งานวิจัย

เรื่อง

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากขี้เลื่อยโดยเชื้อราด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง

(Production of Cellulase from Sawdust by Fungal in Solid State Fermentation)

นางสาวจารุวรรณ มณีศรี

ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยของสถาบันเทคโนโลยีราชมงคลปีงบประมาณ 2541
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์นครศรีธรรมราช
สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากขี้เลื่อยโดยเชื้อราด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง

นางสาวจารุวรรณ มณีศรี

บทคัดย่อ

การเลี้ยงเชื้อรา 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108, *Aspergillus niger* TISTR 3425, *Aspergillus oryzae* , *Trichoderma reesei* TISTR 3081 และ *Chaetomium globosum* TISTR 3093 ในอาหารแข็งที่มีขี้เลื่อยไม้ยางพาราเป็นแหล่งคาร์บอน และมีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50, 60 และ 70 พบว่า เชื้อ *A. fumigatus* TISTR 3108 ที่เลี้ยงในสภาพที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ให้ค่าแอคทิวิตี้ของ CMCase สูงสุดเท่ากับ 1.05 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 4 วัน เมื่อศึกษาผลของสปอร์เริ่มต้น (10^6, 10^7และ 10^8, สปอร์ต่อกรัมสับสเตรท), พีเอชเริ่มต้น (4, 5, และ 6), ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนโดยเปรียบเทียบระหว่างยูเรียและแอมโมเนียมไนเตรทที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2 และ 3 พบว่า การใช้สปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อกรัมสับสเตรท, พีเอชเริ่มต้น 4 และใช้ยูเรียร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่เชื้อ *A. fumigatus* TISTR 3108 ให้ค่าแอคทิวิตี้ CMCase สูงสุดเท่ากับ 1.40, 3.52 และ 3.55 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ หลังการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน

เมื่อเปรียบเทียบผลของการแปรสภาพขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยการบด, การใช้ความร้อน และการใช้ด่าง พบว่า การแปรสภาพไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ เมื่อขยายขนาดของการหมัก (5, 25, 50, 100และ 500 กรัม) พบว่า การเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* TISTR 3108 ในสับสเตรท 100 กรัม ให้ค่าแอคทิวิตี้สูงสุดเท่ากับ 16.22 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท หลังการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน และนำเอนไซม์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ dialysis หลังจากนั้นทำให้เป็นผงด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยงพบว่า ได้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.04 กรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าแอคทิวิตี้ CMCase เท่ากับ 0.82 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Production of Cellulase from Para Sawdust by Fungals in Solid state Fermentation

ABSTRACT

Cultivation of 5 fungal strains is *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108, *Aspergillus niger* TISTR 3425, *Aspergillus oryzae* , *Trichoderma reesei* TISTR 3081 and *Chaetomium globosum* TISTR 3093 using solid substrate on para rubber sawdust and 50, 60, and 70% initial moisture contents. The maximum activities of carboxymethylcellulose (CMCase) (1.05 U/g substrate) were obtained from *A. fumigatus* TISTR 3108 at 70% initial moisture content after 4 days cultivation. Factors effection the production of enzyme of initial spores (10^6, 10^7, and 10^8 spores/g substrate), initial pH (4, 5 and 6) and nitrogen sources (urea and ammonium nitrate at 1, 2 and 3%) were studied. Using 10^6 spores/g substrate, initial pH of 4 and addition 1% urea as nitrogen sources wer the optimum conditons, *A. fumigatus* TISTR 3108 produced th highest CMCase activity of 1.40, 3.52 and 3.55 U/g substrate after 4 days cultivation.

A Comparative study of using to ground, heat and alkali pretreated para rubber sawdust, It indicated that the pretreatments was no effecting for enzyme production. To scales up of the fermentation. The maximum enzyme activities as 16.22 U/g substrate was obtained from 100 g sustrate after 4 days cultivation. The partially purified enzyme by ammoniumsulfate precitpiation, dialysis and evaporate centrifuge to the powder were 0.04 g/ml and CMCase activity of 0.82 U/ml.

คำนิยม

ข้าพเจ้าขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณในการวิจัยประจำปี 2541ในครั้งนี้แก่ข้าพเจ้า ขอขอบคุณภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์นครศรีธรรมราชที่ได้ให้การสนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์ที่เอื้ออำนวยต่อการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณนักศึกษาภาควิชาอุสาหกรรมเกษตรที่ให้ความร่วมมือในการทำการวิจัยในครั้งนี้

นางสาวจารุวรรณ มณีศรี

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญรูป	ข
บทนำ	1
จุดประสงค์ของการทดลอง	2
การตรวจเอกสาร	3
1 ยางพารา	3
2 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส	4
3 เอนไซม์เซลลูเลส	5
4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอไซม์เซลลูเลสในสภาพการหมักแบบอาหารแข็ง	9
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	15
ผลการทดลองและวิจารณ์	18
สรุปผลการทดลอง	28
ข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	33
ภาคผนวก ก.	34
ภาคผนวก ข.	35
ภาคผนวก ค	39

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	10
2	องค์ประกอบของขี้เลื่อยไม้ยางพารา	19

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส	4
2	รูปร่างของโครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์พืชโดยทั่วไป	6
3	ลำดับการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์	7
4	การประยุกต์ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	8
5	ผลของสายพันธุ์เชื้อราและความชื้นต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	20
6	ผลของปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108	21
7	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108	23
8	ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108	24
9	ผลของการแปรสภาพขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108	25
10	ผลของการขยายขนาดการหมักต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108	27

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

บทนำ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจของภาคใต้ของประเทศไทย จังหวัดที่ปลูกมากที่สุด คือ จังหวัดสงขลา และนครศรีธรรมราช (นพรัตน์, 2536) ในปี พ.ศ. 2536 และ 2537 มีพื้นที่ปลูกยางพารา 11.92 และ 12.12 ล้านไร่ ตามลำดับ (อัญชลี, 2537, 2538) และมีแนวโน้มขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เป็นผลมาจากการส่งเสริมของกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยางที่ได้มีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ไม้ยางพาราประกอบกับไม้ยางพาราจะให้น้ำยางน้อยลงเมื่อมีอายุประมาณ 25 ปี จึงต้องตัดและปลูกขึ้นใหม่ โดยพื้นที่ปลูกไม้ยางพารา 1 ไร่ จะให้เนื้อไม้ยางพาราเฉลี่ย 32.43 ลบ.ม. (ธวัช, 2538) สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมไม้แปรรูป อุตสาหกรรมเครื่องเรือน และอุตสาหกรรมไม้อัดไม้ประกอบ เป็นต้น จากกระบวนการเหล่านี้ทำให้เกิดวัสดุเศษเหลือที่สำคัญ คือ ขี้เลื่อย ซึ่งได้มีการนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยตรง เช่น ทำปุ๋ย วัสดุในการเผาถ่านแทนการใช้แกลบ และการใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อใช้เพาะเห็ด เป็นต้น

ด้วยเหตุที่ขี้เลื่อยไม้ยางพาราเป็นวัสดุเศษเหลือพวกลิกโนเซลลูโลส มีองค์ประกอบหลัก คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ดังนั้นการนำขี้เลื่อยไม้ยางพารามาเป็นสับสเตรทในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง ซึ่งจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จึงนับว่าเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานแปรรูปไม้ยางพาราในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

จุดประสงค์ของการทดลอง

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ คือ

1. เพื่อศึกษาแนวทางการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราโดยใช้ขี้เลื่อยไม้ยางพาราเป็นแหล่งคาร์บอน
2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การตรวจเอกสาร

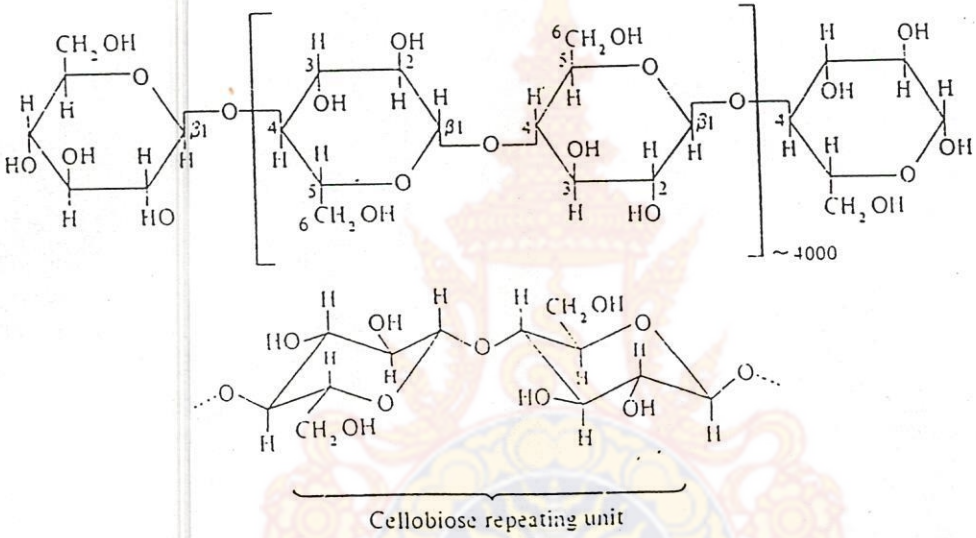
1. ยางพารา (Para Rubber)

ยางพารามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hevea brasilensis* เป็นพืชใบเลี้ยงคู่อยู่ใน Family Euphorifiaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตป่าร้อนที่มีฝนตกชุกในอเมริกาใต้ ได้แก่ ประเทศบราซิล และเปรู โดยเฉพาะอย่างยิ่งแถบฝั่งแม่น้ำอเมซอน (สนิท, 2523) และได้มีการนำยางพาราไปปลูกยังแหล่งอื่นๆของโลก โดยเฉพาะทวีปเอเชียเป็นพื้นที่ที่ได้รับความสนใจเนื่องจากมีสภาพภูมิอากาศคล้ายคลึงกับทวีปอเมริกาใต้ ซึ่งได้นำมาปลูกเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2416 ที่เมืองกัลกัตตา ประเทศอินเดีย แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ จนกระทั่ง พ.ศ.2420 ได้นำยางพารามาปลูกที่ประเทศสิงคโปร์และมาเลเซีย ซึ่งประสบผลสำเร็จและส่งผลให้มีการทำสวนยางพาราเป็นอาชีพในแถบภูมิภาคเอเชียตั้งแต่บัดนั้นเป็นต้นมา (วิชิต, มปพ)

สำหรับประเทศไทย พระยารัษฎานุประดิษฐ์มหิศรภักดีเป็นผู้นำยางพาราจากประเทศมาเลเซียเข้ามาปลูกที่อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2442-2444 และในปี พ.ศ. 2454 หลวงราชไมตรี (ปูม ปุณศรี) ได้นำยางพาราจากประเทศมาเลเซียเช่นกันไปปลูกที่จังหวัดจันทบุรี (ชิต, 2531) จึงทำให้พื้นที่ปลูกยางพาราเพิ่มขึ้นจนเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้เป็นอันดับ 3 ของประเทศ รองจากเสื้อผ้าสำเร็จรูปและชิ้นส่วนอุปกรณ์ส่วนประกอบเครื่องคอมพิวเตอร์ และตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 ประเทศไทยสามารถส่งยางพาราเป็นสินค้าออกมากเป็นอันดับ 1 ของโลก รองลงมาคือ ประเทศอินโดนีเซีย และมาเลเซีย ตามลำดับ ส่วนไม้ยางพาราสามารถนำมาใช้ประโยชน์ เช่น ทำเฟอร์นิเจอร์, ไม้อัด และการใช้เป็นเชื้อเพลิง ซึ่งจากกระบวนการแปรรูปไม้ยางพาราจะทำให้เกิดวัสดุเศษเหลือ คือ ขี้เลื่อย ส่วนใหญ่นำมาใช้ประโยชน์ เช่น เผาถ่าน ทำปุ๋ย และเพาะเห็ด เป็นต้น

2. ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปไม้ยางพาราเป็นสวกพวกลิกโนเซลลูเลสมีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ เซลลูโลส เซมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยpolymer moleculeของหน่วยย่อยของD-anhydroglucopyranose มาเชื่อมต่อเป็นสายยาวด้วยพันธะ β-1, 4 glucosidic อย่างมีระเบียบ จำนวนหน่วยย่อยของ D-anhydroglucopyranose ต่อหนึ่งโมเลกุล (degree of polymerization) จะมีอย่างน้อยประมาณ 15 หน่วย จนถึง 10,000-14,000 หน่วย (Cowling and Kirk, 1976) เซลลูโลสที่ต่อกันอยู่ในสายลูกโซ่ของเซลลูโลสเป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 1 เมื่อสายของเซลลูโลสหลายสายเข้ามาใกล้กัน โดยเรียงตัวขนานและเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจนอย่างมีระเบียบในลักษณะที่เรียกว่า Crystalline micelle แต่ละไมเซลประกอบด้วยโมเลกุลของเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุล ไมเซลจะเรียงตัวเป็นโครงสร้างใหญ่ขึ้นเรียกว่า ไมโครไฟบิล (microfibril) ซึ่งอาจจะม้วนหรือพันไปมาตามแกนของเส้นใย



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส
ที่มา : Goodwin และ Mercer (1983)

เซลลูโลส หรือม้วนทับกันเป็นเกลียวรอบแกนของเส้นใย จากการเรียงตัวของโมเลกุลของเซลลูโลส ทำให้สามารถแบ่งรูปร่างของเซลลูโลสในผนังเซลของพืชได้ 3 แบบ ดังรูปที่ 2 ในธรรมชาติจะมีส่วนที่จัดตัวเป็นระเบียบ (Crystalline) ร้อยละ 85 และส่วนที่ไม่เป็นระเบียบร้อยละ 15 (Tsao and Chiang, 1983)

3. เอนไซม์เซลลูเลส

การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสทำได้ 2 วิธี คือ วิธีทางเคมี โดยย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) และวิธีการใช้เอนไซม์ (enzyme hydrolysis) (Tsao and Chiang, 1983; Spano, 1977) การย่อยด้วยกรดเครื่องมือที่ใช้จะต้องทนทานต่อการกัดกร่อน ซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้ส่วนโมเลกุลของเซลลูโลสที่เป็นระเบียบ (crystalline) จะทนทานต่อกรดที่มีความเข้มข้นสูงและอุณหภูมิสูง เนื่องจากปฏิกิริยาการใช้กรดไม่เฉพาะเจาะจง ดังนั้นการใช้เอนไซม์ย่อยสลายจึงได้น้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ กลูโคสบางส่วนที่เกิดขึ้นและสารประกอบอื่นที่ติดมากับเซลลูโลสจะทำปฏิกิริยากับกรดต่อไปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ ส่วนการใช้เอนไซม์ซึ่งเป็นวิธีทางชีวเคมีที่มีความจำเพาะเจาะจง ดังนั้นการใช้เอนไซม์ย่อยสลายจึงได้น้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์

เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส เป็นกลุ่มของเอนไซม์ (multiple enzymes) ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ (Fan and Lee, 1983)

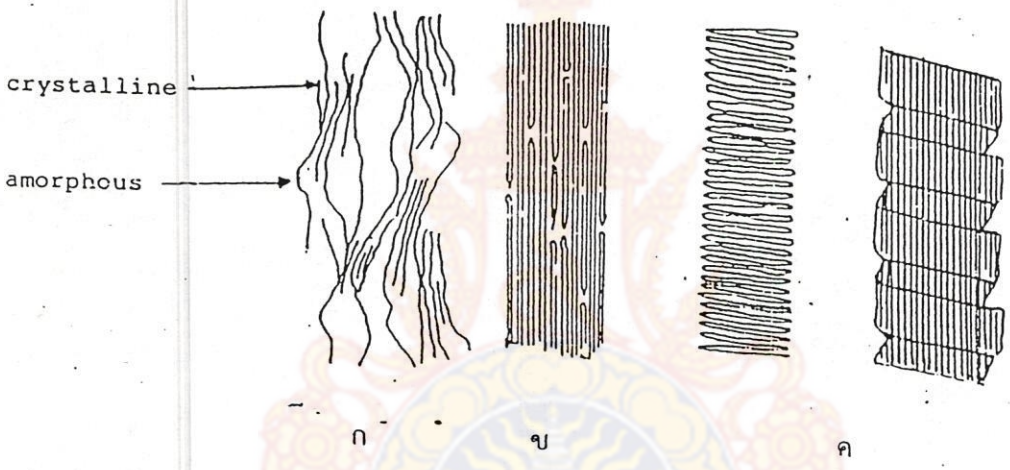
1. Endo-β-1,4-glucan glucanohydrolase (EC. 3.2.1.4) หรือ endo-β-1,4-glucanase ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในรูปที่เป็นระเบียบ (crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) รวมทั้งโมเลกุลของ cellooligomer ที่ตำแหน่งพันธะ β-1,4 แบบสุ่ม ทำให้ได้ oligomer และเซลโลไบโอส

2. Exo-β-1,4-glucan cellobiohydrolase (EC. 3.2.1.91) หรือ CBH เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ Endo-β-1,4-glucanase ในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยย่อยจากปลายด้าน non-reducing ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส

3. β-glucosidase (EC. 3.2.21) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของ cellobiose และ cellooligosaccharide ให้กลูโคส

4. Exo-β-1,4-glucan glucohydrolase (EC. 3.2.1.7.4) หรือ exo-β-1,4-glucosidase เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่แยกหน่วยกลูโคสออกจากปลายด้าน non-reducing ของเซลลูโลสได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสโดยตรงโดยไม่เกิดเซลโลไบโอส เอนไซม์ชนิดนี้พบในจุลินทรีย์เพียงไม่กี่สายพันธุ์ ได้แก่ *Trichoderma reesei* QM 9414 (Marsden. *et al.* 1982)

กลไกการย่อยสลายโมเลกุลเซลลูโลสทั้งในรูปที่เรียงตัวไม่เป็นระเบียบและเป็นระเบียบ ได้น้ำตาลกลูโคสด้วยเอนไซม์เซลลูโลส ดังรูปที่ 3 ซึ่งน้ำตาลกลูโคสที่ได้นี้จะมีราคาถูกและสามารถนำไปเปลี่ยนให้เป็นสารที่มีราคาสูงโดยการใช้เอนไซม์หรือกระบวนการหมัก (Fiechter, 1986) แสดงดังรูปที่ 4



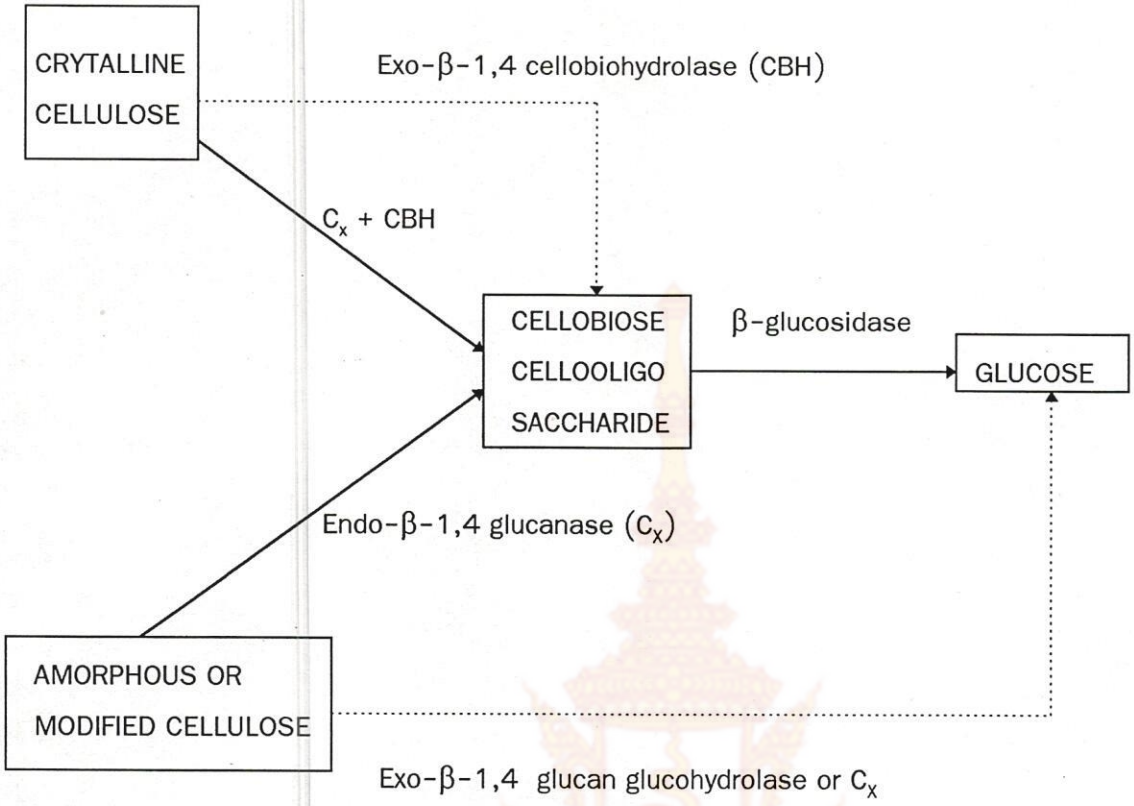
รูปที่ 2 รูปร่างของโครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์พืชโดยทั่วไป

