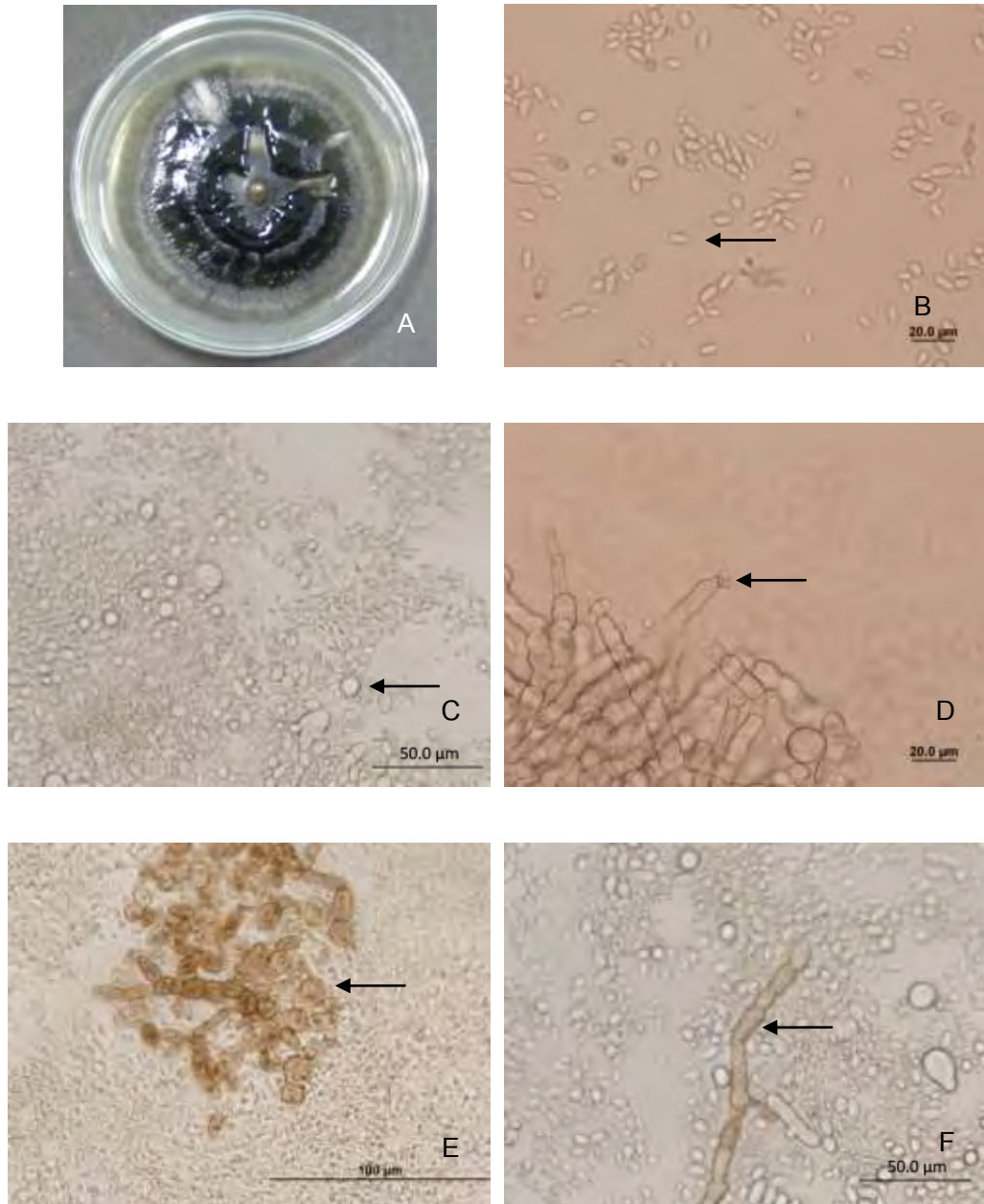
ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. pullulans* ไอโซเลต No.16 (รูปที่ 17) โคโลนีเป็นสีครีมและที่ปลายเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มและน้ำตาลอ่อนจนเกือบดำ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันขึ้นไป ปรากฏเส้นใยสั้นๆ รอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบบลาสโตสปอร์ เซลล์พอง คลาไมโดสปอร์ โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย การแตกหน่อ และเส้นใย



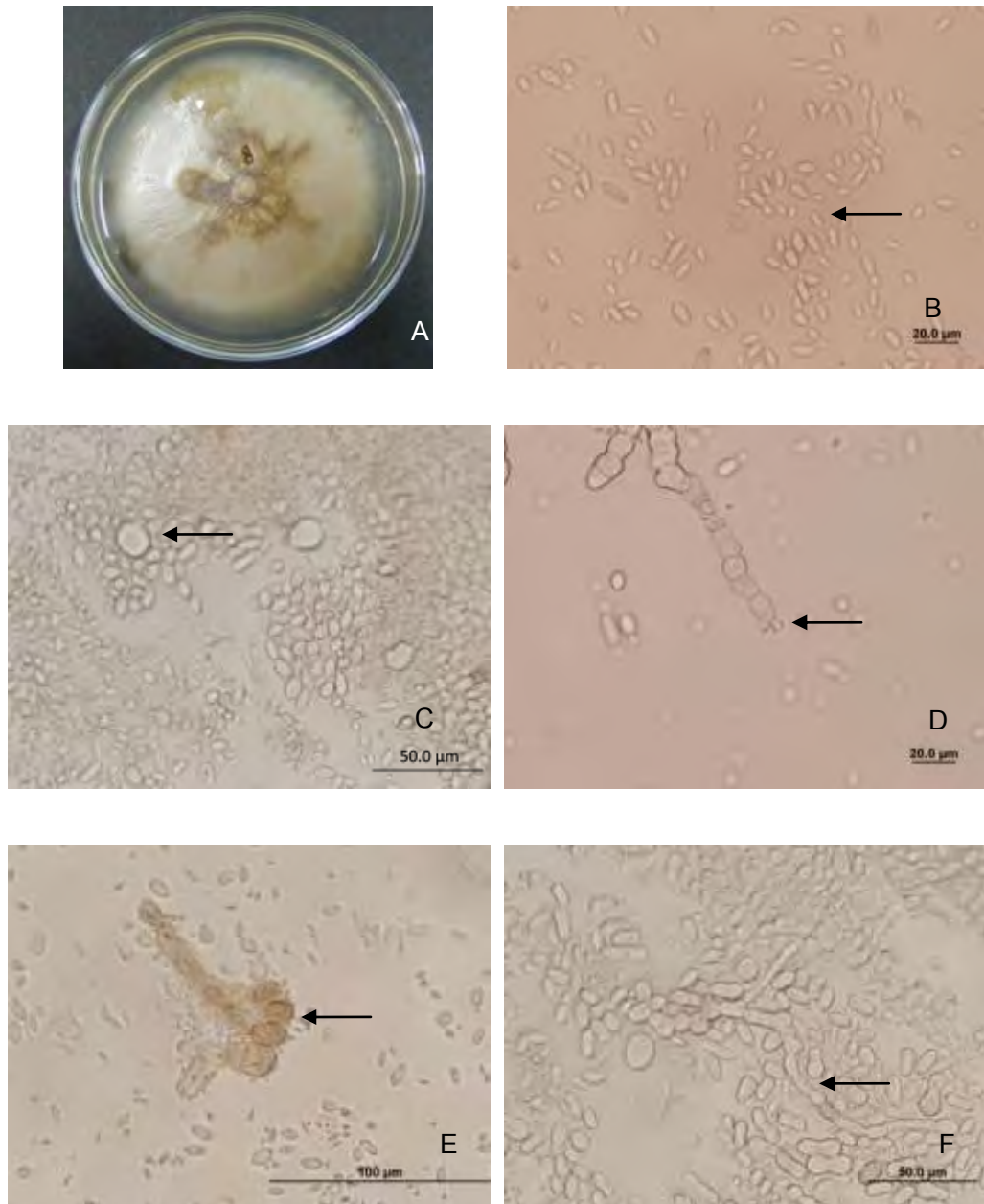


ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. pullulans* ไอโซเลต No.150O (รูปที่ 32) โคโลนีเป็นสีส้มอ่อน และตรงกลางของโคโลนีจะเปลี่ยนสีส้มจนเกือบดำ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันขึ้นไป ปรากฏเส้นใยสั้นๆ รอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบบลาสโตสปอร์ เซลล์พอง คลาไมโดสปอร์ โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย การแตกหน่อ และเส้นใย

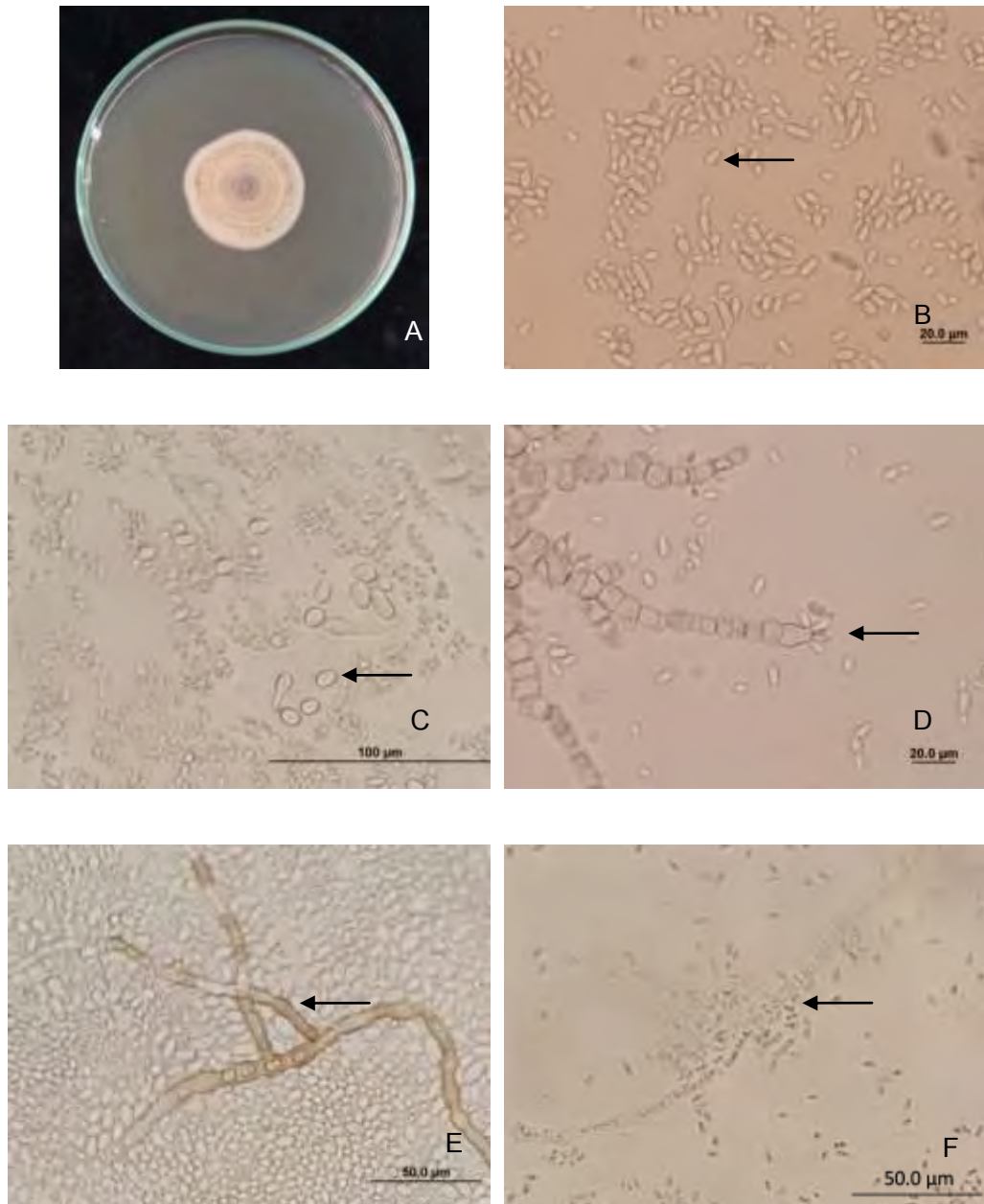
ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. pullulans* ไอโซเลต No.150W (รูปที่ 33) โคโลนีเป็นสีครีม เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน จะเป็นสีส้มและตรงกลางของโคโลนีจะเปลี่ยนสีส้มและดำ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันขึ้นไป ปรากฏเส้นใยสั้นๆรอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบบลาสโตสปอร์ เซลล์พอง คลาไมโดสปอร์ โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย การแตกหน่อ และเส้นใย



รูปที่ 14 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.1 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใยที่สร้างเม็ดสี

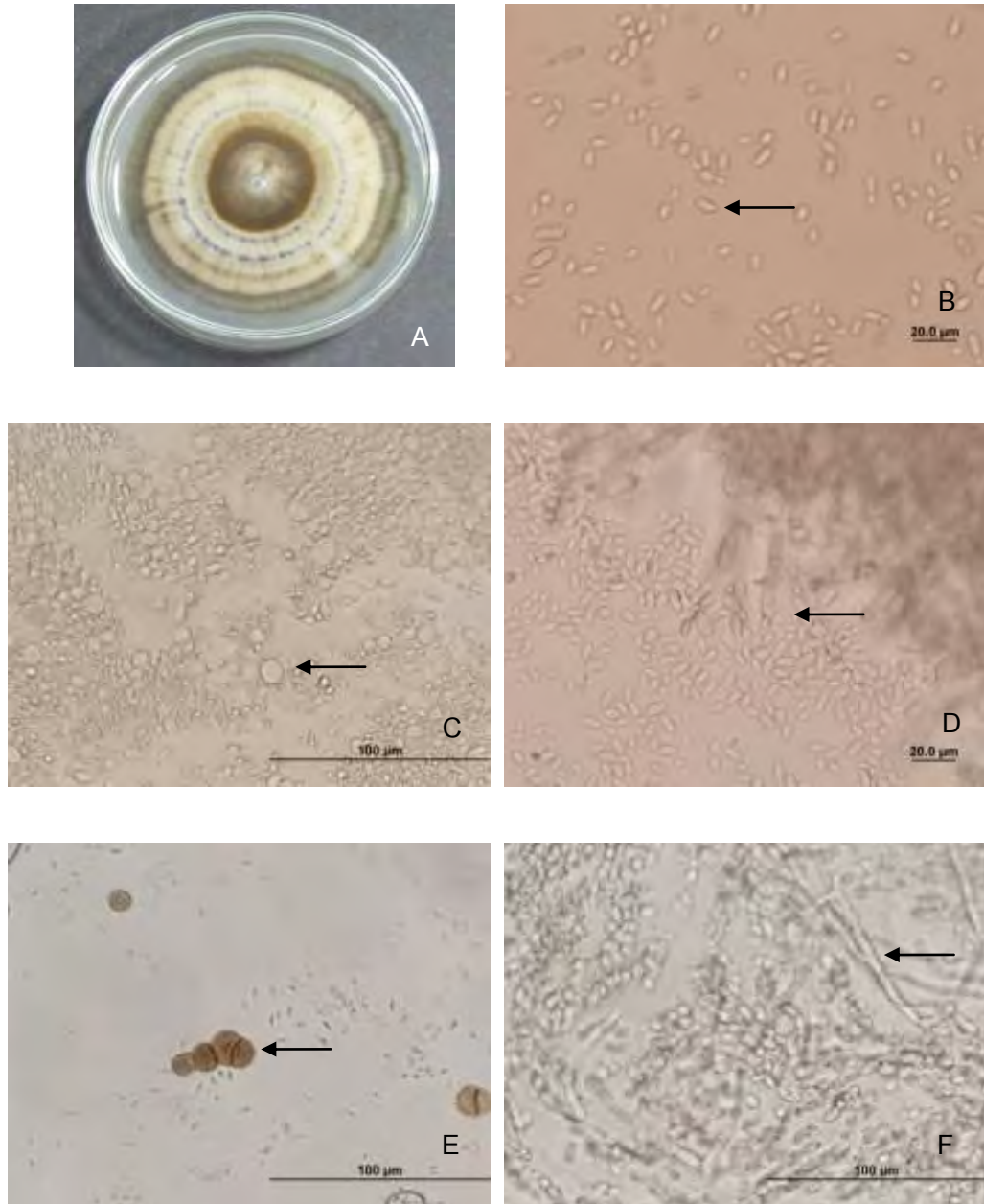


รูปที่ 15 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.2 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใย

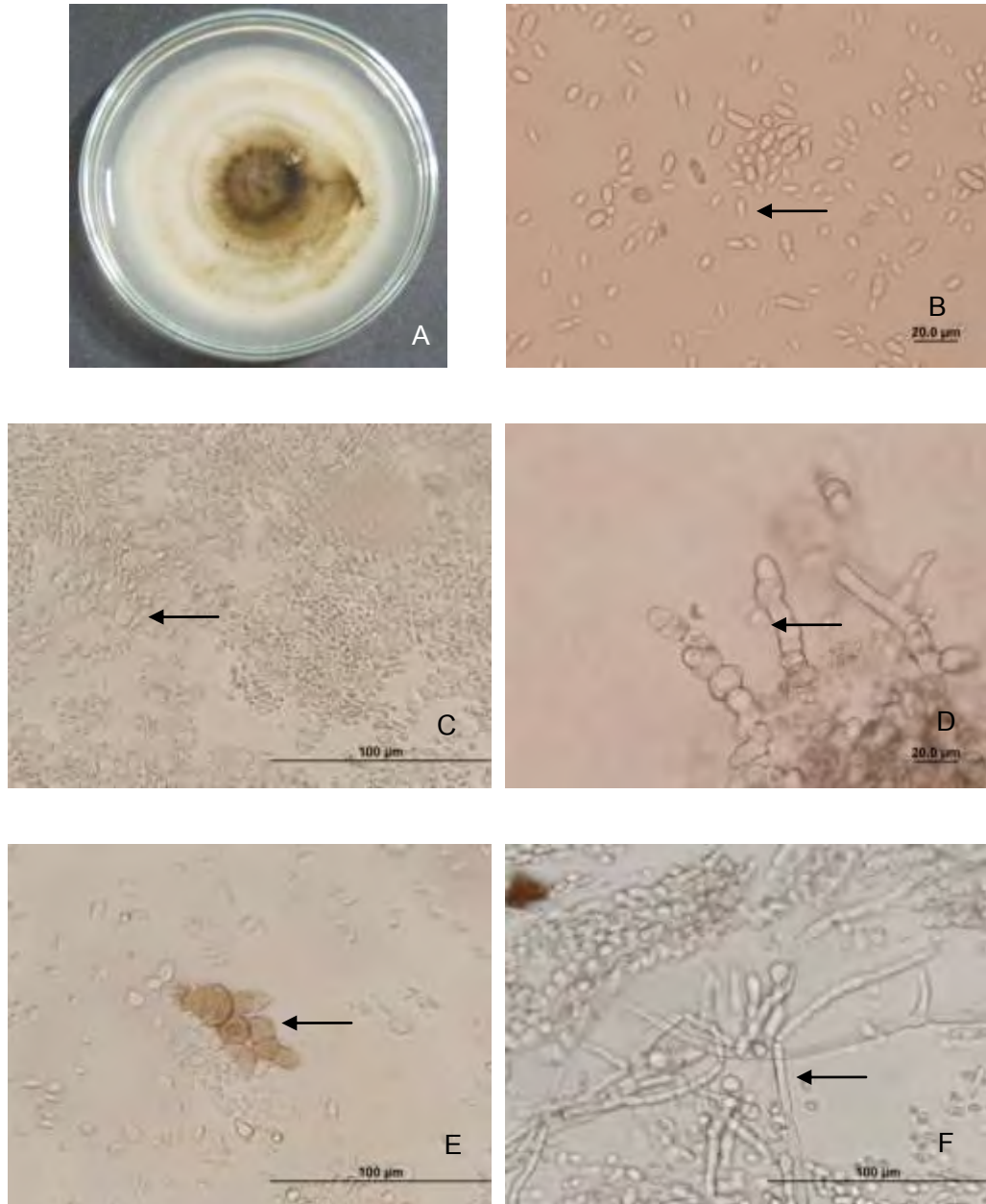


รูปที่ 16 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.15 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) ลักษณะเส้นใยที่สร้างเม็ดสี และ (F) ลักษณะเส้นใย

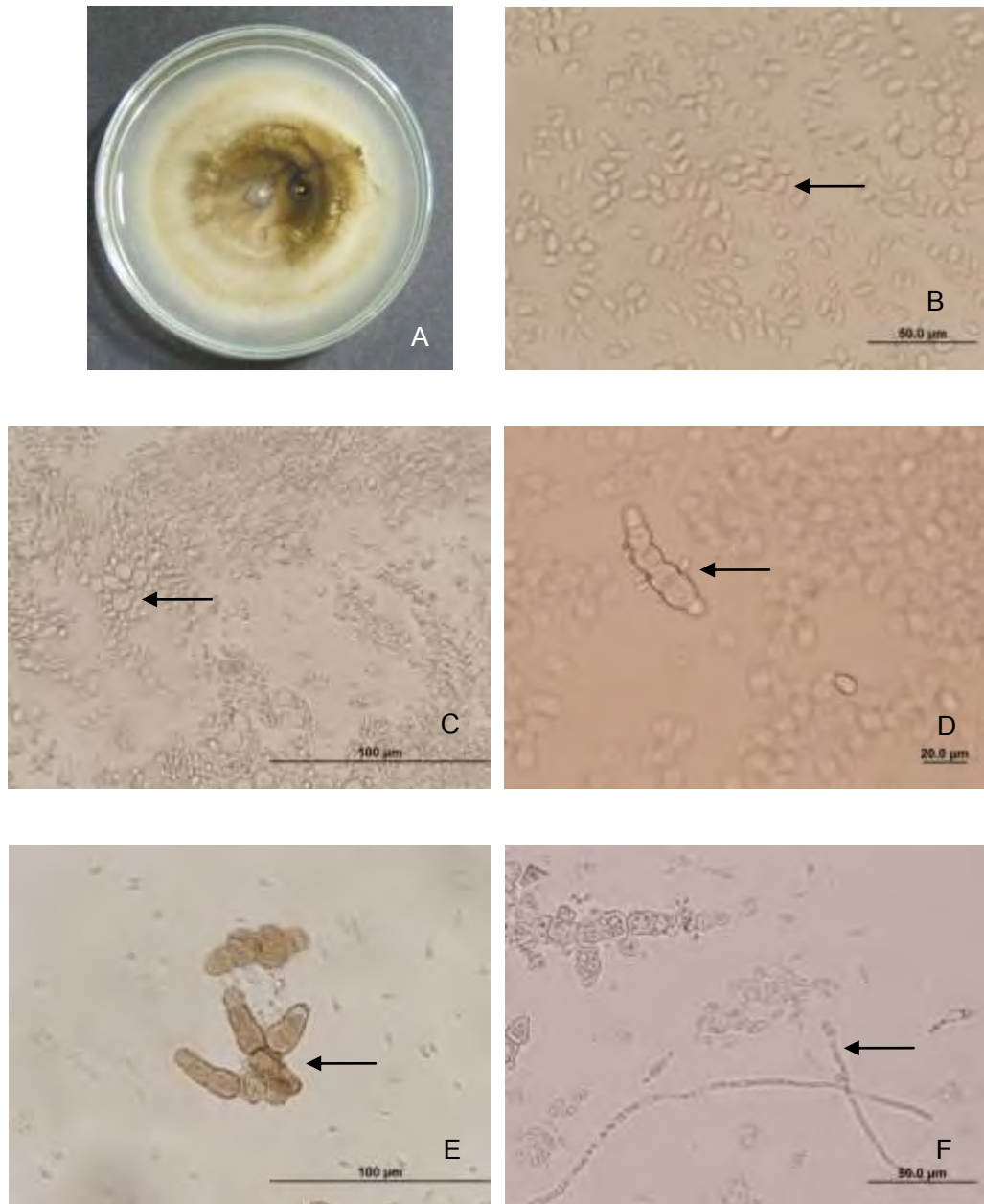




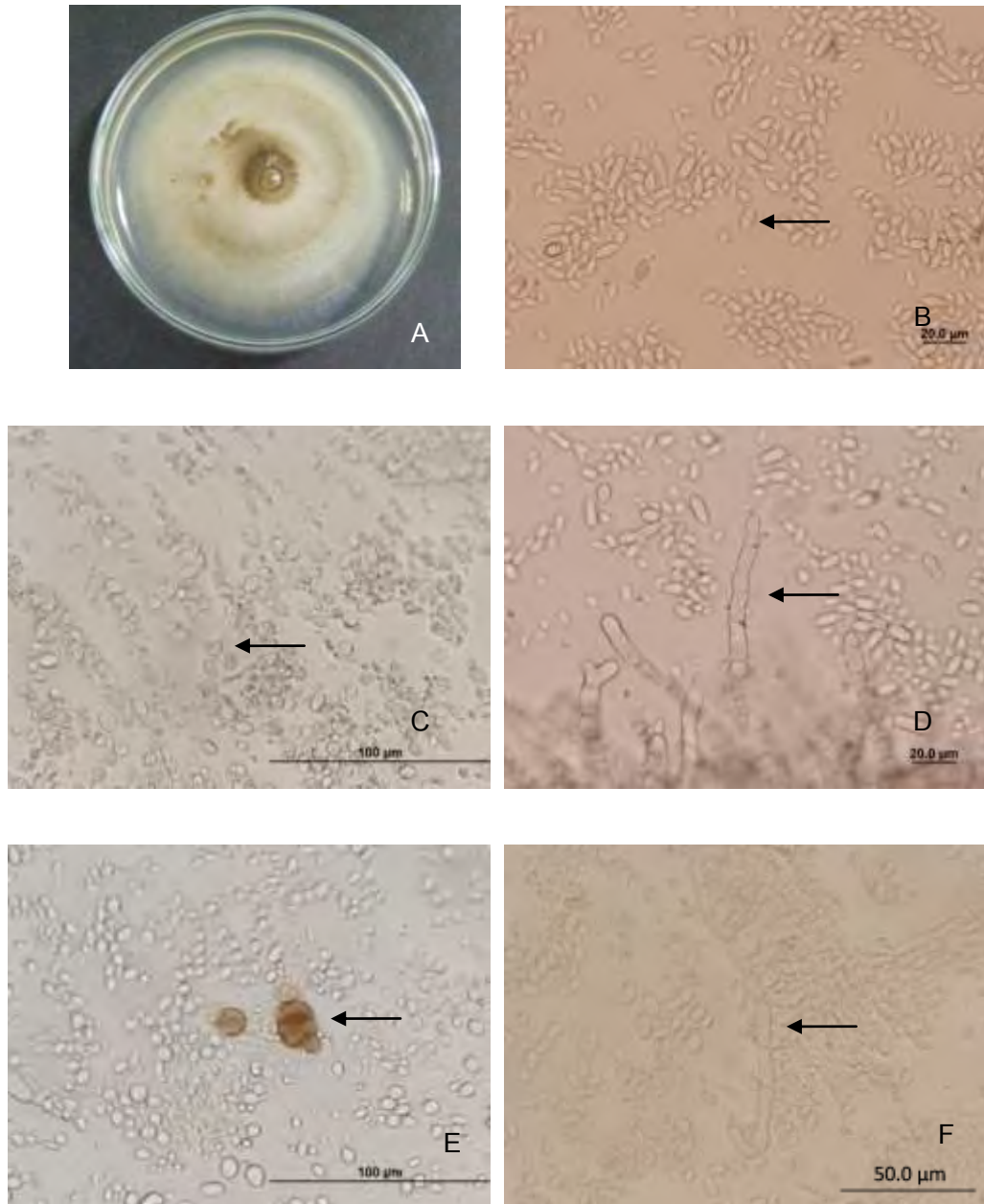
รูปที่ 17 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No. 16 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใย



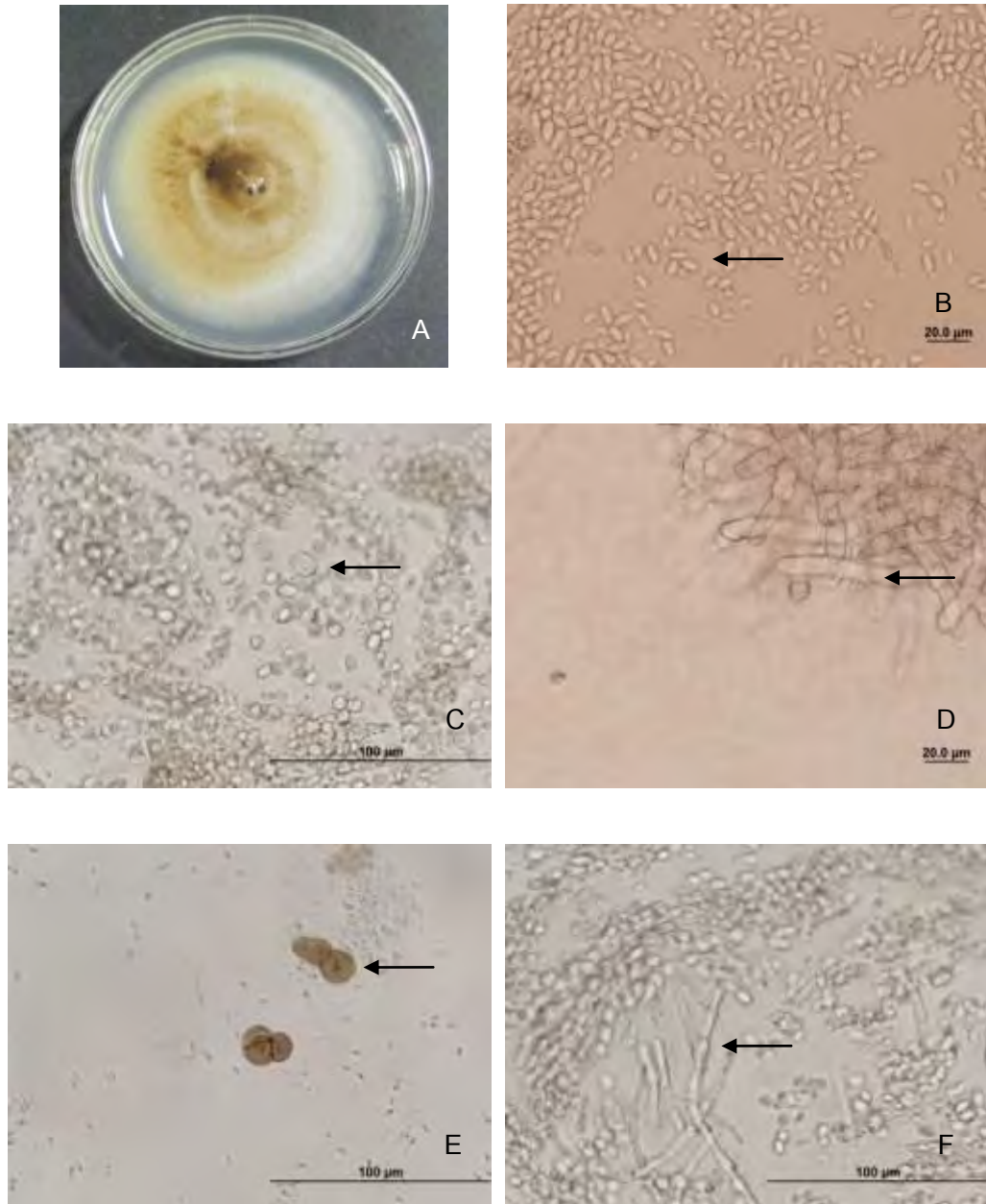
รูปที่ 18 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.27 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนิเดียมติดอยู่ที่ด้านข้างของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใย



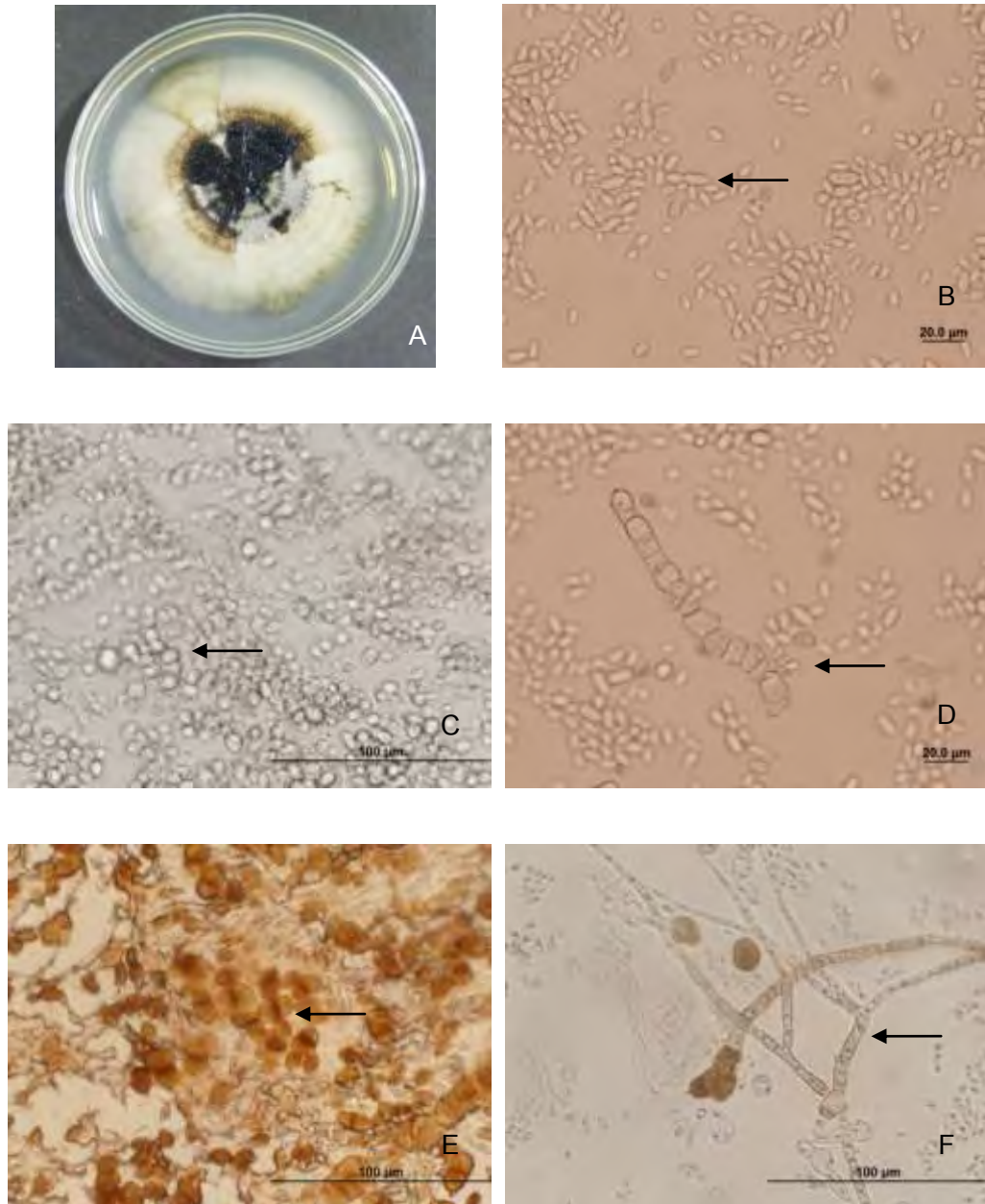
รูปที่ 19 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No. 55 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนิเดียมติดอยู่ที่ ด้านข้าง ของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใย



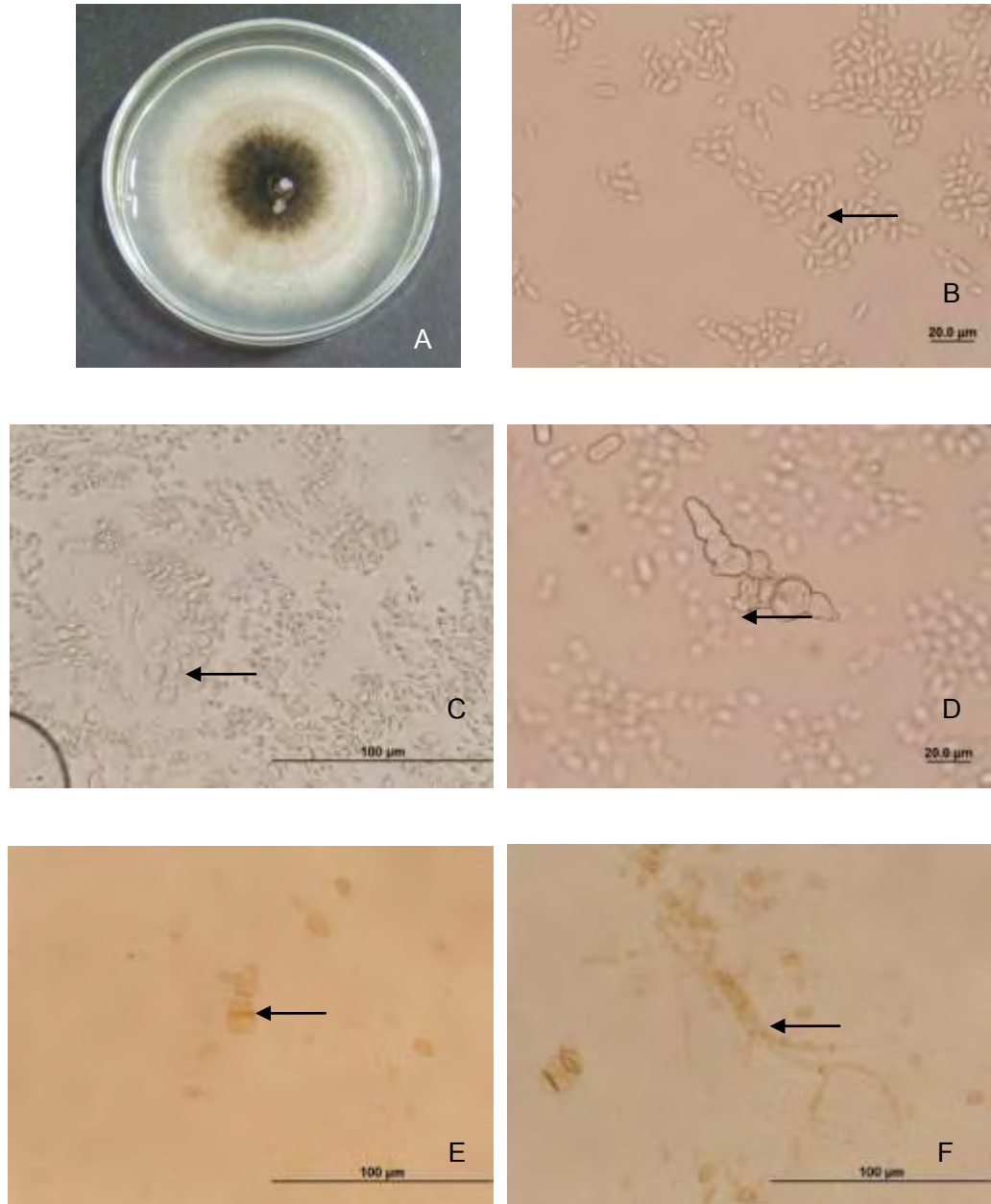
รูปที่ 20 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.59 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนิเดียมติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใย



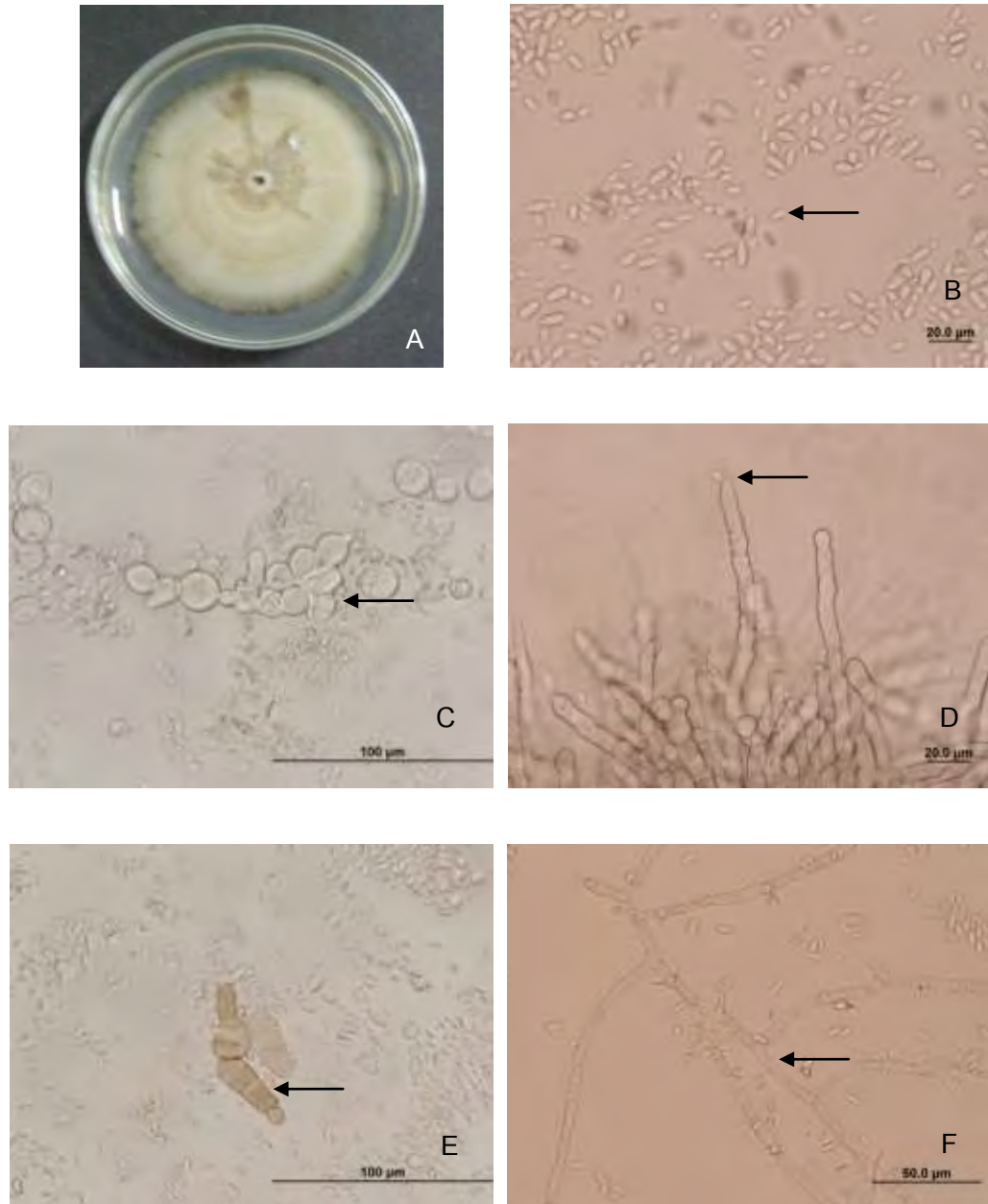
รูปที่ 21 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.63 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนินเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใย



รูปที่ 22 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.66 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใยที่สร้างเม็ดสี

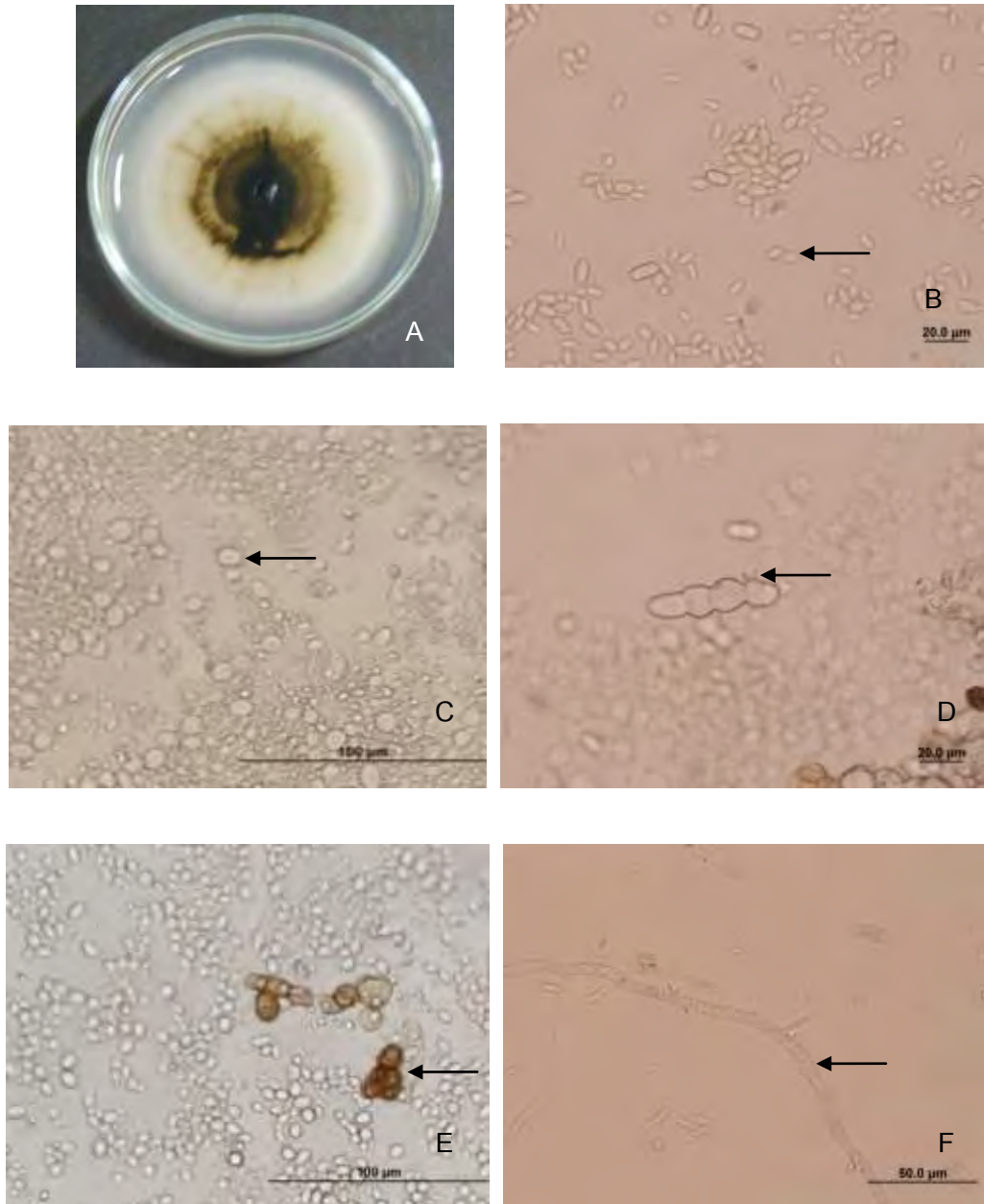


รูปที่ 23 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.83 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์ฟอง (D) โคนิเดียติดอยู่ที่ ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใยที่สร้างเม็ดสี

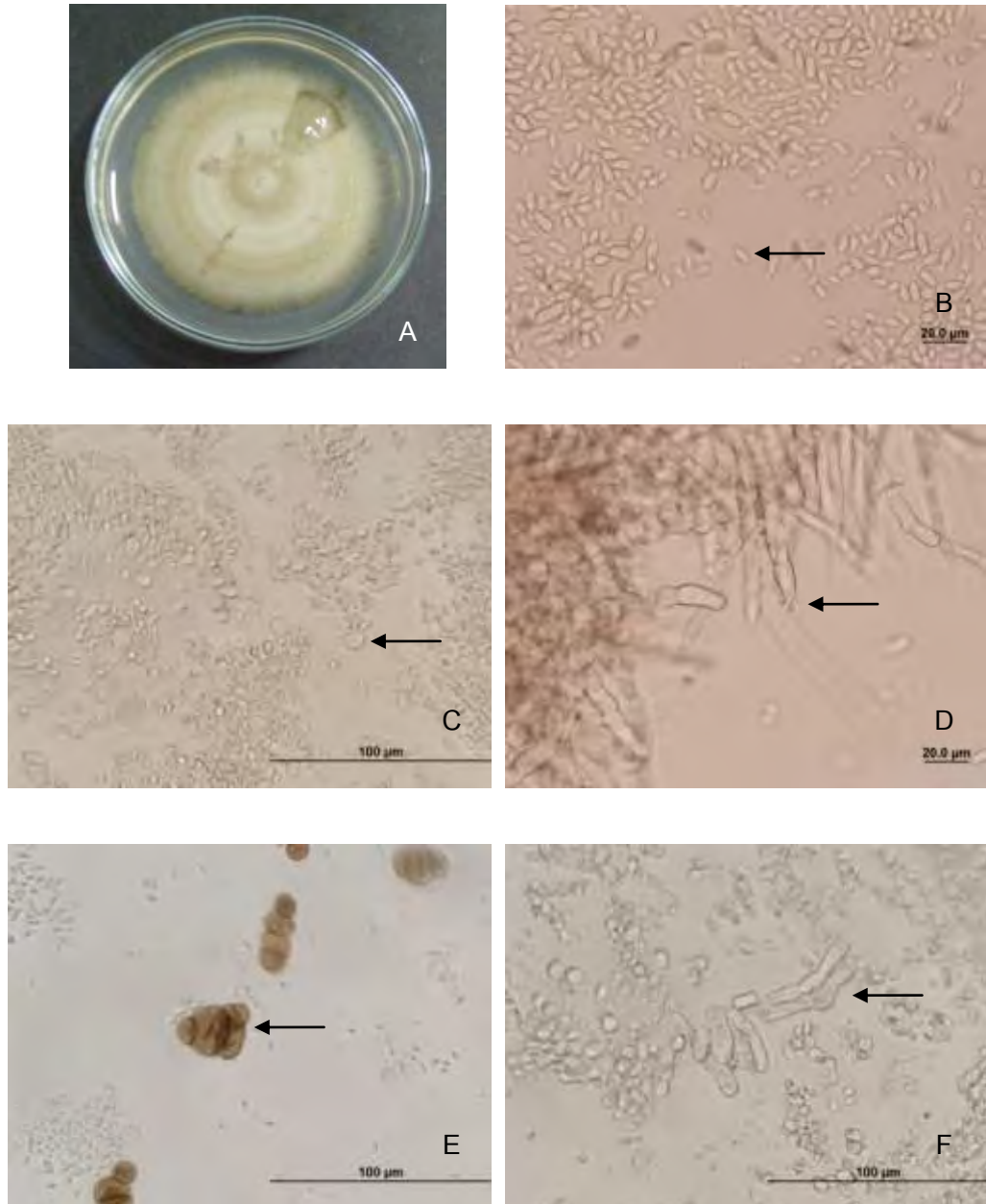


รูปที่ 24 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.92 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใยที่สร้างโคนิเดียติดอยู่ด้านข้างของเส้นใย

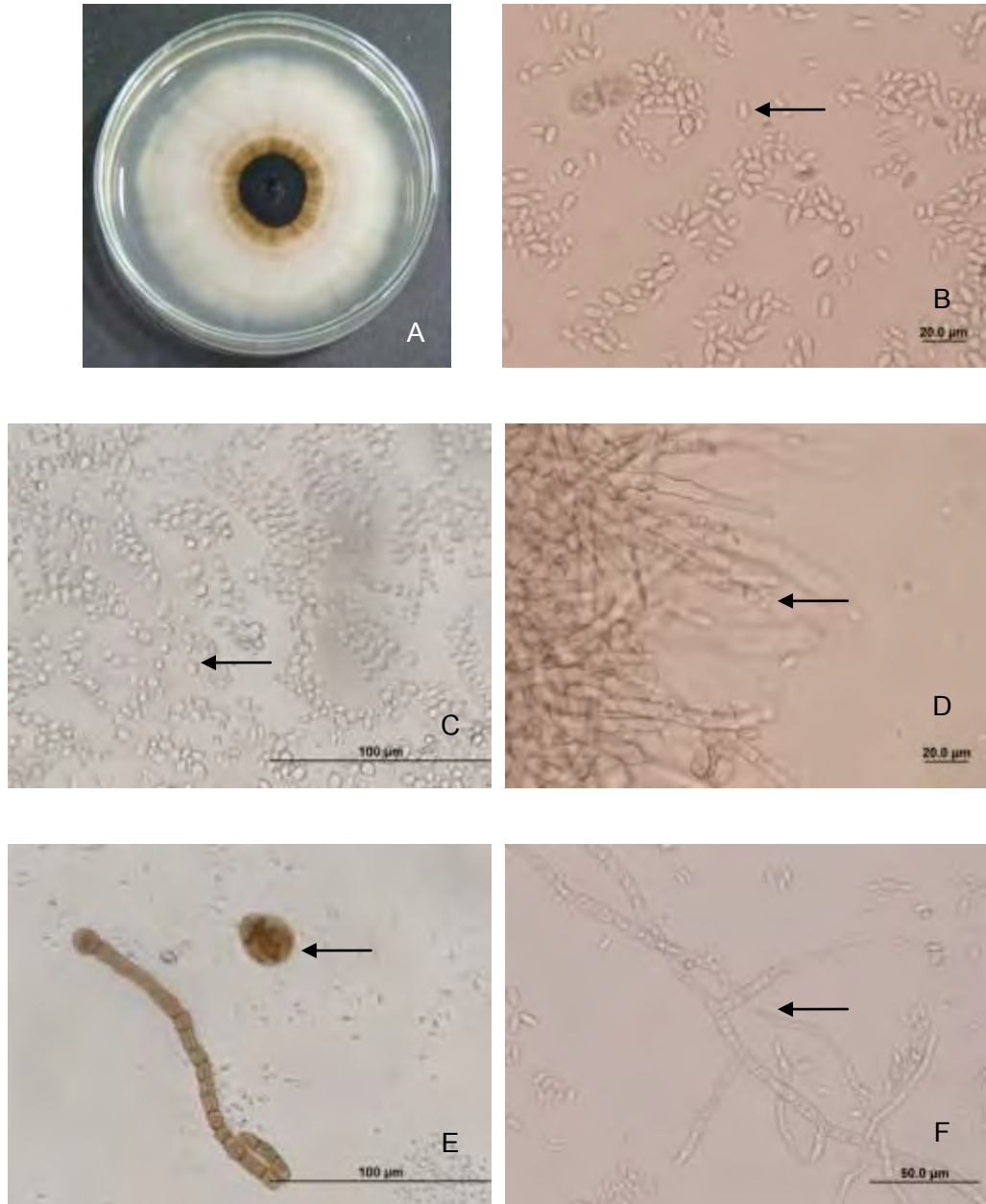




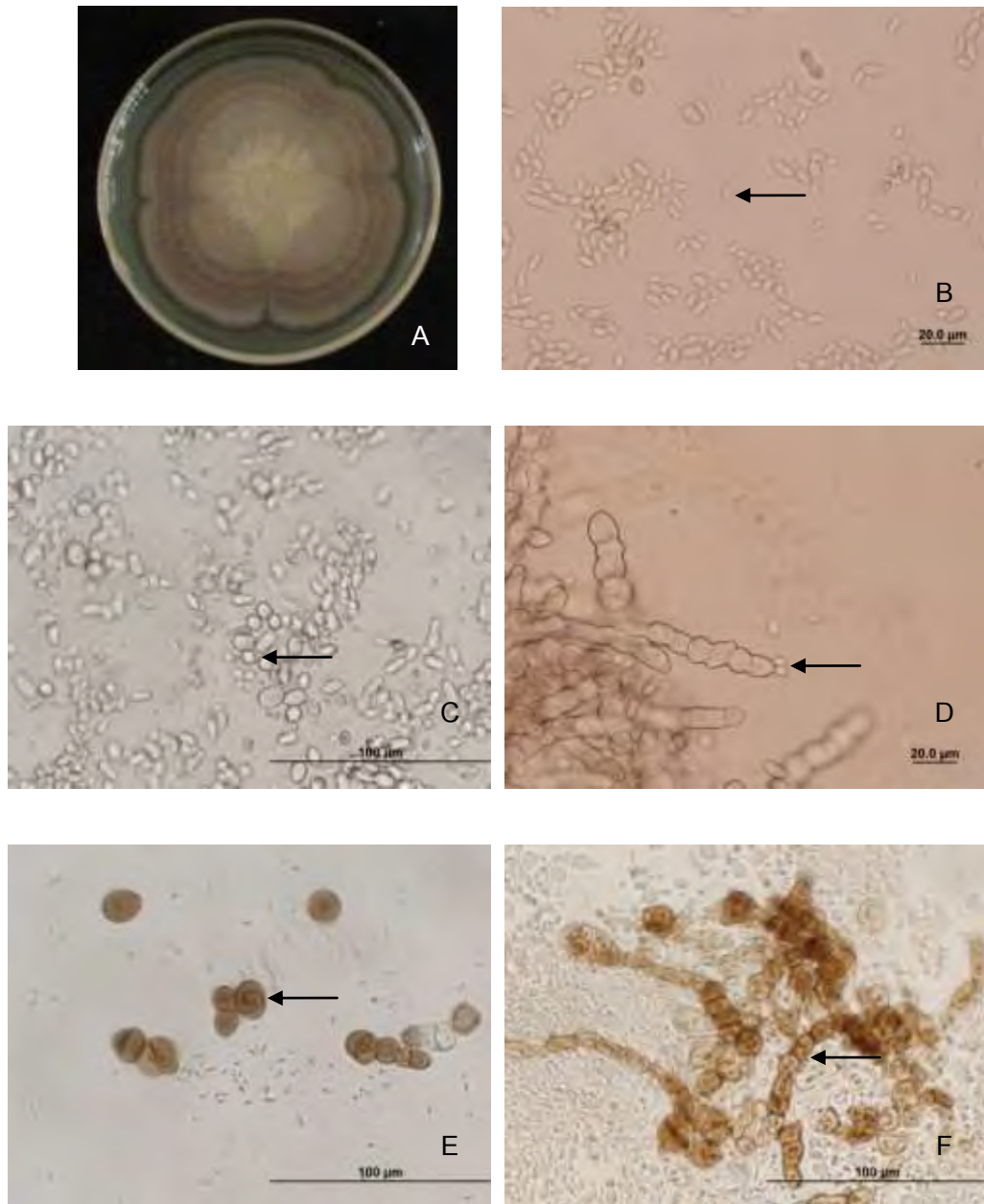
รูปที่ 25 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.98 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใยที่สร้างโคนิเดียติดอยู่ด้านข้างของเส้นใย



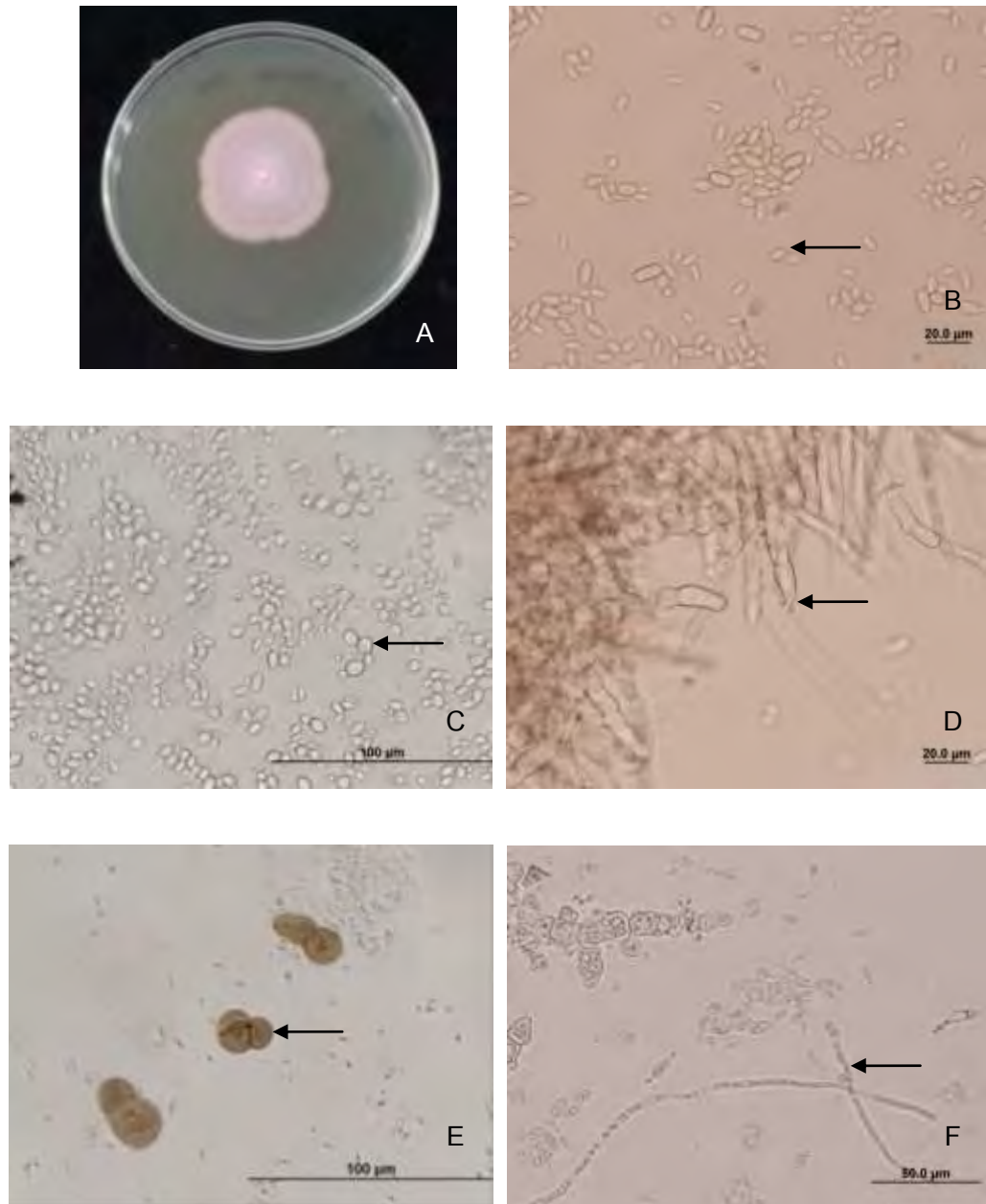
รูปที่ 26 ลักษณะโคโคไนด์ของ *A. pullulans* ไอโซเลต 102 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใย



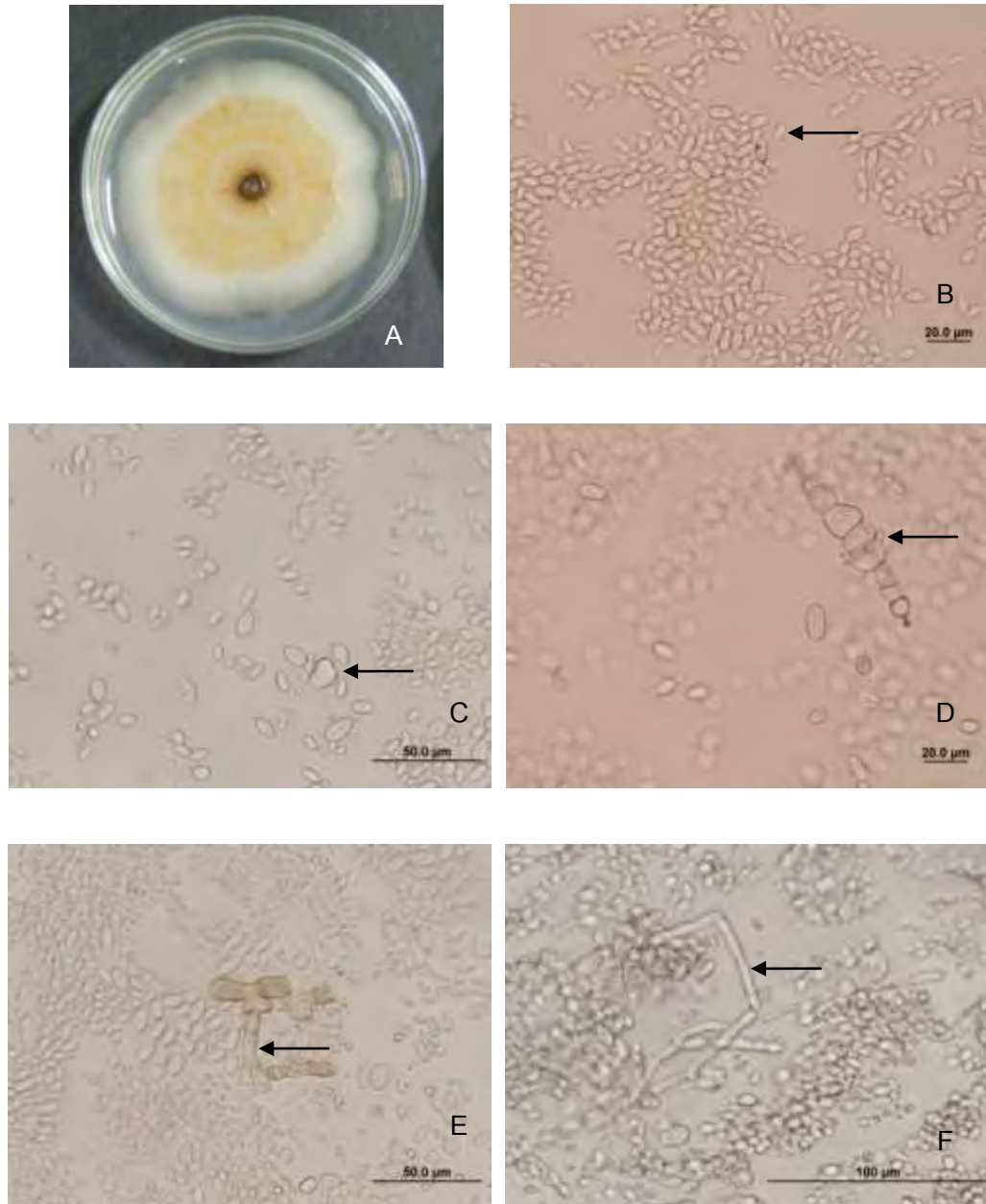
รูปที่ 27 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.107 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใยที่สร้างโคนิเดียติดอยู่ด้านข้างของเส้นใย



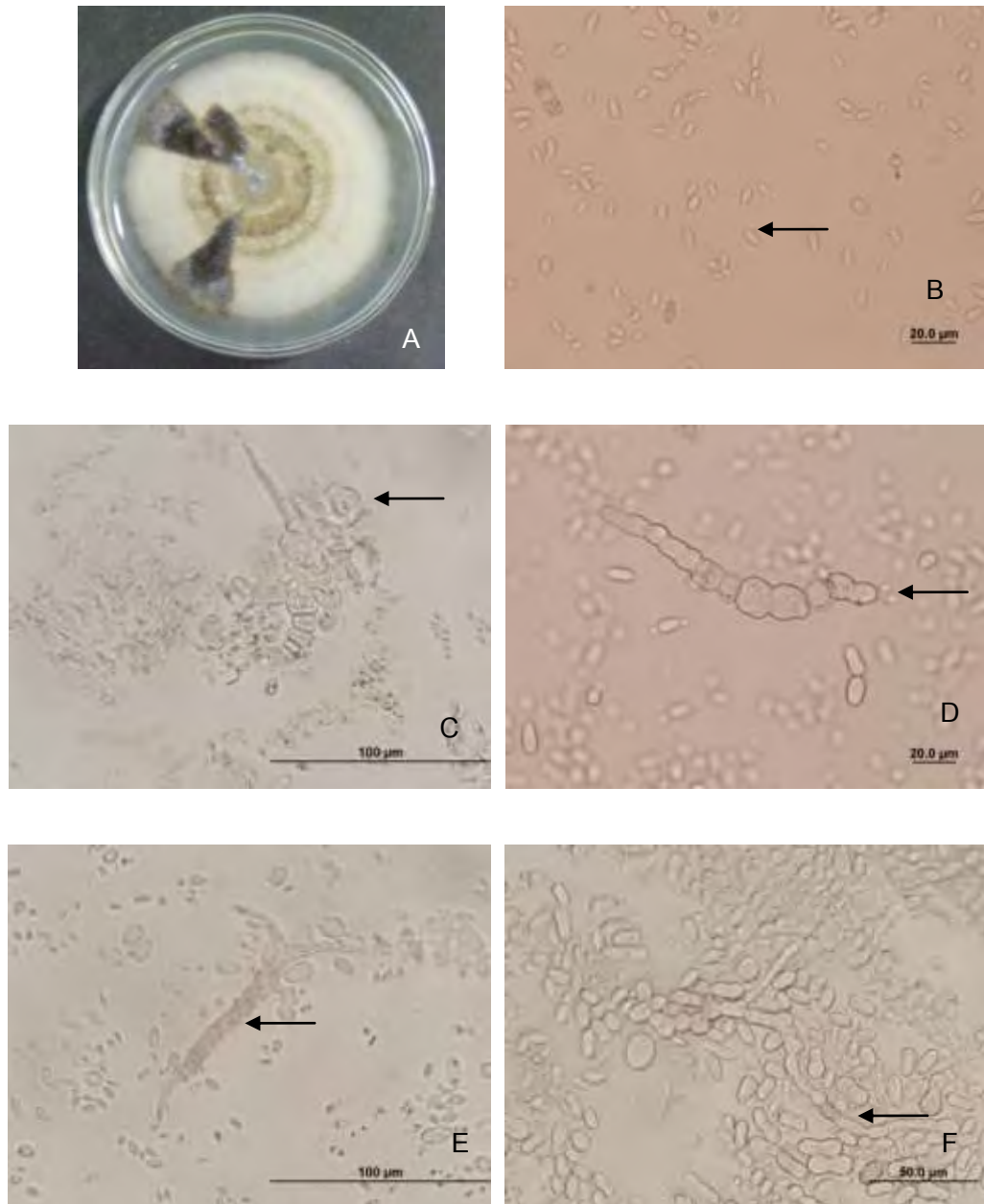
รูปที่ 28 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์ฟอง (D) โคนิเดียมติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใยที่สร้างเม็ดสี



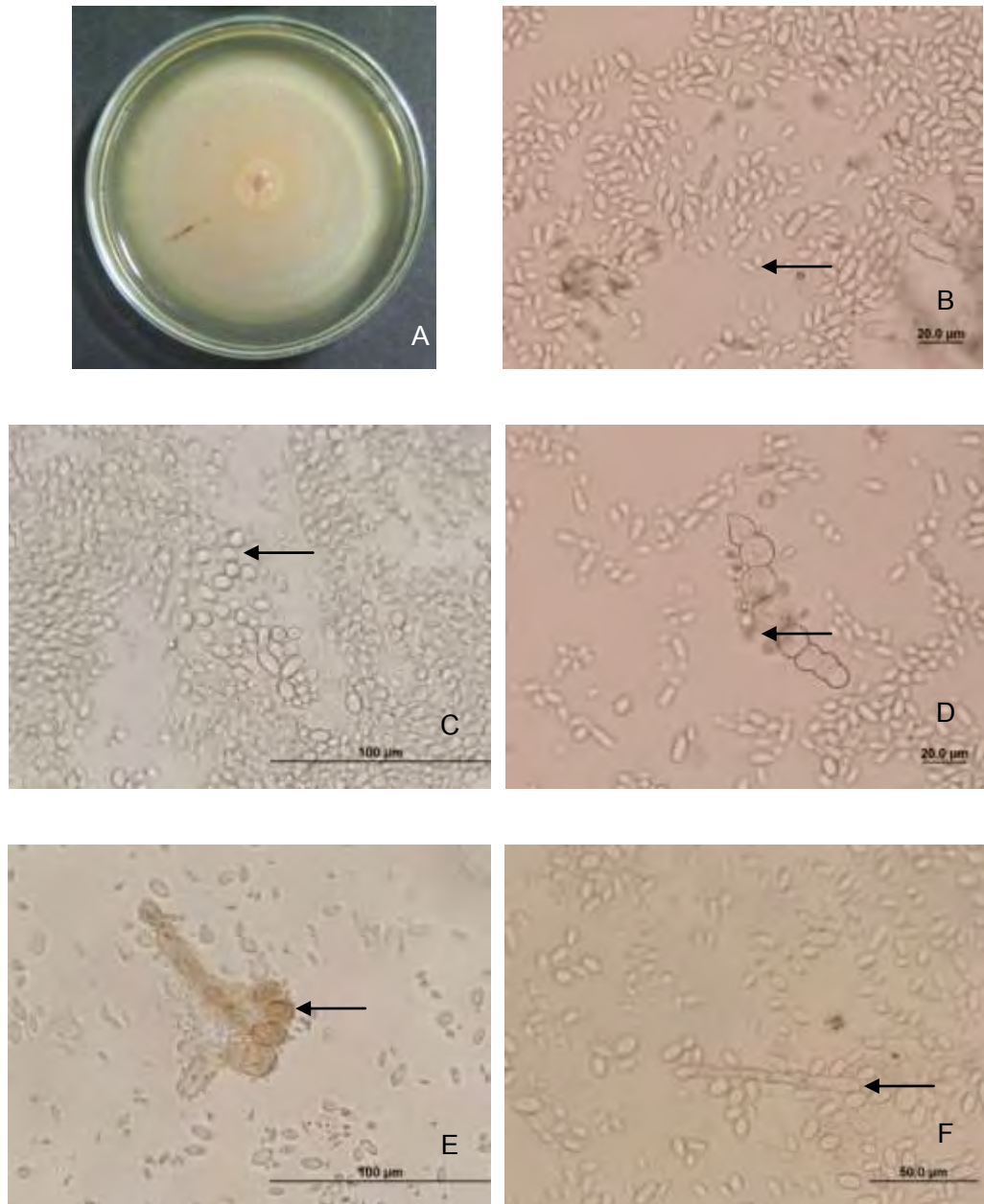
รูปที่ 29 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.109P เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์ฟอง (D) โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์ และ (F) ลักษณะเส้นใย



รูปที่ 30 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.114 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) ลักษณะเส้นใยที่สร้างเม็ดสี และ (F) ลักษณะเส้นใย

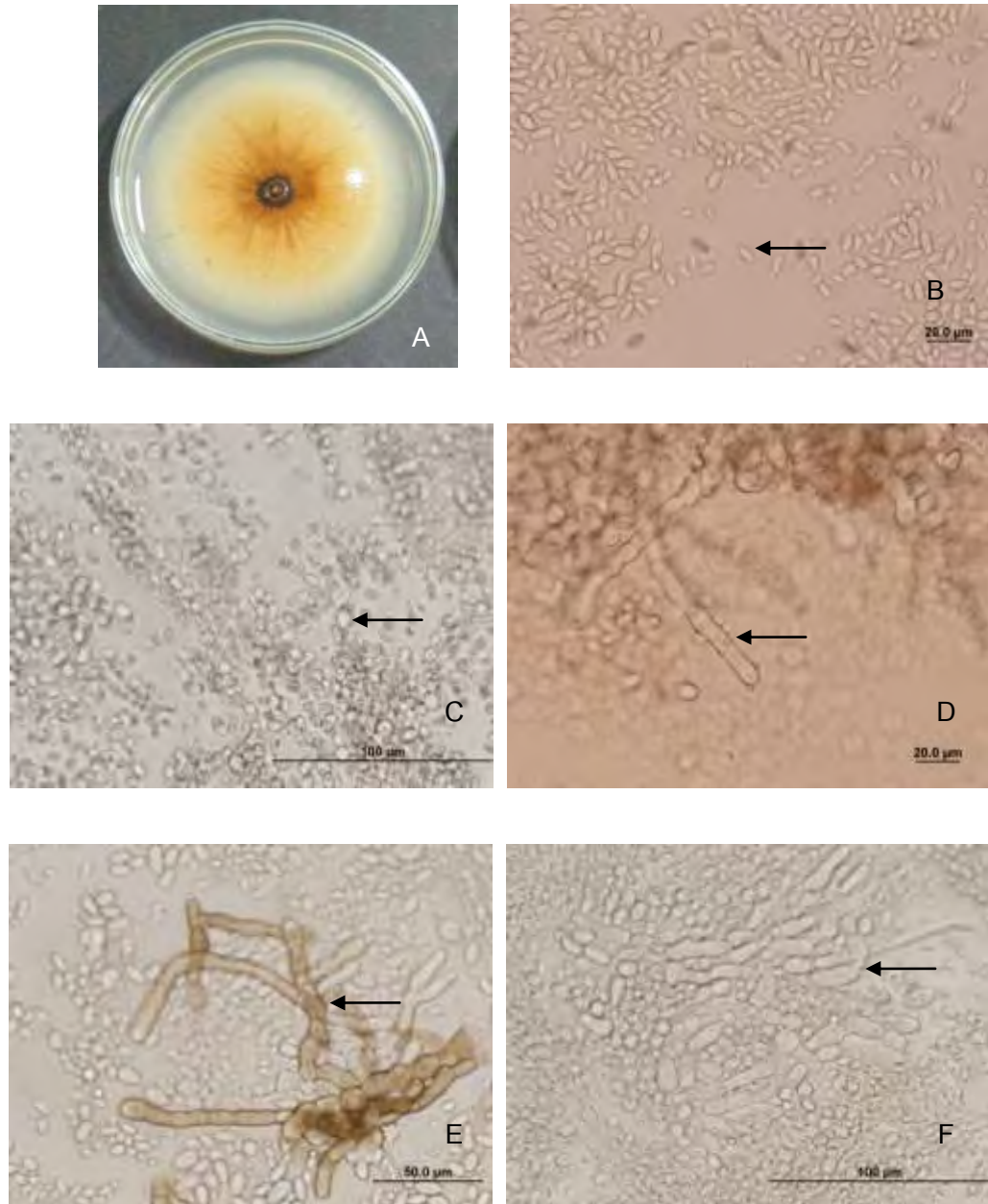


รูปที่ 31 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.149 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์พอง (D) โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) ลักษณะเส้นใยที่สร้างเม็ ดสี และ (F) ลักษณะเส้นใย



รูปที่ 32 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.1500 เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์ฟอง (D) โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) คลาไมโดสปอร์และลักษณะเส้นใยที่สร้างเม็ดสี และ (F) ลักษณะเส้นใย





รูปที่ 33 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.150W เมื่อเลี้ยงบน YMA เป็นเวลา 7 วัน (A) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB เป็นเวลา 5 วัน (B) บลาสโตสปอร์ (C) เซลล์ฟอง (D) โคนินเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (E) ลักษณะเส้นใยที่สร้างเม็ดสี และ (F) ลักษณะเส้นใย

ตารางที่ 3 สีโคโลนีของ *A. pullulans* ที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA MEA YMA และ YMX เป็นเวลา 3 วัน

ไอโซเลต	PDA	MEA	YMA	YMX
No. 1	สีครีม	สีเทา	สีชมพูอ่อน	สีครีม
No. 2	สีเหลืองอ่อน	สีเทาดำ	สีครีม	สีครีม
No. 15	สีครีม	สีเทา	สีชมพูอ่อน	สีครีม
No. 16	สีครีม	สีเทาดำ	สีชมพูอ่อน	สีครีม
No. 27	สีขาว	สีเทา	สีครีม	สีครีม
No. 55	สีชมพูอ่อน	สีเทา	สีส้มอ่อน	สีครีม
No. 59	สีเหลืองอ่อน	สีเทา	สีเหลืองอ่อน	สีครีม
No. 63	สีชมพูอ่อน	สีเทา	สีส้มอ่อน	สีครีม
No. 66	สีชมพูอ่อน	สีเทา	สีครีม	สีครีม
No. 83	สีครีม	สีเทา	สีครีม	สีครีม
No. 92	สีครีม	สีเทาดำ	สีครีม	สีครีม
No. 98	สีครีม	สีเทา	สีครีม	สีครีม
No. 102	สีครีม	สีเทาดำ	สีครีม	สีครีม
No. 107	สีชมพูอ่อน	สีเทา	สีชมพูอ่อน	สีครีม
No. 109 B	สีม่วง	สีเทาดำ	สีชมพูอ่อน	สีครีม
No. 109 P	สีชมพูอ่อน	สีเทา	สีชมพูอ่อน	สีครีม
No. 114	สีครีม	สีเทาดำ	สีครีม	สีครีม
No. 149	สีครีม	สีเทาดำ	สีครีม	สีครีม
No. 150 O	สีส้มอ่อน	สีเทา	สีครีม	สีครีม
No. 150 W	สีครีม	สีเทา	สีครีม	สีครีม

## 4.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลเนส

### 4.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างไซแลเนสโดยวิธี plate screening

เมื่อนำ *A. pullulans* ทั้ง 20 ไอโซเลตมาตรวจสอบความสามารถในการสร้างไซแลเนสโดยเลี้ยงบนอาหารสูตร YMXA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน พบว่าทุกไอโซเลตสามารถสร้างวงใสได้ (รูปที่ 34) ซึ่งแสดงถึงไซแลเนสแอกติวิตี ไอโซเลตที่พบวงใสกว้างที่สุดเมื่อเทียบกับขนาดโคโลนี ได้แก่ ไอโซเลต No.109B มีค่าอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ  $3.00 \pm 0.05$  และไอโซเลตที่พบวงใสแคบที่สุดเมื่อเทียบกับขนาดโคโลนีคือ ไอโซเลต No.59 มีค่าอัตราส่วนเท่ากับ  $1.29 \pm 0.03$  (ตารางที่ 4) โดยสามารถแบ่งกลุ่มของ *A. pullulans* ตามการสร้างวงใสได้ 3 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่สร้างวงใสแคบ (อัตราส่วนน้อยกว่า 2.0) ได้แก่ ไอโซเลต No.2 No.15 No.16 No.55 No.59 No.63 No.92 และ No.102 กลุ่มที่สร้างวงใสปานกลาง (อัตราส่วน 2.0-2.5) ได้แก่ ไอโซเลต No.1 No.27 No.66 No.83 No.98 No.107 No.109P No.114 No.149 และ No.150W และกลุ่มที่สร้างวงใสกว้าง (อัตราส่วนมากกว่า 2.5) ได้แก่ ไอโซเลต No.109B และ No.150O

### 4.2.2 การวัดไซแลเนสแอกติวิตีเชิงปริมาณ

เมื่อนำ *A. pullulan* ทั้ง 20 ไอโซเลตมาเลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตไซแลเนสเชิงปริมาณ พบว่าทุกไอโซเลตสามารถผลิตไซแลเนสได้แตกต่างกัน โดยไอโซเลต No.109B ให้แอกติวิตีสูงสุดที่  $165.86 \pm 3.65$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และไอโซเลต No.2 ให้แอกติวิตีน้อยสุดที่  $15.83 \pm 14.17$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 35) โดยสามารถแบ่งกลุ่มของ *A. pullulans* ตามการสร้างไซแลเนสได้ 3 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ผลิตไซแลเนสแอกติวิตีได้น้อยกว่า 50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ได้แก่ ไอโซเลต No.2 No.15 No.63 No.92 No.102 และ No.149 กลุ่มที่ผลิตไซแลเนสแอกติวิตีได้ 50-100 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ได้แก่ ไอโซเลต No.1 No.16 No.27 No.55 No.59 No.66 No.83 No.150O และ No.150W และกลุ่มที่ผลิตไซแลเนสแอกติวิตีได้ 100-200 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ได้แก่ ไอโซเลต No.98 No.107 No.109B No.109P และ No.114

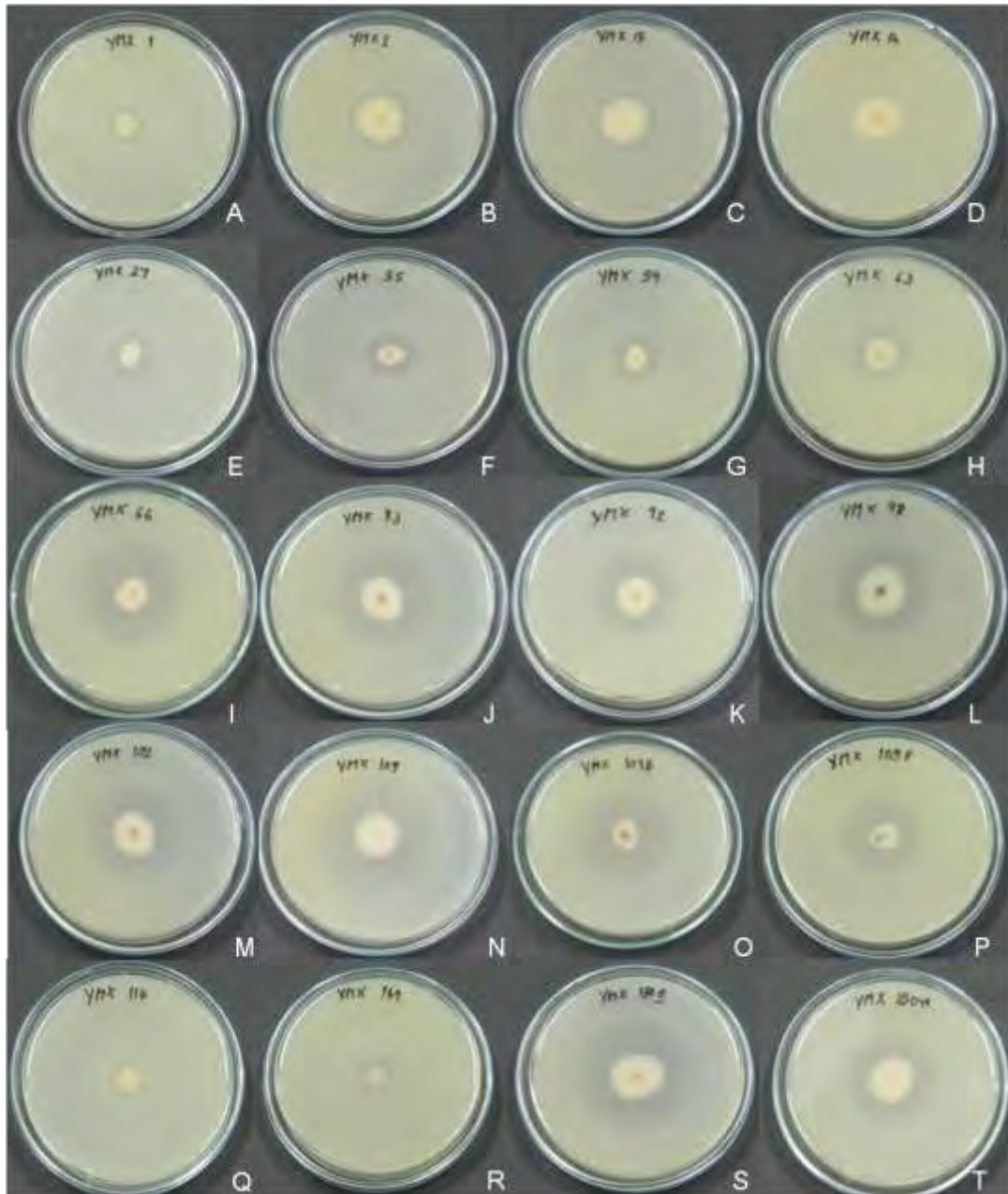
### 4.2.3 การคัดเลือก *A. pullulans* ที่ผลิตไซแลเนสที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง

ทำการคัดเลือกไอโซเลตของ *A. pullulans* ที่ผลิตไซแลเนสที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง โดยเตรียมไซแลเนสตามวิธีในข้อ 3.4.2.2 นำเอนไซม์ที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาทำการวัดแอกติวิตีที่ภาวะปกติ แล้วคำนวณแอกติวิตีสัมพัทธ์ เปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมา

วัดแอกติวิตีตามปกติ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของ *A. pullulans* ตามการผลิตไซแลเนสที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงได้ 3 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่สร้างไซแลเนสที่เสถียรที่อุณหภูมิสูงและ /หรือถูกกระตุ้นด้วยอุณหภูมิสูง (แอกติวิตีสัมพัทธ์มากกว่า 100 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ ไอโซเลต No.1 No.15 No.27 No.55 No.59 และ No.102 กลุ่มที่สร้างไซแลเนสที่ค่อนข้างเสถียร (แอกติวิตีสัมพัทธ์น้อยกว่า 100 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ ไอโซเลต No.2 No.16 No.83 No.98 No.107 No.109B No.114 และ No.149 และกลุ่มที่สร้างไซแลเนสที่ไวต่ออุณหภูมิสูง (แอกติวิตีสัมพัทธ์เป็น 0 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ ไอโซเลต No.66 No.92 No.109P No.150O และ No.150W

#### 4.2.4 การตรวจสอบการสร้าง EPS

ทำการเลี้ยง *A. pullulans* ทุกไอโซเลตในอาหารสูตร PM โดยนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน พบว่า *A. pullulans* ทั้ง 20 ไอโซเลตสามารถผลิต EPS ได้ โดยที่ไอโซเลต No.83 ให้น้ำหนัก EPS เฉลี่ยสูงสุดที่  $1.09 \pm 0.04$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไอโซเลต No.2 ให้น้ำหนัก EPS เฉลี่ยน้อยสุดที่  $0.15 \pm 0.03$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 37) โดยสามารถแบ่งกลุ่ม *A. pullulans* ตามความสามารถในการผลิต EPS ได้ 2 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่สามารถผลิต EPS ได้น้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แก่ ไอโซเลต No.1 No.2 No.15 No.16 No.27 No.55 No.59 No.63 No.66 No.92 No.98 No.102 No.107 No.114 No.109B No.109P No.149 No.150O และ No.150W และกลุ่มที่สามารถผลิต EPS ได้มากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แก่ ไอโซเลต No.83

