การผลิตไซแลนเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร

นางสาว เนริสา คุณประทุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-1186-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF XYLANASE FROM *Trichoderma reesei* USING AGRICULTURAL WASTES

Miss Narisa Kunpratum

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Botany
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2000

ISBN 974-13-1186-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไซแลนเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร
โดย	นางสาวเนริสา คุณประทุม
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.พันธ์พิมพ์ วอนขอพร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนริสา คุณประทุม : การผลิตไซแลนเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร (PRODUCTION OF XYLANASE FROM *Trichoderma reesei* USING AGRICULTURAL WASTES) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ; 79 หน้า. ISBN 974-13-1186-9.

เมื่อนำ *Trichoderma reesei* Rut C-30 เลี้ยงในอาหารสูตร production medium ที่ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร 4 ชนิด คือรำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า เปลือกถั่วลิสง และชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ารำข้าวสาลีให้แอคติวิตีของไซแลนเนสสูงสุด (23.931 U/ml) และรำข้าวเจ้ามีแอคติวิตีของเซลลูเลสสูงสุด (0.656 U/ml) จากนั้นนำวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรทั้ง 4 ชนิด มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่ารำข้าวสาลีมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนมากที่สุด โดยมีปริมาณ 26.10 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ส่วนเปลือกถั่วมีปริมาณเซลลูโลสสูงสุด (35.13 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง) โดยที่การมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสค่อนข้างสูงในรำข้าวสาลีมีผลส่งเสริมการผลิตไซแลนเนสได้ เมื่อนำรำข้าวสาลีมาหาความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ให้แอคติวิตีของไซแลนเนสสูงสุด (27.946 U/ml) และใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ corn steep liquor เมื่อศึกษาถึงผลของสารที่มีผลกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส 3 ชนิดคือ ไซแลน ไซโลส และ β-methyl-xyloside พบว่าไซแลนมีผลต่อการผลิตไซแลนเนสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ไซโลสและ β-methyl-xyloside มีผลกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเพิ่มขึ้น โดยไซโลสที่ระดับความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตรให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.85 เท่า และ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 5.32 เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2543

4072292923 : MAJOR BOTANY

KEY WORDS: *Trichoderma reesei* / XYLANASE / AGRICULTURAL WASTES

NARISA KUNPRATUM : PRODUCTION OF XYLANASE FROM *Trichoderma reesei* USING AGRICULTURAL WASTES. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D. 79 pp. ISBN 974-13-1186-9.

Trichoderma reesei Rut C-30 was cultivated in production medium at pH 5 temperture 30 °C, using agricultural wastes including wheat bran, rice bran, sugarcane bagasse and peanut hulls as the sole carbon sources. Wheat bran gave highest xylanase activity (23.931 IU/ml). Rice bran gave highest cellulase activity (0.656 U/ml). Chemical analysis of agricultural wastes component were accomplished. Wheat bran contained the highest hemicellulose or xylan, which contained 26.10 gram per dry weight. Peanut hulls contained highest cellulose (35.13 gram per dry weigh). The presence of relatively high hemicellulose content in the wheat bran helped support the production of xylanase. In the attempt to find suitable concentration of wheat bran, the substrate at 5 % level gave the highest activity (27.946 U/ml). Corn steep liquor 0.1 % was the best nitrogen source. Xylan, xylose and β-methyl-xyloside for xylanase production were investigated as the inducers. Wheat bran plus xylan slightly induced xylanase activity. Wheat bran plus 0.2 g/l of xylose could induce 1.85 folds of xylanase production. β-methyl-xyloside induced xylanase production 5.32 folds.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department	Botany	Student's signature……
Field of study	Botany	Advisor's signature……
Academic year	2000	

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนได้แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ ประธานกรรมการที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.พันธ์พิมพ์ วอนขอพร กรรมการที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคุณเพ็ญสุดา ฮ่งภู่ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่กรุณาวิเคราะห์องค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ตลอดจนให้คำแนะนำและความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์รวมถึงบุคลากรในภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องทุกคนที่กรุณาเอื้อเฟื้อและช่วยเหลือเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมาจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณภาสินี ปิติพรชัยที่กรุณาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติและให้คำปรึกษาแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย ตลอดจนให้กำลังใจในทุกๆ เรื่องเสมอมา

ท้ายสุดข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา พี่ชาย สำหรับความรัก ความอบอุ่น และกำลังใจที่มีให้เสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ..... 1
2. การตรวจเอกสาร..... 4
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการทดลอง..... 18
4. ผลการทดลอง..... 26
5. วิจารณ์ผลการทดลอง..... 46
6. สรุปผลการทดลอง..... 53

รายการอ้างอิง..... 57

ภาคผนวก..... 64

ประวัติผู้เขียน..... 79

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

		หน้า
1	ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซแลนเนส.....	13
2	ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ.....	28
3	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสและเซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้เซลลูโลสร่วมกับรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว.....	30
4	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน.....	32
5	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเปรียบเทียบกับการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน.....	33
6	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้เมื่อใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน.....	35
7	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 เมื่อเลี้ยงในรำข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	36
8	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	38
9	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ	39
10	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ.....	41
11	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลส.....	42
12	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลส.....	42
13	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสและเซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	44

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 เมื่อใช้เซลลูโลส 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน..... 74

15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้เซลลูโลส 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน..... 74

16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน..... 75

17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเปรียบเทียบกับการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน..... 75

18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T.reesei* Rut C-30 เมื่อใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน..... 75

19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 เมื่อเลี้ยงในรำข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ..... 76

20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 76

21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ..... 76

22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T.reesei* Rut C-30โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ..... 77

23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลส..... 77

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลส..... 77

25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 78

26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ..... 78

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

		หน้า
1	โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส.....	4
2	ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน.....	6
3	ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง.....	7
4	การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน	10
5	กลไกของการย่อยสลายไซแลนของ *Cryptococcus albidus*.....	17
6	ขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร.....	21
7	เชื้อรา *Trichoderma reesei* Rut C-30.....	26
8	การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma reesei* Rut C-30 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB	27
9	ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ.....	28
10	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจากได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 ใช้เซลลูโลสร่วมกับรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว	31
11	ค่าแอคติวิตีของเอนเซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้เซลลูโลสร่วมกับรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว	31
12	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 ที่เลี้ยงด้วยคาร์บอนแหล่งต่างๆ	33
13	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจากเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 ที่เลี้ยงด้วยไซแลนเปรียบเทียบกับใช้รำข้าวสาลี	34
14	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 เมื่อเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ.....	36
15	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 เมื่อเลี้ยงในรำข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	37
16	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
17	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ	40
18	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ	41
19	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลส.....	43
20	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลส.....	43
21	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับการใช้ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	45
22	ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับการใช้ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	45
23	กราฟน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน.....	70
24	กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน.....	71

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นองค์ประกอบสำคัญอย่างหนึ่งในผนังเซลล์ของพืช มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ (polymer) สายพอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดมาเชื่อมต่อกัน ในไม้เนื้อแข็งพบว่ามีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนไม้เนื้ออ่อนมีกลูโคแมนแนนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส พืชแต่ละชนิดมีปริมาณไซแลนแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืชนั้นๆ โดยพืชในกลุ่มแองจิโอสเปิร์มมีปริมาณไซแลนมากกว่า 30 % ของน้ำหนักแห้ง (Gome et al., 1992) ส่วนพืชในกลุ่มจิมโนสเปิร์มมีไซแลนอยู่เพียง 8% ของน้ำหนักแห้ง

ไซแลนประกอบด้วยน้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) หลายๆ โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะบีตา–1,4 ไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic) (Dekker, 1983; Kirk and Farrell, 1987) ในปัจจุบันพบว่ามีการนำไซโลสมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้และการทำไวน์โดยใช้เพิ่มความหวาน (brix) ของน้ำผลไม้เนื่องจากหลังจากการย่อยไซแลนจะได้น้ำตาล ดี-ไซโลส ซึ่งเป็นสารให้รสหวานเรียกอีกชื่อว่าน้ำตาลจากไม้ (wood sugar) นอกจากนั้นยังใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (Wong et al., 1988) ผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) ยาปฏิชีวนะ เชื้อเพลิง (Bailey et al.,1993) การย่อยสลายไซแลนเพื่อให้น้ำตาลดี-ไซโลสนิยมใช้เอนไซม์มากกว่าการใช้สารเคมีเพราะปฏิกิริยาที่เกิดไม่รุนแรง และมีความจำเพาะเจาะจงต่อ สับสเตรทจึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ใช้ค่าใช้จ่ายน้อยและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Biely, 1985; Gome et al., 1992) โดยเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายไซแลนคือเอนไซม์ไซแลนเนสทำหน้าที่ย่อยสลายไซแลนโดยตัดพันธะบีตา 1,4 ไซโลซิดิก ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลไซโลสและ โอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ

ในธรรมชาติไซแลนเนสมีความสำคัญในระบบนิเวศโดยมีบทบาทในการย่อยสลายไซแลน ที่มีอยู่ในส่วนต่างๆ ของพืช เป็นการช่วยลดขยะอันเกิดจากวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร อีกทั้งช่วยให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหารกลับคืนสู่ดินทำให้พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป (Rose,1980; Fogrty,1983) มีการนำไซแลนเนสมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการฟอกสีเยื่อกระดาษ เพื่อเพิ่มความขาวและความนุ่มของเยื่อกระดาษ

(Buchert et al., 1992; Pilon et al., 1982) ช่วยลดความขุ่นของน้ำผลไม้ และช่วยทำให้ผิวของผลไม้มีความนุ่มมากขึ้น ซึ่งง่ายต่อการบีบคั้น

ไซแลนเนส ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ โปรโตซัว ซึ่ง จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตไซแลนเนสได้แก่ *Aureobasidium pullulans Clostridium thermocellum* (Biely, 1985) *Aspergillus oryzae* (Bailey and Poutanen, 1989) และ *Trichoderma reesei* (Gomerith et al., 1992) ปัญหาของการนำเอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรม คือต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสค่อนข้างสูง สาเหตุหลักนั้นมาจากการใช้ไซแลนบริสุทธิ์ซึ่งมีราคาแพงเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีผู้สนใจหาแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นที่มีราคาถูกมาทดแทนการใช้ไซแลน เช่น นำวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่มีไซแลนเป็นส่วนประกอบมาใช้ผลิตเอนไซม์ ซึ่งนอกจากจะลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์แล้ว ยังลดปริมาณการใช้สารเคมีอีกด้วย และยังช่วยส่งเสริมการนำเอนไซม์ไปใช้ในอุตสาหกรรม นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้วการผลิตเอนไซม์ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น เช่น แหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งตัวชักนำที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์

Trichoderma reesei เป็นเชื้อราที่มีความสำคัญและนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรม สามารถผลิตได้ทั้งเซลลูเลสและไซแลนเนส (Gome et al., 1992; Pilon et al., 1982; Tan et al., 1987) และเป็นเชื้อราที่ง่ายต่อการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตไซแลนเนสจาก *T. reesei* โดยใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่มีไซแลนเป็นส่วนประกอบ เพื่อทดแทนการใช้ไซแลนบริสุทธิ์ที่มีราคาแพง ซึ่งนอกจากจะเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการผลิตเอนไซม์แล้วยังสามารถกำจัดขยะอันเกิดจากวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรด้วย และเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนในวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรแต่ละชนิดที่นำมาใช้ เพื่อทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนต่อการชักนำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *T. reesei* โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่มีไซแลนเป็นส่วนประกอบ โดยมีการวิเคราะห์ปริมาณเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนในวัสดุเหลือใช้จาก

การเกษตรที่นำมาใช้ เพื่อทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนต่อการชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อรา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถเพิ่มการผลิตไซแลนเนสที่ได้จาก *T. reesei* โดยใช้สารที่เหมาะสม และสภาวะที่เหมาะสม และสามารถนำวัสดุที่เหลือใช้จากการเกษตรมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการผลิตและไม่ก่อให้เกิดปัญหาทางมลพิษกับสิ่งแวดล้อม ลดการสะสมของขยะเพราะสามารถเปลี่ยนวัสดุทางการเกษตรให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าได้ และทราบองค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสับสเตรทต่อการชักนำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์

งานวิจัยนี้ได้มุ่งศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดย *T. reesei* โดยทดสอบกับวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ รวมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรแต่ละชนิด และศึกษาถึงผลของแหล่งไนโตรเจนและสารที่สามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อราได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

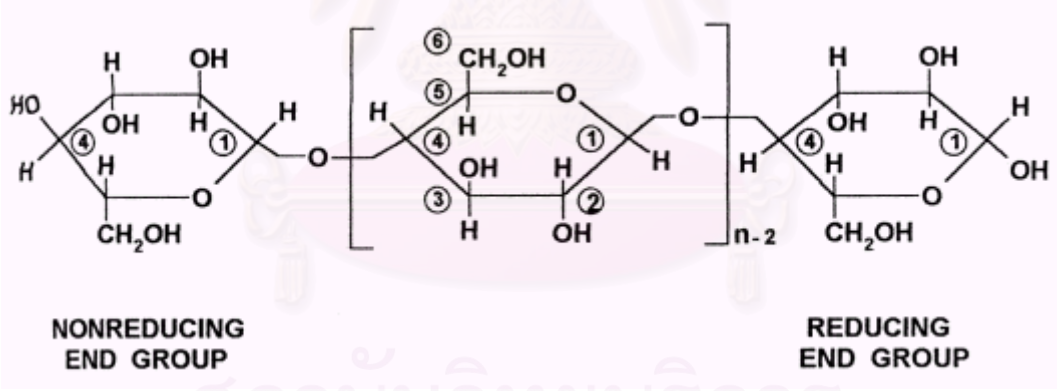
บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

พืชเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญ ที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ในส่วนของผนังเซลล์พืชประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์หลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Harada and Cote, 1985)

เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่พบมากที่สุดในเซลล์พืชในปริมาณ 40-45เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง โครงสร้างหลักประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ บีตา-1,4 ไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic) โมเลกุลของเซลลูโลส มีลักษณะเป็นเส้นตรง (ภาพที่ 1) ไม่มีแขนงย่อย มีสูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและมักพบรวมกับลิกนิน (Stephens and Heichel, 1975)



ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส (Cowling and Kirk, 1976)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตสหรือเฮกโซส ประกอบด้วยพอลีแซคคาไรค์หลายชนิดมาเชื่อมต่อกันเช่น

เพนโตแซน (pentosan) ส่วนใหญ่เป็นไซแลน (xylan) และอะราแบน (araban) ซึ่งไซแลนเป็นสารที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลสในปริมาณมากที่สุด

เฮกโซแซน (hexoxan) เช่น แมนแนน (mannan) กาแลคแตน (galactan) และกลูแคน (glucan)

โพลียูโรไนด์ (polyuronides) เป็นสารประกอบของกรดโพลียูโรนิค (polyuronic acid)

ลิกนิน

ลิกนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทพอลิฟีโนลิค (polyphenolic) โครงสร้างโมเลกุลส่วนใหญ่เป็นวงแหวน โมเลกุลลิกนินจะแทรกตัวอยู่ในช่องว่างระหว่างเส้นใยเซลลูโลส ลิกนินที่พบในส่วนของผนังเซลล์จะทำหน้าที่เสมือนเกราะป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ (Ericksson, Blanchette and Ander, 1990)

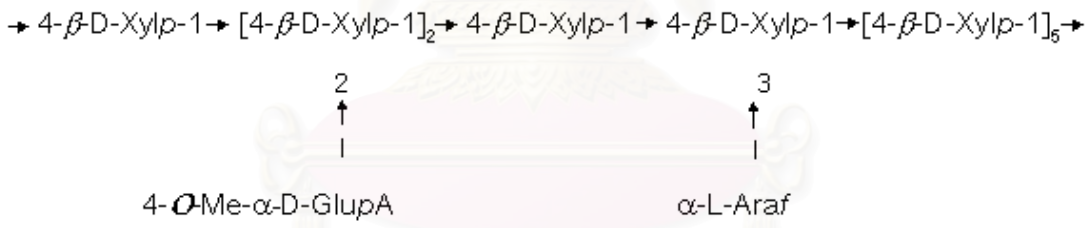
ไซแลน

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นเมื่อกล่าวถึงเฮมิเซลลูโลสมักหมายถึงไซแลน ไซแลนยึดเกาะกับส่วนของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน พบตามธรรมชาติ ทั้งในไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง พืชล้มลุกในส่วนของผนังเซลล์พืชชั้นปฐมภูมิ ปริมาณไซแลนและโครงสร้างจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา ในไม้เนื้อแข็งพบว่ามีปริมาณไซแลนมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เช่น ใน birch wood มีปริมาณไซแลนประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ในไม้เนื้ออ่อนมีปริมาณไซแลนประมาณ 7-12 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง รวมทั้งไม้ล้มลุกและวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร เช่น ฟ้าย รำข้าว ซังข้าวโพด ฟางข้าว และในเปลือกเมล็ดธัญพืชต่างๆ มีไซแลนอยู่ประมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

ลักษณะโครงสร้างของไซแลน

ไซแลนเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลสิดิก(β-1,4-xylosidic) เป็นสายหลัก และมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นหรือโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ มาเชื่อมต่อเป็นสายโซ่กิ่ง ซึ่งสายโซ่กิ่งอาจประกอบด้วยหมู่อะราบิโนซิล (arabinosyl) กลูโคนิล (gluconyl) หรือหมู่อะซิทิล (acetyl)

ไซแลนที่พบในไม้เนื้ออ่อนส่วนใหญ่เป็นอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (arabinoglucuronoxylan) สายหลักประกอบด้วยน้ำตาลบีตาดี-ไซโลไพแรนโนส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา 1,4 โดยมี 4-โอ-เมททิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิค แอซิค (4-O-methyl-α--D-glucuronic acid) มาเชื่อมต่อกับสายหลักที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 2 ทุกๆ 2 หน่วยต่อ ไซโลส 10 หน่วย และแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนส (α-L-arabinofuranose) เชื่อมต่อที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 2 ดังภาพที่ 2 จำนวนไซโลสที่มาเชื่อมต่อกัน (degree of polymerization) ประมาณ 200 หน่วย