ก. fringle micelle ประกอบด้วยส่วนที่เป็นระเบียบและที่ไม่เป็นระเบียบ

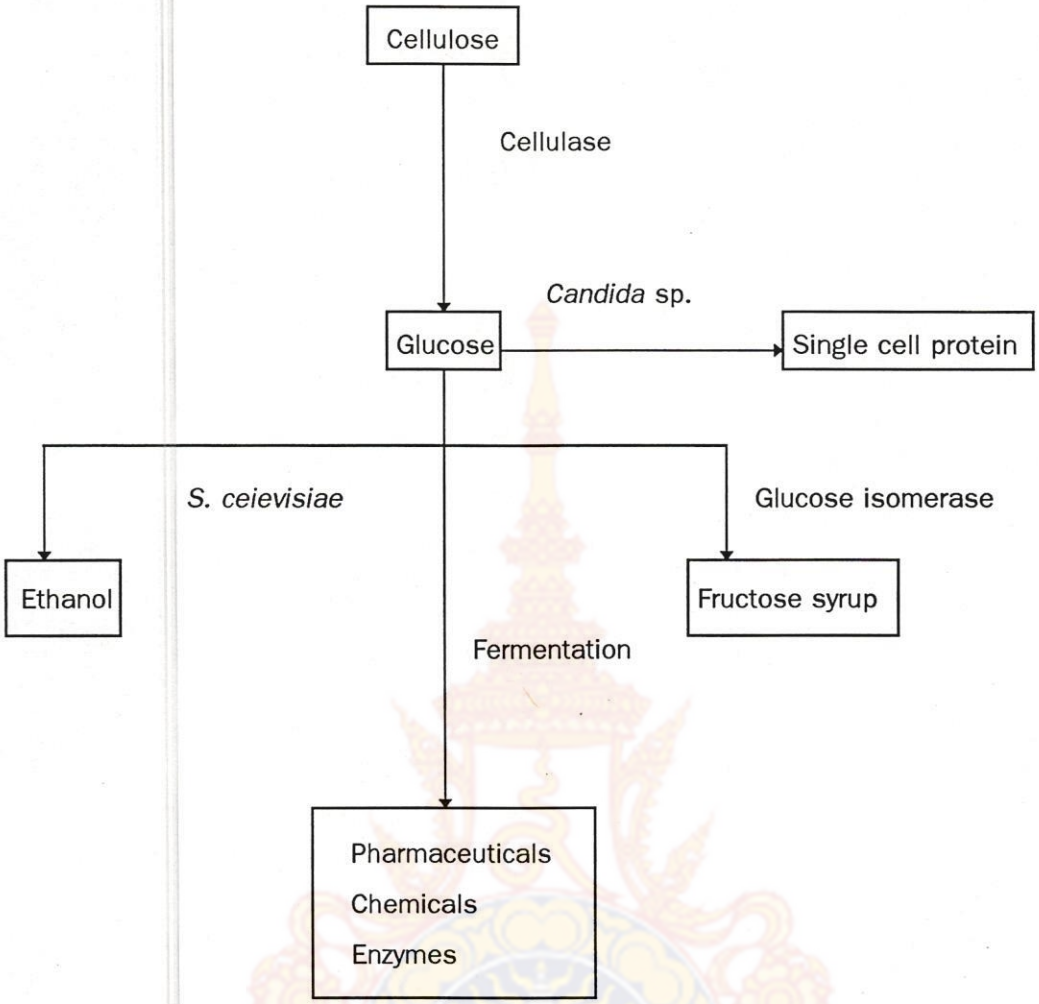
ข. โครงสร้างของเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใย

ค. โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นริบบิ้นหนาเกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้งฉากกับแกนของริบบิ้นและแถบของริบบิ้นที่ม้วนเป็นเกลียว

ที่มา : Norkrans (1967) อ้างโดย วิเชียร (2532)



รูปที่ 3 ลำดับการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์
ที่มา : Fan และ Lee (1983)



รูปที่ 4 การประยุกต์ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเสล
ที่มา : ดัดแปลงจาก Fiechter (1986)

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส สามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ การเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง (Solid state fermentation, SSF) และการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว (Liquid state fermentation, LSF) (Madamwar *et al.*, 1989) ในการผลิตทั้งสองแบบจะใช้วัตถุดิบประเภทเซลลูโลสบริสุทธิ์ที่สามารถชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ได้สูง แต่เนื่องจากมีราคาแพงจึงไม่นิยมใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเอนไซม์ในทางการค้า วัตถุดิบที่ได้รับความสนใจในขณะนี้ได้แก่ วัตถุดิบที่เป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, กาบข้าวโพด, ฟางข้าว และ รำข้าวสาลี (วิเชียรและคณะ, 2535) ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก แต่พบว่าในการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวจะก่อให้เกิดปัญหาในการควบคุมและการไหลเวียนภายในถังหมัก นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีหลายชนิด ดังตารางที่ 1

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสภาพการหมักแบบอาหารแข็ง (Solid-state Fermentation)

การหมักแบบอาหารแข็ง เป็นสภาวะการหมักที่มีน้ำในปริมาณน้อย มีความชื้นอยู่ระหว่าง ร้อยละ 12-80 ความชื้นจะอยู่ในลักษณะที่ดูดซับบนวัตถุดิบ ปัจจัยที่สำคัญที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยทางชีวเคมี และกายภาพ ซึ่งมีผลต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ (น้อย, 2529)

4.1 แหล่งคาร์บอน

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจากธรรมชาติ เช่น สำลี, ขุยมะพร้าว, ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, ขี้เลื่อย และข้าวสาลี เป็นต้น

Madamwar และคณะ(1989)ศึกษาการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ*Aspergillus niger* โดยเปรียบเทียบวัสดุหมักต่างๆ คือ ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, Computer cards และขี้เลื่อยที่ผ่านการแปรสภาพ พบว่า ชานอ้อยที่ผ่านการแปรสภาพด้วย 5 โมลาร์ NaOH เป็นวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ exoglucanase, endoglucanase, FPase และβ-glucosidaseซึ่งให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 12.1, 21.5, 7.6 และ 12.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Wase และคณะ (1989) เลี้ยง *Aspergillus fumigatus* IMI 255091 แบบอาหารเหลวในฟลาส์กโดยใช้ฟางข้าวบดความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 5.0 (น้ำหนักโดยปริมาตร)พบว่าฟางข้าวบดร้อยละ 4.0 มีความเหมาะสมโดยให้แอคทิวิตี้ของbeta-D-glucosidase, endo-1, 4-beta-D-glucanase และ D-xylanase สูงสุดในวันที่ 6 หรือ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยให้แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ เท่ากับ 5.88, 3.24, และ 67.65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

วิเชียร (2525) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนโดย *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-IF ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงแบบ solid substrate ที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรม ได้แก่ ฟางข้าว, ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, กาบข้าวโพด และรำข้าวสาลีพบว่า ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ FPase, β-glucosidase, CMCase, β-xylanase และ β-xylosidase เท่ากับ 19.4, 15.7, 24.6, 540 และ 2.3 หน่วยต่อกรัมวัสดุแห้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จุลินทรีย์	วัตถุดิบ	อ้างอิง
Aspergillus niger	ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, ขี้เลื่อย, computer cards	Madamwar, 1989
Trichoderma reesei	เศษไม้ยูคาลิปตัส	Ramos, 1993
Aspergillus fumigatus	ฟางข้าว, กาบข้าวโพด, ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, รำข้าวสาลี	วิเชียรและคณะ, 2535
Chaetomium cellulolyticum	ขี้เลื่อย	Pamment *et al.*, 1978
Aspergillus niger ATCC 6275	กากปาล์ม, กากสลัดจ์	จารุวรรณ, 2538

น้อย (2529) ได้ศึกษาเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* (Fresenius) บนวัสดุหมัก คือ ผักตบชวา, เปลือกมันสำปะหลัง, ฟางข้าว, แกลบและขี้เลื่อย พบว่า ฟางข้าวเป็นวัสดุหมักที่ทำให้เชื้อรา *Aspergillus fumigatus* เจริญ และผลิตเอนไซม์ ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายกระดาษกรอง และ CMC สูงสุด โดยมีความสามารถในการย่อยสลายเท่ากับ 5.47 และ 6.08 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมัก

วิเชียร และคณะ(2535) ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนโดย *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-IF ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวและความชื้นเริ่มต้นของฟางข้าวที่ร้อยละ 81 เป็นความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ทุกชนิด ส่วนการเติม NH_4NO_3 มีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนแต่ละชนิดแตกต่างกัน กล่าวคือ จะช่วยเพิ่มการสร้างเอนไซม์ β-xylanase, β-xylosidase และ filter paper activity (FPase) อย่างเด่นชัดแต่มีต่อการสร้าง β-glucosidase และ carboxymethylcellulase (CMCase) เพียงเล็กน้อย เชื้อที่ศึกษาสามารถสร้างเอนไซม์ FPase, CMCase, β-glucosidase, β-xylanase และ β-xylosidase ได้ 19.4, 24.6, 15.7, 540 และ 2.3 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเจริญในอาหารที่มีฟางข้าว 5 กรัม NH_4NO_3 0.2 กรัม และ yeast extract 0.001 กรัม ในระดับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 81 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน แต่การเติม Sodium pentachlorophenate 2 มิลลิกรัม ลงในอาหารข้างต้นมีผลยับยั้งการสร้างสปอร์ การเจริญและการสร้างเอนไซม์ทุกชนิดลดลงยกเว้น เอนไซม์ β-glucosidase

4.2 ความชื้นเริ่มต้น

ความชื้นเป็นตัวควบคุมและทำให้กระบวนการหมักแบบอาหารแข็งดำเนินไปได้ ความชื้นที่มากเกินไปทำให้สับสเตรทอัดกันแน่นป้องกันการแทรกซึมของออกซิเจนและทำให้เกิดการปนเปื้อนโดยแบคทีเรียที่เจริญได้เร็ว ความชื้นที่น้อยจะยับยั้งแอคทิวิตี้ของเอนไซม์และการนำไปใช้ประโยชน์

Raimbault และ Alazard (1980) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักกากมันสำปะหลังแบบอาหารแข็งโดยเชื้อ *Aspergillus niger* พบว่า ความชื้นที่เหมาะสมคือ ร้อยละ 50-55

วิเชียร และคณะ (2535) ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นของฟางข้าวต่อการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส และไซแลนโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-IF พบว่า ความชื้นเริ่มต้น ร้อยละ 81 เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์

Alam และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ xylanase โดยเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* และ *Thermoascus aurantiacus* ซึ่งใช้ข้าวสาลีเป็นสับสเตรทใช้ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 20-100 พบว่า ความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* และ *Thermoascus aruantiacus* เป็นร้อยละ 80 และ 50 ตามลำดับ

Kinoshita และคณะ (1983) ศึกษาอิทธพลของความชื้นต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสภาพการเลี้ยงแบบอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Aspergillus sp.* บนวัตถุดิบที่ประกอบด้วย

ม15.35
ว333ท
0350

ฟางข้าวต่อรำข้าวในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 พบว่า ระดับความชื้นร้อยละ 50 เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์

4.3 ปริมาณเชื้อริ่มต้น

Battaylino และคณะ (1991) ศึกษาขนาดของเชื้อเริ่มต้น 10^4, 10^5, และ 10^6 สปอร์ต่อกรัมสับสเตรท ทำให้ผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้น

Ofura และ Ukpong (1988) รายงานว่า ความเข้มข้นของอะไมเลส เซลลูเลส และอะไมโลกลูโคซิเดสเป็นนสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้โดยแอคติวิตี้ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 4 เท่า เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นจาก $7x\ 10^4$ เป็น $3.5x10^5$ เซลล์

Battoglino และคณะ (1991) กล่าวว่า การเพิ่มปริมาณสปอร์ *A. oryzae* ไม่มีผลต่อค่าแอคทิวิตี้ของ xylanase อาจเนื่องจากผลที่เกิดขึ้นอาจเกิดในช่วง 1 และ 2 วันแรกการเปลี่ยนแปลงพีเอช พบว่า พีเอชมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณสปอร์ที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่าเท่ากับ 6.3, 6.6 และ 6.7 เมื่อใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^6, 10^7, และ 10^8 สปอร์ต่อกรัม ตามลำดับ

4.4 พีเอช

พีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน Adrian และคณะ (1993) กล่าวว่า พีเอช 5.5 จะเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อ *Penicillium janthimellum*

การหมักในระยะแรก พีเอชของการเลี้ยงเชื้อเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงอาจจะเกิดจากการย่อยโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่นๆ ออกมา Lonsane และคณะ (1992) กล่าวว่าการควบคุมพีเอชในช่วงของการหมักจะใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมากกว่าเกลือแอมโมเนีย

การย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์ขึ้นเป็นผลทำให้พีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อควบคุมให้พีเอชในอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ บัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH ออกมา

น้อย (2529) รายงานว่า เอนไซม์ Carboxymethylcellulase ของ *Aspergillus fumigatus* รหัส FKN 125ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อบนฟางข้าวในสภาพการหมักแบบแห้งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาที่ 3.6 อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บเอนไซม์ที่พีเอช 3.0-7.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะเกิดการสูญเสียแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ ร้อยละ 1.5