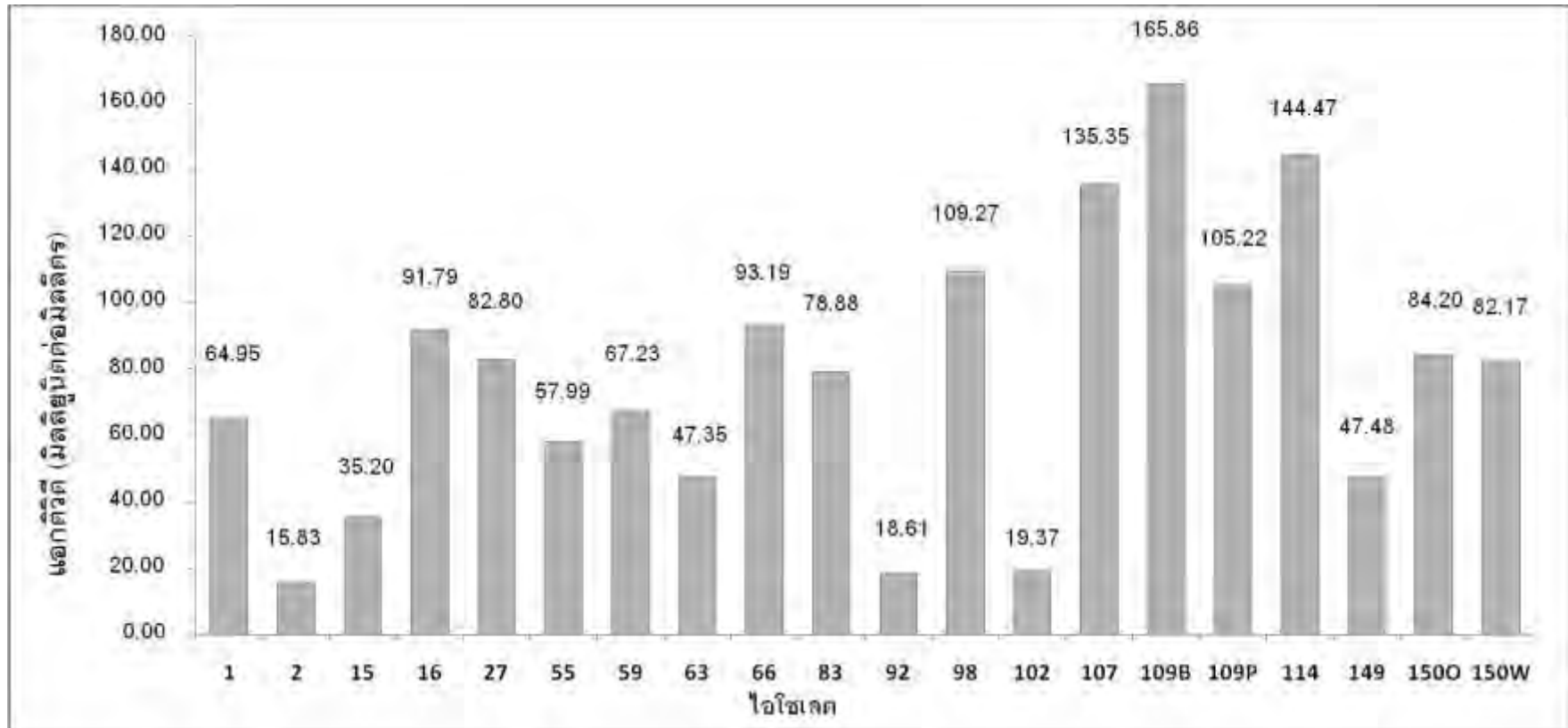


รูปที่ 34 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไฮดรอลิซเซลลูโลสของ *A. pullulans* ด้วยวิธี plate screening การสร้างไฮดรอลิซเซลลูโลสสังเกตได้จากวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี ภายหลังจากเลี้ยงบนอาหารสูตร YMXA ที่มีไฮดรอลิซเซลลูโลส 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน (A) ไอโซเลต No.1, (B) ไอโซเลต No.2, (C) ไอโซเลต No.15, (D) ไอโซเลต No.16, (E) ไอโซเลต No.27, (F) ไอโซเลต No.55, (G) ไอโซเลต No.59, (H) ไอโซเลต No.63, (I) ไอโซเลต No.66, (J) ไอโซเลต No.83, (K) ไอโซเลต No.92, (L) ไอโซเลต No.98, (M) ไอโซเลต No.102, (N) ไอโซเลต No.107, (O) ไอโซเลต No.109B, (P) ไอโซเลต No.109P, (Q) ไอโซเลต No.114, (R) ไอโซเลต No.149, (S) ไอโซเลต No.150O และ (T) ไอโซเลต No.150W

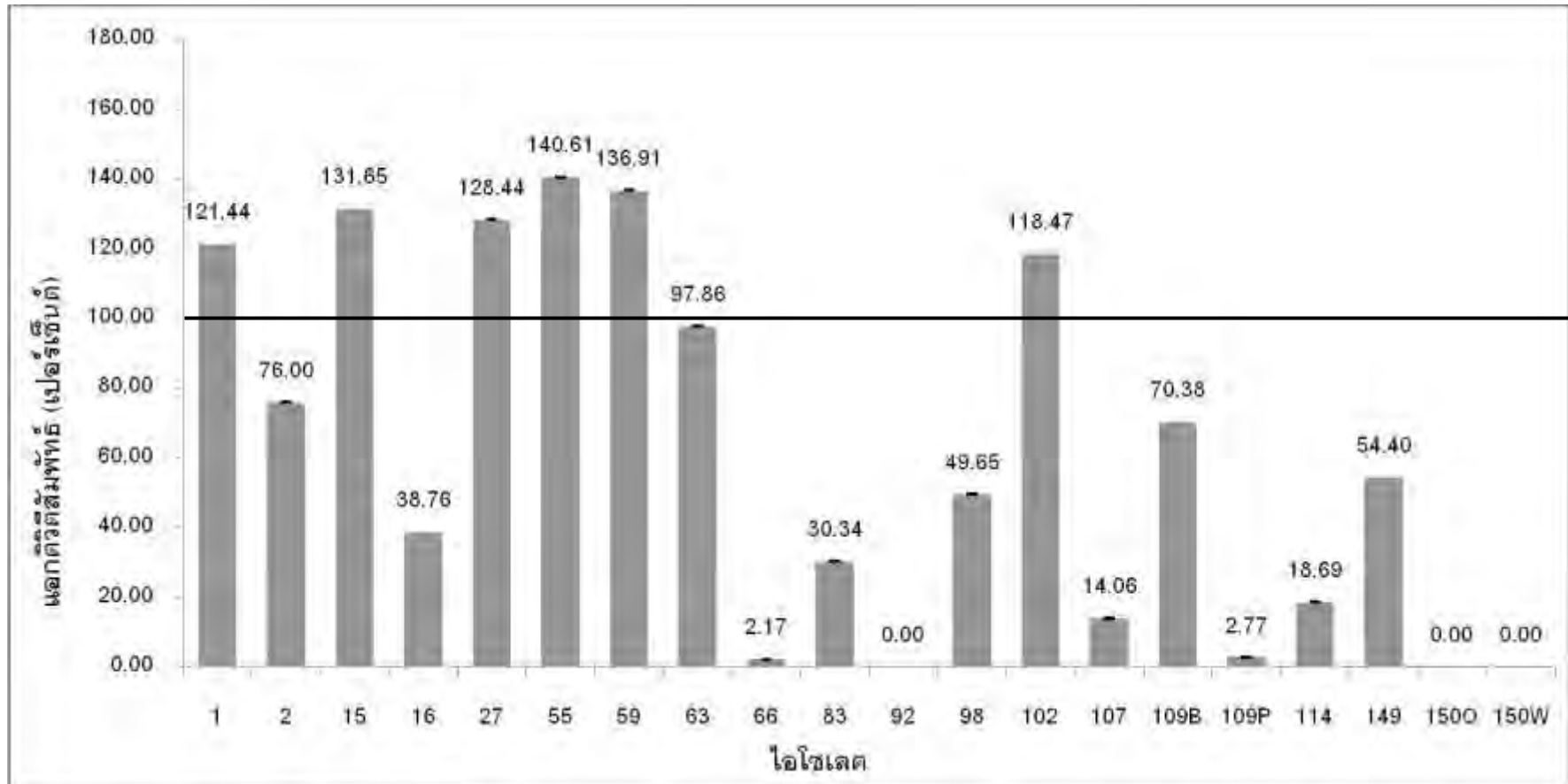
ตารางที่ 4 ความสามารถในการสร้างวงใสของ *A. pullulans* 20 ไอโซเลต ภายหลังจากเลี้ยงบนอาหารสูตร YMXA ที่มีไซแลน 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

ไอโซเลต	ขนาดของวงใส	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส/ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี	อัตราส่วน	วันที่แสดงอัตราส่วนสูงสุด
No.1	+++++	4.40/2.10	2.10±0.20	3
No.2	+++++	4.00/2.30	1.74±0.30	3
No.15	+++	1.60/1.10	1.45±0.10	1
No.16	++	1.40/0.80	1.75±0.20	1
No.27	++	1.40/0.70	2.00±0.30	1
No.55	+++	1.70/0.90	1.89±0.20	1
No.59	+	0.90/0.70	1.29±0.20	1
No.63	++	1.10/0.80	1.38±0.30	1
No.66	++++	2.20/1.10	2.00±0.20	1
No.83	+++++	2.60/1.30	2.00±0.30	1
No. 92	++++	2.30/1.20	1.92±0.20	1
No. 98	+++++	3.00/1.30	2.31±0.20	1
No.102	+++	1.90/1.20	1.58±0.10	1
No.107	++++	2.20/0.90	2.44±0.10	1
No.109B	+++++	2.70/0.90	3.00±0.30	1
No.109P	++++	2.50/1.10	2.27±0.30	1
No.114	+++++	2.80/1.20	2.33±0.20	1
No.149	++++	2.40/1.10	2.18±0.20	1
No.150O	+++++	2.80/1.10	2.55±0.30	1
No.150W	+++++	2.70/1.30	2.08±0.20	1

หมายเหตุ ขนาดของวงใส: + คือ 1.0-2.0 เซนติเมตร, ++ คือ 2.0-2.5 เซนติเมตร และ +++ คือมากกว่า 2.5 เซนติเมตร

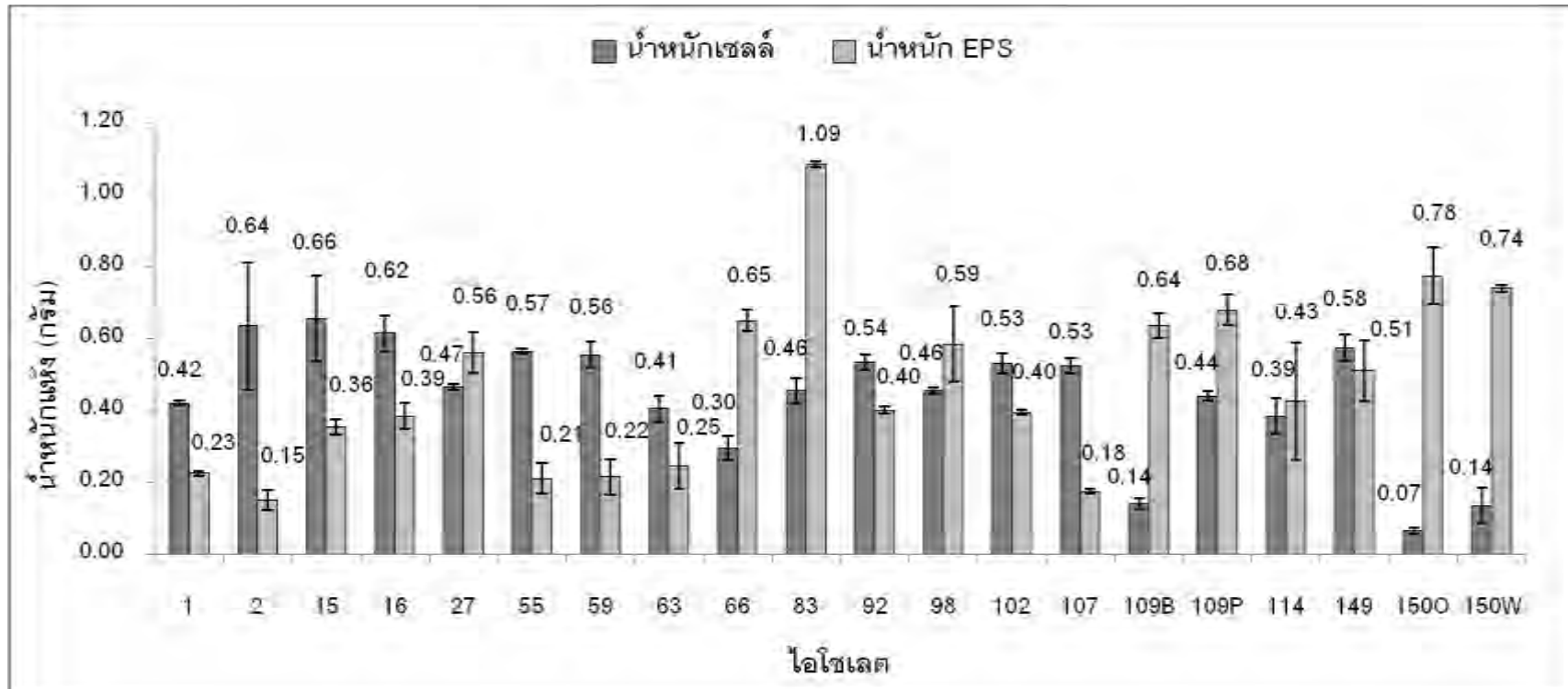


รูปที่ 35 ไส้แลนเนสแอกทีวิตีของ *A. pullulans* 20 ไอโซเลต ภายหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่เติมน้ำตาลไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ



รูปที่ 36 แอกติวิตีสัมพัทธ์ของไซแลเนสที่สร้างโดย *A. pullulans* 20 ไอโซเลต หลังจากทำการบ่มเอนไซม์หยาบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดแอกติวิตีที่ภาวะปกติ แอกติวิตีสัมพัทธ์อยู่ค่านวมโดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาวัดแอกติวิตีตามปกติ ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

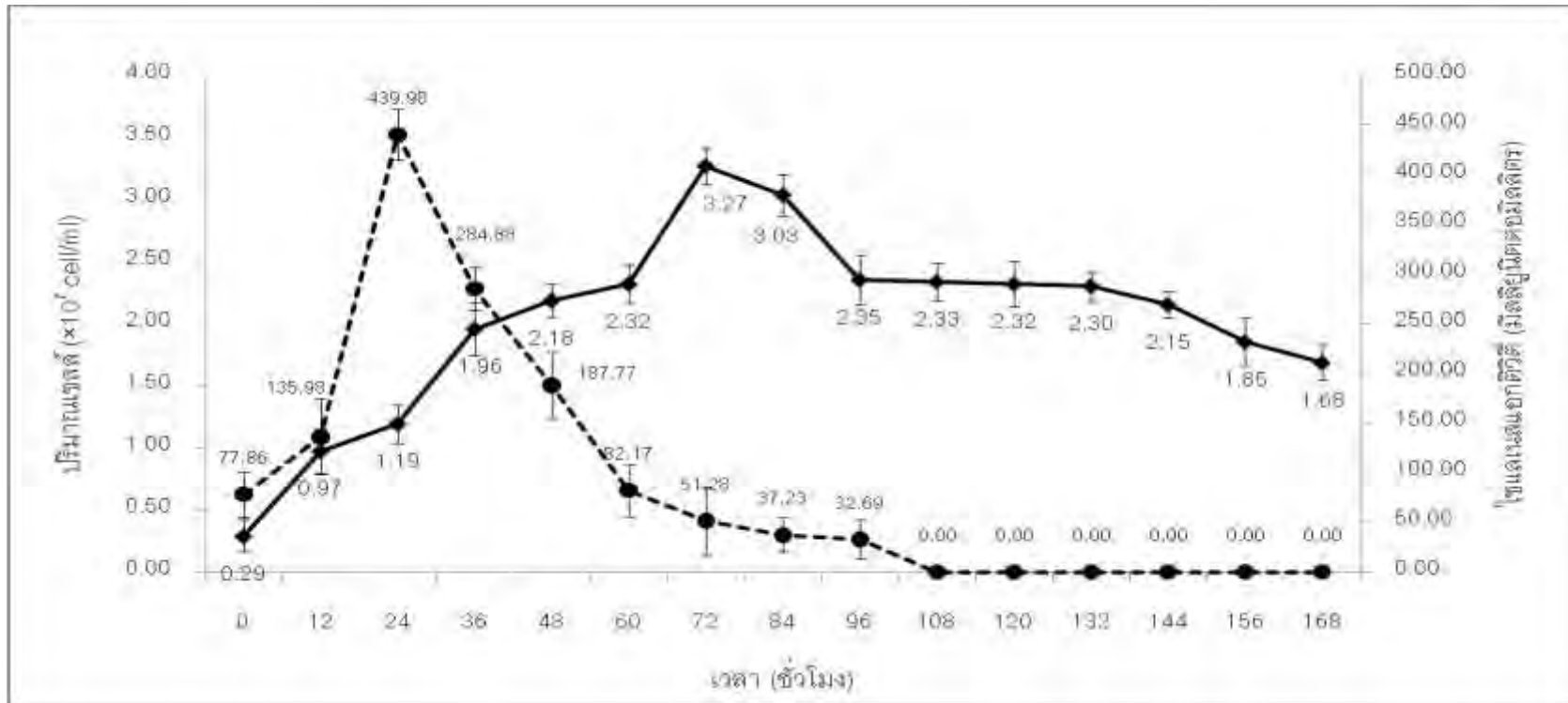




รูปที่ 37 การเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (EPS) ของ *A. pullulans* 20 ไอโซเลต ภายหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร PM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.3 การศึกษาการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของ *A. pullulans*

นำ *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ที่มีความสามารถในการผลิตไซแลเนสได้มากที่สุด และสามารถคงแอกติวิตี้ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มาศึกษาการเติบโตและช่วงเวลาที่ผลิตไซแลเนสโดยเลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่เติมน้ำตาลไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง พบว่า ไอโซเลต No.109B ให้แอกติวิตี้สูงสุดที่  $439.98 \pm 14.33$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน และให้จำนวนเซลล์มากที่สุด  $3.27 \times 10^7$  เซลล์ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน (รูปที่ 38) ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่า *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B มีความสามารถในการผลิตไซแลเนสได้มากที่สุด ระหว่างการเติบโตใน ช่วง early log phase เมื่อทำการเลี้ยงไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 38 การเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ภายหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่เติมน้ำตาลไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส —●— แสดงปริมาณเซลล์ ( $\times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิตร) และ -●- แสดงไซแลเนสแอกติวิตี (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)

#### 4.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส

ทำการศึกษาระยะที่เหมาะสมในการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B โดยการปรับองค์ประกอบของอาหารสูตร XPM และภาวะในการเลี้ยง ตามลำดับ ดังนี้

##### 4.4.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไซแลเนส โดยเลี้ยง

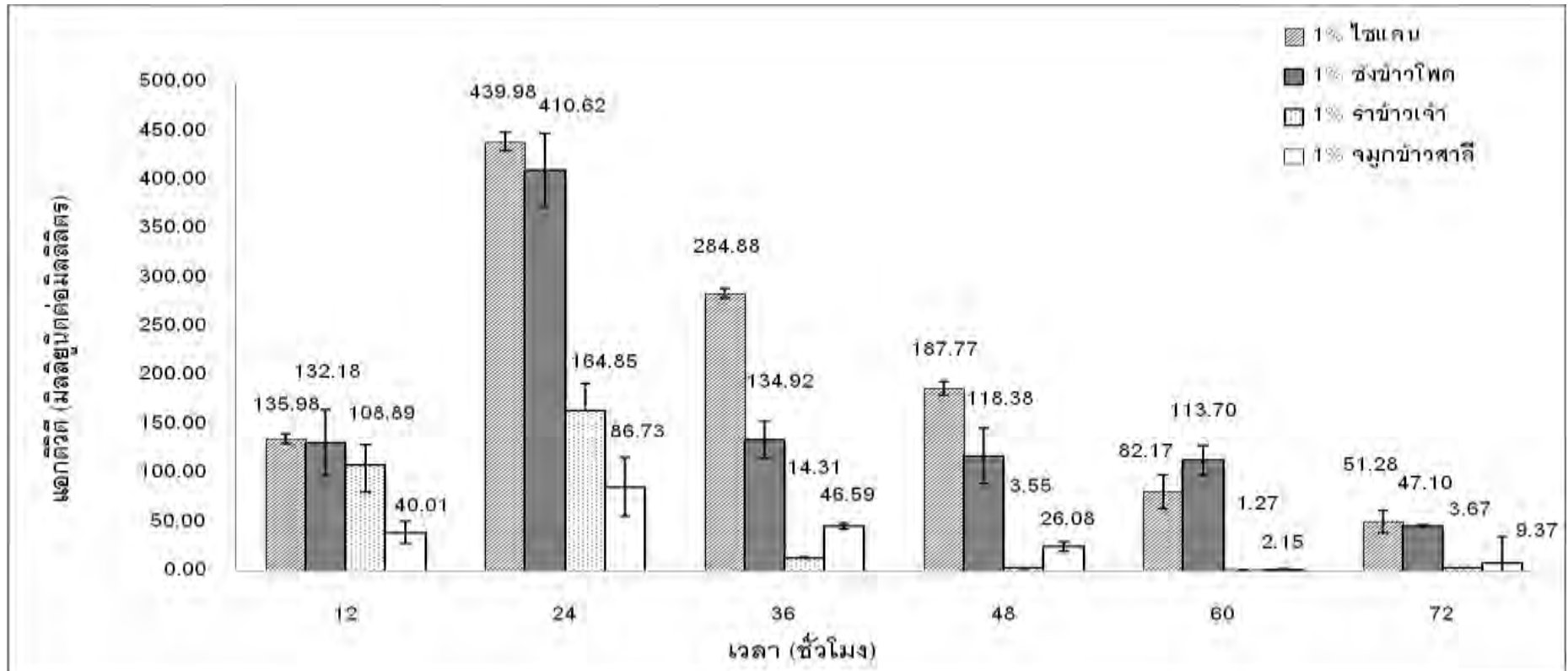
*A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ในอาหารสูตร XPM ที่ปรับองค์ประกอบโดยเปลี่ยนจากการใช้น้ำตาลไซแลนเป็นวัสดุจากการเกษตรคือ ชั่งข้าวโพด รำข้าว และจมูกข้าวสาลี ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าไอโซเลต No.109B ให้ไซแลเนสแอกติวิตีสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ไซแลนและชั่งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $439.98 \pm 9.66$  และ  $410.62 \pm 37.63$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาเป็น รำข้าว และจมูกข้าวสาลี โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $164.85 \pm 27.19$  และ  $86.73 \pm 30.39$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 39) ทั้งนี้องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุจากการเกษตรแต่ละชนิดประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน สำหรับชั่งข้าวโพดมี 30.49 43.62 และ 21.51 กรัมต่อน้ำหนักแห้งเริ่มต้น 100 กรัม ตามลำดับ รำข้าวมี 38.59 35.54 และ 22.33 กรัมต่อน้ำหนักแห้งเริ่มต้น 100 กรัม ตามลำดับ และจมูกข้าวสาลี 40.73 11.11 และ 42.60 กรัมต่อน้ำหนักแห้งเริ่มต้น 100 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบชีวมวลของวัสดุจากการเกษตรที่ใช้ในการปรับอาหารสูตร XPM

ชนิดของวัสดุทางการเกษตร	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อน้ำหนักแห้งเริ่มต้น 100 กรัม)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ชั่งข้าวโพด	43.62 <sup>1</sup>	36.49 <sup>1</sup>	21.51 <sup>1</sup>
รำข้าว	38.59 <sup>1</sup>	35.54 <sup>1</sup>	22.33 <sup>1</sup>
จมูกข้าวสาลี	30.50 <sup>2</sup>	28.40 <sup>2</sup>	18.90 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>ทำการวิเคราะห์ ลิกนิน ไฮโดรเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส แอลฟาเซลลูโลสด้วยวิธี : Standard Tappi (Technical Associate Pulp And Paper Industry, 2000-2001)

<sup>2</sup>ปิยวรรณ สายมโนพันธ์ และ พัชรินทร์ ฉัตรประเสริฐ, 2538



รูปที่ 39 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไซแลนเนสของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ที่เลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่ปรับแหล่งคาร์บอน โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

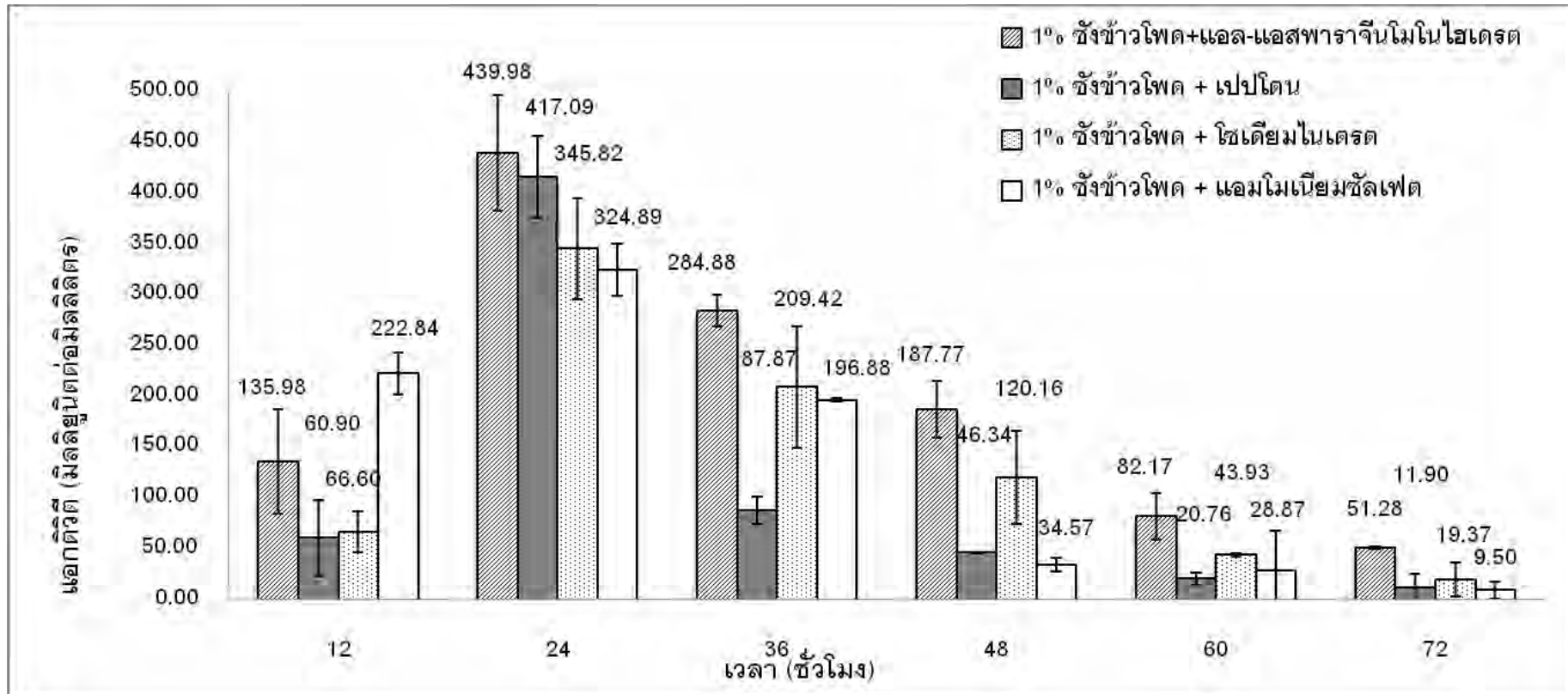
#### 4.4.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไซแลเนส โดยเลี้ยง

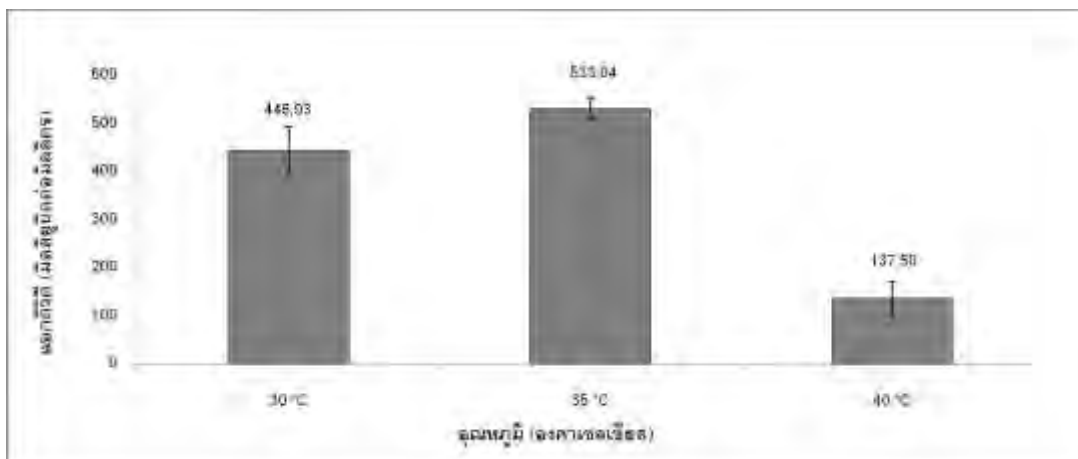
*A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ในอาหารสูตร XPM ที่มีซังข้าวโพด ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจากแอล- แอสพาราจีนโมโนไฮเดรตเป็น เปปโตน โซเดียมไนเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่า ไอโซเลต No.109B ให้ไซแลเนสแอกติวิตีสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่ง คาร์บอนและมีแอล-แอสพาราจีนโมโนไฮเดรตและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $439.98 \pm 56.60$  และ  $417.09 \pm 40.31$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาเป็นอาหารที่มีโซเดียมไนเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $345.82 \pm 50.08$  และ  $324.89 \pm 23.11$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 40)

#### 4.4.3 อุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไซแลเนส โดยเลี้ยง *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ในอาหารสูตร XPM ที่มีซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และแอล-แอสพาราจีนโมโนไฮเดรตที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยบ่ม บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไอโซเลต No.109B ให้ไซแลเนสแอกติวิตีสูงที่สุด โดยให้ ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $533.04 \pm 15.35$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตรรองลงมาเป็นการเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $445.93 \pm 31.97$  และ  $137.50 \pm 23.10$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 41)



รูปที่ 40 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ที่เลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่ปรับแหล่งไนโตรเจน โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