Glu = D-glucose

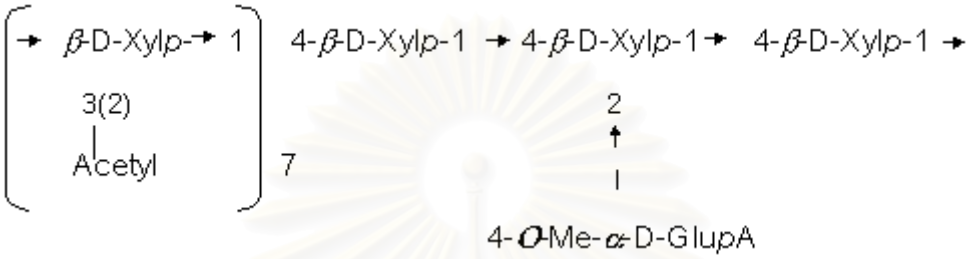
Xyl = D-xylose

Araf = L-arabinofuranose

p = pyranose

ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน (Ericksson et al., 1990)

ไซแลนที่พบในไม้เนื้อแข็งส่วนใหญ่เป็น โอ-อะซิทิล-4-โอ-กลูคูโรโน-บีตา–ดี-ไซแลน (*O*-acetyl-4-*O*-methyl-glucurono-*β*-D-xylan) เรียกสั้นๆ ว่า กลูคูโรโนไซแลน สายหลักประกอบด้วยบีตา-ดี-ไซโลไพแรนโนสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1,4 ไซโลซิดิก มีหมู่อะเซทิลเชื่อมต่อที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ทุกๆ 7-10 หน่วยของน้ำตาลไซโลส และ 4-โอ-เมททิล-แอลฟา-ดี-กลูคู-โรนิค แอซิด เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,2 ทุกๆ 10 หน่วยของไซโลส ดังภาพที่ 3



Glu = D-glucose

Xyl = D-xylose

p = pyranose

ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง (Ericksson et al., 1990)

การย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลน

การย่อยสลายเซลลูโลส

การย่อยสลายเซลลูโลส สามารถทำได้โดยใช้สารเคมี เช่น กรด หรือด่าง และย่อยโดยใช้เอนไซม์ เอนไซม์ที่ใช้คือ เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งส่วนใหญ่จะได้จากเชื้อรา และแบคทีเรีย เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีหลายองค์ประกอบทำงานร่วมกัน ดังนี้

1. Exoglucanase หรือ cellobiohydrolase หรือ 1,4-*β*-D-glucan cellobiohydrolase (EC.3.2.91) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสโดยตัดพันธะ *β*-1,4-ไกลโคซิดิก จากปลายด้าน non-reducing ได้เป็นเซลโลไบโอสและกลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

2. Endoglucanase หรือ 1,4-β-D-glucan 4-glucanohydrolase (EC.3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส โดยตัดพันธะ β-1,4-ไกลโคซิดิก แบบสุ่มได้เซลโลไบโอสและกลูโคสเป็น ผลิตภัณฑ์สุดท้าย

3. β-glucosidase หรือ β-D-glucoside-4-glucohydrolase หรือ cellobiase (EC.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถทำได้ 2 วิธี คือการย่อยด้วยสารเคมี (chemical hydrolysis) และการย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) หรือใช้ทั้ง 2 วิธีร่วมกัน

1. **การย่อยสลายไซแลนด้วยสารเคมี** สามารถทำได้ 2 วิธี ดังนี้

1.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด (acid hydrolysis)

การย่อยสลายไซแลนด้วยกรดอาจใช้กรดแก่เช่นกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริก ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือน้ำตาลไซโลส การย่อยสลายไซแลนด้วยกรดเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรุนแรงและไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษ เช่น เฟอฟูรัล (furfural) ซึ่งมีผลต่อการนำไปเลี้ยงจุลินทรีย์ และยังต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ทนต่อความเป็นกรดและอุณหภูมิสูงได้ ซึ่งอุปกรณ์ที่สามารถทนต่อกรดและอุณหภูมิสูงได้มักมีราคาแพง

1.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง (alkaline hydrolysis)

การย่อยสลายไซแลนด้วยด่างมักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการทำกระดาษ ในขั้นตอนการทำเยื่อกระดาษ โดยการนำชิ้นไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เพื่อให้ไม้ยุ่ยและกำจัดลิกนินที่อยู่ในชั้นของลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ออกบางส่วน ในขั้นตอนนี้ เฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อยออกมาและปนอยู่ในน้ำทิ้ง หลังจากนั้นจะนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยใช้สารเคมีที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide) ก๊าซคลอรีน (Cl_2) ที่อุณหภูมิสูงไม่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียสและความเป็นกรดด่างไม่ต่ำกว่า 10 ทำให้เกิดสารพิษพวกไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบคลอไรด์ที่เป็นพิษชนิดอื่นๆ ด้วย (Germgard and Larsson, 1983)

2. การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงกว่าการใช้สารเคมีในการย่อยสลาย เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรท (substrate) ในปฏิกิริยานั้นๆ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีความบริสุทธิ์สูง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในสภาวะเป็นกลางที่อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างที่สิ่งมีชีวิตสามารถเจริญเติบโตได้ จึงไม่จำเป็นต้องใช้ภาชนะที่ทนต่อความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิสูง และไม่ก่อให้เกิดสารประกอบเป็นพิษและสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายพันธะ-1,4 ของสายหลักของไซแลนเพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลส มีอยู่ 2 ชนิด ใหญ่ๆ คือ

1. เอนโดไซแลนเนส (endoxylanase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan-xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะ1,4-บีตา-ดี-ไซโลซิดิกแบบสุ่ม ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้เป็นไซโลสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ

2. บีตาไซโลซิเดส (β-xylosidase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan-xylohydrolase; EC 3.2.1.37) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะ1,4-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ทีละ 1 หน่วย จากปลายสายด้านนอนรีดิวซ์ (non-reducing end) ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้เป็นไซโลส

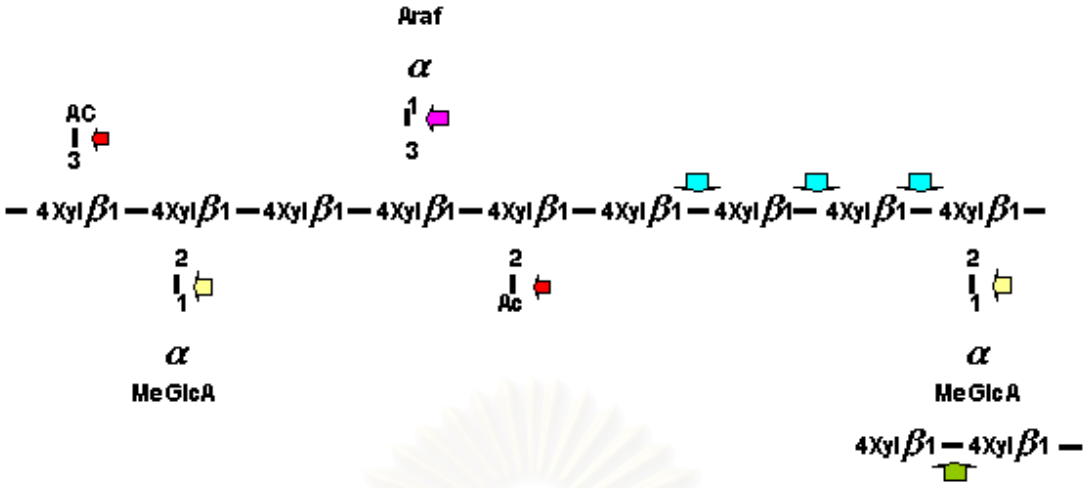
เนื่องจากโครงสร้างของไซแลนประกอบด้วยมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นมาเชื่อมต่อ ดังนั้นในการย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น

เอนไซม์แอลฟา-แอล-อะราบิโนซิเดส (α-L-arabinosidase; EC 3.21.55) จะย่อยสลายหมู่นอน-รีดิวซ์-แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนส ของ แอลฟา-แอล-อะราบิฟิวราโนไซด์ อะราบิแนน และอะราบิโนกาแลคแตน ได้น้ำตาลที่เป็นพันธะกิ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

เอนไซม์แอลฟา-ดี-กลูคูโรโนสิเดส (α-D-glucuronosidase; EC 3.2.1.1) จะย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ใน 4-โอ-เมททิล-ดี-กลูคูโรนิค แอซิค

เอนไซม์อะเซติล (ไซแลน) เอสเทอเรส (acetyl (xylan) esterase); EC 3.1.1.6) จะย่อยสลายพันธะ-1,2 และบีตา-1,3 ที่เชื่อมหมู่อะเซทิลกับสายหลัก ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดอะซิติก

จากเอนไซม์ทั้งหมดที่กล่าวมาสามารถแสดงแผนภาพการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนได้ดังภาพที่ 4



Ac = Acethyl

Araf = L-arabinofuranose

MeGlcA = 4-O-methyl-α-D-glucuronic acid

Xyl = D-xylose

ภาพที่ 4 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายไซแลน

ที่มา (Biely, 1985)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คุณสมบัติของเอนไซม์ไซแลนเนส

เอนไซม์ไซแลนเนสมีน้ำหนักโมเลกุลไม่ใหญ่มากคือไม่เกิน 10,000 ดาลตัน มีความจำเพาะเจาะจงต่อไซแลน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส ทนต่อความเป็นกรดด่างในช่วงกว้าง โดยจะอยู่ในช่วง pH 4.0-9.0

การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไซแลนเนส

จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสแล้วขับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) แต่ก็มีบางชนิดที่ผลิตเอนไซม์เป็นแบบ intracellular enzyme อาทิเช่น *Aspergillus niger* (Iwamoto, Sasaki and Inaoka, 1973) การผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเริ่มผลิตในระยะ stationary phase ไซแลนเนสเป็นเอนไซม์หนึ่งที่มีความสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรม เมื่อพืชถูกนำไปใช้ในการเกษตรและอุตสาหกรรมจะมีส่วนที่เหลือทิ้ง เช่น ฟางข้าว กากรำข้าว เปลือกเมล็ดพืชต่างๆ เป็นต้น ดังนั้นเอนไซม์ไซแลนเนสจึงเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายวัสดุที่เหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมได้ ซึ่งนอกจากจะช่วยลดการเกิดมลภาวะทางน้ำและทางอากาศจากการทิ้งหรือเผาวัตถุดิบเหล่านี้แล้ว น้ำตาลไซโลสที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นสารให้รสหวาน เรียกอีกอย่างหนึ่งว่าน้ำตาลจากไม้ (wood sugar) ที่มีสูตรเคมี $C_5H_{10}O_5$ มีจุดหลอมเหลว 144-145 องศาเซลเซียส ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายประการ เช่น ผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) ผลิตเชื้อเพลิง เช่น เอธทานอล บิวทานอล ผลิตไซลิทอล เป็นต้น (Biely, 1985; Magee และ Kosaric, 1985; Gilbert and Hazlewood, 1993)

นอกจากนั้น ยังมีการนำไซแลนเนสไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมกระดาษ การเตรียมเยื่อกระดาษและการฟอกสีเยื่อกระดาษให้ขาวขึ้น เนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมเยื่อกระดาษโดยนำชิ้นไม้มาต้มในสารละลายด่างเข้มข้น เฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อยและละลายอยู่ในสารละลายและจะกลับมารวมตัวกับลิกนินเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้การกำจัดลิกนินทำได้ยากขึ้น เมื่อนำเอนไซม์มาใช้ในขั้นตอนการเตรียมเยื่อจะทำให้เยื่อที่ได้มีค่าความขาวสว่าง (brightness) เพิ่มมากขึ้น และสามารถลดการใช้สารเคมีที่ใช้ในการฟอกเยื่อได้อีกด้วย ซึ่งในกรณีดังกล่าวต้องการไซแลนเนสที่ไม่มีการปนเปื้อนของเซลลูเลส (Beily, 1985) ซึ่งมีรายงานตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไม่พบแอคติวิตีของเซลลูเลสดังนี้ *Aspergillus nidulans* (Femandez-Espinar et al., 1994) *Bacillus* sp. BP-23 (Blanco, Colom and Javier pastor, 1995), *Bacillus* sp. K-1 (Ratanakhanokchai, 1999) *Bacillus*

amyloliquefaciens (Breccia et al., 1998) *Cephalosporium* sp. RYM-202 (Kang, Maeng and Rhee, 1996) *Streptomyces halstedii* JM8 (Ruiz-Arribas, 1995) *Trichoderma reesei* PC-3-7 (Xu et al., 1998)

เอนไซม์ไซแลนเนสพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ยีสต์ รา แบคทีเรีย โปรโตซัว แมลงบางชนิด และพืช เอนไซม์กลุ่มนี้ที่นิยมนำมาศึกษามักมาจากจุลินทรีย์ เนื่องจากเจริญได้รวดเร็ว เพาะเลี้ยงง่าย จุลินทรีย์บางสายพันธุ์จะสร้างและปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ แต่บางสายพันธุ์จะสร้างและเก็บไว้ภายในเซลล์ ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซแลนเนส แสดงในตารางที่ 1

การผลิตและปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซแลนเนสโดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

1. แหล่งคาร์บอนที่สามารถชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์

ไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถชักนำให้เกิดขึ้นได้ (inducible enzyme) จุลินทรีย์ที่ผลิตไซแลนเนสได้ส่วนใหญ่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งจุลินทรีย์จะผลิตเซลลูเลสหรือไซแลนเนสเป็นหลักขึ้นกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ Royer และ Nakas (1990) รายงานว่าในการเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma longibrachiatum* นั้น ถ้าต้องการให้สร้างไซแลนเนส จะใช้ ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ถ้าต้องการให้สร้างเซลลูเลสต้องใช้คาร์บอกซี-เมททิลเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และเนื่องจากวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรมีไซแลนเป็นองค์ประกอบสูงถึง 20-40 เปอร์เซ็นต์ จึงมีผู้สนใจนำวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) ได้แยก *Streptomyces* sp. ที่ผลิตไซแลนเนสและบีตาไซโลซิเดสจากแหล่งดินในประเทศไทย พบว่า *Streptomyces* sp. PC22 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างไซแลนเนสได้สูงสุด โดยพบว่าการเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและมีไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน *Streptomyces* sp. PC22 สร้างไซแลนเนสได้ 14.68 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรคือกากเมล็ดฝ้ายมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับไซแลน โดยเมื่อใช้กากเมล็ดฝ้าย 2.5 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไซแลน 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. PC22 ก็ยังสามารถสร้างไซแลนเนสได้สูงถึง 12.66 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซแลนเนส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus awamori	Tenkanen, Ratto and Viikari,1993
A. foetidus	Biely and Poutanen, 1989
A. fumigatus	Lindner, Stulket and Hecker, 1994
A. niger NCIM 1207	Gokhale , Puntambekar and Deobagkar, 1986
A. oryzae	Tenkanen et al., 1993
A. terreus	Biely and Poutanen, 1989
Aureobasidium pullulans	Karni et al., 1993
Bacillus circulans	Ratto et al., 1992
B. stearothermophilus	Nanmori et al., 1990
B. subtilis	Lindner et al., 1994
Clostridium acetobutyricum ATCC 824	Lee and Forsberg, 1987
Cryptococcus albidus	Biely, Vrsanska and Kratky, 1980
Nocardiopsis dassonvillei	Tsujibo et al., 1990
Prevotella ruminicola	Flint et al., 1997
Schizophyllum commune	Paice et al., 1978
Streptomyces sp.S38	Georis et al., 1999
S. lividans	Dupont et al., 1998
Streptomyces roseiscleroticus	Grabski and Jeffries; 1991
Trichoderma harzianum	De Paula Silveira et al., 1999
T. longibrachitum	Royer and Nakas, 1990
T. reesei PC-3-7	Xu et al., 1998

Gome และคณะ (1992) ทำการแยกเชื้อ *Trichoderma viride* จากเศษปอกระเจาที่ทับถมกัน พบว่าในอาหารที่มี sulphite pulp เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถชักนำการสร้างเอนไซม์บีตา-ไซแลนเนสได้สูงสุด คือ 190.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่ในขณะเดียวกันก็สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสสูงด้วย (0.56 หน่วยต่อมิลลิลิตร) แต่ถ้าใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำ (0.15 หน่วยต่อมิลลิลิตร) เมื่อนำเศษวัสดุเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเปลือกจากข้าวบาร์เลย์ หนังสือพิมพ์ และฟางข้าวสาลี (wheat straw) สามารถชักนำการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสได้ โดยให้แอคติวิตี 111.2 92.4 72.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนแกลบ (rice husk) ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสต่ำสุด คือ 37.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Karni และคณะ (1993) เลี้ยง *Aureobasidium pullulans* ในอาหารที่มีกลูโคส ฟรุกโตส ไซแลน หรือไซโลส พบว่าเชื้อจะสร้างเอนไซม์บีตาไซแลนเนสเมื่อใช้ไซแลนหรือไซโลสเท่านั้น และสามารถใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร เช่น รำข้าวสาลี ฟางข้าว ชานอ้อย มาเป็นแหล่งคาร์บอน โดยรำข้าวสาลีให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุด คือ 10.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนฟางข้าวและชานอ้อยให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส 5.1 และ 0.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร

นอกจากนี้ Beg และคณะ (2000) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Streptomyces* sp QG-11-3 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสที่ปราศจากเซลลูเลสได้ โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร คือ รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสสูง (96 และ 82 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดีพอๆ กับไซแลน (81 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

2. แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

แหล่งไนโตรเจนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา จากรายงานการศึกษาแหล่งของไนโตรเจนที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อสร้างเอนไซม์ไซแลนเนส Svarachorn (1999) ใช้ NH_4NO_3 0.8 เปอร์เซ็นต์ในการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Aspergillus fumigatus* 4-45-1F ได้ดีพอๆ กับการใช้สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) Bailey และ Poutanen (1989) นำ distiller's spent grain มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยง *Aspergillus* 7 สายพันธุ์