Stewart และParry (1981) ศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* IMI 249651พบว่า ความสามารถในการย่อยสลาย CMC (endoglucanase) และใยฝ้าย (exoglucanase) จะสูงสุดเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0

4.5 แหล่งไนโตรเจน

Raimbault และ Alazard (1980) เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* ในแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า ยูเรียในอัตราส่วนร้อยละ 40-50 ของไนโตรเจนทั้งหมดจะกระตุ้นการเจริญของเชื้อรา ซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างโปรตีน การใช้คาร์โบไฮเดรตมีมากขึ้นเมื่ออัตราส่วนของยูเรียเพิ่มขึ้น และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้มีผลต่อพีเอช คือ การใช้เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เมื่อเชื้อเจริญจะเกิดกรดอย่างรวดเร็ว ทำให้การเจริญหยุดชงัก

ผลของปริมาณ NH_4NO_3 ในสภาาพการหมักแบบแห้งแหล่งธาตุอาหารเป็นปัจจัยที่เป็นข้อจำกัดของการเจริญและกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์(Moo Young *et al.*,1983) โดยเฉพาะอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน วิเชียร (2535) ทำการศึกษาผลการเติม NH_4NO_3 ปริมาณต่างๆ คือ 0.025, 0.04, 0.1, 0.2 และ 0.3 กรัม พบว่า การเติม NH_4NO_3 มีผลต่อการสร้างเอนไซม์แตกต่างกันตามชนิดของเอนไซม์ คือจะมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ β-xylanase, β-xylosidase และ FPase อย่างมาก แต่มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ CMCase และ β-glucosidase คือเมื่อ NH_4NO_3 เพิ่มจาก 0.025 กรัม เป็น 0.20 กรัม มีผลให้เชื้อรา *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-IF สามารถผลิตเอนไซม์ β-xylanase, β-xylosidase และ Lipase ได้สูงสุด โดย xylanase เพิ่มมากที่สุด จาก 51.2 เป็น 505 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ส่วน β-glucosidase และFPase นั้นเพิ่มจาก 1.03 และ 1.06 เป็น 2.46 และ 20.5 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ตามลำดับ

Zadrazil และ Burnnert (1981 และ 1982) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการย่อยสลายฟางข้าวสาลี พบว่า NH_4NO_3 ปริมาณ ร้อยละ 0.25 จะทำให้เกิดการย่อยสลายฟางข้าวสาลีโดยเชื้อรา *Sporotrichum pulverulentrum* ถ้าความเข้มข้นเพิ่มขึ้นทำให้อัตราการย่อยสลายฟางข้าวสาลีลดลง

4.6 การแปรสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)

เนื่องจากเซลลูโลสในธรรมชาติไม่ได้ประกอบด้วยเซลลูโลสเพียงอย่างเดียว แต่มีสารอื่นประกอบด้วยเช่น ลิกนิน เพคติน เฮมิเซลลูโลส ดังนั้น การแปรสภาพเพื่อกำจัดสารอื่นออกไปจะทำให้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้สะดวกยิ่งขึ้น ซึ่งการแปรสภาพมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น

4.6.1 วิธีทางกล

วิธีทางกลเป็นการบดหรือตัดวัตถุดิบด้วย ball mill, hammer mill, roller mill เพื่อทำให้อนุภาคของลิกโนเซลลูโลสมีขนาดเล็กลงเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวและลดปริมาณเซลลูโลสรูปผลึก

Muniswaran และ Charyulu (1994) รายงานว่า เชื้อรา *Trichoderma viride* NCTM 1051สามารถเจริญได้ดีในสับสเตรทที่มีขนาดเล็กเนื่องจากมีพื้นที่ผิวมาก ขนาดที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูง คือ 375 ไมโครเมตร ขนาดที่เล็กหรือใหญ่กว่านี้จะทำให้การผลิตลดลง

4.6.2 วิธีทางเคมี

4.6.2.1 การใช้ด่าง โดยทั่วไปสารละลายที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ให้เฮมิเซลลูโลสและลิกนินละลายตัวออกจากเส้นใย ปฏิกิริยาทางเคมีที่สำคัญในการแยกลิกนินด้วยด่าง คือ การเกิดกระบวนการ saponification ของหมู่ ester ของกรดยูโรนิกในส่วนของไซแลน ซึ่งเป็นการชักนำให้เกิดการพองตัวของลิกโนเซลลูโลส ทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาได้มากขึ้น นอกจากนี้สารละลายด่างยังคงทำให้ส่วนที่เป็นระเบียบในโมเลกุลเซลลูโลสลดปริมาณลง ด่างที่นิยมใช้ในการแยกลิกนิน ได้แก่ NaOH และ H_2O_2 เป็นต้น

Kuhad และSingh (1993) ศึกษาผลของการแปรสภาพวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Penicillium citrinum* พบว่า การใช้แกลบที่ผ่านการแปรสภาพด้วย NaOH จะให้ปริมาณเอนไซม์สูงกว่าแกลบที่ไม่ผ่านการแปรสภาพ โดยมีค่า FPase, CMCase และ cellobiase เท่ากับ 36.9, 58.8 และ75.2 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ

Muniswaran และคณะ (1998) กล่าวว่า การแปรสภาพวัตถุดิบ ได้แก่ ชานอ้อย, ซังข้าวโพด, Computer cards และขี้เลื่อยด้วย NaOH เข้มข้น 5 โมลาร์ จะให้แอคทิวิตี้ของเซลลูเลสสูงสุด 21.5, 17.6, 18.1, และ 14.8 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบที่ไม่แปรสภาพกับที่แปรสภาพวัตถุดิบด้วย NaOH เข้มข้น 1 โมลาร์, $Ca(OH)_2$ เข้มข้น 1 และ 2 โมลาร์ และวัตถุดิบที่แปรสภาพด้วยไอน้ำ

4.6.2.2 การใช้กรด สารละลายกรดจะทำให้เฮมิเซลลูโลสถูกย่อยให้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและละลายตัวออกจากเส้นใย สารละลายที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้เซลลูโลสเกิดการละลายเช่นกัน จึงนิยมใช้สารละลายกรดย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลกลูโคสมากกว่าใช้ในการแยกลิกนิน

Wayman และ Chen (1992) รายงานว่าการใช้ HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ถึง 0.6 โมลาร์ ย่อยข้าวสาลีชนิดแข็ง พบว่า ปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ถึง 0.3 โมลาร์ เป็นตัวย่อยและจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ HCl ซึ่งการใช้กรดย่อยสับสเตรทจะช่วยให้เชื้อรา *Trichoderma reesei* ผลิตเอนไซม์ได้ดีขึ้น แต่ถ้าเกิดการย่อยมากเกินไปจะทำให้เกิดสารที่ไม่ต้องการและมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้

4.6.3 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นการย่อยสลายที่มีความจำเพาะสูง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์ ปฏิกิริยาการย่อยสลายไม่รุนแรง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่ถูกทำปฏิกิริยาต่อไป ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การใช้วิธีทางเอนไซม์เป็นวิธีการที่ดีกว่าวิธีทางเคมี แต่วิธีทางเอนไซม์ก็มีข้อเสียเช่นกันคือ เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายมีราคาแพง การย่อยสลายเกิดขึ้นช้าเนื่องจากลิกนินซึ่งเป็นองค์ประกอบชนิดหนึ่งในวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมลิกโนเซลลูโลสจะเป็นตัวป้องกันการย่อยสารคาร์โบไฮเดรท (วิเชียร, 2532)

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. วัตถุดิบ : ขี้เลื่อยไม้ยางพารา
2. จุลินทรีย์

ใช้เชื้อรา 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108, *Aspergillus niger* TISTR 3245, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* TISTR 3081 และ *Chaetomium globosum* TISTR 3093 เก็บรักษาเชื้อทั้งหมดในหลอดอาหารวุ้นเอียง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 45 วัน แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุกๆ เดือน เพื่อใช้เป็นสปอร์เริ่มต้น

3. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์เพื่อหาค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ (ภาคผนวก ข)

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
3. เครื่องเขย่า
4. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (JASCo UV/vis Model 7800)
5. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และกล้องจุลทรรศน์
6. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
7. เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer)
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
9. ตู้อบ (Hot air over)
10. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

วิธีการทดลอง

1. วิเคราะห์องค์ประกอบของขี้เลื่อยไม้ยางพารา

หาความชื้นของขี้เลื่อยไม้ยางพารา เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับความชื้นเริ่มต้นของการหมัก วิเคราะห์ปริมาณเส้นใย (crude fiber), ลิกนิน, ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, โปตัสเซียม และแมกนิเซียม

2. การคัดเลือกเชื้อราและความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เลี้ยงเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยขี้เลื่อยไม้ยางพารา 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, ยูเรีย ร้อยละ 2.0 และน้ำกลั่น ปรับความชื้นเริ่มต้น ร้อยละ 50, 60 และ 70 และปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บรรจุอาหารในถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 6x8

นิ้ว ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^8 สปอร์/กรัมสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) สุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน นำตัวอย่างไปสกัดด้วยน้ำกลั่นที่เติม Tween 80 ร้อยละ 0.1 ในปริมาณ 5 เท่าของน้ำหนักสับสเตรท วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาทีเป็นเวลา 30 นาที แยกไมซีเลียมโดยกรองผ่านผ้าขาวบาง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 50 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดวิเคราะห์หาค่าแอคทิวิตี้ของ CMCase ตามวิธีการ Mandels และ Weber (1969)

3. ศึกษาผลของสปอร์เริ่มต้น

เลี้ยงเชื้อราที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากข้อ 2 ศึกษาผลของปริมาณสปอร์เริ่มต้น เท่ากับ 10^6, 10^7 และ 10^8 สปอร์/กรัมสับสเตรท

4. ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้น

ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4, 5 และ 6 และใช้ปริมารสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสม (จากข้อ 3)

5. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 4)โดยใช้ไนโตรเจน 2 ชนิด คือ ยูเรียและแอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 1, 2 และ 3 เปรียบ-เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน

6. ศึกษาผลของการแปรสภาพ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (จากข้อ 5) โดยใช้ขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่มีการแปรสภาพโดยการบดขนาด 2 และ4 มิลลิเมตร,การใช้ความร้อนอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และการใช้ด่าง (NaOH ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 5 โมลาร์)(ภาคผนวก ข) เปรียบเทียบกับขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่ไม่แปรสภาพ

7. ศึกษาผลของการขยายขนาดการหมัก

เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารที่เหมาะสม (จากข้อ 6) โดยมีปริมาณของขี้เลื่อยไม้ยางพารา 5, 25, 50, 100 และ 500 กรัม โดยใช้ถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 6x8, 8x12, 10x15, 14x24 และ 20x30 นิ้ว ตามลำดับ

8. การเตรียมเอนไซมเซลลูเลสให้บริสุทธิ์บางส่วนและทำให้เป็นผง

8.1 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

เตรียมสารละลายเอนไซม์โดยการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่เหมาะสม (จากข้อ 7) เมื่อครบกำหนดที่ผลิตเอนไซม์สูงสุด นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่นที่เติม Tween 80 ร้อยละ 0.1 ในปริมาณ 5 เท่าของน้ำหนักสับสเตรท ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 2 หลังการเหวี่ยงนำสารละลายใส (filtrate) มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เก็บตะกอนโปรตีนในช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 20-70 โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยพร้อมทั้งคนด้วยแท่งแม่เหล็กตลอดเวลาที่ความเร็วต่ำๆ และคนต่ออีกประมาณ 30-60 นาทีหลังเติมครั้งสุดท้ายแยกตะกอนโปรตีนโดยนำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 โดยใช้ปริมาตร 1-2 เท่าของปริมาตรตะกอน นำมา dialysis ในสารละลายซิ-เตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 เป็นเวลา 6-7 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายของเอนไซม์ที่ได้วิเคราะห์ค่าแอคทิวิตี้ CMCase

8.2 การทำสารละลายเอนไซม์ให้เป็นผง

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 8.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาระเหยน้ำออกโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง (Centrifuge evaporature) ด้วยความเร็ว 1,550 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์ค่าแอคทิวิตี้ของ CMCase

ผลการทดลองและวิจารณ

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของขี้เลื่อยไม้ยางพารา

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของขี้เลื่อยไม้ยางพารา (ตารางที่ 2) พบว่า ขี้เลื่อยไม้ยางพารามีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 12.97 และประกอบด้วย เส้นใย, ลิกนิน, ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, โพแทสเซียม, โซเดียม และแมกนีเซียม ร้อยละ(ต่อน้ำหนักแห้ง) 57.99, 41.24, 0.25, 0.04, 0.21, 0.02 และ0.10 ตามลำดับ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำวัสดุเศษเหลือจากโรงงานแปรรูปไม้ยางพารามาใช้ประโยชน์ในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์

2. ผลการคัดเลือกเชื้อราและความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

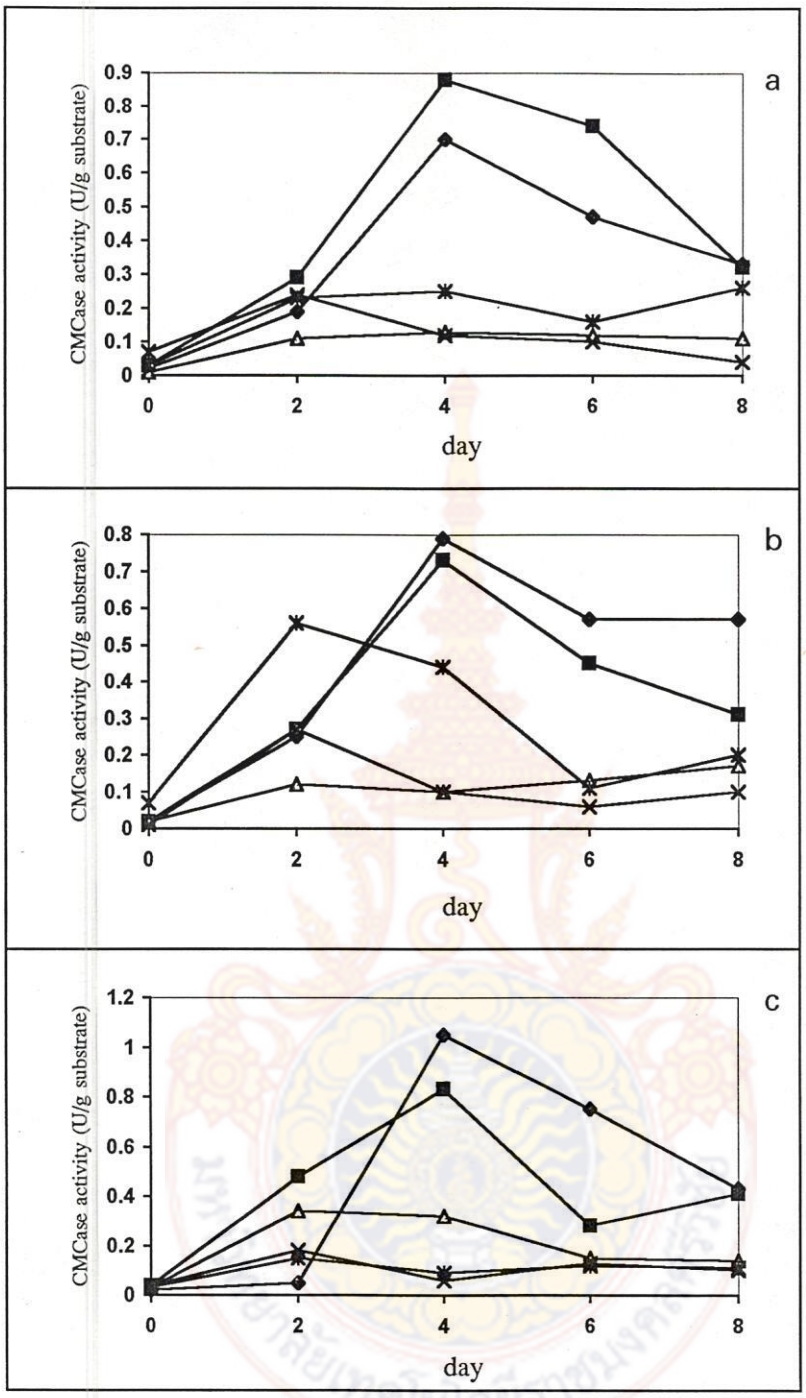
ผลของการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108, *Aspergillus niger* TISTR 3245, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* TISTR 3081 และ *Chaetomium globosum* TISTR 3093 ในขี้เลื่อยทีมีความชื้นเริ่มต้น ร้อยละ 50, 60, และ 70 (รูปที่ 5) พบว่า เชื้อ *A. fumigatus* TISTR 3108 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีความชื้นเริ่มต้น ร้อยละ 70 จะให้แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ CMCase สูงสุดในวันที 4 ของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1.05 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคือ *A. niger* TISTR 3245 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 (0.88 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) และ *A. fumigatus* TISTR 3108 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 (0.79 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองของวิเชียรและคณะ (2535) ศึกษาผลของความชื้นที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โดยเชื้อรา *A. fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-IF โดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 81 จะผลิตเอนไซม์ CMCase ได้แอคทิวิตี้ 24.6 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมัก ในวันที่ 4 ของการหมัก แสดงว่า ความชื้นเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *A. fumigatus* โดยจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในสับสเตรทที่มีความชื้นสูง จากการทดลองจึงได้เลือกใช้เชื้อ *A. fumigatus* TISTR 3108 และความชื้นของอาหารเริ่มต้นร้อยละ 70 ในการศึกษาขั้นต่อไป

3. ผลของสปอร์เริ่มต้น

การเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* TISTR 3108ในอาหารแข็งที่มีขี้เลื่อยไม้ยางพาราเป็นสับสเตรท ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 โดยใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^6, 10^7 และ10^8สปอร์ต่อกรัมสับสเตรท พบว่า การใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อกรัมสับสเตรท ให้ค่าแอคทิวิตี้ของ CMCase สูงสุด เท่ากับ 1.40 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน (รูปที่ 6) รองลงมาคือ 10^8 และ 10^7 สปอร์ต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ โดยให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ 1.26 และ 0.92 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การใช้สปอร์

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของขี้เลื่อยไม้ยางพารา

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง)
ความชื้น	12.97
เส้นใย	57.99
ลิกนิน	41.24
ไนโตรเจน	0.25
ฟอสฟอรัส	0.04
โพแทสเซียม	0.21
โซเดียม	0.02
แมกนีเซียม	0.10



รูปที่ 5 ผลของสายพันธุ์เชื้อราและความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
(a) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 (b) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60
(c) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70

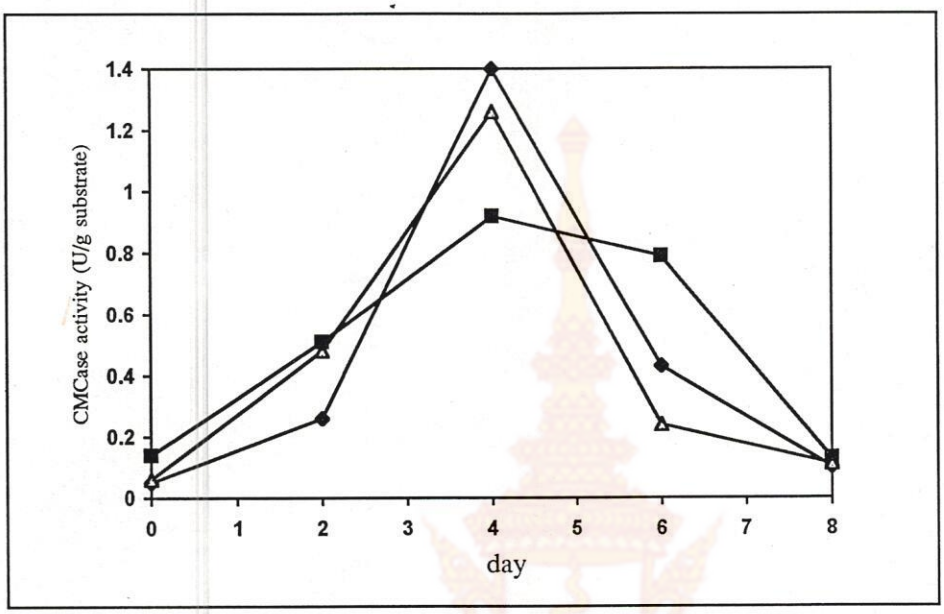
—◆— *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108

—■— *Aspergillus niger* TISTR 3245

—Δ— *Aspergillus oryzae*

—X— *Trichoderma reesei* TISTR 3081

—✱— *Chaetomium globosum* TISTR 3093



รูปที่ 6 ผลของปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108

—◆— 10^6

—■— 10^7

—Δ— 10^8

เริ่มต้น 10^6 และ 10^8 สปอร์ต่อกรัมสับสเตรท ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อกรัมสับสเตรท เป็นปริมาณสปอร์เริ่มต้นสำหรับขั้นตอนต่อไป

4. ผลของพีเอชเริ่มต้น

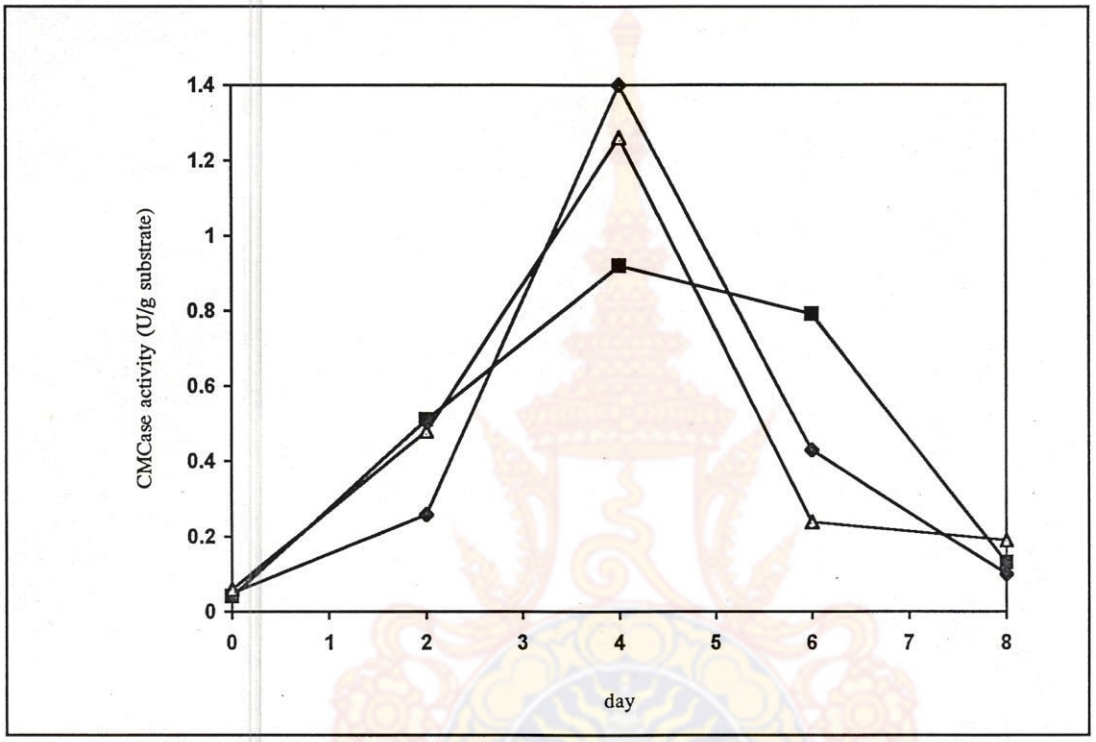
ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. fumigatus* TISTR 3108 แสดงดังรูปที่ 7 พบว่า การใช้พีเอชเริ่มต้น 4 ให้แอคทิวิตี้ของ CMCase สูงสุด 3.52 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคือ พีเอชเริ่มต้น 6 (3.28 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) และ 5(3.16 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า การผลิตเอนไซม์ที่พีเอชเริ่มต้น 4 มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่าแอคทิวิตี้ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 5 และ6 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจึงถือว่าพีเอชเริ่มต้น 4 เป็นระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

5. ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (รูปที่ 8) โดยใช้ยูเรียและแอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2 และ 3 พบว่า การใช้ยูเรียร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ค่าแอคทิวิตี้ของ CMCase สูงสุดเท่ากับ 3.55 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท หลังการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน รองลงมา คือ การใช้ NH_4NO_3 ร้อยละ 2, ยูเรีย ร้อยละ 3 , ยูเรีย ร้อยละ 2, NH_4NO_3 ร้อยละ 3 และ 1 ตามลำดับ โดยให้ค่าแอคทิวิตี้ของ CMCase เท่ากับ 2.98, 2.91, 2.90, 2.61 และ 2.26 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน ให้ค่าแอคทิวิตี้เท่ากับ 1.91 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ซึ่งน้อยกว่าชุดการทดลองที่มีการเติมไนโตรเจนแสดงว่า แหล่งไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แต่การเติมในปริมาณที่มากเกินไปอาจมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์ได้ ซึ่งวิเชียร และคณะ (2535) พบว่า ปริมาณ NH_4NO_3 มีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ CMCase โดยเชื้อ *A. fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-IF เพียงเล็กน้อย โดยเมื่อเติม NH_4NO_3 ระหว่าง 0.04-0.2 กรัม เชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน และปริมาณเอนไซม์ลดลงเมื่อเพิ่ม NH_4NO_3 เป็น 0.3 กรัม ดังนั้นจากผลการทดลองจึงเลือกใช้ยูเรีย ร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน

6. ผลของการแปรสภาพ

ผลของการแปรสภาพขี้เลื่อยไม้ยางพาราด้วยการบด, การใช้ความร้อน และการใช้ด่าง เพื่อเพิ่มปริมาณลิกโนโซลลูโลสต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase (รูปที่ 9) พบว่า การใช้ขี้เลื่อยที่ไม่ผ่านการแปรสภาพซึ่งเป็นชุดควบคุมให้แอคทิวิตี้ของCMCaseสูงสุด 2.96 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนชุดการทดลองที่ใช้ขี้เลื่อยที่แปรสภาพด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 M, ใช้ความร้อน, NaOH ความเข้มข้น 5 M, บดขนาด 2 มิลลิเมตร และบดขนาด 4 มิลลิเมตร ตามลำดับ (2.76, 2.68, 2.66, 2.44 และ 1.60 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า การใช้ด่าง (NaOH ความเข้มข้น 1 และ 5 M) การใช้ความร้อน และการบดขนาด 2 มิลลิเมตร ให้ค่าแอคทิวิตี้ของ CMCase ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่า

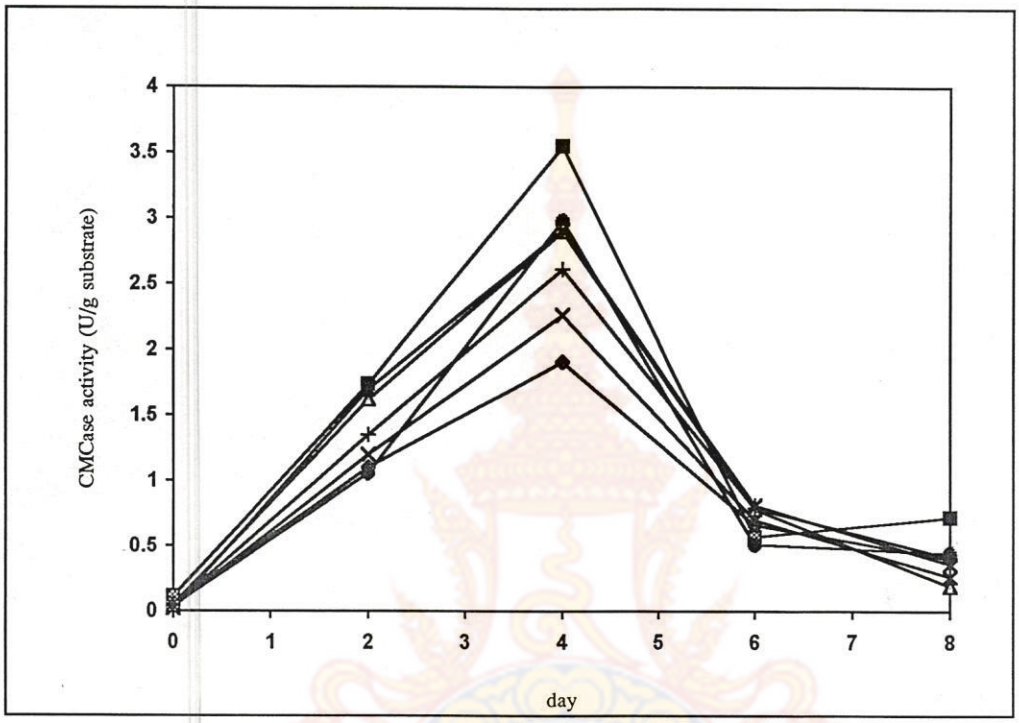


รูปที่ 7 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108

—◆— พีเอช 4

—■— พีเอช 5

—Δ— พีเอช 6



รูปที่ 8 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108

—◆— Control

—■— 1% Urea

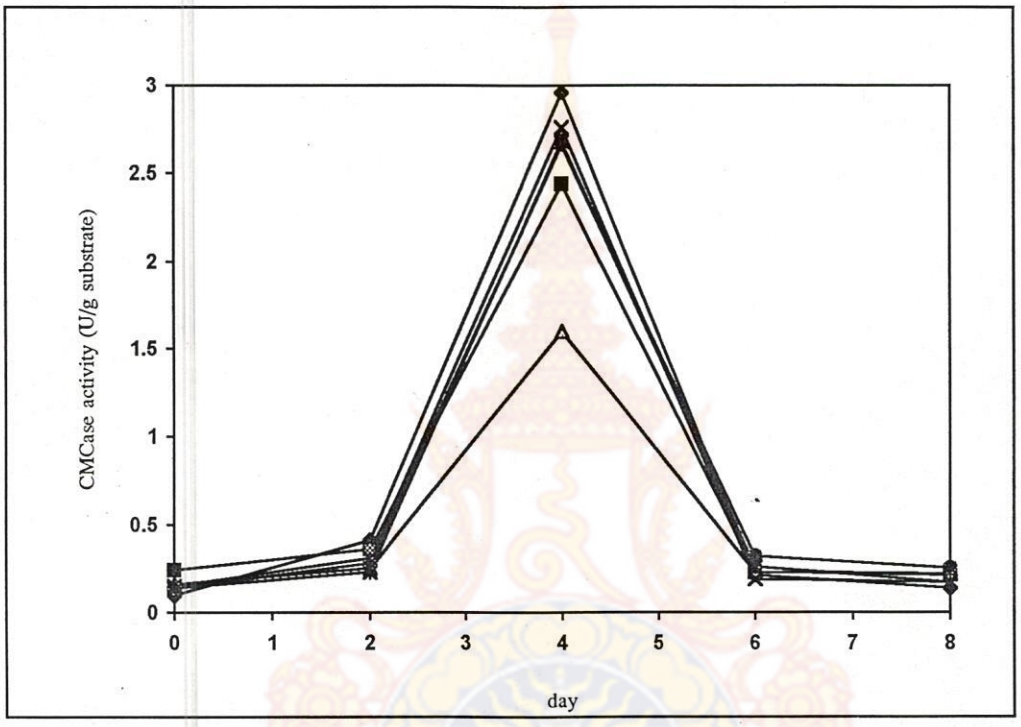
—Δ— 2% urea

—X— 3% urea

—X— 1% NH_4NO_3

—●— 2% NH_4NO_3

—+— 3% NH_4NO_3



รูปที่ 9 ผลของการแปรสภาพขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108

—◆— ไม่แปรสภาพ

—■— บดมีขนาด 2 มม.

—Δ— บดมีขนาด 4 มม.

—X— ใช้ความร้อน

—✱— NaOH 1 M

—●— NaOH 5 M

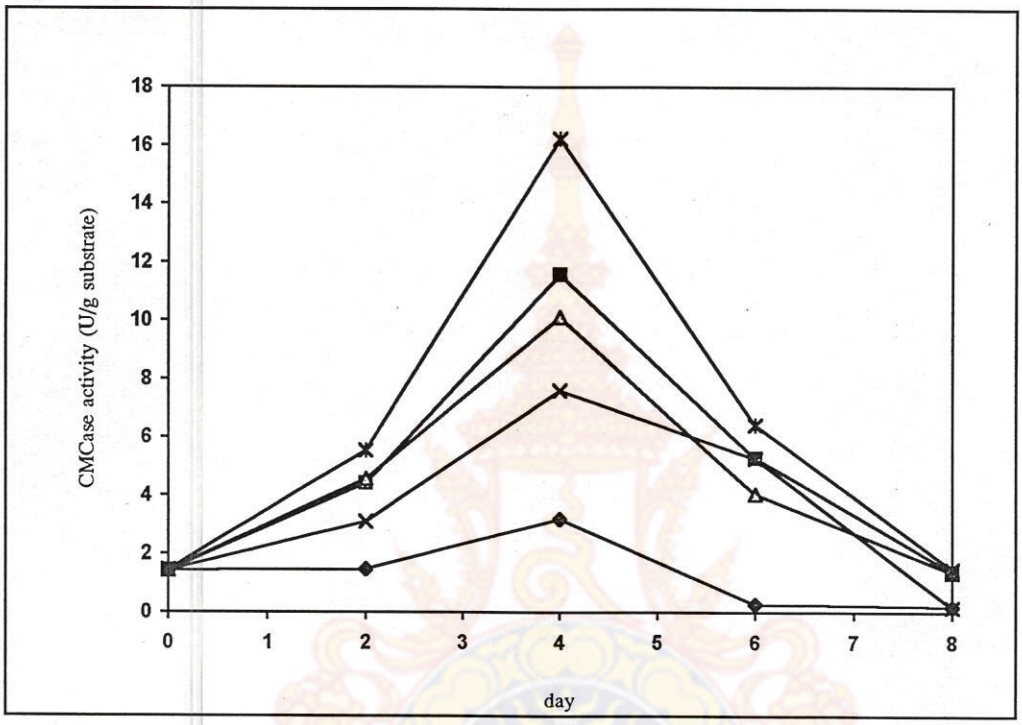
การแปรสภาพไม่มีผลในการเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ ทั้งนี้เนื่องจากขี้เลื่อยไม้ยางพารามีปริมาณลิกนินสูง ในขณะที่การใช้ขี้เลื่อยที่บดมีขนาด 4 มิลลิเมตร ให้ค่าแอคทิวิตี้ที่น้อยกว่าขี้เลื่อยที่ไม่แปรสภาพ ซึ่งอาจเนื่องจากขนาดของขี้เลื่อยที่เล็กมากเกินไปทำให้อัตราการระบายอากาศของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ได้น้อย