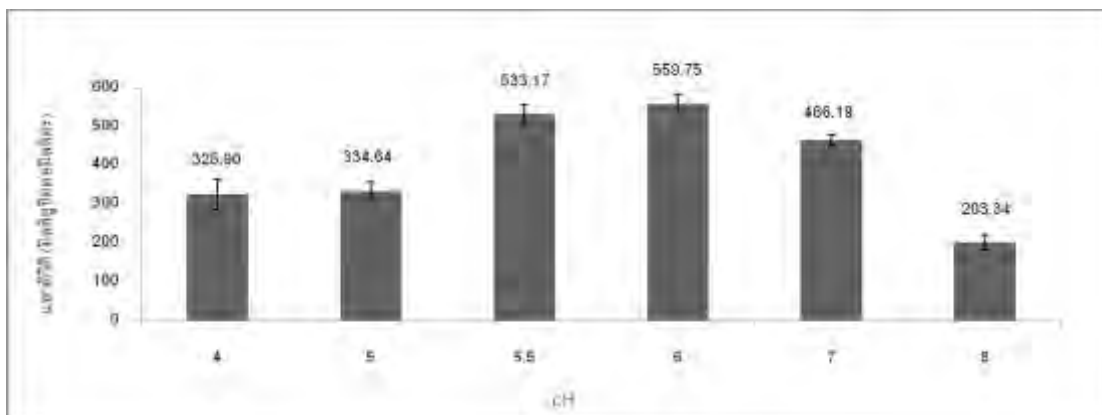


รูปที่ 41 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* ไอโซเลต No. 109B ที่เลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่มีซังข้าวโพด 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและแอล- แอสพาราจिनโมโนไฮเดรต 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวเลขเห็นอกกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.4.4 ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหาร

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารที่มีผลต่อการผลิตไซแลเนสโดยเลี้ยง *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ในอาหารสูตร XPM ที่มีซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและแอล- แอสพาราจिनโมโนไฮเดรตที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารให้ได้ 4.0 5.0 5.5 6.0 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ ทำการบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลต No.109B ให้ไซแลเนสแอกติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารที่ 6.0 โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $559.75 \pm 25.03$  มิลลิวินิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารที่ 5.5 7.0 5.0 4.0 และ 8.0 โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $533.17 \pm 23.14$   $466.19 \pm 14.16$   $334.64 \pm 23.05$   $325.90 \pm 37.91$  และ  $203.34 \pm 19.20$  มิลลิวินิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 42)





รูปที่ 42 ผลของค่าความเป็นกรดต่าง เริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ที่เลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่มีซังข้าวโพด 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและแอล-แอสพาราจีนโมโนไฮเดรต 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

#### 4.5 การเตรียมเอนไซม์ไซแลเนสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ

##### 4.5.1 การเตรียมเอนไซม์ไซแลเนส

###### 4.5.1.1 การทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน

เลี้ยง *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ในอาหารสูตร XPM ที่มีการปรับองค์ประกอบและภาวะของการเลี้ยงจากข้อ 4 ปริมาตร 2 ลิตร นำอาหารเหลวที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 และวัดแอกติวิตีของไซแลเนสทั้งหมดได้ 1,066,080.00 มิลลิลิยูนิต วัดโปรตีนทั้งหมดได้ 68,880.00 มิลลิกรัม และมีค่าแอกติวิตีจำเพาะ 15.48 มิลลิลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน หลังจากนั้นทำให้มีความเข้มข้นของไซแลเนสสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชันโดยใช้ Viva Flow 25 ที่มี membrane cut off ที่ 10,000 Da แล้วนำมาวัดแอกติวิตีของไซแลเนส ทั้งส่วนที่ผ่านและไม่ผ่านเมมเบรน พบว่าแอกติวิตีของไซแลเนสมีมาก ในส่วนที่กรองไม่ผ่านเมมเบรนโดยมีแอกติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 1,186,614.50 มิลลิลิยูนิต วัดโปรตีนทั้งหมดได้ 44,583.33 มิลลิกรัม และแอกติวิตีจำเพาะ 26.62 มิลลิลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนที่ผ่านเมมเบรนมีค่าแอกติวิตีของไซแลเนสเล็กน้อยเท่ากับ 49,125.74 มิลลิลิยูนิต วัดโปรตีนทั้งหมดได้ 24,166.67 มิลลิกรัม และแอกติวิตีจำเพาะ 2.03 มิลลิลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบแอกติวิตีของไซแลเนสก่อนและหลังการทำอัลตรา-ฟิลเตรชัน พบว่าวิธีการนี้สามารถทำให้ไซแลเนสมีความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 1.86 เท่า

#### 4.5.1.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

จากการตกตะกอนไซแลเนสที่ผ่านการทำอัลตราฟิลเตรชันปริมาตร 200 มิลลิลิตร ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นในช่วง 0-20 20-40 40-60 60-80 และ 80-100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโปรตีนที่ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 60-80 เปอร์เซ็นต์ มีแอกติวิตีทั้งหมดและแอกติวิตีจำเพาะของไซแลเนสสูงที่สุดคือ อยู่ที่ 10,483.53 มิลลิลิยูนิต และ 30.25 มิลลิลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ รองลงมาคือโปรตีนที่ ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 80-100 40-60 และ 20-40 โดยมีแอกติวิตีของไซแลเนสเท่ากับ 1,594.69 1,215.48 และ 167.13 มิลลิลิยูนิต ตามลำดับและแอกติวิตีจำเพาะของไซแลเนสเท่ากับ 10.87 8.82 และ 3.65 มิลลิลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ สุดท้ายคือโปรตีนที่ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0-20 เปอร์เซ็นต์ มีแอกติวิตีทั้งหมดและแอกติวิตีจำเพาะของไซแลเนสน้อยที่สุดคืออยู่ที่ 30.39 มิลลิลิยูนิต และ 3.22 มิลลิลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

#### 4.5.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของไซแลเนส

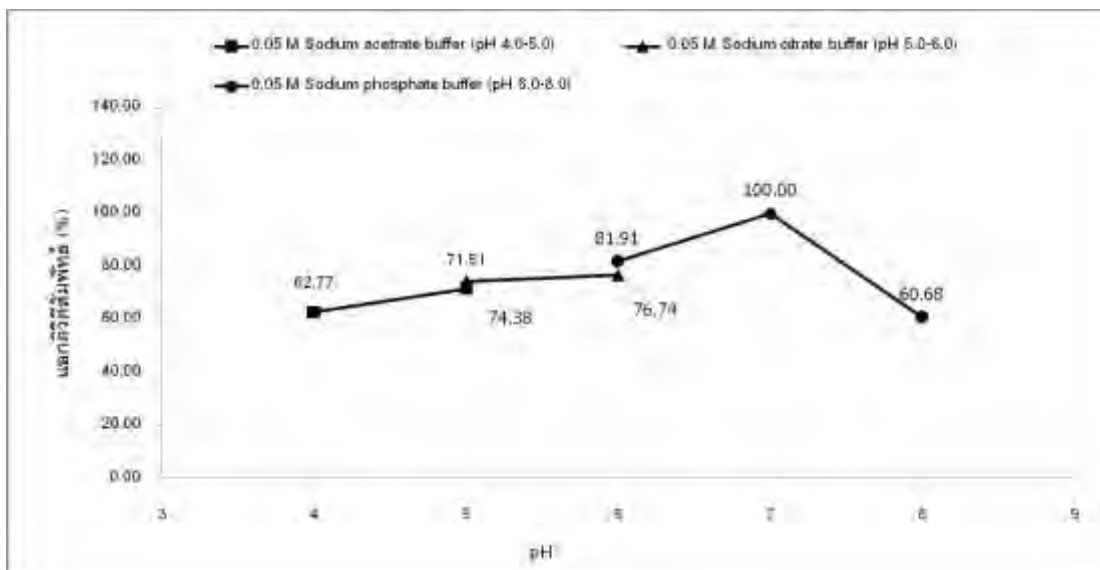
จากการศึกษาการตกตะกอนโปรตีน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 60-80 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ ไซแลเนส มีความเข้มข้นและแอกติวิตีจำเพาะสูงที่สุด ดังนั้นจึงนำเอาน้ำเอนไซม์ที่ได้จากช่วงความเข้มข้นนี้มาทำการศึกษาลักษณะสมบัติของไซแลเนสดังต่อไปนี้

##### 4.5.2.1 การศึกษาผลของความเป็นกรดต่างที่มีต่อการทำงานของไซแลเนส

เมื่อศึกษาผลของความเป็นกรดต่างที่มีต่อการทำงานของไซแลเนส โดยการปรับความเป็นกรดต่างของ reaction mixture ให้เป็น pH 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ก่อนทำการวัดแอกติวิตี คำนวณ แอกติวิตีสัมพัทธ์โดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของไซแลเนสที่วัดในภาวะปกติ (pH 7.0) พบว่าไซแลเนสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรดต่าง 7.0 (ใน 50 mM Sodium phosphate buffer) โดยมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือความเป็นกรดต่าง 6.0 (ใน 50 mM Sodium phosphate buffer และใน 50 mM Sodium citrate buffer) 5.0 (ใน 50 mM Sodium citrate buffer และใน 50 mM Sodium acetate buffer) และ 4.0 (ใน 50 mM Sodium acetate buffer) โดยมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 81.91 และ 76.74 (pH 6.0) 74.38 และ 71.51 (pH 5.0) และ 62.77 (pH 4.0) เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสุดท้ายที่ความเป็นกรดต่าง 8.0 (ใน 50 mM Sodium phosphate buffer) โดยมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 60.68 เปอร์เซ็นต์ โดยสรุปได้ว่า ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการทำงานของไซแลเนสคือ 7.0 ใน 50 mM Sodium phosphate buffer (รูปที่ 43)

ตารางที่ 6 การตกตะกอนโปรตีนของไซแลเนส จาก *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

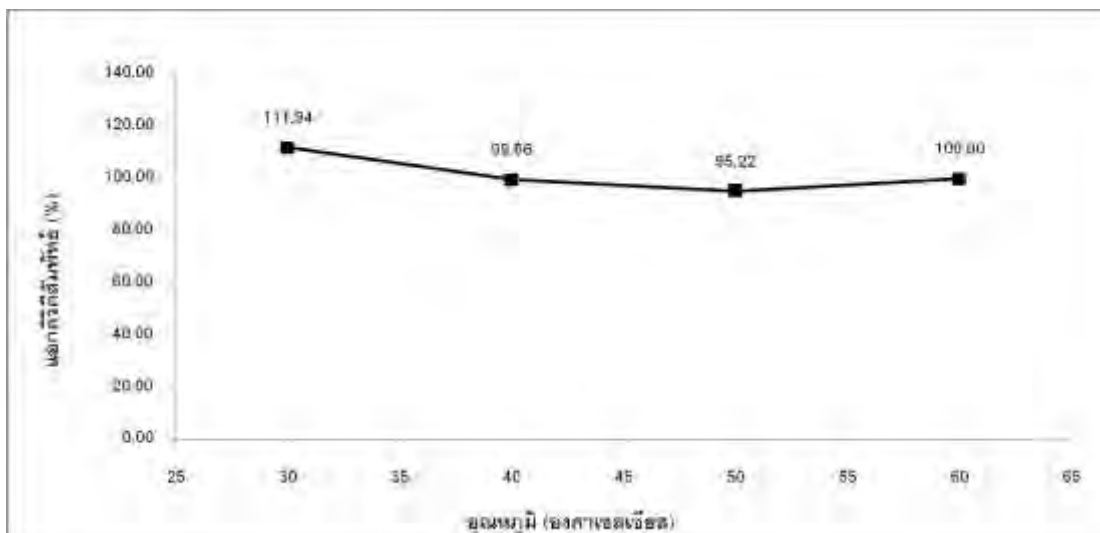
ช่วงเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	Total volume (ml)	Activity (mU/ml)	Total protein (mg)	Total activity (mU)	Specific activity (mU/mg)	Purification folds
เอนไซม์หยาบ (ก่อนตกตะกอน)	200.00	988.85	6,888.89	197,770.00	26.62	1.00
0-20	4.00	7.60	9.44	30.39	3.22	0.12
20-40	6.00	27.85	45.83	167.13	3.65	0.14
40-60	8.00	151.94	137.78	1,215.48	8.82	0.33
60-80	10.00	1048.35	346.53	10,483.53	30.25	1.14
80-100	11.00	144.97	146.67	1,594.69	10.87	0.41



รูปที่ 43 ผลของความเป็นกรดต่างที่มีต่อการทำงานของไซแลเนส โดยการปรับความเป็นกรดต่างของ Reaction mixture ให้เป็น pH 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ก่อนทำการวัดแอกติวิตี แล้วคำนวณแอกติวิตีสัมพัทธ์โดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของไซแลเนสที่วัดในภาวะปกติ (pH 7.0) ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 4.5.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของไซแลเนส

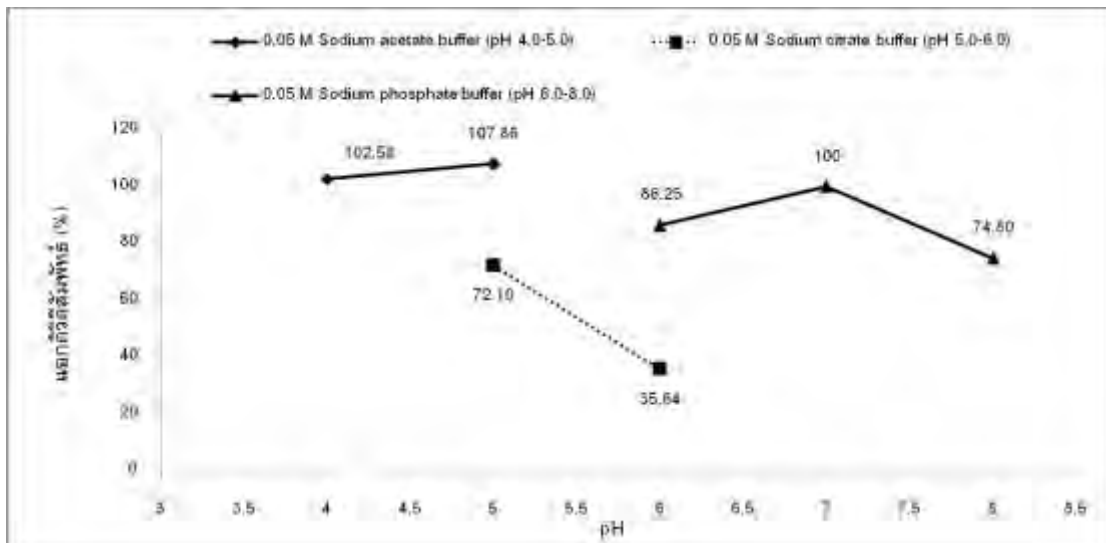
เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของ ไซแลเนส โดยการป้อน reaction mixture ที่อุณหภูมิ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส แล้วคำนวณแอกติวิตีสัมพัทธ์โดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของไซแลเนสที่วัดในภาวะปกติ (อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) พบว่า ไซแลเนส ทำงานได้ดีในช่วง 30-60 องศาเซลเซียส โดยมีแอกติวิตีสัมพัทธ์ในช่วง 95.22-111.94 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 44)



รูปที่ 44 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของไซแลเนส โดยการบ่ม reaction mixture ที่อุณหภูมิ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส แล้วคำนวณแอกติวิตีสัมพัทธ์โดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของไซแลเนสที่วัดในภาวะปกติ (อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 4.5.2.3 การศึกษาผลของความเป็นกรดต่างที่มีต่อความเสถียรของไซแลเนส

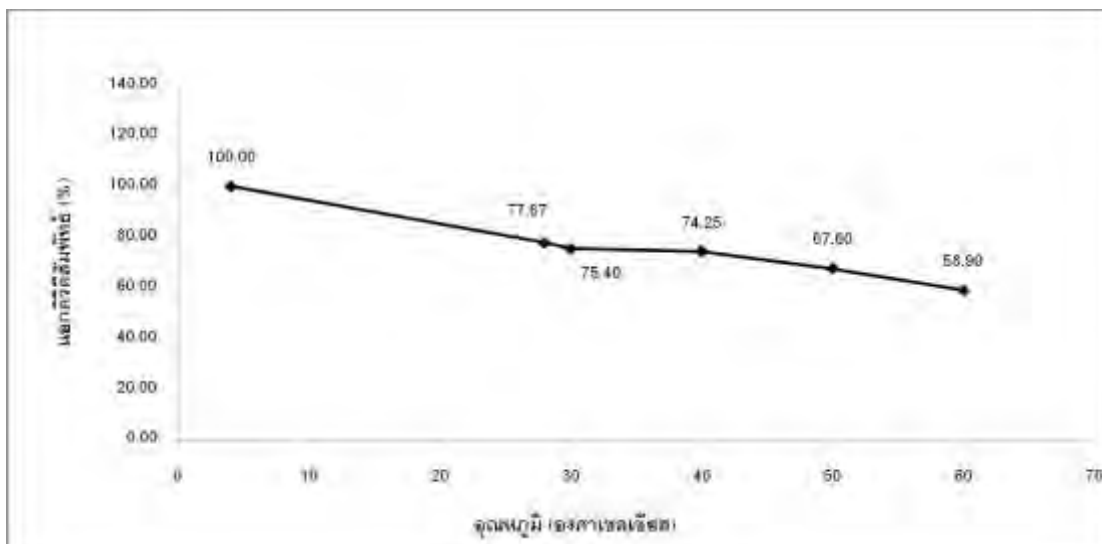
เมื่อศึกษาผลของความเป็นกรดต่าง ที่มีต่อความเสถียรของไซแลเนส โดยการบ่ม เอนไซม์ที่ pH 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ ในภาวะปกติเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่อยู่ใน 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า ไซแลเนส มีความเสถียรในช่วงความเป็นกรดต่าง 4.0-7.0 (ใน 50 mM Sodium acetate buffer และ 50 mM Sodium phosphate buffer) โดยมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่อยู่ในช่วง 86.25-107.86 เปอร์เซ็นต์ (สูงสุดที่ความเป็นกรดต่าง 5.0) โดยเมื่อเปลี่ยนความเป็นกรดต่างสูงขึ้นเป็น 8.0 แอกติวิตีสัมพัทธ์ของไซแลเนสลดลงเป็น 74.80 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้การบ่มเอนไซม์ใน 50 mM Sodium citrate buffer (pH 5.0 และ 6.0) ให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ต่ำกว่าการบ่มใน 50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.0) และ 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 6.0) โดยมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 72.10 และ 35.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 45)



รูปที่ 45 ผลของความเป็นกรดต่างที่มีต่อความเสถียรของ ไสแลเนส โดยการบ่มเอนไซม์ที่ pH 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ในภาวะปกติ คำนวณแอกติวิตีสัมพัทธ์ โดยเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์ที่อยู่ใน 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 4.5.2.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของไสแลเนส

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของไสแลเนส โดยการบ่มเอนไซม์ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 องศาเซลเซียส) 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ในภาวะปกติเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ เก็บ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า ไสแลเนส มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ความเสถียรของ ไสแลเนส จะลดลง โดยที่อุณหภูมิห้อง 30 40 และ 50 องศาเซลเซียส ไสแลเนส มีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์อยู่ที่ 77.67 75.40 74.25 และ 67.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และน้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ 58.90 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 46)



รูปที่ 46 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของ ไฮโดรเจนส โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าแอกติวิตีของ เอนไซม์ในภาวะปกติเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 4.6 การย่อยเฮมิเซลลูโลส และการผลิตเอทานอลด้วยการย่อยสลายและการหมักแบบแยกส่วน (separate hydrolysis and fermentation, SHF) กระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (simultaneous sacchrification and fermentation, SSF)

ทำการศึกษเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลชีวภาพจากวัชพืช 2 ชนิด คือ หญ้าคาและหญ้าแฝก

##### 4.6.1 การย่อยเฮมิเซลลูโลส

###### 4.6.1.1 การย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยกรด

นำวัชพืชทั้ง 2 ชนิด คือ หญ้าคาและหญ้าแฝก มา ย่อยเฮมิเซลลูโลส โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลดี-ไซโลส ดี-กลูโคส และ แอล-อะราบิโนส ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าการย่อยหญ้าคา ด้วยกรดเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ได้น้ำตาลดี-ไซโลส  $266.72 \pm 0.38$  และ  $406.62 \pm 3.54$  มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมวัชพืชเริ่มต้น ตามลำดับ ดี-กลูโคส  $8.81 \pm 0.18$  และ  $13.22 \pm 0.17$  มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมวัชพืชเริ่มต้น ตามลำดับ และแอล-อะราบิโนส  $323.54 \pm 16.30$  และ  $497.86 \pm 20.09$  มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมวัชพืชเริ่มต้น ตามลำดับ สำหรับการย่อยหญ้าแฝกด้วยกรดเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ได้น้ำตาลดี-ไซโลส  $303.08 \pm 0.80$  และ  $409.26 \pm 6.75$  มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมวัชพืชเริ่มต้น ตามลำดับ ดี-กลูโคส  $6.61 \pm 0.12$  และ  $18.30 \pm 0.73$  มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมวัชพืชเริ่มต้น ตามลำดับ และ

แอล-อะราบิโนส  $462.14 \pm 16.30$  และ  $549.79 \pm 17.50$  มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมวัชพืชเริ่มต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

#### 4.6.1.2 การย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

ทำการย่อยเฮมิเซลลูโลส โดยใช้เอนไซม์ไซแลเนส  $66.47$  มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลดี-ไซโลส ดี-กลูโคส และแอล-อะราบิโนส ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าการย่อยหญ้าคาด้วยเอนไซม์เป็นเวลา  $24$  และ  $48$  ชั่วโมง ได้น้ำตาลดี-ไซโลส  $64.10 \pm 0.13$  และ  $119.90 \pm 0.24$  มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมวัชพืชเริ่มต้น ตามลำดับ ดี-กลูโคส  $0.52 \pm 0.07$  และ  $2.85 \pm 2.43$  มิลลิกรัม น้ำตาลต่อกรัมวัชพืชเริ่มต้น ตามลำดับ และแอล-อะราบิโนส  $11.16 \pm 0.45$  และ  $74.43 \pm 3.46$  มิลลิกรัม น้ำตาลต่อกรัมวัชพืชเริ่มต้น ตามลำดับ และพบว่าการย่อยหญ้าแฝก ด้วยเอนไซม์เป็นเวลา  $24$  และ  $48$  ชั่วโมง ได้น้ำตาลดี-ไซโลส  $118.88 \pm 0.60$  และ  $151.96 \pm 0.03$  มิลลิกรัม น้ำตาลต่อกรัมวัชพืชเริ่มต้น ตามลำดับ แอล-อะราบิโนส  $73.02 \pm 0.24$  และ  $76.25 \pm 2.12$  มิลลิกรัม น้ำตาลต่อกรัมวัชพืชเริ่มต้น ตามลำดับ สำหรับน้ำตาลดี-กลูโคสไม่สามารถตรวจพบได้หลังจากย่อยเป็นเวลา  $24$  ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการย่อยเป็น  $48$  ชั่วโมง มีน้ำตาลดี-กลูโคส  $0.86 \pm 0.027$  มิลลิกรัม น้ำตาลต่อกรัมวัชพืชเริ่มต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

4.6.2 การผลิตเอทานอลด้วยการย่อยสลายและการหมักแบบแยกส่วน (separate hydrolysis and fermentation, SHF) กระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (simultaneous sacchrification and fermentation, SSF)

จากการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF (สำหรับวัชพืชที่ย่อยด้วยกรด) และ SSF (สำหรับวัชพืชที่ย่อยด้วยเอนไซม์) ที่อุณหภูมิ  $30$  องศาเซลเซียส โดยการใช้วัสดุหมักที่แตกต่างกันคือ หญ้าคาและหญ้าแฝก ร่วมกับ *P. tannophilus* สายพันธุ์ NRRL-Y2460 พบว่าได้ผลการหมักเอทานอลดังนี้

4.6.2.1 การผลิตเอทานอลด้วยการย่อยสลายด้วยกรดและการหมักแบบแยกส่วน (SHF)

เมื่อใช้หญ้าคาและหญ้าแฝกที่ผ่านการย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยกรดและทำการหมักแบบ SHF พบว่าการหมักหญ้าคาให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในวันที่  $7$  ที่  $8.50$  เปอร์เซ็นต์ (v/v) สำหรับการหมักหญ้าแฝกให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในวันที่  $7$  เช่นเดียวกันที่  $8.71$  เปอร์เซ็นต์ (v/v) (ตารางที่ 9)



4.6.2.2 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง ,  
SSF

เมื่อหมักหญ้าคาและหญ้าแฝกแบบSSF โดยเอนไซม์ไซแลเนสร่วมกับ  
*P. tannophilus* NRRL-Y2460 พบว่าการหมักหญ้าคาให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในวันที่ 7 ที่ 7.63  
เปอร์เซ็นต์ (v/v) สำหรับการหมักหญ้าแฝกให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในวันที่ 7 เช่นเดียวกันที่ 7.74  
เปอร์เซ็นต์ (v/v) (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 7 ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยหญ้าคาและหญ้าแฝกบดแห้งด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ชนิดของ หญ้า	ปริมาณน้ำตาลดี-ไซโลส (มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุเริ่มต้น)		ปริมาณน้ำตาลดี-กลูโคส (มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมวัสดุเริ่มต้น)		ปริมาณน้ำตาลแอล-อะราบิโนส (มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมวัสดุเริ่มต้น)	
	ระยะเวลา	ระยะเวลา	ระยะเวลา	ระยะเวลา	ระยะเวลา	ระยะเวลา
	ในการย่อย 24 ชม.	ในการย่อย 48 ชม.	ในการย่อย 24 ชม.	ในการย่อย 48 ชม.	ในการย่อย 24 ชม.	ในการย่อย 48 ชม.
หญ้าคา	80.02±0.11	121.98±1.06	2.64±0.05	3.97±0.05	97.06±0.83	149.36±6.03
หญ้าแฝก	90.92±1.50	122.78±2.02	1.98±0.04	5.49±0.22	138.64±4.89	164.94±5.25

ตารางที่ 8 ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยหญ้าคาและหญ้าแฝกบดแห้งด้วยเอนไซม์ไซแลเนส 66.47 มิลลิยูนิต

ชนิดของ หญ้า	ปริมาณน้ำตาลดี-ไซโลส (มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมวัสดุเริ่มต้น)		ปริมาณน้ำตาลดี-กลูโคส (มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมวัสดุเริ่มต้น)		ปริมาณน้ำตาลแอล-อะราบิโนส (มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมวัสดุเริ่มต้น)	
	ระยะเวลา	ระยะเวลา	ระยะเวลา	ระยะเวลา	ระยะเวลา	ระยะเวลา
	ในการย่อย 24 ชม.	ในการย่อย 48 ชม.	ในการย่อย 24 ชม.	ในการย่อย 48 ชม.	ในการย่อย 24 ชม.	ในการย่อย 48 ชม.
หญ้าคา	9.38±0.20	17.55±0.30	0.80±0.10	0.58±0.04	1.63±0.07	10.90±0.51
หญ้าแฝก	17.40±0.90	22.25±0.24	ไม่พบ	0.13±0.10	10.69±0.52	11.16±0.31

ตารางที่ 9 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบ SHF โดยใช้วัสดุหมักคือ หัว้าคาและหัว้าแฝกน้ำหนักแห้งเริ่มต้น 3 กรัม ที่ผ่านการย่อยเฮมิเซลลูโลส ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการปรับความเป็นกรดต่างด้วย 1 N NaOH ให้ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 .0 ก่อนนำมาหมักด้วย *P. tannophilus* NRRL-Y2460 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่ของการหมัก	ปริมาณเอทานอล (เปอร์เซ็นต์ (v/v))		ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อ100 มิลลิลิตร)		ปริมาณเอทานอล (กรัมเอทานอลต่อกรัมวัชพืช)	
	หัว้าคา	หัว้าแฝก	หัว้าคา	หัว้าแฝก	หัว้าคา	หัว้าแฝก
3	4.66±0.01	5.15±0.07	3.68±0.09	4.07±0.05	1.23±0.03	1.36±0.02
5	5.57±0.15	5.94±0.10	4.40±0.11	4.67±0.07	1.47±0.04	1.56±0.03
7	8.50±0.10	8.71±0.03	6.71±0.24	6.87±0.08	2.24±0.01	2.29±0.03

ตารางที่ 10 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักแบบ SSF โดยใช้วัสดุหมักคือ หัว้าคาและหัว้าแฝกน้ำหนักแห้งเริ่มต้น 3 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อใน 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์ไซแลเนส 66.47 มิลลิลิยูนิต ร่วมกับ *P. tannophilus* NRRL-Y2460 ในการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

วันที่ของการหมัก	ปริมาณเอทานอล (เปอร์เซ็นต์ (v/v))		ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)		ปริมาณเอทานอล (กรัมเอทานอลต่อกรัมวัชพืช)	
	หัว้าคา	หัว้าแฝก	หัว้าคา	หัว้าแฝก	หัว้าคา	หัว้าแฝก
3	3.52±0.02	4.04±0.14	2.78±0.07	3.66±0.11	0.93±0.02	1.22±0.04
5	4.76±0.10	5.51±0.10	4.35±0.80	3.75±0.07	1.45±0.03	1.25±0.03
7	7.63±0.02	7.74±0.09	6.02±0.02	6.11±0.69	2.01±0.01	2.04±0.02



## บทที่ 5

### การอภิปรายผลการวิจัย

#### 5.1 การคัดแยกและจำแนกชนิด *Aureobasidium pullulans*

##### 5.1.1 การคัดแยก *A. pullulans*

จากการสำรวจ เก็บตัวอย่าง และคัดแยก *A. pullulans* จากใบไม้ชนิดต่างๆ จำนวน 239 ตัวอย่าง สามารถแยก *A. pullulans* ได้เพียง 20 ไอโซเลต เนื่องจากใบไม้มีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่สามารถเจริญ อยู่ได้ อีกทั้งระยะเวลาระหว่างการ เก็บตัวอย่าง กับการแยกเชื้อบางครั้งกินเวลานาน จึงทำให้ใบไม้มีสภาพไม่สมบูรณ์ แห้งหรือเน่าไปได้ หรือเมื่อนำมาแยกแล้วได้จุลินทรีย์ได้แก่ เชื้อราเส้นใยสีเขียว เส้นใยสีเหลือง เส้นใยสีขาว และเส้น ใยสีดำ รวมถึงเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ชนิดอื่นๆ จึงทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการ คัดแยก *A. pullulans* ในบางตัวอย่าง ทั้งนี้ การคัดแยกใช้อาหารสูตร MEA แบบ half strength (Atlas, 1993) เพื่อลดปริมาณสารอาหารในอาหารคัดแยกเชื้อ และผสม Rose bengal 0.01 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพื่อทำให้เชื้อราชนิดอื่นเติบโต ช้าลง และเติม Chloramphenicol 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Leathers, 1984) เพื่อไม่ให้เชื้อแบคทีเรียเติบโตได้ ทำให้สามารถลดจำนวนเชื้อชนิดอื่นที่ไม่ต้องการให้ขึ้นบนอาหารที่ใช้คัดแยกจนมีจำนวนไม่มากเกินไปจนยากต่อการแยก *A. pullulans*