Bailey Buchert และViikari (1993) นำ spray-dried corn steep solids (CSS) หรือ distiller's spent grain มาเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า CSS เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการสร้างไซแลนเนสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* ให้ค่าแอคติวิตี 5400 ($nkatml^{-1}$) โดยมี Birch glucuronoxylan เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนั้น Watcharachai (1998) ศึกษาใน *T. reesei* Rut

C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งไนโตรเจน เปรียบเทียบกับการใช้ corn steep solid ซึ่งรำข้าวสาลีให้แอคติวิตีน้อยกว่าการใช้ corn steep solid

3. ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นแตกต่างกันคือ จุลินทรีย์จำพวกรามักจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ เช่น *Aspergillus awamori* และ *Thermoascus aurantiacus* เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0 (Smith and Wood, 1991; Gomes, Gomes and Steiner, 1994) *Trichoderma reesei* เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 แอคติโนมัยสีทจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกลาง เช่น *Streptomyces* T7 เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 (Ross et al., 1992) *Thermomonospora fusca* สามารถผลิต ไซแลนเนสได้ดีเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 9.0 (Bachmann and McCarthy, 1989)

4. อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างไซแลนเนส ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 30-35 องศา-เซลเซียส เช่น *Trichoderma reesei Aspergillus* และ *Bacillus circulan* สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดีที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (John and Schmidt, 1979; Ratto et al., 1992)

5. ตัวชักนำ (inducer)

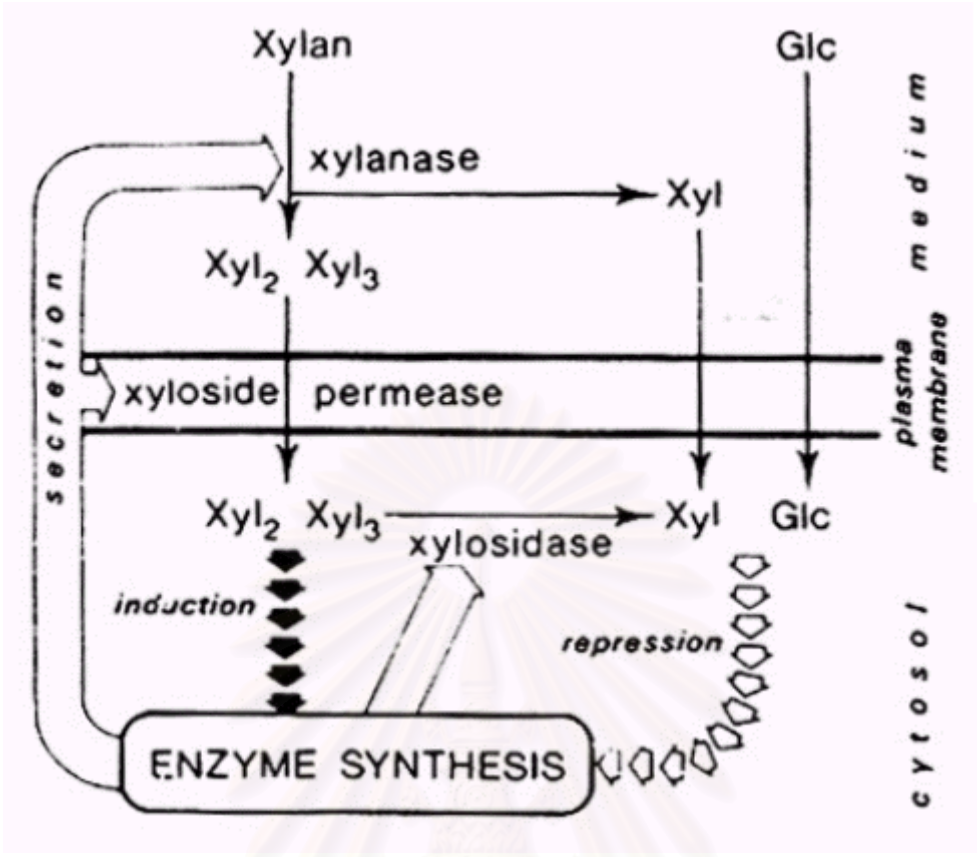
นอกจากปัจจัยดังกล่าวเบื้องต้นแล้ว ตัวกระตุ้นเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารถเพิ่มความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสของจุลินทรีย์ได้ เอนโดไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษามากที่สุดในกลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส ข้อมูลเบื้องต้นพบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสและเอนไซม์เซลลูเลสถูกควบคุมด้วยยีนตำแหน่งเดียวกันทำให้การผลิตเอนไซม์จะมีความสอดคล้องกัน แต่มีผู้ขัดแย้งในภายหลังว่าการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสและเซลลูเลสใน *T. reesei* ถูกควบคุมด้วยยีนต่างกัน การควบคุมการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้าง

เอนไซม์เซลลูเลส เช่น เมื่อนำจุลินทรีย์มาเลี้ยงในอาหารที่มีเซลลูโลส จะมีการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนส ในปริมาณที่เล็กน้อยเท่านั้น อย่างไรก็ตามความรู้ในเรื่องนี้ยังไม่ชัดเจน

Biely และ Petrakova (1985) ศึกษารูปแบบการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสและบีตาไซโลซิเดสของยีสต์ *Cryptococcus albidus* พบว่าจุลินทรีย์จะปลดปล่อยเอนไซม์ไซแลนเนสออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายไซแลนให้เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ จากนั้นนำเอาไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เข้าสู่เซลล์ด้วยระบบแอคทีฟ ทรานสปอร์ต (active transport) ต่อจากนั้นบีตาไซโลซิเดสภายในเซลล์จะทำงานต่อเพื่อย่อยสลายให้เกิดน้ำตาลไซโลส ซึ่งจุลินทรีย์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป เอนไซม์ไซแลนเนสสามารถถูกกระตุ้นได้โดยไซโลไบโอส และไซโล- ไตรโอส ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไซแลน จากนั้นไซโลไบโอสและไซโลไตรโอสมีผลไปกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสเพิ่มขึ้น เมื่อผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือไซโลสมีปริมาณที่มากเกินไปจะมีผลไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสให้น้อยลงได้

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าตัวกระตุ้นที่รู้จักกันดีคือไซโลไบโอส และ β-methyl-D-xyloside นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาถึงตัวกระตุ้นชนิดอื่นเช่น Haltrich Sebesta และSteiner (1995) รายงานว่าเอนไซม์จะถูกสร้างขึ้นในปริมาณหนึ่งโดยที่ไม่จำเป็นต้องได้รับการกระตุ้น จากนั้นทดลองนำแซคคาไรด์หลายๆ ชนิดทั้งที่มีโมเลกุลเดี่ยวและแซคคาไรด์สายสั้นมาใช้ในการชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสและเซลลูเลส จาก *Schizophyllum commune* พบว่า sophorose lactose และ 4-O-β-galactopyranosyl-D-mannopyranose สามารถชักนำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสได้อย่างมีนัยสำคัญ ไซแลนเนสยังถูกชักนำได้โดยใช้ β-methyl-D-xyloside ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับไซโลไบโอสได้อีกด้วย นอกจากนั้น β-methyl-D-xyloside ยังใช้เป็นตัวชักนำในการสร้างเอนไซม์ไซโลซิเดสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายไซแลนที่สำคัญได้อีกด้วย (Kristufek, Zeilinger and Kubick, 1995)

นอกจากนี้ Bailey และPoutanen (1989) ยังใช้ β-methyl-D-xyloside เป็นตัวชักนำและเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส จากเชื้อ *Aspergillus foetidus* VTT.D71002 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสโดยไม่มีการสร้างเซลลูเลสได้อีกด้วย



Glc = D-glucose

Xyl = D-xylose

Xyl_2 = Xylobiose

Xyl_3 = Xylotriose

ภาพที่ 5 กลไกของการย่อยสลายไซแลนของ *Cryptococcus albidus*

(ที่มา: Biely, 1985)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น NovaSpec 4049 (LKB Biochrom, England)

2. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Steam sterilizer/Autoclave) (Ta Chang Medical Instrument Factory, Taiching, Taiwan)

3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) Model universal 16 (Hettich, Germany)

4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) model SS40-2 Ambient (Grant Instruments (Cambridge) Ltd., England)

5. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (รุ่น E5 EA) (OMROM)

6. เครื่องเขย่า

7. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow

8. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น U4600P (Scientific Promotion Co. Ltd.)

9. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น Mettler H10 (Scientific Promotion Co. Ltd.)

10. เครื่องค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) รุ่น ion analyzer 255 (Corning, USA)

เคมีภัณฑ์

เคมีภัณฑ์สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ (Carlro Erba Reagent)

2. วุ้นผง (agar) (Difco)

3. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) (Calro Erba reagent)

4. แคลเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($CaHPO_4$) (Fluka)

5. corn steep liquor (Sigma)

6. เฟอรัสซัลเฟต($FeSO_4$) (M&B)

7. ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) (M&B)

8. แมงกานีสซัลเฟต (MnSO4) (M&B)

9. โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) (M&B)

10. แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) (Fluka)

11. ยูเรีย ($CO(NH_2)_2$) (Fluka)

12. peptone (Difco)

13. รำข้าวเจ้า (จากโรงสีข้าว จังหวัดอยุธยา)

14. รำข้าวสาลี (บริษัทโลวานโฮลฟูดส์พีทีวาย จำกัด)

15. ชานอ้อย (ร้านน้ำอ้อย เพชรบุรี ซอย7 เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร)

16. เปลือกถั่วลิสง (จากตลาดสะพานขาว เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร)

เคมีภัณฑ์ที่ใช้สำหรับวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (M&B)

2. โซเดียมไบซัลไฟด์ ($NaHSO_3$) (M&B)

3. 3,5-dinitrosaliccylic acid ($C_7H_4N_2O_7$) (Sigma)

4. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต ($COOK(CHOH)_2COONa$) (Fluka)

5. ฟีนอล (C_6H_6O) (Merck)

เคมีภัณฑ์ที่ใช้สำหรับวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส

1. โซเดียมคาร์บอนเนต (Na_2CO_3) (Carlo Erba)

2. โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทต $COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$) (Rochelle salt)

3. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) (Carlo Erba)

4. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) (Carlo Erba)

5. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) (Carlo Erba)

6. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) (AnalaR)

7. แอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) (Mallinckrodt)

8. โซเดียมไฮโดรเจนไดโซเดียมอาซีเนท ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) (M&B)

9. ไซแลน (Sigma)

เคมีภัณฑ์ที่ใช้สำหรับเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1. กรดซิตริก ($C_3H_4(OH)(COOH)_3$ (M&B)
2. ไตรโซเดียมซิเตรต ($C_6H_5O_7Na_3$) (Carlo Erba)
3. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) (Carlo Erba)
4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) (Carlo Erba)

เชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อรา *Trichoderma reesei* Rut C-30 จากห้องปฏิบัติการพฤกษศาสตร์เชิงอุตสาหกรรม (plant biomass utilization) ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *T. reesei* Rut C-30

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ตัดชิ้นวุ้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ย้ายมาเลี้ยงในอาหาร PDB (Potato Dextrose Broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยเฉลี่ยทุกวัน จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟการเจริญเติบโต (growth curve) เพื่อหาระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโตของเชื้อรา

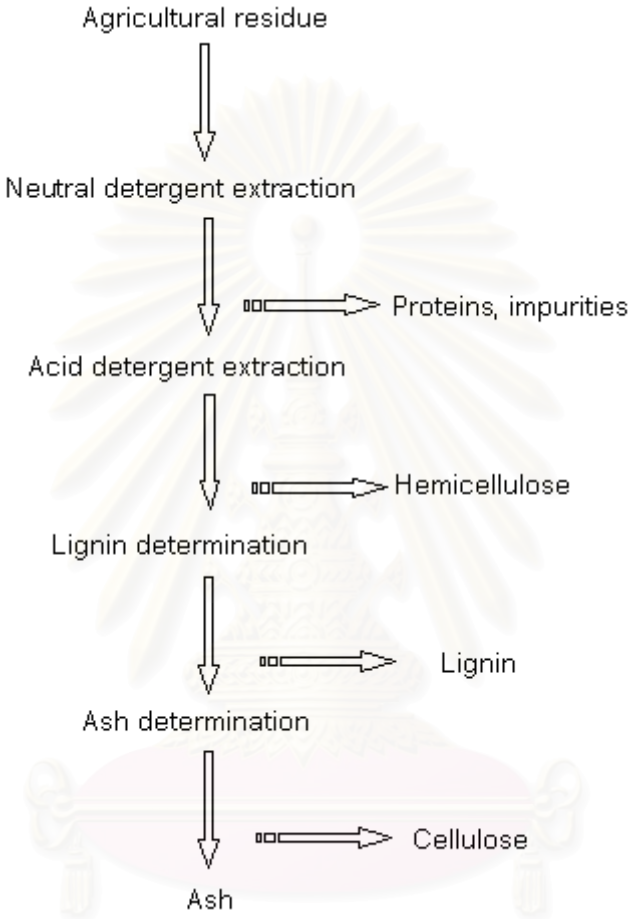
2. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร

2.1 วิเคราะห์หาปริมาณเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนในวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร

นำวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร 4 ชนิดได้แก่ รำข้าวสาลี ชานอ้อย เปลือกถั่วลิสง และรำข้าวเจ้า มาวิเคราะห์หาปริมาณเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนตามวิธีของ Goering และVan Soest (1970) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ (ภาพที่ 6)

2.1.1 การสกัดโปรตีนและส่วนที่ไม่ต้องการ (impurities) ด้วยกระบวนการ Neutral Detergent Extraction โดยนำวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรมาสกัดด้วย Neutral Detergent Solution (NDS) (ภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

จากนั้นนำมา กรองและอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน desiccator ที่อุณหภูมิห้อง ชั่งหาน้ำหนักที่หายไปเทียบกับน้ำหนักแห้งตั้งต้น โดยน้ำหนักที่หายไปคือน้ำหนักของโปรตีนและส่วนที่ไม่ต้องการ



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร

2.1.2 การสกัดเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนด้วยกระบวนการ Acid Detergent Extraction นำตะกอนที่ได้จากข้อ 2.1.1 มารีฟลักซ์ด้วย Acid Detergent Solution (ADS) (ภาคผนวก ข) และ decalin ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยน้ำร้อน 90-100 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง และล้างด้วย ethanol 80 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง นำมากรองและอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน desiccator ที่

อุณหภูมิห้อง ผลต่างระหว่างน้ำหนักที่ชั่งได้เทียบกับน้ำหนักที่ชั่งได้จากข้อ 2.1.1 จะเท่ากับน้ำหนักของเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลน

2.1.3 การสกัดลิกนินด้วยกระบวน Lignin Determination นำตะกอนส่วนที่ได้จากข้อ 2.1.2 มาสกัดแยกลิกนินออกด้วย permanganate-buffer solution (ภาคผนวก ข) และผ่านกระบวนการ demineralization กรองตะกอนที่ได้หลังจากผ่านกระบวนการข้างต้น นำมาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน desiccator ที่อุณหภูมิห้อง ผลต่างระหว่างน้ำหนักที่ชั่งได้เทียบกับน้ำหนักที่ชั่งได้จากข้อ 2.1.2 จะเท่ากับน้ำหนักของลิกนิน

2.1.4 การหาปริมาณเซลลูโลส ด้วยกระบวนการ Ash Determination นำตะกอนที่ได้จากข้อ 2.1.3 มาเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน desiccator ที่อุณหภูมิห้อง ผลต่างระหว่างน้ำหนักที่ชั่งได้เทียบกับน้ำหนักที่ชั่งได้จากข้อ 2.1.3 จะเท่ากับน้ำหนักของเซลลูโลส

3. ศึกษาชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

3.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน

3.1.1 การใช้เซลลูโลสร่วมกับวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน

ทดสอบการใช้เซลลูโลสร่วมกับวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งในการทดลองครั้งนี้เลือกรำข้าวสาลีเป็นตัวแทนของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีเซลลูโลส 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับรำข้าวสาลีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และมี corn steep liquor 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ตามสูตรอาหารของ (Bailey, Buchert and Viikari, 1993) ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 5 โดยใช้ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำอาหารให้มีสภาพปลอดเชื้อโดยนึ่งฆ่าเชื้อด้วยระบบความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทำการบ่มเชื้อโดยใช้เชื้อราเริ่มต้นจำนวน 5 ชิ้นวุ้น (เตรียมจากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 ที่เจริญบน PDA เป็นเวลา 7 วัน เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราที่เจริญเต็มที่โดยใช้เครื่องเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 1 เซนติเมตร) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน เก็บผลการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสทุก 3 วัน โดยใช้วิธีของ Ghose และBisaria (1987) และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้น โดยใช้วิธีของ Ghose (1987)

3.1.2 ศึกษาชนิดของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

เลี้ยงเชื้อราโดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรแต่ละชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ชานอ้อย เปลือกถั่วลิสง รำข้าวเจ้า และมี corn steep liquor 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ตามสูตรอาหารของ Bailey และคณะ (1993) (ภาคผนวก ก) ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 5 โดยใช้เชื้อราเริ่มต้นจำนวน 5 ชิ้นวุ้น นำไปบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน เก็บผลการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสทุก 3 วัน โดยใช้วิธีของ Ghose และ Bisaria (1987) และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้น โดยใช้วิธีของ Ghose (1987)

3.2 หาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

จากนั้นนำแหล่งคาร์บอนที่ได้จากข้างต้นมาหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน เก็บผลวิเคราะห์หาไซแลนเนสทุก 3 วัน โดยใช้วิธีของ Ghose และ Bisaria (1987) และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้น โดยใช้วิธีของ Ghose (1987)

4. ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อกระบวนการสร้างไซแลนเนส

เมื่อได้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือรำข้าวสาลี 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็น ammonium sulphate ammonium nitrate urea และ peptone ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน เก็บผลการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสทุก 3 วัน โดยใช้วิธีของ Ghose และ Bisaria (1987) และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้น โดยใช้วิธีของ Ghose (1987)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ผลของตัวชักนำที่มีต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

5.1 ศึกษาผลของการเสริมไซแลนหรือไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยใช้รำข้าวสาลี 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ไซแลนหรือไซโลสที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 12 วัน เก็บผลการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสทุก 3 วัน โดยใช้วิธีของ Ghose และ Bisaria (1987) และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้น โดยใช้วิธีของ Ghose (1987)