7. ผลของการขยายขนาดการหมัก

เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์จาก *A. fumigatus* TISTR 3108 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 5, 25, 50, 100 และ 500 กรัม (รูปที่ 10) พบว่า แอคทิวิตี้ของ CMCase ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 กรัม มีค่าสูงสุดเท่ากับ 16.22 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท หลังการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 500, 50, 25 และ 5 กรัม โดยมีค่าแอคทิวิตี้ 7.61, 10.12, 11.57 และ 3.18 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ซึ่งการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหรือสับสเตรทปริมาณน้อยมีผลให้สับสเตรทมีความหนาน้อย จึงมีผลให้มีการสูญเสียความชื้นเนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญของเชื้อได้ง่าย ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 500 กรัม มีความหนาของสับสเตรทมากเกินไป แสดงว่าความหนาของสับสเตรทมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ (Ahchara, *et al*., 1985)

8. การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์บางส่วนและทำให้เป็นผง

สารละลายเอนไซม์จาก *A. fumigatus* TISTR 3108ที่เตรียมได้ก่อนทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มีค่าแอคทิวิตี้ CMCase เท่ากับ 1.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และโปรตีนเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและ dialysis มีค่าโปรตีน เท่ากับ 0.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าของแอคทิวิตี้ CMCase 0.87 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อผ่านการทำให้เป็นผง พบว่า เอนไซม์มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.82 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าแอคทิวิตี้ของ CMCase เท่ากับ 0.82 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และได้ปริมาณน้ำหนักแห้งของเอนไซม์หลังการทำให้เป็นผงเท่ากับ 0.04 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งในระหว่างการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เอนไซม์มีการสูญเสียแอคทิวิตี้อาจเนื่องจากความร้อนในขณะทดลองและขนาดรูพรุนของถุง dialysis ไม่เหมาะสม จึงมีผลให้เอนไซม์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กแพร่ออกไปด้วย นอกจากนี้ในระหว่างการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และการทำให้เป็นผง ไม่มีการเติมสารที่ช่วยทำให้เอนไซม์มีความคงตัว เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น เช่น chloram -phenicol หรือสารอื่นๆ ที่เหมาะสมเพื่อช่วยรักษาสภาพและความคงตัวของเอนไซม์ให้คงที่



รูปที่ 10 ผลของการขยายขนาดการหมักต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108

—◆— 5 กรัม

—■— 25 กรัม

—Δ— 50 กรัม

—X— 100 กรัม

—X— 500 กรัม

สรุปผลการทดลอง

1. จากการใช้ขี้เลื่อยไม้ยางพาราเป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108, *Aspergillus niger* TISTR 3245, *Aspergillus* oryzae, *Trichoderma reesei* TISTR 3081 และ *Chaetomium globosum* TISTR 3093 ที่มีความชื้นของสับสเตรท ร้อยละ 50, 60 และ 70 พบว่า เชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108 ให้แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ CMCase สูงสุดเท่ากับ 1.05 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อโดยสับสเตรทมีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70

2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108 บนขี้เลื่อยไม้ยางพาราแบบอาหารแข็ง คือ การใช้สปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อกรัมสับสเตรท, พีเอชเริ่มต้นของสับสเตรทเท่ากับ 4 และใช้ยูเรียร้อยละ 1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนการแปรสภาพด้วยการบด, การใช้ความร้อนและการใช้ด่างพบว่า ไม่มีผลในการผลิตเอนไซม์และเมื่อขยายขนาดการหมักโดยมีปริมาณสับสเตรท 5, 25, 50, 100 และ 500 กรัม พบว่า การเลี้ยงเชื้อ *A. fumigatus* TISTR 3108 ในสับสเตรท 100 กรัม ให้แอคทิวิตี้ของ CMCase สูงสุดเท่ากับ 16.22 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท หลังการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน

3. เมื่อนำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ dialysis จะมีค่าแอคทิวิตี้ CMCase เท่ากับ 0.87 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และหลังการทำให้เป็นผง พบว่า มีแอคทิวิตี้ของ CMCase เท่ากับ 0.82 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.82 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ปริมาณน้ำหนักของเอนไซม์ผงเท่ากับ 0.04 กรัมต่อมิลลิลิตร

ข้อเสนอแนะ

1. ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ควรบ่มในตู้บ่มที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศได้ เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้อาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อ จึงทำให้แอคทิวิตี้ของ CMCase ในแต่ละขั้นตอนเกิดความแตกต่างกัน

2. จากการทดลองจะต้องมีการศึกษาขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์และทำให้เป็นผง เช่น การใช้ถุง dialysis ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุนที่เหมาะสม, การเติมสารที่ช่วยรักษาแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เพื่อลดการสูญเสียระหว่างขบวนการต่างๆ และสภาวะเหมาะสมในการทำให้เอนไซม์ให้เป็นผง เป็นต้น

เอกสารสารอิง

จารุวรรณ มณีศรี. 2538. การผลิตและการประยุกต์ใช้ไซลาเนสและเซลลูเลสจากกากปาล์มและกากสลัดจ์โดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 119 หน้า.

ธวัช จิรายุส. 2538. ปัญหาวัตถุดิบในอุตสาหกรรมไม้อัดไม้ประกอบ. ว.วิทยาศาสตร์เทคโนโลยี. 10(1) : 93-95.

นพรัตน์ บำรุงรักษ. 2536. พืชหลักปักษ์ใต้. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.

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

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

วิเชียร สีสุข. 2532. การย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus fumigatus* TISTR รหัส 4-45-IF วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์, 138 หน้า.

อัญชลี รัตนวิจิตร. 2537. ยางพารา. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร. 40(446) : 35-38.

อัญชลี รัตนวิจิตร. 2538. ยางพารา. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร. 41(458) : 36-38.

Ahchara, P., Kinoshita, S., Kishimoto. M., Yoshida, T. and Taguchi, H. 1985. Effect of rice bran on the sawdust to cellulase activity and mycelial growth by *Pleurotus oseatus*. Annual Reports of ICBiotech. 8: 302-305.

Alam, M., Gomes, I., Mohiuddin, G.and Hoq, M.M. 1994. Production characterization of thermostable xylanase by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiansus* grown on lignocellulose. Enzyme Microb. Technol. 16: 298-302.

A.O.A.C. 1990. Official Method of Analysis of Association of Official Chemists, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Verginia.

Battaglino, R.A., Huergo, M., Pilosof, A.M.R. and Barthelomai, G.B. 1991. Culture requirement for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solids state fermentation. App. Microbiol. Biotechol. 35 : 292-296.

Cowling, E.B. and Kirk, T.K. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion process. Biotech. Bioeng. Symp. (6) : 95-123.

Fan, L.T. and Lee, Y.H. 1983. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose : derivation of a mechanistic model. Biotechnol. Bioeng. 15 : 2707-2733.

Fiechter, A. 1986. Biodegradation of lignocellulosic materials. Microbial Utilization of Renewable Resources. 5: 283-290

Kinoshita,S., Srigotha, P., Lumyong, S. and Chisuksant, Y. 1983. Production of cellulase in solid culture by *Aspergillus* sp. Annual Reports of ICME. 6: 289-292.

Kuhad, R.C and Singh, A. 1993. Enhanced production of cellulase by *Penicillium citrinum* in solid state fermentation of cellulosic residue. World J.Microbial. Biotechnol. 9: 100-101.

Madamwar, D., Sangita, P. and Parikh, H. 1989. Solid state fermentation for cellulase and β- glucosidase production by *Aspergillus niger*. J. Ferment. Bioeng. 67(6) :424-426.

Mandels, M. and Weber, J. 1969. The production of cellulase. *In* Cellulase and Their Applications. (ed. R.E. Gould) Adv. Chem. Ser. 95. pp. 391-398, Washington, D.C. : American Chemistry Society.

Marsden, W.L., Gray, P.P. and Dunn, W.W. 1982. Alternative pathway for glucose production from cellulose using *Trichoderma reesei* QM 9414 cellulase. Biotechnol. Lett. 4: 589-594.

Moo-Yong, M., Moreira, A.R. and Tengerdy, R.P. 1983. Principles of solid substrate fermentation. In The filamentous Fungi. fungal Technology (Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B. eds) pp. 117-144, New York : Edward Arnold Pulishers.

Muniswaran, P.K.A. and Charyuly, N.C.L.N. 1994. Solid substrate fermentation to coconut coir pith for cellulose production. Enzyme microb. Technol. 16 : 436-440.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-380.

Pamment, N., Robinson, C.W,. Hilton, J. and Moo-Young, M.1978. Solid-state cultivation of *Chaetomium cellulolyticum* on alkali-pretreatment sawdust. Biotechnol. Bioeng. 20 : 1735-1744.

Raimbault, M. and Alazard, D. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9 : 199-209.

Ramos, L.P., Breuil, C. and Saddler, S.N. 1993. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma*. Enzyme Microb. Technol. 15: 19-25.

Spano, L.A. 1977. Enzymatic hydrolysis of cellulosic material. *In* Symposium on Microbial Energy Conversion. (Schlegel, H.G. and Bannea, J. eds.) pp. 157-177, Oxford : Pergamon Press.

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

Tsao, G.T. and Chiang, L. 1983. Cellulose and hemicellulose technology. *In*. The Filamentous Fungi. (Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B, eds.) pp. 296-326, New York : John Wiley & Son Inc.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ อาหารวุ้นเอียง PDA (potato dextose agar) ประกอบด้วย

มันผรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20 กรัม
ผงวุ้น	15 กรัม

วิธีการ

ต้มมันผรั่งในน้ำจนเดือด กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่ได้มาเติมน้ำตาลเดกซ์โทรส และผงวุ้น ต้มจากวุ้นละลายปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาด 16 X 150 มิลลิลิตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที (ขณะที่วุ้นยังไม่แข็งตัวนำหลอดมาวางเอียงไว้จนกระทั่งวุ้นแข็งตัวดี)

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. ความชื้น (A.O.A.C., 1990)

อุปกรณ์

1. ภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบไฟฟ้า (electric oven)
3. โถดูดความชื้น (desiccator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า

วิธีการ

1. อบภาชนะอลูมิเนียมในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะถึงที่อุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (2.0 กรัม) ใส่ในภาชนะที่ชั่งน้ำหนักแล้ว
3. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (16 ชั่วโมง)
4. นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้นจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะถึงที่อุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก
5. อบซ้ำอีกครั้งละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

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

2. การวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ Carboxymethylcellulase (CMCase) ตามวิธีของ Mandels และ Weber (1969)

นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตร. ของสารละลาย Carboxymethylcellulose (CMC) เข้มข้นร้อยละ 1.0 ในซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Nelson-Somogyi (Nelson, 1944) ในการวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์จะมีชุดควบคุม ซึ่งเติมสารละลายต่างๆ เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว แต่ไม่บ่ม นำค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมไปหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการใช้สารละลายเอนไซม์ก่อนการคำนวณหาแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ สำหรับ blank จะใช้น้ำกลั่น 1 มล. แทนปริมาตรของตัวอย่างและสารละลาย CMC

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

3. การวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์ ตามวิธีการ Nelson-Somogyi (Nelson, 1944)

สารเคมี

1. การเตรียม Low-alkalinity of Somogyi (สารละลาย A) การเตรียมสารละลายนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1.1 ละลายโปตัสเซียม-โซเดียมตาร์เตรท 12 กรัม และโซเดียมคาร์บอเนต 24 กรัม ในน้ำกลั่นต้มปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติม $CuSO_4$ $5H_2O$ 4 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กวนให้สารละลายผสมกันจากนั้นเติม $NaHCO_3$ 16 กรัม

1.2 ละลาย anhydrous $NaHCO_3$ 180 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด ทิ้งไว้ให้เย็น

นำสารละลายในข้อ 1.2 เติมลงในสารละลายข้อ 1.1 แล้วเติมน้ำกลั่นต้มให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้

2. การเตรียม Arsenomolybdate reagent of Nelson (สารละลาย B) การเตรียมสารละลายนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

2.1 ละลาย ammonium molybdate 25 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร

2.2 ละลาย Na_2HAsO_4 $7H_2O$ 3 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร

นำสารละลายในข้อ 2.2 เติมในสารละลายข้อ 2.1 เติมน้ำกลั่นใช้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนใช้

3. การเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคส

ชั่งน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียดให้ได้ปริมาณ 0.75 กรัม ใส่ใน volumetric flask เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จาก stock solution นี้ นำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้น 15-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 15-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ใส่สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ
3. เติมสารละลาย Somogyi ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที
4. เติมสารละลาย Nelson ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ 15 นาที

5. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลตร เขย่าให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล
6. สำหรับตัวอย่างที่จะหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ก็วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ. 2-5

ถ้าตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลอยู่สูงต้องเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การคำนวณค่าแอคทิวิตี้เซลลูเลส (CMCase)

ให้ค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน = X มิลลิกรัม
จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์ = Y มิลลิกรัม

$$\text{ยูนิต/มิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของกลูโคส X 1,000 X จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส X ระยะเวลาการบ่ม X ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

(กรัม/โมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{มิลลิกรัมของกลูโคส X 1,000 X จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{150.13 \text{ X } 10 \text{ X } 0.5}$$

$$= 1.332XY = Z$$

สมมติ จากขี้เลื่อยมีความชื้น ร้อยละ 7.75 แสดงว่า ขี้เลื่อย 5 กรัม จะมีความชื้นหรือปริมาณน้ำ = 0.38 มิลลิลิตร
เนื่องจากอัตราของขี้เลื่อยต่อน้ำกลั่นในการปรับความชื้น = 1 : 1 (5 กรัม 5 มิลลิลิตร)
ดังนั้น ขี้เลื่อยจะมีน้ำทั้งหมด = 0.38 + 5 = 5.38 มิลลิลิตร
สมมุติ ความชื้นเริ่มต้นของสับสเตรท ร้อยละ 52.6
ความชื้นสุดท้ายหลังการเลี้ยงเชื้อ ร้อยละ 59.9
แสดงว่า ปริมาณน้ำเริ่มต้น 52.6 มิลลิลิตร ปริมาณน้ำสุดท้าย 59.9 มิลลิลิตร
ปริมาณน้ำของขี้เลื่อย(5 กรัม) 5.38 มิลลิลิตร ปริมาณน้ำสุดท้าย $= \frac{5.38 \text{ X } 59.9}{52.6}$

= 6.13 มิลลิลิตร

ปริมาณน้ำกลั่นผสม Tween 80 ร้อยละ 0.1 ที่ใช้ในการสกัด = 25 มิลลิลิตร
ดังนั้น ปริมาตรน้ำที่มีอยู่ในสับสเตรทหลังการเลี้ยงเชื้อ = 25 + 6.13 = 31.13 มิลลิลิตร

$$\text{ยูนิต/กรัมสับสเตรท} = \frac{\text{ยูนิต/มิลลิลิตร (ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์ + ปริมาตรน้ำที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ)}}{\text{น้ำหนักกากปาล์มเริ่มต้น (กรัม)}}$$

$$= \frac{Z\ (25 + 6.13)}{5}$$

$$= (6.27)\ Z$$

4. ปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Lowry, *et al.* (1951)

สารเคมี

1. สารละลาย Na_2CO_3 2 เปอร์เซนต์ ใน NaOH 0.1 นอร์มอล
2. สารละลาย $CuSO_4$ $5H_2O$ 1.5 เปอร์เซนต์ ใน sodium potassium tartrate 1.0 เปอร์เซนต์
3. สารละลาย alkali copper เตรียมโดยผสมสารละลายในข้ 1. 50 มิลลิลิตร กับสารในข้อ 2. 1 มิลลิลิตร (ควรเตรียมในวันที่ใช้)
4. สารละลาย Folin-ciocateus phenol reagent นำมาเจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1 ก่อนใช้

วิธีการ

1. ใส่สารตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ
2. เติมสารละลาย alkali copper 3.0 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. เติมสารละลาย Folin-ciocateus reagent 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

เตรียมโดยใช้ Bovine serum albumin ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ค 1 ผลการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา 5 สายพันธุ์ ในขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50

ระยะเวลา (วัน)	0	2	4	6	8
เชื้อรา	CMCase Activity (ยูนิต/กรัม)[1]				
Aspergillus Fumigatus TISTR 3108	0.02^{a}	0.19^{c}	0.70^{b}	0.47^{b}	0.33^{a}
Aspergillus niger TISTR 3245	0.03^{a}	0.29^{a}	0.88^{a}	0.74^{a}	0.32^{a}
Aspergillus oryzae	0.01^{a}	0.11^{d}	0.13^{d}	0.12^{c}	0.11^{c}
Trichoderma reesei TISTR 3081	0.17^{a}	0.24^{b}	0.12^{d}	0.10^{c}	0.04^{d}
Chaetomium globosum TISTR 3093	0.03^{a}	0.23^{bc}	0.25^{c}	0.16^{c}	0.26^{b}

[1] ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค 2 ผลการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา 5 สายพันธุ์ ในขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60

ระยะเวลา (วัน)	0	2	4	6	8
เชื้อรา	CMCase Activity (ยูนิต/กรัม)[1]				
Aspergillus Fumigatus TISTR 3108	0.02[b]	0.25[b]	0.79[a]	0.57[a]	0.57[a]
Aspergillus niger TISTR 3245	0.02[b]	0.27[b]	0.76[a]	0.45[b]	0.31[b]
Aspergillus oryzae	0.02[b]	0.12[c]	0.10[c]	0.13[c]	0.17[c]
Trichoderma reesei TISTR 3081	0.01[b]	0.27[b]	0.10[c]	0.06[d]	0.10[d]
Chaetomium globosum TISTR 3093	0.07[a]	0.56[a]	0.44[b]	0.11[c]	0.20[c]

[1] ในสดมถ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค 3 ผลการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา 5 สายพันธุ์ ในขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70

ระยะเวลา (วัน)	0	2	4	6	8
เชื้อรา	CMCase Activity (ยูนิต/กรัม)[1]				
Aspergillus Fumigatus TISTR 3108	0.02[a]	0.05[d]	1.05[a]	0.75[a]	0.43[a]
Aspergillus niger TISTR 3245	0.04[a]	0.48[a]	0.83[b]	0.28[b]	0.41[a]
Aspergillus oryzae	0.03[a]	0.34[b]	0.32[c]	0.15[c]	0.14[b]
Trichoderma reesei TISTR 3081	0.04[a]	0.18[c]	0.06[d]	0.13[c]	0.10[c]
Chaetomium globosum TISTR 3093	0.03[a]	0.15[c]	0.09[d]	0.12[c]	0.11[bc]

[1] ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 4ค ผลของปริมาณสปอร์เริ่มต้นของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108 ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ระยะเวลา (วัน)	0	2	4	6	8
ปริมาณสปอร์เริ่มต้น (สปอร์/กรัมสับสเตรท)	CMCase Activity (ยูนิต/กรัม)[1]				
10^6	0.05[a]	0.26[a]	1.40[a]	0.43[b]	0.10[a]
10^7	0.04[a]	0.51[a]	0.92[b]	0.79[a]	0.13[a]
10^8	0.06[a]	0.48[a]	1.26[a]	0.24[c]	0.11[a]

[1] ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 5ค ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108

ระยะเวลา (วัน)	0	2	4	6	8
พีเอชเริ่มต้น	CMCase Activity (ยูนิต/กรัม)[1]				
4	0.10[a]	1.79[a]	3.52[a]	1.05[a]	0.30[a]
5	0.04[b]	1.21[b]	3.16[b]	0.62[a]	0.18[b]
6	0.11[a]	1.60[a]	3.28[b]	0.78[a]	0.21[b]

[1] ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 6ค ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108

ระยะเวลา (วัน)	0	2	4	6	8
แหล่งไนโตรเจน	CMCase Activity (ยูนิต/กรัม)[1]				
ไม่เติม	0.05^{b}	1.10^{c}	1.91^{e}	0.66^{cd}	0.40^{b}
Urea 1 %	0.11^{a}	1.74^{a}	3.55^{a}	0.57^{de}	0.72^{a}
Urea 2 %	0.05^{b}	1.62^{ab}	2.90^{b}	0.78^{ab}	0.19^{c}
Urea 3 %	0.02^{b}	1.70^{a}	2.91^{b}	0.81^{a}	0.36^{b}
NH_4NO_3 1%	0.03^{b}	1.20^{c}	2.26^{d}	0.70^{bc}	0.26^{c}
NH_4NO_3 2%	0.04^{b}	1.06^{c}	2.98^{b}	0.51^{e}	0.44^{b}
NH_4NO_3 3%	0.04^{b}	1.35^{bc}	2.61^{c}	0.79^{ab}	0.41^{b}

[1] ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 7ค ผลของการแปรสภาพขี้เลื่อยที่มีต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108

ระยะเวลา (วัน)	0	2	4	6	8
การแปรสภาพ	CMCase Activity (ยูนิต/กรัม)[1]				
ไม่แปรสภาพ	0.10^{b}	0.41^{a}	2.96^{a}	0.21^{c}	0.14^{d}
บดมีขนาด 2 มม.	0.24^{a}	0.36^{b}	2.44^{a}	0.23^{bc}	0.21^{abc}
บดมีขนาด 4 มม.	0.16^{ab}	0.25^{e}	1.60^{b}	0.23^{bc}	0.22^{ab}
ใช้ความร้อน	0.14^{ab}	0.23^{e}	2.68^{a}	0.26^{b}	0.17^{bcd}
NaOH 1 M	0.15^{ab}	0.31^{c}	2.76^{a}	0.19^{c}	0.17^{cd}
NaOH 5 M	0.14^{ab}	0.28^{d}	2.66^{a}	0.32^{a}	0.25^{a}

[1] ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 8ค ผลของการขยายขนาดการหมักต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108

ระยะเวลา (วัน)	0	2	4	6	8
ขนาดการหมัก (กรัม)	CMCase Activity (ยูนิต/กรัม)[1]				
5	1.44^{a}	1.48^{a}	3.18^{c}	0.28^{d}	0.20^{c}
25	1.45^{a}	4.42^{b}	11.57^{b}	5.29^{b}	1.39^{b}
50	1.45^{a}	4.56^{ab}	10.12^{b}	4.05^{c}	1.38^{b}
100	1.46^{a}	5.55^{a}	16.22^{a}	6.42^{a}	1.49^{a}
500	1.45^{a}	3.11^{c}	7.61^{b}	5.26^{b}	1.43^{a}

[1] ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)