##### 5.1.2 การจำแนกชนิด *A. pullulans*

ในการจัดจำแนก *A. pullulans* โดยอาศัยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า *A. pullulans* มีรูปร่างได้หลายลักษณะ ได้แก่ บลาสโตสปอร์ เซลล์พอง คลาโมโดสปอร์ เส้นใย เส้นใยเทียม และรูปร่างแบบเส้นใยที่มีการเจริญ โดยการแตกแขนงแบบ branching หรือมีการสร้างโคนเดี่ยวตรงบริเวณด้านข้างและด้านปลายของเส้นใยเป็นต้น ซึ่งในการจัดจำแนก ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับลักษณะ ของ *A. pullulans* ที่ Hermanides-Nijhof (1977) ได้รายงานไว้ และจากการศึกษา ของ Romos and Acha, 1975) ที่อธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ของ *A. pullulans* ในระหว่างการเติบโต ว่ามีได้หลายแบบ โดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเลี้ยงและองค์ประกอบของอาหาร เช่น การแตกหน่อ จะพบเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไนเตรต หรือการเปลี่ยนแปลงลักษณะของบลาสโตสปอร์ เป็นเซลล์พองเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียม เป็นต้น นอกจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้ว ยังได้ทำการศึกษาลักษณะของโคโลนีและการสร้างเม็ดยีสต์ บนอาหาร สูตรต่างๆ ได้แก่ PDA PDB YMA YMB MEA และ YMXA ซึ่งมีรายงานว่าเมื่อทำการเลี้ยง *A. pullulans*

เป็นระยะเวลาเวลานานขึ้นสีของโคโลนีจะเข้มขึ้น กลายเป็นสีน้ำตาลหรือดำได้ (Hermandes-Nijhof, 1977; Domsch et al., 1993) ซึ่งจากผล การศึกษา สรุปได้ว่าราทั้ง 20 ไอโซเลตที่แยกได้เป็น *A. pullulans* ทั้งหมด

ในการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกชนิด *A. pullulans* นั้นค่อนข้างทำได้ยาก เนื่องจากเซลล์ของ *A. pullulans* มีหลายแบบดังกล่าวข้างต้น และเซลล์บางแบบมีความคล้ายคลึงกับยีสต์ชนิดอื่น โดยเฉพาะ *Trichosporon pullulans* *Hormonema* spp. และ *Aureobasidium* ชนิดอื่น ๆ ซึ่งโดยทั่วไปมักมี ลักษณะโคโลนี ในระยะแรก ของการเลี้ยงเป็นสีครีม มหรือชมพู และเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นเมื่อเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น เนื่องจากสามารถสร้างคลาไมโดสปอร์ และสามารถสร้างเอนโดโคนิเดียได้เช่นเดียวกัน (De Hoog and Yurlova, 1994) หรือในกรณี *T. pullulans* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีเซลล์รูปร่างหลายแบบ เช่น เส้นใย บลาสโตสปอร์ โคนิเดีย เป็นต้น แม้ว่าโคโลนีของ *T. pullulans* จะมีสีครีมหรือชมพูตั้งแต่ในระยะแรกของการเลี้ยง แต่ตลอดการเลี้ยงจะไม่เปลี่ยนสี (Dennis and Buhagiar, 1973) แต่ก็มี *A. pullulans* บางสายพันธุ์ที่ไม่ สามารถ ผลิตเม็ดสีเมลานิน ที่มีสีเข้ม เช่นกัน ดังนั้นการจำแนก *A. pullulans* ต้องอาศัยวิธีอื่นมาประกอบ นอกเหนือจากวิธีสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น การใช้แหล่งอาหารต่างๆกัน (Substrate utilization) ภาวะการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ (De Hoog และ Yurlova, 1994) และการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS (Manitchotpsit et al., 2009) เป็นต้น

สำหรับการศึกษา *A. pullulans* ในประเทศไทย พบว่าสามารถแยกได้จาก ทั้งในอากาศ (airborne) (Punnapayak et al., 2003) ผนังห้องน้ำ ผนังที่ทาสี (Prasongsuk et al., 2005; Lotrakul et al., 2009) และบนผิวใบไม้ (Prasongsuk et al., 2005; Manitchotpsit et al., 2009) และจากรายงาน พบว่าปัจจุบัน มีผู้คัดแยก *A. pullulans* ในประเทศไทยได้ทั้งสิ้นอย่างน้อย 65 ไอโซเลต ซึ่งในการศึกษานี้ พบว่าใบพืชบางชนิดที่แยก *A. pullulans* ได้ เป็นชนิดเดียวกับที่ Prasongsuk และคณะ (2005) และ Manitchotpsit และคณะ (2009) ได้รายงานไว้ คือ ใบมะขาม ใบพิกุล และใบไทร ในขณะที่ ใบหูกวาง ใบโมก ใบปลาหมึกยักษ์ ใบ เล็บครุฑ ใบแก้ว ใบชงโค ใบเข็ม ใบแค ใบมะละกอ ใบอินทนิล ใบกระถินณรงค์ และใบกันเกรา นับเป็นชนิดที่มีการรายงานเป็นครั้งแรกในประเทศไทยว่าสามารถแยก *A. pullulans* ได้ อย่างไรก็ตาม มีพืชบางชนิดที่มี รายงานว่าสามารถคัดแยก *A. pullulans* ได้แต่ในการศึกษานี้ไม่ประสบความสำเร็จในการแยก เช่น ใบเฟื่องฟ้า ใบมะม่วง ใบชมพู ใบมังคุด ใบจามจุรี และใบต้นตีนเป็ด เป็นต้น สำหรับการสร้าง เม็ดสี พบว่ามี 5 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างเม็ดสีที่ไม่เป็นสีเขียวคล้ำ น้ำตาล หรือ ดำ ได้ เมื่อเลี้ยง บนอาหารสูตร PDA เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน โดยจัดเป็น color variant ได้แก่ ไอโซเลต No.107 สร้างเม็ดสีชมพู No.109B สร้างเม็ดสีม่วง No.109P สร้างเม็ดสีชมพู No.114 สร้างเม็ดสีส้ม และ No.150O สร้างเม็ดสีส้ม โดย color variant ของ *A. pullulans* คือ สายพันธุ์ที่สามารถ สร้างเม็ดสี

ชนิดอื่นๆ ที่ไม่ สร้างเม็ด สีดำ ซึ่งจากรายงาน ว่าสามารถคัดแยกได้จากเขตร้อน นอกจากนี้ Leathers (1984) ได้รายงาน ว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ที่เป็น color variant จะสามารถผลิต ไชแลเนสได้ในปริมาณมาก ทั้งนี้ในการศึกษานี้ พบว่า มี 7 ไอโซเลตที่สามารถสร้างวงสี (color ring) โดยวงสีที่พบจะเกิดเมื่อ *A. pullulans* เติบโตในภาวะที่ได้รับแสงสลบกับภาวะที่ไม่ได้รับแสง ซึ่ง ลักษณะของโคโลนี จะมีวงสีเข้มสลบกับวงสีที่อ่อน ได้แก่ No.1 No.15 No.16 No.83 No.102 No.109B และ No.109P ทั้งนี้การสร้าง color ring ของ *A. pullulans* ถูกรายงานเป็นครั้งแรกในสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากประเทศไทยเช่นกัน (Manitchotpisit et al., 2009) นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะของ *A. pullulans* ทั้ง 20 ไอโซเลต นี้กับ *A. pullulans* ใน Clade ต่างๆ ที่ รายงานไว้โดย Manitchotpisit และคณะ (2009) พบว่ามีจำนวน 13 ไอโซเลต ที่มีความคล้ายคลึง โดย สามารถจัดอยู่ใน Clade ต่างๆ ได้ดังนี้ Clade 1 จำนวน 5 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต No.1 No.92 No.102 No.107 และ No.149 Clade 5 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต No.55 Clade 6 จำนวน 1 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต No.63 Clade 9 จำนวน 2 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต No.1 No.2 Clade 10 จำนวน 2 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต No.109B No. 109P Clade 11 จำนวน 2 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต No.16 No.27 และมี 7 ไอโซเลตที่มีลักษณะที่ไม่คล้ายคลึงกับ *A. pullulans* ใน ทั้ง 12 Clade ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรม ของ *A. pullulans* จากเขตร้อน อาจมีมากกว่าที่เคยมีรายงานไว้

## 5.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไชแลเนส

### 5.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างไชแลเนสโดยวิธี plate screening

จากการตรวจสอบความสามารถในการสร้างไชแลเนสโดยเลี้ยง *A. pullulans* บนอาหาร สูตร YMXA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ตามวิธีของ Christov และ Prior (1994) แล้วสังเกต การสร้างไชแลเนส จากการเกิด วงใสรอบๆ โคโลนี ซึ่งเกิด จากการย่อยผงไชแลเนสในอาหารโดย ไชแลเนส ผลพบว่าทุกไอโซเลตสามารถสร้างวงใสได้ ซึ่งแสดงถึงไชแลเนสแอกติวิตี โดยไอโซเลต ที่พบวงใสกว้างที่สุดคือ ไอโซเลต No.109B มีค่าอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ  $3.00 \pm 0.05$  การตรวจสอบความสามารถในการสร้างไชแลเนส โดยวิธี plate screening นี้เป็นเพียงการตรวจสอบเบื้องต้นเชิงคุณภาพ (qualitative preliminary test) ดังนั้นเพื่อให้ทราบปริมาณไชแลเนสที่ *A. pullulans* สามารถผลิตได้จริง จึงต้องมีการวัดไชแลเนส แอกติวิตีเชิงปริมาณในขั้นต่อไป



### 5.2.2 การวัดไซแลเนสแอกติวิตีเชิงปริมาณ

โดยทั่วไป *A. pullulans* มีความสามารถในการผลิตไซแลเนสได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และภาวะของการเลี้ยง โดย Leathers (1984) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากเขตร้อน จำนวน 13 สายพันธุ์ พบว่า มีการผลิตไซแลเนสอยู่ในช่วง 2.59-373.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Myburgh และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาถึงความสามารถของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL Y 2311-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เขตร้อนเช่นกัน แต่ได้ทำการเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างจาก Leathers (1984) พบว่ามีการผลิตไซแลเนสอยู่ในช่วง 15.00-82.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ Manitchotpisit และคณะ (2009) รายงานว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากประเทศไทย และเขตอบอุ่นจำนวน 49 สายพันธุ์ สามารถผลิตไซแลเนสอยู่ในช่วง 7.70-94.30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สำหรับ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า *A. pullulans* ทั้ง 20 ไอโซเลตที่คัดแยกได้ ให้ผลการผลิตไซแลเนสต่ำกว่าที่เคยมีรายงานคือ อยู่ในช่วง 15.83-165.83 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

### 5.2.3 การคัดเลือก *A. pullulans* ที่ผลิตไซแลเนสที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง

ในการใช้เอนไซม์ไซแลเนสทางอุตสาหกรรม อาจมีบางกระบวนการที่ก่อให้เกิดอุณหภูมิสูง ซึ่งหากสามารถคัดเลือกเอนไซม์ที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง ก็น่าจะเป็นประโยชน์ เนื่องจากจะสามารถใช้เอนไซม์ ในการกระตุ้นปฏิกิริยานานขึ้น ได้ จากการตรวจหา *A. pullulans* ที่ผลิตไซแลเนสที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง พบว่า ไอโซเลต No.1 No.15 No.27 No.55 No.59 และ No.102 สามารถผลิตไซแลเนสที่มีความเสถียรที่ 60 องศาเซลเซียส โดยมีแอกติวิตีสัมพัทธ์ สูงกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ไอโซเลตเหล่านี้มีความสามารถในการผลิตไซแลเนสค่อนข้างต่ำ โดยสร้าง เอนไซม์ได้น้อยกว่า 100 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร จึงไม่เลือก ไอโซเลตเหล่านี้มาทำการศึกษาในขั้นต่อไป ส่วนไอโซเลต No.109B สามารถสร้างไซแลเนสได้มากที่สุด ใน 20 ไอโซเลต และ ค่อนข้างเสถียรที่อุณหภูมิสูง โดยมีแอกติวิตีสัมพัทธ์มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงได้เลือกไอโซเลตนี้สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

### 5.2.4 การตรวจสอบการสร้าง EPS

Manitchotpisit และคณะ (2009) จัด *A. pullulans* ตามความสามารถในการสร้าง EPS ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้าง EPS ได้น้อยกว่า 10 กรัมต่อลิตร กลุ่มที่สร้าง EPS ได้ในช่วง 10-20 กรัมต่อลิตร และกลุ่มที่สร้าง EPS ได้มากกว่า 10 กรัมต่อลิตร สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า *A. pullulans* 19 ไอโซเลตจัดอยู่ในกลุ่มที่สามารถสร้าง EPS ได้น้อยกว่า 10 กรัมต่อลิตร มีเพียง

ไอโซเลต No.83 ที่สามารถสร้าง EPS ได้ 10.85 กรัมต่อลิตร จึงจัดอยู่ในกลุ่มที่สามารถสร้าง EPS ได้ในระดับปานกลาง ซึ่งคล้ายคลึงกับรายงานของ Prasongsuk และคณะ (2005) ที่พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทยมีความสามารถในการผลิต EPS ค่อนข้างน้อยเช่นกัน โดยอยู่ในช่วง 3.7-7.9 กรัมต่อลิตร และ Leathers (1988) พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ Y-17,001 สามารถผลิต EPS ได้สูงสุดที่ 8.4 กรัมต่อลิตร และสายพันธุ์อื่นๆ อยู่ในช่วง 3.9-7.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งการตรวจสอบการสร้าง EPS ในการศึกษารั้งนี้ เพื่อต้องการศึกษาเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับผู้สนใจจะนำ *A. pullulans* ทั้ง 20 ไอโซเลตที่ได้ขึ้นไปศึกษาต่อถึงคุณสมบัติของ EPS หรือทำการผลิต EPS และนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

### 5.3 การศึกษาการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของ *A. pullulans*

จากการศึกษาการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของ *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B พบว่าให้แอกติวิตีสูงสุดที่  $439.98 \pm 14.33$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และให้จำนวนเซลล์มากที่สุด  $3.27 \times 10^7$  เซลล์ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ซึ่งการผลิตไซแลเนสได้มากที่สุดนั้นอยู่ในระหว่างการเติบโตในช่วง early log phase หรือใน 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งผลที่ได้ต่างจากรายงานของ Karni และคณะ (1993) ที่ระบุว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NCIM 1050 จากประเทศอินเดีย สามารถผลิตไซแลเนส ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ในระยะการเติบโตช่วง stationary phase โดยให้แอกติวิตีสูงสุดที่ 31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และให้จำนวนเซลล์มากที่สุด  $10 \times 10^7$  เซลล์ แต่อย่างไรก็ดี Karni และคณะ ทำการเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ NCIM 1050 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสที่แตกต่างจากการศึกษานี้ นอกเหนือจากสายพันธุ์ที่ต่างกัน ทั้งนี้การศึกษการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของ *A. pullulans* มีผู้ศึกษาไม่มากนัก จึงทำให้การเปรียบเทียบปัจจัยที่อาจมีผลกระทบทำได้ยาก นอกจากนี้ผู้ศึกษาส่วนใหญ่มักทำการเก็บเอนไซม์ไซแลเนสในวันที่ 3 ของการเลี้ยง ตามวิธีของ Leathers (1984,1986) ซึ่งจากการศึกษา นี้พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมของการเก็บไซแลเนสที่ได้จาก *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B จะอยู่ที่ 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าควรได้มีการศึกษาระยะเวลาของการผลิต ไซแลเนส ของ *A. pullulans* แต่ละสายพันธุ์โดยเฉพาะสายพันธุ์จากเขตร้อนเช่นประเทศไทย เนื่องจากอาจมีช่วงเวลาของการผลิตที่แตกต่างจากสายพันธุ์จากเขตอบอุ่น เพื่อให้สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ในปริมาณมากที่สุด

## 5.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส

### 5.4.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และการผลิตเอนไซม์ เพราะเป็น primary metabolite ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ เนื่องจากเชื้อราจำเป็นต้องผลิตเอนไซม์ออกมาเพื่อย่อยสลายสารตั้งต้นที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เล็กลง ซึ่งจะดูดซึมเข้าในเซลล์ได้ เพื่อให้ได้มาซึ่งพลังงานในการเจริญเติบโต ดังนั้นถ้าหากต้องการเอนไซม์ชนิดใดก็ต่อเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยเฉพาะกับเอนไซม์ที่เป็น inducible enzymes ซึ่งการผลิตเอนไซม์กลุ่มนี้จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์มีความจำเป็นต้องใช้หรือถูกเหนี่ยวนำให้ผลิตเท่านั้น เช่น ในการผลิตเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสก็ต้องการเลี้ยงราในอาหารที่มีเฮมิเซลลูโลส ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ไอโซเลต No.109B ให้ไซแลเนสแอกติวิตีสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $439.98 \pm 9.66$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เนื่องจากไซแลนบริสุทธิ์มีราคาแพง ดังนั้นจึงได้เลือกวัสดุทางการเกษตรที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไซแลเนสแทนไซแลน ซึ่งมีรายงานว่าสามารถนำ รำข้าว กากชานอ้อย เปลือกถั่วลิสง ใช้เป็นสารในการผลิตไซแลเนสได้ (เนริสา คุณประทุม , 2543) โดยในการทดลองนี้ได้เลือกวัสดุทางการเกษตร 3 ชนิดคือ ช้างข้าวโพด รำข้าว และจมูกข้าว โดยพบว่าสามารถกระตุ้นให้ *A. pullulans* No.109B ผลิตไซแลเนสได้ โดยมีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $410.62 \pm 37.63$   $164.85 \pm 27.19$  และ  $86.73 \pm 30.39$  มิลลียูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แม้ว่าไซแลเนสที่ได้จากการเลี้ยง *A. pullulans* No.109B ในอาหารที่มีช้างข้าวโพดจะมีปริมาณต่ำกว่าในอาหารที่มีไซแลนเล็กน้อย แต่เนื่องจากช้างข้าวโพดมีราคาต่ำกว่าไซแลนมากจึงได้เลือกที่จะใช้ช้างข้าวโพดในการการศึกษานี้ต่อไป

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุทางการเกษตรที่เลือกมาศึกษา พบว่าช้างข้าวโพดมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสสูงที่สุดคือ 36.49 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ รำข้าว 35.54 เปอร์เซ็นต์ และจมูกข้าวสาลี 28.40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ทั้งนี้มีรายงานว่า การนำช้างข้าวโพดมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไซแลเนสจากรา *Thermomyces lanuginosus* พบว่าได้แอกติวิตีของไซแลเนสสูงกว่าการใช้เศษวัสดุทางการเกษตรชนิดอื่นๆ ถึง 1.43 เท่า (Hayn et al., 1993)

### 5.4.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อการเติบโต เช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน โดยมีผลต่อกระบวนการต่างๆ มากมาย เช่น การสร้างโปรตีน ซึ่งรวมถึงการผลิตเอนไซม์ จากการศึกษาพบว่า *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้ทุกชนิดไม่ว่าจะเป็น สารอินทรีย์

(แอล-แอสพาราจีนโมโนไฮเดรตและเปปโตน) หรือสารอนินทรีย์ (โซเดียมไนเตรตและแอมโมเนียมซัลเฟต) โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีไนโตรเจนอินทรีย์ได้เร็วกว่าอาหารที่มีไนโตรเจนอนินทรีย์ (สมใจ ศิริโชค, 2547) และพบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น แอล-แอสพาราจีนโมโนไฮเดรตและเปปโตน สามารถกระตุ้นให้ *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ผลิต ไชแลเนสได้ในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อใช้แหล่งโปรตีนอนินทรีย์ โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $439.98 \pm 9.66$  และ  $417.09 \pm 40.31$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ แอล-แอสพาราจีนโมโนไฮเดรตและเปปโตน มีไนโตรเจนอินทรีย์ที่อยู่ในรูปที่สามารถนำไปใช้ได้ทันทีโดยไม่ต้องสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ ดังนั้นจึงได้เลือกอาหารสูตรที่มีซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและแอล-แอสพาราจีนโมโนไฮเดรตที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งให้ผลผลิตไชแลเนสสูงที่สุด สำหรับการศึกษาระดับต่อไป

#### 5.4.3 อุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไชแลเนส โดยเลี้ยง *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ในอาหารสูตร XPM ที่มีซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและแอล-แอสพาราจีนโมโนไฮเดรตที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที พบว่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไอโซเลต *A. pullulans* No.109B สามารถผลิต ไชแลเนสได้สูงที่สุดที่  $533.04 \pm 15.35$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลที่คล้ายคลึงกับการศึกษาที่พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเม็ดสีชนิดอื่นที่ไม่สร้างเม็ดสีดำ (color variant) ได้จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Wickerham and Kurtzman, 1975) ซึ่ง *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเม็ดสีได้เช่นกัน โดยเมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน 3 วัน สีของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อน แต่จากหลายงานวิจัยพบว่า *A. pullulans* สามารถเติบโตและผลิตไชแลเนสได้ดี ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส (Christov and Prior, 1993; Li et al., 1993; Ohta et al., 2001; Ohta et al., 2010) ซึ่งผลของอุณหภูมิต่อการใช้ในการเติบโตและผลิตไชแลเนส *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B จะแตกต่างจาก งานวิจัยเหล่านี้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B นี้คัดแยกได้จากเขตร้อน จึงสามารถเติบโตและสร้างเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิที่สูงกว่าสายพันธุ์ที่มีการศึกษาในเขตอบอุ่นเล็กน้อย

#### 5.4.4 ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหาร

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารที่มีผลต่อการผลิตไชแลเนส พบว่า *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ให้ไชแลเนสแอกติวิตีสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเป็นกรด -

ต่างเริ่มต้น 6.0 โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $559.75 \pm 23.14$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และไซแลเนสจะผลิตได้น้อยลงเมื่อมีความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารสูงขึ้นหรือลดลงกว่านี้ ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกับการศึกษาที่พบว่า *A. pullulans* สามารถผลิตไซแลเนสได้ดีที่ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหาร ในช่วง 5.0-6.0 และเมื่อความเป็นกรดต่างของอาหารเริ่มต้นเพิ่มขึ้นหรือลดลงมากกว่านี้จะมีผลทำให้ *A. pullulans* สามารถผลิตไซแลเนสได้ลดลงเช่นกัน (Li et al., 1993; Ohta et al., 2001; Ohta et al., 2010)

## 5. การเตรียมเอนไซม์ไซแลเนสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ

### 5.1 การเตรียมเอนไซม์ไซแลเนส

#### 5.1.1 การทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน

จากการทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน โดยเลือกใช้ membrane cut off ที่ 10,000 Da นั้น เนื่องจากมีรายงานการศึกษาว่าไซแลเนส จาก *A. pullulans* นั้นมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 20,000-21,000 Da (Leathers, 1984) ดังนั้นจึงคาดว่าไซแลเนสจะไม่สามารถกรองผ่านเมมเบรนได้เนื่องจากมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของรูพรุนของเมมเบรน ซึ่งจากการศึกษาที่พบว่า แอกติวิตีของไซแลเนสมีมากอยู่ในส่วนที่กรองไม่ผ่านเมมเบรน ตรงตามที่คาดไว้โดยมีแอกติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 1,186,614.50 มิลลิยูนิตและแอกติวิตีจำเพาะ 26.62 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยวิธีการนี้สามารถทำให้ไซแลเนสมีความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 1.86 เท่า และยังพบว่าในส่วนที่ผ่านเมมเบรนนั้นมีแอกติวิตีของไซแลเนสเล็กน้อยอาจเนื่องมาจาก ในขั้นตอนการทำอัลตราฟิลเตรชัน มีการเพิ่มความดัน จึงอาจเป็นผลทำให้ไซแลเนสหลุดผ่านรูพรุนของเมมเบรนได้ หรืออาจเป็นไปได้ว่าไซแลเนสเกิดการย่อยของโปรตีนจึงทำให้มีขนาดเล็กลง จนมีขนาดมวลโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 Da ทำให้กรองผ่านเมมเบรนได้

#### 5.1.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นวิธีที่อาศัยคุณสมบัติของการละลายโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นประจุ (ionic strength) โดยความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นจะทำให้ความเข้มข้นของประจุมากขึ้นด้วย การละลายของโปรตีนจึงลดลง เพราะไอออนจะไปจับกับน้ำได้ดีกว่า ทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอนลงมา (เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์, 2544) จากการตกตะกอนไซแลเนสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า ไซแลเนส ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 60-80 เปอร์เซ็นต์ โดยมีแอกติวิตีและแอกติวิตีจำเพาะของ ไซแลเนส ที่ 10,483.53 มิลลิยูนิต และ 30.25 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

## 5.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของไซแลเนส

### 5.2.1 การศึกษาผลของความเป็นกรดต่างที่มีต่อการทำงานของไซแลเนส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดต่างที่มีต่อการทำงานของไซแลเนส พบว่าไซแลเนสสามารถทำงานได้ดีที่สุด ที่ความเป็นกรดต่าง 7.0 ใน (50 mM Sodium phosphate buffer) โดยมีแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปลี่ยนความเป็นกรดต่างเป็นช่วง 4.0-6.0 ทำให้การทำงานของไซแลเนสลดลง โดยทั่วไปแล้วไซแลเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* จะมีความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 3.0-7.0 เช่น *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 สามารถทำงานได้ดีที่ ความเป็นกรดต่าง 3.0-4.5 (Myburgh et al., 1991; Leathers, 1984; Li et al., 1993) แต่ยังมีการศึกษาพบว่า *A. pullulans* ใน var. *melanigenum* สามารถผลิตไซแลเนสที่ทำงานได้ดีที่ความเป็นกรดต่าง 2.0 ซึ่งจัดว่าเป็น acidophilic xylanase (Ohta et al., 2001)

### 5.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของไซแลเนส

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของไซแลเนส พบว่าไซแลเนสทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส โดยมีแอกติวิตีสัมพัทธ์ สูงสุดที่ 111.94 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไซแลเนส นั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของรา โดยทั่วไป อุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการทำงานของไซแลเนส จะอยู่ในช่วง 30-60 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน (Myburgh et al., 1991) มีรายงานว่าไซแลเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL Y 2311-1 และ *A. pullulans* สายพันธุ์ CBS 58475 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน ที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งจัดว่าเป็น thermophilic enzyme (Myburgh et al., 1991; Leathers, 1984; Dobberstein and Emeis, 1989) ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษานี้

### 5.2.3 การศึกษาผลของ pH ที่มีต่อความเสถียรของไซแลเนส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดต่างที่มีต่อความเสถียรของไซแลเนส พบว่าไซแลเนสจาก *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B จะมีความเสถียรในช่วงความเป็นกรดต่าง 4.0-7.0 (ใน 50 mM Sodium acetate buffer และ 50 mM Sodium phosphate buffer) หลังจากบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ อยู่ในช่วง 86.25-107.86 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้รายงานส่วนใหญ่ระบุว่าไซแลเนสจาก *A. pullulans* จะเสถียรในภาวะที่ค่อนข้าง เป็นกรด เช่น *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL Y 2311-1 มีความเสถียรอยู่ในช่วงความเป็นกรดต่าง 4.0-4.8 (Leathers, 1984; Li et al., 1993) ในขณะที่ไซแลเนสที่ผลิตได้จากราโดยทั่วไป จะมีความเสถียรในช่วงความเป็นกรดต่าง 4.5-5.0 เช่น *T. reesei* จะมีความเสถียรที่ความเป็น กรดต่าง 4.5 และ *T. harzianum* จะมีความเสถียรที่ความเป็นกรดต่าง 5.0 (Myburgh et al., 1991) ดังนั้นไซแลเนสที่ผลิตได้ จาก

*A. pullulans* No. 109B จึงจัดว่ามีความเสถียรในช่วงความเป็นกรดต่างที่กว้างกว่า ไสแลเนสของราโดยทั่วไป แต่ทั้งนี้ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลอย่างมาก ต่อความเสถียรของไซแลเนส โดยในการศึกษานี้พบว่าที่ความเป็นกรดต่างเดียวกัน เมื่อเปลี่ยนบัฟเฟอร์จาก 50 mM Sodium acetate buffer หรือ 50 mM Sodium phosphate buffer มาเป็น 50 mM Sodium citrate buffer ไสแลเนสจะสูญเสียความเสถียรไป โดยสังเกตได้จากแอกติวิตีที่ลดลง

#### 5.2.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของไซแลเนส

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของ ไสแลเนส พบว่าไซแลเนส มีความเสถียรพอสมควรที่อุณหภูมิห้องหรือประมาณ 28 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าแอกติวิตีจะลดลงเล็กน้อยหลังทำการบ่มไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา นานาน 1 ชั่วโมง โดยทั่วไป เอนไซม์ไซแลเนส ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* จะมีความเสถียร ในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามผลที่ได้ในการศึกษานี้ คล้ายคลึง กับการศึกษาไซแลเนส จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL Y 2311-1 ที่พบว่ามีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแอกติวิตีจะลดลง เมื่อทำการบ่มไว้เป็นเวลานานกว่า 3 ชั่วโมง และ ความเสถียรของเอนไซม์จะยิ่งลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Myburgh et al., 1991) สำหรับไซแลเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 20524 พบว่ามีความเสถียรที่อุณหภูมิห้องถึงอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และแอกติวิตีจะลดลงเมื่อทำการบ่มไว้เป็นเวลานานกว่า 3 ชั่วโมงเช่นกัน แต่ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีแอกติวิตีเหลือเลย

#### 5.6 การย่อยเฮมิเซลลูโลส และการผลิตเอทานอลด้วย การย่อยสลายและการหมักแบบแยกส่วน (separate hydrolysis and fermentation, SHF) และกระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (simultaneous sacchrification and fermentation, SSF)