5.2 ศึกษาผลของ β-methyl-xyloside ต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

โดยใช้รำข้าวสาลี 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ β-methyl-xyloside ที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ1 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 12 วัน เก็บผลการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสทุก 3 วัน โดยใช้วิธีของ Ghose และ Bisaria (1987) และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้น โดยใช้วิธีของ Ghose (1987)

6. การวัดแอคติวิตีไซแลนเนส ตามวิธีการของ Ghose และ Bisaria (1987)

6.1 นำ crude enzyme ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

6.2 เติม 1 เปอร์เซ็นต์ไซแลน ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และ 50 mM phosphate buffer pH 7 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

6.3 นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6.4 เติม alkaline copper reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6.5 เติม arsenomolybdate reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

6.6 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 520 นาโนเมตร โดยใช้ 50 mM phosphate buffer เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลไซโลส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐานเพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

7. การวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส โดยการวิเคราะห์หา FPA (Filter Paper Assays) ตามวิธีของ Ghose (1987)

7.1 นำ crude enzyme ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

7.2 เติม 0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 1.0 x 6.0 เซ็นติเมตร (50 มิลลิกรัม) เขย่าให้เข้ากัน

7.3 นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

7.4 เติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent (ภาคผนวก ข)ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

7.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M sodium citrate buffer เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐานเพื่อนำไปคำนวณหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส จากสูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

8. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และนำค่าเฉลี่ยมาวิเคราะห์ความแตกต่างแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม BANANA

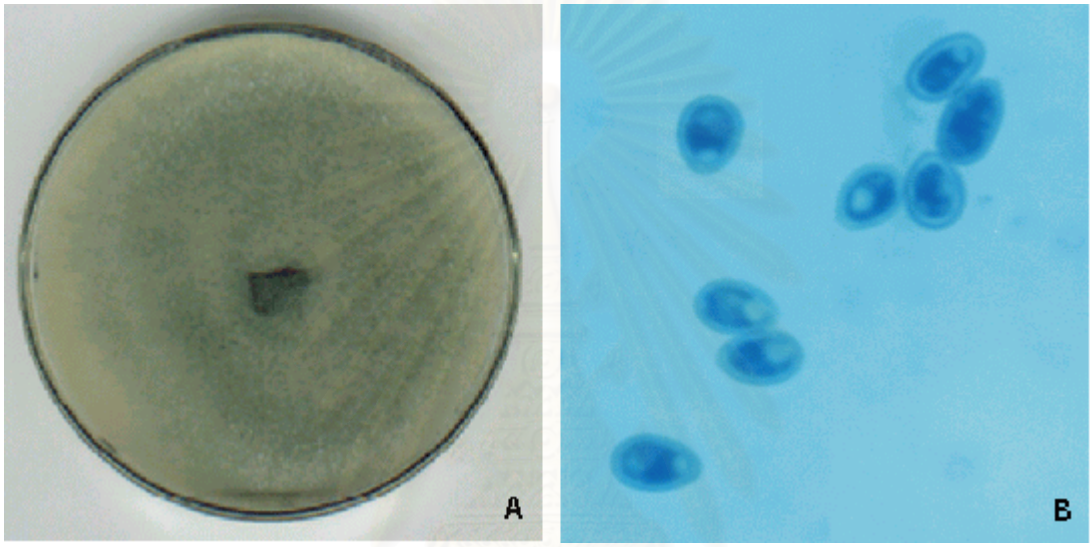
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

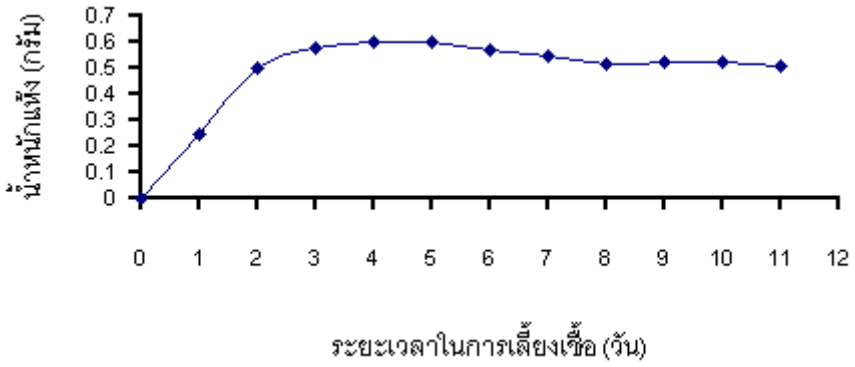
1. ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma reesei* Rut C-30

เชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ *Trichoderma reesei* Rut C-30 ซึ่งมีลักษณะดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 เชื้อรา *Trichoderma reesei* Rut C-30 (A) ลักษณะโคโลนี (B) ลักษณะสปอร์ (430 เท่า)

จากการศึกษาการเจริญเติบโตโดยเลี้ยงเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma reesei* Rut C-30 ในอาหาร PDB นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโต จากผลการทดลองพบว่าเส้นใยเชื้อรา *T. reesei* Rut C-30 มีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 2 ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อรามีการเจริญในระยะ log phase โดยในวันที่ 3 น้ำหนักของเส้นใย เพิ่มขึ้นสูงสุด และน้ำหนักเริ่มคงที่อยู่ในช่วงวันที่ 3-6 และวันที่ 3 ของการเจริญเป็นระยะที่เชื้อรา *T. reesei* Rut C-30 มีการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase และช่วง stationary phase ยังคงดำเนินไปจนกระทั่งถึงวันที่ 6 หลังจากนั้น น้ำหนักแห้งของเส้นใยจะเริ่มลดลงในวันที่ 7 ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma reesei* Rut C-30 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB

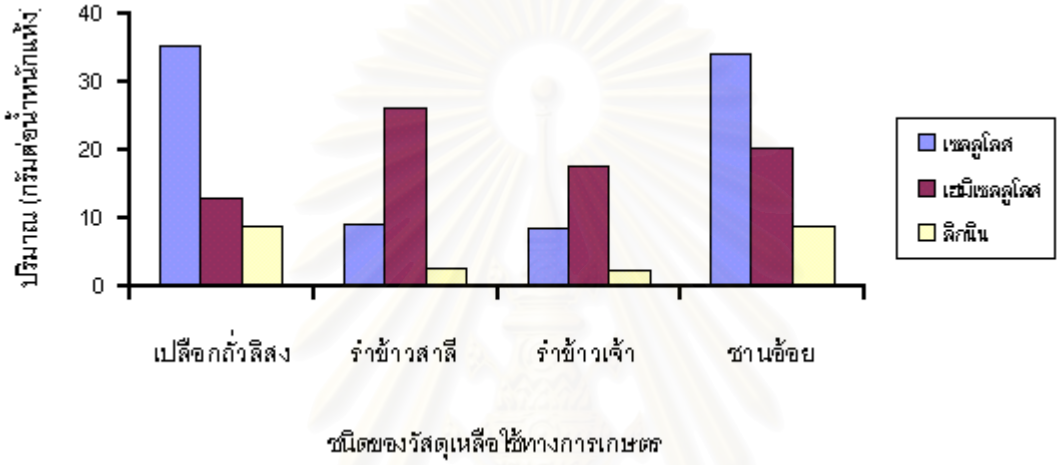
2. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร

เนื่องจากวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่นำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน รวมทั้งมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร ซึ่งพบว่าเปลือกถั่วลิสงมีปริมาณเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบมากที่สุดคือ 35.13 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับชานอ้อย คือ 34.08 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ส่วนรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้ามีปริมาณเซลลูโลสน้อยคือ 9.07 และ 8.30 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบที่เป็นเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลน พบว่ารำข้าวสาลีมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนมากที่สุด คือ 26.10 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือชานอ้อย รำข้าวเจ้า และเปลือกถั่วลิสง โดยมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนเท่ากับ 20.31 17.58 และ12.96 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนปริมาณลิกนินพบว่าเปลือกถั่วลิสงมีปริมาณลิกนินมากที่สุดคือ 9.04 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือชานอ้อยซึ่งมีปริมาณลิกนินถึง 8.93 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ส่วนรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้ามีปริมาณลิกนินน้อยคือ 2.74 และ 2.38 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ

ชนิดของวัสดุทางการเกษตร	ปริมาณองค์ประกอบ (กรัมต่อน้ำหนักแห้ง)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ชานอ้อย	34.08	20.31	8.93
เปลือกถั่วลิสง	35.13	12.96	9.04
รำข้าวเจ้า	8.30	17.58	2.38
รำข้าวสาลี	9.07	26.10	2.74



ภาพที่ 9 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ศึกษาชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่มีผลต่อกระบวนการสร้างไซแลนเนส

3.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ต้องการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส ให้ได้ปริมาณที่สูงแต่ในขณะเดียวกันก็ต้องการให้มีปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำ ดังนั้นนอกจากจะวัดปริมาณการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสแล้วยังต้องมีการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้นในทุกๆ การทดลอง

3.1.1 การใช้เซลลูโลสร่วมกับวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน

ทำการศึกษาเบื้องต้นถึงปริมาณการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส เมื่อใช้เซลลูโลส 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับการใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลือกวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่นำมาทดสอบคือรำข้าวสาลี โดยใช้รำข้าวสาลี 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับเซลลูโลส 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารให้มีค่าเท่ากับ 5 เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน เก็บผลการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสทุก 3 วัน และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้น พบว่าเชื้อ *T. reesei* Rut C-30 ให้ผลการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสคงที่ โดยมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างการเสริมรำข้าวสาลีในอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน (ใช้รำข้าวสาลีอย่างเดียวให้แอคติวิตีของเอนไซม์ 23.682 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ใช้รำข้าวสาลีร่วมกับเซลลูโลสให้แอคติวิตีของเอนไซม์ 23.592 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 10 แต่เมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสพบว่ามีปริมาณสูงคือ 0.608 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการใช้รำข้าวสาลีเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 11 ดังนั้นจึงเลือกใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้เซลลูโลสโดยใช้ความเข้มข้นเบื้องต้น 2 เปอร์เซ็นต์

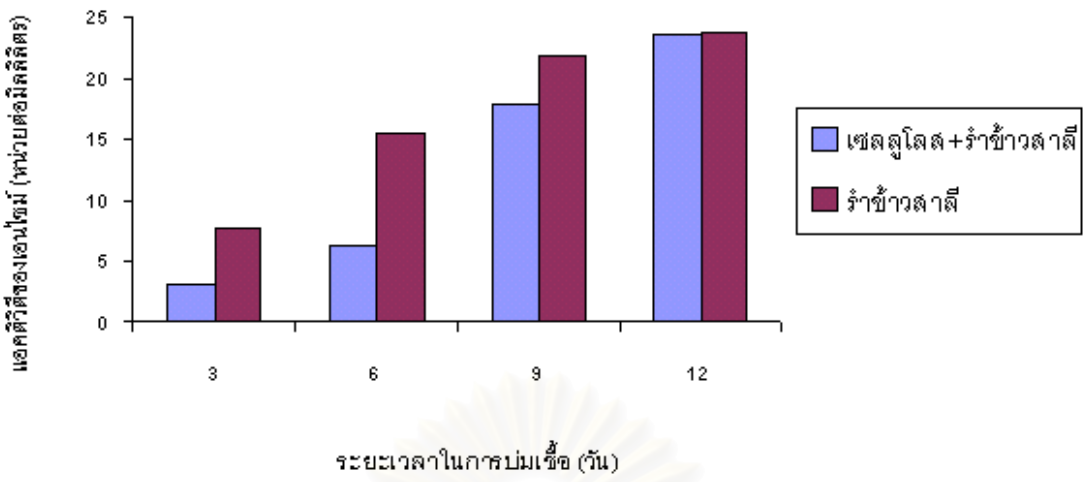
3.1.2 ศึกษาชนิดของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

จากการนำวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่นำมาใช้ได้แก่ ชานอ้อย เปลือกถั่วลิสง รำข้าวเจ้า และรำข้าวสาลีพบว่าเมื่อเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 ในอาหารสูตร production medium ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดคือ รำข้าวสาลี รองลงมาเป็นรำข้าวเจ้า และชานอ้อยโดยให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 23.931 21.708 13.409 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนเปลือกถั่วลิสงให้แอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำสุดคือ 2.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 12

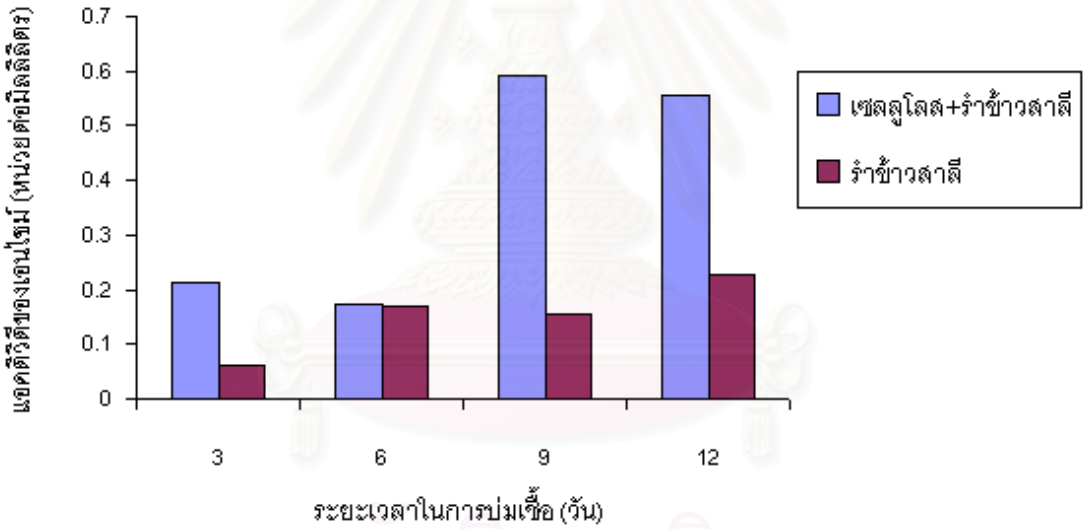
ตารางที่ 3 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสและเซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้เซลลูโลสร่วมกับรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

แหล่งคาร์บอน	แหล่งอาหารเสริม	แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส (U/ml)			
		วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
เซลลูโลส	รำข้าวสาลี	3.1267^{f}	6.243^{e}	17.804^{c}	23.592^{a}
รำข้าวสาลี	-	7.747^{e}	15.606^{d}	21.918^{b}	23.682^{a}
		แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส (U/ml)			
เซลลูโลส	รำข้าวสาลี	0.214^{B}	0.173^{BC}	0.608^{A}	0.557^{A}
รำข้าวสาลี	-	0.061^{D}	0.169^{BC}	0.110^{CD}	0.226^{A}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส (ตัวอักษรพิมพ์เล็ก) และเอนไซม์เซลลูเลส (ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่) ที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้เซลลูโลสร่วมกับรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 10 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้เซลลูโลสร่วมกับรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 11 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้เซลลูโลสร่วมกับรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

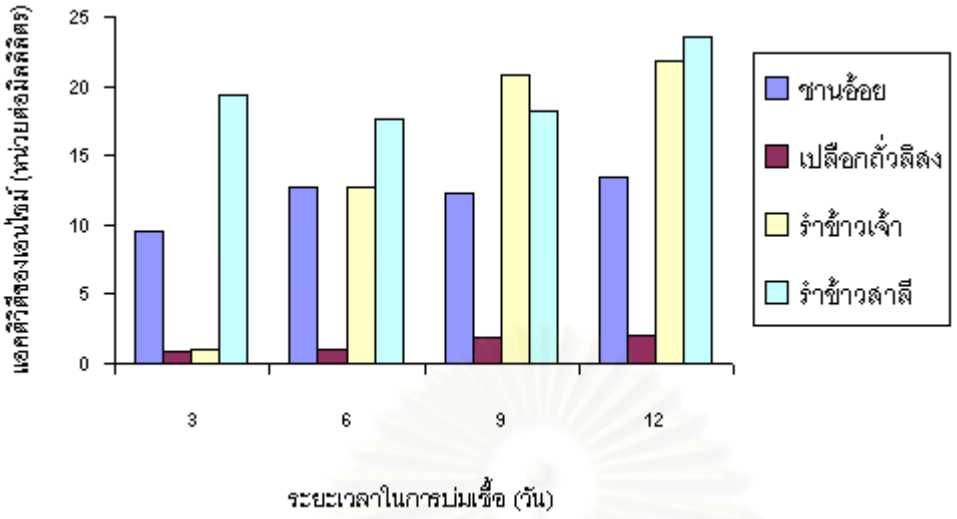
ดังนั้นจึงเลือกรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนและเมื่อนำค่าแอคติวิตีที่ได้จากการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนมาเปรียบเทียบกับการใช้ไซแลนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *T. reesei* Rut C-30 สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้มากที่สุดเทียบเท่ากับการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสในวันที่ 3 ของการใช้ไซแลนบริสุทธิ์เท่านั้น และในวันที่ 12 ของการบ่มเชื้อ ไซแลนให้แอคติวิตีของเอนไซม์แตกต่างจากการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนประมาณ 4.7 เท่า(ตารางที่ 5 ภาพที่ 13)

ตารางที่ 4 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
ชานอ้อย	9.585^{f}	12.658^{d}	12.331^{e}	13.409^{e}
เปลือกถั่วลิสง	0.821^{g}	0.983^{g}	1.934^{g}	2.001^{g}
รำข้าวเจ้า	1.007^{g}	12.742^{e}	20.770^{bc}	21.708^{b}
รำข้าวสาลี	19.371^{cd}	17.698^{d}	18.170^{d}	23.931^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจากเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



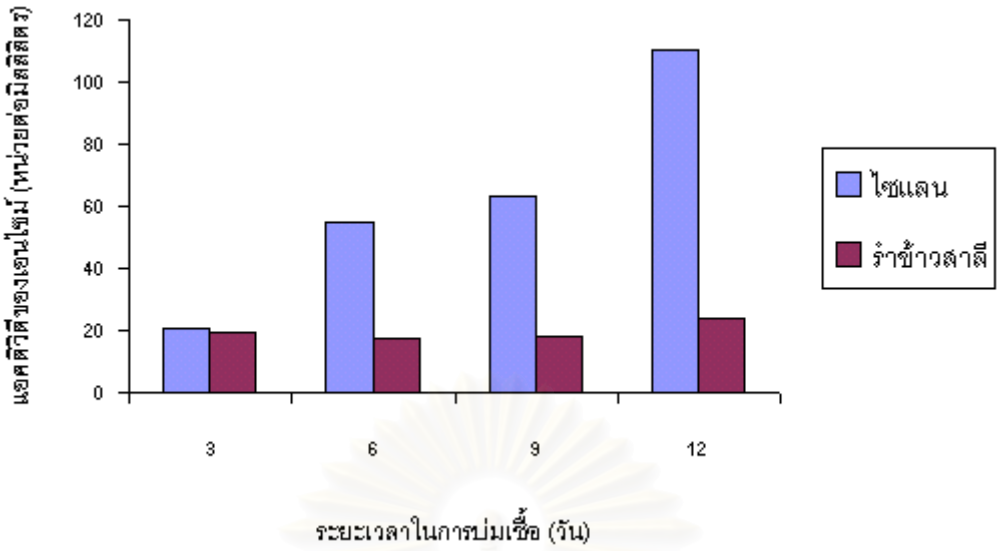
ภาพที่ 12 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 ที่เลี้ยงด้วยคาร์บอนแหล่งต่างๆ

ตารางที่ 5 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเปรียบเทียบกับการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
ไซแลน	20.330^{c}	54.737^{b}	59.614^{b}	110.084^{a}
รำข้าวสาลี	19.371^{c}	17.698^{c}	18.170^{c}	23.931^{c}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจากเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเปรียบเทียบกับการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 13 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 ที่เลี้ยงด้วยไซแลนเปรียบเทียบกับใช้รำข้าวสาลี

การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้นเมื่อใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ารำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด รองลงมาคือ ชานอ้อย เปลือกถั่วลิสง และรำข้าวสาลีโดยให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.656 0.367 0.263 และ0.226 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 6 และภาพที่ 14

3.2 หาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

จากผลการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จึงเลือกรำข้าวสาลีมาหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยใช้ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ5 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารให้มีค่าเท่ากับ 5 เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 27.946 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ 3 2 4 1 เปอร์เซ็นต์โดยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 22.533 22.001 20.542 และ 11.920 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 7 และภาพที่ 15

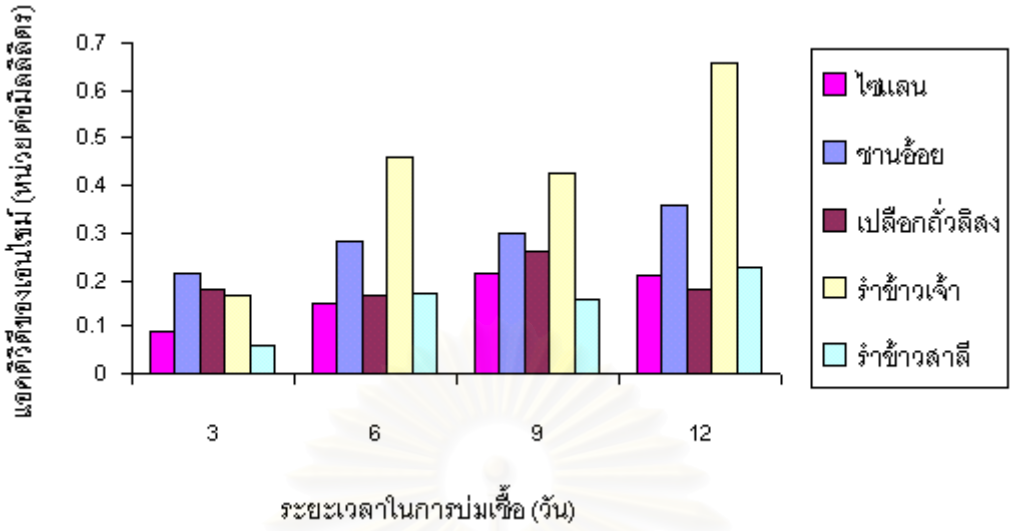
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้เมื่อใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
ไซแลน	0.090 ^{j}	0.146 ^{i}	0.216 ^{g}	0.211 ^{g}
ชานอ้อย	0.217 ^{g}	0.283 ^{ef}	0.299 ^{e}	0.367 ^{d}
เปลือกถั่วลิสง	0.181 ^{h}	0.165 ^{hi}	0.263 ^{f}	0.182 ^{h}
รำข้าวเจ้า	0.165 ^{hi}	0.460 ^{b}	0.428 ^{c}	0.656 ^{a}
รำข้าวสาลี	0.061 ^{k}	0.169 ^{hi}	0.156 ^{hi}	0.226 ^{g}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

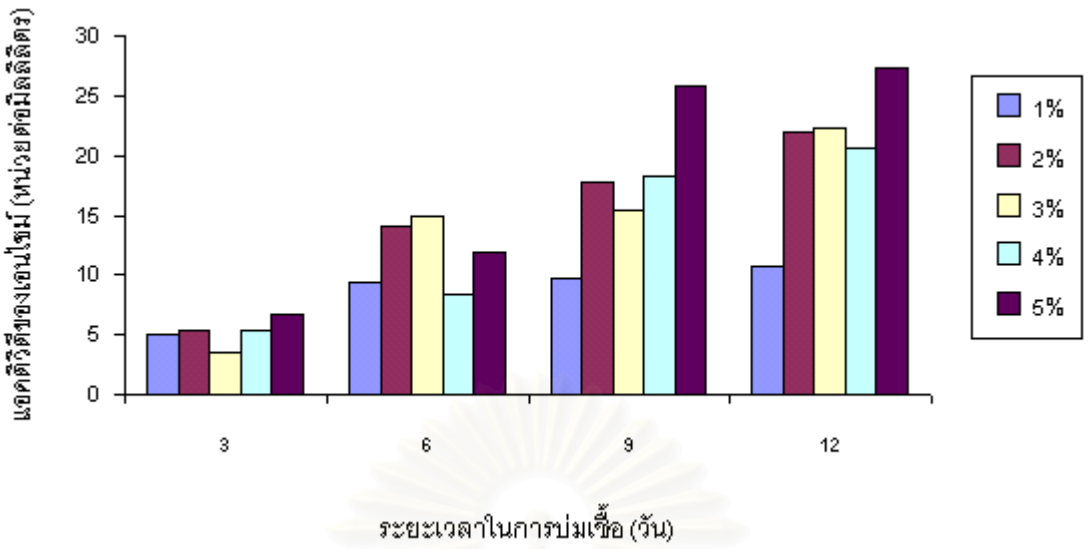


ภาพที่ 14 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 เมื่อเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

ตารางที่ 7 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C- 30 เมื่อเลี้ยงในรำข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่างๆ

เปอร์เซ็นต์ของรำข้าวสาลี	แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
1	6.769 ^{ij}	9.374 ^{h}	12.476 ^{g}	11.920^{g}
2	5.580 ^{j}	14.171 ^{fg}	18.960 ^{cd}	22.001 ^{b}
3	7.750 $^{h-j}$	15.220 ^{ef}	16.680 ^{de}	22.533 ^{b}
4	5.554 ^{j}	8.302 ^{hi}	18.458 ^{cd}	20.542 ^{bc}
5	6.926 ^{ij}	11.905 ^{g}	25.988 ^{a}	27.946 ^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส ที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 15 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 เมื่อเลี้ยงในรำข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้น เมื่อใช้รำข้าวสาลีความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ มากที่สุดเท่ากับ 0.998 และ 0.991 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ 3 2 และ 1 เปอร์เซ็นต์โดยให้ค่า แอคติวิตีของเอนไซม์ เท่ากับ 0.601 0.375 และ 0.261 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 8 และภาพที่ 16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่างๆ

เปอร์เซ็นต์ของรำข้าวสาลี	แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
1	0.126 $^{h-k}$	0.166 $^{g-i}$	0.215 ^{gh}	0.261 ^{fg}
2	0.071 $^{i-k}$	0.221 ^{gh}	0.332 ^{ef}	0.375 ^{e}
3	0.086 $^{i-k}$	0.253 ^{fg}	0.601 ^{c}	0.482 ^{d}
4	0.062 ^{jk}	0.415 ^{de}	0.733 ^{b}	0.991 ^{a}
5	0.031 ^{k}	0.148 $^{h-j}$	0.998 ^{a}	0.973 ^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ภาพที่ 16 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

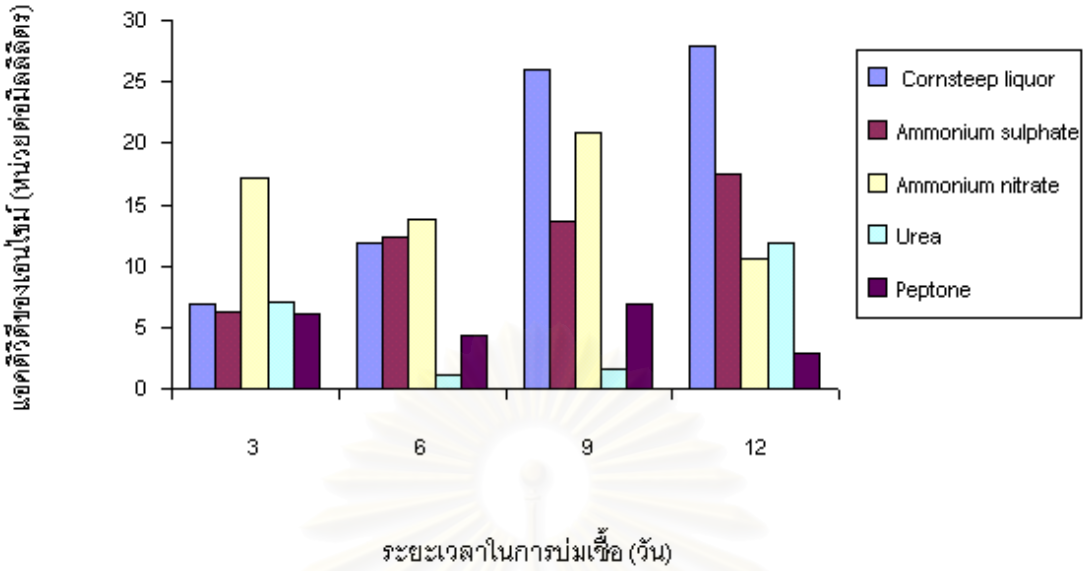
จากผลการทดลองหาความเข้มข้นและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ซึ่งได้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือรำข้าวสาลีที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสต่อไป โดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ ได้แก่ corn steep liquor ammonium sulphate ammonium nitrate urea และ peptone ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด โดยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 27.946 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็น ammonium nitrate ammonium sulphate urea และ peptone โดยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 20.929 17.409 11.867 และ 6.828 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังตารางที่ 9 และภาพที่ 17

ตารางที่ 9 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

แหล่งไนโตรเจน	แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
Cornsteep liquor	6.926 ^{f}	11.905 ^{de}	25.988 ^{a}	27.946 ^{a}
Ammonium sulphate	6.188 ^{fg}	12.364 ^{de}	13.616 ^{d}	17.409 ^{c}
Ammonium nitrate	17.090 ^{c}	13.791 ^{d}	20.929 ^{b}	10.613 ^{e}
Urea	7.084 ^{f}	1.043 ^{i}	1.683 ^{i}	11.867 ^{de}
Peptone	6.049 ^{fg}	4.324 ^{gh}	6.828 ^{f}	2.897 ^{hi}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 17 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดคือเท่ากับ 0.345 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็น cornsteep liquor ammonium sulphate ammonium nitrate และ urea โดยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.261 0.234 0.158 และ 0.094 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังตารางที่ 10 และภาพที่ 18

5. ผลของตัวชักนำที่มีต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

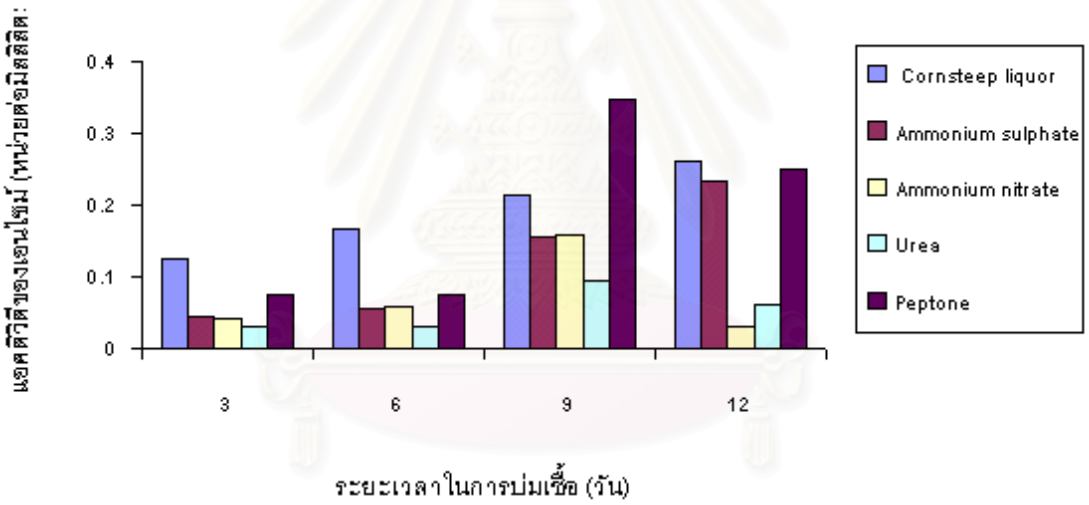
5.1 ศึกษาถึงผลของการเสริมไซแลนหรือไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ถึงแม้ว่ารำข้าวสาลีจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส แต่ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ยังคงมีปริมาณที่ต่ำเมื่อเทียบกับการใช้ไซแลนบริสุทธิ์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ไซแลนและไซโลสเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าไซแลนมีผลต่อการชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยให้ค่าแอคติวิตีเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ส่วนไซโลสสามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเพิ่มสูงขึ้น โดยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ เท่ากับ 51.666 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 11 และภาพที่ 19

ตารางที่ 10 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

แหล่งไนโตรเจน	แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
Cornsteep liquor	0.126 ^{ef}	0.166 ^{d}	0.215 ^{c}	0.261 ^{b}
Ammonium sulphate	0.046 ^{hi}	0.057 $^{g-i}$	0.156 ^{de}	0.234 ^{bc}
Ammonium nitrate	0.044 ^{hi}	0.059 $^{g-i}$	0.158 ^{de}	0.030 ^{l}
Urea	0.032 ^{l}	0.030 ^{i}	0.094 ^{fg}	0.061 $^{g-l}$
Peptone	0.074 ^{gh}	0.076 ^{gh}	0.345 ^{a}	0.249 ^{bc}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 18 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลส

แหล่งอาหารเสริม	แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
Control	6.926 ^{i}	11.905 ^{h}	25.988 ^{cd}	27.946 ^{bc}
ไซแลน	8.925 ^{i}	21.074 ^{f}	24.160 ^{de}	30.128 ^{b}
ไซโลส	7.678 ^{i}	15.851 ^{g}	22.716 ^{ef}	51.666 ^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลส
แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

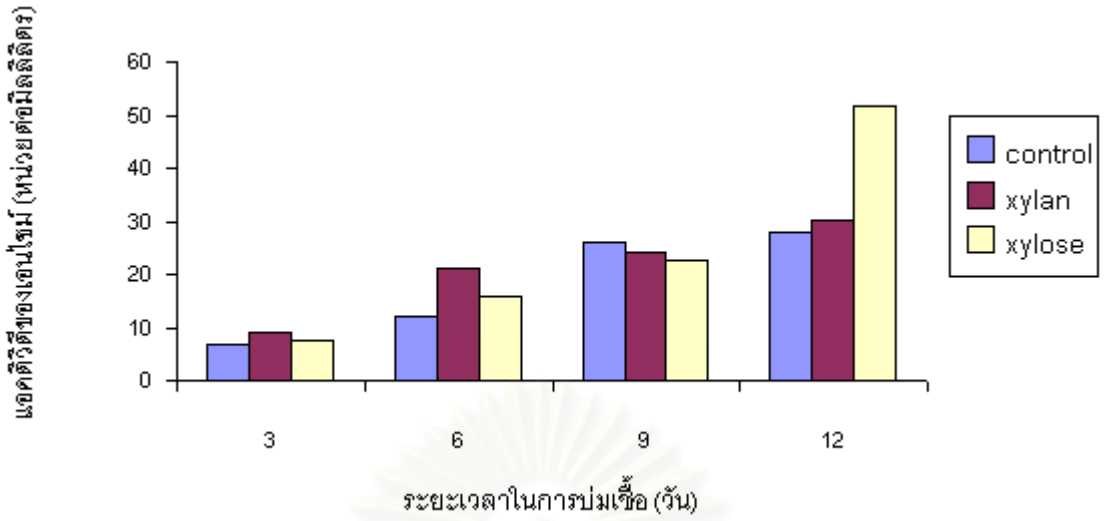
แต่เมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้น พบว่ามีปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้ไซแลนกับไซโลสเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 12 และภาพที่ 20