มีรายงานว่า โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสในหญ้านั้นจะประกอบด้วยอะราบิโนไซแลน เป็นองค์ประกอบหลัก โดย อะราบิโนไซแลน นั้นประกอบด้วย น้ำตาลแอล-อะราบิโนส ดี-ไซโลส และ ดี-กลูโคส (Eriksson, 1990) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยวัชพืชในการศึกษานี้ คือ น้ำตาลแอล-อะราบิโนส ดี-ไซโลส และดี-กลูโคส ตามลำดับ โดยการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสด้วยกรดและเอนไซม์ จะเกิดปฏิกิริยาการตัดสายกิ่งของเฮมิเซลลูโลสที่หมู่อะราบิโนสก่อน ทำให้ได้น้ำตาลแอล-อะราบิโนส และเอนไซม์ไซแลเนส จะทำหน้าที่เข้าไป การสลายพันธะ บีตา-1, 4-ไซโลซิ ดิกในสายหลักของไซแลน แบบสุ่ม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่า กลไกแบบเอนโด (endo-mechanism) ผลของการย่อยจะได้ดี-ไซโลสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Gilbert et al., 1993) และจาก การศึกษาพบว่า ปริมาณน้ำตาลที่ได้ จากการย่อย

เฮมิเซลลูโลสกรดซัลฟูริกให้ปริมาณน้ำตาลมากกว่าการ ย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วย เอนไซม์ไซแลเนส เนื่องจากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสด้วยกรดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรุนแรง และไม่ จำเพาะทำให้ ได้ผลผลิตในปริมาณมาก แต่ผลผลิตที่ได้จะไม่บริสุทธิ์ ส่วนการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสด้วย เอนไซม์ไซแลเนส นั้นจะให้ปริมาณน้ำตาลที่น้อย เนื่องจาก ชั้นของ เฮมิเซลลูโลส อยู่ระหว่าง เซลลูโลสและลิกนิน ดังนั้น ทำให้เอนไซม์ไซแลเนส เข้าไปทำการกระตุ้นปฏิกิริยา ได้ยาก อีกทั้ง โครงสร้างของไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของเฮมิเซลลูโลสนั้นมีสายกิ่งหลายแบบ จึงทำให้การย่อยไซแลนอย่างสมบูรณ์จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน หลายชนิด ร่วม ด้วยเช่น แอลฟา-แอล-อะราบิโนซิเดส แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส อะซิทิล (ไซแลน) เอสเทอเรส และเพอริโลอิด เอสเทอเรส เป็นต้น (Chavez et al., 2001)

กระบวนการในการผลิตเอทานอลสามารถทำได้หลายวิธีเช่น การย่อยสลายและการหมัก แบบแยกส่วน (SHF) และกระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (SSF) โดยการย่อยสลาย และการหมักแบบแยกส่วนนั้น เป็นกระบวนการที่มีการแยกขั้นตอนระหว่างการย่อยสลายสารตั้ง - ต้นด้วย กรดหรือ เอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาลก่อน แล้วจึงนำไป สู่กระบวนการ หมักต่อเพื่อให้ได้ เอทานอล แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ ปริมาณน้ำตาล ที่ได้อาจมีมากเกินไปจนมีผลยับยั้งการเติบโตของ จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ทำให้ได้ผลผลิตของเอทานอลลดลง และหากต้องใช้เอนไซม์ในการย่อย สลายการหมักแบบแยกส่วนต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมากเพื่อที่จะให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูง อีกทั้งในขั้นตอนการนำน้ำตาลไปใช้ในกระบวนการหมัก มักจะเกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ ส่วนกระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง นั้น จะเป็นกระบวนการที่รวมเอาการย่อย สลายสารตั้งต้นและการหมักไว้ในขั้นตอนเดียวกัน ซึ่งน้ำตาลที่เกิดขึ้นในระบบจะถูกนำไปใช้ เป็น สารตั้งต้น ในการหมักโดยจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่อง ซึ่งถือเป็น ข้อดีของกระบวนการหมักแบบนี้ เนื่องจาก เอนไซม์จะย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลแล จุลินทรีย์ก็จะสามารถใช้ น้ำตาลไป เรื่อยๆ จนไม่เกิดการสะสมของน้ำตาลในปริมาณสูง ที่จะทำให้เป็นอันตรายต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ รวมทั้งวิธีนี้การย่อยสลายสารตั้งต้นและการหมักนั้นเกิดขึ้นในขั้นตอนเดียวกัน ทำให้ช่วยลดปัญหา การปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย (เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์ , 2544; ھرรษา ปุณณะพยัคฆ์ , 2552)

สำหรับ การหมักเอทานอลแบบ SHF พบว่าการหมักหญ้าคาและหญ้าแฝกให้ ปริมาณ เอทานอลสูงสุดในวันที่ 7 ที่  $2.24 \pm 0.01$  และ  $2.29 \pm 0.03$  กรัมเอทานอล ต่อกรัมวัชพืช ตามลำดับ และการหมักหญ้าคาและหญ้าแฝกแบบ SSF โดยใช้เอนไซม์ไซแลเนสร่วมกับ *P. tannophilus* NRRL-Y2460 พบว่าการหมักหญ้าคาและหญ้าแฝกให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในวันที่ 7 ที่  $2.01 \pm 0.01$  และ  $2.04 \pm 0.02$  กรัมเอทานอล ต่อกรัมวัชพืช ตามลำดับ มีการศึกษาพบว่า *P. tannophilus* สามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลดี- ไชโลส ได้ 0.366 กรัมเอทานอลต่อกรัม



น้ำตาลดี-ไซโลส ในวันที่ 3 ของการหมักเอทานอล ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Schneider et al., 1983) และยังมีการศึกษาถึงความสามารถในการผลิตเอทานอล *P. tannophilus* สายพันธุ์ RL-171 พบว่าสามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลดี-ไซโลส โดยให้ปริมาณเอทานอล 0.3 กรัมเอทานอล ต่อกรัมน้ำตาลดี-ไซโลส ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส (Dekke, 1983) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่พบว่า *P. tannophilus* สามารถผลิตเอทานอลจากวัสดุหมักหญ้าคาและหญ้าแฝกที่ผ่านการย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยกรด โดยให้ปริมาณเอทานอล  $1.23 \pm 0.03$  และ  $1.36 \pm 0.02$  กรัมเอทานอล ต่อกรัมวัสดุ ตามลำดับ และสามารถผลิตเอทานอลจากวัสดุหมักหญ้าคาและหญ้าแฝกที่ผ่านการย่อย เฮมิเซลลูโลสด้วย เอนไซม์ไซแลเนส โดยให้ปริมาณเอทานอล  $0.93 \pm 0.02$  และ  $1.22 \pm 0.04$  กรัม เอทานอลต่อกรัมวัสดุ ตามลำดับ ในวันที่ 3 ของการหมักเช่นกัน จะเห็นได้ว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ จากการศึกษา มีปริมาณมากกว่าการผลิตเอทานอล จากการศึกษาที่ผ่านมา อาจเนื่องมาจาก ในวัสดุหมัก หญ้าคาและหญ้าแฝก นอกจากจะมีน้ำตาลดี-ไซโลสแล้ว ยังมีน้ำตาลชนิดอื่นๆ เป็นองค์ประกอบเช่น แอล-อะราบิโนส ดี-กลูโคส ดี-กาแลกโตส และ ดี-กลูโคโรนิก ซึ่งน้ำตาลเหล่านี้ *P. tannophilus* สามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลได้ (Dekker, 1983) ซึ่งมีการศึกษาหาศักยภาพการเปลี่ยนเฮกโซสและไซโลสไปเป็นเอทานอลโดย *P. tannophilus* สายพันธุ์ไวลด์ไทป์และสายพันธุ์มิวแทนต์ โดยเลี้ยงในส่วนผสมของน้ำตาลที่เลี้ยงแบบตามชนิดของเนื้อไม้ ซึ่งจะมีน้ำตาล ดี- กลูโคส ดี-กาแลกโตส และแอล- อะราบิโนส เป็น องค์ประกอบ จากการศึกษาพบว่า *P. tannophilus* จะเจริญได้ในดี-กาแลกโตสและสามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้ โดยการใช้ดี- แลกโตสจะเป็นไปอย่างช้าๆ เมื่อเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่นๆ และ ปริมาณเอทานอลที่ได้จากสายพันธุ์มิวแทนต์ให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่า (Schneider et al., 1983)

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### 6.1 การคัดแยกและจำแนกชนิด *Aureobasidium pullulans*

##### 6.1.1 การคัดแยก *A. pullulans*

จากการสำรวจ เก็บตัวอย่าง และคัดแยก *A. pullulans* จากใบไม้ชนิดต่างๆ ในประเทศไทย (ช่วงเดือนพฤษภาคม ศก. 2550 – พฤษภาคม พ.ศ. 2551) ในพื้นที่ 4 จังหวัด ดังนี้ กรุงเทพฯ ชลบุรี นครปฐม และร้อยเอ็ด สามารถคัดแยกเชื้อราที่มีลักษณะคล้าย *A. pullulans* ได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต

##### 6.1.2 การจำแนกชนิด *A. pullulans*

จากการจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าทุกไอโซเลตเป็น *A. pullulans* โดยกำหนด ไอโซเลต ดังนี้ No.1 No.2 No.15 No.16 No.27 No.55 No.59 No.63 No.66 No.83 No.92 No.98 No.102 No.107 No.109B No.109P No.114 No.149 No.150O และ No.150W

#### 6.2 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลเนส

##### 6.2.1 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างไซแลเนสโดยวิธี plate screening

*A. pullulans* ทุกไอโซเลตสามารถสร้างวงใสได้ ซึ่งแสดงถึงไซแลเนสแอกติวิตี โดยไอโซเลต No.109B มีค่าอัตราส่วน เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี สูงที่สุดเท่ากับ  $3.00 \pm 0.05$  และไอโซเลต No.59 มีค่าอัตราส่วน เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีน้อยที่สุดเท่ากับ  $1.29 \pm 0.03$

##### 6.2.2 การวัดไซแลเนสแอกติวิตีเชิงปริมาณ

การวัดไซแลเนสแอกติวิตีเชิงปริมาณ พบว่าไอโซเลต No.109B ให้แอกติวิตีสูงสุดที่  $165.86 \pm 0.01$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และไอโซเลต No.2 ให้แอกติวิตีน้อยสุดที่  $15.83 \pm 0.04$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

### 6.2.3 การคัดเลือก *A. pullulans* ที่ผลิตไซแลเนสที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง

การวัดแอกติวิตีของผลิตไซแลเนสที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง พบว่าไอโซเลต No.109B มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง โดยมีแอกติวิตีที่เหลืออยู่ประมาณ 70.38 เปอร์เซ็นต์ จากแอกติวิตีเริ่มต้นก่อนการบ่ม

### 6.2.4 การตรวจสอบการสร้าง EPS

การตรวจสอบการสร้าง EPS ของ *A. pullulans* พบว่าไอโซเลต No.83 ให้น้ำหนัก EPS เฉลี่ยสูงสุดที่  $1.09 \pm 0.04$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไอโซเลต No.2 ให้น้ำหนัก EPS เฉลี่ยน้อยสุดที่  $0.15 \pm 0.03$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

## 6.3 การศึกษาการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของ *A. pullulans*

เลือก *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ที่มีความสามารถในการผลิตไซแลเนสได้มากที่สุด และสามารถคงแอกติวิตีได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มาทำการศึกษาการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส พบว่าไอโซเลต No.109B ให้แอกติวิตีสูงสุดที่  $439.98 \pm 14.33$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในการเติบโตช่วง early log phase และให้จำนวนเซลล์มากที่สุด  $3.27 \times 10^7$  เซลล์ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน

## 6.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส

### 6.4.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

*A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ให้ไซแลเนสแอกติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ไซแลเนสและซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $439.98 \pm 9.66$  และ  $410.62 \pm 37.63$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

### 6.4.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

*A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ให้ไซแลเนสแอกติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและมีแอล-แอสพาราจिनโมโนไฮเดรตและเปปโตินที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $439.98 \pm 9.66$  และ  $417.09 \pm 40.31$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

### 6.4.3 อุณหภูมิ

*A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ให้ไซแลเนสแอกติวิตีสูงที่สุดเมื่อเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและ แอล-แอสพาราจีนโมโนไฮเดรตที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $533.04 \pm 15.35$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

### 6.4.4 ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหาร

*A. pullulans* ไอโซเลต No.109B ให้ไซแลเนสแอกติวิตีสูงที่สุดเมื่อเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและ แอล-แอสพาราจีนโมโนไฮเดรตที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ  $559.75 \pm 25.03$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

เมื่อประมวลผลจากการทดลองทั้งหมดพบว่า *A. pullulans* ไอโซเลต No.109B สามารถผลิตไซแลเนสเพิ่มสูงขึ้นกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร XPM ที่ไม่ผ่านการปรับแหล่งไนโตรเจน ถึง 1.27 เท่า

## 6.5. การเตรียมเอนไซม์ไซแลเนสเพื่อศึกษาลักษณะสมบัติ

### 6.5.1 การเตรียมเอนไซม์ไซแลเนส

#### 6.5.1.1 การทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน

การทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้ Viva Flow 250 ที่มี membrane cut off ที่ 10,000 Da ไซแลเนสจะอยู่ในส่วนที่ไม่ผ่านการกรองโดยมีความเข้มข้นสูงขึ้นกว่าเดิมถึง 1.86 เท่า

#### 6.5.1.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

จากการตกตะกอนไซแลเนสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าโปรตีนของไซแลเนสจะตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 60-80 เปอร์เซ็นต์ มีแอกติวิตีทั้งหมดและแอกติวิตีจำเพาะของไซแลเนสสูงที่สุดคือ อยู่ที่  $10,483.53$  มิลลิยูนิต และ  $30.25$  มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

## 6.5.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของไซแลเนส

### 6.5.2.1 การศึกษาผลของความเป็นกรดต่างที่มีต่อการทำงานของไซแลเนส

ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการทำงานของไซแลเนส คือ 7.0 ใน 50 mM Sodium phosphate buffer และเมื่อเปลี่ยนความเป็นกรดต่าง ให้สูงขึ้นหรือลดลงมากกว่านี้ จะมีผลทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง

### 6.5.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของไซแลเนส

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของไซแลเนส คือ 30-60 องศาเซลเซียส

### 6.5.2.3 การศึกษาผลของความเป็นกรดต่างที่มีต่อความเสถียรของไซแลเนส

ไซแลเนสมีความเสถียรในช่วงความเป็นกรดต่าง 4.0-7.0 โดยมีความเสถียรมากที่สุดที่ความเป็นกรดต่าง 5.0 ใน 50 mM Sodium acetate buffer เมื่อเปลี่ยนความเป็นกรดต่างให้สูงขึ้นหรือลดลงมากกว่าช่วงนี้จะมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพไป

### 6.5.2.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของไซแลเนส

ไซแลเนส จะมีความ เสถียรมากที่สุดที่อุณหภูมิห้องหรือประมาณ 28 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีผลทำให้เอนไซม์ที่มีความเสถียรน้อยลง

## 6.6 การย่อยเฮมิเซลลูโลส และการผลิตเอทานอลด้วยการย่อยสลายและการหมักแบบแยกส่วน (separate hydrolysis and fermentation, SHF) กระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (simultaneous sacchrification and fermentation, SSF)

### 6.6.1 การย่อยเฮมิเซลลูโลส และการวัดความสามารถในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสในวัชพืช

#### 6.6.1.1 การย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

หญ้าแฝกเมื่อถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ให้ปริมาณน้ำตาลไซโลส ใกล้เคียงกับ หญ้าคา เมื่อย่อย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คือที่  $409.26 \pm 6.75$  และ  $406.62 \pm 3.54$  มิลลิกรัมน้ำตาลต่อมิลลิกรัมวัชพืชเริ่มต้นตามลำดับ

### 6.6.1.2 การย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

หญ้าแฝกเมื่อถูกย่อยด้วยไซแลเนสจาก *A. pullulans* No. 109B ให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสมากกว่าหญ้าคา เมื่อย่อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง คือที่  $151.96 \pm 0.03$  และ  $119.90 \pm 0.24$  มิลลิกรัมน้ำตาลต่อมิลลิกรัมวัชพืชเริ่มต้นตามลำดับ

6.6.2 การผลิตเอทานอลด้วยการย่อยสลายและการหมักแบบแยกส่วน (separate hydrolysis and fermentation, SHF) กระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (simultaneous sacchrification and fermentation, SSF)

#### 6.6.2.1 การผลิตเอทานอลด้วยการย่อยสลายและการหมักแบบแยกส่วน, SHF

เมื่อหมักหญ้าคาและหญ้าแฝกที่ผ่านการย่อยด้วยกรดแบบ SHF พบว่าการหมักหญ้าคาให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในวันที่ 7 ที่ 8.50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) สำหรับหญ้าแฝกให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในวันที่ 7 เช่นเดียวกันที่ 8.71 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

6.6.2.2 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง, SSF

เมื่อหมัก หญ้าคาและหญ้าแฝก แบบ SSF โดยใช้ไซแลเนส ร่วมกับ *P. tannophilus* พบว่าการหมักหญ้าคาให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในวันที่ 7 ที่ 7.63 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ซึ่งใกล้เคียงกับการหมักหญ้าแฝกที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในวันที่ 7 เช่นเดียวกันที่ 7.74 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

## 6.7 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้พบว่าปริมาณไซแลเนสที่ผลิตได้นั้นค่อนข้างน้อย ดังนั้นควรที่ทำการคัดเลือกเพื่อหา *A. pullulans* ไอโซเลต ที่สามารถผลิต ไซแลเนสให้ได้ปริมาณที่มากขึ้น รวมทั้งทำการศึกษากาหาระที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนสต่อไป

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- เนริสา คุณประทุม. 2543. **การผลิตไซแลเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร** . วิทยานิพนธ์ ปริญา มหบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์. 2544. **เทคโนโลยีชีวภาพ**. ลำปาง: บรรณกิจการพิมพ์
- ปิยวรรณ สยามโนพันธ์ และ พัชรินทร์ ฉัตรประเสริฐ. 2538. **การวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาเซลลูโลสจากขยะกระดาษโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย** คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมใจ ศิริโชค. 2547. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- สุภาภรณ์ ไสภณพัฒนโกศา. 2546. **วัชพืชที่มีศักยภาพเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์เชื้อเพลิง** . วิทยานิพนธ์ปริญญา มหบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ . 2552. **พฤกษศาสตร์เชิงอุตสาหกรรม (Industrial Botany)** เอกสารประกอบการเรียนการสอนรายวิชา พฤกษศาสตร์เชิงอุตสาหกรรม ภาควิชา พฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

## ภาษาอังกฤษ

- Atik , C., Imamoglu , S. and Bermek , H. 2006 Impact of xylanase pre- treatment on peroxide bleaching stage of bio kraft pulp . **International Biodeterioration & Biodegradation** 58:22-26.
- Atlas RM, 1993. In: Parks LC (ed.), **Handbook of Microbiological Media**. CRC Press, Boca Raton.
- Bajpai, P., Bhardwaj, N.K., Bajpai. P.K. and Jauhari, M.B. 1994. The impact of xylanases on bleaching of eucalyptus kraft pulp. **Journal of Biotechnology**. 38:1-6.
- Barbosa, M. F. S., de Medeiros, M. B., de Mancilha, I. M., Schneider, H. and Lee, H. 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 3:241-251.
- Belfaquih, N., Jaspers, C.H., Kurzatkowski, W. and Penninckx, M.J. 2004. Properties of *Streptomyces* sp. endo- $\beta$ -xylanases in relation to their applicability in kraft pulp bleaching. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 18:699-705.
- Blackburn, B., MacDonald, T., McCormack, M., Perez P. and Tiengco, V. 1999. **Evaluation of Biomass -to-Ethanol Fuel Potential in California** California Energy Commission Docket.
- Blanco, A., Vidal, T., Colom. and Javier, F.I. 1995. Purification and properties of xylanase a from alkali-tolerant *Bacillus* sp. Strain BP-23. **Applied and Environmental Microbiology**. 61:4468-4470.
- Breccia, J.D., Sineriz, F., Baigori., Castro, G.R. and Hatti-Kaul, R. 1998. Purification and characterization of the most stable xylanase from *Bacillus amyloquelaciens*. **Enzyme Microbiology Technology**. 22:42-49.
- Chadha, B.S., Badhan, A.K., Mellon, F. and Bhat, M.K. 2004. Two endoxylanases active and stable at alkaline pH from the newly isolated thermophilic fungus, *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Journal of Biotechnology**. 109:227–237.
- Chaudhary, P. and Deobagkar, D.N. 1997. Purification and characterisation of xylanases from *Cellulomonas* sp. NCIM 2353. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 25:127-133.



- Chaveza, R., Bull, B.P. and Eyzaguirre, J. 2001. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **FEMS Microbiology Letters**. 205:379–383.
- Cheng, K.K., Ge J.P., Zhang, J.A., Ling, H.Z., Zhou, Y.J., Yang, M.D. and Xu, J.M. 2007. Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology letters**. 29:1051–1055.
- Chi, Z., Wang, F., Chi. Z., Yue, L., Liu, G. and Zhang, T., 2009. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Application Microbiolog Biotechnology**. 82:793–804.
- Christakopoulos, P., Mamma, D., Kekos, D. and Macris, B.J. 1999. Enhanced acetyl esterase production by *Fusarium oxysporum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 15:443-446.
- Christopher, L., Bissoon, S., Singh, S., Szendefy, J. and Szakacs, G. 2005. Bleach - enhancing abilities of *Thermomyces lanuginosus* xylanases produced by solid state fermentation. **Process Biochemistry**. 40:3230-3235.
- Christov, L.P., Szakacs, G., Rele, M.V. and Balakrishnan, H. 1999. Screening of cellulase-free fungal xylanases and evaluation of their performance on sulfite dissolving pulp. **Biotechnology Techniques**. 13: 313-316.
- Christov, L.P. and Prior, B.A. 1993. Xylan removal from dissolving pulp using enzymes of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**. 15:1269-1274.
- De Hoog, G.S. and Yurlova, N.A. 1994. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 65: 41-54.
- Dekker, R.F.H. 1983. Bioconversion of hemicelluloses production by *T. reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicelluloses. **Biotechnology and Bioengineering**. 25:1127-1146.
- Dennis, C. and Buhagiar, R.W.M. 1973. Comparative study of *Aureobasidium pullulans*, *A. prunorum* sp. and *Trichosporon pullulans*. **Transactions British Mycological Society**. 60:567-575.
- DePaula Silveir, F.Q., de Sousa, M.V., Ricart, C.A.O., Milagres, A.M.F., de Medeiros, C.L. and Filho, E.X.F. 1999. A new xylanase from *Trichoderma harzianum* strain. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 23: 682-685.

- Deshpande, M.S., Rale, V.B. and Lynch, J.M. 1992. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report. **Enzyme Microbial Technology**. 14: 514-527.
- Deverell, K.F. 1983. Ethanol production from wood hydrolysates using *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**. 5:475-480.
- Dobberstein, J. and Emeis, C. C. 1989.  $\beta$ -Xylanase produce by *Aureobasidium pullulans* CBS 58475. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 32:262-268.
- Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. H. 1993. **Compendium of Soil Fungi**. London: Academic Press.
- Eriksson, K.-E., Blanchette, R.A. and Ander, P. 1990. **Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components**. New York: Springer-Verlag.
- Fernandez- Espinar, M.T., Pinaga, F., de Graaff, L., Visser, . J., Ramonan, D. and Valles, S. 1994. Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acitic xylanase. **Application Microbiolog Biotechnology**. 42:555-562.
- Flores, M.E., Perea, M., Rodríguez, O., Malváez, A. and Huitrón, C. 1996. Physiological studies on induction and catabolite repression of  $\beta$ -xylosidase and endoxylanase in *Streptomyces* sp. CH-M-1035. **Journal Biotechnology**. 49:179–187.
- Gilbert, H.J. and Hazlewood, G.P. 1993 Bacterial cellulase and xylanase. **Journal Microbiology**. 139:187-194.
- Gokhale, D.V. and Deobagkar, D.N. 1989. Differential expression of xylanases and endoglucanases in the hybrid derived from intergeneric protoplast fusion between a *Cellulomonas* sp. and *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**. 55:2675-2680.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W. and Zupan, S. 1996. Production of fungal xylanase. **Bioresource Technology**. 58:137-161.
- Hayn, M., Steiner, W., Klinger, R., Steinmuller, H., Sinner, M. and Ester, H. 1993. Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics. **Bioconversion of Agricultural Plant Residues**. CAB International, Wallingford, UK.

- Hermanides-Nijhof, E. J. 1977. *Aureobasidium* and allied genera. **Studies in Mycology**. 15:141-177.
- Hon, D.N.S. and Shiraishi, N. 1990. **Wood and Cellulosic Chemistry**. Marcel Dekker, New York.
- Ito, K., Iwashita, K. and Iwano, K. 1992. Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 56:547–550.
- Ito, T., Yokoyama, E., Sato, H., Ujita, M., Funaguma, T., Furukawa, K. and Hara, A. 2003. Xylosidases associated with the cell surface of *Penicillium herquei* IFO 4674. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 96:354–359.
- Karni, M., Deopurkar, R.L. and Rale, V.B. 1993.  $\beta$ -xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grown on sugar and agricultural residues. **Journal of Microbiology & Biotechnology**. 9:476-478.
- Khanongnuch, C., Lumyong, S., Ooi, T., and Kinoshita, S. 1999. A non cellulase producing strain of *Bacillus subtilis* and its potential use in pulp biobleaching. **Biotechnology Letters**. 3:21-61.
- Khasin, A., Alchanati, I. and Shoham, Y. 1993. Purification and characterization of thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. **Applied and Environmental Microbiology**. 59:1725-1730.
- Kimura, I. and Tajima, S. 1998. The modes of action of two endo-1,4-b-D-xylanases from *Aspergillus sojae* on various xiligosaccharides. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 85:283-288.
- Kimura, T., Ito, J., Kawano, A., Making, T., Kondo, H., Karita, S., Sakka, K. and Ohmiya, K. 2000. Purification, characterization and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp.. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 64:1230–1237.
- Kotter, P. and Ciriacy, M. 1993. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 38:776-783.
- Leathers, T.D., Nofsinger, G.W., Kurtzman, C.P. and Bothast, R.J. 1988. Pullulan production by color variant strains of *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Industrial Microbiology**. 3: 231–239.

- Leathers, T.D. 1986. Color variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity. **Applied and Environmental Microbiology**. 52:1026–1030.
- Leathers, T.D., Kurtzman, C.P. and Detroy, R.W. 1984. Overproduction and regulation of xylanase in *Aureobasidium pullulan* and *Cryptococcus albidus*. **Biotechnology and Bioengineering**. 12:225-240.
- Leite, R.S.R., Bocchini, D.A., Martins, E.D.S., Silva, D., Gomes, E. and Silva, R.D. 2007. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulan* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 12: 281-288.
- Li, X.L., Zhang, Z.Q. and Eriksson, K.E. 1993. Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. **Applied and Environmental Microbiology**. 59:3212-3218
- Lodder, J. 1974. A taxonomy study. **The Yeast**. 1:448-454.
- Lotrakul, P., Deenam, P., Prasongsuk, S. and Punnapayak, H. 2009. Isolation of *Aureobasidium pullulans* from bathroom surfaces and their antifungal activity against some Aspergilli. **African Journal of Microbiology Research**. 3:253-257.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. 193: 265-275.
- Manin, C.F., Shareek, Morosoli, R. and D. Kluepfel. 1994. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (*abfA*). **Biochemical Journal**. 302:443–449.
- Manitchotpisit, P., Leathers, T.D., Peterson S.W., Kurtzman, C.P., LI, X.L., Eveleigh, D.E., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Vermillion, K.E. and Punnapayak, H., 2009. Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. **Mycological Research**. 113: 1107-1120.
- Myburgh, J., Prior, B.A. and Kilian, S.G. 1991. The temperature and pH properties of the extracellular hemicellulose-degrading enzyme of *Aureobasidium pullulans* NRRL 2311-1. **Process Biochemistry**. 26: 343-348.

- Nair, S.G., Sindhu, R. and Shashidhar, S. 2008. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. **Microbiology Research**. 2:82-86.
- Nanmori, H.K., Watanabe, T., Shinke, R., Kohno, A. and Kawamura, Y. 1990. Purification and some properties of thermostable of xylanase and  $\beta$ -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. **Journal of Bacteriology**. 172: 6669-6672.
- Nascimento, R.P., Coelho, R.R.R., Marques, S., Alves, L., Girio, F.M., Bon, E.P.S. and Amaral-Collaço, M. T. 2002. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**. 31:549-555.
- Neale, A.D., Scopes, R.K. and Kelly, J.M. 1988. Alcohol production from glucose and xylose using *Escherichia coli* containing *Zymomonas mobilis* genes. **Applied Microbiology Biotechnology**. 29:162-167.
- Ohta, K., Fujimoto, H., Fujii, S. and Wakiyama M., 2010. Cell-associated  $\beta$ -xylosidase from *Aureobasidium pullulans* ATCC: Purification, properties, and characterization of the encoding gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. (Article in press).
- Ohta, K., Moriyama, S., and Tanaka, H. 2001. Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* and sequence analysis of the encoding gene. **Bioscience and Bioengineering** 92: 262-270.
- Parajo, J.C., Dominguez, H. and Dominguez, J. 1997. Xylitol production from Eucalyptus wood hydrolysates extracted with organic solvents. **Process Biochemistry**. 32: 599-604.
- Perego, P., Converti, A., Palazzi, E., Borghi, M.D. and Ferraiolo, G.. 1990. Fermentation of hardwood hemicellulose hydrolysate by *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Journal of Industrial Microbiology**. 6:157-164.
- Pereira, P.S., Mesquita, A., Duarte, J.C., Barros, M.R.A. and Ferreire, M.C. 2002. Rapid production of thermostable cellulose-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties. **Enzyme and Microbial Technology**. 30:924-933.

- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge J.A. and Amorim, D.S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**. 67: 577–591.
- Prasongsuk, S., Sullivan, R.F., Kuhirun, M., Eveleigh, D.E. and Punnapayak, H. 2005. Thailand habitats as sources of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans*. **Microbiology & Biotechnology**. 52: 393-398.
- Punnapayak, H. and Emert, G. H. 1986. Use of *Pachysolen tannophilus* in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocelluloses. **Biotechnology Letters**. 8:63-66.
- Punnapayak, H., Sudhadham, M., Prasongsuk, S. and Pichayangkura, S. 2003. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 30:89-94.
- Ramos, S. and Acha, I. G. 1975. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*. **Transactions British Mycological Society**. 64:129-135.
- Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L. and Tanticharoen, M. 1999. Purification and some properties of xylan-binding endoxylanase from alkaliophilic *Bacillus* sp. Strain K-1. **Applied and Environmental Microbiology**. 65:694-697.
- Ryan, S.E., Nolan, K., Thompson, R., Gubitzi, G.M., Savage, A.V. and Tuohy, M.G. 2003. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. **Enzyme and Microbial Technology**. 33:775-785.
- Saha, B.C., Freer, S.N. and Bothast, R.J. 1994. Production, purification, and properties of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. **Applied and Environmental Microbiology**. 60:3774-3780.
- Saha, B.C. 2000. Alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**. 18:403–423.
- Saha, B.C. and Bothast, R.J. 1998. Effect of carbon source on production of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase by *Aureobasidium pullulans*. **Microbiology**. 64: 216-220.
- Schneider, H., Wang, P.Y., Chan, Y.K and Maleszka, R. 1983. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**. 3: 89-92.

- Shigemori, H., Tenma, M., Shimazaki, K. and Kobayashi, J. 1998. Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Natural Products**. 61:696-698.
- Slininger, P.J., Bothast, R.J., Van Cauwionberg, J.E. and Kurtman, C.P. 1982. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**. 24: 371-384.
- Sreenath, H.K., Koegel, R.G., Moldes, A.B., Jeffries, T.W. and Straub, R.J. 2001. Ethanol production from alfalfa fiber fractions by saccharification and fermentation. **Process Biochemistry**. 36:1199-1204.
- Stephens, G.R. and Heichel, G.H., 1975. Agricultural and forest products as source. **Biotechnology Letters**. 5: 27-42.
- Svarachorn, A. 1999. Production of fungal-xylanase using agricultural waste by solid state fermentation. **The Journal of Scientific Research Chulalongkorn University**. 24:13-20.
- Tsao, G.T. and Chiang L.C. 1983. Cellulosic Material as a Renewable Resource. **Cellulose and Hemicellulose Technology**. 4: 296-321.
- Ueda, S., Fujita, K., Komatsu, K. and Nakashima, Z. 1963. Polysaccharide produced by the genus *Pullularia*. **Applied Microbiology**. 11:211-215.
- Visser, J., Beldman, G., Someren, M.A.K.V. and Voragen, A.G.J. 1992. Xylan and xylanase. **Applied Microbiology**. 13:178-182.
- Whistler, R.H.A. and Richards, E.L. 1970. **Hemicellulase in the Carbohydrates**. New York, USA. 447-469.
- Wickerham, L.J. and Kurtzman, C.P., 1975. Synergistic color variants of *Aureobasidium pullulans*. **Mycologia**. 67: 342-361.
- Woodward, D.J. 1987. Utilization of cellulose as a fermentation substrate: Problems and potential. In Stowell, J.D. Beardmore, A.J., Keevil, C.W. and Woodward, J.R. (eds) **Carbon Substrates in Biotechnology**. 21:111
- Xu, J., Takakuw, N., Nogawa, M. and Morikawa, Y. 1998. A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7. **Application Microbiology Biotechnology**. 49:718-724.

- Yurlova, N.A. and de Hoog, G.S. 1997. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. **Antonie van Leeuwenhoek**. 72:141-147.
- Yurlova, N.A., Hoog, G.S. and Gerrits van den Ende, A.H.G. 1999. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. **Studies in Mycology**. 43: 63-69.
- Zalar, P., Gostincar, C., de Hoog, G.S., Ursic, V. and Sudhadham, M. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Studies in Mycology**. 61:21-38.



ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

#### 1. Malt Extract Agar (MEA) + (rose bengal 0.01 กรัมต่อลิตร), (Atlas, 1993)

Malt extract	25	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
Bacto-Peptone	1	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นวุ้นด้วยน้ำกลั่น แล้วเติมวุ้น จากนั้นนำไปต้มจนวุ้นละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ

#### 2. Potato Dextrose Agar (PDA), (Atlas, 1993)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น		

นำมันฝรั่งที่ล้างสะอาดแล้วมาหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นลูกเต๋ารูปขนาดประมาณ 1 X 1 เซนติเมตร นำไปต้มในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก จากนั้นใช้ผ้าขาวบางกรองเอาแต่ส่วนน้ำเติมส่วนประกอบที่เหลือลงไป คนให้ละลายหมด จากปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

#### 3. Yeast Malt Agar (YMA), (Atlas, 1993)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นวุ้นด้วยน้ำกลั่น แล้วเติมวุ้น จากนั้นนำไปต้มจนวุ้นละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ

#### 4. Yeast Malt Broth (YMB), (Atlas, 1993)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลายส่วนผสมแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น โดยละลายแยกจากกัน แล้วนำมาผสมกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

#### 5. Yeast Malt Xylan Agar (YMXA), (Christov and Prior, 1993)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
น้ำตาลไซแลน	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลายส่วนผสมแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น โดยละลายแยกจากกัน แล้วนำมาผสมกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

#### 6. Basal Medium (Leathers et al., 1984)

น้ำตาลไซแลน	10	กรัม
Yeast-nitrogenous base	6.7	กรัม
Asperagine	2	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	กรัม

ละลายส่วนผสมแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น โดยละลายแยกจากกัน แล้วนำมาผสมกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

## 7. Xylanase Production medium (XPM), (Leathers et al., 1984)

น้ำตาลไซแลน	10	กรัม
Yeast-nitrogenous base	6.7	กรัม
Asperagine	2	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5	กรัม

ละลายส่วนผสมแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น โดยละลายแยกจากกัน แล้วนำมาผสมกัน  
ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

## 8. Production medium (PM), (Ueda et al., 1963)

น้ำตาลซูโครส	50	กรัม
Bacto-Peptone	0.6	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	5	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	กรัม
NaCl	1	กรัม
Yeast extract	0.4	กรัม

ละลายส่วนผสมแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น โดยละลายแยกจากกัน แล้วนำมาผสมกัน  
ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

9. อาหารเหลวสำหรับ *Pachysolen tannaophilus* สายพันธุ์ NRRL-Y2460 (Cheng et al., 2007)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5	กรัม
$(\text{Na}_4)_2\text{SO}_4$	2	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Bacto peptone	1	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
Xylose	20	กรัม

ละลายส่วนผสมแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น โดยละลายแยกจากกัน แล้วนำมาผสมกัน  
ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

## 10. Fermentation medium (Cheng et al., 2007)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5	กรัม
$(\text{Na}_4)_2\text{SO}_4$	2	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Bacto peptone	1	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม

ละลายส่วนผสมแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น โดยละลายแยกจากกัน แล้วนำมาผสมกัน  
ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

## ภาคผนวก ข

### 1. การเตรียมสารเคมีสำหรับการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนส

#### 1.1 Reagent A

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	25	กรัม
NaK Tartrate (Rochelle salt)	25	กรัม
$\text{NaHCO}_3$	20	กรัม
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	200	กรัม

ละลายสารดังกล่าวให้เข้ากัน ปรับปริมาตรโดยใช้ volumetric flask ให้มีปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร

#### 1.2 Reagent B (copper alkaline reagent)

$\text{CuSO}_4$	15	กรัม
-----------------	----	------

ละลายสารดังกล่าวแล้วปรับปริมาตรโดยใช้ volumetric flask ให้มีปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 2 หยดกรดซัลฟูริกเข้มข้น

#### 1.3 Reagent C

ทำการปิเปต 25 มิลลิลิตรของ Reagent A ผสมกับ 1 มิลลิลิตรของ Reagent B (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

#### 1.4 Reagent D (arsenomolybdate reagent)

ชั่ง ammonium molybdate 25 กรัม ละลายใน 450 มิลลิลิตร เติม 21 มิลลิลิตรของกรดซัลฟูริกเข้มข้น ในขณะกวนให้เข้ากัน จากนั้นเติม 3 กรัมของ  $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ที่ละลายอยู่ในน้ำ 25 มิลลิลิตรลงไป แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ใส่ในขวดสีน้ำตาล และนำไปป่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

### 2. การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนส

2.1 นำเอนไซม์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.2 เติม ไซแลน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ 50 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร

2.3 นำไปป่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

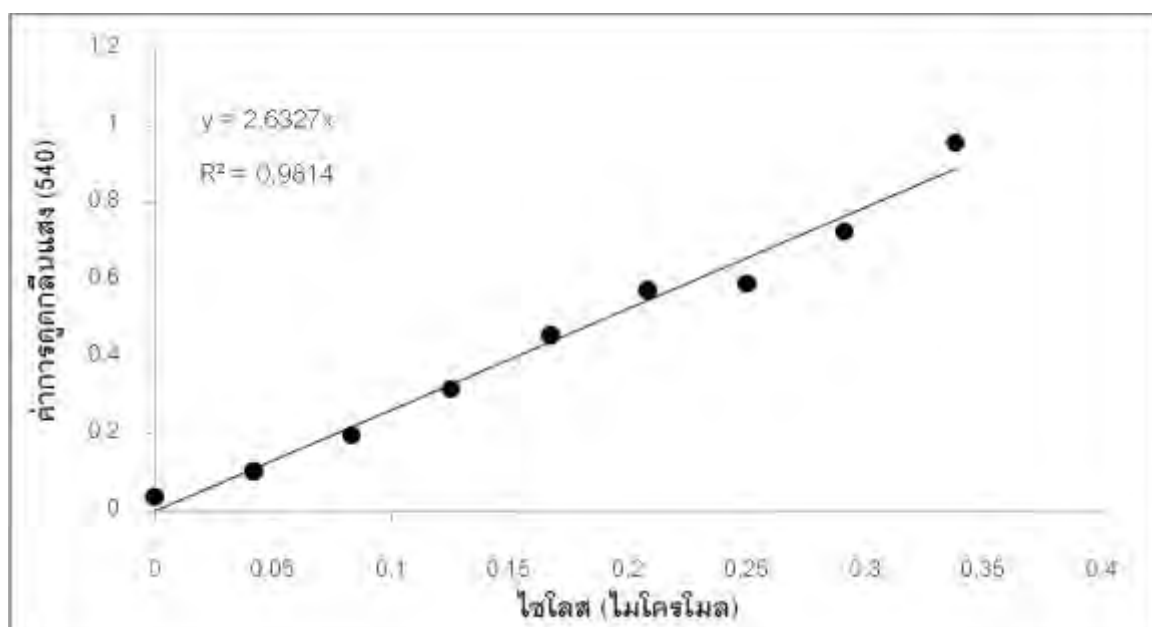
2.4 เติมสารละลาย Reagent C ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2.5 เติมสารละลาย Reagent D ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2. 6 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลไซโลส จากกราฟมาตรฐาน

### การสร้างกราฟน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน

การสร้างกราฟน้ำตาลไซโลสมาตรฐานทำได้โดย เตรียมสารละลายไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 25 50 75 100 125 150 175 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม reagent C หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำไปตั้งในน้ำเดือด 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม reagent D หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลไซโลส (รูปที่ 47)



รูปที่ 47 กราฟปริมาณไซโลสมาตรฐาน

### 3. การเตรียมสารเคมีสำหรับการวัดโปรตีน (Lowry et al., 1951)

3.1 เตรียมสารละลาย BSA มาตรฐาน เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปละลายด้วยน้ำกลั่น

3.2 การเตรียมสารละลาย Lowry reagent I ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.2.1 เตรียม sodium potassium tartrate ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.2.2 เตรียม copper sulphate ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.2.3 เตรียม sodium carbonate ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ละลายใน 0.1 N sodium hydroxide

เติมสารละลาย 1.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 2.2.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย 2.2.3 ปริมาตร 98 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยสาร Lowry reagent I จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง

3.3 การเตรียมสารละลาย Lowry reagent I ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

นำ phenol reagent ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาผสมกับน้ำกลั่นไปปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4. การทำกราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

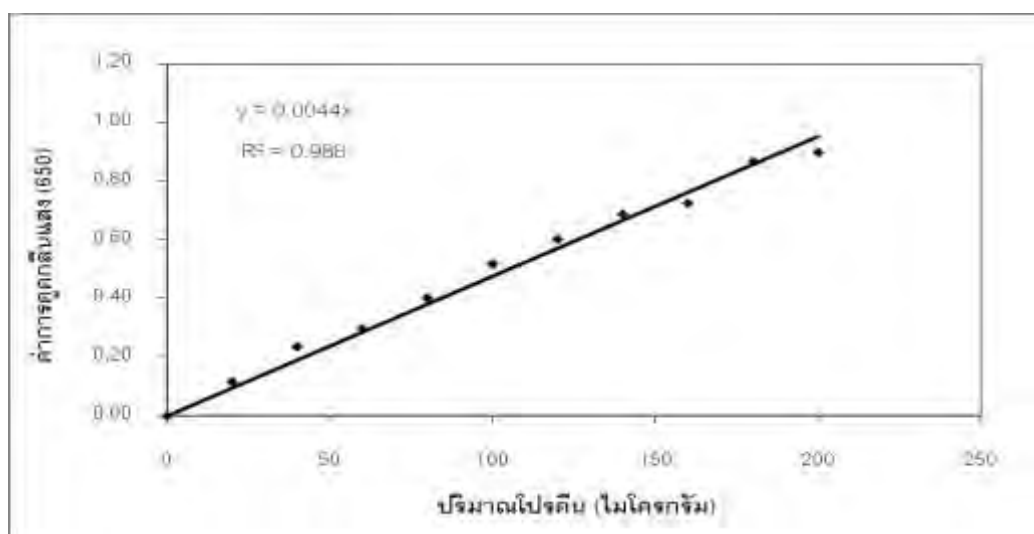
4.1 เตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2 ใส่ละลาย BSA ความเข้มข้นต่าง ๆ จากข้อ 1 ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร ชูดควบคุมทำการเติมน้ำกลั่นแทนสารละลาย BSA ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.3 เติมสารละลาย Lowry reagent I (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย Lowry reagent II (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

4.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

4.5 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีน



รูปที่ 48 กราฟปริมาณโปรตีนมาตรฐาน



## ภาคผนวก ค

### การคำนวณค่าแอกติวิตีของเอนไซม์

การคำนวณหาค่า unit of enzyme ตามวิธีการของ The International Union of Biochemistry

การคำนวณหาค่า unit of enzyme ของไซแลเนส

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้น ให้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ นั่นคือ

$$\begin{aligned}
 1 \text{ หน่วยของเอนไซม์} &= 1 \text{ ไมโครโมลของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที} \\
 &= 1 \text{ ไมโครโมลของไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที} \\
 &= 0.150 \text{ มิลลิกรัม ของไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที}
 \end{aligned}$$

### สูตรในการคำนวณ

$$\text{Units/ml enzyme} = \frac{(O.D/2.632) \times (Df)}{(10) \times (0.25)}$$

โดยที่ 2.632 = ปริมาณน้ำตาลที่เทียบได้จากกราฟมาตรฐาน

Df = Dilution factor

10 = ระยะเวลาในการวัดปริมาณไซแลเนส (นาที)

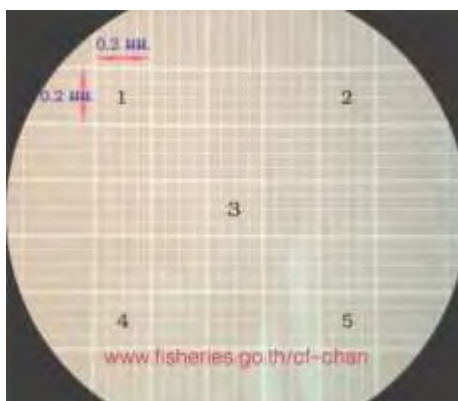
0.25 = ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษา

## ภาคผนวก ง

การนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Direct microscopic count โดยใช้ Haemocytometer

### 1. การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยวิธี Direct Microscopic Count โดยใช้ Haemocytometer

Haemocytometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือด แต่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการนับสปอร์ของราหรือจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ได้ Haemocytometer เป็นสไลด์มีช่องแบ่งไว้เป็นตาราง เมื่อปิดด้วย cover glass ซึ่งใช้เฉพาะกับอุปกรณ์จะทำให้มีความลึกระหว่างตัวสไลด์กับ cover glass ทำให้บรรจุของเหลวซึ่งมีตัวอย่างที่ต้องการนับจำนวนไว้ได้ ซีดแบ่งจะแบ่งออกเป็นช่องสี่เหลี่ยม จตุรัส 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด  $0.2 \times 0.2$  ตารางมิลลิเมตร



รูปที่ 49 ตัวอย่างแนวเส้นของ Haemocytometer

ซึ่งภายในแต่ละช่องจะแบ่งย่อยออกเป็น 16 ช่องเล็ก แต่ละช่องมีขนาด  $0.05 \times 0.05$  ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นเมื่อปิดทับสไลด์ด้วย cover glass ซึ่งใช้เฉพาะกับอุปกรณ์นี้ ของเหลว ที่บรรจุอยู่จึงมีปริมาตรเท่ากับ  $0.00025$  ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ในการนับจำนวนเซลล์ควรเจือจางเซลล์ให้มีปริมาณที่สามารถนับได้สะดวกและแม่นยำไม่เจือจางหรือหนาแน่นจนเกินไป ในการนับให้หยดน้ำตัวอย่างที่ต้องการนับจำนวนเซลล์ลงบน Haemocytometer แล้วปิดทับด้วย cover glass จากนั้นนำไปตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้านับจากช่องใหญ่ควรนับอย่างน้อย 5 ช่อง

### วิธีการคำนวณ

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก)	=	0.1	ลูกบาศก์มิลลิเมตร
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องใหญ่	=	X	เซลล์
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก	=	Y	เซลล์
นั่นคือ	X	=	16Y เซลล์

ดังนั้น

ใน 0.1 ลบ.มม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	$X \times 25$	หรือ	$Y \times 16 \times 25$	เซลล์
ใน 1.0 ลบ.มม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	$X \times 25 \times 10$	หรือ	$Y \times 16 \times 25 \times 10$	เซลล์
ใน 1 ลบ.ซม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	$X \times 25 \times 10 \times 1000$	หรือ	$Y \times 16 \times 25 \times 10 \times 1000$	เซลล์
หรือเท่ากับ	$X \times 25 \times 10^4$	หรือ	$4Y \times 10^6$	เซลล์ต่อมิลลิลิตร

## ภาคผนวก จ

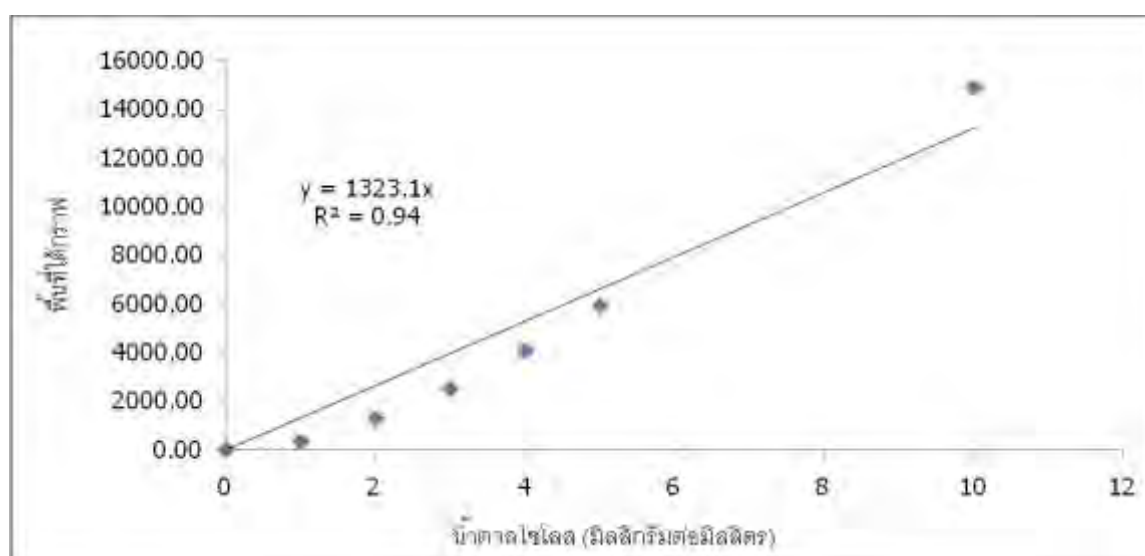
### 1. วิธีการคำนวณปริมาณน้ำตาลโดยใช้ HPLC

เป็นกระบวนการเปรียบเทียบสารประกอบที่ไม่สามารถความเข้มข้น กับสารละลาย ที่ทราบความเข้มข้น มีวิธีดังนี้

1. เตรียมสารละลายน้ำตาลที่ทราบความเข้มข้น จากนั้นนำไปฉีด HPLC เพื่อทำการตรวจสอบ Chromatograph ซึ่งจะแสดงพีคของชุดข้อมูลกับความเข้มข้นของสารละลายที่ฉีดเข้าไป
2. หาพื้นที่ใต้กราฟ โดยการสำรวจกราฟเปรียบเทียบกับความเข้มข้นมาตรฐาน

ตารางที่ 11 พื้นที่ใต้กราฟของน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน

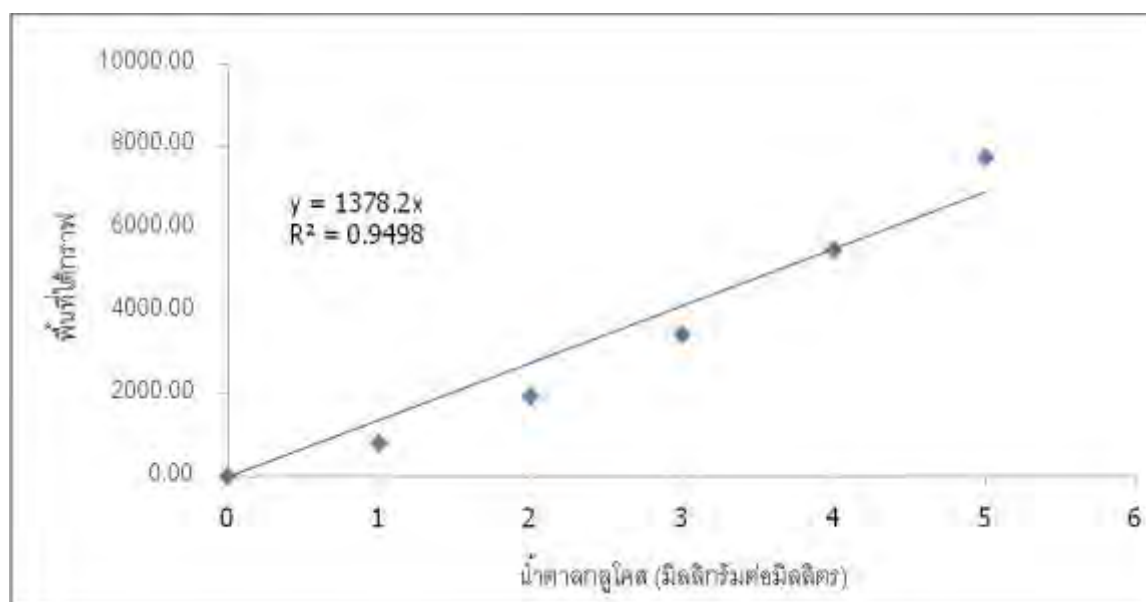
ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ
0	0.00
1	336.27
2	1277.09
3	2512.65
4	4069.41
5	5920.95
10	14877.26



รูปที่ 50 กราฟปริมาณน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน

ตารางที่ 12 พื้นที่ใต้กราฟของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

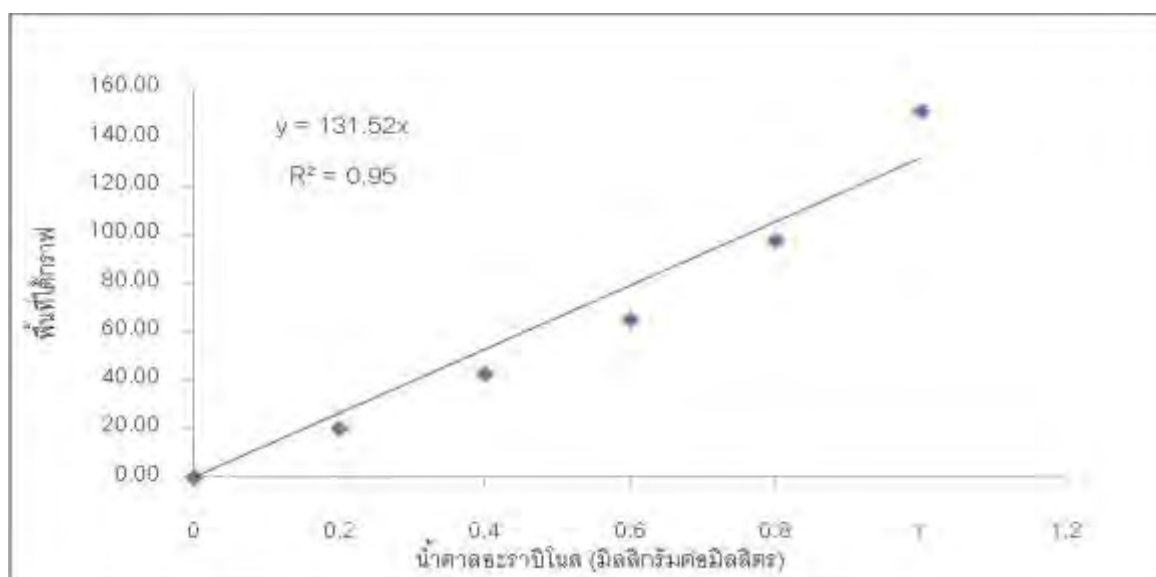
ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ
0	0.00
1	807.24
2	1946.70
3	3449.75
4	5499.96
5	7750.62



รูปที่ 51 กราฟปริมาณน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

ตารางที่ 13 พื้นที่ใต้กราฟของน้ำตาลอะราบิโนสมาตรฐาน

ความเข้มข้นน้ำตาลอะราบิโนส (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ
0	0.00
0.2	20.20
0.4	42.82
0.6	65.06
0.8	97.77
1.0	150.93



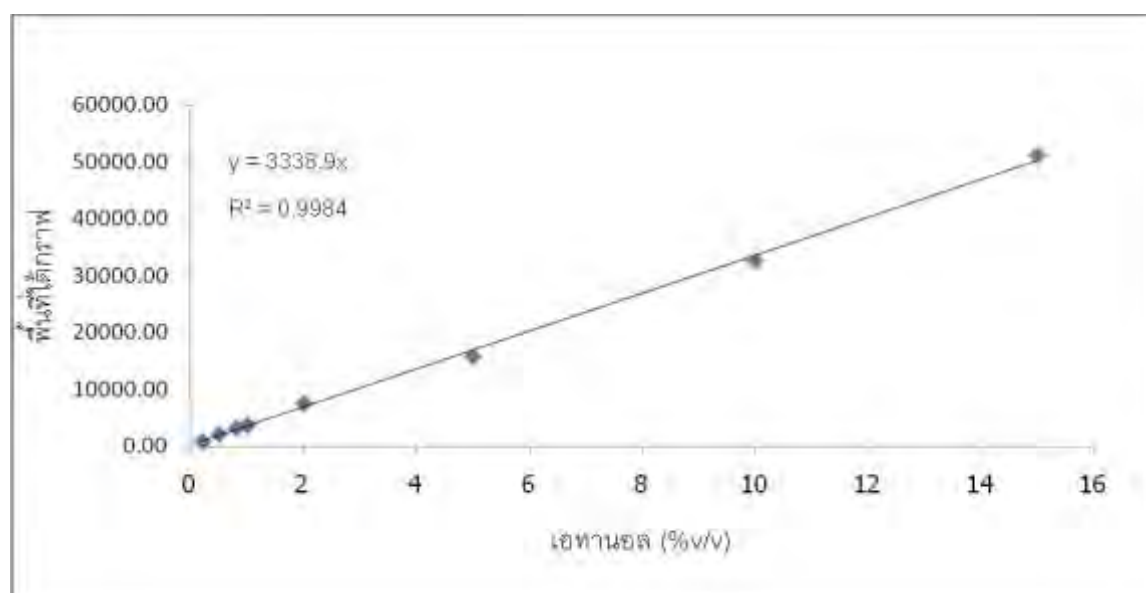
รูปที่ 52 กราฟปริมาณน้ำตาลอะราบิโนสมาตรฐาน

## 2. วิธีการคำนวณปริมาณเอทานอลมาตรฐาน

การสร้างกราฟเอทานอลมาตรฐานทำได้โดย เตรียมเอทานอลความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0% (v/v) แล้วนำไปตรวจสอบความเข้มข้นด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) นำพื้นที่ที่ได้กราฟที่ได้ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลและพื้นที่ที่ได้กราฟ

ตารางที่ 14 พื้นที่ที่ได้กราฟของเอทานอลมาตรฐาน

ความเข้มข้นเอทานอล (%v/v)	พื้นที่ที่ได้กราฟ
0.2	787.82
0.5	2084.42
0.8	3142.65
1.0	3701.37
2.0	7501.67
5.0	15773.00
10.0	32609.00
15.0	51197.00



รูปที่ 53 กราฟปริมาณเอทานอลมาตรฐาน

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว สรัสวดี โรจนกุศล เกิดเมื่อวันที่ 14 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดร้อยเอ็ด สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก เมื่อปี พ.ศ. 2550 จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2553

### ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

ขณะศึกษาได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ครั้งที่ 1 ปีงบประมาณ 2553 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลขโครงการ F-31-GS-ES13 เลขที่ 92 และได้รับทุนสนับสนุนนิสิตระดับปริญญาโทบัณฑิต เพื่อไปเสนอผลงานวิชาการในต่างประเทศจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### การเสนอผลงาน

Rotjanagusol, S., Lotrakul, P., Prasongsuk S., Punnapayak, H. 2009. Isolation and Screening of Xylanase-Producing *Aureobasidium pullulans* Isolated in Thailand. In Proceeding of The 21<sup>st</sup> Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology: 297-303. Queen Sirikit National Convention Center Bangkok, Thailand. September 24-25, 2009.