ตารางที่ 12 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลส

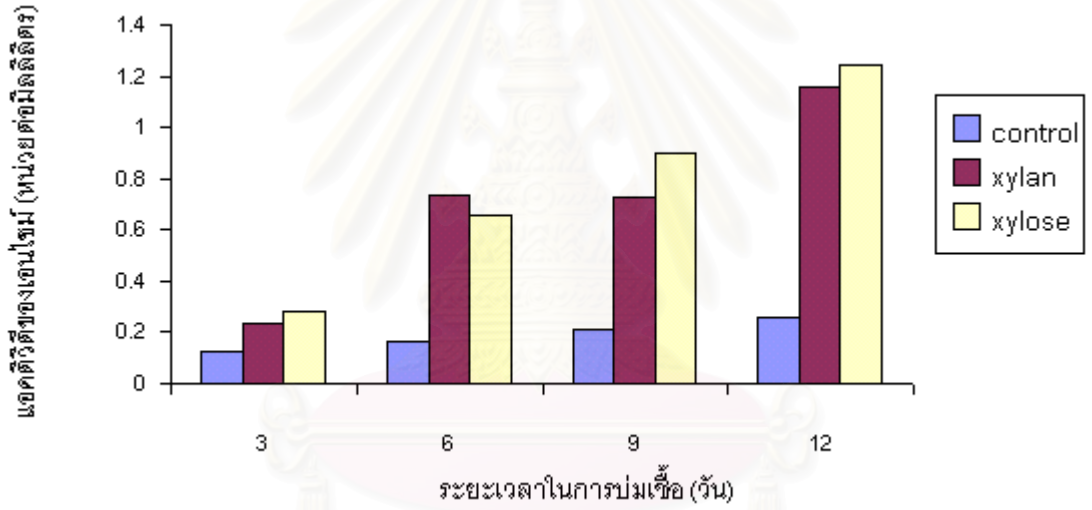
แหล่งอาหารเสริม	แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส (U/ml)			
	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
Control	0.126 ^{e}	0.166 ^{de}	0.215 ^{de}	0.261 ^{de}
ไซแลน	0.235 ^{de}	0.734 ^{c}	0.727 ^{c}	1.155 ^{a}
ไซโลส	0.281 ^{d}	0.655 ^{c}	0.899 ^{b}	1.246 ^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 19 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลส



ภาพที่ 20 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 ศึกษาผลของ β-methyl-xyloside ต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

นอกจากใช้ไซแลนและไซโลสในการชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสแล้ว ในการทดลองนี้ยังนำ β-methyl-xyloside ซึ่งเป็นสารที่ชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสร่วมกับการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์หลังจากเลี้ยงเชื้อได้ 12 วัน โดยใช้ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรสามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* Rut C-30 ได้สูงสุดคือ 105.847 ยูนิตต่อมิลลิลิตรซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการใช้ไซแลนบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือระดับความเข้มข้น 4 3 2 และ 1 กรัมต่อลิตร โดยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 90.316 88.126 41.144 และ 31.268 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 13 และภาพที่ 21

การวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ β-methyl-xyloside ร่วมกับการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตรมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส โดยให้ค่าแอคติวิตีที่แตกต่างจากชุดควบคุมและที่ระดับความเข้มข้นของ β-methyl-xyloxide 1 และ 2 กรัมต่อลิตรดังตารางที่ 13 และภาพที่ 22

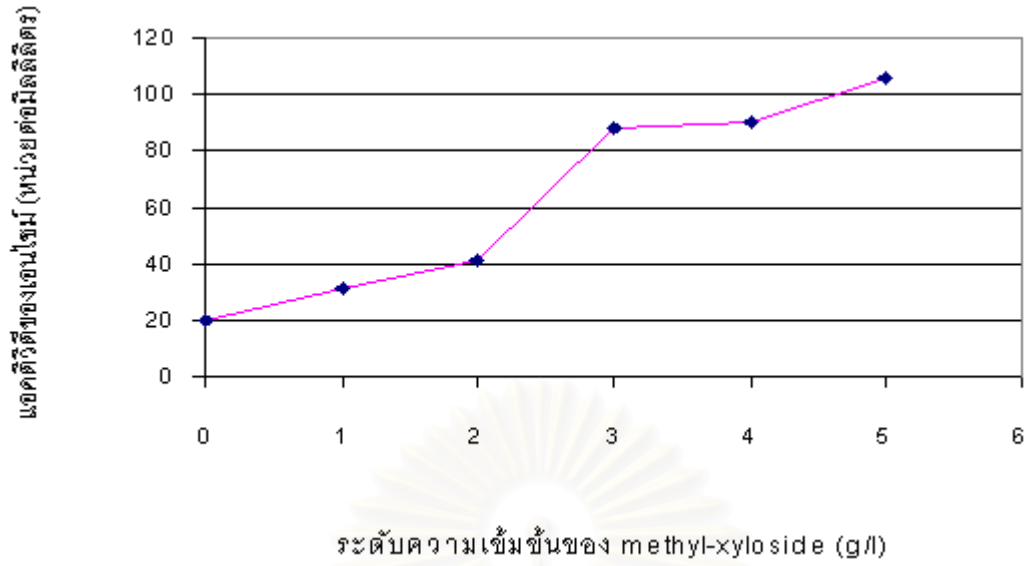
ตารางที่ 13 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสและเซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส (U/ml)					
Control	1(g/l) ^{M}	2(g/l) ^{M}	3(g/l) ^{M}	4(g/l) ^{M}	5(g/l) ^{M}
19.911 ^{d}	31.268 ^{cd}	41.144 ^{c}	88.126 ^{b}	90.316 ^{b}	105.847 ^{a}
แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส (U/ml)					
0.535 ^{B}	0.541 ^{B}	0.634 ^{AB}	0.708 ^{A}	0.724 ^{A}	0.720 ^{A}

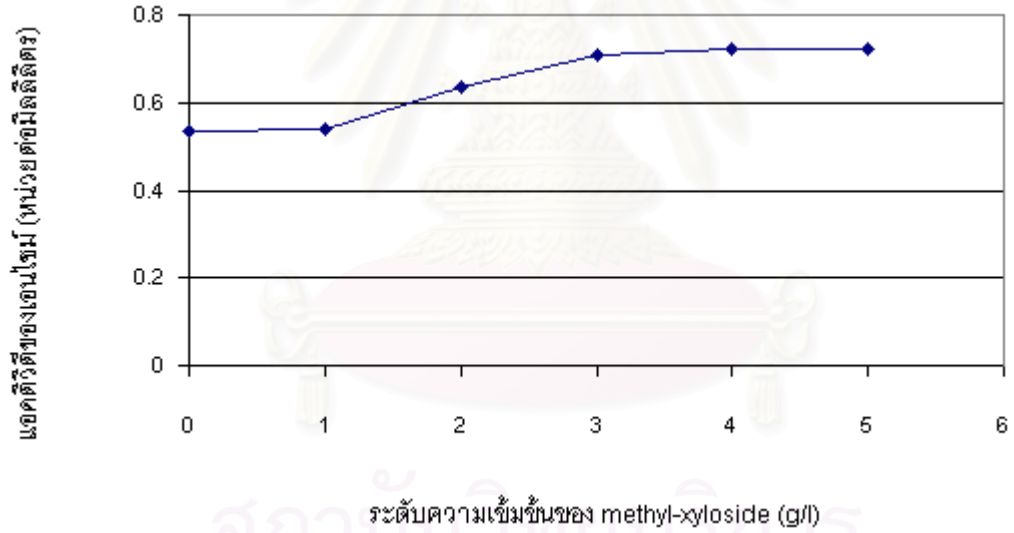
M = β-methyl-xyloside

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส (ตัวอักษรพิมพ์เล็ก) และเอนไซม์เซลลูเลส (อักษรตัวพิมพ์ใหญ่) ที่ได้จาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 21 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 22 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma reesei* Rut C-30

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma reesei* Rut C-30 ในอาหาร PDB นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโต พบว่าเมื่อให้ปริมาณธาตุอาหารจำกัดในการเลี้ยงเชื้อรา ทำให้เชื้อรามีระยะการเจริญดังนี้ ระยะแรกคือ lag phase เป็นระยะที่เชื้อรามีการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ และถ้าเป็นการบ่มเชื้อจากสปอร์จะสังเกตได้อย่างชัดเจน แต่จากการทดลองใช้เส้นใยราในการบ่มเชื้อทำให้ระยะเวลาดังกล่าวสั้นมากเพราะไม่ต้องอาศัยเวลาในการงอกของสปอร์ ต่อจากนั้นเชื้อราจะมีการเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อราอย่างรวดเร็ว สังเกตจากกราฟช่วงวันที่ 1-2 มีความชันสูงเชื้อราจะมีมวลชีวภาพคงที่เมื่อเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งมักเป็นช่วงที่เชื้อรามีการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในระยะนี้ด้วย จากกราฟคือช่วงวันที่ 3-7 หลังจากนั้นน้ำหนักแห้งของเส้นใยจะเริ่มลดลงในวันที่ 7-11 ซึ่งเนื่องจากมีการใช้สารอาหารที่มีอยู่หมดไป รวมทั้งมีสารพิษที่เกิดจากกระบวนการต่างๆ ทำให้สิ่งแวดล้อมไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตจึงเป็นช่วงที่เชื้อราตายและลดมวลชีวภาพลง

2. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร

วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นพืชต่างชนิดกันทำให้องค์ประกอบรวมถึงปริมาณไซแลนจึงแตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำเอาวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ผลการทดลองพบว่ารำข้าวสาลีมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสสูงที่สุด รองลงมาคือ ชานอ้อย รำข้าวเจ้าและเปลือกถั่วลิสง ซึ่งให้ผลที่ได้สอดคล้องกับการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* Rut C-30 โดยเฉพาะรำข้าวสาลีที่มีปริมาณไซแลนมากที่สุด เมื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส ก็ให้ปริมาณไซแลนเนสในระดับที่สูงสุดเช่นเดียวกัน

การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสพบว่าเปลือกถั่วลิสงและชานอ้อยมีปริมาณเซลลูโลสสูง ส่วนรำข้าวเจ้าและรำข้าวสาลีมีปริมาณเซลลูโลสที่ต่ำ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* Rut C-30 โดยพบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ใน

ปริมาณที่สูงเมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงหรือชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่รำข้าวเจ้าและรำข้าวสาลีจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำ

การวิเคราะห์หาปริมาณลิกนินในวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรให้ผลเช่นเดียวกับปริมาณของเซลลูโลส คือชานอ้อยและเปลือกถั่วมีปริมาณลิกนินมาก ส่วนรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้ามีปริมาณลิกนินต่ำ จากโครงสร้างและหน้าที่ของลิกนินพบว่าลิกนินมีหน้าที่ป้องกันการเข้าทำลายจากเชื้อต่างๆ (Gilbertson, 1980) ดังนั้นการนำวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรมาใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ บางครั้งต้องปรับสภาพเสียก่อน เช่น การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์กำจัดลิกนินออกโดยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้ลิกนินพองตัวและหลุดออกไปบางส่วนทำให้จุลินทรีย์สามารถเข้าไปใช้เซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสในการเจริญได้มากขึ้น (Manonmoni and Sreekantiah, 1987) ถึงแม้ว่าวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่นำมาเลี้ยงเชื้อไม่ได้ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมีแต่เชื้อยังสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้แสดงว่าในการศึกษาครั้งนี้ ลิกนินไม่มีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อ อาจเนื่องมาจากว่าได้มีการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรด้วยวิธีทางกายภาพให้มีขนาดเล็กเพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์จากเชื้อรา

3. ศึกษาชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

3.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน

3.1.1 การใช้เซลลูโลสร่วมกับวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน

การทดลองนี้มีความต้องการที่จะผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสในปริมาณที่สูงแต่ต้องการเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณที่ต่ำ ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การฟอกสีเยื่อกระดาษ เอนไซม์ไซแลนเนสที่นำไปใช้ในการฟอกเยื่อนั้นต้องมีการปนเปื้อนของเอนไซม์เซลลูเลสที่ต่ำมากหรือไม่มีเอนไซม์เซลลูเลสเลย เพราะเอนไซม์เซลลูเลสจะย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งก็คือเยื่อกระดาษทำให้คุณภาพของกระดาษลดลง เช่น ความเหนียวลดลง (Buchert et al., 1992) ดังนั้นในขั้นแรกจึงทดสอบความสามารถของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์ ไซแลนเนสโดยใช้เซลลูโลส 2 เปอร์เซ็นต์และรำข้าวสาลี 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสไม่มีความแตกต่างกันระหว่างการใช้หรือไม่ใช้เซลลูโลส แต่เมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้นพบว่ามีแอคติวิตีมากกว่าการใช้รำข้าวสาลีเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุมาจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรท แตกต่างกันซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสมีความจำเพาะต่อเซลลูโลสทำให้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการ

สร้างเอนไซม์เซลลูเลสทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสสูงด้วย ดังนั้นจึงไม่เลือกใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

3.1.2 ศึกษาชนิดของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยหลักที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และการสร้างเอนไซม์ของรา เมื่อเชื้อราเจริญในสภาวะแวดล้อมที่มีความจำกัดของแหล่งคาร์บอนในด้านชนิดและปริมาณ เชื้อราจำเป็นต้องสร้างเอนไซม์มาย่อยสลายสับสเตรทที่มีอยู่เพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและเข้าสู่กระบวนการต่างๆ เพื่อให้ได้มาซึ่งพลังงานในการเจริญเติบโต ดังนั้นทำให้เชื่อว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดใดแล้วเชื้อราจะสร้างเอนไซม์ที่สอดคล้องกับสับสเตรท เช่นเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีเฮมิเซลลูโลส เชื้อราควรที่จะสร้างเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสออกมามากเช่นเดียวกัน จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อมี 1 เปอร์เซ็นต์ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ 117.143 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่ไซแลนบริสุทธิ์มีราคาแพง ดังนั้นจึงได้นำวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรซึ่งมีข้อมูลว่ามีไซแลนเป็นองค์ประกอบมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส จาก *T. reesei* Rut C-30 โดยในการทดลองนี้เลือกวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร 4 ชนิด คือ ชานอ้อย เปลือกถั่วลิสง รำข้าวเจ้า และรำข้าวสาลี ซึ่งพบว่าเมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงสุด คือ 23.931 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือรำข้าวเจ้า ชานอ้อย และเปลือกถั่วลิสง ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับกับการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อ *Streptomyces* sp. QG-11-3 (Beg et al., 2000) รำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากในรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้ามีโปรตีน วิตามินและไขมันที่มีผลต่อการชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเพิ่มมากขึ้น *T. reesei* Rut C-30 ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้น้อยเมื่อใช้ชานอ้อยหรือเปลือกถั่วเป็นลิสงเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับชานอ้อยอาจจะเนื่องมาจากว่าชานอ้อยที่นำมาใช้นั้นแม้ว่าจะผ่านกระบวนต่างๆ แล้วก็ยังคงมีกลูโคสเหลืออยู่มาก โดย Svarachorn (1999) ได้วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสจากชานอ้อยด้วยวิธี paper chromatography ทั้งก่อนและหลังการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่าชานอ้อยที่ยังไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบในปริมาณที่สูง ซึ่งปริมาณกลูโคสดังกล่าวอาจไม่มีผลต่อการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส อีกทั้งเชื้อสามารถใช้กลูโคสนี้ในการเจริญเติบโต ทำให้ไม่จำเป็นต้องผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสในการย่อยไซแลนเพื่อใช้ในการเจริญ ส่วนเปลือกถั่วลิสงให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสต่ำสุด อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกถั่วลิสงที่ประกอบด้วยเซลลูโลสในปริมาณที่สูง และมีลิกนินในปริมาณสูงด้วย ซึ่งอาจไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

จากผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี พบว่ารำข้าวสาลีมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสสูงที่สุด ซึ่งให้ผลที่ได้สอดคล้องกับการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* Rut C-30 โดยเฉพาะรำข้าวสาลีที่มีปริมาณไซแลนมากที่สุด เมื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส ก็ให้แอคติวิตีของไซแลนเนสในระดับที่สูงสุดเช่นเดียวกัน

จากความสัมพันธ์ดังกล่าวทำให้เชื่อว่าปริมาณเฮมิเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบในพืชแต่ละชนิดนั้นมีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ Gomes และคณะ (1993) ที่ใช้ corn cobs ที่มีปริมาณไซแลนสูงถึง 28.60 เปอร์เซ็นต์ (Hayn et al., 1993) นำมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส จากเชื้อ *T. lanuginosus* ได้ แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงมากกว่าการใช้วัสดุชนิดอื่นทำให้เชื่อกันว่าปริมาณไซแลนที่เป็นองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นเสมือนตัวชักนำ (inducer) ในการผลิตไซแลนเนส นอกจากนี้ปัจจัยอื่นเช่น ผิวและขนาดรูของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรมีผลต่อการย่อยสลายด้วย ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าปริมาณไซแลนในรำข้าวสาลีที่มีปริมาณค่อนข้างสูงมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส และเมื่อพิจารณาถึงแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้น เมื่อใช้วัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งวัสดุทางการเกษตรที่มีเซลลูโลสสูงคือชานอ้อยและเปลือกถั่วลิสงจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูง ดังนั้นจากแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสและเซลลูเลสทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของสับสเตรทที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์นั้นๆ เฮมิเซลลูเลสหรือไซแลนเนสมีความจำเพาะต่อเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลน ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสมีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลลูโลส ซึ่งทำให้คาดคะเนการผลิตเอนไซม์ของเชื้อได้จากปริมาณองค์ประกอบของพืชแต่ละชนิดได้ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเลือกใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ให้เหมาะสมกับชนิดของเอนไซม์ได้

แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อยกเว้นในรำข้าวเจ้าซึ่งมีปริมาณเซลลูโลสน้อยแต่เมื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถทำให้มีแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่สูงที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่ารำข้าวเจ้าที่ใช้เป็นรำข้าวเจ้าที่หาซื้อได้จากโรงสีข้าวทั่วไป มีความบริสุทธิ์น้อย แปรเปลี่ยนไปตามเวลาซึ่งอาจจะมีพวกโอลิโกเมอร์ของเซลลูโลสอยู่ในรำข้าวเจ้า และมีผลไปกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้

3.2 หาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

การศึกษาหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นนั้นเป็นสิ่งสำคัญเพราะคาร์บอนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์สารประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ ดังนั้นหากปริมาณของแหล่งคาร์บอนน้อยไปอาจทำให้เชื้อตายได้ หากมีความเข้มข้นมากไปอาจไม่เหมาะสมเพราะเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง แหล่งคาร์บอนก็จะเหลือและสูญเสียไปโดยเปล่าประโยชน์

จากการทดลองพบว่ารำข้าวสาลีที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส อาจจะเป็นเพราะที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์มีสารอาหารที่เพียงพอกับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส ความเข้มข้นของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรมีความแตกต่างจากการใช้ไซแลนบริสุทธิ์มาก เนื่องจากวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรมีโครงสร้างที่ ซับซ้อนกว่า เชื้อจุลินทรีย์จึงนำไปใช้ได้ยากกว่าไซแลนบริสุทธิ์ ซึ่งวัสดุทางการเกษตรที่นำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ต่างชนิดกันจะใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันด้วย เช่น *Aspergillus fumigatus* ใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้ความเข้มข้นที่ 3 เปอร์เซ็นต์

4. ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

ธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญ เนื่องจากราต้องการเป็นดันดับสองรองจากแหล่งคาร์บอน และมีผลต่อกระบวนการต่างๆ เช่นมีผลต่อการขนส่งน้ำตาลใน Saccharomyces cerevisiae การสร้างโปรตีน กรดนิวคลีอิค รวมถึงมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ ราไม่สามารถตรึงไนโตรเจนแต่สามารถใช้ไนโตรเจนจากแหล่งต่างๆ มากมาย นิวัฒ เสนาะเมือง (2543) ราส่วนใหญ่ชอบใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน สารที่นิยมใช้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งบางครั้งอาจมีผลทำให้ ค่าความเป็นกรดด่างลดลง (Berry} 1988) จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า corn steep liquor เป็นไนโตรเจนที่ดีสำหรับการผลิตเอนไซแลนเนสทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนประกอบหลัก (26 เปอร์เซ็นต์) และกรดแลคติก (2.5 เปอร์เซ็นต์) น้ำตาล (2.5 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนั้นยังมีกรดอะมิโน วิตามิน และสารประกอบดื่นๆ ในปริมาณเล็กน้อย (akhtar et al., 1997) ซึ่งเชื้อราสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ได้เร็วกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นอินทรียสาร

จากการทดลองยังพบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ค่าแอคติวิตี 17.090 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งถือว่าเป็นค่าแอคติวิตีที่สูงโดยที่ใช้เวลาสั้น อีกทั้งให้แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ต่ำด้วย ดังนั้นการใช้แอมโมเนียไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจโดยเฉพาะในระดับ

อุตสาหกรรมที่ต้องการความรวดเร็วทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในเวลาอันสั้น อีกทั้งแอมโมเนียมไนเตรทมีราคาถูก จึงสามารถประหยัดต้นทุนได้อีกทางหนึ่งด้วย

5. ผลของตัวชักนำที่มีต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

5.1 ศึกษาถึงผลของการเสริมไซแลนหรือไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนและมีไซโลสร่วมด้วย พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีไซโลส อาจเนื่องมาจากว่าไซโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการผลิตเอนไซม์ และเป็นสารที่กระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้อย่างดีในหลายเชื้อราซึ่งมีกลไกในการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์คือ ไซโลสเป็นสารที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเอนไซม์ไซแลนเนส เนื่องจากไซโลสเป็นน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของไซแลน ไซโลสจำนวนเพียงเล็กน้อยอาจจะไปกระตุ้นการสร้างไซแลนเนสออกมาย่อยรำข้าวสาลีที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Dobberstein และ Emeis (1989) พบว่าไซโลสและโอลิโกเมอร์เป็นตัวชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดี และถ้าไม่มีไซโลส แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสจะลดลงประมาณ 10 เท่า เมื่อใช้ไซแลนร่วมกับรำข้าวสาลีพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ไซแลนเนสเพียงเล็กน้อยเท่าน้อย ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Haltrich และ Steiner (1994) พบว่าไซแลนบริสุทธ์หรือกลูโคแมนแนนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีแต่ไม่มีผลไปกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสใน *Schizophyllum commune* แต่คาดว่าสารที่ชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่มาจากเซลลูโลส ซึ่งเซลลูโลสบางชนิดมีไซโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์

5.2 ศึกษาผลของ β-methyl-xyloside ต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

เมื่อเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ β-methyl-xyloside เป็นตัวกระตุ้น ซึ่งพบว่า β-methyl-xyloside สามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้เพิ่มขึ้น 5.3 เท่า เมื่อใช้ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ให้ผลสอดคล้องกับ Bailey และ Poutanen (1989) Kristufek Zeilinger และ Kubick (1995) β-methyl-xyloside เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับไซโลไบโอส จัดเป็น non-metabolite ดังนั้นจึงสามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับไซโลไบโอส ซึ่งจากกลไกของการย่อยสลายไซแลนจะพบว่าไซโลไบโอสหรือไซโลไตรโอสที่เกิดจากการย่อยสลายไซแลนโดยใช้ไซแลนเนสที่มีอยู่แล้ว ตัวไซโลไบโอสและไซโลไตรโอสนี้เป็นตัวกระตุ้นหรือเป็นตัวส่งสัญญาณให้จุลินทรีย์เพื่อให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์

ไซแลนเนสมาใช้ในในระดับมากขึ้นได้ การทดลองครั้งนี้พบว่า β-methyl-xyloside กระตุ้นการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ β-methyl-xyloside แล้วแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสไม่เพิ่มมากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma reesei* Rut C-30

จากการศึกษาการเจริญเติบโตโดยเลี้ยงเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma reesei* Rut C-30 ในอาหาร PDB เส้นใยเชื้อรา *T. reesei* Rut C-30 มีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 2 โดยในวันที่ 3 น้ำหนักของเส้นใยเพิ่มขึ้นสูงสุด เชื้อรา *T. reesei* Rut C-30 มีการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 3-6 จากนั้น น้ำหนักแห้งของเส้นใยจะเริ่มลดลงในวันที่ 6

2. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรพบว่าเปลือกถั่วลิสงและชานอ้อยมีปริมาณเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบมากคือ 35.13 และ 34.08 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ส่วนรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้ามีปริมาณเซลลูโลสน้อยคือ 9.07 และ 8.30 กรัมต่อน้ำหนักแห้งตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบที่เป็นเฮมิเซลลูโลส พบว่ารำข้าวสาลีมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสมากที่สุด คือ 26.10 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือชานอ้อย รำข้าวเจ้า และเปลือกถั่วลิสง ซึ่งมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสเท่ากับ 20.31 17.58 และ12.96 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณลิกนินพบว่า เปลือกถั่วลิสงและชานอ้อยมีปริมาณลิกนินมากคือ 9.04 และ 8.93 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ส่วนรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้ามีปริมาณลิกนินน้อยคือ 2.74 และ 2.38 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

3. ศึกษาชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

3.1ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน

3.1.1 การใช้เซลลูโลสร่วมกับวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อใช้เซลลูโลส 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการใช้รำข้าวสาลี 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เก็บผลการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสทุก 3 วัน และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ไซแลนเนสที่เกิดขึ้น พบว่าเชื้อ *T. reesei* Rut C-30 ให้ผลการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มสูงกว่าการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่าง

เดียวอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้เซลลูโลส โดยใช้ความเข้มข้นเบื้องต้น 2 เปอร์เซ็นต์

3.1.2 ศึกษาชนิดของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

จากผลการศึกษาการที่เลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 เพื่อสร้างไซแลนเนส โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ 4 ชนิดได้แก่ ชานอ้อย เปลือกถั่วลิสง รำข้าวเจ้า และรำข้าวสาลี มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 ในอาหารสูตร production medium ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะเขย่าเป็นเวลา 12 วัน เก็บผลทุกๆ 3 วัน พบว่ารำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด รองลงมาเป็นรำข้าวเจ้า ชานอ้อย และเปลือกถั่วลิสง โดยให้แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 23.931 21.708 13.409 และ 2.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้นเมื่อใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรชนิดต่างๆ พบว่ารำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์มากที่สุด รองลงมาคือ ชานอ้อย เปลือกถั่วลิสง และรำข้าวสาลีโดยให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.656 0.367 0.263 และ 0.226 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการทดลองจึงเลือกรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์

3.2 หาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

นำรำข้าวสาลี มาหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยใช้ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 27.946 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้รำข้าวสาลีความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.998 และ 0.991 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ 3 2 และ 1 เปอร์เซ็นต์โดยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.601 0.375 และ 0.261 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4. ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

จากผลการทดลองหาความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส โดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ ได้แก่ corn steep liquor ammonium sulphate ammonium nitrate urea และ peptone ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด โดยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 27.988 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็น ammonium nitrate ammonium sulphate urea และpeptone โดยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 20.929 17.409 11.867 และ 6.828 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้นเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดคือเท่ากับ 0.345 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็น corn steep liquor ammonium sulphate ammonium nitrate และ urea โดยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.261 0.234 0.158 และ 0.094 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

5. ผลของตัวชักนำที่มีต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

5.1 ศึกษาถึงผลของการเสริมไซแลนหรือไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดลองใช้ไซแลนและไซโลสเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ไซโลสร่วมกับรำข้าวสาลีสามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสให้เพิ่มสูงขึ้น โดยให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 51.666 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนไซแลนมีผลชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสโดยมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นในระดับหนึ่ง

5.2 ศึกษาผลของ β-methyl-xyloside ต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

จากการทดลองนำ β-methyl-xyloside มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อร่วมกับการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์หลังจากเลี้ยงเชื้อได้ 12 วัน พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อ *T. reesei* Rut C-30 ได้สูงสุดคือ 105.847 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อใช้ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้น 2 3 4 5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มี β-methyl-xyloside

จากการทดลองดังกล่าวได้สภาวะการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดังนี้

ใช้รำข้าวสาลี ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และมี corn steep liquor หรือ ammonium nitrate เป็นแหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้โดยการเสริมไซโลส หรือ β-methyl-xyloside ซึ่งสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ดังนี้

ไซโลสความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร เพิ่มการผลิตไซแลนเนส 1.8 เท่า

β-methyl-xyloside ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เพิ่มการผลิตไซแลนเนส 5.3 เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นิวัฒ เสนาะเมือง. 2543. เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับรา. โรงพิมพ์พระธรรมวันต์. 203 หน้า.

สุมาลี อึ้งใจธรรม. 2539. ไซแลนเนสและบีตาไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* spp. ที่ชอบร้อนและชอบด่าง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Akhtar, M., Lentz, M.J., Blanchette, R.A., and Kirk, T.K. 1997. Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. Tappi journal. 80(6): 161-164.Bachman, S.L., and McCarthy, A.L.1989. Purification and characterization of a thermostable β-xylosidase from *Thermomonospora fussa*. J. Gen. Microbiol. 35: 293-299.

Bailey, M.J., Buchert, J., and Viikari, L. 1993. Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan and cellulose-base media. Appl. Microbiol. Biotechhnol. 40: 22-229.

Bailey, M. J., and Poutanen, K.1989. Production of xynolytic enzymes by strains of *Aspergillus.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 5-10.

Beg, Q.M., Bhusan, B., Kapoor M., and Hoonda, G.S. 2000. Production and characterization of the thermostable xylanase and petinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. J Indus. Micro & Biotechnol. 24: 396-402.

Berry, D.R. 1988. Physiology of industrial of fungi. Blackwell Scientific publications. 285pp.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnology. 3(11): 286-290.

Biely, P., and Petrakova, K. 1985. Novel inducer of the xylan-degrading enzymes system of *Cryptococcus albidus*. J. Bacteriol. 160: 408-412.

Biely, P., and Poutanen K. 1989. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 224-229.

Biely, P., Vrsanska, M., and Kratky, Z. 1980. Xylan degrading enzymes of the yeast *Crryptococcus albidus*, Identification and cellular location. Eur. J. Biochem. 108: 313-321.

Blanco, A., Vidal, T., Colom., and Javier pastor, F.I. 1995. Purification and properties of xylanase a from alkali-tolerant *Bacillus* sp. Strain BP-23. Appl. Environ. Microbiol. 61(12): 4468-4470.

Breccia, J.D., Sineriz, F., Baigori., Castro, G.R., and Hatti-Kaul, R. 1998. Purification and characterization of a themostable xylanase from *Bacillus amyloquefaciens*. Enzym. Microbiol. Technol. 22: 42-49.

Buchert, J., Ranua, M., Kantelinnen, A., and Viikari, L. 1992. The role of two *Trichoderma reesei* xylanase in the bleaching of pine kraft pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 825-829.

Cowing, E.B., and Kirk, T.K. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. Biotechnology and Bioengineering Symp. No.6: 95-123.

Dekker, R.F.H. 1983. Bioconversion of hemicellulose production by *T. reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose. Biotechnol. and Bioeng. 25: 1127-1146.

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 a *Trichoderma harzianum* strain. J. Industrial Microbiol. Biotechnol. 23: 682-685.

Dobberstein, J., and Emeis, C.C. 1989. β-Xylanase produced by *Aureobasidium pullulans* CBS 58475. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 262-268.

DuManior, J.R., Hamilton J., Senior, D.J., Bernier R.L., Grant, J.E., Moser, L.E., and Dubelsten, P. 1993. Production of a high level of cellullase-free xylanse by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 700-707.

Dupont, C., Roberge, M., Shareck, F., Morosoli, R., and Kluefel, D. 1998. Substrate-binding domains of gylcanases from *Streptomyces lividans*: characterization of a new family of xylan-binding domains. Biochem J. 330: 41-45.

Ericksson, K.E.L., Blanchette, R.A., and Ander, P. 1990. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood Components. Ozach Gmbh and Co., Berlin, Germany. p.181-222.

Femandez-Espinar, M.T., Pinaga, F., de Graaff, L., Visser, J., Ramon, D., and Valles, S. 1994. Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acetic xylanase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 555-562.

Flint, H.I., Whitehead, T.R., Martin, J.C., and Gasparic, A. 1997. Interrupted catalytic domain structures in xylanases from two distantly related strains *of Prevotella ruminicola*. Biochimica et Biophysica. 1337: 161-165.

Fogrty, W.M. 1983. Microbial enzyme and Biotechnology. New York: Applied Science publishers LTD.

Germgard, K., and Larsson. 1983. Oxygen bleaching in modern soft pulp mill paper ja puu-papper och Tra. 65: 287-290.

Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. International Union of Pure and Applied Chemistry. 59: 257-268.

Ghose, T.K., and Bisaaria, V.S. 1987. Measurement of hemicellulase activities Part 1: Xylanases. Pure & Appl. Chem. 59(2): 1739-1752.

Gilbert, H.J., and Hazlewood, G.P. 1993. Bacterial cellulase and xylanase and xylanase. J. Microbiol. 139: 187-194.

Gilbertson, R.L. 1980. Wood-Roting Fungi of North America. Mycologia. 72:1-49.

Goering, H.K., and Van Soest P.J. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagent, Producers and Some Applications). Agriculture Handbook No.379. United States Department of Agriculture. Washington, D.C. 20402, U.S.A. 20 p.

Godden, B., Legon, T., Helvenstein, P., and Penninekx, M. 1989. Regulation of the production of hemicellulose and cellulytic enzyme by *Streptomyces* sp. growing on lignocellulose. J. Gen. Microbiol. 135: 285-292.

Gokhale, D. V., Puntambekar, U.S., and Deobagkar, D.N. 1986. Xylanase and β-xylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. Biotechnol. Lett. 8(2): 137-138.

Gomes, D.J., Gomes, J., and Steiner, W. 1994. Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus auranticus* and partial characterization of the enzyme. J. Biotechnol. 37: 11-12.

Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W., and Esterbauer, H. 1992. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride.* Appl. Micobiol. Biotechnol. 36: 701-707.

Gome, J., Purkarthofer, H., Hayn, M., Kapplmuller, J., Sinner, M., and Steiner, W. 1993. production of a high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermyces lanuginosus* in laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 700-707.

Gomerith, G., Groicher, R., Zerlinger, S., Herzog, P., and Kubicek, C.P. 1992. Cellulase-poor xylanase produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on hemicellulose substrates. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 315-322.

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

Haltrich, D., Sebesta B., and Steiner W.1994. Formation of xylanase by *Schizophyllum commune* effect of medium components Enzyme and Microbial Technology. 16(3): 229-235.

Haltrich, D., Sebesta B., and Steiner W.1995. Induction xylanase and cellulase in *Schizophyllum commune*. Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates. 618: 305-318.

Harada, H., and Cote, W.A. 1985. Structure of wood in biosynthesis and biodegradation of wood components. Higuchi, T. (ed.), Academic Press, New York, p.16.

Hayn, M., Steiner, W., Klinger, R., SteinmÜller, H., Sinner, M., and Ester baver, H. 1993. Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics. In: Saddler, J. N. (ed). Bioconversion of Agricultural Plant Residues. CAB International, Wallingford, UK. (in press).

Iwamoto,T. Sasaki, T., and Inaoka. 1973. Mem. Ehime Univ. 17: 13-25. In Dekker, R.F.H. and Richards, G.N. 1976. Hemicellulases: Their occurrence, purification, properties and mode of action. Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 32: 277-352.

Jonh, M., and Schmidt, B. 1979. Purification and some properties of five endo 1,4 β-D-xylanase and β-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger* Can. J. Biochem. 57: 125-135.

Kang, M.K., Maeng, P.J., and Rhee, Y.H. 1996. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic *Cephalosporium* sp. Strain RYM-202. App. Environ. Microbiol. 62(9): 3480-3482.

Karni, M., Deopurkar, R.L., and Rale, V.B. 1993. β-xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grown. Biotechnol. 9: 476-478.

Kirk, K. T., and Farrell, R.I. 1987. Enzymatic "Composition" The microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbiol. 41: 465-505.

Kristufek, D., Zeilinger, S., and Kubick, C.K. 1995. Regulation of beta xylosidase formation in *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42(5): 713-717.

Lee, S.F., Forberg, C.W., and Rattaray, J.B. 1987. Purification and characterization of two endoxylanase from *Clotridium acetobutylicum* ATCC 824. Appl. Environ. Microbiol. 53(4): 644-650.

Linder, C., Stulket, J., and Hecker, M. 1994. Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtillis*. Microbiol. 140: 753-757.

Magee, R.J., and Kosaric, N. 1985. Bioconversion of hemicellulosic. Adv. Biochem. Bioeng. 32: 64-93.

Manonmani, H.K., and Sreekantiah, K.R. 1987. Saccharification of sugarcane bagasse from *Aspergillus ustus* and *Trichoderma viride*. Enz. Microbiol. 9: 484-488.

Nanmori, T., Watanabe, T., Shinke, R., Kohno, A., and Kawamura, Y. 1990. Purification and some properties of thermostable of xylanase and β-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stesrothermophilus* strain. J. Bacteriol. 172(12): 6669-6672.

Paice, M.G., Jurasek, L., Carpenter, M.R., and Smillie, L.B.1978. Production, characterization, and partial amino acid sequence of xylanase a from *Shizophyllum commune*. Appl. Environ. Microbiol. 36(6): 802-808.

Pilon, L., Barbe, M. C., Desrochers, M., and Jurasek, L. 1982. Fungal treatment of mechanism pulps its effect on paper properties. Biotechnol. Bioeng. 24: 2063-2076.

Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L. and Tanticharoen, M. 1999. Purificayion and some properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliophillic *Bacillus* sp. Strain K-1. Appl. Environ. Microbiol. 65(2): 694-697.

Ratto, M., Mahrani, I.M., Ahring, B., and Viikari, L. 1992. Production of xylanolytic enzymes by alkalotolerant *Bacillus circulans* strain. Appl. Microbiol Technol. 37: 470-473.

Rose, A.H. 1980. Microbial Enzyme and Bioconversions. England: School of Biological Science University of Bath.

Ross, N.W., Johnson, K.G., Braun, C., Mackenzie, C.R., and Schneider, H. 1992. Enzymatic hydrolysis of water-soluble lignin carbohydrate complexs from *Populus detoides* effect of combination of β-mamanaase, xylanase and acetyl xylanesterase. Enzyme and Microbial Technol. 14(2): 90-95.

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

Smith, D.C., and Wood, T.M. 1991. Xylanase production by *Aspergillus awamori* development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and β-xylosidase while maintaining low protease production. Biotechnol. Bioeng. 38(3): 883-890.

Stephens, G.R., and Heichel, G.H. 1975. Agricultural and forest products as source. Biotechnol, Bioeng. Symp. 5: 27-42.

Svarachorn, A. 1999. Production of fungal-xylanase using agricultural waste by solid state fermentation. J. Sci. Res. Chula. Univ. 24(1): 13-20.

Tan, L.U.L., Yu, E.K.C., Louis, S.G.W., and Saddler, J. N. 1987. Inexpensive, rapid procedure for bulk purification of cellulase-free β-1,4-D-xylanase of high specific activity. Biotechnol. Bioeng. 30: 96-100.

Tenkanen, M., Puls., Ratto, M., and Viikari, L. 1993. Enzymatic deacetylation of galactoglucomannans. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 159-165.

Tsujibo, H., Sakamoto, T., Nishino, N., Hasegawa, T., and Dlnamori, Y. 1990. Purification and properties of three types of xylanases produced by an alkalophlic actinomycete. J. Apl. Bacteriol. 69: 398-405.

Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., and Sadler, J.N. 1988. Multiplicity of β-1,4-xylanase in microorganism: functions and applications. Microbiol. Rev. 52(3): 305-317.

Xu, J., Takakuw, N., Nogawa, M., Okada., and Morikawa, Y. 1998. A thrid xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 718-724.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

1. Potato Dextrose Agar (PDA) ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเด็กโตรส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำมันฝรั่งที่ล้างสะอาดแล้วมาหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์-เซนติเมตร ไปต้มในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุกโดยสังเกตได้จากเมื่อใช้มือบีบแล้ว มันฝรั่งจะแตกออกโดยง่าย จากนั้นใช้ผ้าขาวบางกรองเอาส่วนแต่น้ำ เติมส่วนประกอบที่เหลือลงไป คนให้ละลายหมด ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 5.0–5.5 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. Production medium

$MgSO_4$	1.0	กรัม
$CaHPO_4$	5.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	4.0	กรัม
Corn steep liquor	10	กรัม
$FeSO_4$	5.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	1.4	มิลลิกรัม
$MnSO_4$	1.6	มิลลิกรัม
$CoCl_2$	3.6	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร	2.0	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้ได้ 5.0 ถ่ายใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 100 มิลลิลตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

หมายเหตุ: วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร และ $CaHPO_4$ ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงต้องชั่งใส่ฟลาสก์ก่อนแล้วจึงเติมสารอาหารลงไปให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid)

1.1 เตรียมสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย phenol 10 กรัม เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เทแบ่งออกมา 96 มิลลิลิตร เติม $NaOSO_3$ 9.6 กรัม คนให้เข้ากัน

1.2 เตรียมสารละลาย DNS 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 880 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย Rochelle salt 255 กรัม ด้วยสารละลาย NaOH 4.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเทรวมกับสารละลาย DNS 1 เปอร์เซ็นต์ คนให้เข้ากัน

1.3 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1.1 และ 1.2 เทรวมกัน จะได้เป็นสารละลาย DNS สารละลายนี้ต้องเก็บไว้ในขวดสีชา แล้วนำไปใส่ในตู้เย็นอย่างน้อย 1 คืน จึงนำไปใช้ได้

2. การเตรียม 0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8

2.1 เตรียม 0.1 M Citric acid ($C_6H_8O_7.H_2O$; MW = 210.14) โดยชั่งสาร 21.01 กรัม ละลายน้ำ ปรับปริมาตร ให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

2.2 เตรียม 0.1 M Tri-sodium citrate dihydrate ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$; MW = 294.12) โดยชั่งสาร 29.41 กรัม ละลายน้ำ ปรับปริมาตร ให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

นำสารละลายในข้อ 2.1 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายในข้อ 2.2 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร จะได้ sodium citrate buffer pH 4.8 ที่มีความเข้มข้น 0.1 M

3. การเตรียม 50 mM phosphate buffer pH 7

เตรียม stock 0.2 M phosphate buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เตรียมได้จาก stock solution 2 ชนิด คือ

3.1 เตรียม 0.2 M $NaH_2PO_4.2H_2O$; MW = 156.01) โดยชั่งสาร 15.60 กรัม ละลายน้ำ ปรับปริมาตร ให้ครบ 500 มิลลิลิตร

3.2 เตรียม 0.2 M $Na_2HPO_4.2H_2O$; MW = 177.96) โดยชั่งสาร 17.79 กรัม ละลายน้ำ ปรับปริมาตร ให้ครบ 500 มิลลิลิตร

การเตรียม 50 mM phosphate buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยใช้ 0.2 M phosphate buffer ปริมาตร 62.5 มิลลิลิตร เติมน้ำจนครบ 500 มิลลิลิตร

การเตรียม reagent ที่ใช้ในการวัดเอนไซม์ไซแลนเนส

1. Reagent A

ชั่ง	Na_2CO_3	25.0	กรัม
	NaK Tartatate (Rochelle salt)	25.0	กรัม
	$NaHCO_3$	20.0	กรัม
	Na_2SO_4	200.0	กรัม

ละลายสารดังกล่าวให้เข้ากัน ปรับปริมาตรโดยใช้ volumetric flask ให้มีปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร

2. Reagent B (copper alkaline reagent)

ชั่ง $CuSO_4$.$5H_2O$ 15.0 กรัม ละลายน้ำจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 2 หยดของกรดซัลฟูริกเข้มข้น

3. Reagent C

เตรียมโดยปิเปต 25 มิลลิลิตร ของ reagent A ผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของ reagent B (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

4. Reagent D (arsenomolybdate reagent)

ชั่ง 25.0 กรัม ของ ammonium molybdate ละลายใน 450 มิลลิลิตร เติม 21 มิลลิลิตร ของกรดซัลฟูริกเข้มข้น ในขณะการกวนให้เข้ากัน

จากนั้นเติม 3.0 กรัม ของ Na_2HasO_4.7H2O ที่ละลายอยู่ในน้ำ 25 มิลลิลิตรลงไป แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ใส่ในขวดสีน้ำตาล และนำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร

1. Neutral detergent solution ประกอบด้วย

3 %(w/v) Sodium lauryl sulfate

1.618 % (w/v) ethylenediamine tetracetic acid (EDTA)

0.456 % (w/v) Na_2HPO_4

0.681 % (w/v) $Na_2B_4O_7\,10H_2O$

1% (v/v) ethylene glycol monoethyl ether

ปรับสารละลายให้มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.9 และเติม 2 % (v/v) decahydronaphthalene และ 0.5 % (w/v) Na_2SO_4

2. Acid detergent solution ประกอบด้วย

2 % (w/v) cetyl trimethy ammonium bromide ใน 1 N H_2SO_4

3. Lignin determination

Buffer solution ประกอบด้วย

0.6 % (w/v) $Fe\,(NO_3)_3\,9H_2O$

0.015 % (w/v) $AgNO_3$

50 % (v/v) glacial acetic acid

0.5 % (w/v) potassium acetate

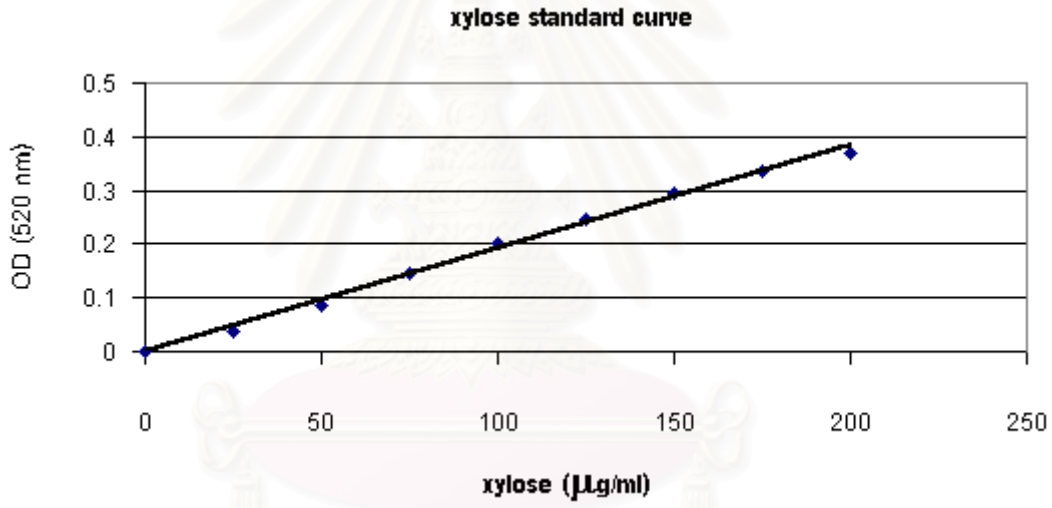
40 % (v/v) tertiary butyl alcohol

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การทำกราฟน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน

การทำกราฟน้ำตาลมาตรฐานทำได้โดย เตรียมสารละลายน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 25 50 75 100 125 150 175 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม reagent C (ภาคผนวก ข) หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำไปตั้งในน้ำเดือด 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม reagent D (ภาคผนวก ข) หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสดังแสดงในภาพที่ 23

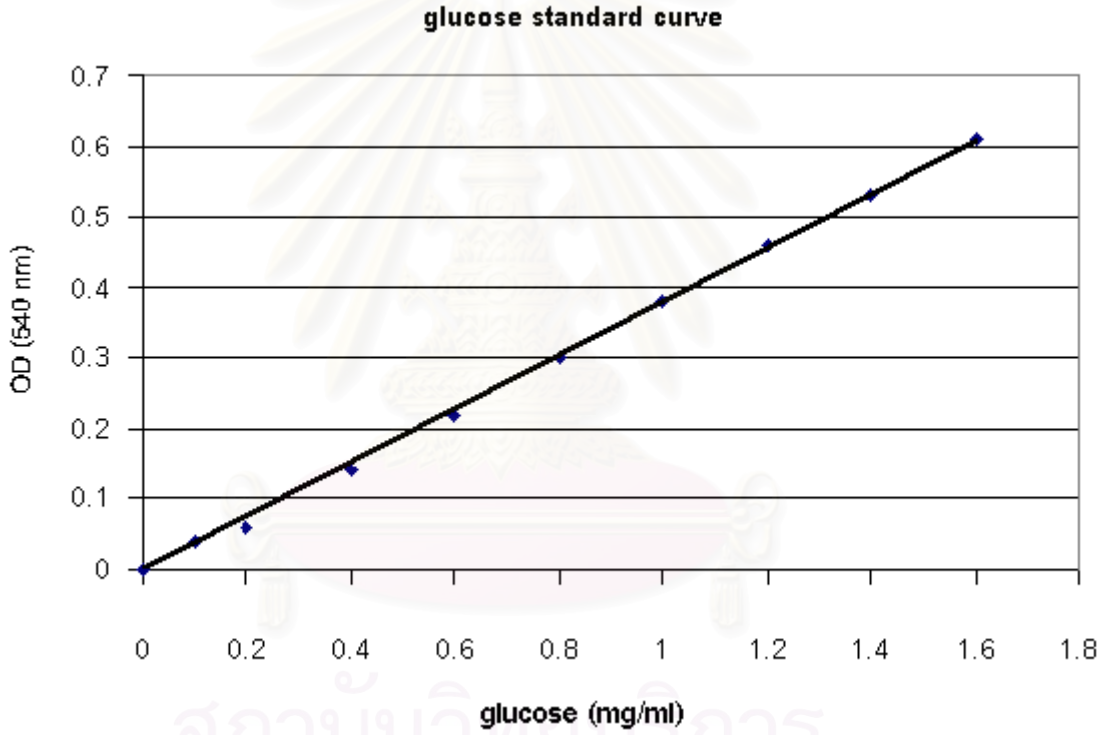


ภาพที่ 23 กราฟน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

การทำกราฟน้ำตาลมาตรฐานทำได้โดย เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.4 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปตั้งในน้ำเดือด 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 20 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสดังแสดงในภาพที่ 24



ภาพที่ 24 กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณหาค่า unit of enzyme **ตามวิธีการของ** The International Union of Biochemistry

การคำนวณ unit of enzyme **ของไซแลนเนส**

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที

1 หน่วยของเอนไซม์ = 1 μM ของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1 μM ของไซโลสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1นาที

= 0.150 มิลลิกรัม ของไซโลสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

ถ้า 0.150 มิลลิตร ไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า = 1 หน่วย

1.000 มิลลิกรัม ไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 10 นาที มีค่า = $\frac{1}{0.150 \times 10}$ หน่วย

= 0.67 หน่วย

หากปลดปล่อยไซโลส x มิลลิลิตร ใน 10 นาที จะมีค่า = (x) x (0.67) หน่วย

จากการทดลองในปริมาณเอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร ถ้าหากใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร

= $\frac{(x) \times (0.67)}{0.25}$ หน่วย

หรืออาจคิดเป็น = $\frac{(\text{มิลลิกรัมไซโลส}) \times (0.67)}{\text{มิลลิลิตรของเอนไซม์}}$ หน่วยต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณ unit of enzyme **ของเซลลูเลส**

1 หน่วยของเอนไซม์ = 1 μM ของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1 μM ของไซโลสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1นาที

= 0.180 มิลลิกรัม ของไซโลสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

ถ้า 0.180 มิลลิกรัม กลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า = 1 หน่วย

1.000 มิลลิกรัม กลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 60 นาที มีค่า = $\frac{1}{0.180 \times 60}$ หน่วย

= 0.093 หน่วย

หากปลดปล่อยกลูโคส x มิลลิลิตร ใน 60 นาที จะมีค่า = (x) x (0.093) หน่วย

จากการทดลองในปริมาณเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ถ้าหากใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร

= $\frac{(x) \times (0.093)}{0.5}$ หน่วย

หรืออาจคิดเป็น = $\frac{(\text{มิลลิกรัมกลูโคส}) \times (0.093)}{\text{มิลลิลิตรของเอนไซม์}}$ หน่วยต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ตาราง ANOVA

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *Trichoderma reesei* Rut C-30 เมื่อใช้เซลลูโลส 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	1,426.7217	203.8174	260.8047 **
Error	16	12.5039	0.07815	
Total	23	1,439.2256		

** significant at 1% level

CV = 5.91 %

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้เซลลูโลส 2 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับการใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	0.8707	0.1244	45.9550 **
Error	16	0.0433	0.0027	
Total	23	0.914		

** significant at 1% level

CV = 19.65 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	15	3,0457959	203.0531	133.8438 **
Error	32	48.5469	1.5171	
Total	47	3,094.3428		

** significant at 1% level

CV = 10.42%

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเปรียบเทียบกับการใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	7	22,668.9961	3,238.4280	106.938**
Error	16	484.5234	30.2827	
Total	23	23,153.5195		

** significant at 1% level

CV = 17.80 % 13%

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 เมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เป็นแหล่งคาร์บอน

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	19	1.1209	0.0590	253.4067 **
Error	40	0.0093	0.0002	
Total	59	1.1302		

** significant at 1% level

CV = 6.18 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 เมื่อเลี้ยงในรำข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	19	2,746.4141	144.548	80.1447**
Error	40	72.1436	1.8036	
Total	59	2,818.5576		

** significant at 1% level

CV = 9.29 %

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	19	5.8393	0.3073	99.6307**
Error	40	0.1234	0.0031	
Total	59	5.9627		

** significant at 1% level

CV = 14.73 %

ตารางที่ 21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้ แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	19	33,293.5308	173.3437	88.9588**
Error	40	77.9434	1.94886	
Total	59	3,371.4741		

** significant at 1% level

CV = 12.32 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	19	0.4933	0.0260	53.2547**
Error	40	0.0195	0.0005	
Total	59	0.5128		

** significant at 1% level

CV = 17.57

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลส

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	11	5,218.8652	474.4423	161.5167 **
Error	24	70.4980	2.9374	
Total	35	5,289.3633		

** significant at 1% level

CV = 8.07 %

ตารางที่ 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับการใช้ไซแลนและไซโลส

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	11	5.2287	0.4753	82.0453**
Error	24	0.1390	0.0058	
Total	35	5.3677		

** significant at 1% level

CV = 13.63 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *T.reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับการใช้ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	5	19,663.0469	3,932.6094	89.3841 **
Error	12	527.9609	43.9967	
Total	17	20,191.0078		

** significant at 1% level

CV = 10.57 %

ตารางที่ 26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้จากการเลี้ยง *T. reesei* Rut C-30 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับการใช้ β-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	5	0.1171	0.0234	4.9732 *
Error	12	0.0565	0.0047	
Total	17	0.1736		

* significant at 5% level

CV = 10.66 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวเนริสา คุณประทุม เกิดเมื่อวันที่ 22 มิถุนายน พ.ศ. 2517 ที่จังหวัดชัยภูมิ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2539 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2543

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย