

ศักยภาพของวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรใน
การเป็นสับสเตรตสำหรับผลิตเซลล์จากเชื้อรา
ภายใต้การหมักสภาพอาหารแข็ง



ลิขสิทธิ์ © วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต เชียงใหม่
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พฤศจิกายน 2557

ศักยภาพของวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรใน
การเป็นสับสเตรตสำหรับผลิตเซลล์จากเชื้อรา
ภายใต้การหมักสภาพอาหารแข็ง



วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อมหาวิทยาลัยเชียงใหม่เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ลิขสิทธิ์ © สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
Copyright © Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พฤษภาคม 2557

ศักยภาพของวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรในการเป็นสับสเตรต
สำหรับผลิตเซลล์จากเชื้อราภายใต้การหมักสภาพอาหารแข็ง

เมธีศ ชูเวช
วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบ

อาจารย์ที่ปรึกษา



ประธานกรรมการ



(อาจารย์ ดร.บัณฑิต ลีละศาสตร์)

(รองศาสตราจารย์ ดร.นาวาศรี รักอริยะธรรม)



กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นาวาศรี รักอริยะธรรม)



กรรมการ

(อาจารย์ ดร.นพกาญจน์ จันทร์เดช)

27 พฤศจิกายน 2557

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างสูงจาก รองศาสตราจารย์ ดร. นวลศรี รักอิระธรรม อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำวิธีดำเนินงานวิจัย แนวทาง การแก้ไขปัญหาและข้อบกพร่องต่างๆที่เป็นประโยชน์ และ ให้ความสนับสนุนในการจัดหาอุปกรณ์เครื่องมือ และสารเคมีในงานวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.บัณฑิต ทีละศาสตร์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์.ดร. นพกาญจน์ จันทร์เดช กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยีทุกท่าน ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆตลอดมา รวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำสาขาวิชาชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยีทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวก และช่วยให้คำปรึกษา ในขั้นตอนการดำเนินงานของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการสนับสนุนทางด้านอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดาของผู้วิจัยที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณพี่ รุ่งน้อง และเพื่อนๆทุกท่านที่ได้ร่วมศึกษา เรียนรู้เป็นกำลังใจและช่วยเหลือเป็นอย่างดี ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งอย่างยิ่ง และขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

เมธัส ชูเวช

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ศักยภาพของวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรในการเป็นสับสเตรตสำหรับผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราภายใต้การหมักสภาพอาหารแข็ง
ผู้เขียน	นายเมธัส ชูเวช
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. นवलศรี รักอริยะธรรม

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ได้นำวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร 4 ชนิด ได้แก่ ชังข้าวโพด กาบมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสง ที่ผ่านการบดละเอียดและปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่างมาวิเคราะห์หาค่าประกอบเส้นใย เพื่อใช้เป็นสับสเตรตสำหรับเชื้อราในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรแต่ละชนิดมีองค์ประกอบ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินแตกต่างกัน โดยเปลือกถั่วลิสงมีปริมาณเซลลูโลสสูงที่สุด 33.82 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปลือกข้าวโพดและกากมะพร้าวมีปริมาณเซลลูโลสใกล้เคียงกัน 22.94 และ 26.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ชังข้าวโพดมีปริมาณเซลลูโลสน้อยที่สุด 13.87 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำเชื้อราไวท์รอต 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pycnoporus coccineus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes pavonia*, *Ganoderma australe* และ *Ganoderma mastoporium* ซึ่งมีศักยภาพในการย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสในอาหารวุ้น CMC agar โดยนำแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหารแข็งชังข้าวโพด กาบมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสงเพื่อให้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยทำการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสได้แก่ เอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethyl cellulase (CMCase) และเซลโลไบเอส โดยหมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสระยะเวลา 12 วัน ปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60, 70, 80 และ 90 pH เริ่มต้น 5.5 ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *P. coccineus* และ *P. sanguineus* มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 9 ของการหมัก โดยใช้ชังข้าวโพดกับเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรตที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ดังนั้นในการทดลองถัดไปจึง

เลือกใช้เชื้อรา *P. coccineus* และ *P. sanguineus* ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้อาหาร 2 ชนิด ได้แก่ ชั่งข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรตและศึกษาหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลส (แปรผัน pH เริ่มต้น อุณหภูมิ แหล่งไนโตรเจน และตัวเหนียวน้ำ) ผลจากการทดลองพบว่าสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด คือใช้ระยะเวลาการหมัก 9 วัน pH เริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตส หรือเวราทริลแอลกอฮอล์เป็นตัวเหนียวน้ำ

เมื่อนำเชื้อ *P. sanguineus* มาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสภายใต้สภาวะการหมักที่เหมาะสม (ใช้ชั่งข้าวโพดเป็นสับสเตรต ระยะเวลาหมัก 9 วัน pH เริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้เวราทริลแอลกอฮอล์เป็นตัวเหนียวน้ำ) และทำการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ และภายหลังผลการทดลองพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่สกัดได้มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethyl cellulase (CMCase) และเซลโลไบโอดีเอสเจทีสูงที่สุดเท่ากับ 8.492 ± 0.702 , 14.141 ± 1.177 และ 4.255 ± 0.405 ยูนิต์ต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ และเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร คือ ชั่งข้าวโพด กาบมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการเตรียมโดยการบดและปรับสภาพด้วยสารละลายกรด-ด่าง ปริมาณ 1.50 กรัม โดยติดตามผลการย่อยสลายที่เวลาต่างๆ (0-96 ชั่วโมง) โดยใช้เอนไซม์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (11.326 FPA/กรัม สับสเตรต) ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเปลือกถั่วลิสงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด (11.68 ± 0.37 กรัมต่อลิตร) รองลงมาเป็นชั่งข้าวโพด (10.15 ± 0.43 กรัมต่อลิตร) เปลือกข้าวโพด (8.35 ± 0.12 กรัมต่อลิตร) และกากมะพร้าว (5.45 ± 0.47 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับที่เวลาย่อย 96 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Potential of Agro-industrial By-products as Substrates for Fungal Cellulase Production Through Solid-State Fermentation
Author	Mr. Methus Chuwech
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nuansri Rakariyatham

ABSTRACT

Four agro-industrial by-products, including corn-cobs, coconut hulls, corn-husks and peanut hulls, were selected as substrates in the production of cellulase enzymes. These biomass substances were ground and pretreated with diluted acid and alkali. The cellulose content was found to be the highest in the peanut hulls (33.82 percent), followed by corn husks, coconut hulls and corn-cobs which were 22.94, 26.29 and 13.87 percent, respectively.

In this study, 5 white-rot fungi, *Pycnoporus coccineus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes pavonia*, *Ganoderma australe* and *Ganoderma mastoporum*, which exhibited potential for carboxymethyl cellulose degradation on CMC agar were cultured by solid state fermentation using corn-cobs, coconut hulls, corn husks and peanut hulls as substrates for cellulase production. The cellulase activity, filter paper activity (FPase), carboxymethyl cellulase (CMCase) and cellobiase activities were analyzed after solid state fermentation (SSF) under static conditions at 25°C for 12 days with an initial moisture content of 60-90% and an initial pH value of 5.5. The results showed that *P. coccineus* and *P. sanguineus* provided the highest enzyme activity over 9 days of fermentation when using corn-cobs and peanut hulls as substrates at 70 percent initial moisture content. Therefore, the optimal conditions (initial pH value, incubation temperature, nitrogen sources and inducer) for cellulase production from *P. coccineus* and *P. sanguineus* using corn-cobs and peanut hulls as substrates were evaluated. The results showed that the optimal conditions to produce cellulase included a 9-day fermentation period, an initial pH value of 6.0 at 30°C, a medium

containing yeast extract as the nitrogen source. The inducer consisted of lactose or veratryl alcohol as the inducer. These conditions resulted in the highest level of enzyme activity.

The production of cellulase was successfully achieved from *P. sanguineus* under optimal conditions (using corn-cobs as substrate, incubation at 30°C for 9 days with an initial pH value of 6.0, and containing yeast extract and veratryl alcohol). The results presented that FPase, CMCase and cellobiase activities of the crude enzyme were 8.492 ± 0.702 , 14.141 ± 1.177 and 4.255 ± 0.405 units per gram of substrate (U/gds), respectively. The crude enzyme was used to hydrolyze corn-cobs, coconut hulls, corn husks and peanut hulls (1.50 grams) by monitoring the decay at various times (0-96 h) using an enzyme volume of 10 ml (11.326 FPU/g substrate) in a solution of citrate buffer, a pH value of 4.8 at 50°C, a rate of shaking 160 rpm. Consequently, the amount of reducing sugars from the peanut hulls was highest (11.68 ± 0.37 grams per liter), followed by corn cobs (10.15 ± 0.43 g per liter) corn husks (8.35 ± 0.12 g per liter) and coconut hulls, which displayed the lowest amount (5.45 ± 0.47 g per liter), respectively, at 96 hours.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
ABSTRACT	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ท
รายการอักษรย่อ	ถ
รายการสัญลักษณ์	ธ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ประวัติความเป็นมา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 สมมุติฐานของการศึกษา	3
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	3
1.5 การทบทวนวรรณกรรม	3
1.5.1 วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร	3
1.5.2 เอนไซม์เซลลูเลส	8
1.5.3 เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	11
1.5.4 กระบวนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยจุลินทรีย์	13
1.5.5 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ในกระบวนการหมักในสภาพ อาหารแข็ง	14
1.5.6 การนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์	17
บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	18
2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	18
2.2 วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร	20
2.3 การเตรียมวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร	20

2.4	เชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง	21
2.4.1	ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อราไวท์รอต	21
2.5	วิธีการทดลอง	22
2.5.1	การหาปริมาณความชื้นวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร	22
2.5.2	การหาค่าประกอบของเส้นใยวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรประเภท ลิกโนเซลลูโลสก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายกรด-ด่าง	22
2.5.3	การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรด้วยกรด-ด่างเพื่อเตรียม เป็นสับสเตรต	25
2.5.4	การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งวัน คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC agar)	26
2.5.5	การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ ในสภาพอาหารแข็งบนวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร	26
2.5.6	ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก เชื้อรา <i>P. coccineus</i> และ <i>P. sanguineus</i>	27
	1) ศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	27
	2) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	27
	3) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	27
	4) ศึกษาผลของของตัวเหนียวต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	28
2.5.7	การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสในชีวมวลด้วยสารละลาย เอนไซม์จากเชื้อ <i>P. sanguineus</i>	29
บทที่ 3	ผลการทดลองและวิจารณ์	30
3.1	ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา	30
3.2	ผลการหาค่าประกอบของเส้นใยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโน เซลลูโลส	31
3.3	ผลการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรด้วยกรด-ด่าง เพื่อเตรียม เป็นสับสเตรต	32
3.4	ผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง	36
3.5	การวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อคัดกรองเชื้อราและวัสดุเหลือทิ้งทาง อุตสาหกรรมเกษตรที่เหมาะสมสำหรับการหมัก	37

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ <i>P. coccineus</i> และ <i>P. sanguineus</i>	63
3.6.1 การศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	64
3.6.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	68
3.6.3 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	72
3.6.4 การศึกษาผลของสารเหนียวต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	76
3.7 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสในชีวมวลด้วยเอนไซม์ที่ผลิต จากเชื้อ <i>P. sanguineus</i>	85
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	89
เอกสารอ้างอิง	91
ภาคผนวก	103
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	103
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	104
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส และวิธีการเตรียมกราฟ มาตรฐาน	107
ภาคผนวก ง ตารางผลการทดลอง	114
ประวัติผู้เขียน	160

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.1	องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของลิกโนเซลลูโลสชนิดต่างๆ	6
ตารางที่ 1.2	ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	11
ตารางที่ 3.1	แสดงปริมาณ ความชื้น และค่าเส้นใย Neutral Detergent Fiber และ Acid Detergent Fiber	31
ตารางที่ 3.2	ผลการศึกษาร้อยละขององค์ประกอบของเส้นใยก่อนการปรับสภาพ	31
ตารางที่ 3.3	แสดงปริมาณ ความชื้น และค่าเส้นใย Neutral Detergent Fiber และ Acid Detergent Fiber ภายหลังการปรับสภาพด้วยกรด-ด่าง	33
ตารางที่ 3.4	ผลการศึกษาร้อยละขององค์ประกอบของเส้นใยภายหลังการปรับสภาพด้วยกรด-ด่าง	34
ตารางที่ 3.5	ผลการศึกษาร้อยละขององค์ประกอบของเส้นใยก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยกรด-ด่าง (เปอร์เซ็นต์)	35
ตารางที่ 3.6	แสดงความกว้างของโซนไฮสโตรอบโคโลนีของเชื้อราบนจานอาหารแข็งวุ้นคาร์บอนซีเมทิลเซลลูโลส (CMC agar)	37
ตารางที่ 3.7	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> ในการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรตและมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน	39
ตารางที่ 3.8	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> ในการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้ก้ามมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน	42
ตารางที่ 3.9	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> ในการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน	45
ตารางที่ 3.10	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> ในการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน	48

ตารางที่ 3.11	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> ในการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน	51
ตารางที่ 3.12	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> ในการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้กามมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน	54
ตารางที่ 3.13	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> ในการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรตและมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน	57
ตารางที่ 3.14	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> ในการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน	60
ตารางที่ 3.15	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ <i>P. coccineus</i> และ <i>P. Sanguineus</i> ในวันที่ 9 ของการหมัก	62
ตารางที่ 3.16	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ <i>P. coccineus</i> และ <i>P. sanguineus</i> โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ	64
ตารางที่ 3.17	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ	66
ตารางที่ 3.18	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH เริ่มต้น 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ	69
ตารางที่ 3.19	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	73
ตารางที่ 3.20	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้ขังข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัวเหนียวนำ	77

- ตารางที่ 3.21 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้ซังข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต 81
ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มี
สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทริลแอลกอฮอล์เป็นตัว
เหนี่ยวนำ
- ตารางที่ 3.22 ผลการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 86
จากเชื้อ *P. sanguineus* ที่เวลาต่างๆ



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญภาพ

	หน้า	
ภาพที่ 1.1	แสดงโครงสร้างภายในผนังเซลล์ของพืช	4
ภาพที่ 1.2	โมเลกุลของเซลลูโลส	5
ภาพที่ 1.3	โครงสร้างของเซลลูโลส	6
ภาพที่ 1.4	กลไกการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส	8
ภาพที่ 1.5	การย่อยและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	10
ภาพที่ 2.1	วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรที่ผ่านการบดด้วยเครื่อง Hammer Mill สำหรับเป็นสับสเตรต ชั่งข้าวโพดบด (ก) เปลือกข้าวโพดบด (ข) กาบมะพร้าว บด (ค) เปลือกถั่วลิสงบด (ง) เครื่อง Hammer Mill (จ)	21
ภาพที่ 2.2	แผนภูมิแสดงการหาองค์ประกอบของเส้นใยวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรด้วยวิธีของ Van Soest	23
ภาพที่ 3.1	การเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหาร PDA <i>P. coccineus</i> (ก), <i>P. sanguineus</i> (ข), <i>T. pavonia</i> (ค), <i>G. australe</i> (ง), <i>G. mastoporum</i> (จ)	30
ภาพที่ 3.2	ผลการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรด้วยกรด-ด่าง เพื่อเตรียมเป็นสับสเตรต ชั่งข้าวโพด (ก), กาบมะพร้าว (ข), ชั่งข้าวโพด (ค), เปลือกถั่วลิสง (ง)	33
ภาพที่ 3.3	การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราโดยวิธีคองโกเรด <i>P. coccineus</i> (ก), <i>P. sanguineus</i> (ข), <i>T. pavonia</i> (ค), <i>G. australe</i> (ง), <i>G. mastoporum</i> (จ)	36
ภาพที่ 3.4	แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>P. coccineus</i> โดยใช้ชั่งข้าวโพดเป็นสับสเตรต	38
ภาพที่ 3.5	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> เมื่อใช้ชั่งข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	40

ภาพที่ 3.6	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	40
ภาพที่ 3.7	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	41
ภาพที่ 3.8	แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>P. coccineus</i> โดยใช้ก้ามมะพร้าวเป็นสับสเตรต	41
ภาพที่ 3.9	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> เมื่อใช้ก้ามมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	43
ภาพที่ 3.10	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> เมื่อใช้ก้ามมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	43
ภาพที่ 3.11	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> เมื่อใช้ก้ามมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	44
ภาพที่ 3.12	แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>P. coccineus</i> โดยใช้เปลือกข้าวโพดเป็นสับสเตรต	44
ภาพที่ 3.13	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	46
ภาพที่ 3.14	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	46
ภาพที่ 3.15	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	47
ภาพที่ 3.16	แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>P. coccineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต	47

ภาพที่ 3.17	ผลของความขึ้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	49
ภาพที่ 3.18	ผลของความขึ้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	49
ภาพที่ 3.19	ผลของความขึ้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	50
ภาพที่ 3.20	แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>P. sanguineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต	50
ภาพที่ 3.21	ผลของความขึ้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	52
ภาพที่ 3.22	ผลของความขึ้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	52
ภาพที่ 3.23	ผลของความขึ้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	53
ภาพที่ 3.24	แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>P. sanguineus</i> โดยใช้กาบมะพร้าวเป็นสับสเตรต	53
ภาพที่ 3.25	ผลของความขึ้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	55
ภาพที่ 3.26	ผลของความขึ้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	55
ภาพที่ 3.27	ผลของความขึ้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	56

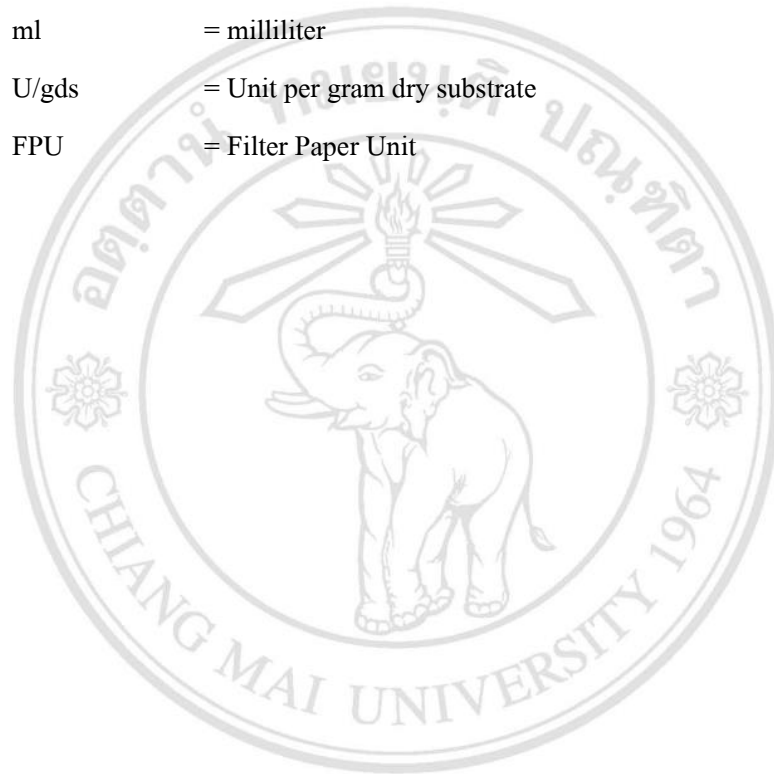
ภาพที่ 3.28	แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>P. sanguineus</i> โดยใช้เปลือกข้าวโพดเป็น สับสเตรต	56
ภาพที่ 3.29	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่ ผลิตจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย กรด-ด่างเป็นสับสเตรต	58
ภาพที่ 3.30	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับ สภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	58
ภาพที่ 3.31	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็น สับสเตรต	59
ภาพที่ 3.32	แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>P. sanguineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็น สับสเตรต	59
ภาพที่ 3.33	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่ ผลิตจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วย กรด-ด่างเป็นสับสเตรต	61
ภาพที่ 3.34	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับ สภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต	61
ภาพที่ 3.35	ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่ผลิตจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็น สับสเตรต	62
ภาพที่ 3.36	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> โดยใช้ซังข้าวโพดเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้น เริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ	65
ภาพที่ 3.37	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> โดยใช้ซังข้าวโพดเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้น เริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ	65
ภาพที่ 3.38	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้น เริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ	67

ภาพที่ 3.39	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้น เริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ	67
ภาพที่ 3.40	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> โดยใช้ซังข้าวโพดเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ	70
ภาพที่ 3.41	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> โดยใช้ซังข้าวโพดเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ	70
ภาพที่ 3.42	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ	71
ภาพที่ 3.43	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ	71
ภาพที่ 3.44	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> โดยใช้ซังข้าวโพดเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	74
ภาพที่ 3.45	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> โดยใช้ซังข้าวโพดเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	74
ภาพที่ 3.46	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	75
ภาพที่ 3.47	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	75
ภาพที่ 3.48	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> โดยใช้ซังข้าวโพดเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน อาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัว เหนี่ยวนำ	78

ภาพที่ 3.49	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> โดยใช้ซังข้าวโพดเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน อาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัว เหนี่ยวนำ	78
ภาพที่ 3.50	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน อาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัว เหนี่ยวนำ	79
ภาพที่ 3.51	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน อาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัว เหนี่ยวนำ	79
ภาพที่ 3.52	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> โดยใช้ซังข้าวโพดเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน อาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทริลแอลกอฮอล์เป็น ตัวเหนี่ยวนำ	82
ภาพที่ 3.53	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> โดยใช้ซังข้าวโพดเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน อาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทริลแอลกอฮอล์เป็น ตัวเหนี่ยวนำ	82
ภาพที่ 3.54	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. coccineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน อาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทริลแอลกอฮอล์เป็น ตัวเหนี่ยวนำ	83
ภาพที่ 3.55	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา <i>P. sanguineus</i> โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็น สับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน อาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทริลแอลกอฮอล์เป็น ตัวเหนี่ยวนำ	83
ภาพที่ 3.56	สารละลายเอนไซม์จากเชื้อ <i>P. sanguineus</i>	85
ภาพที่ 3.57	ผลของเวลาการทำปฏิกิริยาต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวัซ์	87

รายการตัวย่อ

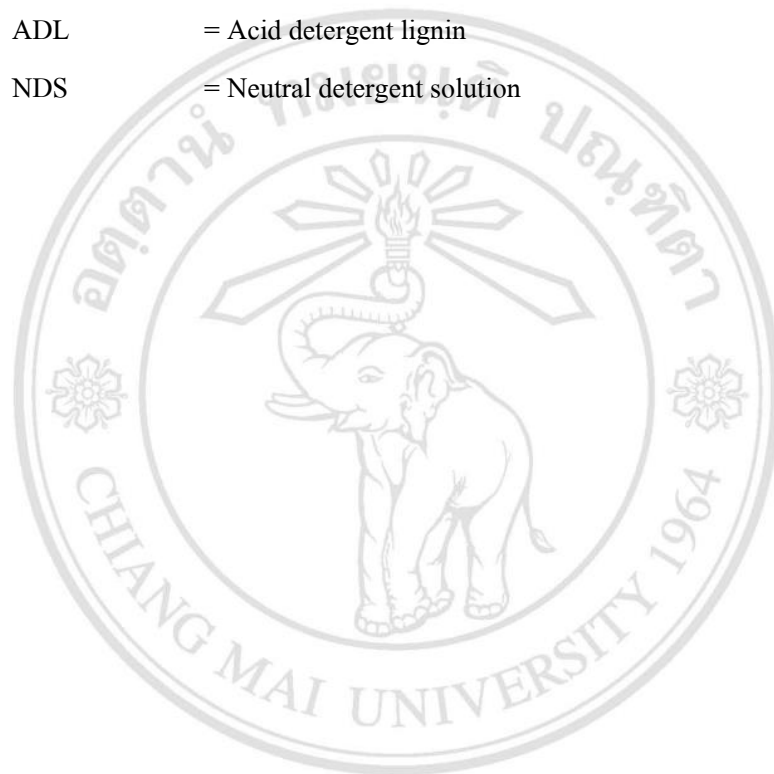
g/L	= กรัมต่อลิตร
FPase	= Filter paper cellulase
CMCase	= Carboxymethyl cellulase
ml	= milliliter
U/gds	= Unit per gram dry substrate
FPU	= Filter Paper Unit



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการสัญลักษณ์

°C	= องศาเซลเซียส
NDF	= Neutral detergent fiber
ADF	= Acid detergent fiber
ADL	= Acid detergent lignin
NDS	= Neutral detergent solution



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ. 2555-2559) ได้ให้ความสำคัญต่อความมั่นคงของอาหารและพลังงานของโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาพลังงานชีวภาพโดยใช้วัสดุเหลือใช้จากภาคเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม แต่ละปีมีผลผลิตทางการเกษตรในปริมาณมาก เพื่อส่งเป็นสินค้าออก และเพื่อการอุปโภคบริโภคเองภายในประเทศ จากกระบวนการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตรดังกล่าว ทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสจำนวนมาก (วิไลวรรณ โชติเกียรติ และคณะ, 2523 อ้างโดย รุสนี, 2552) วัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ได้แก่ ชานอ้อย กาบมะพร้าว ปาล์มน้ำมัน ฟางข้าว ของเหลือทิ้งจากข้าวโพด แกลบ และเปลือกถั่วลิสง เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่ลิกโนเซลลูโลสเหล่านี้มีองค์ประกอบหลักเป็น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งสารดังกล่าวสามารถย่อยสลายเพื่อนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารอื่นๆ เช่น การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากลิกโนเซลลูโลส ซึ่งจัดเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่ 2 (2nd Generation Biofuel) ได้แก่ ไบโอดีทานอลจากลิกโนเซลลูโลสถือเป็นพัฒนาการของเชื้อเพลิงชีวภาพที่ไม่ใช่พืชอาหาร ซึ่งเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาเพิ่มมูลค่าในการผลิตพลังงานเชื้อเพลิง แต่การที่จะใช้ลิกโนเซลลูโลสผลิตไบโอดีทานอลได้นั้น จำเป็นต้องย่อยสลายให้น้ำตาลกลูโคสก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก โดยทั่วไปการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสสามารถทำได้ 2 วิธีคือ การย่อยสลายโดยใช้กรด ซึ่งจะมีข้อเสียคือเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง และเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดยจะใช้เอนไซม์เซลลูเลสซึ่งมีความจำเพาะต่อสับสเตรตจำพวกเซลลูโลส ซึ่งเป็นสารประกอบ โพลีแซคคาไรด์ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส ต่อกันเป็นสายยาวตั้งแต่ 30-15,000 หน่วย ด้วยพันธะเบต้า-(1,4)-ไกลโคซิดิก (Clarke, 1997) เอนไซม์เซลลูเลสเป็นระบบเอนไซม์ที่ซับซ้อนประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดทำงานร่วมกัน คือ เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase, EC 3.4.1.4) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส โดยตัดที่พันธะเบต้า-(1,4)-ไกลโคซิดิก ในส่วนที่เป็นโครงสร้างอสัณฐาน (amorphous) โดยจะเข้าตัดพันธะ

แบบส้อม ชนิดที่สองคือ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase, EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส โดยเข้าตัดที่พันธะเบต้า-(1,4)-ไกลโคซิดิก จากปลายด้านที่ไม่มีหมู่น้ำตาลรีดิวซ์ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นเซลโลไบโอสและกลูโคสบางส่วน และเอนไซม์ชนิดสุดท้ายคือ เบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase, EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่สลายเซลโลไบโอสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ได้น้ำตาลกลูโคส (Milala *et al.*, 2005; Bansal *et al.*, 2011; Deswal *et al.*, 2011)

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดยเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่สูงโดยขับออกมาสู่ภายนอกเซลล์ทำให้ง่ายต่อการแยกเอนไซม์ (Kim *et al.*, 1999) แต่ปัญหาหนึ่งที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมผลิตไบโอเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส คือเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั้งที่ผลิตได้เองและที่นำเข้าจากต่างประเทศยังคงมีราคาสูง จึงได้มีการศึกษาหาแนวทางในการลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งมีมากภายในประเทศและมีราคาถูกมาใช้เป็นสับสเตรตสำหรับการเลี้ยงเชื้อรา และหากสามารถคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงโดยใช้สับสเตรตที่มีราคาถูก ก็เท่ากับเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเกษตร โดยใช้ต้นทุนต่ำ

ในงานวิจัยนี้จึงมีความพยายามที่จะลดต้นทุนการผลิตของเอนไซม์ลง โดยการคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้ได้ในปริมาณสูงเพื่อย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรภายใต้การหมักสภาพอาหารแข็ง (solid state fermentation) และศึกษาถึงสภาวะการหมักที่เหมาะสม ผลที่ได้จากการศึกษาอาจเป็นแนวทางเลือกในการจัดการวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นการเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ (value-added products) โดยอาศัยความรู้ทางเทคโนโลยีการหมักเพื่อเป็นทางเลือกในการลดต้นทุนแก่อุตสาหกรรมผู้ใช้ประโยชน์จากเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ในปัจจุบันได้มีความคิดที่จะนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาเปลี่ยนแปลงให้มีประโยชน์มากขึ้นดังเช่นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล แต่ก่อนที่จะนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรไปผลิตเป็นน้ำตาลได้จะต้องผ่านขั้นตอนการปรับสภาพด้วยกรดหรือด่างเพื่อกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินรวมถึงเพื่อเปิดพื้นผิวของเซลลูโลสให้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์เข้าทำการย่อยได้ง่ายยิ่งขึ้นโดยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนต่างกันจะสามารถย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้แตกต่างกัน

ในงานวิจัยนี้จะนำเชื้อรากลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสคือเชื้อรากลุ่มไวท์รอต (white-rot fungi) ซึ่งคัดเลือกมา 5 สายพันธุ์ได้แก่ *P. coccineus*, *P. sanguineus*, *T. pavonia*, *G. australe* และ *G. mastoporum* นำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสภายใต้การหมักในสภาพอาหารแข็งและจากนั้นทดลองย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรโดยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้โดยมีวัตถุประสงค์หลักดังต่อไปนี้

- 1.2.1 เพื่อศึกษาหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินของวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นสับสเตรตในการเลี้ยงเชื้อราสำหรับการผลิตเอนไซม์
- 1.2.2 เพื่อศึกษาศักยภาพของเชื้อราในการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรเช่น ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด กาบมะพร้าว และเปลือกถั่วลิสง ซึ่งประกอบด้วยลิกโนเซลลูโลสเพื่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสภายใต้การหมักสภาพอาหารแข็ง
- 1.2.3 เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อาทิ ความชื้นเริ่มต้น ระยะเวลาการหมัก ความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ แหล่งไนโตรเจนและตัวเหนียวน้ำ
- 1.2.4 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรด้วยเซลลูเลสที่ผลิตได้

1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

- 1.3.1 เชื้อราที่นำมาใช้ในงานวิจัยสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีประสิทธิภาพสูง
- 1.3.2 ชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรที่นำมาใช้ในการศึกษามีผลต่อการผลิตเซลลูเลส
- 1.3.3 การที่เชื้อราจะเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีจะต้องมีสภาวะการหมักที่เหมาะสม

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราภายใต้การหมักสภาพอาหารแข็ง (solid state fermentation) โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรได้แก่ ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด กาบมะพร้าว และเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต โดยทำการศึกษาองค์ประกอบของเส้นใยในวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร หาสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก เช่น ปริมาณความชื้น ระยะเวลาการหมัก ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ แหล่งไนโตรเจนและตัวเหนียวน้ำต่อการเพิ่มการผลิตเอนไซม์

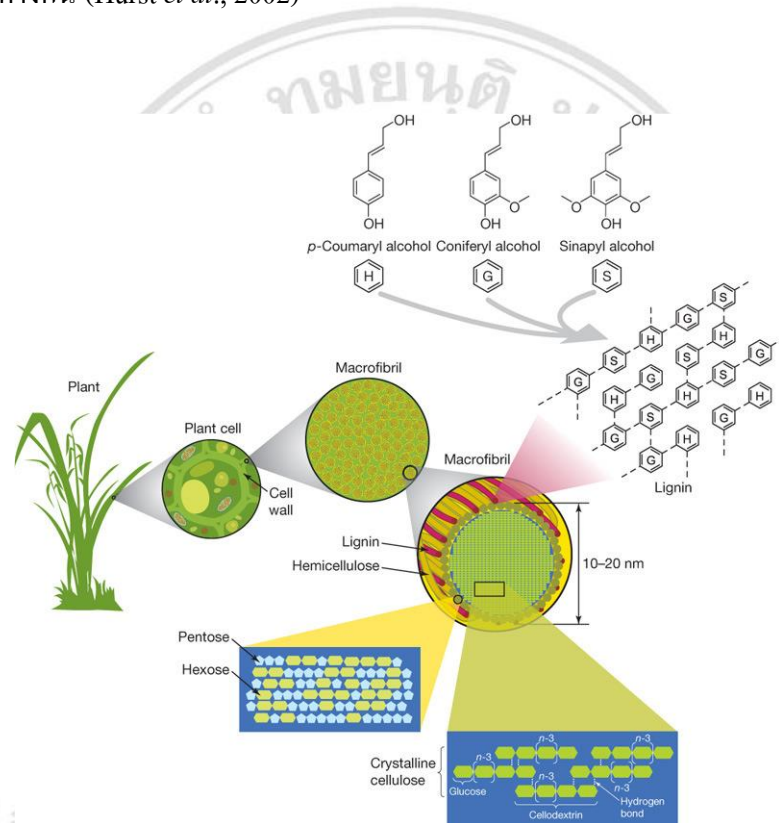
1.5 การทบทวนวรรณกรรม

1.5.1 วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร(สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรและสหกรณ์, 2556)

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม จึงทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปผลผลิตทางการเกษตร เช่น ชัง

ข้าวโพด กามมะพร้าว เปลือกถั่วลิสง และชานอ้อย เป็นต้น ซึ่งวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวโดยเฉลี่ยมีประมาณ 65 ล้านตันต่อปี

วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรประกอบด้วย 3 องค์ประกอบหลักที่สำคัญคือ เซลลูโลส (35-50 เปอร์เซ็นต์) เฮมิเซลลูโลส (20-35 เปอร์เซ็นต์) และลิกนิน (10-25 เปอร์เซ็นต์) (Lynd, 2002; Kuhad and Singh, 2007; Sánchez, 2009 อ้างโดย จุฑามาศ, 2553) (ภาพที่ 1.1) อัตราส่วนขององค์ประกอบอาจแตกต่างกันตามแหล่งของวัสดุเหลือทิ้ง โดยองค์ประกอบเหล่านี้ มีรายละเอียดของโครงสร้างแตกต่างกัน (Hurst *et al.*, 2002)

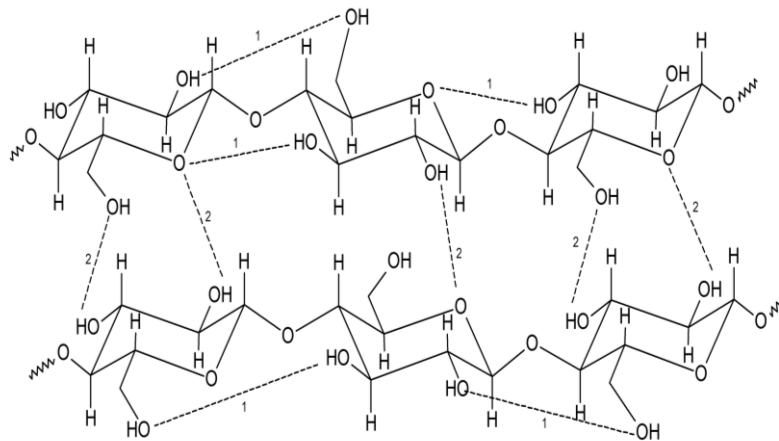


ภาพที่ 1.1 แสดงโครงสร้างภายในผนังเซลล์ของพืช (Rubin, 2008)

1) เซลลูโลส (Cellulose)

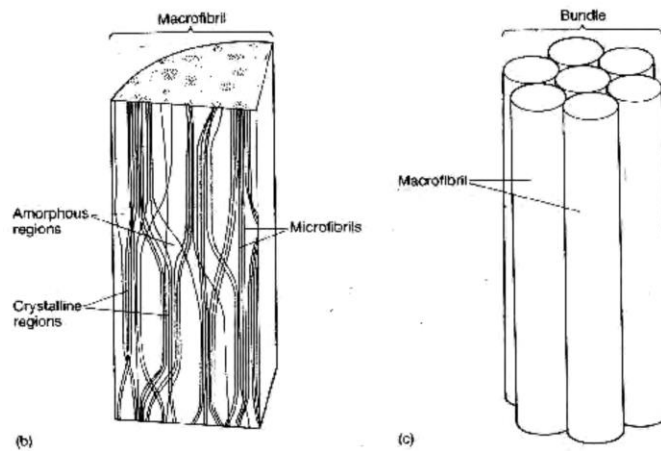
เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบของพืชที่มีมากที่สุด ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงแก่เซลล์พืช (Fan *et al.*, 1987 อ้างโดย ศศิธร, 2552) โดยธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระ แต่จะรวมกับเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีมากในผนังของเซลล์พืช ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่หนึ่งของน้ำตาลกลูโคสกับคาร์บอนตำแหน่งที่สี่ของน้ำตาลกลูโคสตัวถัดไป เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตัวที่หนึ่งอยู่ในตำแหน่งเบต้าจึงเรียกพันธะนี้ว่า เบต้า-(1,4)-ไกลโคซิดิก การเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงไม่มีแขนงย่อย มีสูตรเคมีทั่วไปคือ $-(C_6H_{10}O_5)_n-$ เมื่อ n คือ

จำนวนหน่วยกลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง จำนวนกลูโคสในสายเซลลูโลสไม่สามารถทราบจำนวนที่แท้จริงได้ เนื่องจากระหว่างสายเซลลูโลสจะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนซึ่งเรียงแน่นเป็นมัดไมโครไฟบริล ทำให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสมีมาก ทำให้เกิดโครงสร้างเซลลูโลสที่ซับซ้อน (ภาพที่ 1.2) แบ่งได้เป็นสองส่วนคือ ส่วนของผลึก (crystalline) เป็นโครงสร้างที่จัดเรียงกันอย่างเป็นระเบียบและส่วนของ โครงสร้างที่จัดเรียงกันอย่างไม่เป็นระเบียบ หรืออสัณฐาน (amorphous) เป็นส่วนที่ดูดซับน้ำได้ดีสามารถย่อยสลายได้ง่ายกว่า (ภาพที่ 1.3)



ภาพที่ 1.2 โมเลกุลของเซลลูโลส (ที่มา : <http://www.intechopen.com/source/html/45443/media/image1.png>)

การจัดเรียงตัว จะทำให้มีส่วนที่มีความเป็นระเบียบ (crystalline regions) โดยการรวมตัวกันเกิดเป็นไฟบริล (fibrils) และไฟบริลจำนวนมากรวมกันเป็นเส้นบันเดิล (bundle) ภายในโครงสร้างเซลลูโลส บันเดิลประมาณ 40-60 สายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน มีการจัดเรียงตัวเป็นสายยาวโครงสร้างคล้ายลูกโซ่ ลักษณะเป็น rod-shaped unit ที่เรียกว่าไมโครไฟบริล (microfibril) ที่มีลักษณะส่วนใหญ่เป็นระเบียบ (ภาพที่ 1.3) จึงถูกย่อยสลายได้ยาก ภายในโมเลกุลเซลลูโลส ยึดติดกันแน่น มีโครงสร้างซับซ้อน เพราะประกอบด้วยสายโพลีเมอร์เรียงขนานกัน ยึดด้วยพันธะไฮโดรเจน และแรงแรงแคตอร์วาล์ว (Cooke and Whipps, 1993 ; Sánchez, 2009 อ้างโดยจุฑามาศ, 2553) จึงทำให้เซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ได้ช้า



ภาพที่ 1.3 โครงสร้างของเซลลูโลส (ที่มา :Cooke and Whipps, 1993 อ้างโดย จุฑามาศ, 2553)

พืชต่างชนิดกันจะมีปริมาณเซลลูโลสไม่เท่ากัน เนื่องจากความแตกต่างขององค์ประกอบของผนังเซลล์ รวมถึงอายุของพืช แสดงในตารางที่ 1.1 ซึ่งในช่วงแรกๆ เซลลูโลสในพืชจะเกาะกันอยู่อย่างไม่แน่น โครงสร้างเป็นแบบอสัณฐาน (amorphous) แต่เมื่อพืชมีอายุสูงขึ้น พันธะไฮโดรเจนที่ช่วยยึดเส้นบันเดิล (bundle) แต่ละเส้นจะเพิ่มมากขึ้นตามกาลเวลา ทำให้เซลลูโลสเกาะกันอยู่อย่างหนาแน่น มีโครงสร้างแบบผลึก ทำให้เอนไซม์เข้าสลายพันธะได้ยาก (Kuhad and Singh, 2007; Graminha, 2008 อ้างโดย จุฑามาศ, 2553)

ตารางที่ 1.1 องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของลิกโนเซลลูโลสชนิดต่างๆ

ลิกโนเซลลูโลส	องค์ประกอบ (ร้อยละ)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ฟางข้าวสาลี	50	30	15
ฟางข้าวโอ๊ต	49.3	25	14-22
ฟางข้าว	35	25	17
ชานอ้อย	33	22	14
รำข้าวสาลี	8.7	28	3.2
ต้นมันสำปะหลัง	32.2	13.85	29.26

(ที่มา: คัดแปลงจาก Bisaria (1991))

วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรมีองค์ประกอบของเซลลูโลสอยู่ในช่วง 32-50 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 22-35 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 15-35 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันมีการนำเอาวัสดุเหลือ

ทั้งทางการเกษตรที่มีอยู่หลากหลายชนิดมาใช้ประโยชน์มากขึ้น ซึ่งหาได้ง่าย มีราคาถูกเช่น เปลือกข้าวโพด กากมันสำปะหลัง ชานอ้อย กาบมะพร้าว และขังข้าวโพด ถือเป็น การเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งมีค่าน้อยให้มีมูลค่าสูงขึ้น

2) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบประเภทเฮเทอโรโพลิเมอร์โพลิแซคคาไรด์ (heterogeneous polysaccharides) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิดประกอบอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน โดย เฮมิเซลลูโลสจะแตกต่างกับเซลลูโลสซึ่งเป็นสารประกอบโฮโมโพลิเมอร์โพลิแซคคาไรด์ (homogeneous polysaccharides) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียวกายในโมเลกุล เฮมิเซลลูโลสมีค่ามวลโมเลกุลน้อยกว่ามวลโมเลกุลของเซลลูโลส และโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสสามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยสารละลายกรด (Goodwin and Mercer, 1972; Wong *et al.*, 1988)

3) ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินเป็นสารประกอบโพลิฟีนอลิก (polyphenolic compound) ที่มีโครงสร้างซับซ้อน เป็นโพลิเมอร์ของ p-hydroxy phenyl propane เรียงต่อกัน โดยมีพันธะที่สำคัญคือ พันธะเอสเทอร์ ซึ่งจะทนต่อการย่อยสลายด้วยกรด นอกจากนี้ยังพบพันธะคาร์บอน ซึ่งจะทนต่อการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่าง ด้วยเหตุนี้ทำให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง ลิกนินไม่สามารถละลายน้ำแต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น เอทานอล หรือเมทานอลที่ร้อน และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปกติลิกนินจะอยู่ในโครงสร้างของเซลล์พืชบริเวณรอบเซลลูโลส โดยเป็นตัวป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยสลาย (วรณี แฝงจันทิก และคณะ, 2546 อ้างโดย รุสนี, 2552)

การย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรสามารถย่อยสลายได้ด้วย 2 กระบวนการ ดังนี้ (Fan *et al.*, 1987; รุสนี, 2552)

1) วิธีการทางเคมี

เป็นการย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง (acid hydrolysis) เช่น กรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริก การย่อยด้วยกรดเครื่องมือที่ใช้จะต้องทนทานต่อการกัดกร่อนและอุณหภูมิสูง เนื่องจากปฏิกิริยาการใช้กรดไม่เฉพาะเจาะจง กลูโคสบางส่วนที่เกิดขึ้นและสารประกอบอื่นที่ติดมาจะทำปฏิกิริยากับกรดต่อไปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ

2) วิธีการทางชีวภาพ

เป็นการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรส่วนใหญ่เกิดการสลายตัวจากการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในเชื้อรา

2.1) ข้อดีของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (ศศิธร, 2552)

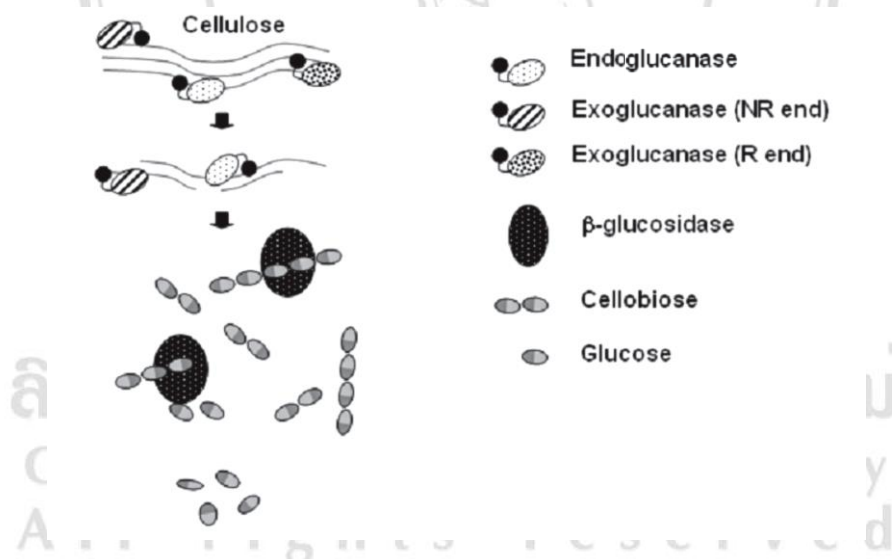
2.1.1) เอนไซม์สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิไม่สูง จึงเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องให้ความร้อนทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิต

2.1.2) เอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะมีความบริสุทธิ์มาก และไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง

2.1.3) ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน

1.5.2 เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาย่อยสลายเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส มีเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีหน้าที่ และคุณลักษณะที่ต่างกัน (DeMenezes, 1978; Lynd, 2002; Zhang *et al.*, 2006 อ้างโดย จุฑามาศ, 2553)



ภาพที่ 1.4 กลไกการย่อยสลายเซลลูโลส โดยเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส

(ที่มา: Mathew *et al.*, 2008 อ้างโดย จุฑามาศ, 2553)

1) กลไกการทำงานของเซลลูเลส
กลไกการทำงานของเซลลูเลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด (Zhang *et al.*, 2006; Mathew *et al.*, 2008; de Castro *et al.*, 2010 อ้างโดย จุฑามาศ, 2553) ได้แก่

1.1) เอนโดกลูคาเนส [Endo-1,4- β -D-glucanase (CMCase, EC. 3.2.1.4)]
เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในรูปที่เป็นระเบียบและ
ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ที่ตำแหน่ง β -1,4 แบบสุ่ม ทำให้โมเลกุลมีขนาดเล็กลง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น
โอลิโกเมอร์ และน้ำตาลกลูโคสบางส่วน

1.2) เอกโซกลูคาเนส [Exo-1,4- β -D-glucanase (FPase, EC.3.2.1.91)] หรือ 1,4- β -
D-glucan cellobiohydrolase (CBH)
เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ endo- β -1,4-glucanase ในการย่อย
โมเลกุลของเซลลูโลส โดยย่อยจากปลายด้านที่ไม่มีหมู่ น้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ
ย่อยสลายส่วนใหญ่คือน้ำตาลเซลโลไบโอส

1.3) เบต้ากลูโคซิเดส [β -D-Glucoside glucanohydrolase (cellobiase, EC. 3.2.21)]
เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เสริมการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอก
โซกลูคาเนส โดยทำหน้าที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลโลไบโอส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส

โดยพบว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ ต้องทำงานร่วมกัน จึงจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้
ดี แต่เมื่อแยกชนิดใดชนิดหนึ่งออกไปจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง แม้การย่อย
เซลลูโลสโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจะเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจง

นอกจากลำดับการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ที่ได้แสดงดังกล่าวแล้ว ยังสามารถ
อธิบายการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยชนิดและตำแหน่งการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ 3 ชนิดที่ทำงานร่วมกัน
ตามภาพที่ 1.5 ดังนี้

2) ชนิดและตำแหน่งการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ 3 ชนิด

2.1) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase)
ทำหน้าที่ย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์และย่อยเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโล-
ไบโอสโดยจะย่อยสลายจากทางด้านปลายรีดิวซ์ (reducing end) ของเซลลูโลส

2.2) เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase)

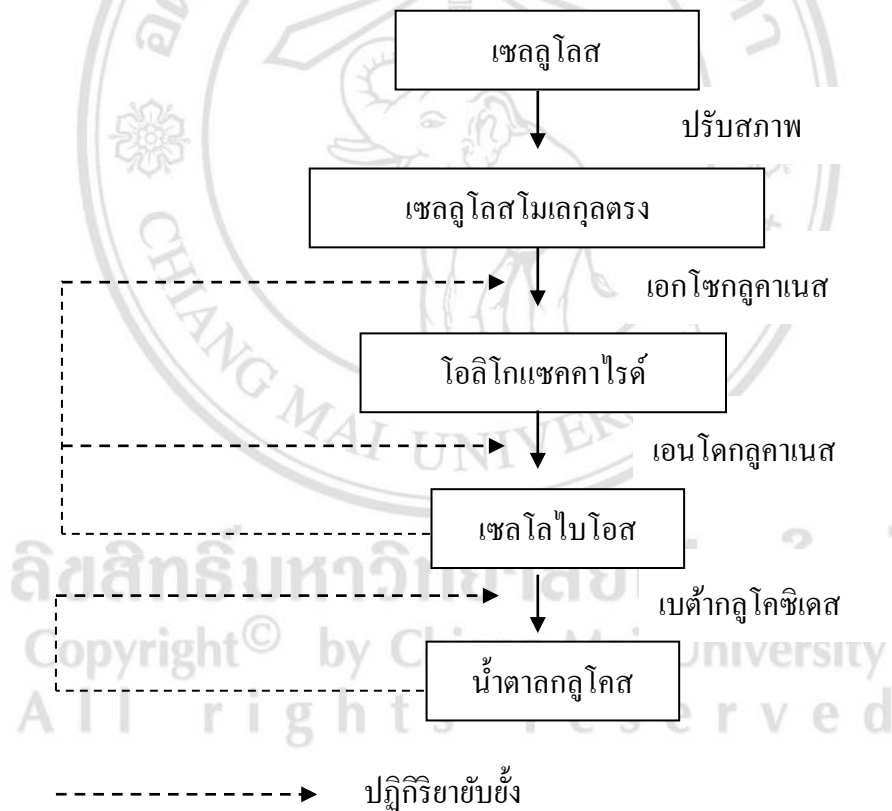
ทำหน้าที่ย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์และเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส

2.3) เบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase)

ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เปลี่ยนเป็นกลูโคส

3) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถอธิบายได้ดังนี้ คือ เบต้ากลูโคซิเดสจะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคส ทำให้มีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอกโซกลูคาเนสและเอนโดกลูคาเนส ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและหยุดปฏิกิริยาในที่สุดแสดงดังภาพที่ 1.5



หมายเหตุ -----> ปฏิกิริยายับยั้ง

ภาพที่ 1.5 การย่อยและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

(ที่มา : ฉัตรชัย ไกรสรพงษ์, 2548)

1.5.3 เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตแบบยูคาริโอต (eukaryote) เช่นเดียวกับพืชและสัตว์ ซึ่งมีความต้องการอากาศแบบแอโรบ (aerobe) หรือแฟคัลเตทีฟแอนแอโรบ (facultative anaerobe) มีลักษณะเป็นเส้นใย (filamentous) หรืออาจเป็นเซลล์เดี่ยว เช่น ยีสต์ แต่ส่วนใหญ่ประกอบด้วยหลายเซลล์มาต่อกันเป็นเส้นใย ผนังเซลล์ ประกอบด้วย ไคติน และกลูแคน พบได้ทั่วไปทั้งในดินและแหล่งน้ำ สามารถดำรงชีวิตได้หลายแบบ เช่น ปรสิตร และดำรงชีวิตอิสระ โดยทำหน้าที่ย่อยสลาย (saprophyte) หรืออาศัยร่วมกับ สิ่งมีชีวิต อื่นๆ (symbiosis) ซึ่งเชื้อราจะปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยอินทรีย์วัตถุ แล้วดูดสารอาหารเข้าสู่เซลล์หรือเส้นใย (นงลักษณ์ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2548) เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราที่มีความสำคัญมาก ได้แก่ เซลลูเลส ไชลานาส เป็นต้น

รายงานที่มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากราเส้นใย (filamentous fungi) เช่น เชื้อรา ในสกุล *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* และ *Fusarium* เป็นต้น (Sukumaran et al., 2005) ดังแสดง ในตารางที่ 1.2 (ดัดแปลงจากจุฑามาศ, 2553)

ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

สกุล	ชนิด	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>	Ray et al., 1993 ; Tsao et al., 2000 ; Ong et al., 2004
	<i>A. fumigatus</i>	Gupte and Madamwar, 1997
	<i>A. terreus</i>	Gao et al., 2008
	<i>A. nidulans</i>	Ali et al., 2008
<i>Fusarium</i>	<i>F. oxysporum</i>	Ortega, 1990
	<i>F. solani</i>	Wood and McCrae, 1997
<i>Penicillium</i>	<i>P. brasilianum</i>	Jorgensen et al., 2003
	<i>P. citrinum</i>	Dutta et al., 2008
	<i>P. decumbans</i>	Fujian et al., 2002 ; Mo et al., 2004
	<i>P. notatum</i>	Das and Ghose, 2009
	<i>P. occitanis</i>	Chaabouni et al., 1995
<i>Trichoderma</i>	<i>T. harzianum</i>	Kalra et al., 1984 ; Roussos et al., 1992
	<i>T. longibrachiatum</i>	Sidhu, 1983
	<i>T. reesei</i>	Chahal, 1985 ; Juhász et al., 2005 ; Latifian et al., 2007 ; Singhanian et al., 2007

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณสูง ได้แก่ *T. reesei* และ *A. niger* ถึงแม้ว่าเชื่อดังกล่าวจะไม่ใช่กลุ่มก่อโรคอย่างชัดเจน แต่การที่มีเชื้อราอยู่ในปริมาณมากก็จะมีการสร้างสปอร์จำนวนมากด้วย ผู้ที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้นมีโอกาสหายใจเข้าเอาสปอร์เข้าไปในร่างกายได้มากเช่นกัน โดยกลุ่มบุคคลที่จะได้รับผลกระทบอย่างมาก คือกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิแพ้ ทำให้เกิดอาการจาม น้ำมูกไหล หรือหอบหืดได้ และในกลุ่มคนที่มีร่างกายอ่อนแอ มีโรคประจำตัว ซึ่งมีภูมิคุ้มกันต่ำต่อสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ก็มีโอกาที่เชื้อราจะเข้าไปก่อโรคในร่างกาย จึงได้มีการค้นคว้าเชื้อราสายพันธุ์อื่น ๆ ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแทน เช่น เชื้อราในกลุ่มไวท์รอต

1) เชื้อราในกลุ่มไวท์รอต

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรได้ ส่วนใหญ่ มักจะอยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes โดยสามารถจำแนกชนิดของเชื้อรานี้ตามลักษณะการย่อยได้ 3 ชนิด (เบญจวรรณ, 2545) ได้แก่

- 1.1) เชื้อราในกลุ่มซอฟต์รอต (soft-rot fungi) สามารถย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์ทั้งที่เป็นส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้เพียงบางส่วน
- 1.2) เชื้อราในกลุ่มบราวน์รอต (brown-rot fungi) สามารถย่อยสลายได้เฉพาะเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเท่านั้น
- 1.3) เชื้อราในกลุ่มไวท์รอต (white-rot fungi) สามารถย่อยองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสได้ทั้งหมด

เชื้อราในกลุ่มไวท์รอต จัดเป็นเชื้อราที่อยู่ในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตัมของอาณาจักรเห็ดรา (kingdom fungi) โดยส่วนใหญ่เชื้อราในกลุ่มนี้ มักจะเป็นเห็ดราที่บริโภคได้ (edible mushroom) มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ *Auricularia auriculajude* (เห็ดหูหนู) และ *Lentinula edodes* (shiitake, เห็ดหอม) และอีกมากกว่า 20 ชนิดที่เป็นกลุ่มเห็ดราที่มีการเพาะเลี้ยงเพื่อการบริโภคอย่างกว้างขวาง โดย *Agaricus bisporus* (champignon, เห็ดแชมปิญอง, เห็ดกระดุม) และ *Pleurotus ostreatus* (เห็ดนางรม) (Chang and Miles, 1989 อ้างโดย สุนันทา, 2549))

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรพบว่าเชื้อราในกลุ่มไวท์รอต มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Rodriguez *et al.*, 1991) โดยเชื้อราจะผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มที่เป็น primary metabolite ออกมานอกเซลล์ สำหรับย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์จำพวกเซลลูโลส ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เอนไซม์เหล่านี้ ได้แก่ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) เอนโดกลู-

คาเนส (endoglucanase) และเบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) และกลุ่มที่เป็น secondary metabolite เช่น ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase) และแลคเคส (laccase) เพื่อทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารประกอบฟีนอลิก และอะโรมาติกโพลีเมอร์ในโครงสร้าง ลิกนิน (Have and Franssen, 2001 อ้างโดย สุนันทา, 2549)

1.5.4 กระบวนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยจุลินทรีย์ (จุฑามาศ, 2553)

กระบวนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อจุลินทรีย์ สามารถแบ่งตามลักษณะอาหารในการเลี้ยงเชื้อได้ 2 ลักษณะ คือ

1) การหมักในสภาพอาหารเหลว (Submerged fermentation)

กระบวนการผลิตในอาหารเหลวโดยใช้ถังหมัก ที่ประกอบด้วยส่วนของการให้อากาศ อาจมีลักษณะเป็นท่อเปิด หรืออาจมีใบพัด เพื่อช่วยในการเพิ่มอากาศและกวนให้อากาศรอบในถังหมักเข้ากันได้ และอุปกรณ์ตรวจวัดปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ pH ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำและการเกิดฟอง กระบวนการหมักที่นิยมระดับอุตสาหกรรมเป็นวิธีแบบ batch (การหมักแบบไม่ต่อเนื่องหรือการหมักแบบกะ) และแบบ fed-batch (การหมักกึ่งต่อเนื่องหรือการหมักแบบกึ่งกะ)

การหมักในสภาพอาหารเหลวมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์เป็นระยะๆ ได้ หากหมักแบบ fed-batch culture ลดการเกิดการปนเปื้อนใช้แรงงานน้อย แต่การหมักแบบนี้มีข้อเสียเช่นประสิทธิภาพต่ำในการหมักโดยใช้ลิกโนเซลลูโลสเป็นสับสเตรต ค่าใช้จ่ายสูง และได้เอนไซม์ความเข้มข้นน้อยกว่าการหมักในสภาพอาหารแข็ง

2) การหมักในสภาพอาหารแข็ง (Solid state fermentation)

กระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสับสเตรตที่ไม่ละลายน้ำ สับสเตรตที่ใช้ส่วนมากเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรที่มีราคาถูก เช่น ลิกโนเซลลูโลส รวมทั้งของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตอาหาร เป็นการหมักที่อาศัยการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง ที่มีน้ำอยู่ในระบบในสภาพถูกดูดซับด้วยสับสเตรต การผลิตเอนไซม์ด้วยวิธีนี้มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายต่ำ มีความสะดวกในการให้อากาศ เพราะมีช่องว่างระหว่างสับสเตรต ไม่จำเป็นต้องกวนต่อเนื่อง เอนไซม์ที่ได้มีความเข้มข้นสูงกว่าการหมักในสภาพอาหารเหลว และองค์ประกอบของอาหารหาง่ายและราคาถูก (Pandey, 2003; Singhania *et al.*, 2010)

การหมักในสภาพอาหารแข็งเหมาะกับเชื้อราที่เจริญได้ในระดับความชื้นต่ำ ระหว่างการหมัก ไม่สามารถขจัดความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการ

ควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงถึงระดับที่เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ ภายภาพ และปัจจัยต่างๆทำได้ยาก เนื่องจากสับสเตรตที่ใช้ในการหมักไม่เป็นเนื้อเดียวกันอย่างสม่ำเสมอ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะต่างๆกันย่อมมีผลต่อคุณภาพและปริมาณ

1.5.5 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ในกระบวนการหมักในสภาพอาหารแข็ง

เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตในทางการค้ามักเป็นเอนไซม์เซลลูเลสผสมที่สกัดได้จากเชื้อรา ชนิดที่แตกต่างกันไป และให้ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้ องค์ประกอบของอาหาร และสภาวะที่ใช้ในการผลิต การที่จะให้ผลผลิตเอนไซม์สูงและให้คุณภาพดีนั้น จะต้องมีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ชนิดอาหารที่ใช้ต้องเหมาะสม pH การปนเปื้อน รวมทั้งคำนึงถึงราคาต้นทุนในการผลิตด้วย นอกจากนี้การเติมแหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุที่ จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ สารเหนียวทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ก็เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงด้วย (Tsao and Chaing, 1983)

1) ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1) แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนหรือสับสเตรตที่ใช้ในการหมักในระดับห้องปฏิบัติการต้อง คำนึงถึงความเป็นไปได้ในการที่จะพัฒนาไปสู่ระดับนำร่องและระดับอุตสาหกรรมด้วย ดังนั้นราคาของ แหล่งคาร์บอนหรือสับสเตรตที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ต้องพิจารณาพร้อมด้วย กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น แป้งจากแหล่งต่างๆ เมล็ด ธัญพืช ซึ่งทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ในปัจจุบันมีการศึกษานำวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร และของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ การนำวัสดุคิบ เหล่านี้มาใช้ นอกจากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุคิบในรูปของผลผลิตที่ได้แล้วยังสามารถลดปัญหาการ จัดการของเสียเหล่านี้ได้อีกด้วย (Akidumils and Glatz, 1998)

Miyamoto (1997) ได้นำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ (ขานอ้อย รำ ข้าวเจ้า รำข้าวสาลี) มาใช้เป็นสับสเตรตในการเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อรา *T. reesei* เพื่อใช้ในการ ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเก็บตัวอย่าง ทุกๆ 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิต ภายในช่วงเวลา 12 วัน พบว่า รำข้าวเจ้า ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด คือ 0.656 ยูนิตต่อ มิลลิลิตร ตามด้วยขานอ้อย 0.367 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และรำข้าวสาลี 0.226 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการศึกษา ซึ่งได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่างกัน เนื่องจากวัสดุทางการเกษตรแต่ละชนิดมีปริมาณ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่ต่างกัน จึงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้มีผลที่ต่างกัน (हररषषष ढुणुणषष

พฤษภาคม และคณะ, 2545 อ้าง โดย รุณี, 2552) นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้ว ชนิดของจุลินทรีย์ก็มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่จะผลิตได้ และสำหรับจุลินทรีย์ในสกุลเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ก็มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ต่างกัน เช่น การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T. reesei* โดยใช้กากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง พบว่าไม่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ แต่ในขณะที่เลี้ยงเชื้อรา *T. reesei* สายพันธุ์ QM9414 MCG77 และ Rut C-30 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงในระหว่างการเจริญบนกากปาล์ม (Cheah *et al.*, 1988) นอกจากนี้ชนิดของแหล่งคาร์บอนอาจส่งผลกระทบต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้ ดังรายงานการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Penicillium funiculosum* UV-49 ในอาหารเหลว พบว่า กิจกรรมของ Filter paper activity (FPase) และ Carboxymethylcellulase (CMCase) มีค่าสูงเมื่อใช้ฟางข้าวสาลีเป็นสับสเตรต ส่วนการใช้ฝ้ายกระดาษกรอง กากชานอ้อย ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายด่างให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่า (Joglekar *et al.*, 1984)

1.2) ความชื้นเริ่มต้น

Alam *et al.*, (2005) รายงานผลของความชื้นเริ่มต้นไว้ว่า ความชื้นจะทำให้เชื้อรามีการเจริญในสับสเตรตที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้ดี แต่ถ้าปรับความชื้นต่ำเกินไป อาจทำให้สารอาหารและสับสเตรตไม่เป็นเนื้อเดียวกัน แต่ถ้ามีความชื้นสูงเกินไป จะเกิดช่องว่างระหว่างสับสเตรตกับเชื้อราน้อยเกินไป ซึ่งอาจส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ลดลง มีงานวิจัยของ Pothiraj *et al.*, (2006) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* และ *Rhizopus stolonifer* โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรต ทำการปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อรา *R. stolonifer* มีกิจกรรมเอนไซม์ เซลลูเลสสูงที่สุด และ Singhanian *et al.*, (2009) รายงานว่าการเจริญของเชื้อราในกระบวนการหมักในสภาพอาหารแข็ง ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม ควรอยู่ในช่วง 30-85 เปอร์เซ็นต์ โดยแตกต่างกันตามสับสเตรตที่ใช้ ซึ่งสับสเตรตทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับความชื้นระหว่างการหมัก

1.3) พีเอช

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตและมีกระบวนการชีวเคมีในสภาพที่ pH เป็นกลาง อย่างไรก็ตามยังมีจุลินทรีย์หลายชนิดมีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีในสภาพที่มีความเป็นกรดหรือด่าง จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์นั้น ดังรายงานของ Immanuel *et al.*, (2007) ได้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *A. niger* และ *A. fumigatus* โดยใช้กากมะพร้าวเป็นสับสเตรต พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดที่ pH 5 ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Oikawa *et al.*, (1994) ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* KU-1 พบว่า pH ที่เหมาะสมคือ 5.5 ผลการทดลองเหมือนกับรายงานของ Singh and Kumar (1998) ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus brevis* VS-1 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ pH 5.5 แต่ Desai *et al.*, (1988) พบว่าเมื่อ

ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Scytalidium lignicola* CD-48 ใน pH เท่ากับ 6.0 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด ผลที่ได้สอดคล้องกับ Haq *et al.*, (2005) ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T. harzianum* UM-11 และพบว่าที่ pH 6.0 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดเช่นกัน

1.4) อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญและการเกิดกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการอุณหภูมิเพื่อการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อราแต่ละชนิดก็จะต่างกันด้วย โดยในระหว่างการเจริญเติบโตจะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทลงสู่อาหาร ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น ถ้าสูงจนถึงระดับหนึ่งที่เชื้อราไม่สามารถดำเนินกิจกรรมของเซลล์ต่อไปได้ ดังนั้นในกระบวนการหมัก จึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม มีรายงานหลายฉบับได้ศึกษาผลของอุณหภูมิ เช่น Kathiresan and Manivannan (2006) ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Penicillium fellutanum* ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด รองลงมา คือ 20 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mekala *et al.*, (2008) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกระบวนการหมักในสภาพอาหารแข็งจากเชื้อรา *T. reesei* Rut C30 โดยใช้เทคนิคทางสถิติในการใช้พารามิเตอร์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส อีกทั้งในกระบวนการหมักในสภาพอาหารแข็งจะเกิดความร้อนสะสมระหว่างการหมัก ดังนั้นจำเป็นต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้เย็น เพื่อไม่เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์

1.5) แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์จะใช้ไนโตรเจนในการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก บางชนิดสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ บางชนิดสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจะต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อรานั้นๆ (Boze *et al.*, 1995 อ้างโดย ปาวิชาติ, 2549) เช่นรายงานของ Keskar (1992) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Penicillium janthinellum* พบว่าในอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน เชื้อเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้น้อย แต่เมื่อเติมแหล่งไนโตรเจน พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตช่วยให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าที่ไม่เติม และ Ali *et al.*, (1991) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *A. terreus* พบว่าแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด Jatinder *et al.*, (2006) รายงานการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Melanocarpus* sp. MTCC 3922 โดยใช้ฟางข้าวเป็นสับสเตรต และเติมยูเรีย 1.5 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งเติมสารละลายแร่ธาตุที่จำเป็น (trace element) และ Tween 20 พบว่าเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด เท่ากับ 142.4 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds)

1.5.6 การนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆมาก โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อการผลิตอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมอาหารเพื่อการผลิต หรืออุตสาหกรรมสิ่งทอ และอุตสาหกรรมเชื้อเพลิงเพื่อการผลิตไบโอเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส (Bhat and Bhat, 1997 อ้างโดย จุฑามาศ, 2553)

ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์มาผลิตเพื่อการค้า โดยมีการผลิตอย่างแพร่หลายในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งมีจำหน่ายในบริษัทยักษ์ใหญ่ทางด้านสารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์หลายแห่ง เช่น ในปี 2014 บริษัท sigma-aldrich มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *A. niger* จำหน่ายในราคา 7,570 บาทต่อ 25 กรัม จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ที่นำเข้าจากต่างประเทศมีต้นทุนสูงมาก ดังนั้นการศึกษานี้มุ่งที่จะคัดเลือกชนิดหรือสายพันธุ์ของเชื้อรา ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้ โดยไม่ต้องพึ่งพาเอนไซม์ทางการค้า



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1. สารเคมี

สารเคมี	บริษัท/ประเทศผู้ผลิต
α - Amylase heat stable	Sigma-Aldrich, USA
Acetone	Ajax Finechem, Australia
Ammonium dihydrogen phosphate	MERCK, Germany
Ammonium sulphate	Carlo Erba, Italy
Ammonium chloride	BDH, England
Ammonium nitrate	MERCK, Germany
Bovine serum albumin	Fluka, Switzerland
Calcium chloride dihydrate	BDH, England
Cetyl triethyl ammonium bromide (CTAB)	Ajax Finechem, Australia
Carboxymethyl cellulose	Sigma-Aldrich, USA
Citric acid monohydrate	BDH, England
Congo red	MERCK, Germany
Copper (II) Sulfate pentahydrate	BDH, England
3,5- dinitrosalicylic acid	Sigma-Aldrich, USA
D (+)-Glucose	Sigma-Aldrich, USA
D (+)-Lactose	MERCK, Germany
D (+)-Cellobiose	Fluka, Switzerland
Di-ammonium hydrogen phosphate	MERCK, Germany
Di-sodium hydrogen phosphate anhydrous	QRec, New Zealand

Di-potassium phosphate	Fluka, Switzerland
Potassium dihydrogen phosphate	BDH, UK
Ethylenediaminetetraacetate (EDTA)	Fluka, Switzerland
Ethylene glycol monoethylether (2-Ethoxyethanol)	Sigma-Aldrich, USA
Folin ciocalteu's reagent	Carlo Erba, Italy
Magnesium sulfate heptahydrate	BDH, England
Manganese (II) sulfate monohydrate	Carlo Erba, Italy
Peptone	Scharlau Chemie, Spain
Potato dextrose agar (PDA)	Himedia, India
Sodium carbonate	Ajax Finechem, Australia
Sodium chloride	Carlo Erba, Italy
Sodium hydroxide	Lab-scan, Ireland
Sodium lauryl sulphate	Carlo Erba, Italy
Sodium nitrate	Carlo Erba, Italy
Sodium sulphite anhydrous	Carlo Erba, Italy
Sodium tetra borate decahydrate	Sigma-Aldrich, USA
Sulfuric acid	QRec, New Zealand
Trisodium citrate dehydrate	Fluka, Switzerland
Veratryl alcohol	Sigma-Aldrich, USA
Yeast extract	Lab-scan, Ireland

2.1.2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

รุ่น

PB 1502-S

บริษัท

Mettler Toledo,

Switzerland

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

Analytic AC210S

Sartorius, Germany

เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ

J2-MC

Beckman Coulter, USA

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

Spectronic GENESYS 20

Thermo Scientific,

USA

เครื่องเขย่าสาร

Genie-2 G-560E

Bohemia, USA

เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า	Innova 4080 New Brunswick Scientific	Eppendorf, USA
เครื่องปั่น	IF 308	Imarflex, Thailand
เครื่องบด Hammer mill	Laboratory Hammer Mill	Armfield, USA
เครื่องวัด pH	713	Metrohm, Switzerland
ตู้บ่มเชื้อ		Gallenkamp, UK
ตู้อบอุณหภูมิสูง	FP 400	Binder, USA
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ	MLS-3780	Sanyo, Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	461	Büchi, Switzerland
เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน	C/STIR	Clifton Cerastir, USA
เตาหลุมให้ความร้อน	electromantle	Electro thermal, UK
เตาเผา	eurotherm 91e	Carbolite, UK
โถวัดความชื้น		
กรูชีเบิ้ล		
ชุด Reflux		
ชุดกรองสุญญากาศ		

2.2 วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร

2.2.1 ชังข้าวโพด ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทลานนาโปรดักส์จำกัด

2.2.2 กาบมะพร้าว เป็นส่วนของเปลือกชั้นกลาง (Mesocarp) เป็นชั้นที่อยู่ถัดจากเปลือกนอกของมะพร้าวเข้ามา เป็นชั้นของเส้นใย ความหนาประมาณ 4-8 เซนติเมตร (วาสนา, 2541) ชื่อจากตลาดค้าเหียง จ.เชียงใหม่

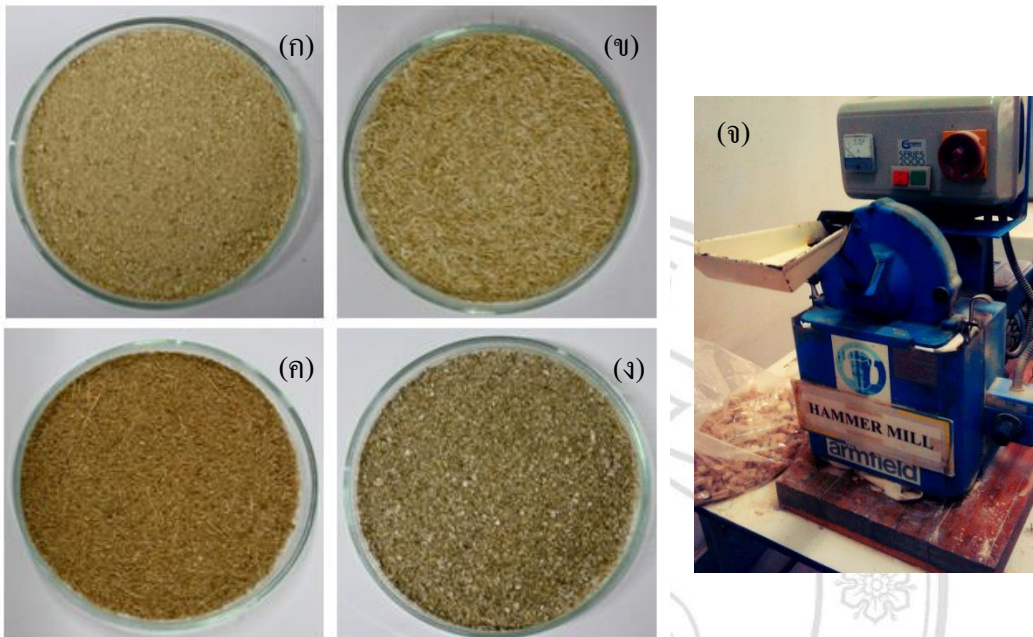
2.2.3 เปลือกข้าวโพด ได้รับความอนุเคราะห์จากแม่ค้าในตลาดสดเทศบาลเมืองเชียงราย

2.2.4 เปลือกถั่วลิสง ชื่อจากตลาดต้นพะยอม จ.เชียงใหม่

2.3 การเตรียมวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรคือชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด กาบมะพร้าว และเปลือกถั่วลิสง โดยสับตัวอย่างให้มีขนาดประมาณ 1 นิ้ว นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ตัวอย่างจะแห้งเร็ว และสะดวกต่อการบด) จนแห้ง นำไปบดด้วยเครื่อง Hammer Mill, ขนาดตะแกรง

1 มิลลิเมตร 16 เมช ทำการหาค่าประกอบทางของเส้นใย เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนินและ
ถ้ำ ก่อนนำมาใช้เป็นสับสเตรต



ภาพที่ 2.1 วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรที่ผ่านการบดด้วยเครื่อง Hammer Mill สำหรับเป็น
สับสเตรต ชั่งข้าวโพดบด (ก) เปลือกข้าวโพดบด (ข) กาบมะพร้าวบด (ค) เปลือกถั่วลิสงบด (ง) เครื่อง
Hammer Mill (จ)

2.4 เชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง

จุลินทรีย์คือเชื้อรา *P. coccineus* หรือเห็ดหิ้งแดงก้ามเหยี่ยว และ *P. sanguineus* หรือเห็ดขนแดง
รูเล็กจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) เชื้อรา *G. mastoporum*,
G. australe หรือเห็ดหลินจือมรกต และ *T. pavonia* เป็นเชื้อราไวท์รอตที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการ ได้
จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเออายุ 7 วัน

2.4.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อราไวท์รอต

1) เตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อรา สูตรพีดีเอ (Potato Dextrose Agar, PDA)
วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก นำอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่
อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเทใส่จาน

เพาะเลี้ยงเชื้อราในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อยังมีความร้อนอยู่ประมาณ 10-15 มิลลิลิตรแล้วปิดฝาจานเพาะเชื้อ จากนั้นทิ้งไว้ในตู้เย็นเชื้อจนกระทั่งอาหารในจานเลี้ยงเชื้อเป็นวุ้นแข็ง

2) นำเข็มเขี่ยเชื้อราลงไฟให้ร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่เข็มเขี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตรจุ่มลงในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ฉေးเส้นใยของเชื้อราบริเวณขอบโคโลนีซึ่งเจริญในPDAที่เจริญเติบโตเต็มที่ไปไว้ในอาหารใหม่ที่เตรียมได้ในข้อ 1) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ นำเชื้อราไปวางตรงกลางของจานเพาะเลี้ยงเชื้อราที่เตรียมไว้ นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อรามาเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 7 วัน จนเชื้อราเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยง

2.5 วิธีการทดลอง

2.5.1 การหาปริมาณความชื้นวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร

การหาปริมาณความชื้น (moisture content) ทำการวิเคราะห์ตามมาตรฐานของ AOAC (1990) โดยนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ให้ความร้อนคงที่ในตู้อบ (drying oven) ที่อุณหภูมิประมาณ 105-110 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไอน้ำระเหยออกจากตัวอย่าง ค่าความชื้นที่ได้สามารถนำมาคำนวณได้จากน้ำหนักของตัวอย่างที่ลดลง

การคำนวณ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(W_1 - W_2) \times (100)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

W_1 คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

W_2 คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

2.5.2 การหาค่าประกอบของเส้นใยวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายกรด-ด่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณ เสมิเซลลูโลสในซังข้าวโพด, เปลือกข้าวโพด, กาบมะพร้าว และเปลือกถั่วลิสง วิเคราะห์โดยวิธีของ (Van Soest *et al.*, 1991) ซึ่งทำการวิเคราะห์ผนังเซลล์ หรือ Neutral detergent fiber (NDF) และลิกโนเซลลูโลส หรือ Acid detergent fiber (ADF)



ภาพที่ 2.2 แผนภูมิแสดงการหาค่าประกอบของเส้นใยวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรด้วยวิธีของ Van Soest *et al.* (1991)

1) การวิเคราะห์หาปริมาณ Neutral detergent fiber (NDF)

ทำตามวิธีการของ Van Soest *et al.* (1991) โดยวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรที่บดละเอียด ประมาณ 0.5000- 1.0000 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมนิวทรัลดีเทจเจอร์ โซลูชัน (NDS) 100 มิลลิลิตร นำไปต้มโดยวิธีแบบ reflux ให้เดือดประมาณ 5 นาที แล้วลดความร้อนลง ต้มเป็นเวลา 60 นาที กรองโดยใช้ filter crucible ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว ล้างด้วยน้ำร้อน 2-3 ครั้ง และ acetone 2 ครั้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง หรือข้ามคืนทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักหาค่า NDF

การคำนวณ

$$\%NDF = \frac{[(W_1 - W_2) \times 100] - \% \text{ Acid insoluble ash}}{W_3}$$

เมื่อ $W_1 =$ น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่าง

$W_2 =$ น้ำหนัก crucible

$W_3 =$ น้ำหนักตัวอย่าง

%Acid insoluble ash คือ % ash ที่ได้จากขั้นตอนการเผาในการวิเคราะห์หา lignin

2) การวิเคราะห์หาปริมาณ Acid detergent fiber (ADF)

ทำตามวิธีการของ Van Soest *et al.* (1991) โดยชั่งตัวอย่างอาหารที่บดละเอียด ประมาณ 1.0000 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติม acid detergent solution 100 มิลลิลิตร นำไปต้มโดยวิธีแบบ reflux ให้เดือดประมาณ 5 นาที แล้วลดความร้อนลง ต้มนาน 60 นาที กรองโดยใช้ filter crucible ที่ทราบ น้ำหนักแน่นอนแล้ว ล้างด้วยน้ำร้อน 2-3 ครั้ง ล้างเส้นใยด้วย acetone จนกระทั่งไม่มีสีออกมา อาจใช้ แท่งแก้วเขี่ยอาหารให้กระจายออก นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง หรือข้ามคืน ทั้งให้เย็นใน โถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ ADF (%dry weight)

การคำนวณ

$$\%ADF = \frac{[(W_1 - W_2) \times 100] - \% \text{ Acid insoluble ash}}{W_3}$$

เมื่อ $W_1 =$ น้ำหนักกรูชีเบิล + น้ำหนักตัวอย่าง

$W_2 =$ น้ำหนักกรูชีเบิล

$W_3 =$ น้ำหนักตัวอย่าง

%Acid insoluble ash คือ % ash ที่ได้จากขั้นตอนการเผาในการวิเคราะห์หา lignin

การคำนวณหาปริมาณเฮมิเซลลูโลส Hemicellulose

$$= \%NDF - \%ADF$$

3) การวิเคราะห์หาปริมาณลิกนิน (Acid detergent lignin; ADL)

ตามวิธีการของ Van Soest *et al.* (1991) โดยนำตัวอย่างที่ได้จากการหาค่า ADF มาเติม กรดซัลฟิวริก 72 เปอร์เซ็นต์ ที่เข้มข้น (15-20 องศาเซลเซียส) ลงใน crucible จนท่วมโดยมีกรดสแตนเลส รองอยู่ เติมกรดทุกๆ 1 ชั่วโมง จนครบ 3 ชั่วโมง โดยใช้แท่งแก้วคน นำ crucible ไปกรองกรดออกโดยใช้น้ำ ร้อนล้างหลายๆ ครั้งจนหมดกรดนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง หรือข้ามคืนทั้งให้เย็น ใน โถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก (W_2) เเผา crucible ในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

ทั้งให้เขียนใน โทดุดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก (W_1) คำนวณหาปริมาณลิกนิน โดย % Acid detergent lignin (ADL)

การคำนวณ

$$\% \text{ Cellulose} = \frac{W_1 - W_2}{W_3} \times 100$$

เมื่อ $W_1 =$ น้ำหนักกรูชิเบิล+ น้ำหนัก ADF

$$W_2 = \text{น้ำหนักกรูชิเบิล} + \text{น้ำหนักเยื่อใยหลังการอบ}$$

$$W_3 = \text{น้ำหนักตัวอย่าง}$$

$$\% \text{ Lignin} = \frac{W_2 - W_4}{W_3} \times 100$$

เมื่อ $W_2 =$ น้ำหนักกรูชิเบิล+ น้ำหนักเยื่อใยหลังการอบ

$$W_4 = \text{น้ำหนักกรูชิเบิล} + \text{น้ำหนักเยื่อใยหลังการเผา (ignite)}$$

$$W_3 = \text{น้ำหนักตัวอย่าง}$$

2.5.3 การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรด้วยกรด-ด่าง เพื่อเตรียมเป็นสับสเตรต

1) การปรับสภาพด้วยสารละลายด่าง

นำตัวอย่างไปแช่ในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (w/v) ในสัดส่วน 20 ต่อ 1 (สารละลาย : สับสเตรต) นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้อัตราความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจะมีการแยกส่วนที่เป็นของเหลวออกและล้างตะกอนด้วยน้ำ จนน้ำล้างตะกอนมีค่าสภาพเป็นกลาง (pH 7) ผึ่งลม นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในตู้อบลมร้อน แล้วย่อยตัวอย่างแห้งที่ได้ด้วยกรดซัลฟูริกต่อไป

2) การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด

นำตัวอย่างมาปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร ในสัดส่วน 20 ต่อ 1 (สารละลาย : สับสเตรต) นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้อัตราความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกรองแยกสารละลายออกแล้วล้างด้วยน้ำ จนกระทั่งสารละลายที่ชะออกมามีสภาพเป็นกลาง (pH 7) ก่อนนำไปทดลอง

2.5.4 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งวุ้นคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC agar)

นำเชื้อราไวท์รอตที่เลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร เจาะถ่ายเชื้อไปไว้ในอาหารแข็งวุ้นคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC agar) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ตรวจสอบผลโดยเทสารละลายคองโกเรด (congo red) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้นาน 15 นาที ล้างออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ควงใสรอบโคโลนี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี โดยเชื้อที่ให้ผลการเกิดบริเวณใสจะนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารแข็งต่อไป

2.5.5 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราสายพันธุ์ต่างในสภาพอาหารแข็งบนวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรที่ผ่านการเตรียมโดยการบดและปรับสภาพด้วยสารละลายกรดต่างแล้วจำนวน 2.0 กรัมในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (ซังข้าวโพด, เปลือกข้าวโพด, กาบมะพร้าว และเปลือกถั่วลิสง) จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปรับความชื้นเริ่มต้นโดยเติมสารละลายเกลือ (mineral salt solution) ซึ่งประกอบด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 อย่างละ 0.5 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 5.5 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นร้อยละ 60, 70, 80 และ 90 ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ทำการถ่ายเชื้อ *P. coccineus*, *P. sanguineus*, *T. pavonia*, *G. australe* และ *G. mastoporum* ลงในอาหาร โดยตัดปลายเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ด้วย cork borer วางบนผิวหน้าอาหาร บ่มสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการเขย่าด้วยมือวันละ 3 ครั้ง และทำการสกัดเอนไซม์ในแต่ละชุดการทดลองที่เวลา 3, 6, 9 และ 12 วันของการหมัก โดยนำไปสกัดด้วย 0.05 โมลาร์ ซิเตรต บัฟเฟอร์ (pH 4.8) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที กรองด้วยกรูชเบิลแล้วนำสารละลายที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส คัดเลือกเชื้อราและสับสเตรตที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด 2 เชื้อและ 2 สับสเตรต สำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.5.6 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* และ *P. sanguineus*

1) ศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ช้างข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการเตรียมโดยการบดและปรับสภาพด้วยสารละลายกรด-ด่างแล้วจำนวน 2.0 กรัมในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปรับความชื้นเริ่มต้นโดยเติมสารละลายเกลือ (mineral salt solution) ซึ่งประกอบด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 อย่างละ 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นร้อยละ 70 ทำการถ่ายเชื้อเชื้อรา *P. coccineus* และ *P. sanguineus* ลงในอาหารโดยตัดปลายเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ด้วย cork borer วางบนผิวหน้าอาหาร บ่มสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการเขย่าด้วยมือวันละ 3 ครั้ง ใช้ระยะเวลาการหมักที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจากข้อ 2.5.5 นำตัวอย่างไปสกัดด้วย 0.05 โมลาร์ ซิเตรต บัฟเฟอร์ (pH 4.8) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที กรองด้วยกรูชิเบล แล้วนำสารละลายที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ ปริมาณ โปรตีนและวัดกิจกรรมเอนไซม์

2) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ช้างข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการเตรียมโดยการบดและปรับสภาพด้วยสารละลายกรด-ด่างแล้วจำนวน 2.0 กรัมในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปรับความชื้นเริ่มต้นโดยเติมสารละลายเกลือ (mineral salt solution) ซึ่งประกอบด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 อย่างละ 0.5 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ทำการถ่ายเชื้อเชื้อรา *P. coccineus* และ *P. sanguineus* ลงในอาหารโดยตัดปลายเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ด้วย cork borer วางบนผิวหน้าอาหาร บ่มสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส ทำการเขย่าด้วยมือวันละ 3 ครั้ง ใช้ระยะเวลาการหมักที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจากข้อ 2.5.5 นำตัวอย่างไปสกัดด้วย 0.05 โมลาร์ซิเตรต บัฟเฟอร์ (pH 4.8) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที กรองด้วยกรูชิเบลแล้วนำสารละลายที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีนและวัดกิจกรรมเอนไซม์

3) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ช้างข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการเตรียมโดยการบดและปรับสภาพด้วยสารละลายกรด-ด่างแล้วจำนวน 2.0 กรัมในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปรับความชื้นเริ่มต้นโดยเติมสารละลายเกลือ (mineral salt solution) ซึ่งประกอบด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 อย่างละ 0.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ NH_4NO_3 , NH_4Cl , yeast extract และ peptone อย่างละ 0.5 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ทำการถ่ายเชื้อเชื้อรา *P. coccineus* และ *P. sanguineus* ลงในอาหารโดยตัดปลายเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ด้วย cork borer วางบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มสถานะนิ่งที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ ทำการเขย่าด้วยมือวันละ 3 ครั้ง ใช้ระยะเวลาการหมักที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจากข้อ 2.4.6 นำตัวอย่างไปสกัดด้วย 0.05 โมลาร์ ซิเตรต บัฟเฟอร์ (pH 4.8) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที กรองด้วยกฐิเบิลแล้วนำสารละลายที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและวัดกิจกรรมเอนไซม์

4) ศึกษาผลของของตัวเหนียวต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ช้างข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการเตรียมโดยการบดและปรับสภาพด้วยสารละลายกรด-ด่างแล้วจำนวน 2.0 กรัมในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปรับความชื้นเริ่มต้นโดยเติมสารละลายเกลือ (mineral salt solution) ซึ่งประกอบด้วย yeast extract, KH_2PO_4 , MgSO_4 อย่างละ 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เติมตัวเหนียวโดยใช้เวราทริลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิโมลาร์ และแลคโตส ปริมาณ 0.5, 1.0, 1.50 และ 2.00 % w/w ทำการถ่ายเชื้อเชื้อรา *P. coccineus* และ *P. sanguineus* ลงในอาหารโดยตัดปลายเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ด้วย cork borer วางบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มสถานะนิ่งที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ ทำการเขย่าด้วยมือวันละ 3 ครั้ง ใช้ระยะเวลาการหมักที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจากข้อ 2.4.6 นำตัวอย่างไปสกัดด้วย 0.05 โมลาร์ ซิเตรต บัฟเฟอร์ (pH 4.8) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที กรองด้วยกฐิเบิลแล้วนำสารละลายที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและวัดกิจกรรมเอนไซม์

2.5.7 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลล์ลูโลสในชีวมวลด้วยสารละลายเอนไซม์จากเชื้อ *P. sanguineus*

ทำการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร คือ ชังข้าวโพด กาบมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการเตรียมโดยการบดและปรับสภาพด้วยสารละลายกรดต่างปริมาณ 1.5 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 0.05 โมลาร์ ซีเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อ *P. sanguineus* โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์ลูเลส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0-96 ชั่วโมง นำไปแช่ในน้ำร้อนเป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS Method

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในแต่ละชุดการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้ One Way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วย โปรแกรม Duncan's multiple rang test โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.5 for Windows

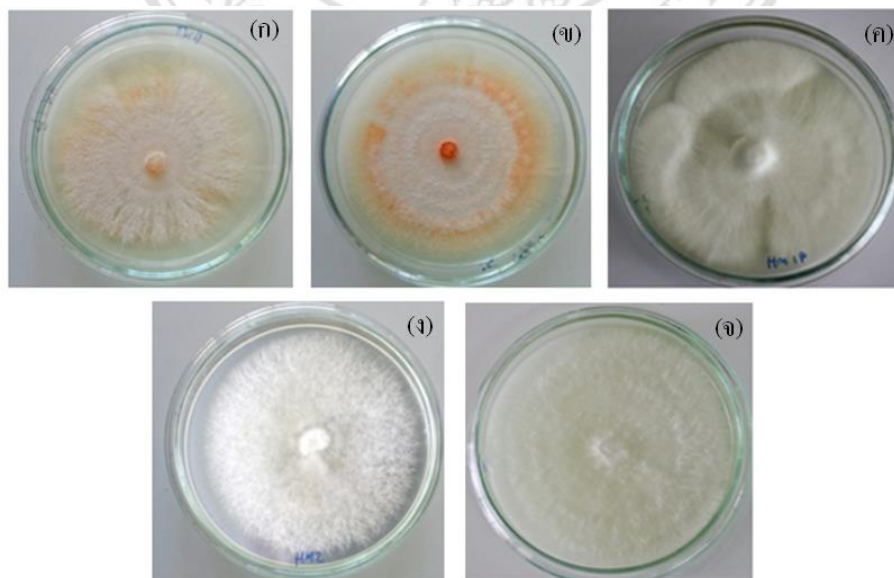
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

เมื่อนำเชื้อรา จำนวน 5 ชนิด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อดูลักษณะการเจริญเติบโตที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 3.1 พบว่าลักษณะการเจริญของเชื้อมีลักษณะบางและราบไปกับผิวหน้าอาหาร โดย *G. australe* และ *G. mastoporum* พบว่าลักษณะโคโลนี มีสีขาวถึงเหลืองซีด เส้นใยหยาบ และเกาะกลุ่มกันเป็นปุยคล้ายขนแกะ ส่วนเชื้อ *P. coccineus* และ *P. sanguineus* พบว่า ลักษณะโคโลนีมีสีขาวปนสีส้ม เส้นใยเรียบ และเกาะกลุ่มกันเป็นวงกลมต่อมาโคโลนีมีสีเหลืองเข้มปนส้ม ส่วน *T. pavonia* ลักษณะโคโลนีเส้นใยฟูสีขาว ความหนาแน่นมาก โคโลนีของเชื้อรา มีลักษณะเป็นแบบปุยฝ้ายฟู (floccose) เส้นใยหนาแน่น (compact mycelium)



ภาพที่ 3.1 การเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหาร PDA เชื้อรา *P. coccineus* (ก), *P. sanguineus* (ข), *T. pavonia* (ค), *G. australe* (ง), *G. mastoporum* (จ)

3.2 ผลการหาค่าองค์ประกอบของเส้นใยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส

การศึกษาในขั้นตอนแรกได้ทำการวิเคราะห์หาของเส้นใยวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรจำนวน 4 ชนิดที่ใช้ในการทดลองคือ ช้างข้าวโพด กาบมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสง ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพทางเคมี แต่ผ่านการเตรียมด้วยวิธีทางกายภาพโดยการบดและผ่านตะแกรงร่อนขนาด 16 เมช เพื่อให้ทราบองค์ประกอบพื้นฐานและปริมาณที่พบนำไปเป็นข้อมูลในการวิจัยต่อไป ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงตารางที่ 3.1-3.3

ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณความชื้น และค่าเส้นใย Neutral Detergent Fiber และ Acid Detergent Fiber

วัสดุเหลือทิ้งทาง อุตสาหกรรมเกษตร	% ความชื้น	%NDF	% ADF
เปลือกถั่วลิสง	16.6880 ±0.3000	82.0207 ±0.5001	59.3392 ±0.7176
กาบมะพร้าว	10.0960 ±0.0335	79.6888 ±0.3987	38.9331 ±0.8742
ช้างข้าวโพด	6.4993 ±0.0396	66.9024 ±0.4478	26.9734 ±1.0460
เปลือกข้าวโพด	12.1076 ±0.0581	69.6068 ±1.1220	31.0666 ±0.6119

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 3.2 ผลการศึกษาองค์ประกอบของเส้นใยก่อนการปรับสภาพ

วัสดุเหลือทิ้งทาง อุตสาหกรรม เกษตร	องค์ประกอบ (เปอร์เซ็นต์)			เถ้าที่ไม่ละลายใน กรด
	เฮมิเซลลูโลส	เซลลูโลส	ลิกนิน	
เปลือกถั่วลิสง	22.6815±0.9420	38.7230±0.8968	20.6162±0.660	1.2911±0.4888
กาบมะพร้าว	40.7557±0.9899	30.7691±1.1410	7.9866±0.5124	3.2486±0.3471
ช้างข้าวโพด	39.9290±1.0383	18.9867±0.6475	8.1640±0.4270	2.3483±0.6292
เปลือกข้าวโพด	38.5402±0.5108	28.0106±0.7574	3.0560±0.1484	2.2723±1.0788

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางข้างต้นเมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของเปลือกถั่วลิสงพบว่ามีค่ามากที่สุด รองลงมาคือเปลือกข้าวโพด กาบมะพร้าว และช้างข้าวโพดมีค่าน้อยสุด ซึ่งความชื้นที่วิเคราะห์ได้มีความสำคัญในการควบคุมการหมัก หากมีความชื้นมากเกินไปส่งผลต่อการหมักได้ จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใยในส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยพิจารณาค่า ADF เป็นค่าส่วนที่

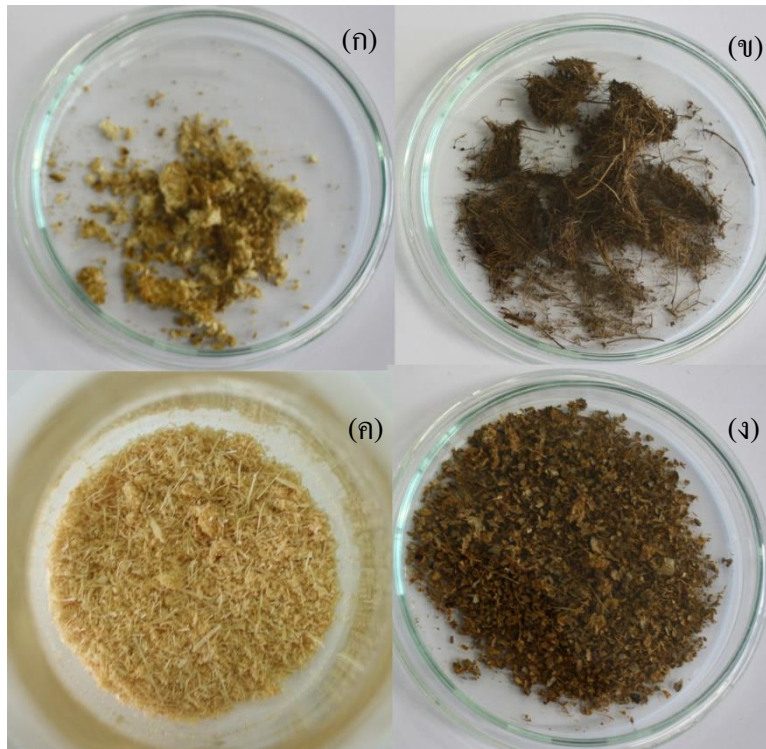
เหลือจากการนำวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรย่อยด้วย acid detergent แต่ค่านี้ไม่ได้รวมถึงค่าเฮมิเซลลูโลส จากการวิเคราะห์พบว่าเปลือกถั่วลิสงมีค่า ADF มากที่สุด รองลงมาคือ กาบมะพร้าว และเปลือกข้าวโพด ส่วนชังข้าวโพดมีค่าต่ำที่สุด ค่า NDF เป็นค่าที่วิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์พืชซึ่งรวมถึงเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน จากผลการวิเคราะห์ที่ได้เป็นไปทำนองเดียวกันกับค่า ADF โดยผลต่างระหว่างค่า NDF และ ADF คือปริมาณเฮมิเซลลูโลส จากการศึกษารายงานองค์ประกอบ ซึ่งจากการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 3.2 พบว่าเปลือกถั่วลิสงมีปริมาณเซลลูโลสมากที่สุดคือ 38.73 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก รองลงมาคือ กาบมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และชังข้าวโพดมีปริมาณเซลลูโลส 30.77, 28.00 และ 18.98 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบอื่นได้แก่ เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้าที่ไม่ละลายในกรดพบว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 4 ชนิด มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสสูงระหว่าง 22-40 เปอร์เซ็นต์ ลิกนินอยู่ระหว่าง 3-20 เปอร์เซ็นต์ และเถ้าที่ไม่ละลายในกรด 1.2-3.2 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้จะใกล้เคียงกับที่ Huda *et al.*, (2008) รายงานไว้โดยปริมาณเซลลูโลสในเปลือกข้าวโพดเท่ากับ 42 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ขณะที่ปริมาณเซลลูโลสในชังข้าวโพด Eylon *et al.*, (2011) รายงานไว้ โดยปริมาณเซลลูโลสเท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งมากกว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้คือ 18.98 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ขณะที่ กาบมะพร้าวซึ่งจะใกล้เคียงกับที่ Israel *et al.*, (2011) รายงานไว้ โดยปริมาณเซลลูโลสในกาบมะพร้าวเท่ากับ 35.99 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และปริมาณเซลลูโลสในเปลือกถั่วลิสงโดย Bharthare *et al.*, (2014) รายงานไว้โดยปริมาณเซลลูโลสในเปลือกถั่วลิสงเท่ากับ 65.5-79.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ

ที่น่าพิจารณาคือวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรเหล่านี้น่าจะใช้เป็นสับสเตรตในการเลี้ยงเชื้อราได้ดี เพราะมีปริมาณเซลลูโลสที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีลิกนินซึ่งอาจเป็นอุปสรรคในการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในการทดลองถัดไปจึงได้ทดลองนำเส้นใยผ่านการปรับสภาพทางเคมีก่อน

3.3 ผลการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรด้วยกรด-ด่าง เพื่อเตรียมเป็นสับสเตรต

หลังการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายกรดซัลฟูริก พบว่าทั้งชังข้าวโพด กาบมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสง มีลักษณะดังภาพที่ 3.2 โดยมีปริมาณเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบลดลง โดยปริมาณเซลลูโลสในชังข้าวโพด กาบมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสง ที่ผ่านการปรับสภาพมีค่าเท่ากับ 13.87, 26.29, 22.93 และ 33.82 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ นอกจากนี้วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพ มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสซึ่งหาได้จากค่า NDF-ADF และปริมาณลิกนินของวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร

ที่ผ่านการปรับสภาพที่มีปริมาณลดลงตามไปด้วย (ตารางที่ 3.3-3.4) แสดงให้เห็นว่าสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายกรดซัลฟูริก สามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจาก โครงสร้างของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้บางส่วนแสดงผลในตารางที่ 3.5



ภาพที่ 3.2 ผลการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรด้วยกรด-ด่าง เพื่อเตรียมเป็น สับสเตรต ชังข้าวโพด (ก), กาบมะพร้าว (ข), ชังข้าวโพด (ค), เปลือกถั่วลิสง (ง)

ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณความชื้น และค่าเส้นใย Neutral Detergent Fiber และ Acid Detergent Fiber ภายหลังการปรับสภาพด้วยกรด-ด่าง

วัสดุเหลือทิ้งทาง อุตสาหกรรมเกษตร	%NDF	% ADF
เปลือกถั่วลิสง	50.2533 ±2.6880	42.4677 ±1.5874
กาบมะพร้าว	50.5989 ±2.1141	31.6530 ±0.9099
ชังข้าวโพด	40.4781 ±3.3296	17.1943 ±0.1951
เปลือกข้าวโพด	19.0878 ±2.2408	25.1295 ±1.5272

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 3.4 ผลการศึกษาองค์ประกอบของเส้นใยภายหลังการปรับสภาพด้วยกรด-ด่าง

วัสดุเหลือทิ้งทาง อุตสาหกรรม เกษตร	องค์ประกอบ (เปอร์เซ็นต์)			
	เฮมิเซลลูโลส	เซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้าที่ไม่ละลาย ในกรด
เปลือกถั่วลิสง	7.7856 ± 2.5270	33.8184 ± 1.5723	8.6493 ± 1.9386	1.1424 ± 0.0631
กามมะพร้าว	18.94587 ± 2.8933	26.2888 ± 1.8117	5.3643 ± 0.9470	3.5631 ± 0.6922
ซังข้าวโพด	23.28377 ± 3.4354	13.8671 ± 0.7748	3.3272 ± 0.5976	5.9184 ± 1.5354
เปลือกข้าวโพด	11.48133 ± 2.2120	22.9372 ± 0.6713	2.1923 ± 1.2437	1.5646 ± 0.7091

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสภายหลังการปรับสภาพจะเห็นได้ว่า มีปริมาณไม่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับลิกโนเซลลูโลสชนิดอื่นและน้อยกว่ารายงานเบื้องต้นอาจเป็นเพราะเกิดการสูญเสียไปในขณะย่อยสลายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายกรดซัลฟูริก และเมื่อพิจารณาตามตารางที่ 1.1 เป็นรายงานเบื้องต้นของปริมาณเซลลูโลสในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่น ตัวอย่างเช่น ฟางข้าวสาลี มีปริมาณเซลลูโลส 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ฟางข้าวโอดมีปริมาณเซลลูโลส 49.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะเห็นได้ว่าวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรที่นำมาใช้ในการทดลองมีปริมาณเซลลูโลสน้อยกว่ามาก แต่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรที่เพาะปลูกมากภายในประเทศ จึงยังคงมีความน่าสนใจที่จะนำวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ ซึ่งปัจจุบันมีการนำวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรมาเป็นสับสเตรตของจุลินทรีย์สำหรับการผลิตเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยเซลลูโลสจากจุลินทรีย์

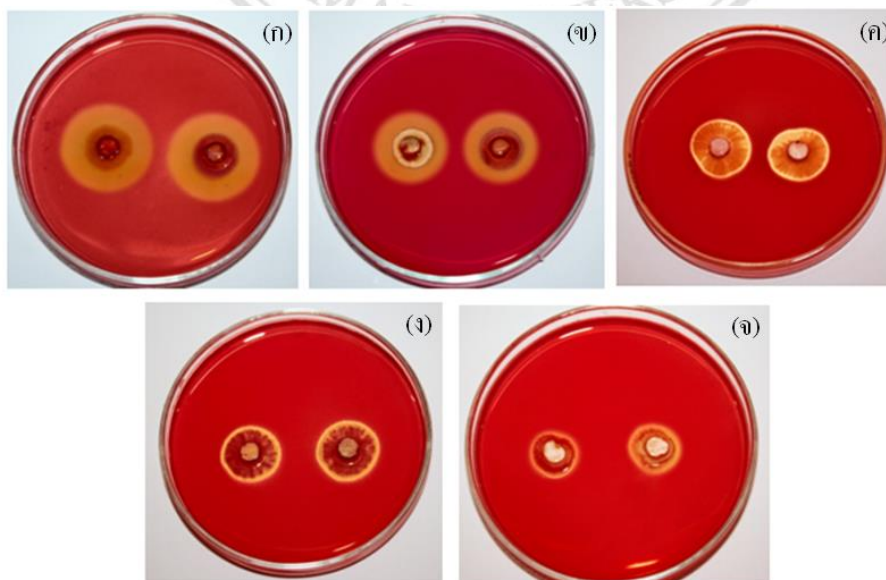
ตารางที่ 3.5 ผลการศึกษาองค์ประกอบของเส้นใยก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยกรด-ด่าง (เปอร์เซ็นต์)

วัสดุเหลือทิ้งทาง อุตสาหกรรมเกษตร	ผลการศึกษาองค์ประกอบของเส้นใยก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยกรด-ด่าง (เปอร์เซ็นต์)											
	เฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)			เซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)			ลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)			เถ้าที่ไม่ละลายในกรด (เปอร์เซ็นต์)		
	ก่อน	หลัง	ผลต่าง	ก่อน	หลัง	ผลต่าง	ก่อน	หลัง	ผลต่าง	ก่อน	หลัง	ผลต่าง
เปลือกถั่วลิสง	22.6815 ±0.9420	7.7856 ±2.5270	14.9599 ±1.7372	38.7230 ±0.8968	33.8184 ±1.5723	4.9046 ±0.6755	20.6162 ±0.660	8.6493 ±1.9386	11.9669 ±1.2786	1.2911 ±0.4888	1.1424 ±0.0631	0.1487 ±0.4249
กามมะพร้าว	40.7557 ±0.9899	18.9458 ±2.8933	21.8098 ±1.9034	30.7691 ±1.1410	26.2888 ±1.8117	4.4803 ±0.6707	7.9866 ±0.5124	5.3643 ±0.9470	2.6233 ±0.4346	3.2486 ±0.3471	3.5631 ±0.6922	0.3145 ±0.3451
ซังข้าวโพด	39.9290 ±1.0383	23.2837 ±3.4354	16.6453 ±2.3971	18.9867 ±0.6475	13.8671 ±0.7748	5.1196 ±0.1273	8.1640 ±0.4270	3.3272 ±0.5976	4.8369 ±0.1705	2.3483 ±0.6292	5.9184 ±1.5354	3.5910 ±0.8750
เปลือกข้าวโพด	38.5402 ±0.5108	11.4813 ±2.2120	27.0589 ±1.7012	28.0106 ±0.7574	22.9372 ±0.6713	5.0734 ±0.0861	3.0560 ±0.1484	2.1923 ±1.2437	0.8673 ±1.0953	2.2723 ±1.0788	1.5646 ±0.7091	0.6277 ±0.5346

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4 ผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง

การทดลองนี้เป็นการศึกษาความสามารถของเชื้อราในการย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสบนอาหารแข็งวุ้นคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC agar) โดยจะมีโซนใสเกิดขึ้นบนอาหาร ซึ่งเกิดจากเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยสลายพันธะเบต้า-(1,4)-ไกลโคซิดิกของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสให้มีโมเลกุลเล็กลง เมื่อใช้สีคองโกเรด (congo red) เทบนอาหาร สีคองโกเรดไม่สามารถไปจับกับโมเลกุลที่ถูกย่อยให้มีขนาดเล็ก จึงทำให้เห็นเป็นโซนใส ส่วนบริเวณที่เอนไซม์ไม่สามารถย่อยพันธะเบต้า-(1,4)-ไกลโคซิดิกของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสได้จะเห็นเป็นสีส้มแดงของสีคองโกเรดที่จับอยู่กับโมเลกุลของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Saczi *et al.*, 1986 ; Teather and Wood 1982 อ้าง โดย จุฑามาศ, 2553) ได้รายงานว่าสีคองโกเรดสามารถจับกับโพลีแซคคาไรด์ที่มีพันธะเบต้า-(1,4)-ดี-กลูโคไพราโนซิด และพันธะเบต้า-(1,4)-ดี-กลูแคน ซึ่งในโครงสร้างของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเชื่อมกันด้วยพันธะเบต้า-(1,4)-ดี-กลูโคไพราโนซิด ทำให้เมื่อใช้สีคองโกเรด ส่วนเกินด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ จะเห็นโซนใสบริเวณที่เอนไซม์ย่อยพันธะเบต้า-(1,4)-ดี-กลูโคไพราโนซิด และโซนสีแดงที่เอนไซม์ไม่สามารถย่อยพันธะในโมเลกุลคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสได้ จากการทดลองพบว่าเชื้อราที่สามารถย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสซึ่งให้ความกว้างของโซนใสตั้งแต่ 10 มิลลิเมตร ขึ้นไป จำนวน 2 ชนิดได้แก่ *P. coccineus* และ *P. sanguineus* โดยมี *P. coccineus* ที่สามารถย่อยสลายได้ดี (ภาพที่ 3.3) และให้เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสสูงสุดเท่ากับ 16 และ 15 มิลลิเมตร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.6



ภาพที่ 3.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราโดยวิธีคองโกเรด *P. coccineus* (ก), *P. sanguineus* (ข), *T. pavonia* (ค), *G. australe* (ง), *G. mastoporum* (จ)

ตารางที่ 3.6 แสดงความกว้างของโซนไฮรอปโคโลนีของเชื้อราบนจานอาหารแข็งวุ้นคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC agar)

เชื้อรา	ความกว้างของโซนไฮรอปโคโลนี (มิลลิเมตร)
<i>P. coccineus</i>	28
<i>P. sanguineus</i>	26
<i>T. pavonia</i>	22
<i>G. australe</i>	22
<i>G. mastoporum</i>	18

หมายเหตุ ความกว้างของโซนไฮรอปโคโลนี (มิลลิเมตร) = เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่มีการย่อยสลาย

เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการคัดกรองเบื้องต้นบนจานอาหารแข็งวุ้นคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC agar) ที่มีความสะดวกรวดเร็ว แต่ไม่สามารถระบุค่ากิจกรรมได้ จึงได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ภายใต้การหมักสภาพอาหารแข็งในการทดลองต่อไป เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีความเหมาะสมที่สุด และให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด

3.5 การวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อคัดกรองเชื้อราและวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรที่เหมาะสมสำหรับการหมัก

การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราไวท้อทสายพันธุ์ต่างๆ ทั้ง 5 ชนิด ในการเลี้ยงบนวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรทั้ง 4 ชนิด เป็นการทดลองเพื่อคัดเลือกเชื้อที่เจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรได้ดี โดยวัดจากค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้

ในการทดลองได้ชั่งวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรทั้ง 4 ชนิดคือ ชังข้าวโพด กาบมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสง ที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นด้วยสารละลายกรด-ด่างชนิดละ 2.0 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร อย่างละ 5 ใบ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เมื่ออาหารเย็นลงทำการถ่ายเชื้อ *P. coccineus*, *P. sanguineus*, *T. pavonia*, *G. australe* และ *G. mastoporum* ลงในแต่ละสับสเตรตที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับความชื้นเริ่มต้นโดยเติมสารละลายเกลือ (mineral salt solution) pH เริ่มต้น

5.5 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นร้อยละ 60, 70, 80 และ 90 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการเขย่าด้วยมือวันละ 3 ครั้ง และทำการสกัดเอนไซม์ในแต่ละเชื้อเวลา 0, 3, 6, 9 และ 12 วันของการหมัก

ภาพที่ 3.4 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. coccineus* โดยใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต จากตารางที่ 3.7 และภาพที่ 3.4-3.6 แสดงความสามารถของเชื้อ *P. coccineus* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่ความชื้นร้อยละ 70 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้มีค่าของกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และเซลโลไบโอสเนสสูงที่สุดในวันที่ 9 ของการหมักเท่ากับ 4.188 ± 0.066 , 12.039 ± 0.161 และ 1.173 ± 0.040 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ



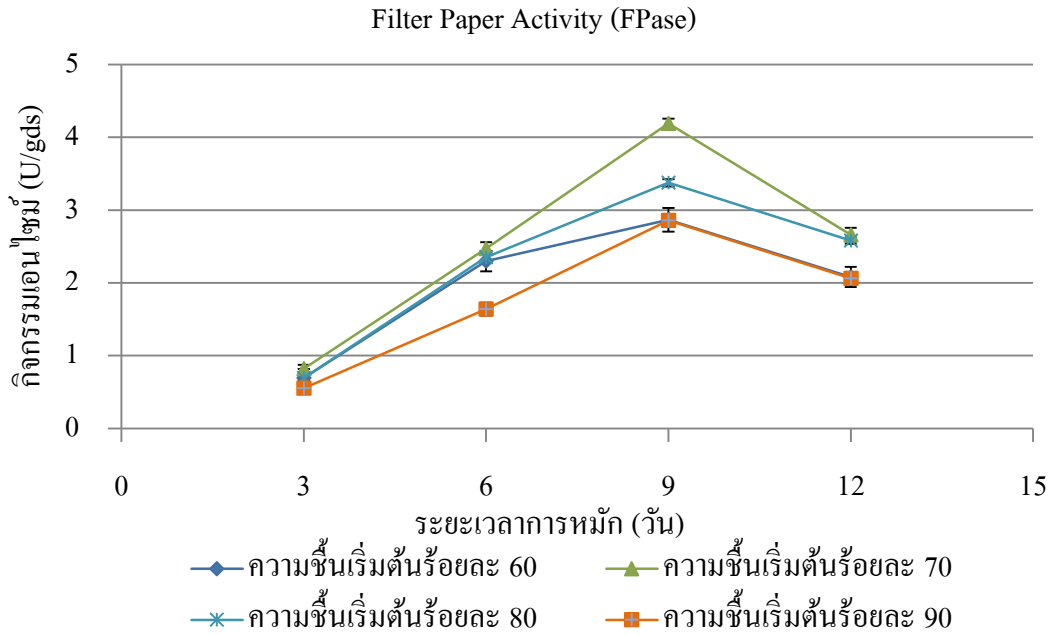
ภาพที่ 3.4 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. coccineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

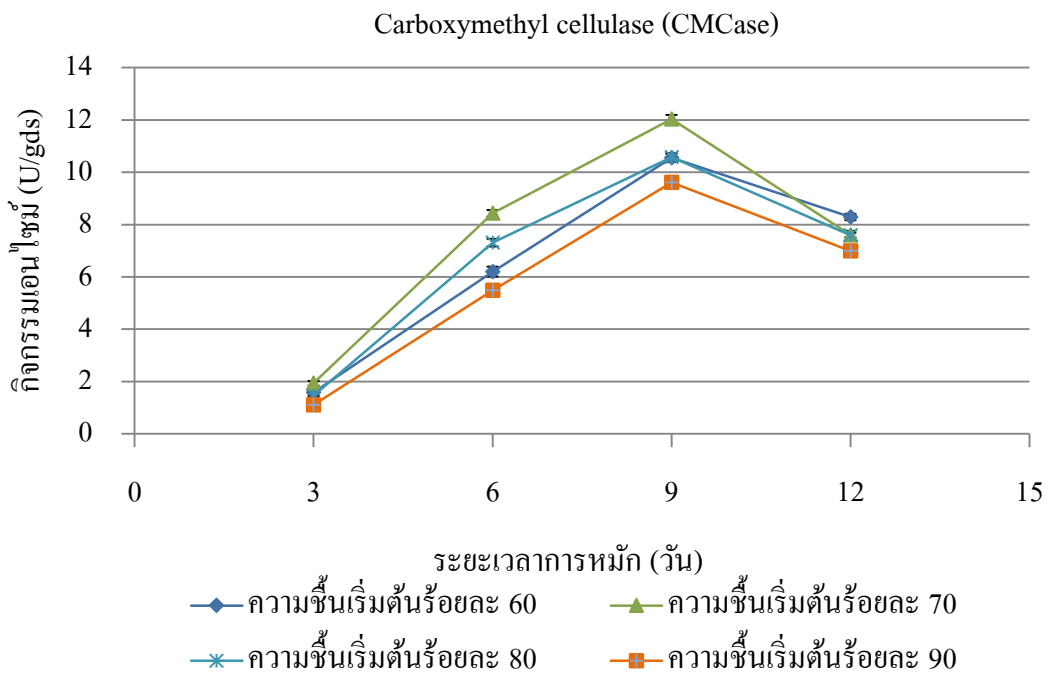
ตารางที่ 3.7 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรตและมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.695±0.120 ^c	1.586±0.140 ^d	0.212±0.054 ^d
	วันที่ 6	2.297±0.141 ^{ab}	6.200±0.186 ^c	0.650±0.032 ^c
	วันที่ 9	2.867±0.162 ^a	10.554±0.163 ^a	1.062±0.047 ^b
	วันที่ 12	2.081±0.137 ^b	8.285±0.122 ^b	1.110±0.038 ^b
70%	วันที่ 3	0.822±0.052 ^c	1.935±0.092 ^d	0.255±0.021 ^d
	วันที่ 6	2.472±0.086 ^b	8.433±0.126 ^c	0.573±0.031 ^c
	วันที่ 9	4.188±0.066 ^a	12.039±0.161 ^a	1.173±0.040 ^a
	วันที่ 12	2.661±0.095 ^b	7.604±0.088 ^b	0.996±0.029 ^b
80%	วันที่ 3	0.692±0.033 ^c	1.458±0.113 ^d	0.144±0.021 ^d
	วันที่ 6	2.352±0.043 ^b	7.310±0.148 ^c	0.537±0.035 ^c
	วันที่ 9	3.375±0.051 ^a	10.578±0.156 ^b	0.827±0.033 ^a
	วันที่ 12	2.580±0.043 ^b	7.586±0.176 ^c	0.650±0.036 ^b
90%	วันที่ 3	0.552±0.038 ^c	1.104±0.140 ^d	0.129±0.021 ^d
	วันที่ 6	1.638±0.088 ^b	5.487±0.097 ^c	0.34±0.036 ^c
	วันที่ 9	2.859±0.042 ^a	9.615±0.104 ^a	0.747±0.034 ^a
	วันที่ 12	2.060±0.057 ^b	6.987±0.127 ^b	0.558±0.032 ^b

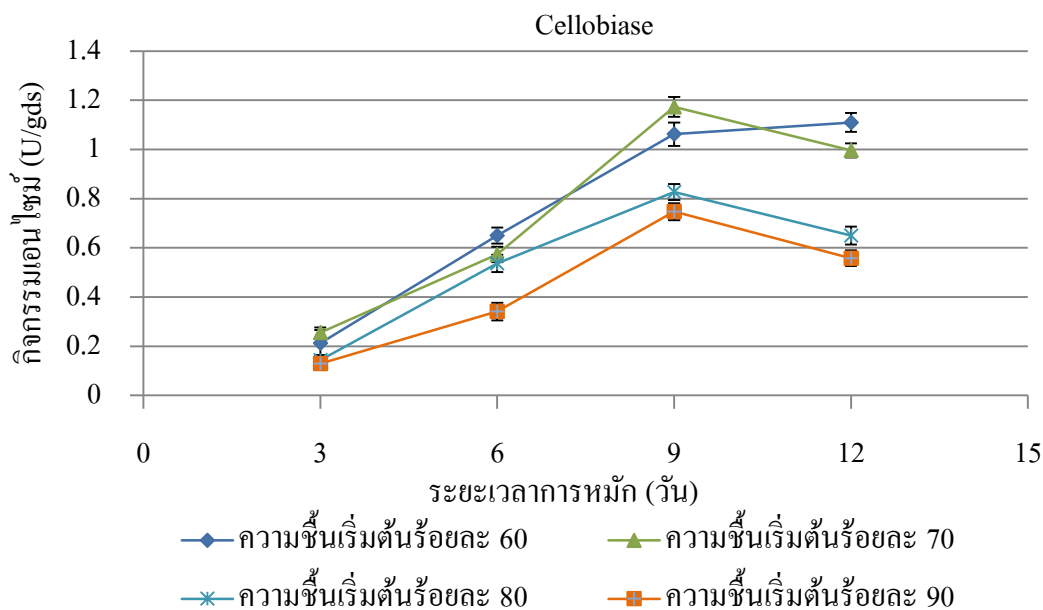
หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจัดกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)



ภาพที่ 3.5 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. coccineus* เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 3.6 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. coccineus* เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 3.7 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. coccineus* เมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต

ภาพที่ 3.8 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. coccineus* โดยใช้ก้ามมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต จากตารางที่ 3.8 และภาพที่ 3.9-3.11 แสดงความสามารถของเชื้อ *P. coccineus* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่ความชื้นร้อยละ 90 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้มีค่าของกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 9 ของการหมักเท่ากับ 1.013 ± 0.073 , 1.083 ± 0.108 และ 0.199 ± 0.012 หน่วยต่อกรัม สับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ

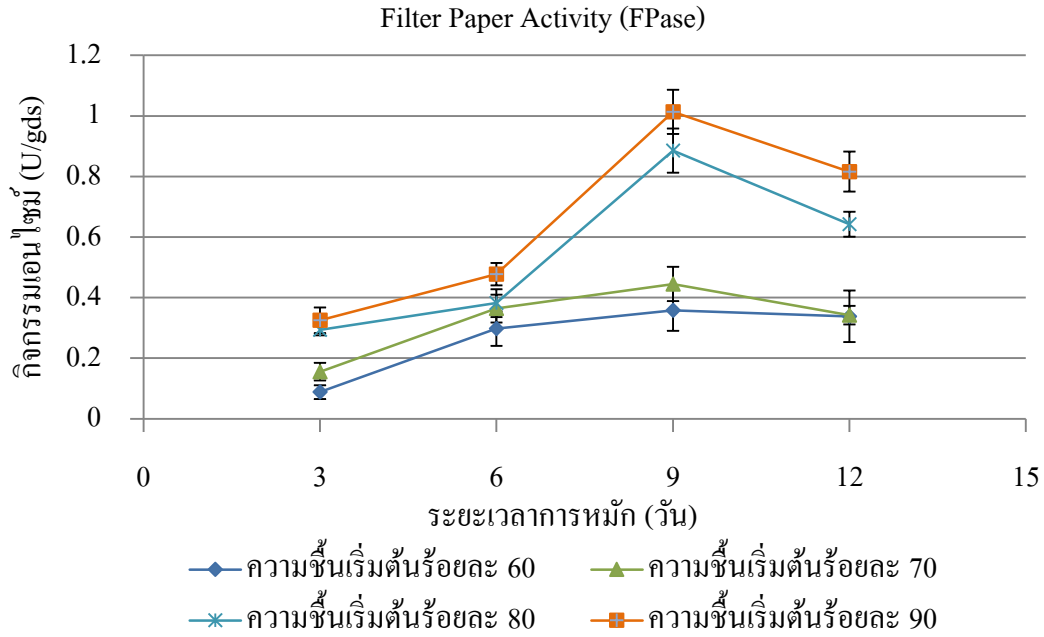


ภาพที่ 3.8 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. coccineus* โดยใช้ก้ามมะพร้าวเป็นสับสเตรต

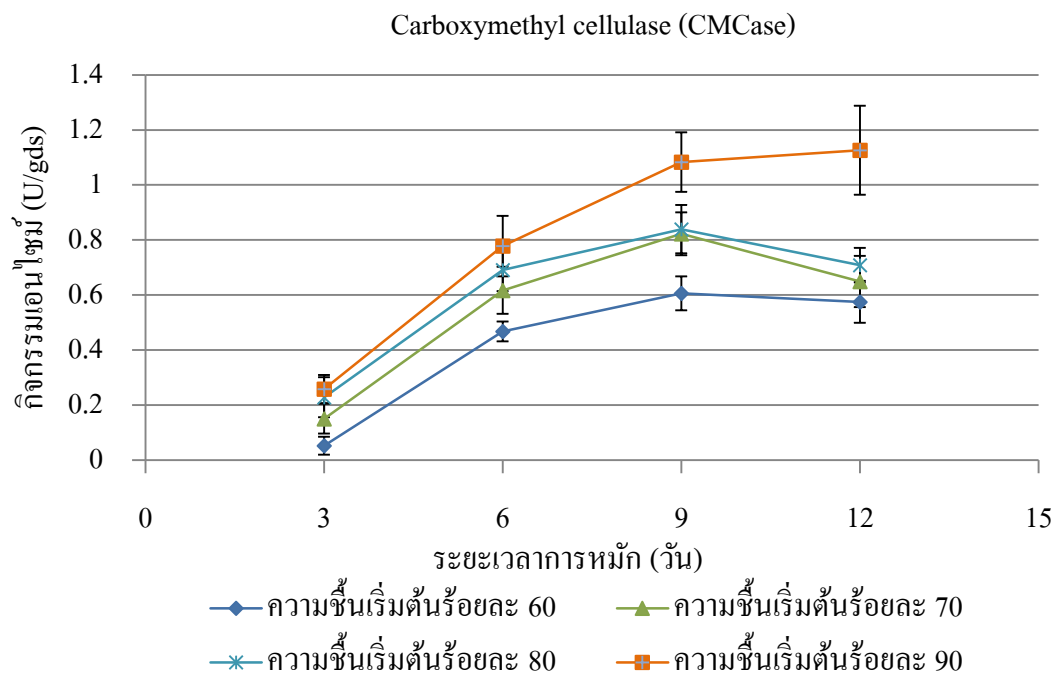
ตารางที่ 3.8 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้
 กากมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase(U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase(U/gds)
60%	วันที่ 3	0.088±0.023 ^d	0.052±0.033 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.298±0.057 ^c	0.467±0.036 ^c	0.050±0.011 ^c
	วันที่ 9	0.358±0.068 ^b	0.606±0.062 ^a	0.088±0.008 ^a
	วันที่ 12	0.338±0.085 ^c	0.575±0.076 ^b	0.060±0.007 ^b
70%	วันที่ 3	0.155±0.029 ^d	0.150±0.054 ^d	0.038±0.007 ^d
	วันที่ 6	0.364±0.046 ^b	0.617±0.086 ^c	0.082±0.010 ^c
	วันที่ 9	0.445±0.057 ^a	0.823±0.078 ^a	0.118±0.014 ^a
	วันที่ 12	0.342±0.031 ^c	0.649±0.093 ^b	0.088±0.015 ^b
80%	วันที่ 3	0.293±0.018 ^d	0.228±0.073 ^d	0.063±0.015 ^d
	วันที่ 6	0.382±0.046 ^b	0.691±0.077 ^c	0.091±0.010 ^c
	วันที่ 9	0.885±0.073 ^a	0.839±0.088 ^a	0.158±0.028 ^a
	วันที่ 12	0.642±0.041 ^c	0.708±0.063 ^b	0.106±0.011 ^b
90%	วันที่ 3	0.325±0.042 ^d	0.258±0.051 ^d	0.083±0.006 ^d
	วันที่ 6	0.477±0.037 ^b	0.778±0.110 ^c	0.122±0.014 ^c
	วันที่ 9	1.013±0.073 ^a	1.083±0.108 ^a	0.199±0.012 ^a
	วันที่ 12	0.816±0.066 ^c	1.126±0.162 ^b	0.146±0.011 ^b

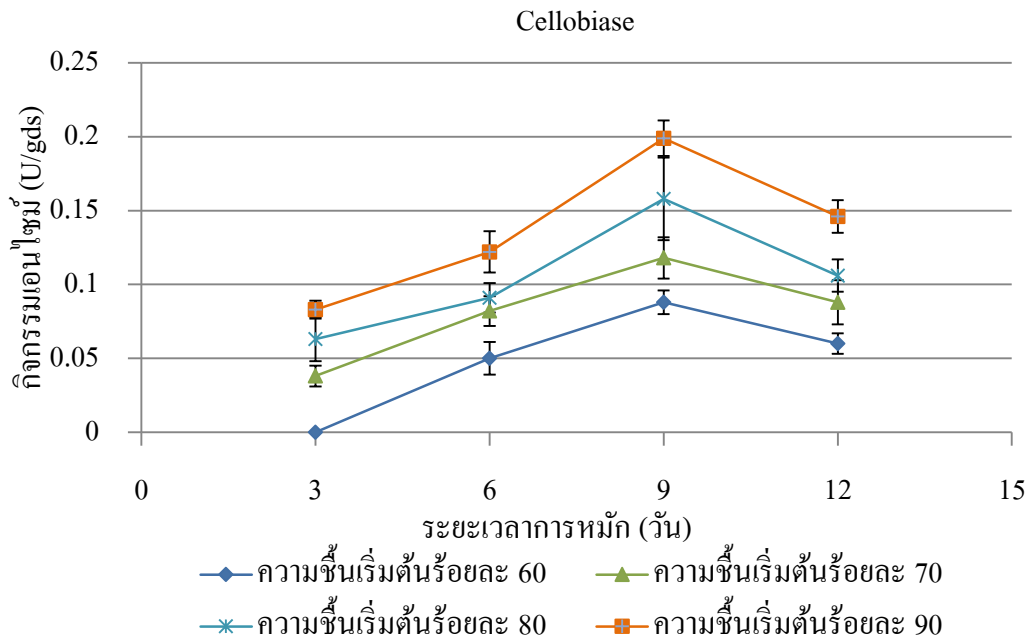
หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจัดกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)



ภาพที่ 3.9 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจาก เชื้อรา *P. coccineus* เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต

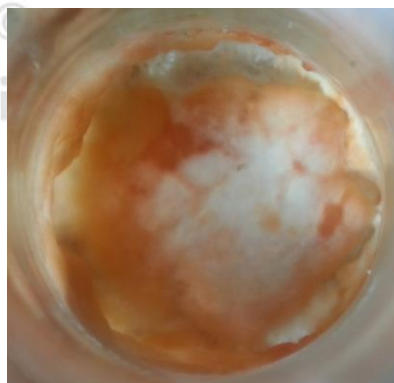


ภาพที่ 3.10 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. coccineus* เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 3.11 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. coccineus* เมื่อใช้การหมักที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต

ภาพที่ 3.12 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. coccineus* โดยใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต จากตารางที่ 3.9 และภาพที่ 3.13-3.15 แสดงความสามารถของเชื้อ *P. coccineus* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่ความชื้นร้อยละ 80 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้มีค่าของกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 9 ของการหมักเท่ากับ 2.894 ± 0.133 , 8.118 ± 0.156 และ 0.875 ± 0.032 ยูนิตต่อกรัม สับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ

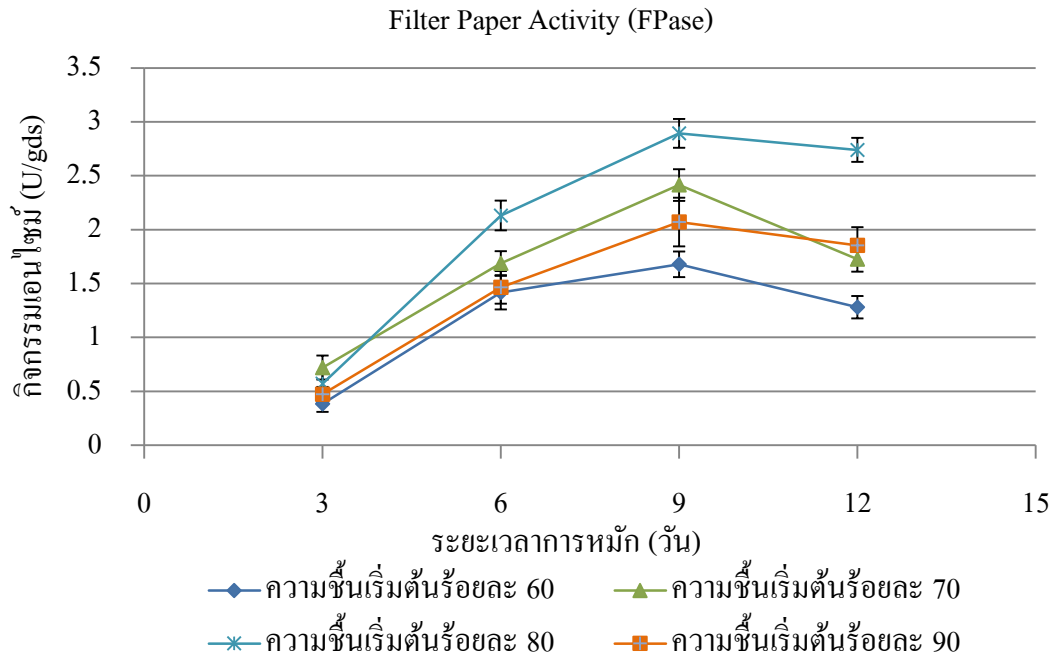


ภาพที่ 3.12 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. coccineus* โดยใช้เปลือกข้าวโพดเป็นสับสเตรต

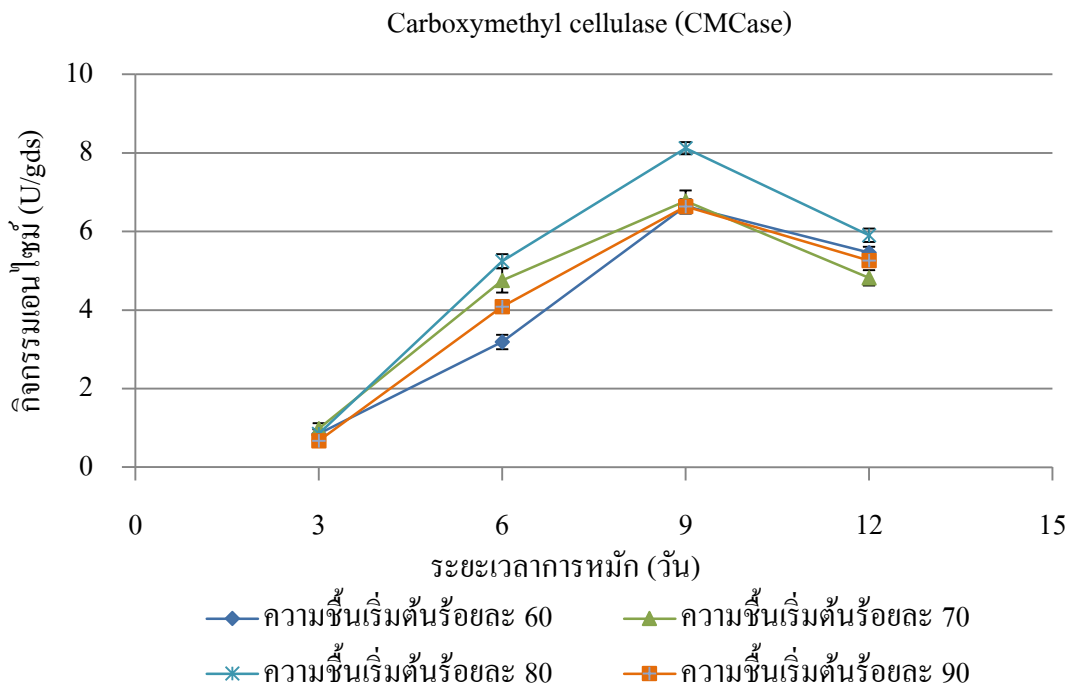
ตารางที่ 3.9 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase(U/gds)
60%	วันที่ 3	0.383±0.075 ^d	0.851±0.114 ^d	0.195±0.028 ^d
	วันที่ 6	1.418±0.158 ^c	3.188±0.183 ^c	0.433±0.033 ^c
	วันที่ 9	1.679±0.119 ^b	6.640±0.176 ^a	0.650±0.034 ^b
	วันที่ 12	1.280±0.104 ^c	5.463±0.150 ^b	0.430±0.047 ^c
70%	วันที่ 3	0.720±0.111 ^d	0.981±0.136 ^d	0.198±0.029 ^d
	วันที่ 6	1.686±0.114 ^b	4.754±0.311 ^c	0.539±0.031 ^c
	วันที่ 9	2.414±0.148 ^a	6.778±0.269 ^a	0.759±0.032 ^b
	วันที่ 12	1.726±0.117 ^c	4.820±0.196 ^b	0.503±0.031 ^c
80%	วันที่ 3	0.571±0.103 ^d	0.853±0.116 ^d	0.228±0.044 ^d
	วันที่ 6	2.131±0.137 ^b	5.245±0.180 ^c	0.521±0.045 ^c
	วันที่ 9	2.894±0.133 ^a	8.118±0.156 ^a	0.875±0.032 ^b
	วันที่ 12	2.740±0.112 ^c	5.904±0.172 ^b	0.560±0.050 ^c
90%	วันที่ 3	0.471±0.070 ^d	0.674±0.084 ^d	0.101±0.020 ^d
	วันที่ 6	1.465±0.152 ^b	4.089±0.120 ^c	0.210±0.034 ^c
	วันที่ 9	2.070±0.225 ^a	6.633±0.173 ^a	0.423±0.034 ^b
	วันที่ 12	1.854±0.169 ^c	5.260±0.161 ^b	0.350±0.027 ^c

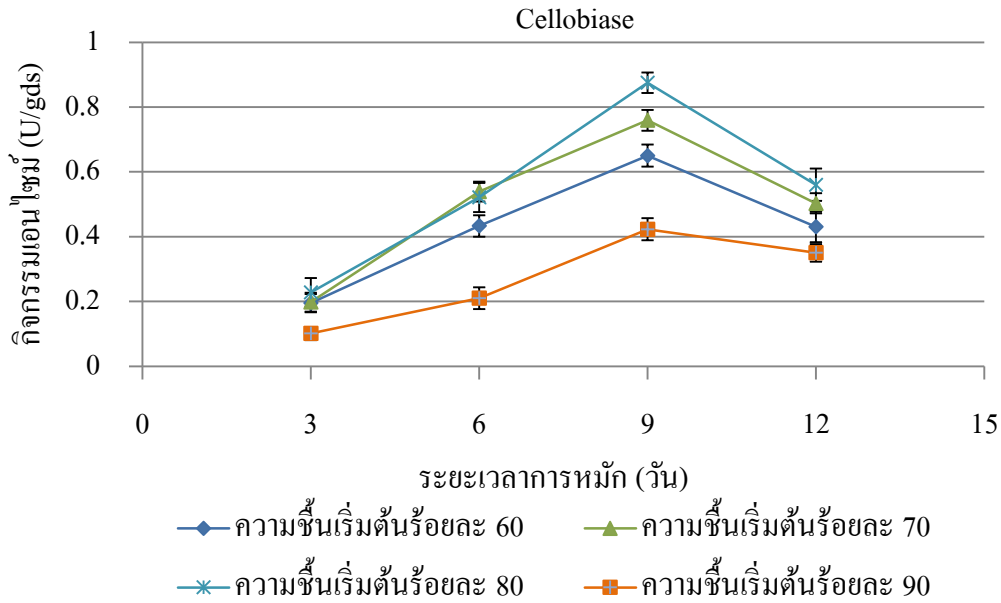
หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจัดกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)



ภาพที่ 3.13 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. coccineus* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 3.14 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. coccineus* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 3.15 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. coccineus* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต

ภาพที่ 3.16 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. coccineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต จากตารางที่ 3.10 และภาพที่ 3.17-3.19 แสดงความสามารถของเชื้อ *P. coccineus* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่ความชื้นร้อยละ 70 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้มีค่าของกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 9 ของการหมักเท่ากับ 4.239 ± 0.138 , 11.232 ± 0.299 และ 0.732 ± 0.061 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ

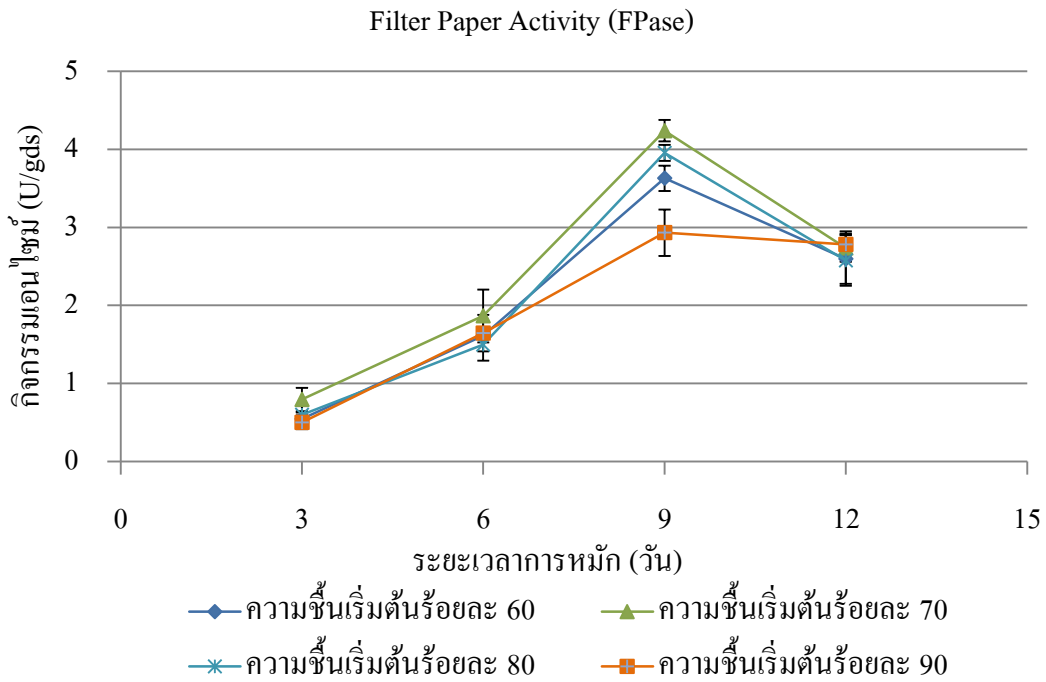


ภาพที่ 3.16 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. coccineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต

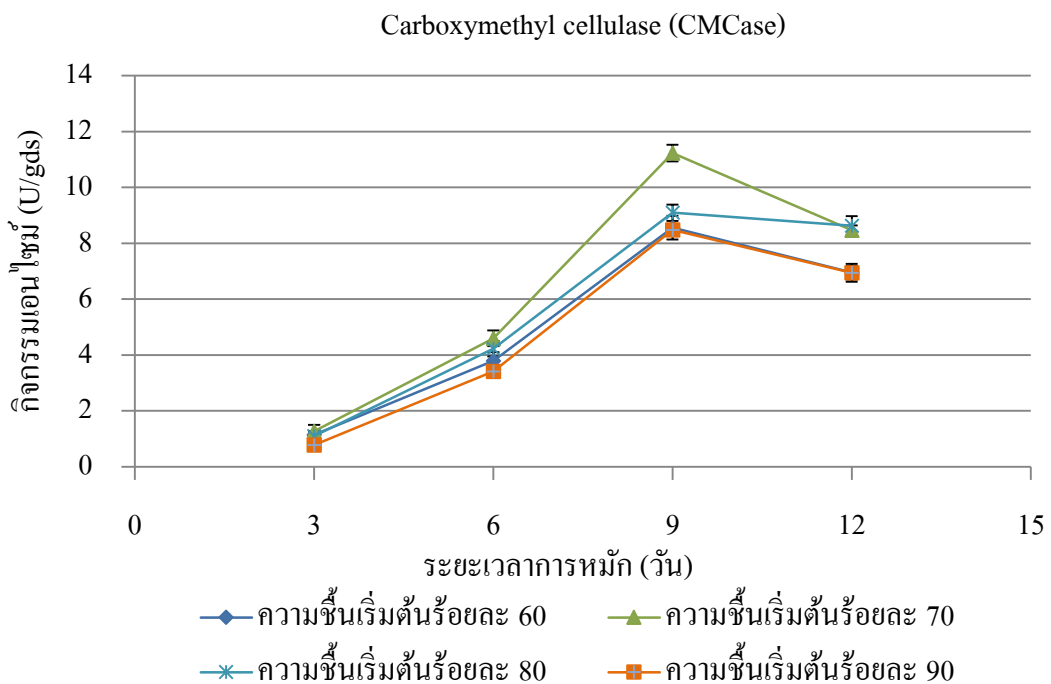
ตารางที่ 3.10 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase(U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase(U/gds)
60%	วันที่ 3	0.545±0.081 ^d	1.137±0.140 ^d	0.317±0.040 ^d
	วันที่ 6	1.613±0.145 ^c	3.795±0.307 ^c	0.488±0.038 ^c
	วันที่ 9	3.629±0.161 ^a	8.560±0.419 ^a	0.730±0.051 ^b
	วันที่ 12	2.598±0.321 ^b	6.952±0.246 ^b	0.489±0.041 ^c
70%	วันที่ 3	0.793±0.149 ^d	1.265±0.235 ^d	0.396±0.038 ^d
	วันที่ 6	1.864±0.337 ^c	4.598±0.280 ^c	0.587±0.029 ^c
	วันที่ 9	4.239±0.138 ^a	11.232±0.299 ^a	0.732±0.061 ^b
	วันที่ 12	2.734±0.174 ^b	8.466±0.179 ^b	0.641±0.038 ^c
80%	วันที่ 3	0.599±0.109 ^d	1.094±0.160 ^d	0.252±0.034 ^d
	วันที่ 6	1.495±0.203 ^c	4.226±0.274 ^c	0.359±0.046 ^c
	วันที่ 9	3.955±0.101 ^a	9.096±0.294 ^a	0.458±0.040 ^b
	วันที่ 12	2.575±0.325 ^b	8.631±0.342 ^b	0.359±0.057 ^c
90%	วันที่ 3	0.500±0.088 ^d	0.770±0.083 ^d	0.173±0.020 ^d
	วันที่ 6	1.644±0.235 ^c	3.411±0.082 ^c	0.263±0.042 ^c
	วันที่ 9	2.931±0.297 ^a	8.484±0.175 ^a	0.355±0.062 ^b
	วันที่ 12	2.780±0.168 ^b	6.943±0.322 ^b	0.162±0.026 ^c

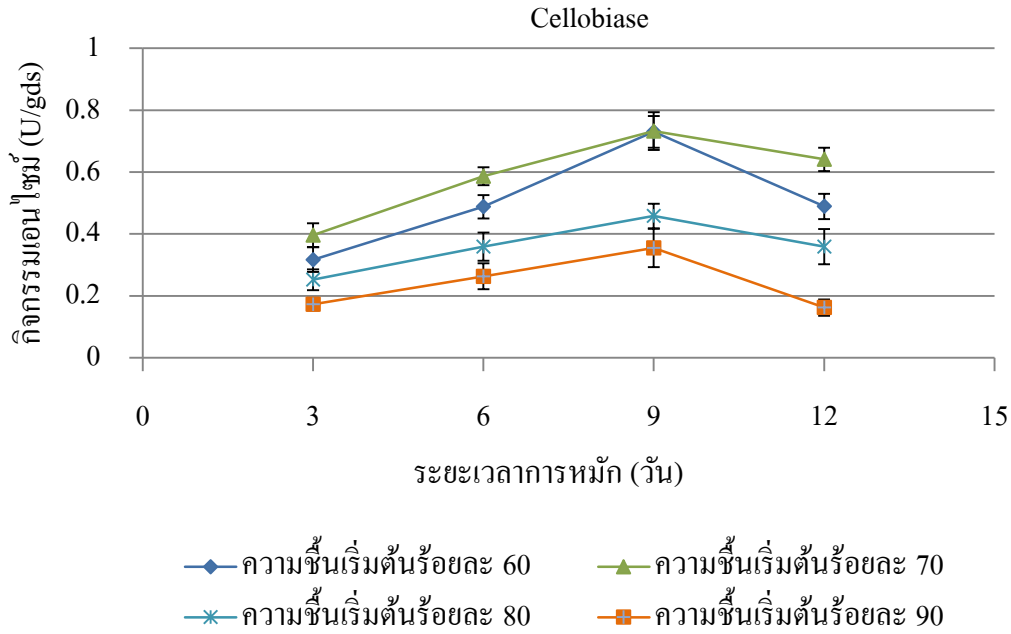
หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจับกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)



ภาพที่ 3.17 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. coccineus* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 3.18 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. coccineus* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 3.19 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. coccineus* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต

ภาพที่ 3.20 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. sanguineus* โดยใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต จากตารางที่ 3.11 และภาพที่ 3.21-3.23 แสดงความสามารถของเชื้อ *P. sanguineus* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่ความชื้นร้อยละ 70 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้มีค่าของกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 9 ของการหมักเท่ากับ 6.353 ± 0.433 , 14.684 ± 0.396 และ 1.442 ± 0.182 ยูนิต์ต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright All reserved University

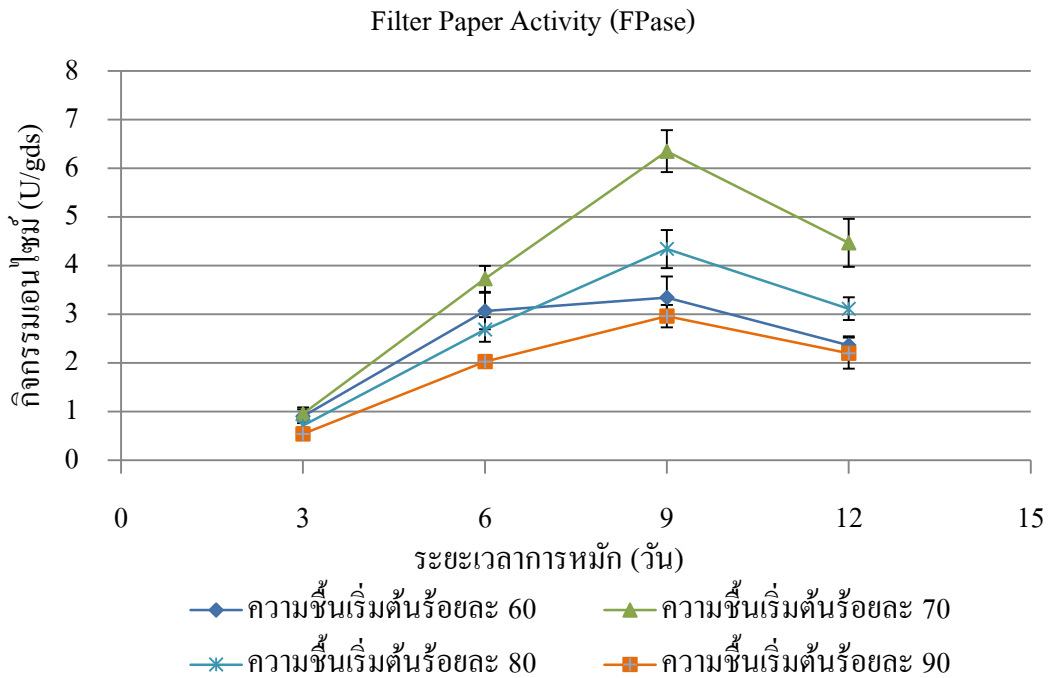


ภาพที่ 3.20 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. sanguineus* โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นสับสเตรต

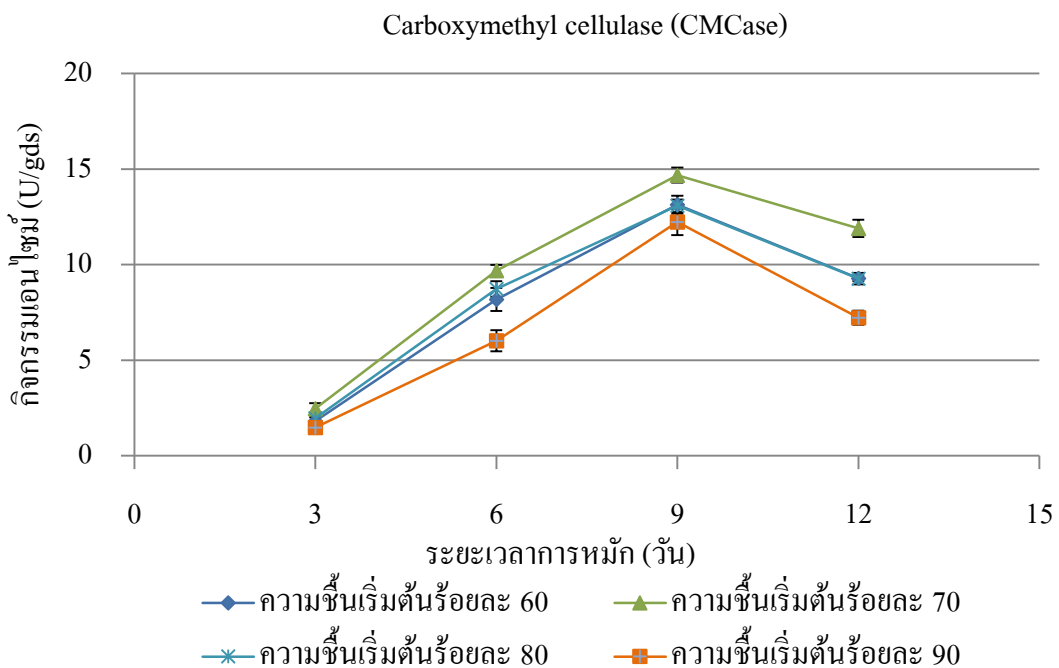
ตารางที่ 3.11 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ ใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase(U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase(U/gds)
60%	วันที่ 3	0.903±0.139 ^d	1.803±0.210 ^d	0.242±0.079 ^d
	วันที่ 6	3.063±0.375 ^c	8.174±0.603 ^c	0.777±0.170 ^c
	วันที่ 9	3.339±0.435 ^b	13.137±0.475 ^a	1.012±0.100 ^b
	วันที่ 12	2.364±0.179 ^c	9.282±0.155 ^b	0.620±0.103 ^c
70%	วันที่ 3	0.952±0.492 ^d	2.464±0.290 ^d	0.224±0.097 ^d
	วันที่ 6	3.729±0.266 ^c	9.685±0.297 ^c	0.676±0.125 ^c
	วันที่ 9	6.353±0.433 ^b	14.684±0.396 ^a	1.442±0.182 ^b
	วันที่ 12	4.468±0.132 ^c	11.893±0.455 ^b	0.852±0.090 ^c
80%	วันที่ 3	0.712±0.122 ^d	1.965±0.231 ^d	0.219±0.111 ^d
	วันที่ 6	2.686±0.254 ^c	8.724±0.414 ^c	0.635±0.174 ^c
	วันที่ 9	4.340±0.390 ^a	13.083±0.327 ^a	0.998±0.107 ^b
	วันที่ 12	3.115±0.231 ^b	9.259±0.303 ^c	0.749±0.176 ^c
90%	วันที่ 3	0.539±0.129 ^d	1.479±0.159 ^d	0.243±0.117 ^d
	วันที่ 6	2.025±0.130 ^c	6.020±0.554 ^c	0.361±0.073 ^c
	วันที่ 9	2.961±0.233 ^b	12.227±0.679 ^a	0.672±0.186 ^b
	วันที่ 12	2.200±0.317 ^b	7.219±0.372 ^b	0.712±0.174 ^d

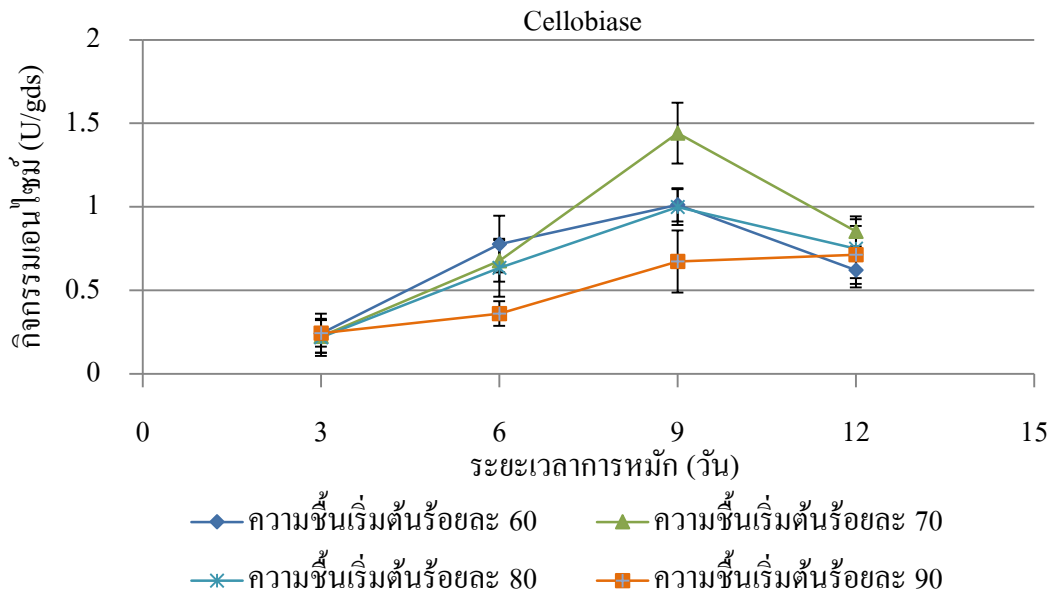
หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจัดกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)



ภาพที่ 3.21 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. sanguineus* เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 3.22 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. sanguineus* เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 3.23 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. sanguineus* เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต

ภาพที่ 3.24 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. sanguineus* โดยใช้ก้ามมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต จากตารางที่ 3.12 และภาพที่ 3.25-3.27 แสดงความสามารถของเชื้อ *P. sanguineus* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่ความชื้นร้อยละ 90 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้มีค่าของกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 9 ของการหมักเท่ากับ 0.409 ± 0.050 , 1.219 ± 0.055 และ 0.288 ± 0.013 ยูนิต์ต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ

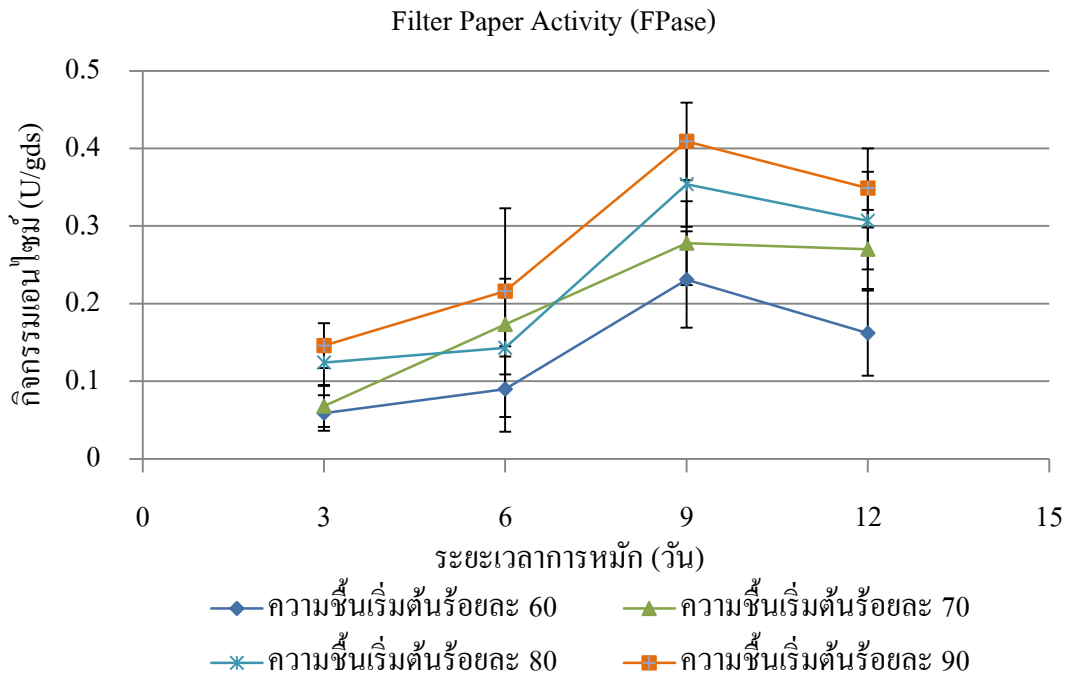


ภาพที่ 3.24 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. sanguineus* โดยใช้ก้ามมะพร้าวเป็นสับสเตรต

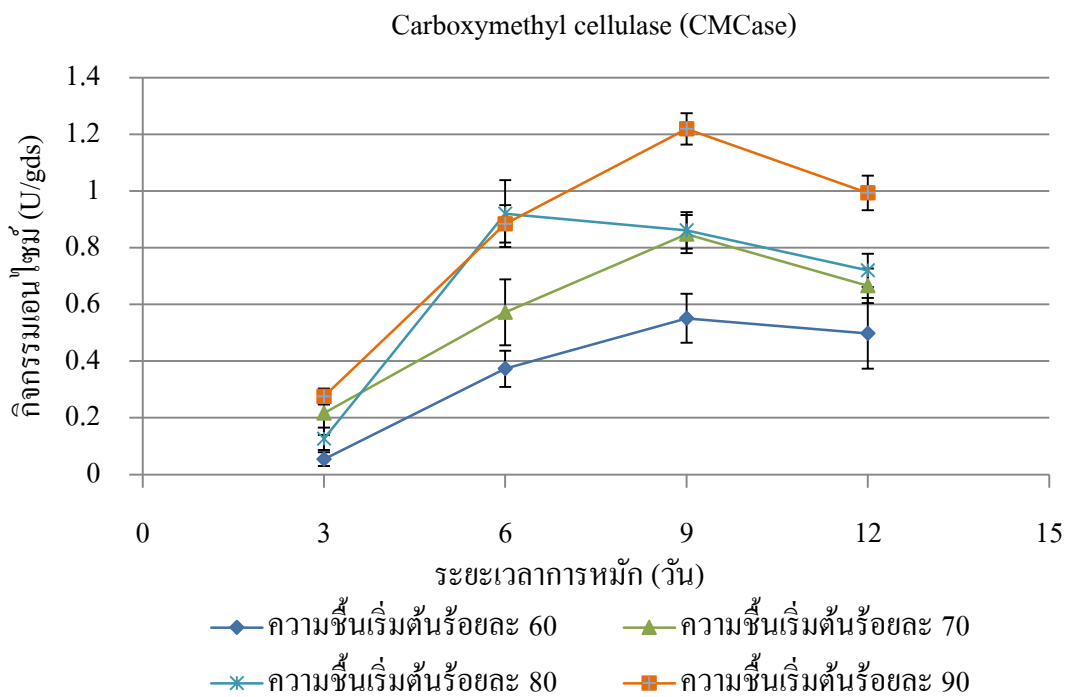
ตารางที่ 3.12 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้กบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase(U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase(U/gds)
60%	วันที่ 3	0.059±0.023 ^d	0.054±0.024 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.090±0.055 ^b	0.373±0.064 ^c	0.053±0.007 ^c
	วันที่ 9	0.231±0.062 ^a	0.551±0.086 ^b	0.088±0.010 ^b
	วันที่ 12	0.162±0.055 ^c	0.498±0.125 ^b	0.053±0.010 ^c
70%	วันที่ 3	0.068±0.027 ^d	0.216±0.077 ^d	0.028±0.008 ^c
	วันที่ 6	0.173±0.041 ^b	0.572±0.116 ^c	0.069±0.008 ^d
	วันที่ 9	0.278±0.054 ^a	0.848±0.067 ^b	0.135±0.016 ^c
	วันที่ 12	0.270±0.051 ^c	0.666±0.061 ^c	0.088±0.016 ^d
80%	วันที่ 3	0.124±0.030 ^d	0.126±0.040 ^d	0.083±0.005 ^d
	วันที่ 6	0.143±0.089 ^b	0.920±0.118 ^b	0.131±0.014 ^c
	วันที่ 9	0.354±0.055 ^a	0.861±0.064 ^b	0.195±0.016 ^b
	วันที่ 12	0.307±0.063 ^c	0.720±0.059 ^c	0.136±0.015 ^c
90%	วันที่ 3	0.146±0.029 ^d	0.275±0.028 ^d	0.070±0.008 ^d
	วันที่ 6	0.216±0.107 ^b	0.884±0.066 ^c	0.121±0.018 ^c
	วันที่ 9	0.409±0.050 ^a	1.219±0.055 ^a	0.288±0.013 ^a
	วันที่ 12	0.349±0.051 ^c	0.993±0.061 ^b	0.218±0.014 ^b

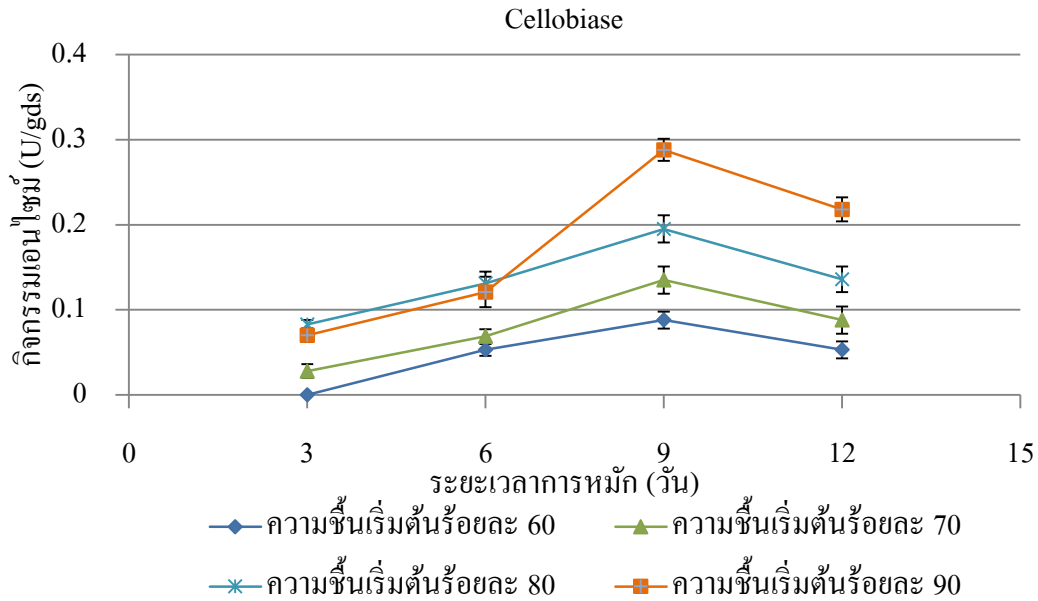
หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจัดกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)



ภาพที่ 3.25 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. sanguineus* เมื่อใช้ก้ามมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 3.26 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. sanguineus* เมื่อใช้ก้ามมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 3.27 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. sanguineus* เมื่อใช้ก้ามมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต

ภาพที่ 3.28 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต จากตารางที่ 3.12 และภาพที่ 3.29-3.31 แสดงความสามารถของเชื้อ *P. sanguineus* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่ความชื้นร้อยละ 80 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้มีค่าของกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และเซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 9 ของการหมักเท่ากับ 3.003 ± 0.251 , 8.274 ± 0.209 และ 0.944 ± 0.126 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ

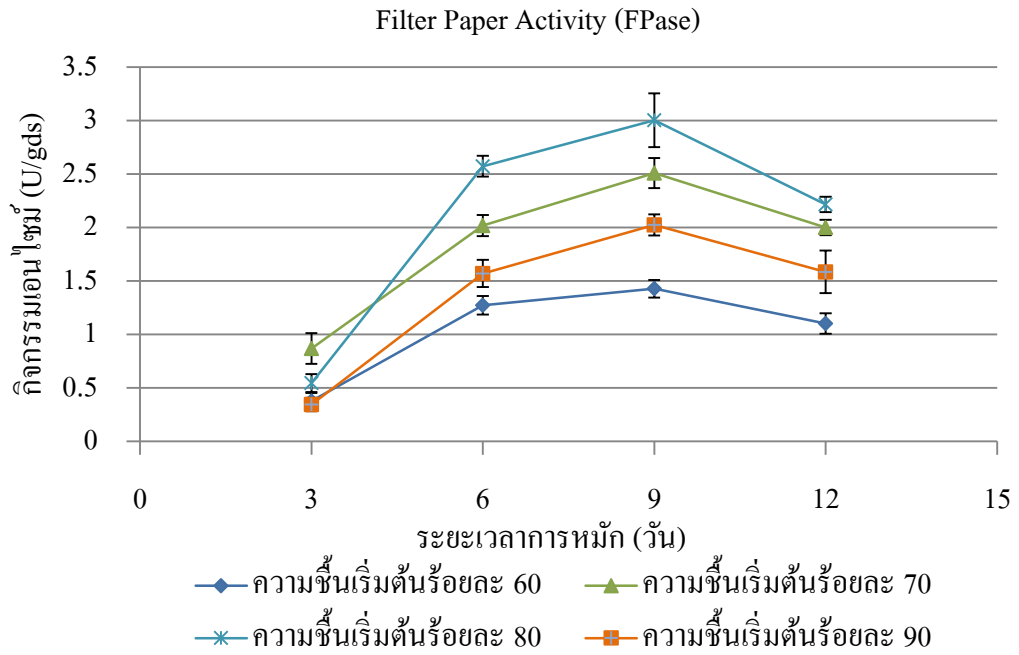


ภาพที่ 3.28 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกข้าวโพดเป็นสับสเตรต

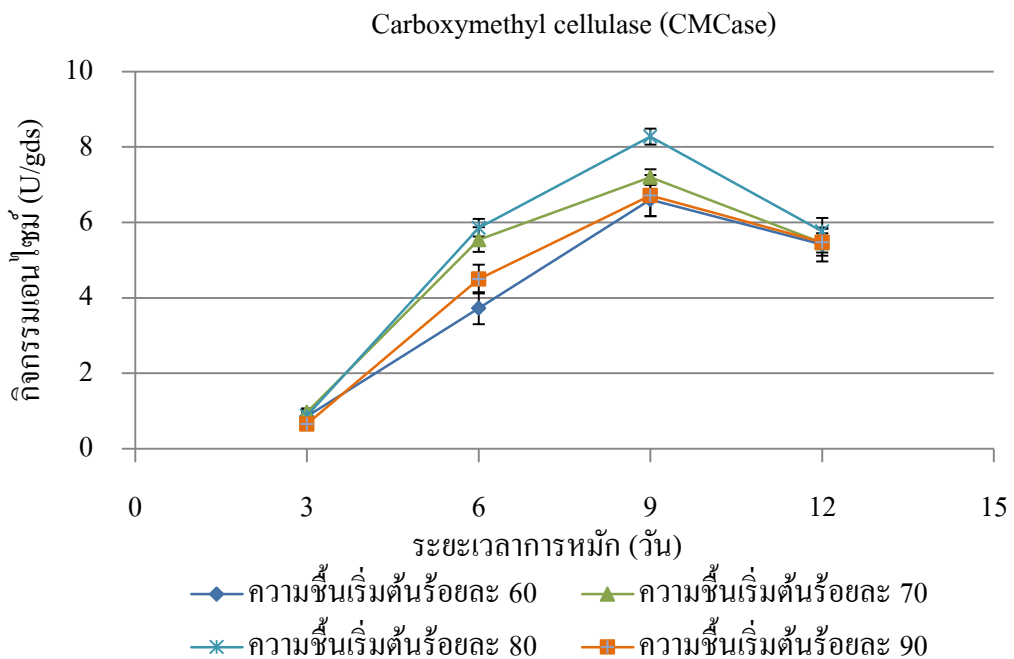
ตารางที่ 3.13 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรตและมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.378±0.075 ^d	0.855±0.121 ^d	0.574±0.608 ^d
	วันที่ 6	1.273±0.086 ^b	3.726±0.427 ^c	0.529±0.084 ^c
	วันที่ 9	1.428±0.083 ^a	6.601±0.443 ^a	0.673±0.056 ^b
	วันที่ 12	1.103±0.096 ^c	5.415±0.449 ^b	0.401±0.073 ^c
70%	วันที่ 3	0.869±0.143 ^d	0.964±0.106 ^d	0.239±0.038 ^d
	วันที่ 6	2.018±0.098 ^c	5.544±0.324 ^c	0.681±0.062 ^b
	วันที่ 9	2.509±0.141 ^b	7.198±0.210 ^b	0.854±0.080 ^a
	วันที่ 12	2.001±0.073 ^c	5.455±0.252 ^c	0.283±0.053 ^c
80%	วันที่ 3	0.546±0.084 ^d	0.875±0.155 ^d	0.254±0.024 ^d
	วันที่ 6	2.574±0.096 ^b	5.859±0.235 ^c	0.484±0.047 ^c
	วันที่ 9	3.003±0.251 ^a	8.274±0.209 ^a	0.944±0.126 ^a
	วันที่ 12	2.216±0.072 ^c	5.759±0.357 ^b	0.631±0.077 ^b
90%	วันที่ 3	0.346±0.063 ^d	0.655±0.052 ^d	0.114±0.050 ^d
	วันที่ 6	1.571±0.128 ^c	4.494±0.382 ^c	0.329±0.086 ^c
	วันที่ 9	2.024±0.099 ^b	6.710±0.542 ^a	0.553±0.210 ^b
	วันที่ 12	1.585±0.199 ^c	5.473±0.359 ^b	0.439±0.060 ^b

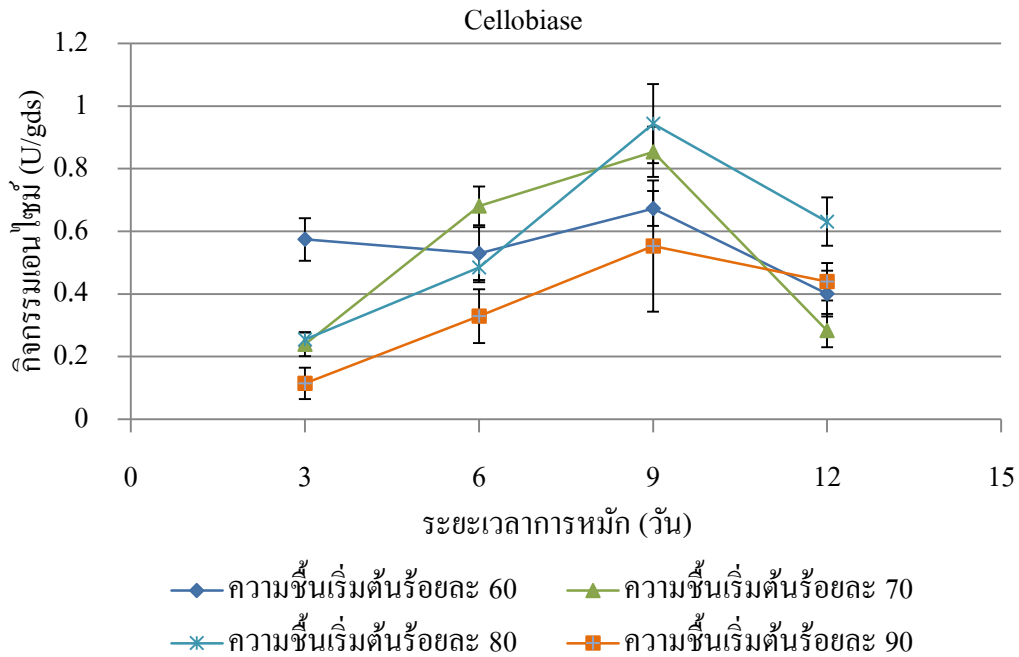
หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจัดกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)



ภาพที่ 3.29 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. sanguineus* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรด



ภาพที่ 3.30 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. sanguineus* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรด



ภาพที่ 3.31 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. sanguineus* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต

ภาพที่ 3.32 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต จากตารางที่ 3.14 และภาพที่ 3.33-3.35 แสดงความสามารถของเชื้อ *P. sanguineus* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่ความชื้นร้อยละ 70 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้มีค่าของกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และเซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 9 ของการหมักเท่ากับ 4.437 ± 0.148 , 11.433 ± 0.144 และ 0.890 ± 0.087 หนึ่งต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ

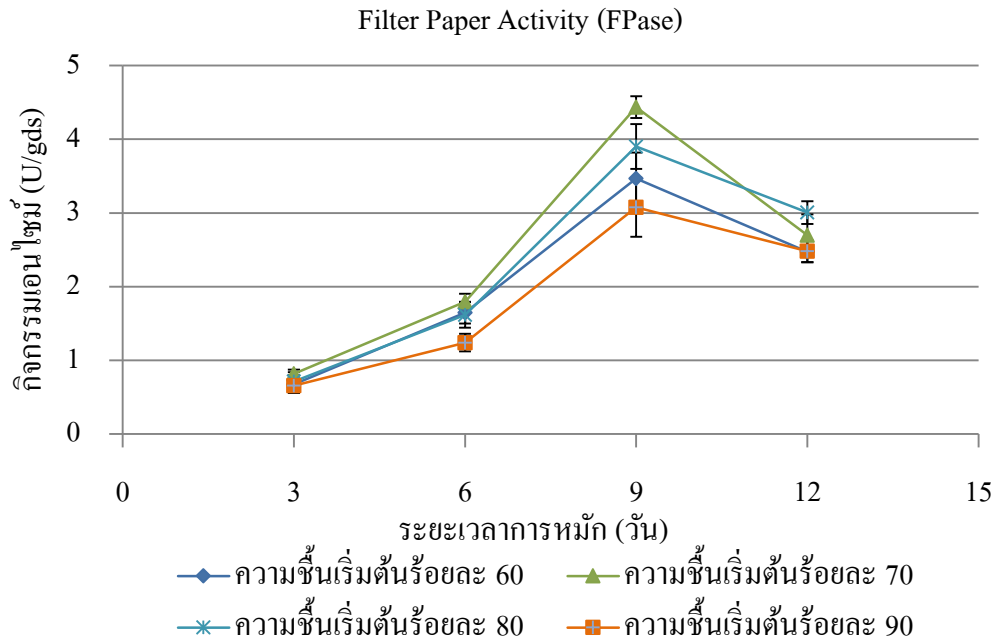


ภาพที่ 3.32 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต

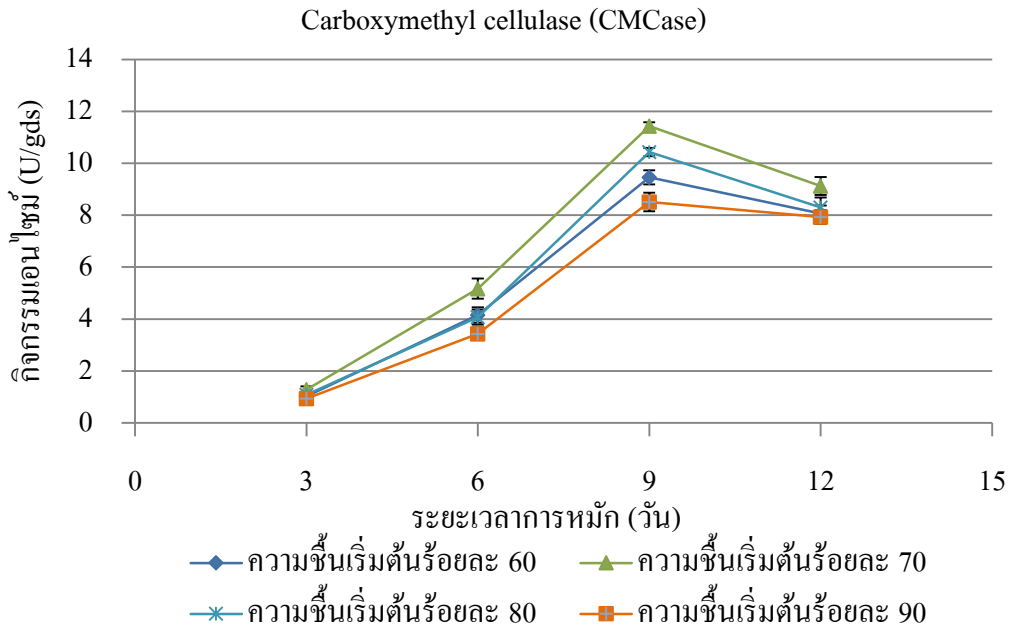
ตารางที่ 3.14 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase(U/gds)
60%	วันที่ 3	0.675±0.118 ^d	1.020±0.174 ^d	0.217±0.055 ^d
	วันที่ 6	1.645±0.147 ^c	4.153±0.298 ^c	0.495±0.071 ^c
	วันที่ 9	3.467±0.353 ^a	9.463±0.272 ^a	0.737±0.069 ^b
	วันที่ 12	2.473±0.145 ^b	8.060±0.318 ^b	0.522±0.098 ^c
70%	วันที่ 3	0.817±0.056 ^d	1.287±0.120 ^d	0.375±0.059 ^d
	วันที่ 6	1.795±0.108 ^c	5.168±0.387 ^c	0.595±0.066 ^c
	วันที่ 9	4.437±0.148 ^a	11.433±0.144 ^a	0.890±0.087 ^b
	วันที่ 12	2.697±0.283 ^b	9.125±0.350 ^b	0.637±0.087 ^c
80%	วันที่ 3	0.712±0.128 ^d	1.083±0.037 ^d	0.277±0.088 ^c
	วันที่ 6	1.617±0.176 ^c	4.073±0.289 ^c	0.403±0.099 ^{bc}
	วันที่ 9	3.903±0.304 ^a	10.435±0.159 ^a	0.480±0.069 ^b
	วันที่ 12	3.005±0.156 ^b	8.300±0.387 ^b	0.300±0.114 ^d
90%	วันที่ 3	0.657±0.083 ^d	0.932±0.107 ^d	0.133±0.048 ^{cd}
	วันที่ 6	1.240±0.119 ^c	3.430±0.238 ^c	0.193±0.066 ^c
	วันที่ 9	3.078±0.402 ^a	8.508±0.353 ^a	0.328±0.055 ^b
	วันที่ 12	2.480±0.147 ^b	7.933±0.259 ^b	0.132±0.043 ^d

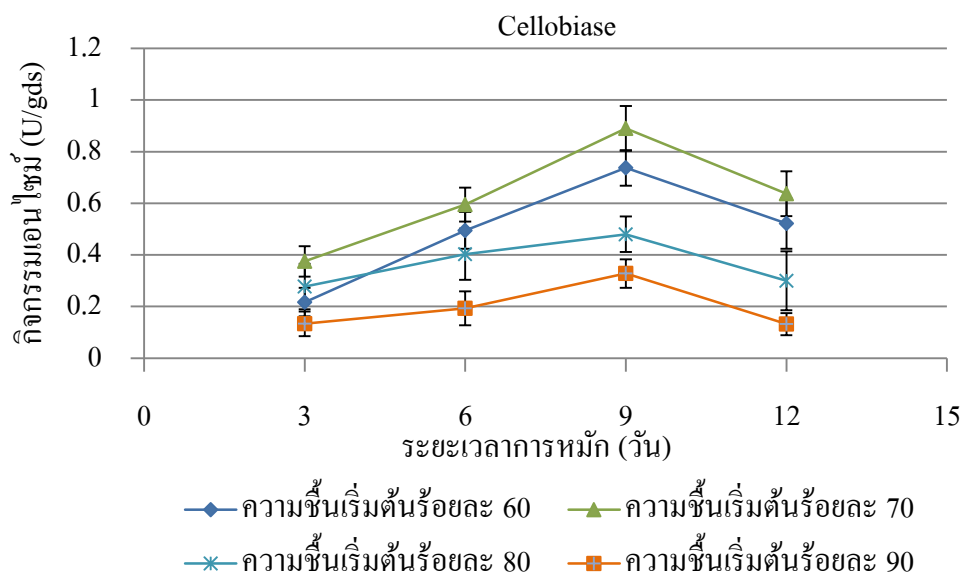
หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจัดกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)



ภาพที่ 3.33 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. sanguineus* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 3.34 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. sanguineus* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 3.35 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *P. sanguineus* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต

ตารางที่ 3.15 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *P. coccineus* และ *P. sanguineus* ในวันที่ 9 ของการหมัก

วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรม	เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase(U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase(U/gds)
ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	4.188±0.066	12.039±0.161	1.173±0.040
	<i>P. sanguineus</i>	6.353±0.433	14.684±0.396	1.442±0.182
กาบมะพร้าว	<i>P. coccineus</i>	1.013±0.073	1.083±0.108	0.199±0.012
	<i>P. sanguineus</i>	0.409±0.050	1.219±0.055	0.288±0.013
เปลือกข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	2.894±0.133	8.118±0.156	0.875±0.032
	<i>P. sanguineus</i>	3.003±0.251	8.274±0.209	0.944±0.126
เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	4.239±0.138	11.232±0.299	0.732±0.061
	<i>P. sanguineus</i>	4.437±0.148	11.433±0.144	0.890±0.087

ผลการทดลองพบว่าเชื้อราทุกชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในทุกๆสับสเตรต โดยเชื้อรา *P. coccineus* และ *P. Sanguineus* สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด แต่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้มีค่าแตกต่างกัน ในขณะที่เชื้อราอีก 3 ชนิดคือ *T. pavonia*, *G. australe* และ *G. mastoporum* เป็นเชื้อที่แยกได้

ในห้องปฏิบัติการ สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ แต่พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้มีค่าต่ำมาก เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรา *P. coccineus* และ *P. sanguineus* (แสดงผลการทดลองของเชื้อทั้ง 3 ชนิดในภาคผนวก) โดยเชื้อทุกชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด ในวันที่ 9 ของการหมัก โดยในช่วงวันที่ 10 ของการหมัก กิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จะค่อยๆลดลง (ข้อมูลไม่ได้แสดง) และเริ่มลดลงจนคงที่ในวันที่ 11-12 ซึ่งอธิบายไว้โดย Greaves (1971) รายงานว่าสาเหตุที่กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเป็นเพราะระหว่างการหมักมีความร้อนเกิดขึ้น หากการระบายอากาศไม่ดีพอ ความร้อนสะสมที่เกิดขึ้นมีผลทำให้เกิดการระเหยของน้ำ และอาจเกิดอันตรายต่อเชื้อราได้ ผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Zeng *et al.*, (2006) ที่พบว่า ในช่วงวันที่ 6-9 ของการผลิตเอนไซม์เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Penicillium simplicissimum* ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด ในส่วนของการปรับความชื้นของสับสเตรต พบว่าความชื้นร้อยละ 70 และ 80 จะมีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับการปรับความชื้นร้อยละ 90 ยกเว้นการใช้กาบมะพร้าว แต่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ต่ำมาก ขณะที่การปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 อาหารจะแห้งเกินไป ซึ่งมีรายงานของ Alam *et al.*, (2005) และ Gao *et al.*, (2008) ได้รายงานไว้ว่า แม้ความชื้นจะส่งผลให้เชื้อรามีการเจริญในสับสเตรตที่เป็นลิกโนเซลลูโลสได้ดี แต่ถ้าปรับความชื้นต่ำเกินไป อาจทำให้สารอาหารและสับสเตรตไม่เป็นเนื้อเดียวกัน แต่ถ้ามีความชื้นที่สูงเกินไป ทำให้เชื้อราเจริญเป็นเส้นใยในอาหารหมักที่อึดตัวไปด้วยน้ำ ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างสับสเตรตกับเชื้อราน้อยเกินไป ซึ่งส่งผลให้ได้กิจกรรมเอนไซม์ลดลง

จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ จึงเลือกเชื้อรา *P. coccineus* และ *P. sanguineus* เพื่อใช้ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้ขังข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรตในการทดลองต่อไป

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *P. coccineus* และ *P. sanguineus*

ในการทดลองก่อนนี้ ได้คัดเลือกเชื้อรา *P. coccineus* และ *P. sanguineus* เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยกระบวนการหมักในสภาพอาหารแข็ง โดยใช้ขังข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด-ด่างเป็นสับสเตรต โดยการปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 และแปรผัน pH อุณหภูมิ แหล่งไนโตรเจน รวมถึงตัวเหนียวน้ำ ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

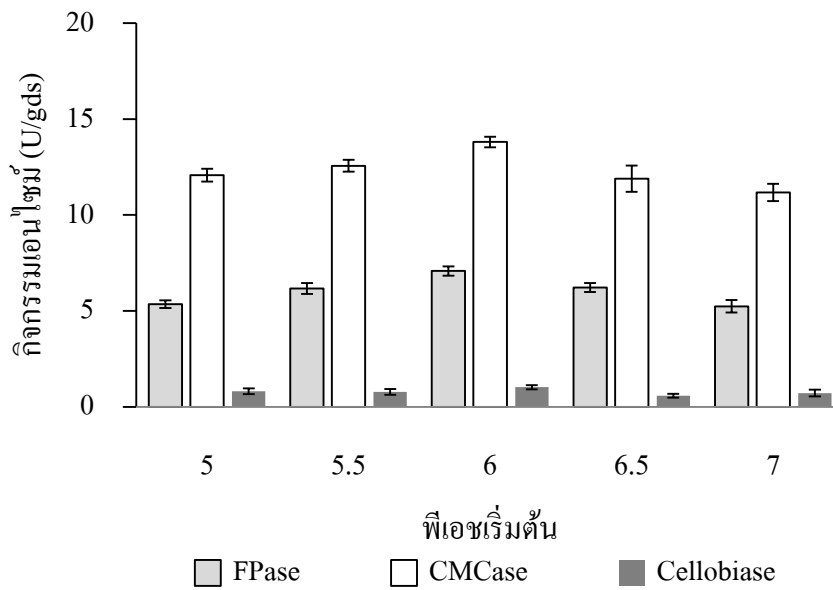
3.6.1 การศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ปรับให้มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เชื้อ *P. coccineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 7.081 ± 0.245 , 13.808 ± 0.277 และ 1.026 ± 0.108 ยูนิตต่อกรัม สับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ขณะที่เชื้อ *P. sanguineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 5.922 ± 0.126 , 15.133 ± 0.330 และ 1.675 ± 0.059 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ เมื่อปรับให้มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เช่นกัน แสดงผลการทดลองในตารางที่ 3.16 และภาพที่ 3.36-3.37 และยังได้ทำการศึกษาเพิ่มที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 8.0-9.0 พบว่าเชื้อราทั้ง *P. coccineus* และ *P. sanguineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงมากและเติบโตช้า (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ขณะที่ก่อนหน้านี้ได้ใช้ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 กิจกรรมเอนไซม์ที่ได้มีค่าต่ำกว่าพีเอช 6.0 จึงเลือกการปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อ *P. coccineus* และ *P. sanguineus* สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

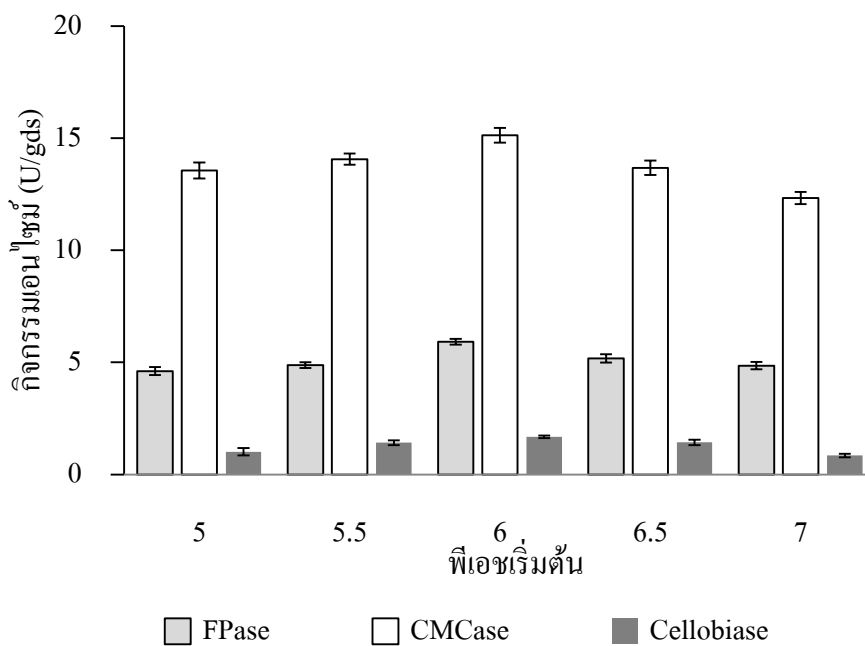
ตารางที่ 3.16 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *P. coccineus* และ *P. sanguineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

pH เริ่มต้น	เชื้อราที่ใช้ในการหมัก	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase(U/gds)
pH 5.0	<i>P. coccineus</i>	5.351 ± 0.198	12.076 ± 0.328	0.812 ± 0.150
	<i>P. sanguineus</i>	4.612 ± 0.176	13.558 ± 0.360	1.013 ± 0.163
pH 5.5	<i>P. coccineus</i>	6.170 ± 0.280	12.569 ± 0.305	0.772 ± 0.150
	<i>P. sanguineus</i>	4.875 ± 0.123	14.062 ± 0.249	1.415 ± 0.108
pH 6.0	<i>P. coccineus</i>	7.081 ± 0.245	13.808 ± 0.277	1.026 ± 0.108
	<i>P. sanguineus</i>	5.922 ± 0.126	15.133 ± 0.330	1.675 ± 0.059
pH 6.5	<i>P. coccineus</i>	6.215 ± 0.235	11.898 ± 0.681	0.578 ± 0.105
	<i>P. sanguineus</i>	5.179 ± 0.189	13.679 ± 0.316	1.433 ± 0.119
pH 7.0	<i>P. coccineus</i>	5.240 ± 0.321	11.174 ± 0.452	0.718 ± 0.175
	<i>P. sanguineus</i>	4.851 ± 0.163	12.330 ± 0.271	0.848 ± 0.078

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ \pm ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 3.36 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ



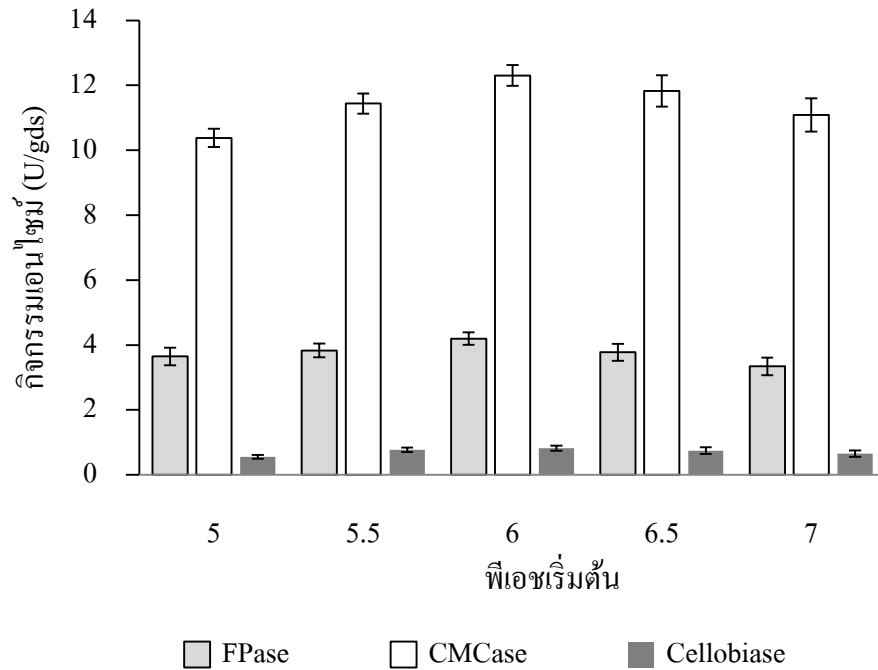
ภาพที่ 3.37 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

ขณะที่การใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต พบว่าเมื่อปรับให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เชื้อรา *P. coccineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 4.197 ± 0.191 , 12.303 ± 0.322 และ 0.824 ± 0.077 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ขณะที่เชื้อ *P. sanguineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 5.368 ± 0.272 , 12.458 ± 0.322 และ 1.165 ± 0.085 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับเช่นกัน แสดงผลการทดลองในตารางที่ 3.17 และภาพที่ 3.38-3.39 และได้ทำการศึกษาเพิ่มที่ค่าพีเอช 8.0-9.0 พบว่าเชื้อทั้งสองมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลง (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ขณะที่ก่อนหน้านี้ได้ใช้ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 กิจกรรมเอนไซม์ที่ได้มีค่าต่ำกว่า จึงเลือกการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์ูลอส สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

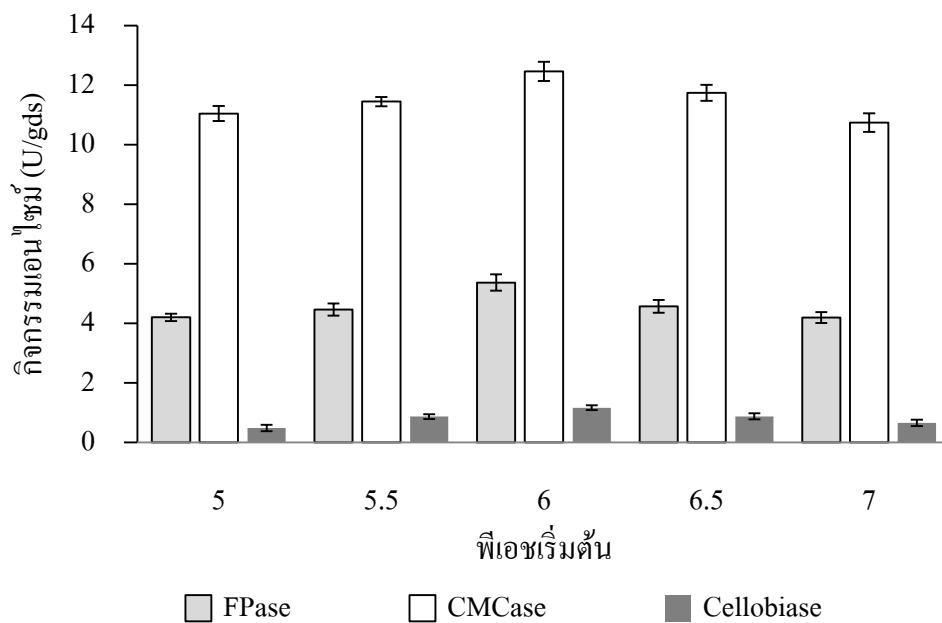
ตารางที่ 3.17 กิจกรรมเอนไซม์เซลล์ูลอสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

pH เริ่มต้น	เชื้อราที่ใช้ในการหมัก	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
pH 5.0	<i>P. coccineus</i>	3.648 ± 0.271	10.381 ± 0.279	0.551 ± 0.060
	<i>P. sanguineus</i>	4.200 ± 0.125	11.048 ± 0.251	0.480 ± 0.106
pH 5.5	<i>P. coccineus</i>	3.831 ± 0.212	11.438 ± 0.309	0.774 ± 0.067
	<i>P. sanguineus</i>	4.463 ± 0.202	11.450 ± 0.156	0.865 ± 0.078
pH 6.0	<i>P. coccineus</i>	4.197 ± 0.191	12.303 ± 0.322	0.824 ± 0.077
	<i>P. sanguineus</i>	5.368 ± 0.272	12.458 ± 0.322	1.165 ± 0.085
pH 6.5	<i>P. coccineus</i>	3.776 ± 0.262	11.828 ± 0.484	0.743 ± 0.104
	<i>P. sanguineus</i>	4.570 ± 0.219	11.743 ± 0.265	0.875 ± 0.099
pH 7.0	<i>P. coccineus</i>	3.342 ± 0.272	11.087 ± 0.517	0.653 ± 0.097
	<i>P. sanguineus</i>	4.195 ± 0.184	10.743 ± 0.308	0.658 ± 0.110

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ \pm ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 3.38 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ



ภาพที่ 3.39 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Singhamia *et al.*, (2006) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อรา *Trichoderma reesei* NRRL 11460 พบค่า pH ของการหมักที่เหมาะสมคือ 6.0-7.0 จึงเลือกสภาวะพีเอชเริ่มต้น 6.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป เช่นเดียวกับ Haq *et al.*, (2005) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *Trichoderma harzianum* UM-11 พบว่าที่ pH 6 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด และจากงานวิจัยของ Keskar (1992) ได้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Penicillium janthinellum* ในอาหารที่มี pH 3 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้น้อยมากเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (H^+) เอนไซม์ส่วนมากจะเร่งปฏิกิริยาได้ในช่วง pH 4-10 ถ้าต่ำหรือสูงกว่านี้ มีผลทำให้ประจุของเอนไซม์หรือสับสเตรตเปลี่ยนแปลงไปจนไม่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยากันได้ หรืออาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพได้ตลอดจน โครงสร้างตามมิติของบริเวณตัวเร่งเปลี่ยนแปลงไปด้วย เพราะ pH มีผลโดยตรงต่อโครงสร้างทุติยภูมิ ตติยภูมิและจตุรภูมิของโปรตีน (สุนันทา, 2547)

3.6.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากรายงานของ Mathew *et al.*, (2008) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกระบวนการหมักในสภาพอาหารแข็งจากเชื้อรา ส่วนใหญ่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จะอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส ซึ่งก่อนหน้านี้ในงานวิจัยได้เลือกอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในการทดลอง โดยในกระบวนการหมักจะเกิดความร้อนสะสมระหว่างหมัก ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่เพื่อไม่เป็นอันตรายต่อเชื้อรา รวมถึงลดการเสียสภาพของเอนไซม์ จึงศึกษาการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 9 วัน โดยใช้ซังข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต เชื้อรา *P. coccineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 7.085 ± 0.239 , 13.397 ± 0.223 และ 0.830 ± 0.105 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ขณะที่เชื้อรา *P. sanguineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และเซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 6.639 ± 0.241 , 13.521 ± 0.293 และ 1.572 ± 0.115 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เช่นกัน แสดงผลการทดลองในตารางที่ 3.18 และภาพที่ 3.40-3.41

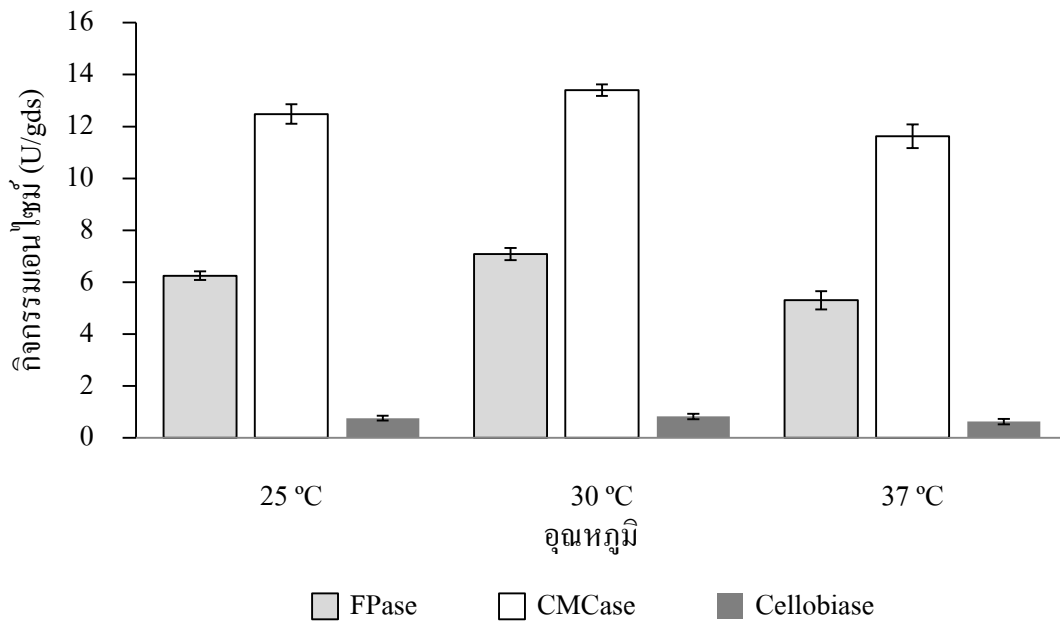
ขณะที่การใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมที่ได้สูงที่สุดเช่นเดียวกับการใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต โดยเชื้อรา *P. coccineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส โดย

ค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 5.674 ± 0.400 , 12.640 ± 0.336 และ 1.216 ± 0.074 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ขณะที่เชื้อรา *P. sanguineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 5.930 ± 0.318 , 12.685 ± 0.184 และ 1.015 ± 0.085 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเช่นกัน แสดงผลการทดลองในตารางที่ 3.18 และภาพที่ 3.40-3.43 จึงเลือกการปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลสสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

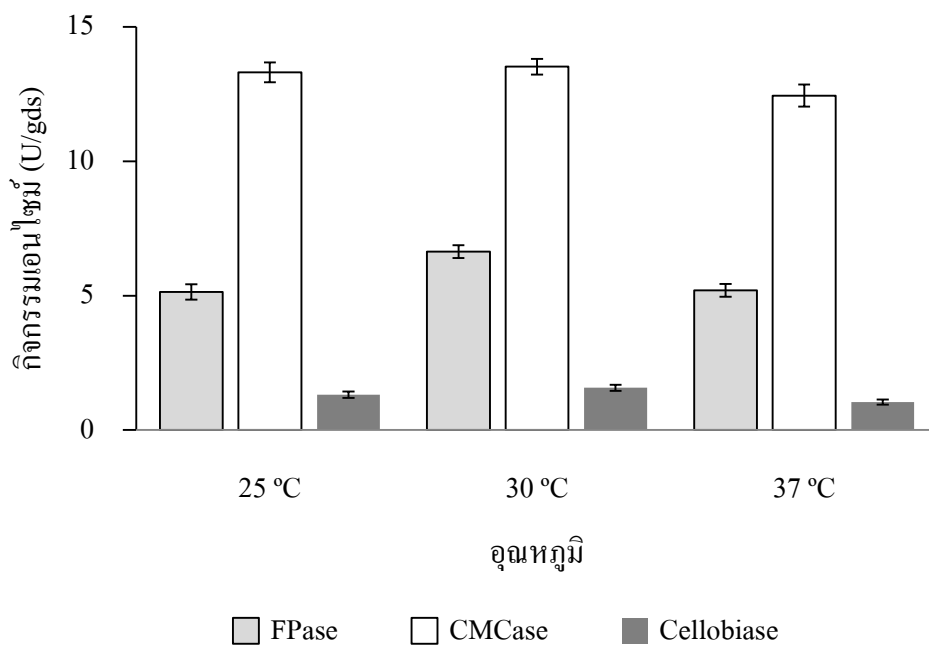
ตารางที่ 3.18 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH เริ่มต้น 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	สับสเตรต	เชื้อราที่ใช้ใน การหมัก	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
			FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
25	ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	6.251 ± 0.162	12.481 ± 0.372	0.758 ± 0.092
		<i>P. sanguineus</i>	5.135 ± 0.284	13.306 ± 0.368	1.318 ± 0.119
	เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	4.679 ± 0.138	11.740 ± 0.400	0.955 ± 0.094
		<i>P. sanguineus</i>	5.335 ± 0.230	12.003 ± 0.315	0.865 ± 0.078
30	ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	7.085 ± 0.239	13.397 ± 0.223	0.830 ± 0.105
		<i>P. sanguineus</i>	6.639 ± 0.241	13.521 ± 0.293	1.572 ± 0.115
	เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	5.674 ± 0.400	12.640 ± 0.336	1.216 ± 0.074
		<i>P. sanguineus</i>	5.930 ± 0.318	12.685 ± 0.184	1.015 ± 0.085
37	ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	5.303 ± 0.353	11.626 ± 0.461	0.632 ± 0.105
		<i>P. sanguineus</i>	5.192 ± 0.238	12.440 ± 0.412	1.040 ± 0.097
	เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	3.608 ± 0.165	11.258 ± 0.316	0.836 ± 0.074
		<i>P. sanguineus</i>	3.848 ± 0.315	10.788 ± 0.209	0.925 ± 0.049

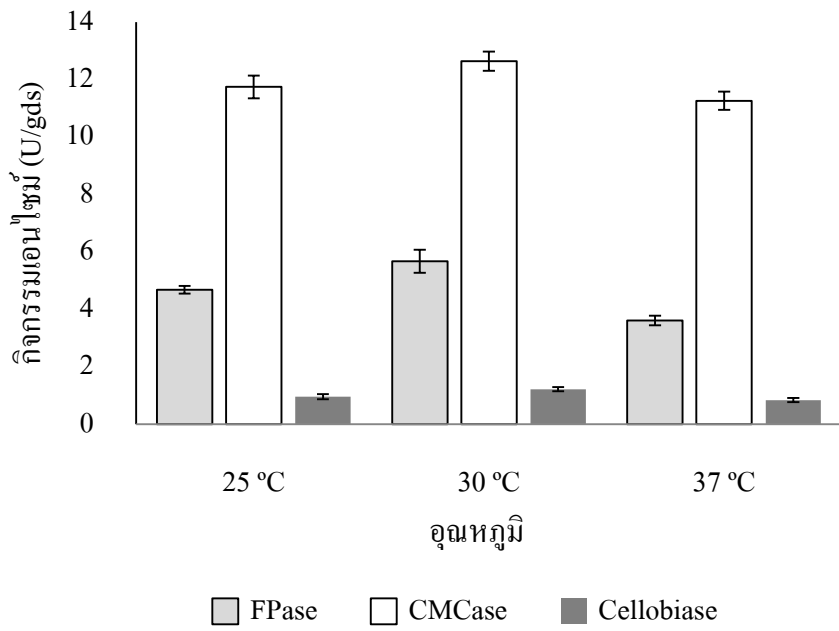
หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ \pm ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



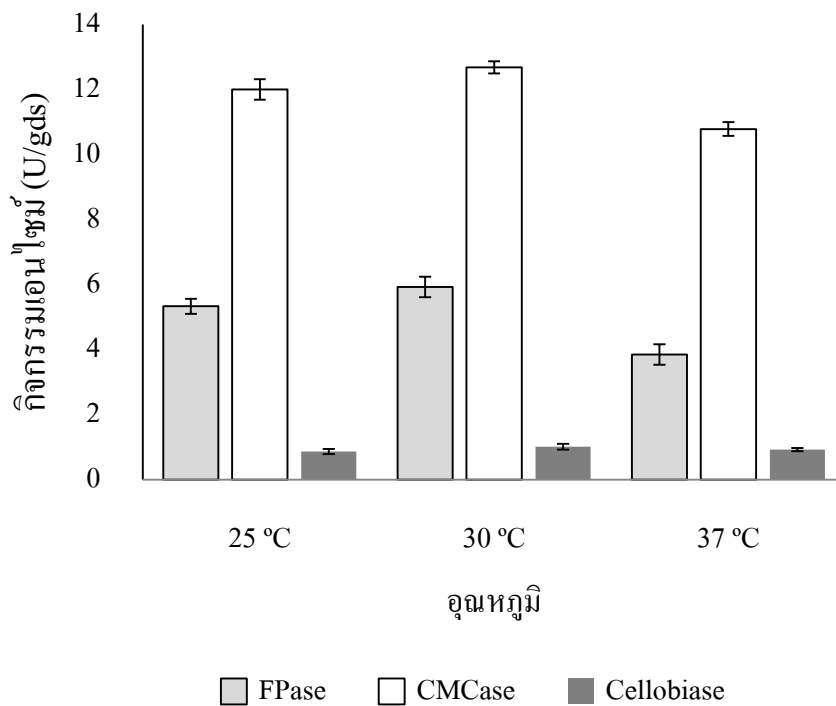
ภาพที่ 3.40 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 3.41 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 3.42 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 3.43 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ

มีรายงานหลายฉบับเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา และระบุถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ ตัวอย่างเช่นเชื้อราในสกุล *Penicillium* พบว่าที่สภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส ดังเช่น Das and Ghosh (2009) ซึ่งได้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *P. notatum* NCIM NO-923 สอดคล้องกับรายงานของ Long *et al.*, (2009) ที่ทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. decumbens* L-06 โดยรายงานทั้งสองระบุตรงกันว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส

3.6.3 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ เช่นจากแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นชุดควบคุมจาก mineal salt solution (สำหรับใช้ปรับความชื้น), แอมโมเนียมไนเตรท, แอมโมเนียมคลอไรด์, สารสกัดจากยีสต์ และเปปโทน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 9 วัน สำหรับการใช้ช่วงข้าวโพดเป็นสับสเตรตพบว่าเมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อรา *P. coccineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 10.303 ± 0.353 , 14.812 ± 0.360 และ 1.118 ± 0.054 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ขณะที่เชื้อรา *P. sanguineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 10.967 ± 0.579 , 14.217 ± 0.178 และ 1.906 ± 0.156 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับเช่นกัน แสดงผลการทดลองในตารางที่ 3.19 และภาพที่ 3.44-3.45

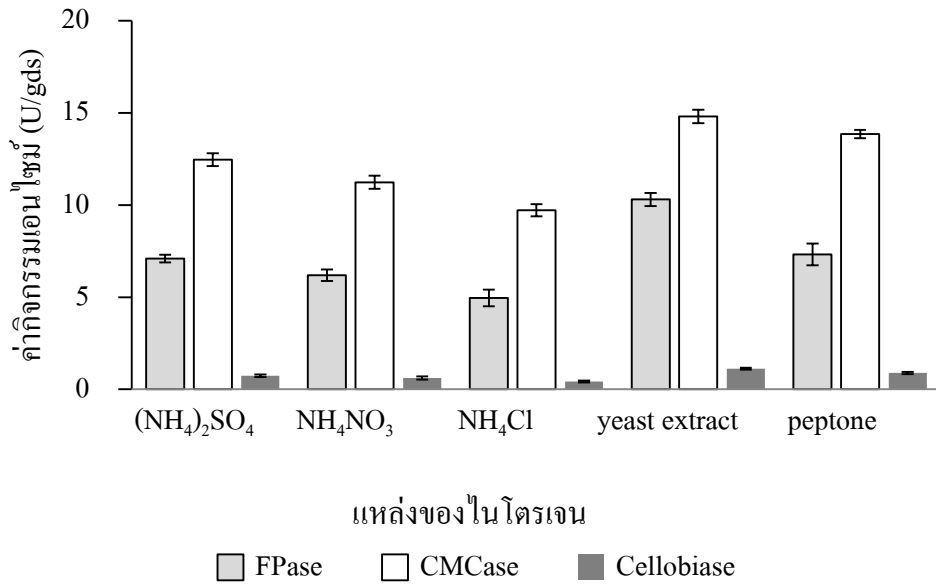
ขณะที่เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต เชื้อ *P. coccineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 8.854 ± 0.390 , 14.645 ± 0.330 และ 3.514 ± 0.193 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ขณะที่เชื้อ *P. sanguineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 7.590 ± 0.757 , 16.398 ± 0.463 และ 1.488 ± 0.095 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับเช่นกัน แสดงผลการทดลองในภาพที่ 3.46-3.47

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Maeda *et al.*, (2010) ทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. funiculosum* พบว่าสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่มีองค์ประกอบหลายชนิดรวมถึงกรดอะมิโน ทำให้มีความเหมาะสมนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและวิตามินสำหรับอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตและผลิตสารตามต้องการได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jatinder *et al.*, (2006) ที่พบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนมีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

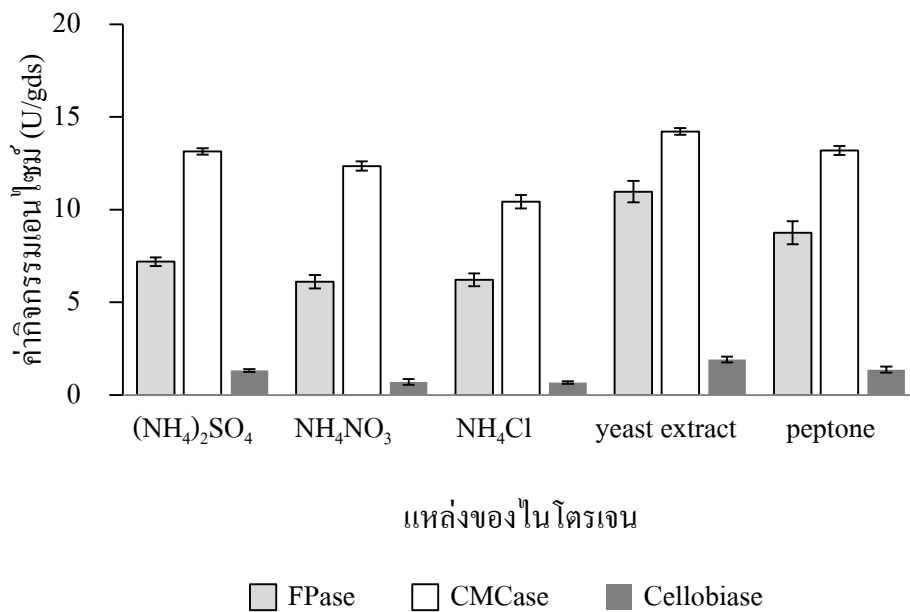
ตารางที่ 3.19 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

แหล่งไนโตรเจน	สับสเตรต	เชื้อราที่ใช้ในการหมัก	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
			FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
(NH ₄) ₂ SO ₄ เป็นชุดควบคุม	ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	7.097±0.207	12.463±0.347	0.734±0.076
		<i>P. sanguineus</i>	7.190±0.234	13.136±0.171	1.320±0.078
	เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	6.820±0.273	13.172±0.408	2.514±0.357
		<i>P. sanguineus</i>	6.400±0.165	13.103±0.364	1.140±0.092
NH ₄ NO ₃	ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	6.190±0.309	11.237±0.356	0.605±0.086
		<i>P. sanguineus</i>	6.108±0.368	12.351±0.256	0.701±0.152
	เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	6.269±0.379	12.406±0.356	1.762±0.245
		<i>P. sanguineus</i>	5.420±0.431	11.920±0.198	0.800±0.099
NH ₄ Cl	ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	4.964±0.452	9.720±0.331	0.428±0.051
		<i>P. sanguineus</i>	6.211±0.342	10.427±0.364	0.662±0.067
	เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	6.232±0.431	12.419±0.375	1.631±0.134
		<i>P. sanguineus</i>	5.085±0.198	10.750±0.269	0.683±0.081
yeast extract	ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	10.303±0.353	14.812±0.360	1.118±0.054
		<i>P. sanguineus</i>	10.967±0.579	14.217±0.178	1.906±0.156
	เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	8.854±0.390	14.645±0.330	3.514±0.193
		<i>P. sanguineus</i>	7.590±0.757	16.398±0.463	1.488±0.095
peptone	ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	7.313±0.592	13.853±0.226	0.882±0.057
		<i>P. sanguineus</i>	8.757±0.624	13.191±0.249	1.360±0.163
	เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	7.812±0.312	14.663±0.334	3.598±0.134
		<i>P. sanguineus</i>	6.420±0.276	12.808±0.357	1.373±0.074

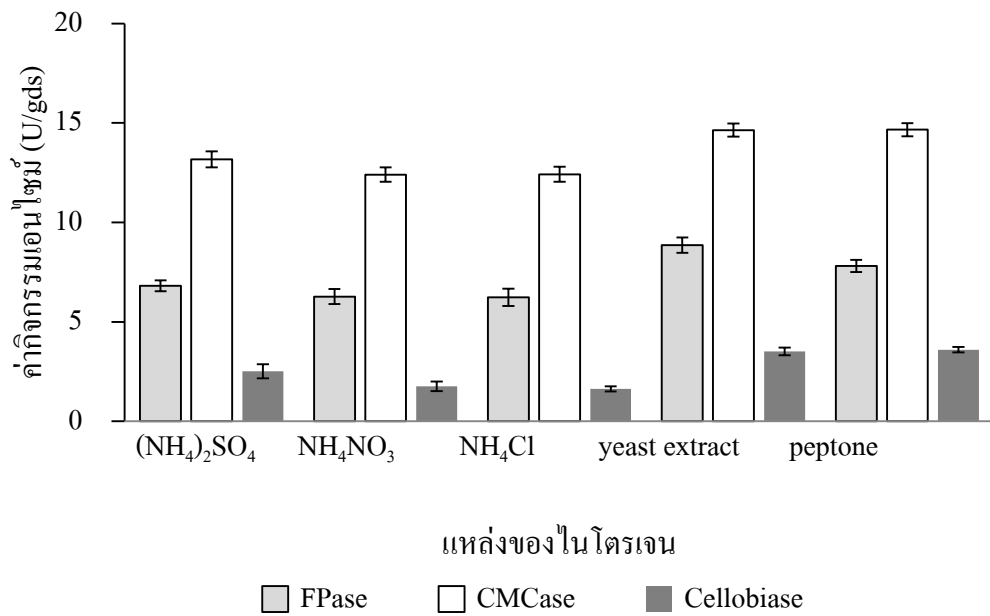
หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



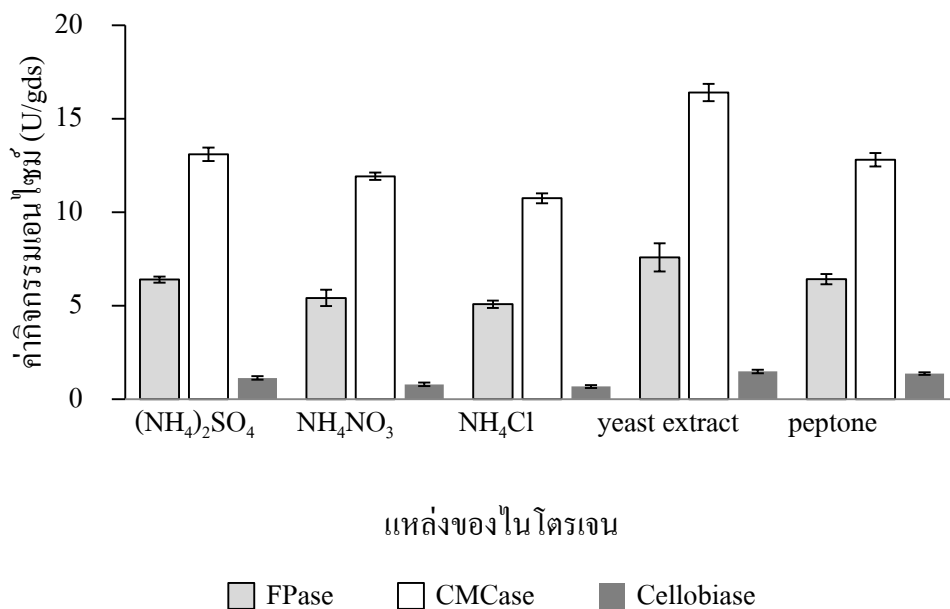
ภาพที่ 3.44 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน



ภาพที่ 3.45 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน



ภาพที่ 3.46 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน



ภาพที่ 3.47 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

3.6.4 การศึกษาผลของสารเหนี่ยวนำต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การทดสอบผลของสารเหนี่ยวนำต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยสารเหนี่ยวนำที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ น้ำตาลแลคโตส (lactose) และเวราทริลแอลกอฮอล์ (veratryl alcohol) ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน โดยใช้ซังข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต พบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด ในกรณีใช้ซังข้าวโพดพบว่าเชื้อ *P. coccineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และเซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 10.141 ± 0.690 , 17.111 ± 0.118 และ 2.950 ± 0.181 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ขณะที่เชื้อรา *P. sanguineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และเซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 9.090 ± 0.791 , 16.981 ± 0.820 และ 3.481 ± 0.163 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับเช่นกัน เมื่อใช้น้ำตาลแลคโตสความเข้มข้น 1.50% (w/w) เป็นตัวเหนี่ยวนำ แสดงผลการทดลองในตารางที่ 3.20 และภาพที่ 3.48-3.49

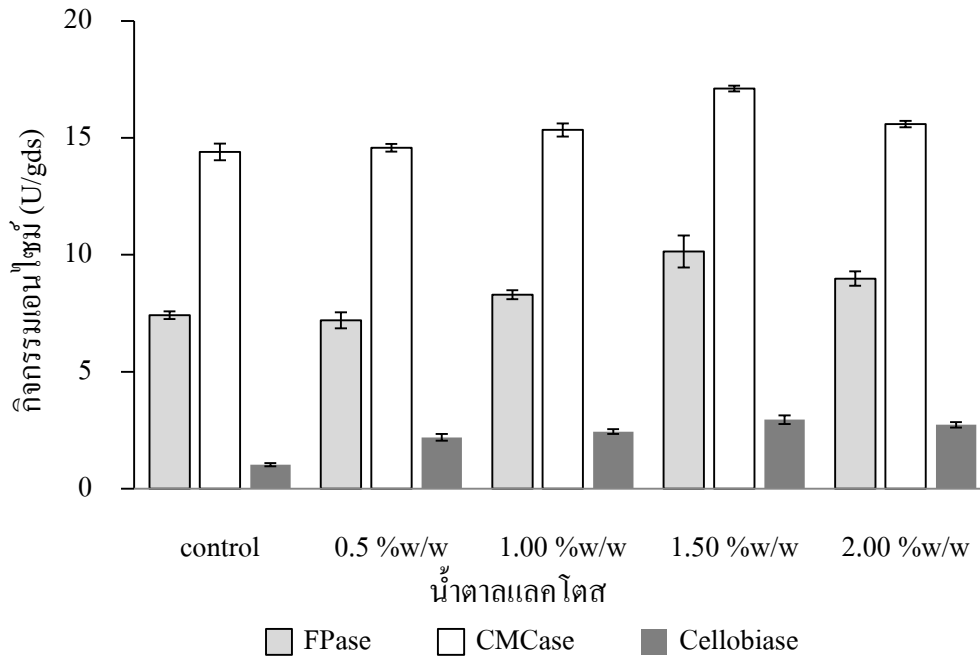
ขณะเดียวกันเมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรตพบว่า เชื้อทั้งสองสามารถผลิตเอนไซม์ได้เพิ่มสูงที่สุดเมื่อเติมน้ำตาลแลคโตส (lactose) เป็นสารเหนี่ยวนำความเข้มข้น 1.50% (w/w) โดยเชื้อ *P. coccineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และเซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 8.683 ± 0.558 , 16.335 ± 0.853 และ 3.791 ± 0.094 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ และเชื้อ *P. sanguineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และเซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 8.763 ± 0.590 , 17.120 ± 0.615 และ 4.148 ± 0.124 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) แสดงผลการทดลองในภาพที่ 3.50-3.51

มีรายงานของ Fang *et al.*, (2008) ที่ผลิตเซลลูเลสจาก *Acremonium cellulolyticus* โดยเติมแลคโตสเป็นเหนี่ยวนำพบว่ามีการเพิ่มสูงขึ้น โดยอธิบายว่าน้ำตาลแลคโตสอาจมีผลต่อการถอดรหัสของยีนเซลลูเลสในขั้นตอน transcriptional state และช่วยควบคุมความสัมพันธ์ระหว่างไคเนสและโมโนไคเนสเนื่องจากน้ำตาลแลคโตสประกอบด้วย D-galactose กับ D-glucose ซึ่งยังต้องมีการศึกษากลไกการเหนี่ยวนำต่อไป

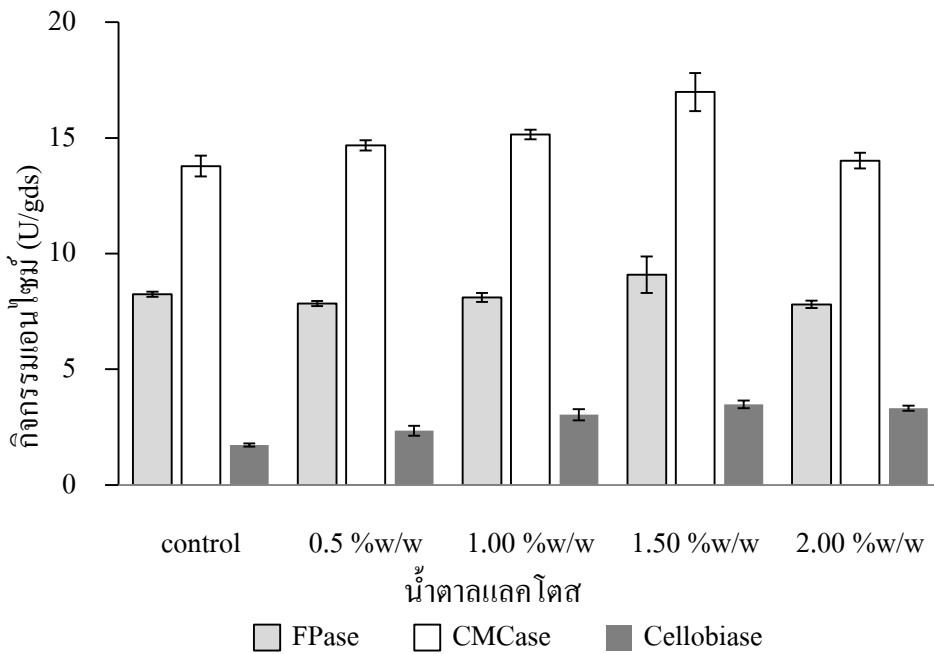
ตารางที่ 3.20 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้ขังข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัวเหนียวน้ำ

น้ำตาลแลคโตส	สับสเตรต	เชื้อราที่ใช้ในการหมัก	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
			FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
control	ขังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	7.416±0.162	14.402±0.353	1.026±0.070
		<i>P. sanguineus</i>	8.243±0.116	13.779±0.449	1.722±0.067
ชุดคววม	เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	6.745±0.171	12.913±0.178	1.606±0.087
		<i>P. sanguineus</i>	7.603±0.133	13.548±0.173	1.308±0.117
0.5 % w/w	ขังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	7.198±0.347	14.578±0.162	2.194±0.150
		<i>P. sanguineus</i>	7.841±0.115	14.674±0.223	2.342±0.208
	เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	6.880±0.245	12.602±0.262	1.898±0.104
		<i>P. sanguineus</i>	7.230±0.226	13.573±0.216	1.790±0.120
1.00 % w/w	ขังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	8.294±0.197	15.338±0.277	2.439±0.102
		<i>P. sanguineus</i>	8.101±0.193	15.152±0.208	3.035±0.245
	เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	7.579±0.191	12.115±0.245	2.109±0.128
		<i>P. sanguineus</i>	7.573±0.371	14.450±0.318	2.140±0.113
1.50 % w/w	ขังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	10.141±0.690	17.111±0.118	2.950±0.181
		<i>P. sanguineus</i>	9.090±0.791	16.981±0.820	3.481±0.163
	เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	8.683±0.558	16.335±0.853	3.791±0.094
		<i>P. sanguineus</i>	8.763±0.590	17.120±0.615	4.148±0.124
2.00 % w/w	ขังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	8.982±0.312	15.588±0.134	2.732±0.115
		<i>P. sanguineus</i>	7.804±0.160	14.018±0.334	3.321±0.108
	เปลือกถั่วลิสง	<i>P. coccineus</i>	8.142±0.215	12.219±0.259	2.582±0.037
		<i>P. sanguineus</i>	7.473±0.209	14.483±0.152	2.490±0.092

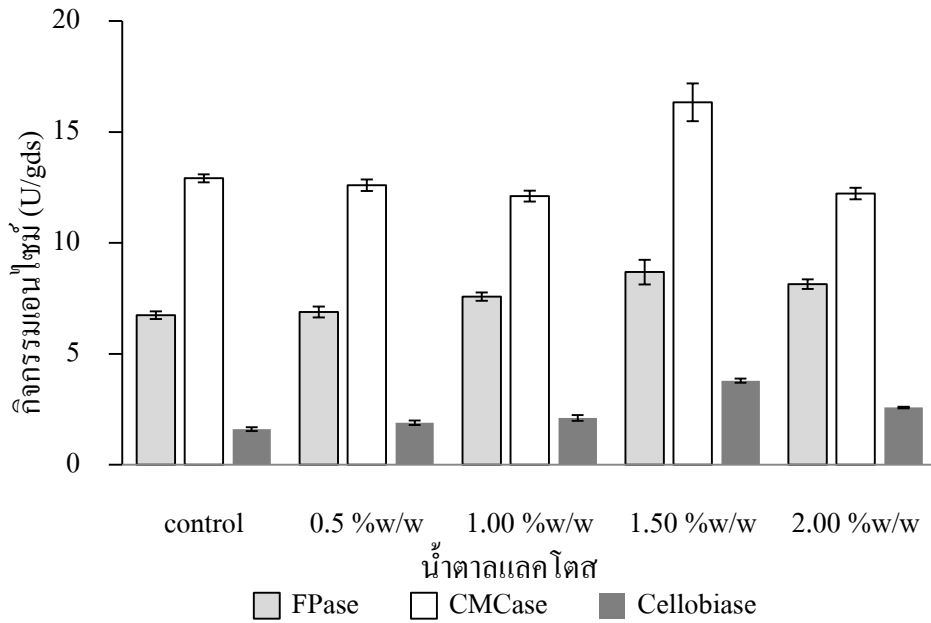
หมายเหตุ ชุดคววม คือ ชุดที่มีค่า pH 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่เติมตัวเหนียวน้ำ



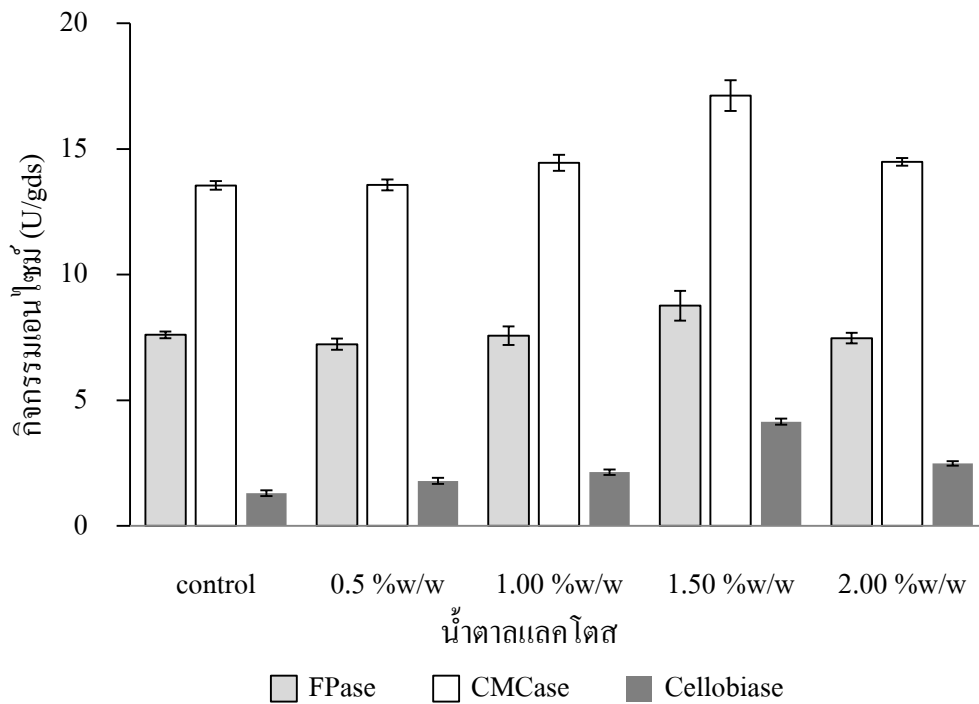
ภาพที่ 3.48 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัวเหนียว



ภาพที่ 3.49 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัวเหนียว



ภาพที่ 3.50 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัวเหนียวน้ำ

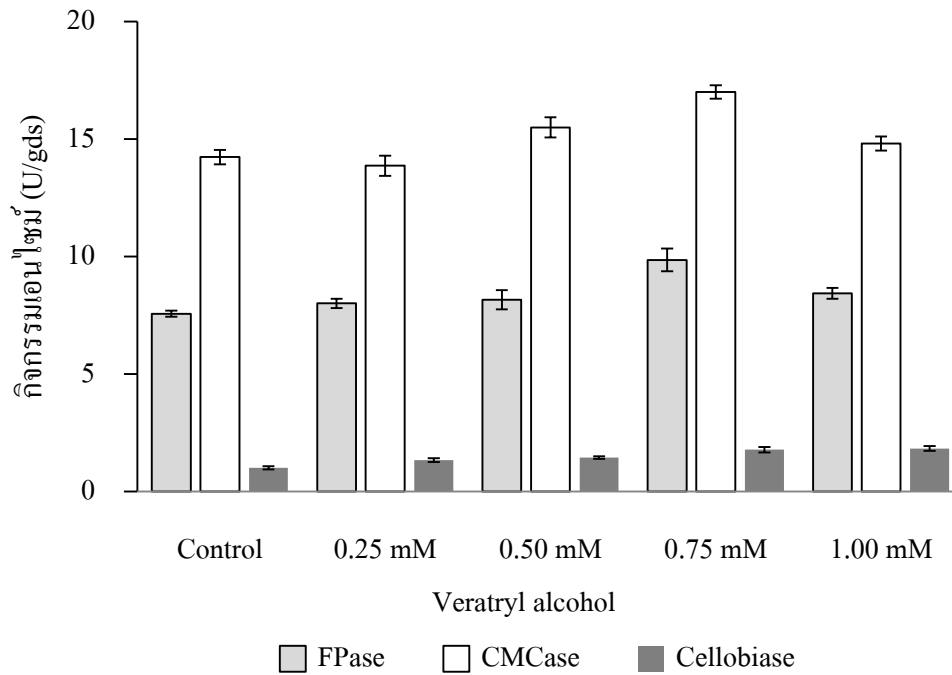


ภาพที่ 3.51 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัวเหนียวน้ำ

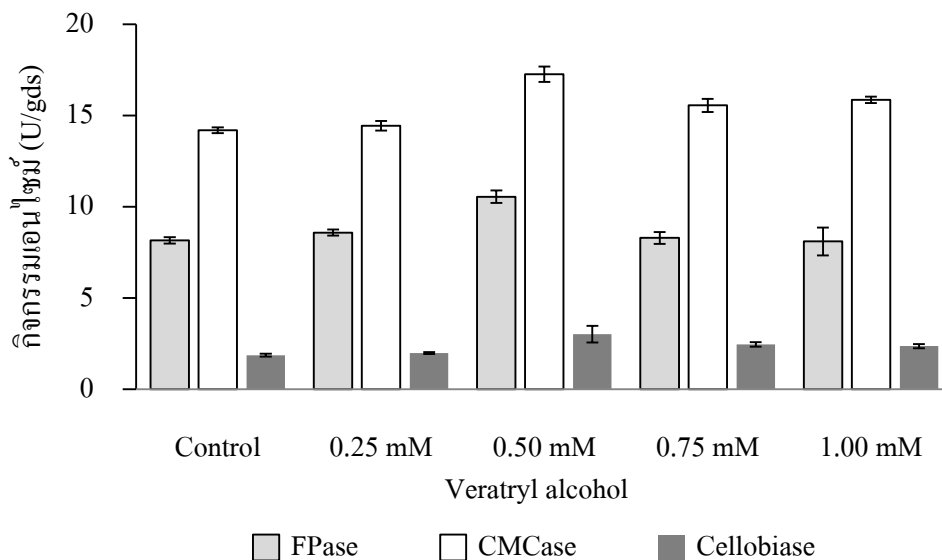
เมื่อทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *P. coccineus* และ *P. sanguineus* โดยใช้ขังข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต โดยเติมเวราทริลแอลกอฮอล์ (veratryl alcohol) ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดในกรณีที่ใช้ขังข้าวโพดเป็นสับสเตรตเชื้อ *P. coccineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethyl cellulase (CMCase) และเซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 9.860 ± 0.484 , 17.008 ± 0.290 และ 1.784 ± 0.118 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ขณะที่เชื้อ *P. sanguineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 10.547 ± 0.349 , 19.390 ± 0.111 และ 3.008 ± 0.460 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับเช่นกัน เมื่อใช้เวราทริลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 0.075 และ 0.050 มิลลิ โมลาร์ ตามลำดับ เป็นตัวเหนี่ยวนำ แสดงผลการทดลองในตารางที่ 3.20 และภาพที่ 3.52-3.53 ขณะที่เชื้อทั้งสองชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดเมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต พบว่าเชื้อ *P. coccineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethyl cellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 9.039 ± 0.732 , 16.245 ± 0.652 และ 1.895 ± 0.107 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ขณะที่เชื้อ *P. sanguineus* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 10.413 ± 0.145 , 18.633 ± 0.407 และ 2.488 ± 0.293 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับเช่นกัน เมื่อใช้เวราทริลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 0.075 และ 0.050 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เป็นตัวเหนี่ยวนำ แสดงผลการทดลองในตารางที่ 3.21 และภาพที่ 3.54-3.55

ตารางที่ 3.21 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้ซังข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทริลแอลกอฮอล์เป็นตัวเหนี่ยวนำ

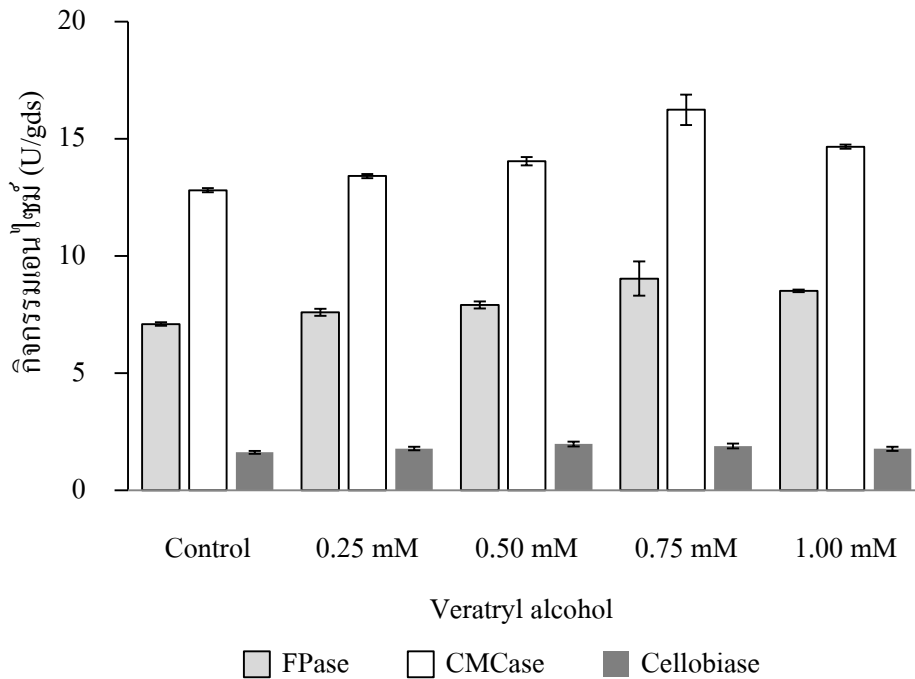
เวราทริล แอลกอฮอล์	สับสเตรต	เชื้อราที่ใช้ใน การหมัก	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
			FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
control	ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	7.569±0.131	14.234±0.305	1.017±0.070
		<i>P. sanguineus</i>	8.159±0.173	14.193±0.160	1.861±0.078
ชุดควบคุม	เปลือกถั่ว ลิสง	<i>P. coccineus</i>	7.099±0.078	12.811±0.094	1.625±0.060
		<i>P. sanguineus</i>	7.470±0.150	13.738±0.258	1.468±0.067
0.25 mM	ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	8.012±0.200	13.867±0.430	1.339±0.086
		<i>P. sanguineus</i>	8.576±0.167	14.435±0.256	1.974±0.059
	เปลือกถั่ว ลิสง	<i>P. coccineus</i>	7.602±0.151	13.414±0.087	1.786±0.074
		<i>P. sanguineus</i>	8.168±0.159	14.265±0.113	1.640±0.092
0.50 mM	ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	8.161±0.410	15.500±0.423	1.449±0.051
		<i>P. sanguineus</i>	10.547±0.349	19.390±0.111	3.008±0.460
	เปลือกถั่ว ลิสง	<i>P. coccineus</i>	7.579±0.191	12.115±0.245	2.109±0.128
		<i>P. sanguineus</i>	10.413±0.145	18.633±0.407	2.488±0.293
0.75 mM	ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	9.860±0.484	17.008±0.290	1.784±0.118
		<i>P. sanguineus</i>	8.287±0.330	15.553±0.360	2.454±0.123
	เปลือกถั่ว ลิสง	<i>P. coccineus</i>	9.039±0.732	16.245±0.652	1.895±0.107
		<i>P. sanguineus</i>	8.948±0.293	15.885±0.240	1.715±0.071
1.00 mM	ซังข้าวโพด	<i>P. coccineus</i>	8.438±0.235	14.814±0.299	1.832±0.102
		<i>P. sanguineus</i>	8.096±0.765	15.858±0.174	2.355±0.108
	เปลือกถั่ว ลิสง	<i>P. coccineus</i>	8.517±0.054	14.670±0.091	1.777±0.087
		<i>P. sanguineus</i>	8.870±0.205	15.113±0.237	1.673±0.074



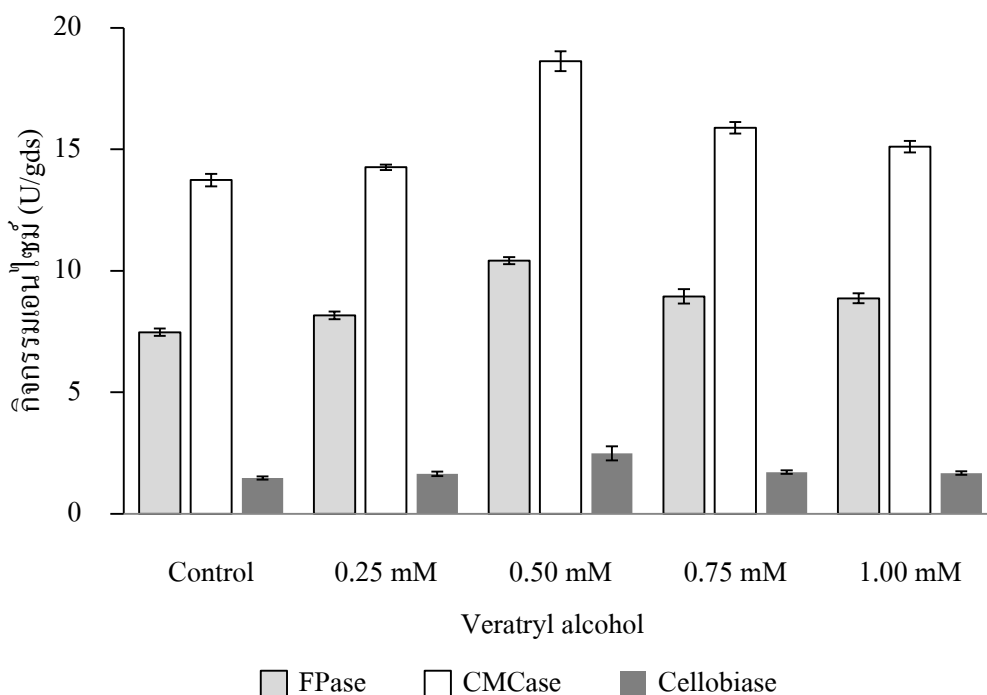
ภาพที่ 3.52 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทริลแอลกอฮอล์เป็นตัวเหนี่ยวนำ



ภาพที่ 3.53 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทริลแอลกอฮอล์เป็นตัวเหนี่ยวนำ



ภาพที่ 3.54 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทริลแอลกอฮอล์เป็นตัวเหนี่ยวนำ



ภาพที่ 3.55 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทริลแอลกอฮอล์เป็นตัวเหนี่ยวนำ

การทดสอบผลของสารเหนี่ยวนำดีออกซิเจนในการผลิตเซลลูเลส โดยสารเหนี่ยวนำที่ไซโตไคนนในการศึกษาไดแก้น้ำตาลแลคโตส และเวราทริลแอลกอฮอล์ ผลการเหนี่ยวนำการสร้งเอนไซม์ของสารแต่ละชนิด พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตส 1.50 % w/w สามารถเหนี่ยวนำการสร้งเอนไซม์ได้ดีที่สุด โดยเชื้อราทั้งสองชนิดให้ผลไปในลักษณะเดียวกัน ขณะที่การใช้เวราทริลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 0.075 และ 0.050 มิลลิโมลาร์ สำหรับเชื้อ *P. coccineus* และ *P. sanguineus* ตามลำดับ เป็นตัวเหนี่ยวนำ พบค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการวิจัยของนักวิทยาศาสตร์อื่นๆ ที่พบว่าน้ำตาลแลคโตสเปปไทด์เหนี่ยวนำการสร้งเอนไซม์เซลลูเลส ดังรายงานของ Dhillon *et al.*, (2012) ที่พบว่าน้ำตาลแลคโตส เปปไทด์เหนี่ยวนำที่ดี ในการสร้งเอนไซม์เซลลูเลสใน *A. niger*

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์เซลลูเลสมีการสร้งในปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีซังข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงเป็นแหล่งคาร์บอน สนับสนุนแนวคิดที่ว่า การสร้งเอนไซม์เซลลูเลสมีกระบวนการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกัน กล่าวคือ อาจถูกควบคุมโดยโปรโมเตอร์เดียวกันหรืออาจถูกกระตุ้นได้โดยสารชนิดเดียวกัน (Haltrich *et al.*, 1994) รวมทั้งเวราทริลแอลกอฮอล์ ก็มีรายงานว่าสามารถเหนี่ยวนำการสร้งเอนไซม์เซลลูเลส (Dhillon *et al.*, (2012) และในกรณีของ *P. coccineus* และ *P. sanguineus* ที่เจริญในอาหารที่มีซังข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต มีผลทำให้เพิ่มการแสดงออกของยีนเอนไซม์เซลลูเลส (Margolles-Clark *et al.*, 1997) โดยปกติแล้วการสร้งเอนไซม์ของเชื้อราในกลุ่ม Basidiomycete จะสร้งในปริมาณต่ำในลักษณะของ constitutive enzyme และเอนไซม์มีการสร้งเพิ่มขึ้นได้เมื่อมีสารเหนี่ยวนำ หรืออาจเป็นไปได้ว่าการเติมเวราทริลแอลกอฮอล์ อาจช่วยเสริมการย่อยสลายลิกนิน ดังรายงานของ Kirk *et al.* (1998) ได้ศึกษากลไกการย่อยลิกนินของเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* พบว่าเส้นใยเชื้อราสร้างเอนไซม์ย่อยลิกนิน คือ lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) และ glyoxal oxidase (GLOX) ซึ่งเป็นตัวสร้าง H₂O₂ ขณะเกิดการย่อยสลายลิกนิน LiP จะย่อยสลายโครงสร้างลิกนินที่เป็น non-phenolic ในขณะที่มีการย่อยลิกนิน เชื้อราจะสร้างเวราทริลแอลกอฮอล์ ทำหน้าที่เป็นตัวชักนำ การสร้ง LiP และเป็นสารตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุให้กับ LiP ส่วน MnP จะย่อยสลายโครงสร้างลิกนินที่เป็น phenolic และสร้ง Mn³⁺ สารตัวกลางในรูปแบบ aromatic และ aliphatic ที่เกิดขึ้นจะถูกเชื้อราใช้ สารตัวสุดท้ายที่ได้จากการย่อยสลายลิกนิน คือ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และน้ำ อาจกล่าวได้ว่าเวราทริลแอลกอฮอล์ไม่ได้เป็นสารเหนี่ยวนำโดยตรง แต่ช่วยเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน ทำให้ลิกนินในสับสเตรตลดลงซึ่งจะทำให้ง่ายต่อการผลิตและการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

3.7 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสในชีวมวลด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *P. sanguineus*

จากการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *P. sanguineus* ภายใต้สภาวะการหมักที่เหมาะสมในการทดลองที่ผ่านมา (การทดลองที่ 2.4.7) โดยใช้ขี้ข้าวโพดที่ผ่านการเตรียมโดยการบดและปรับสภาพด้วยสารละลายกรดต่างเป็นสับสเตรต ใช้ระยะเวลาการหมัก 9 วัน ค่า pH 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทริลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 0.50 mM เป็นตัวเหนี่ยวนำ แต่ขยายขนาดให้ใหญ่ขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์หลังเสร็จสิ้นการหมัก ได้ตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งผลการทดลองพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอสเนสสูงที่สุดเท่ากับ 8.492 ± 0.702 , 14.141 ± 1.177 และ 4.255 ± 0.405 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองควบคุม (ค่า pH 5.5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนและตัวเหนี่ยวนำ) ตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และเซลโลไบเอสเนสสูงที่สุดเท่ากับ 3.365 ± 0.523 , 10.262 ± 0.374 และ 1.645 ± 0.311 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ



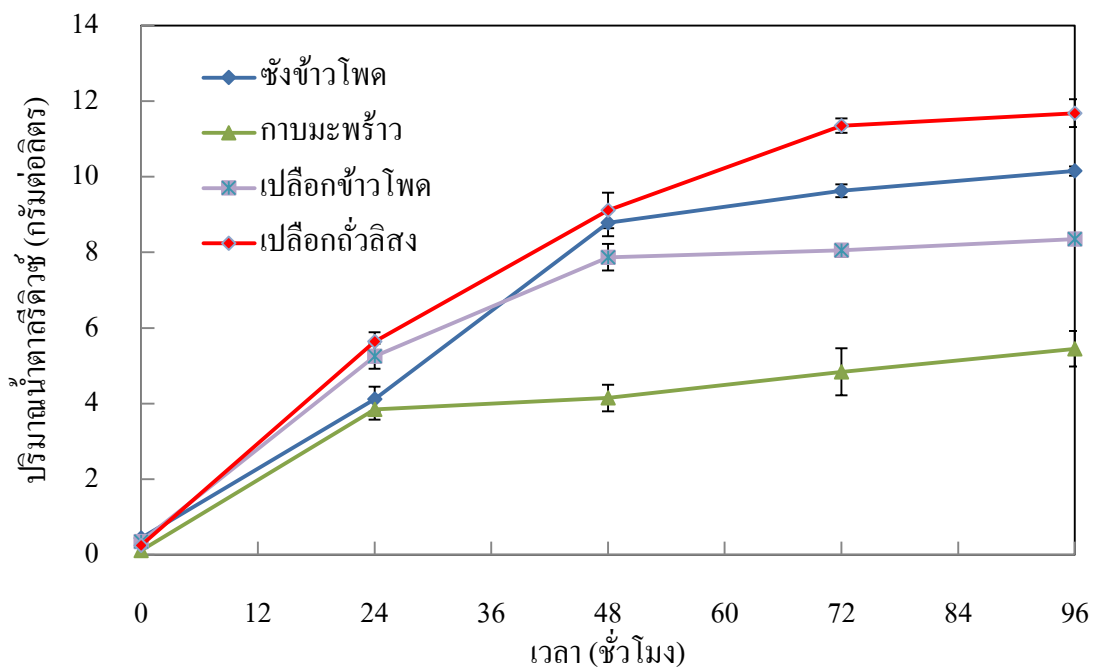
ภาพที่ 3.56 สารละลายเอนไซม์จากเชื้อ *P. sanguineus*

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *P. sanguineus* โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase), Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอสเนสสูงที่สุดเท่ากับ 8.492 ± 0.702 , 14.141 ± 1.177 และ 4.255 ± 0.405 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ปริมาตร 10

มิลลิลิตร (11.326 FPU/g substrate) ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 มาทำปฏิกิริยากับ สับสเตรตคือวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ชั่งข้าวโพด, กาบมะพร้าว, เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสง ปริมาณ 1.50 กรัม นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง นำไปแช่ในน้ำร้อน อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ผลการทดลองพบว่าจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการเปลี่ยนแปลงตามตารางที่ 3.22 และภาพที่ 3.57 ซึ่งจากภาพเห็นได้ว่าใน 24 ชั่วโมงแรก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชั่งข้าวโพด, กาบมะพร้าว, เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสงจะเพิ่มขึ้น และหลังจาก 24 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสยังคงเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ยกเว้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกาบมะพร้าว พบว่าเริ่มคงที่ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรก ขณะที่ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชั่งข้าวโพด, เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสงจะเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเปลือกถั่วลิสงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด (11.68±0.37 กรัมต่อลิตร) ตามด้วยน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชั่งข้าวโพด (10.15±0.43 กรัมต่อลิตร) เปลือกข้าวโพด (8.35±0.12 กรัมต่อลิตร) และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกาบมะพร้าวมีค่าต่ำที่สุด (5.45±0.47 กรัมต่อลิตร) ในชั่วโมงที่ 96 ของการย่อยสลาย

ตารางที่ 3.22 ผลการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *P. sanguineus* ที่เวลาต่างๆ

เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร			
	ชั่งข้าวโพด	กาบมะพร้าว	เปลือกข้าวโพด	เปลือกถั่วลิสง
0	0.44±0.00	0.11±0.00	0.35±0.00	0.25±0.00
24	4.12±0.27	3.85±0.27	5.25±0.33	5.64±0.25
48	8.78±0.31	4.15±0.35	7.87±0.35	9.11±0.47
72	9.63±0.52	4.84±0.62	8.05±0.17	11.35±0.19
96	10.15±0.43	5.45±0.47	8.35±0.12	11.68±0.37



ภาพที่ 3.57 ผลของเวลาการทำปฏิกิริยาต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรได้แตกต่างกัน ทั้งนี้เพราะปริมาณเส้นใยจำพวกเซลลูโลสของวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรชนิดต่างๆมีปริมาณที่ต่างกัน และอีกส่วนหนึ่ง อาจขึ้นอยู่กับโครงสร้าง หรือหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์เซลลูเลสที่สามารถที่จะจับเข้ากับเส้นใยจากวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรแต่ละชนิดแตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 3.57 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ยกเว้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกามมะพร้าวที่เริ่มคงที่ตั้งแต่เวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เริ่มลดลง ในส่วนหนึ่งอาจจะเป็นสาเหตุมาจากเกิดการสะสมของน้ำตาลเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้นในระบบ ซึ่งน้ำตาลเซลโลไบโอสจะเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสมีประสิทธิภาพในการทำงานต่ำลง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงาน Chen *et al.*, (2007) ซึ่งได้ศึกษาการย่อยชั่งข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *T. reesei* ZU-02 ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในปริมาณที่ต่ำ ส่งผลให้น้ำตาลเซลโลไบโอสไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β -1,4-exoglucanase และเอนไซม์ β -1,4-endoglucanase ทำให้การย่อยสลายเกิดขึ้นได้ต่ำ และจากการนำเอนไซม์ทางการค้า 3 ชนิดคือ Papidase Pomaliq (Gist-Brocades), Celluclast 1.5L (Novo) และ Clarex (Genencor) ในการย่อยสลายชั่งข้าวโพด พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสชนิด Papidase Pomaliq (Gist-Brocades) จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด รองลงมาคือ Celluclast

1.5L (Novo) และ Clarex (Genencor) ตามลำดับ เพราะว่าแอนไซม์ Papidase Pomaliq (Gist-Brocades) มีกิจกรรมแอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงกว่าแอนไซม์ชนิดอื่น (Hang and Woodams, 2001)

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น พบว่าได้น้ำตาลรีดิวิซ์ต่ำกว่างานวิจัยของ Sukumaran *et al.*, (2009) ที่ได้ศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์จากการย่อยฟางข้าวและชานอ้อยด้วย *T. reesei* RUT C30 และ *A. niger* TMCC7956 ได้น้ำตาลรีดิวิซ์เท่ากับ 26.3 และ 17.79 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และน้อยกว่างานวิจัยของ Chen *et al.*, (2007) ที่ศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์จากการย่อยชังข้าวโพดด้วย *T. reesei* และ *A. niger* NL02 ได้น้ำตาลรีดิวิซ์เท่ากับ 116.30 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ได้้น้ำตาลรีดิวิซ์สูงกว่างานวิจัยของกาญจนา และคณะ (2008) ที่ศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลจากกามมะพร้าวด้วย *A. niger* ได้น้ำตาลรีดิวิซ์เท่ากับ 2.106 กรัมต่อลิตร

จะเห็นได้ว่าแอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้มีศักยภาพที่นำมาใช้ในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร ถึงแม้ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่ได้อาจจะไม่สูงมาก หากมีการศึกษางานวิจัยนี้ต่อไป ควรศึกษาชนิด และคุณสมบัติของแอนไซม์เซลลูเลสให้มากขึ้นรวมถึงควรศึกษาปฏิกิริยาอื่นที่มีผลต่อการผลิตแอนไซม์ของเชื้อ เช่นศึกษาวิธีการปรับสภาพชีวมวลด้วยวิธีการอื่นเช่น การใช้ไอน้ำร้อนในสถานะที่รุนแรง (steam explosion) การใช้แอมโมเนียในสถานะที่รุนแรง (ammonia fiber explosion, AFEX) และการปรับสภาพด้วยโอโซน (ozonolysis) เป็นต้นเพื่อให้ได้วิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลาย รวมทั้งการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม มาใช้ในการตัดต่อยีนที่ผลิตแอนไซม์เซลลูเลสไปยังจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและทำการเพาะเลี้ยงได้ง่ายเพื่อการผลิตแอนไซม์ในปริมาณที่มากขึ้นและมีกิจกรรมแอนไซม์ที่มากกว่าเดิม (Ohmiya *et al.*, 1988 ; Rincon *et al.*, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไวท์รอตทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. coccineus*, *P. sanguineus*, *T. pavonia*, *G. australe* และ *G. mastoporum* โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ช้างข้าวโพด กาบมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการบดละเอียดและการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่างเป็นสับสเตรตผลการศึกษาสรุปได้ดังต่อไปนี้

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้เชื้อรา *P. coccineus*, *P. sanguineus* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้ช้างข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรตสามารถให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 9 ซึ่งสูงกว่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จาก *T. pavonia*, *G. australe* และ *G. mastoporum* เมื่อพิจารณาสับสเตรตทั้ง 4 ชนิดแล้วช้างข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสง สามารถนำมาใช้เป็นสับสเตรตในการผลิตเอนไซม์ได้ เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงใกล้เคียงกัน ส่วนเมื่อใช้กากมะพร้าวเป็นและเปลือกข้าวโพดเป็นสับสเตรตพบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสต่ำกว่าเล็กน้อย ดังนั้นหากจะนำมาใช้แทนกันได้ต้องให้ความสำคัญในเรื่องของการปรับสภาพของสับสเตรตหรือแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้ก่อน เนื่องจากสับสเตรตมีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบต่างกัน รวมถึงโครงสร้างทางกายภาพที่ต่างกันทำให้มีการย่อยสลายยากต่างกัน

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมจึงเลือกใช้เชื้อรา *P. coccineus* และ *P. sanguineus* ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูง โดยใช้ช้างข้าวโพดและเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ได้ทำการแปรผัน pH เริ่มต้น อุณหภูมิ แหล่งไนโตรเจน และตัวเหนียวน้ำ ผลจากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือใช้ระยะเวลาการหมัก 9 วัน pH เริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีตัวเหนียวน้ำคือน้ำตาลแลคโตส หรือ เวกาทิลแอลกอฮอล์ สภาวะนี้เป็นสภาวะที่ได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาแล้วข้างต้นได้นำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *P. sanguineus* ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายช้างข้าวโพด กาบมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสง ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้เป็นสับสเตรตในการผลิตไบโอเอทานอล โดยติดตามผลการย่อยสลายที่เวลาต่างๆ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเปลือกถั่วลิสงมีปริมาณ

น้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด (11.68 ± 0.37 กรัมต่อลิตร) รองลงมาเป็นซังข้าวโพด (10.15 ± 0.43 กรัมต่อลิตร) เปลือกข้าวโพด (8.35 ± 0.12 กรัมต่อลิตร) และกามมะพร้าวมีค่าต่ำที่สุด (5.45 ± 0.47 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับที่ 96 ชั่วโมง น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นสับสเตรตในการที่จะพัฒนาการผลิตไบโอเอทานอลต่อไป



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา พานแก้ว จิณาภา ศรีภิรมย์ ธนากร ค่ายหนองสรวง พุทธพร แสงเทียน และนารีรัตน์ มูลสීමใจ.
การผลิตไบโอเอทานอลจากกากมะพร้าว. *การประชุมวิชาการ วิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์
แห่งประเทศไทยครั้งที่ 18*; ตุลาคม 20-21, 2008; พัทยา, ประเทศไทย.

ฉัตรชัย ไกรสรพงษ์. การผลิตเอทานอลจากกากของเสียการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร. กอง
วิจัยพัฒนายุทศาสตร์. ศูนย์พัฒนาปิโตรเลียมภาคเหนือ กรมการพลังงานทหาร; 2548

จุฑามาศ รดา. การผลิตเอทานอลจากกากของเสียจากดิน. [วิทยานิพนธ์ปริญญาโท].
กรุงเทพฯ, ประเทศไทย: มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2553

เบญจวรรณ ยนต์วิเศษภักดี. การผลิตเอทานอลจากกากของเสียจากโรงกลั่นน้ำตาล. [วิทยานิพนธ์ปริญญาโท].
กรุงเทพฯ, ประเทศไทย: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2545.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. *อุตสาหกรรมน้ำตาล*. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์
แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2548.

นิ ร น า ม 1. โ ม เ ล กู ล ข อ ง เซ ล ลู โ ล ส . [ระ บ บ อ อ น ไ ล น์]. แห ล ง ที่ ม า
<http://www.intechopen.com/source/html/45443/media/image1.png> [10 กันยายน 2557].

ปรีชาต คนเชื้อ. การคัดเลือกและการผลิตเอทานอลจากกากของเสียจากโรงกลั่นน้ำตาล. [วิทยานิพนธ์ปริญญา
โท]. กรุงเทพฯ, ประเทศไทย: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2549

วาสนา วงใหญ่. พฤษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2541

วิไลวรรณ โชติเกียรติ และอมรรัตน์ พงศ์ดารา. การสกัดเอทานอลจากกากของเสียจากโรงกลั่นน้ำตาล.
[วิทยานิพนธ์ปริญญาโท]. สงขลา, ประเทศไทย: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2523

วรรณิ แฝงจันทิก และวิชัย เพ็ชรดี. การศึกษาการสกัดเอทานอลจากฟางข้าว. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.; 2546

รุสนี โตะกิเล. คุณสมบัติเพื่อการประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมของเอนไซม์ผสมที่ผลิตจากจุลินทรีย์
สารเร่ง พด.1 โดยใช้ขานอ้อย และเปลือกถั่วลิสง เป็นแหล่งคาร์บอน. [วิทยานิพนธ์ปริญญา
มหาบัณฑิต]. สงขลา,ประเทศไทย:มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์;2552

ศศิธร ไกรฤทธิชัย. การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการย่อย
สลายใบไม้. [วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต]. เชียงใหม่, ประเทศไทย :
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่;2552

สัณห์สัน สันจรรยาศักดิ์. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลันเนสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* และการใช้
ประโยชน์ ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม[วิทยานิพนธ์ปริญญา
มหาบัณฑิต]. สงขลา,ประเทศไทย:มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์;2554

สุนันทา ชูแก้ว.การผลิตเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต.[วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต].
กรุงเทพฯ,ประเทศไทย:จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย;2549

สุนันทา ภิณณาวัธน์. *ชีวเคมี 2*. กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง;2547

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรและสหกรณ์. สถิติการเกษตรปีการเพาะปลูก. 2556 จาก
http://www.oae.go.th/main.php?filename=journal_all

หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และเนริสา คุณประทุม. การผลิตไซแลนเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้วัสดุ
เหลือใช้จากการเกษตร.[วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ,ประเทศไทย:
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย;2545.

Akidumila, F. and Glatz, B.A. Growth and production of *Apiotrichum curvatum* in tomato Juice. *Journal
of Food Protection*. 1998;6:1515-1517.

Alam, M.Z., Muhammad, N., Mahmat, M.E. Production of cellulase from oil palm biomass as
substrate by solid state bioconversion. *American Journal of Applied Science*. 2005;2:569-
572.

Ali, S., Sayed, A., Sarker, T.I. and Alam, R. Factors affecting cellulase production by *Aspergillus terreus*
using water hyacinth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1991;43:518-520.

- Ali, U.F., Hala, S. and El-Dein, S. Production and partial purification of cellulase complex by *Aspergillus niger* and *A. nidulans* Grown on water hyacinth blend. *Journal of Applied Sciences Research*. 2008;4:875-891.
- AOAC . Official Methods of Analysis : Moisture in Animal Feed. (7.007). USA:Association of Official Analytical Chemists, Arling ton;1990.
- Bansal, N., Tewari, R., Gupta, J.K., Soni, S.K., Soni, R., 2011. A novel strain of *Aspergillus niger* producing a cocktail of industrial depolymerising enzymes for the production of second generation biofuels. *BioResources*. 2011;6:552-569.
- Bharthare, P., Shrivastava, P., Singh, P. and Tiwari A. Peanut shell as renewable energy source and their utility in production of ethanol. *International Journal of Advance Research*. 2014;2:1-4
- Bhat, M.K. and Bhat, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*. 1997;15:583-620.
- Bisaria, V.S. *Bioprocessing of Agro-residues to glucose and chemicals*. London: Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products. 1991;210-213.
- Boze, H., Moulin, G. and Galzy, P. *Production of Microbial Biomass*. New York:VCH Publishers Inc.1995;170-220.
- Chaabouni, bS.E., Belguith, H., Hassairi, I., M'-Rad, K. and Ellouz, R. Optimization of cellulase production by *Penicillium occitanis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995;43: 267-269.
- Chang, S. and Miles, P.G. *Edible mushrooms and their cultivation*. Florida:CRC Press.1989
- Chahal, D.S. Solid-sate fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985;49:205-210.
- Cheah, S.C., Ma, N.N., Ooi, L.C.L. and Ong, A.S.H. Biotechnological application for the utilization of wastes from palm oil mills. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 1988;90:536-540.

- Chen, M., Xia, L. and Xue, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2007;59:85-89.
- Clarke, A.J. *Biodegradation of Cellulose: Enzymology and Biotechnology*. Lancaster: Technomic Pub. 1997;23-68.
- Cooke, R.C. and Whipps, J.M. *Ecophysiology of fungi*. Oxford: Blackwell Scientific;1993
- Das, A. and Ghosh., U. Solid-state fermentation of waste cabbage by *Penicillium notatum* NCIM NO 923 for production and characterization of cellulases. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2009;68:714-718.
- de Castro, A.M., de Albuquerque, de Carvalho, M.L., Leite, S.G., Pereira, N.J. Cellulase from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2010;37:151-158.
- DeMenezes, T.J.B. Fungal cellulases as an aid for the saccharification in cassava. *Biotechnology*. 1978;7:259-264.
- Deswal, D., Khasa, Y.P., Kuhad, R.C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technology*. 2011;102:6065-6072.
- Desal, J.D., Desai, A.J. and Patel, N.P. Production of cellulase and β -glucosidase by shake culture of *Scytalidium lignicola*. *Journal of Fermentation Technology*. 1988;60:117-124.
- Dhillon, G.S., Kaur, S., Brar, S.K. and Verma, M. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*. 2012;38:6-13.
- Dutta, T., Sahoo, R., Sengupta, R., Ray, S.S., Bhattacharjee, A. and Ghosh, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2008;35:275-282.

- Eylen, D., van, Dongen, F., van, Kabel, M.A., and Bont, J.A.M. de. Corn fiber, cobs and stover: Enzyme-aided saccharification and co-fermentation after dilute acid pretreatment *Bioresource Technology*. 2011;102:5995–6004.
- Fan, L. T., Gharpuray, M. M. and Lee, Y-H. *Cellulose hydrolysis*. London:Springer-Verlag berlin Heidelberg;1987
- Fang, X., Yano, S., Inoue, H. and Sawayama S. Lactose enhances cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008;106:115-120
- Fujian, X., Hongzhang, C. and Zuohu, L. Effect of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;30:45-48.
- Gao, J. Weng, H., Zhu, D., Yuan, M., Guan, F. and Xi, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*. 2008;99:7623-7629.
- Ghose, T.K. Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987;59:257-268.
- Goodwin, T.W. and E.I. Mercer. *Introduction of Plant Biochemistry*. New york: pergamon Press;1988
- Gomori, G. *Methods in Enzymology*. New York:Academic Press;1955
- Graminha, E.B.N. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 2008;144:1-22.
- Greaves, H. The effect of substrate availability on cellulolytic enzyme production by selected wood rotting microorganisms. *Australian Journal of Biological Sciences*. 1971;24:1167-1180.
- Gupte, A. and Madamwar, D. Solid State Fermentation of Lignocellulosic Waste for Cellulase and beta-Glucosidase Production by Cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1997;62:267-274.

- Haltrich, D., Laussamayer, B., Steiner, W., Nidetzky, B., and Kulbe, K.D. Cellulolytic and hemicellulolytic enzymes of *Sclerotium rolfsii*: Optimization of the culture medium and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. *Bioresource Technology*. 1994;50: 43-50.
- Hang, Y.D. and Woodams, E.E. Enzymatic production of reducing sugar from corn cobs. *LWT-Food Science and Technology*. 2001;34:140-142
- Hankin, L., and Anagnostakis, S.L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of micro-organisms. *Journal of general microbiology*.1977;98:109-115.
- Have, R.T. and Franssen, M.C.R. On a revised mechanism of side product formation in the lignin peroxidase catalyzed oxidation of veratryl alcohol. *FEBS Letters*. 2001;487:313-317.
- Haq, K., Hameed, U., Shahzadi, K., Javed, M.M., Ail, S. and Qadeer, M.A. Cotton saccharifying activity of cellulase by *Trichoderma harzianum* UM-11 in shake flask. *International Journal of Botany*. 2005;1:19-22.
- Huda, M.S., Drzal, L.T., Mohanty, A.K. and Misra, M. Effect of fiber surface-treatments on the properties of laminated biocomposites from poly-lactic acid (PLA) and kenaf fibers. *Composites Science and Technology*. 2008;68:424-432.
- Hurst, C.J., Crawford, R.L., Knudsen, G.R., Mcinerney, M.J. and Stetzenbach, L.D. *Manual of Environmental Microbiology*. Washington DC:Press American Society for Microbiology; 2002
- Immanuel, G., Bhagavath, C.M.A., Raj, P.I., Esakkiraj, P. and Palavesam, A. Production and partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* fermented in coir waste and sawdust. *The Internet Journal of Microbiology*. 2007;3:1-12.
- Israel, A.U., Ogali, R.E., Akaranta, O. and Obot, I.B. Extraction and characterization of coconut (*Cocos nucifera* L.) coir dust. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2011;33:717-724.
- Jatinder, K., Chadha, B.S. and Saini, H.S. Optimization of culture condition for production of cellulase and xylanase by *Scytalidium thermophilum* using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006;22:169-176.

- Joglekar, A.V. and Karanth, N.G. Studies on cellulose production by a mutant *Penicillium funiculosum* UV-49. *Biotechnology and Bioengineering*. 1984;26:1079-1084.
- Jørgensen, H., Eriksson, T., Borjesson, J. and Tjerneld, F. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003;32:851-861.
- Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M. and Viikari, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*. 2005;40:3519-3525.
- Kalra, M.K., Sidhu, M.S., Sandhu, D.K. and Sandhu, R.S. Production and regulation of celulase by *Trichoderme harzianum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1984;20:427-429.
- Kathiresan K. and Manivannan, S. α -amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizospheric soil. *African Journal of Biotechnology*. 2006;5:829-832.
- Keskar, S.S. Cellulase production by *Penicillium janthinellum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1992;8:534-535.
- Kim, T.J., Kim, M.J., Kim, B.C., Kim, J.C., Cheong, T.K., Kim, J.W. and Park, K.H. Directed evolution of *Thermus* maltogenic amylase toward enhanced thermal resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999;65:1644-1651.
- Kirk, T. K. and D. Cullen. *Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi*. Canada: John Wiley&Sons;1998
- Kuhad, R.C. and Singh, A. *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*. New Delhi:International publishing House;2007.
- Latifian, M., Hamidi-Esfahani, Z. and Barzegar, M. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solidstate fermentation conditions. *Bioresource Technology*. 2007;98:3634-3637.

- Liming, X. and Cen, P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry*. 1999;34:231-239.
- Liming, X. and Xueliang, S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresource Technology*. 2004;91:259-262.
- Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Wu, H., Xu, D., Tang, Z. and Shen, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2011; 65:717-725.
- Long, C.N., Ou, Y.Q., Guo, P., Liu, Y.T., Cui, J.J., Long, M.N. and Hu, Z. Cellulase production by solid state fermentation using bagasse with *Penicillium decumbens* L-06. *Annals of Microbiology*. 2009;59:517-523.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Faww, A.L., and Randall, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;195:265-275.
- Lynd, L.R. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002;66:506-577.
- Maeda, R.N., da Silva, M.M., Santa Anna, L.M. and Pereira, N. Jr. Nitrogen source optimization for cellulase production by *Penicillium funiculosum*, using a sequential experimental design methodology and the desirability function. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010;161:411-22.
- Margolles-Clark, E., Hayes, C.K., Harman, G.E. and Penttilä, M. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62:2145-2151.
- Mathew, G.M., Sukumaram, R.K., Singhanian, R.R. and Pandey, A. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2008;67:898-907.

- Mekala, N.K., Singhania, R.R., Sukumaran, R.K. and Pandey, A. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical optimization of process parameters. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 2008;151:122-131.
- Milala, M.A., Shugaba, A., Gidado, A., Ene, A.C., Wafer, J.A. Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme productions by *Aspergillus niger*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*.2005;1: 325-328.
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Journal of Analytical Chemistry*. 1959;31:426-428.
- Miyamoto, K. Renewable biological system for alternative sustainable energy production. *Agricultural Services Bulletin* 128;1997
- Miyamoto, K. *Production of fuel alcohol from cellulosic biomass: in renewable biological systems for alternative sustain-able energy production*. Japan:FAO Agricultural service Bulletin (128);1997.
- Mo, H., Xiaoyong, Z. and Zuohu, L. Control of gas phase for enhanced cellulase production by *Penicillium decumbens* in solid-state culture. *Process Biochemistry*. 2004;39:1293-1297.
- Ohmiya, K., Nagashima, K., Kajino, T., Goto, E., Tsukada, A. and Shimizu, S. Cloning of the cellulase gene from *Ruminococcus albus* and its expression in *Escherichai coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988;54:1511-1515.
- Oikawa, T., Takagi, M. and Ameyama, M. Detection of carboxymethyl cellulase activity in *Acetobacter xylinum* KU-1. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 1994;58:2102-2103.
- Ong, L.G.A., Abd-Aziz, S., Noraini, S., Karim, M.I.A. and Hassan, M.A. Enzyme production and profile by *Aspergillus niger* during solid substrate fermentation using plam kernel cake as substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004;118:73-79.
- Ortega, J. Production of extracellular cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum lycopersici*. *Texas Journal of Science*. 1990;42: 405-410.

- Pandey, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2003;13:81-84.
- Perrin, D.D. and Dempsey, B. *Buffers for pH and Metal Ion Control*. London;Chapman and Hall;1974
- Pothiraj, C., Balaji P. and Eyini M. Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste. *African Journal of Biotechnology*. 2006;20:1882-1885.
- Prasertsan, P., Kittikul, H.A. and Chitmanee, B. Isolation and selection of cellulolytic fungi from palm oil mill effluent. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 1992;8:614-617.
- Ray, L., Pal, A., Ghosh, A.K. and Chattopadhyay, P. Cellulases and beta-glucosidase from *Aspergillus niger* and saccharification of some cellulosic wastes. *Journal of Microbial Biotechnology*. 1993; 8:85-94.
- Rincon, M.T., McCrac, S.I., Kirby, J., Scott, K.D. and Flint, H.J. EndB, a multidomain family 44 cellulase from *Ruminococcus flavefaciens* 17, binds to cellulose via a novel cellulose-binding module and to another *R. flavefaciens* protein via a dockerin domain. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67:4426-4431.
- Rodriguez, S., Longo, M.A., Cameselle, C. and Sanroman, A. Production of manganese peroxidase and laccase in laboratory-scale bioreactor by *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess Engineering*. 1999;20:531-535.
- Roussos, S., Raimbault, M., Saucedo, C.G. and Lonsane, B.K. Efficient leaching of cellulases produced by *Trichoderma harizanum* in solid state fermentation. *Biotechnology Techniques*. 1992;6:429-432.
- Rubin, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 2008;454:841-5.
- Saczi, A., Radford, A. and Erenler, K. Detection of cellulolytic fungi by using congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. *Journal of Applied Bacteriology*. 1986;61:559-562.
- Sánchez, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 2009;27:185-194.

- Sidhu, M.S. Production, purification and characterization of cellulase from *Trichoderma longibranchiatum*. *Process Biochemistry*. 1983;18:13-15.
- Singh, V.K. and Kumar, A. Production and purification of an extracellular cellulase from *Bacillus brevis* VS-1. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 1998;45:443-452.
- Singh, A. and Hayashi, R. Microbial cellulose; protein architecture, molecular, properties and biosynthesis. *Advances Applied Microbiology*. 1995;40:1-35.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K. and Pillai, A. Solid-state fermentation of lignocellulosic substrates for cellulase production by *Trichoderma reesei* NRRL 11460. *Indian journal of Biotechnology*. 2006; 5:332-336.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R. and Pandey, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2009;44:13-18.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010;46:541- 549.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K. and Pandey, A. Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2007;142:60-70.
- Sukumaran, R.K., Singhania, R.R. and Pandey, A. Microbial cellulases - Production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2005;64: 832-844.
- Sukumaran, R.K. Singhania, R.R. Mathew, G.M. and Pandey, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio- ethanol production. *Renewable Energy*. 2009;34:421-424.
- Teather, R.M. and Wood, P.J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982;43:777-780.

- Tsao, G.T. and Chaing, L. *Cellulose and hemicellulose technology. In The Filamentous Fungi*. New York:John Wiley & Son Inc;1983.
- Tsao, G.T, Xia, L. and Cao, N. Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* for cellobiase production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2000;84:743-749.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 1991;74:3583-3597.
- Wood, T.M., Wilson, C.A. and Stewart C.S. Preparation of the cellulase from the cellulolytic anaerobic rumen bacterium *Ruminococcus albus* and its release from the bacterial cell wall. *Biochemical Journal*. 1982;205:129-137.
- Wood, T.M., Sheila, I.M. and Bhat, K.M. The mechanism of fungal cellulase action: Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing bond-ordered cellulose. *Biochemistry Journal*. 1989;260:37-43.
- Wood, T.M. and Sheila I. McCrae. Cellulase from *Fusarium solani* Purification and properties of C1 component. *Carbohydrate Research*. 1997;57:117-133.
- Yue, F., Jian-Xin, J. and Li-Wei, Z. Recent development in activities, utilization and sources of cellulase. *Forestry Studies in China*. 2009;3:202-207.
- Zeng, G.M., Shi, J.G., Yuan, X.Z., Liu, J. and Zhang, Z.B. Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;39:1451-1456.
- Zhang, Y.-H., Percival, M.E. and Jonathan R.M. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. 2006;24:452-481.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA)

ประกอบด้วยองค์ประกอบดังนี้

PDA สำเร็จรูป	39.5	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย PDA สำเร็จรูป 39.5 กรัมในน้ำกลั่นอุ่นปริมาตร 1 ลิตร นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเทอาหารลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มล.ต่อ 1 จาน ทิ้งไว้จนแข็งตัว ปิดฝาแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อไว้ใช้ต่อไป

อาหารแข็งวุ้นคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC agar) (Hankin, and Anagnostakis, 1977)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	กรัม
KH_2PO_4	4	กรัม
$\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11.32	กรัม
Na_2HPO_4	6	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Carboxymethyl cellulose (CMC)	5	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20	กรัม

ละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ในน้ำอุ่นปริมาตร 2 ลิตร คนตลอดเวลาจนละลายหมด ปรับ pH เป็น 7.0 จากนั้นเติมผงวุ้น 15 กรัมแล้วต้มอาหารเลี้ยงเชื้อจนวุ้นละลายหมด นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเทอาหารลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มล.ต่อ 1 จาน ทิ้งไว้จนแข็งตัว ปิดฝาแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อไว้ใช้ต่อไป

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

วิธีการเตรียมสาร Neutral Detergent

ชั่ง sodium lauryl sulphate 60 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร แล้วนำมาใส่ใน Volumetric flask ขนาด 2 ลิตร โดยใช้กรวยกรองและแท่งคนสารละลายช่วย เสร็จแล้วล้าง Sodium lauryl sulphate ที่ติดค้างอยู่ในบีกเกอร์ด้วยน้ำร้อน โดยใช้ขวดฉีดน้ำร้อน ฉีดแล้วเทรวมใส่ใน Volumetric flask เดิม เขย่าเบาๆ เติม Ethyleneglycol monoethylether (2-Ethoxyethanol) 20 มิลลิลิตร ใสลงใน Volumetric flask ในเขย่าให้เข้ากัน ละลาย disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) 9.12 กรัม , Sodium tetraborate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 13.62 กรัม และ Disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA) dehydrate 37.22 กรัม ด้วยน้ำกลั่นที่ร้อนแล้วนำมาผสมกับสารละลาย เทใส่ volumetric flask เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตรปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรพอดีขีดด้วยน้ำกลั่นและปรับ pH ให้ได้ 6.9 – 7.1

วิธีเตรียมสารละลาย Acid Detergent Fiber

ชั่งซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4 conc, AR grade) 51.08 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเทใส่ volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 200 มิลลิลิตร ล้างกรดที่อยู่ในบีกเกอร์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วเทลงใน volumetric flask เดิม แล้วเขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้พอดีขีด ปิดฝา เขย่า 3 ครั้ง ให้เข้ากัน ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรพอดีขีด volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่า 2-3 ครั้งให้เข้ากัน

ชั่ง CTAB 20 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เทใส่ลงในขวดสำหรับเก็บสารละลาย Acid Detergent Fiber โดยใช้กรวยกรองและแท่งคนสารละลายช่วย ล้าง CTAB ที่ติดค้างในบีกเกอร์ ด้วยสารละลาย sulfuric acid ความเข้มข้น 1 นอร์มอล แล้วใส่ลงในขวดเก็บสารละลาย Acid Detergent Fiber ที่มี CTAB อยู่แล้ว 3 ครั้ง เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทกรดซัลฟูริกที่เหลือใส่ในขวดสารละลาย Acid Detergent Fiber และเขย่าให้เข้ากัน

สารละลายสำหรับการย้อมจุลินทรีย์ในสื่อนอาหารแข็ง CMC Agar

สารละลายสี Congo red

ละลาย Congo red 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ทำการปรับปริมาตรสารละลายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

สารละลาย 1M Sodium Chloride

ละลาย Sodium chloride (NaCl) 58.44 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้ว

สารเคมีวิเคราะห์ที่กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้วิธี DNS Method (Miller, 1959) ในการหาปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น

Dinitrosalicylic acid reagent (DNS reagent) (Miller, 1959)

ชั่ง 3, 5-dinitrosalicylic acid 10.6 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1,416 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ชั่ง NaOH 19.8 กรัม เติมลงไปคนให้ละลายเข้ากันให้หมด ชั่ง sodium potassium tartrate tetrahydrate 306 กรัม คนให้ละลายจนหมด ชั่ง phenol 7.6 กรัม คนให้ละลายจนหมด ชั่ง sodium metabisulfite 8.3 กรัม คนให้ละลายจนหมด เก็บไว้ในขวดสีชา

สารละลายยับยั้ง (2% CMC) วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Endoglucanase

ละลาย Carboxymethyl cellulose 2.0 กรัม ใน 0.05 M citrate buffer (pH 4.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงนำมาใช้เป็นสารละลายยับยั้ง

สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน โดยวิธี modified Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

Reagent A: NaCO_3 1 กรัม ในสารละลาย 40% NaOH 50 มิลลิลิตร (NaOH 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร)

Reagent B₁: 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02 กรัม ในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร)

Reagent B₂: 2% $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 กรัม ในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร)

ทำการเตรียม Reagent C = Reagent A: Reagent B₁: Reagent B₂ = 50 : 0.5 : 0.5

(เตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้)

Folin-ciocalteu's phenol reagent

สารละลายมีความเข้มข้น 2 N ก่อนนำมาใช้ต้องนำมาเจือจางในน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 N เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมสารละลายโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ ตามวิธีของ Gomori (1955 อ้างโดย Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย A : 0.05 M citric acid ($C_6H_8O_7 \cdot 7H_2O$ 10.51 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 14.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

พีเอช	ปริมาตร A	ปริมาตร B
3.0	46.5	3.5
3.2	43.7	6.3
3.4	40.0	10.0
3.6	37.0	13.0
3.8	35.0	15.0
4.0	33.0	17.0
4.2	31.5	18.5
4.4	28.0	22.0
4.6	25.5	24.5
4.8	23.0	27.0
5.0	20.5	29.5
5.2	18.0	32.0
5.4	16.0	34.0
5.6	13.7	36.3
5.8	11.8	38.2
6.0	9.5	40.5
6.2	7.2	42.8

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส และวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ (Ghose, 1987)

1.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส (Exoglucanase)

วิธีการ

1. ใส่ 0.05 M Citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ใส่กระดาษ whatman No.1 ขนาด 1x6 เซนติเมตร (50 มิลลิลิตร)
3. ใส่ตัวอย่างเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. นำไปอุ่นใน water bath ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาทีและทิ้งไว้ให้เย็น
6. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M Citrate buffer pH 4.8 แทนเอนไซม์เป็น blank

วิธีคำนวณค่า Unit of enzyme ของวิธี The International Union of Biochemistry

กำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในระยะเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ (อุณหภูมิ 50°C ระยะเวลา 60 นาที)

1 ยูนิตเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) คือ 1 μmol ของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที

คือ 1 μmol ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

คือ 0.180 mg กลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

ถ้ากลูโคส 0.180 มิลลิกรัม ถูกปลดปล่อยออกมา ภายใน 1 นาที มีค่า 1 ยูนิต

ถ้ากลูโคส 1.0 มิลลิกรัม ถูกปลดปล่อยออกมา ภายใน 60 นาที มีค่า $\frac{1}{(0.180 \times 60)}$

มีค่า 0.0925 ยูนิต

จากการทดสอบใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ที่สภาวะ 60 นาที	มีค่า	0.0925 ยูนิต
การทดสอบใช้ เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ที่สภาวะ 60 นาที	มีค่า	<u>0.0925</u>
		0.5
	=	0.185 ยูนิต

ดังนั้น ยูนิตของกิจกรรมเอกโซกลูคาเนส เท่ากับ $0.185 \times$ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)

1.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (Endoglucanase)

วิธีการ

1. ใส่ 2% CMC ที่ละลายใน 0.05 M Citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ใส่ตัวอย่างเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปอุ่นใน water bath ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาทีและทิ้งไว้ให้เย็น
5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M Citrate buffer pH 4.8 แทนเอนไซม์เป็น blank

วิธีคำนวณค่า Unit of enzyme ของวิธี The International Union of Biochemistry

กำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในระยะเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ (อุณหภูมิ 50°C ระยะเวลา 30 นาที)

- 1 ยูนิตเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) คือ 1 μmol ของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที
 คือ 1 μmol ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที
 คือ 0.180 mg กลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

ถ้ากลูโคส 0.180 มิลลิกรัม ถูกปลดปล่อยออกมา ภายใน 1 นาที	มีค่า	1 ยูนิต
ถ้ากลูโคส 1.0 มิลลิกรัม ถูกปลดปล่อยออกมา ภายใน 30 นาที	มีค่า	<u>1</u>
		(0.180 \times 30)
	มีค่า	0.185 ยูนิต

จากการทดสอบใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ที่สภาวะ 30 นาที	มีค่า	0.185 ยูนิต
การทดสอบใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ที่สภาวะ 30 นาที	มีค่า	0.185
		0.5
	=	0.37 ยูนิต

ดังนั้น ยูนิตของเอนโดกลูคาเนส เท่ากับ $0.37 \times$ ปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์ (mg/ml)

1.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เซลโลไบเอส (เบต้า-กลูโคซิเดส)

วิธีการ

1. ใส่ 15.0 mM เซลโลไบโอส ที่ละลายใน 0.05 M Citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ใส่ตัวอย่างเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปอุ่นใน water bath ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาทีและทิ้งไว้ให้เย็น
5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M Citrate buffer pH 4.8 แทนเอนไซม์เป็น blank

วิธีคำนวณค่า Unit of enzyme ของวิธี The International Union of Biochemistry

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 2 ไมโครโมล ในระยะเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ (อุณหภูมิ 50°C ระยะเวลา 60 นาที)

1 ยูนิตเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร) คือ 1 μmol ของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที

คือ 2 μmol ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

คือ 0.360 mg กลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

ถ้ากลูโคส 0.360 มิลลิกรัม ถูกปลดปล่อยออกมา ภายใน 1 นาที มีค่า 1.0 ยูนิต

ถ้ากลูโคส 1.0 มิลลิกรัม ถูกปลดปล่อยออกมา ภายใน 30 นาที มีค่า 1.0

(0.360 \times 30)

$$\begin{aligned} \text{จากการทดสอบใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ที่สภาวะ 30 นาที} \quad & \text{มีค่า} \quad \frac{1.0}{(0.360 \times 30 \times 1.0)} \\ & = 0.0925 \text{ ยูนิต} \end{aligned}$$

ดังนั้น ยูนิตของกิจกรรมเซลโลไบเอส เท่ากับ $0.0925 \times$ ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ (mg/ml)

1.4 การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์

ในงานวิจัยนี้ ทำการหมักในสภาพอาหารแข็งและสกัดตัวอย่างด้วยของเหลว โดยนำของเหลว มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ จึงบันทึกปริมาณของเหลวที่ได้จากขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง และปริมาณสับสเตรตที่ใช้ในการหมัก เพื่อรายงานผลกิจกรรมเอนไซม์ในรูปแบบ ยูนิตต่อกรัม สับสเตรต กิจกรรมเอนไซม์สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\frac{\text{ยูนิตของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรสุดท้ายที่ได้จากสกัดตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักสับสเตรตที่ใช้ในการหมัก (กรัม)}}$$

2. การทำกราฟมาตรฐาน

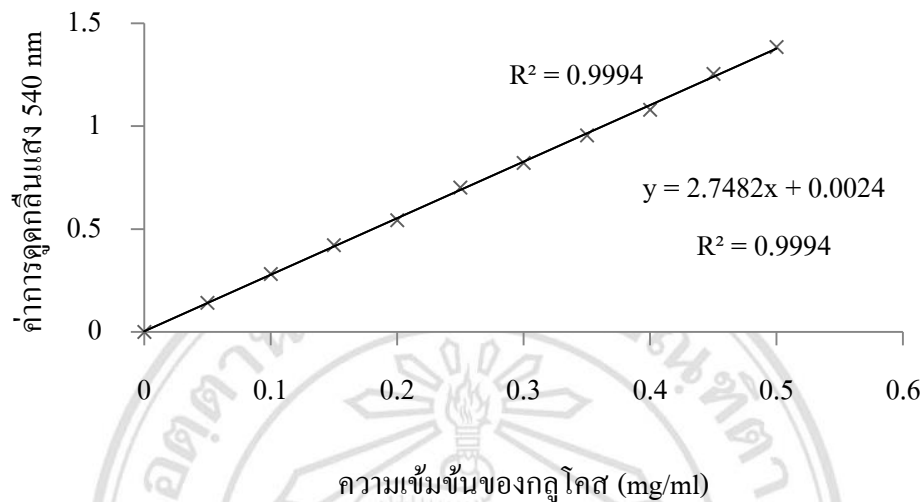
2.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวิซ์ และการคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์

ชั่งน้ำตาลกลูโคส 100 มิลลิกรัม นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเก็บเป็น stock solution

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จาก stock solution เสร็จแล้วชุดตัวอย่างที่เตรียมความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร (blank ใช้ น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทน) เติม DNS Reagent ลงไป 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นทันที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

กราฟมาตรฐานที่ได้ พบว่ามีสมการเส้นตรง $y = 2.7482x + 0.0024$ เมื่อแกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และแกน x คือความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนั้น เมื่อทราบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ สามารถแทนลงในค่า y เพื่อคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาล ได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาล (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm} - 0.0024}{2.7482}$$



ภาพที่ ค1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.2 กราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน และการคำนวณปริมาณโปรตีน

ซึ่ง Bovine serum albumin (BSA) ปริมาณ 0.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ทำการเจือจางสารละลาย BSA ให้มีระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย BSA ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ใส่ลงในแต่ละหลอด เติมสารละลาย reagent C ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี ก่อนตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลาย Folin-Phenol reagent ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณ BSA

สมการเส้นตรง $y = 0.003x + 0.012$ จากกราฟมาตรฐาน อธิบายได้ว่า เมื่อแกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และแกน x คือความเข้มข้นโปรตีนมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนั้น เมื่อทราบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ สามารถแทนลงในค่า y เพื่อคำนวณปริมาณโปรตีน ได้ดังนี้

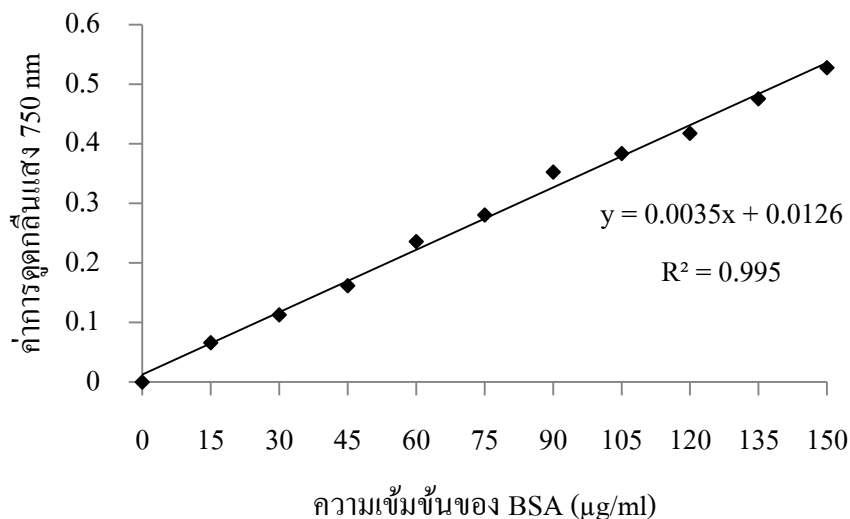
$$\text{ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm} - 0.012}{0.003}$$

ถ้าวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.435 นำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสมการ

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} &= \frac{0.435 - 0.012}{0.003} \\ &= 141 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร } (\mu\text{g/ml}) \end{aligned}$$

จากการทดลองใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.3 มิลลิลิตร

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น จะมีค่าปริมาณ โปรตีน} &= 141/0.3 \\ &= 470 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$



ภาพที่ ค12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการคำนวณกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ คำนวณได้จาก

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อกรัมสับสเตรต)} &= \\ &= \frac{\text{ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรสุดท้ายที่ได้จากสกัดตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักสับสเตรต (กรัม)}} \end{aligned}$$

2.3 การคำนวณกิจกรรมจำเพาะเอนไซม์

$$\text{กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์} = \frac{\text{กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมโปรตีนต่อสับสเตรต)}}$$



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

ตารางผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ง1 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T. pavonia* โดยการหมักในสภาพอาหารแห้งที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.057±0.009 ^d	0.132±0.011 ^c	0.057±0.009 ^d
	วันที่ 9	0.176±0.009 ^c	0.482±0.020 ^a	0.210±0.021 ^c
	วันที่ 12	0.114±0.007 ^b	0.504±0.014 ^b	0.030±0.009 ^c
70%	วันที่ 3	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.072±0.008 ^d	0.104±0.009 ^c	0.056±0.007 ^d
	วันที่ 9	0.209±0.019 ^c	0.419±0.024 ^a	0.153±0.030 ^c
	วันที่ 12	0.188±0.023 ^b	0.498±0.016 ^b	0.021±0.003 ^c
80%	วันที่ 3	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.029±0.007 ^d	0.065±0.014 ^c	0.047±0.005 ^d
	วันที่ 9	0.149±0.018 ^c	0.371±0.033 ^a	0.146±0.014 ^c
	วันที่ 12	0.155±0.014 ^b	0.429±0.011 ^b	0.032±0.009 ^c
90%	วันที่ 3	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.032±0.009 ^d	0.059±0.009 ^c	0.033±0.010 ^d
	วันที่ 9	0.126±0.016 ^c	0.368±0.027 ^a	0.098±0.014 ^c
	วันที่ 12	0.140±0.018 ^b	0.410±0.018 ^b	0.045±0.009 ^c

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจัดกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

ตารางภาคผนวกที่ ๑๒ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T. pavonia* โดยการหมักในสภาพอาหาร
แห้งที่ใช้กากมะพร้าวเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.088±0.023 ^d	0.052±0.033 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.298±0.057 ^d	0.467±0.036 ^c	0.050±0.011 ^d
	วันที่ 9	0.358±0.068 ^c	0.606±0.062 ^b	0.088±0.008 ^c
	วันที่ 12	0.338±0.085 ^d	0.575±0.076 ^c	0.060±0.007 ^b
70%	วันที่ 3	0.155±0.029 ^d	0.150±0.054 ^b	0.038±0.007 ^b
	วันที่ 6	0.364±0.046 ^d	0.617±0.086 ^c	0.082±0.010 ^d
	วันที่ 9	0.445±0.057 ^c	0.823±0.078 ^b	0.118±0.014 ^c
	วันที่ 12	0.342±0.031 ^b	0.649±0.093 ^d	0.088±0.015 ^c
80%	วันที่ 3	0.293±0.018 ^d	0.228±0.073 ^d	0.063±0.015 ^d
	วันที่ 6	0.382±0.046 ^d	0.691±0.077 ^c	0.091±0.010 ^c
	วันที่ 9	0.885±0.073 ^c	0.839±0.088 ^b	0.158±0.028 ^b
	วันที่ 12	0.642±0.041 ^d	0.708±0.063 ^c	0.106±0.011 ^{bc}
90%	วันที่ 3	0.325±0.042 ^d	0.258±0.051 ^d	0.083±0.006 ^d
	วันที่ 6	0.477±0.037 ^d	0.778±0.110 ^{bc}	0.122±0.014 ^c
	วันที่ 9	1.013±0.073 ^c	1.083±0.108 ^b	0.199±0.012 ^b
	วันที่ 12	0.816±0.066 ^b	1.126±0.162 ^c	0.146±0.011 ^c

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจับกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

ตารางภาคผนวกที่ 3 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T. pavonia* โดยการหมักในสภาพอาหารแห้งที่ใช้เปลือกข้าวโพดเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.485±0.095 ^d	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	1.796±0.200 ^c	0.211±0.036 ^c	0.000±0.000 ^c
	วันที่ 9	2.126±0.151 ^a	0.451±0.025 ^b	0.044±0.012 ^d
	วันที่ 12	1.621±0.131 ^b	0.340±0.029 ^a	0.040±0.011 ^b
70%	วันที่ 3	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^a
	วันที่ 6	0.000±0.000 ^c	0.271±0.019 ^c	0.000±0.000 ^c
	วันที่ 9	0.147±0.029 ^b	0.616±0.024 ^b	0.055±0.017 ^b
	วันที่ 12	0.355±0.031 ^b	0.527±0.029 ^a	0.068±0.015 ^d
80%	วันที่ 3	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.000±0.000 ^c	0.168±0.028 ^c	0.000±0.000 ^c
	วันที่ 9	0.086±0.017 ^b	0.488±0.034 ^b	0.055±0.015 ^b
	วันที่ 12	0.155±0.032 ^b	0.339±0.029 ^a	0.062±0.013 ^c
90%	วันที่ 3	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.000±0.000 ^c	0.264±0.029 ^c	0.000±0.000 ^c
	วันที่ 9	0.101±0.031 ^b	0.823±0.038 ^b	0.060±0.010 ^b
	วันที่ 12	0.230±0.017 ^b	0.739±0.033 ^a	0.059±0.012 ^c

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจับกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

ตารางภาคผนวกที่ ๔4 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T. pavonia* โดยการหมักในสภาพอาหารแห้งที่ใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.545±0.081 ^d	1.137±0.140 ^d	0.317±0.040 ^d
	วันที่ 6	1.613±0.145 ^c	3.795±0.307 ^c	0.488±0.038 ^c
	วันที่ 9	3.629±0.161 ^a	8.560±0.419 ^a	0.730±0.051 ^a
	วันที่ 12	2.598±0.321 ^b	6.952±0.246 ^b	0.489±0.041 ^b
70%	วันที่ 3	0.793±0.149 ^d	1.265±0.235 ^d	0.396±0.038 ^d
	วันที่ 6	1.864±0.337 ^c	4.598±0.280 ^c	0.587±0.029 ^c
	วันที่ 9	4.239±0.138 ^a	11.232±0.299 ^a	0.732±0.061 ^b
	วันที่ 12	2.734±0.174 ^b	8.466±0.179 ^b	0.641±0.038 ^c
80%	วันที่ 3	0.599±0.109 ^d	1.094±0.160 ^d	0.252±0.034 ^d
	วันที่ 6	1.495±0.203 ^c	4.226±0.274 ^c	0.359±0.046 ^c
	วันที่ 9	3.955±0.101 ^b	9.096±0.294 ^b	0.458±0.040 ^a
	วันที่ 12	2.575±0.325 ^b	8.631±0.342 ^c	0.359±0.057 ^b
90%	วันที่ 3	0.500±0.088 ^d	0.770±0.083 ^d	0.173±0.020 ^d
	วันที่ 6	1.644±0.235 ^c	3.411±0.082 ^c	0.263±0.042 ^c
	วันที่ 9	2.931±0.297 ^a	8.484±0.175 ^a	0.355±0.062 ^b
	วันที่ 12	2.780±0.168 ^b	6.943±0.322 ^b	0.162±0.026 ^c

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจับกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

ตารางภาคผนวกที่ ๖5 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *G. australe* โดยการหมักในสภาพอาหารแห้งที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.214±0.026 ^d	0.238±0.021 ^d	0.038±0.008 ^d
	วันที่ 6	0.378±0.026 ^c	0.664±0.019 ^c	0.051±0.013 ^d
	วันที่ 9	0.771±0.031 ^a	1.200±0.019 ^b	0.112±0.018 ^b
	วันที่ 12	0.666±0.023 ^b	0.980±0.015 ^{bc}	0.095±0.018 ^b
70%	วันที่ 3	0.248±0.023 ^d	0.327±0.019 ^d	0.045±0.006 ^d
	วันที่ 6	0.468±0.019 ^c	0.708±0.021 ^c	0.065±0.006 ^c
	วันที่ 9	0.883±0.018 ^a	1.303±0.019 ^b	0.150±0.006 ^a
	วันที่ 12	0.789±0.021 ^b	1.085±0.034 ^c	0.118±0.013 ^b
80%	วันที่ 3	0.198±0.023 ^d	0.234±0.032 ^d	0.034±0.007 ^d
	วันที่ 6	0.363±0.015 ^c	0.612±0.019 ^c	0.054±0.009 ^c
	วันที่ 9	0.812±0.017 ^a	1.218±0.033 ^b	0.115±0.009 ^c
	วันที่ 12	0.771±0.017 ^b	1.044±0.030 ^b	0.075±0.013 ^b
90%	วันที่ 3	0.145±0.024 ^d	0.224±0.033 ^d	0.031±0.006 ^d
	วันที่ 6	0.341±0.020 ^c	0.574±0.017 ^d	0.060±0.013 ^c
	วันที่ 9	0.766±0.017 ^a	1.092±0.021 ^b	0.116±0.011 ^b
	วันที่ 12	0.615±0.036 ^b	0.956±0.017 ^c	0.081±0.017 ^c

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจับกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

ตารางภาคผนวกที่ ๖ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *G. australe* โดยการหมักในสภาพอาหารแห้งที่ใช้กากมะพร้าวเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.000±0.000 ^d	0.005±0.001 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.007±0.002 ^c	0.014±0.004 ^c	0.005±0.001 ^c
	วันที่ 9	0.026±0.004 ^a	0.032±0.003 ^b	0.009±0.002 ^b
	วันที่ 12	0.020±0.003 ^b	0.027±0.005 ^b	0.006±0.002 ^{bc}
70%	วันที่ 3	0.000±0.000 ^d	0.005±0.001 ^b	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.007±0.001 ^c	0.013±0.003 ^d	0.004±0.002 ^c
	วันที่ 9	0.031±0.003 ^a	0.036±0.006 ^c	0.009±0.002 ^b
	วันที่ 12	0.015±0.003 ^b	0.027±0.006 ^c	0.005±0.001 ^c
80%	วันที่ 3	0.000±0.000 ^d	0.007±0.003 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.009±0.003 ^c	0.015±0.003 ^c	0.004±0.002 ^c
	วันที่ 9	0.043±0.007 ^a	0.053±0.004 ^b	0.016±0.002 ^a
	วันที่ 12	0.021±0.003 ^b	0.017±0.006 ^c	0.008±0.002 ^b
90%	วันที่ 3	0.007±0.001 ^d	0.015±0.003 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.014±0.003 ^d	0.020±0.002 ^d	0.004±0.002 ^d
	วันที่ 9	0.051±0.004 ^b	0.064±0.006 ^c	0.024±0.004 ^b
	วันที่ 12	0.030±0.006 ^c	0.022±0.004 ^d	0.010±0.004 ^c

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจับกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

ตารางภาคผนวกที่ ๗ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *G. australe* โดยการหมักในสภาพอาหารแห้งที่ใช้เปลือกข้าวโพดเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.183±0.018 ^d	0.238±0.039 ^d	0.026±0.011 ^d
	วันที่ 6	0.394±0.048 ^c	0.757±0.039 ^c	0.165±0.020 ^c
	วันที่ 9	0.966±0.072 ^a	1.415±0.027 ^a	0.407±0.028 ^a
	วันที่ 12	0.664±0.021 ^b	1.155±0.025 ^b	0.244±0.046 ^b
70%	วันที่ 3	0.233±0.023 ^d	0.339±0.036 ^d	0.028±0.006 ^d
	วันที่ 6	0.510±0.022 ^c	0.832±0.025 ^c	0.264±0.020 ^b
	วันที่ 9	1.120±0.042 ^a	1.546±0.033 ^a	0.455±0.023 ^a
	วันที่ 12	0.759±0.036 ^b	1.322±0.044 ^b	0.211±0.028 ^c
80%	วันที่ 3	0.171±0.022 ^d	0.282±0.025 ^d	0.020±0.006 ^d
	วันที่ 6	0.590±0.030 ^c	0.678±0.026 ^c	0.189±0.017 ^c
	วันที่ 9	0.930±0.033 ^c	1.432±0.025 ^a	0.354±0.028 ^b
	วันที่ 12	0.627±0.017 ^b	1.230±0.034 ^b	0.209±0.036 ^c
90%	วันที่ 3	0.123±0.017 ^d	0.209±0.044 ^d	0.020±0.003 ^d
	วันที่ 6	0.468±0.044 ^c	0.656±0.026 ^c	0.156±0.017 ^c
	วันที่ 9	0.865±0.036 ^b	1.331±0.061 ^a	0.345±0.043 ^a
	วันที่ 12	0.508±0.028 ^c	1.197±0.039 ^b	0.244±0.028 ^b

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจับกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

ตารางภาคผนวกที่ ๖๘ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *G. australe* โดยการหมักในสภาพอาหารแห้งที่ใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.056±0.007 ^d	0.110±0.014 ^d	0.015±0.003 ^d
	วันที่ 6	0.167±0.023 ^c	0.276±0.018 ^c	0.041±0.009 ^d
	วันที่ 9	0.546±0.016 ^a	0.915±0.057 ^a	0.116±0.019 ^c
	วันที่ 12	0.386±0.032 ^b	0.824±0.046 ^b	0.092±0.023 ^c
70%	วันที่ 3	0.083±0.019 ^d	0.203±0.018 ^d	0.024±0.003 ^b
	วันที่ 6	0.219±0.021 ^c	0.332±0.019 ^c	0.057±0.009 ^d
	วันที่ 9	0.633±0.030 ^a	1.064±0.014 ^a	0.174±0.016 ^b
	วันที่ 12	0.440±0.032 ^b	0.843±0.032 ^b	0.113±0.009 ^c
80%	วันที่ 3	0.080±0.014 ^d	0.143±0.019 ^d	0.018±0.005 ^d
	วันที่ 6	0.153±0.024 ^c	0.278±0.020 ^c	0.027±0.005 ^d
	วันที่ 9	0.600±0.025 ^a	0.929±0.020 ^a	0.158±0.009 ^b
	วันที่ 12	0.504±0.014 ^b	0.767±0.027 ^b	0.078±0.016 ^c
90%	วันที่ 3	0.041±0.009 ^d	0.081±0.016 ^d	0.017±0.005 ^d
	วันที่ 6	0.107±0.010 ^c	0.234±0.021 ^c	0.023±0.009 ^d
	วันที่ 9	0.557±0.019 ^a	0.810±0.025 ^a	0.134±0.026 ^c
	วันที่ 12	0.449±0.029 ^b	0.711±0.025 ^b	0.110±0.014 ^c

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจับกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

ตารางภาคผนวกที่ ๑๑ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *G. mastoporum* โดยการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.083±0.036 ^d	0.153±0.070 ^d	0.019±0.006 ^d
	วันที่ 6	0.215±0.073 ^c	0.527±0.053 ^c	0.056±0.012 ^c
	วันที่ 9	0.579±0.060 ^a	1.084±0.111 ^a	0.121±0.020 ^b
	วันที่ 12	0.424±0.073 ^b	0.943±0.114 ^b	0.060±0.008 ^c
70%	วันที่ 3	0.116±0.028 ^d	0.236±0.042 ^d	0.047±0.010 ^{bc}
	วันที่ 6	0.315±0.048 ^c	0.524±0.073 ^c	0.111±0.012 ^c
	วันที่ 9	0.663±0.059 ^a	1.205±0.153 ^a	0.179±0.010 ^b
	วันที่ 12	0.500±0.049 ^b	0.947±0.092 ^b	0.073±0.017 ^c
80%	วันที่ 3	0.000±0.000 ^d	0.204±0.056 ^d	0.033±0.009 ^d
	วันที่ 6	0.025±0.006 ^c	0.536±0.077 ^c	0.084±0.008 ^b
	วันที่ 9	0.132±0.016 ^a	1.023±0.067 ^a	0.137±0.012 ^a
	วันที่ 12	0.137±0.012 ^b	0.871±0.029 ^b	0.064±0.011 ^c
90%	วันที่ 3	0.047±0.014 ^d	0.184±0.058 ^d	0.015±0.005 ^d
	วันที่ 6	0.205±0.040 ^c	0.531±0.056 ^c	0.051±0.008 ^c
	วันที่ 9	0.608±0.105 ^a	1.140±0.139 ^a	0.096±0.012 ^b
	วันที่ 12	0.497±0.073 ^b	0.993±0.124 ^b	0.052±0.008 ^c

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจับกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

ตารางภาคผนวกที่ 10 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *G. mastoporum* โดยการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้กามมะพร้าวเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.005±0.003 ^d	0.008±0.001 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.018±0.002 ^c	0.029±0.005 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 9	0.029±0.005 ^b	0.060±0.006 ^c	0.006±0.001 ^c
	วันที่ 12	0.043±0.005 ^a	0.074±0.005 ^c	0.021±0.006 ^b
70%	วันที่ 3	0.008±0.003 ^d	0.011±0.002 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.015±0.011 ^d	0.039±0.006 ^c	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 9	0.038±0.003 ^c	0.077±0.005 ^c	0.010±0.003 ^c
	วันที่ 12	0.050±0.007 ^c	0.082±0.009 ^c	0.029±0.005 ^b
80%	วันที่ 3	0.009±0.002 ^d	0.013±0.003 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.036±0.006 ^c	0.047±0.007 ^c	0.008±0.003 ^c
	วันที่ 9	0.055±0.007 ^b	0.100±0.007 ^b	0.015±0.003 ^b
	วันที่ 12	0.065±0.005 ^b	0.137±0.012 ^a	0.037±0.003 ^a
90%	วันที่ 3	0.010±0.003 ^d	0.029±0.005 ^d	0.000±0.000 ^d
	วันที่ 6	0.037±0.002 ^c	0.057±0.003 ^c	0.016±0.004 ^c
	วันที่ 9	0.078±0.005 ^b	0.119±0.008 ^b	0.032±0.006 ^b
	วันที่ 12	0.092±0.013 ^a	0.145±0.006 ^a	0.051±0.005 ^a

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจัดกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

ตารางภาคผนวกที่ ง11 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *G. mastoporum* โดยการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้เปลือกข้าวโพดเป็นสับสเตรต และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.108±0.021 ^d	0.130±0.051 ^d	0.012±0.006 ^d
	วันที่ 6	0.252±0.081 ^c	0.668±0.061 ^c	0.045±0.010 ^c
	วันที่ 9	0.643±0.103 ^a	0.942±0.033 ^b	0.110±0.018 ^c
	วันที่ 12	0.398±0.051 ^b	0.720±0.091 ^c	0.072±0.015 ^c
70%	วันที่ 3	0.122±0.045 ^d	0.213±0.045 ^d	0.032±0.006 ^d
	วันที่ 6	0.363±0.053 ^c	0.760±0.068 ^c	0.065±0.010 ^{cd}
	วันที่ 9	0.887±0.068 ^a	1.058±0.053 ^a	0.152±0.015 ^b
	วันที่ 12	0.622±0.050 ^b	0.900±0.023 ^b	0.115±0.010 ^c
80%	วันที่ 3	0.187±0.023 ^d	0.315±0.091 ^d	0.062±0.012 ^{cd}
	วันที่ 6	0.440±0.018 ^c	0.900±0.023 ^c	0.112±0.012 ^c
	วันที่ 9	0.958±0.023 ^a	1.188±0.035 ^a	0.173±0.020 ^a
	วันที่ 12	0.750±0.038 ^b	1.085±0.026 ^b	0.130±0.022 ^b
90%	วันที่ 3	0.128±0.015 ^d	0.242±0.129 ^d	0.030±0.009 ^d
	วันที่ 6	0.320±0.018 ^c	0.622±0.055 ^c	0.065±0.013 ^{cd}
	วันที่ 9	0.815±0.036 ^a	1.210±0.055 ^a	0.138±0.042 ^b
	วันที่ 12	0.603±0.028 ^b	1.138±0.091 ^b	0.090±0.018 ^c

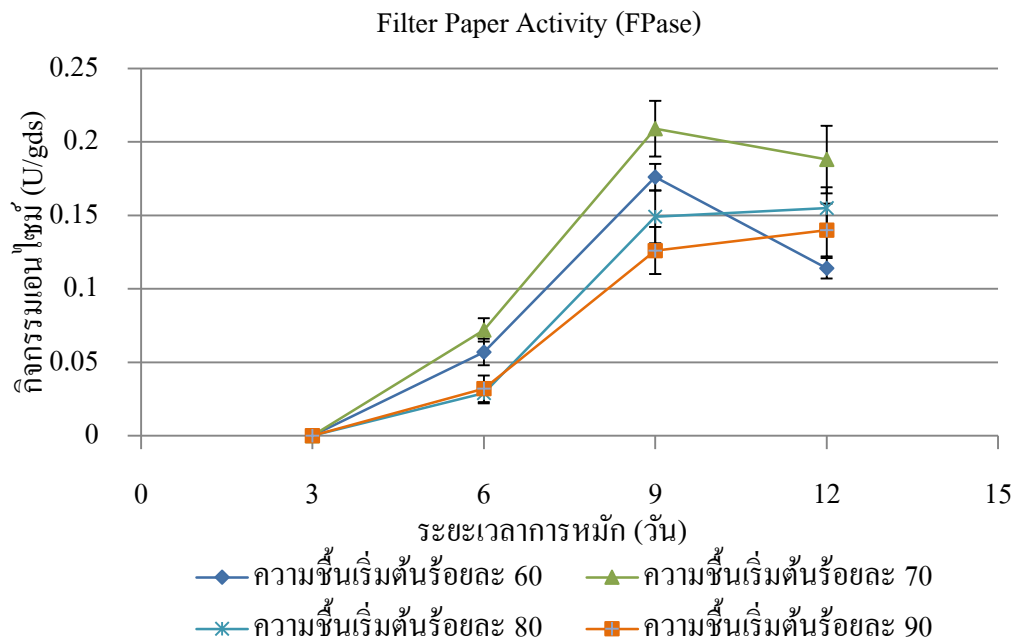
หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจับกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

ตารางภาคผนวกที่ 12 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *G. mastoporum* โดยการหมักในสภาพอาหารแข็งที่ใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรค และมีระยะเวลาการหมัก 12 วัน

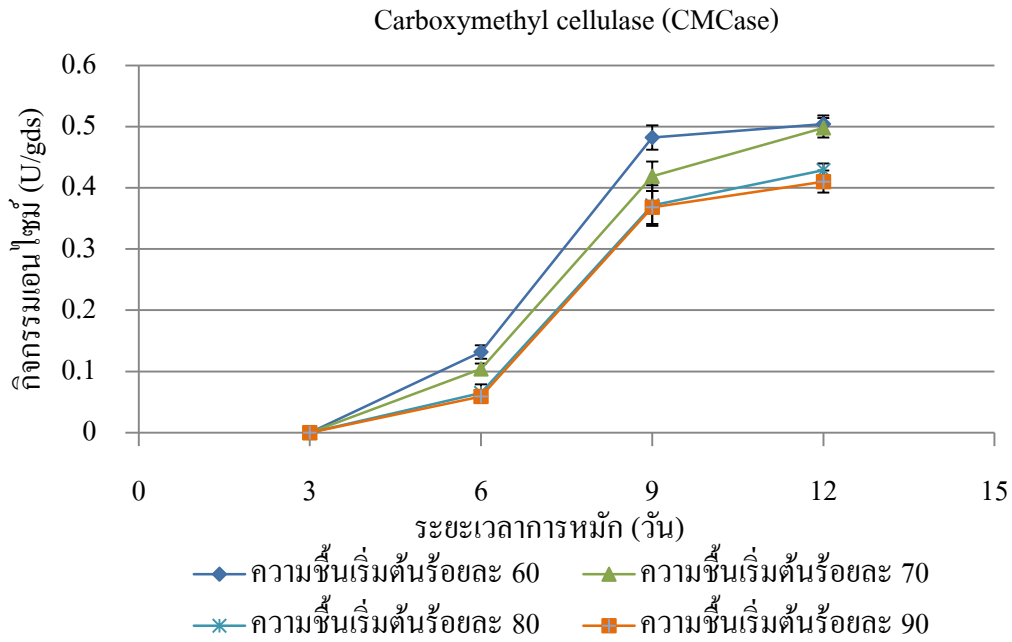
ความชื้นเริ่มต้น	การหมัก (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/gds)		
		FPase (U/gds)	CMCase (U/gds)	Cellobiase (U/gds)
60%	วันที่ 3	0.040±0.017 ^d	0.073±0.012 ^d	0.014±0.008 ^d
	วันที่ 6	0.120±0.038 ^c	0.184±0.026 ^c	0.087±0.017 ^c
	วันที่ 9	0.306±0.042 ^a	0.575±0.067 ^a	0.149±0.017 ^a
	วันที่ 12	0.222±0.018 ^b	0.380±0.026 ^b	0.100±0.014 ^b
70%	วันที่ 3	0.079±0.021 ^d	0.158±0.015 ^d	0.049±0.010 ^d
	วันที่ 6	0.173±0.036 ^c	0.358±0.031 ^c	0.108±0.015 ^c
	วันที่ 9	0.355±0.062 ^a	0.662±0.053 ^a	0.211±0.015 ^a
	วันที่ 12	0.277±0.017 ^b	0.485±0.099 ^b	0.131±0.017 ^b
80%	วันที่ 3	0.068±0.015 ^d	0.136±0.017 ^d	0.030±0.015 ^d
	วันที่ 6	0.127±0.027 ^c	0.359±0.041 ^c	0.067±0.008 ^c
	วันที่ 9	0.323±0.071 ^b	0.584±0.044 ^a	0.162±0.021 ^a
	วันที่ 12	0.192±0.025 ^c	0.437±0.042 ^c	0.065±0.012 ^c
90%	วันที่ 3	0.032±0.010 ^d	0.079±0.012 ^d	0.032±0.007 ^d
	วันที่ 6	0.114±0.055 ^c	0.184±0.017 ^c	0.067±0.014 ^c
	วันที่ 9	0.253±0.050 ^b	0.386±0.035 ^a	0.109±0.010 ^b
	วันที่ 12	0.188±0.029 ^c	0.315±0.045 ^c	0.062±0.010 ^c

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 3 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a, b, c และ d เป็นการจับกลุ่มทางสถิติตามคอลัมน์ ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

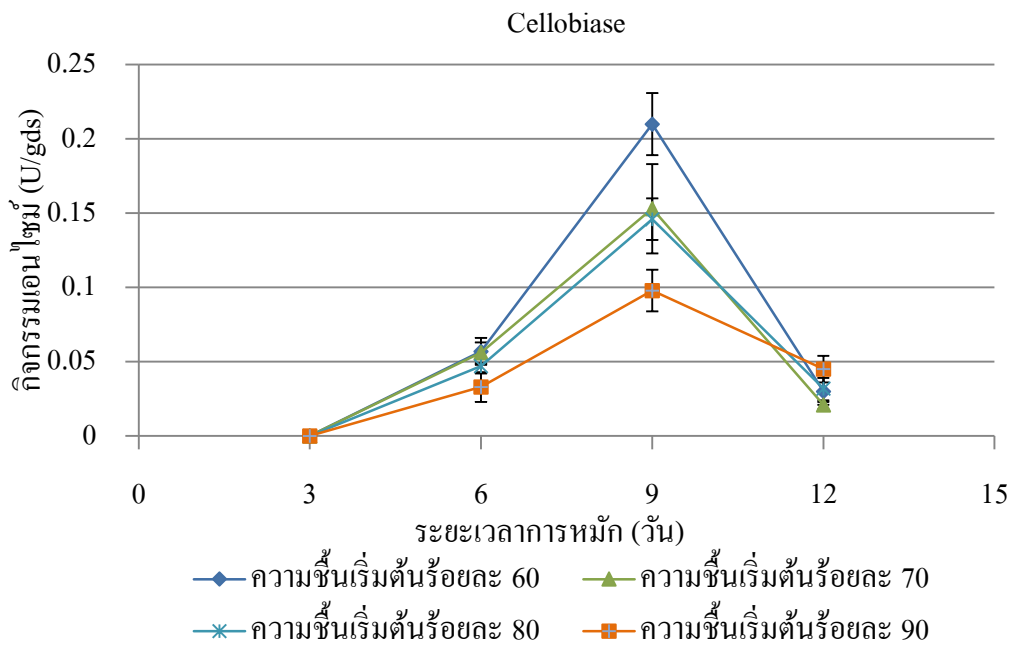
กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักในสภาพอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต 2 กรัม จากเชื้อรา *T. pavonia* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethyl cellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.176 ± 0.009 , 0.482 ± 0.020 และ 0.210 ± 0.021 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ในวันที่ 9 ของการหมัก แสดงผลการทดลองในภาพที่ ๓1-๓3



ภาพที่ ๓1 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *T. pavonia* เมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

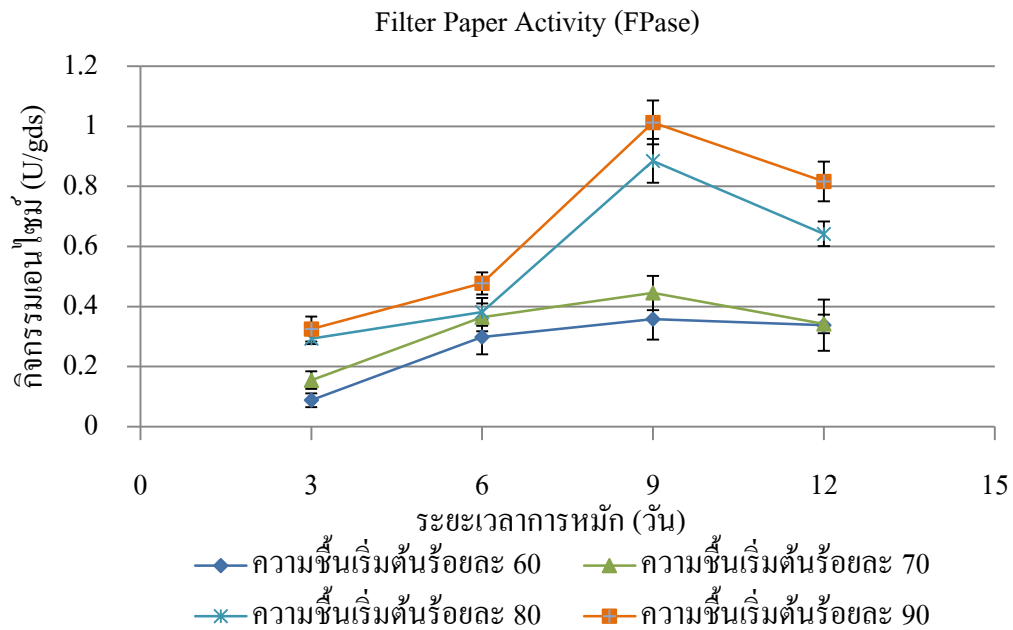


ภาพที่ ๖2 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *T. pavonia* เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต



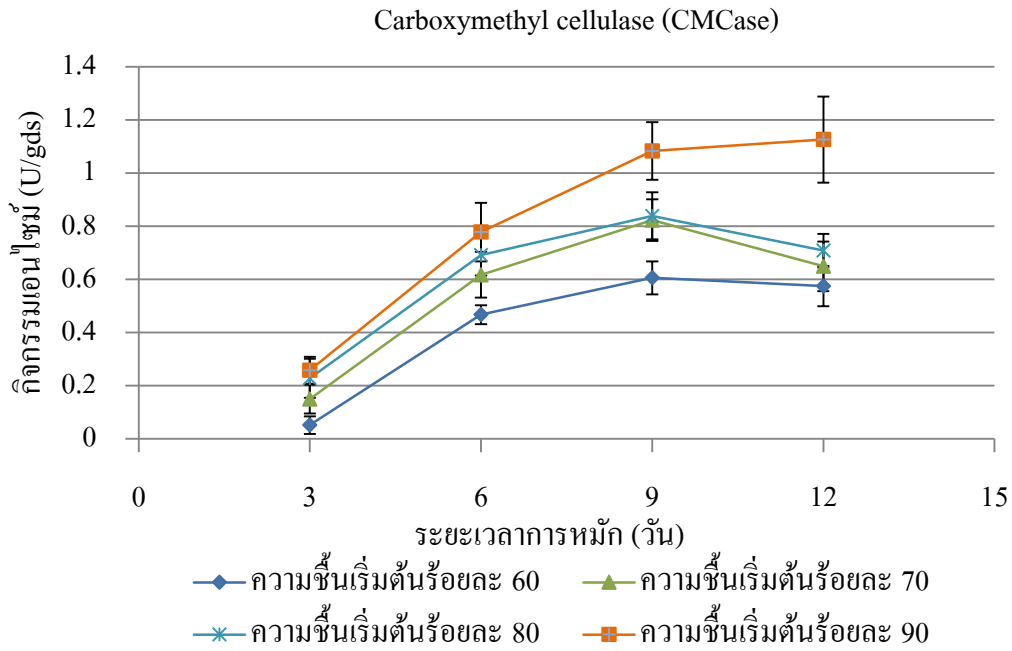
ภาพที่ ๖3 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *T. pavonia* เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักในสภาพอาหารแข็งที่มีกาบมะพร้าวเป็นสับสเตรต 2 กรัม จากเชื้อรา *T. pavonia* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1.013 ± 0.073 , 1.083 ± 0.108 และ 0.199 ± 0.012 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 90 ในวันที่ 9 ของการหมัก แสดงผลการทดลองในภาพที่ ๓4-๓6

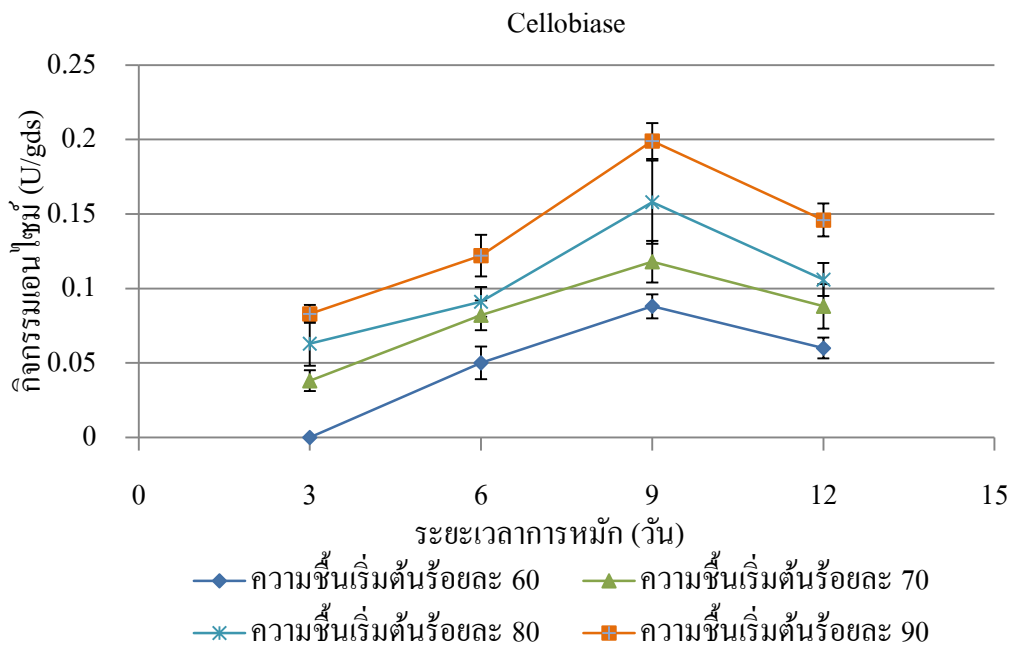


ภาพที่ ๓4 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *T. pavonia* เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

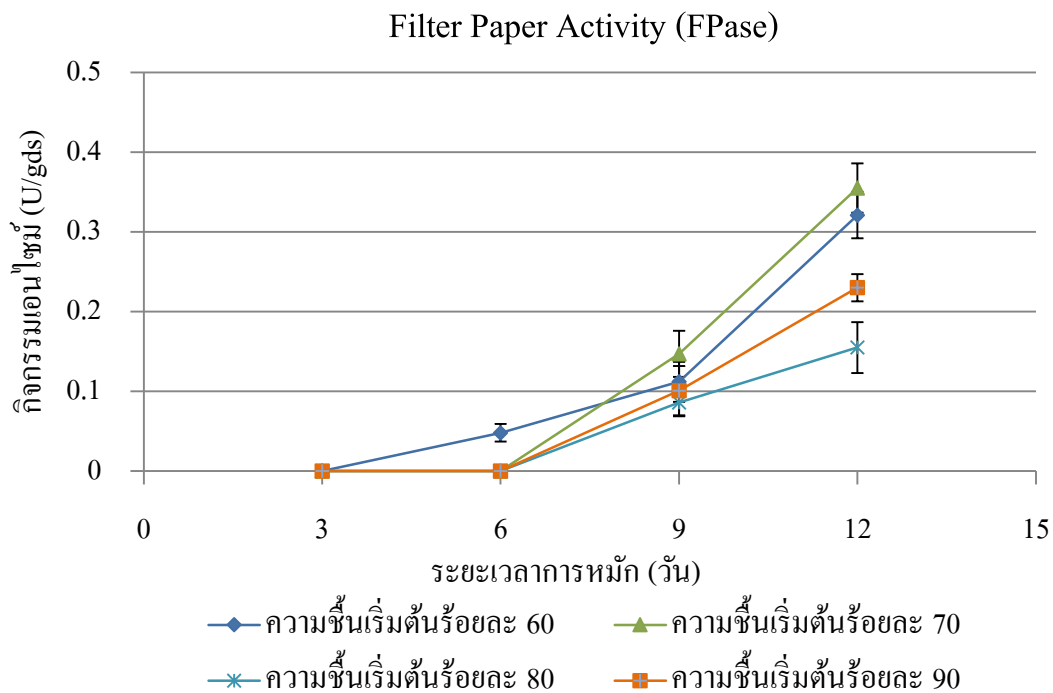


ภาพที่ ๖5 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *T. pavonia* เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต



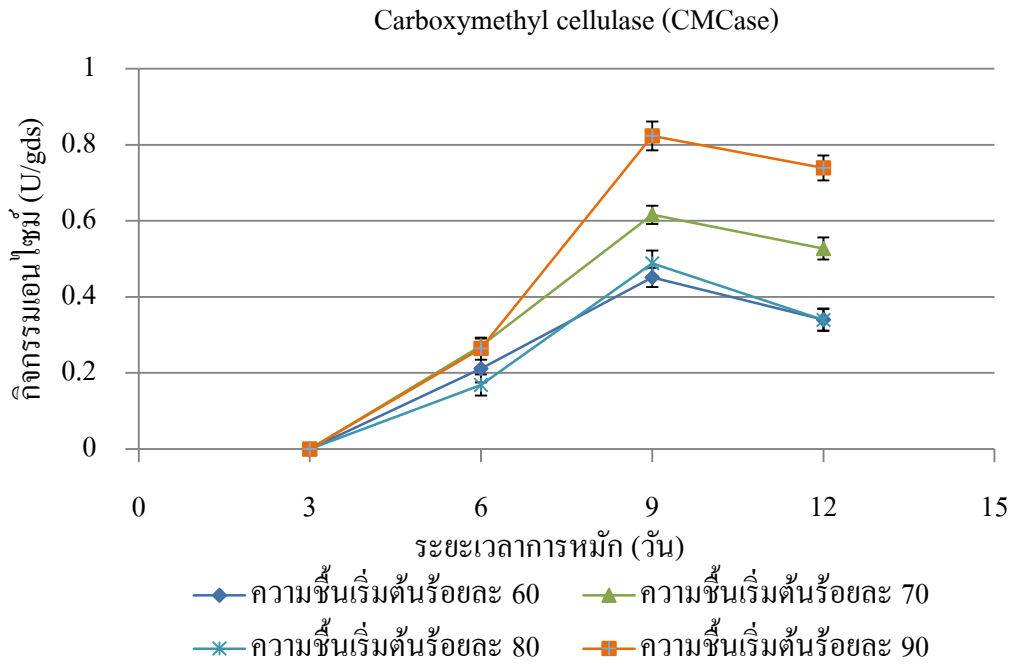
ภาพที่ ๖6 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *T. pavonia* เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักในสภาพอาหารแข็งที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นสับสเตรต 2 กรัม จากเชื้อรา *T. pavonia* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.101 ± 0.031 , 0.823 ± 0.038 และ 0.060 ± 0.010 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 90 ในวันที่ 9 ของการหมัก แสดงผลการทดลองในภาพที่ 7-79

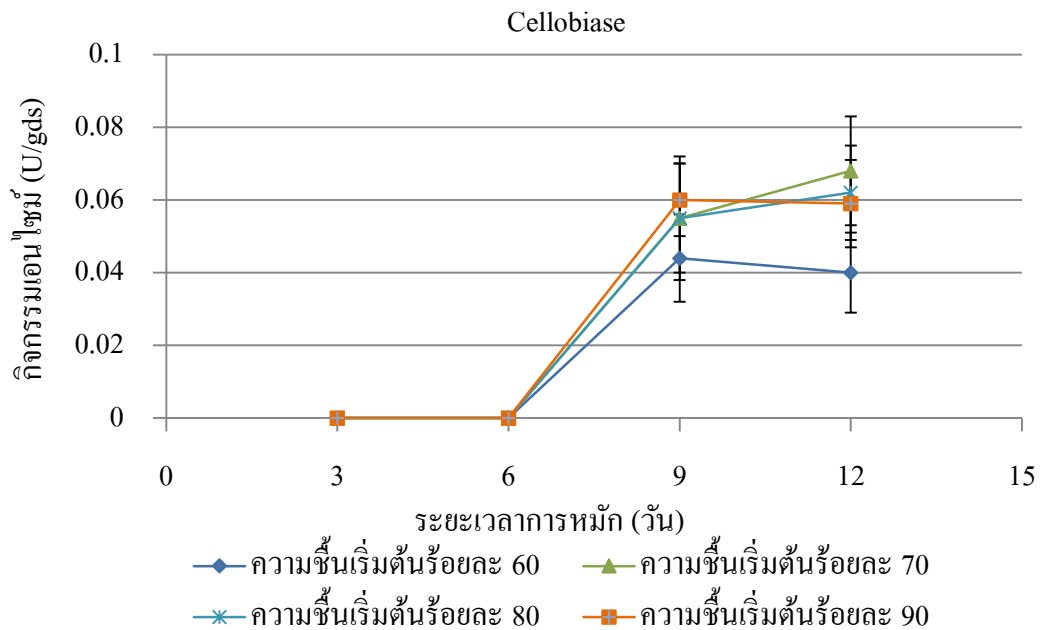


ภาพที่ 77 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *T. pavonia* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

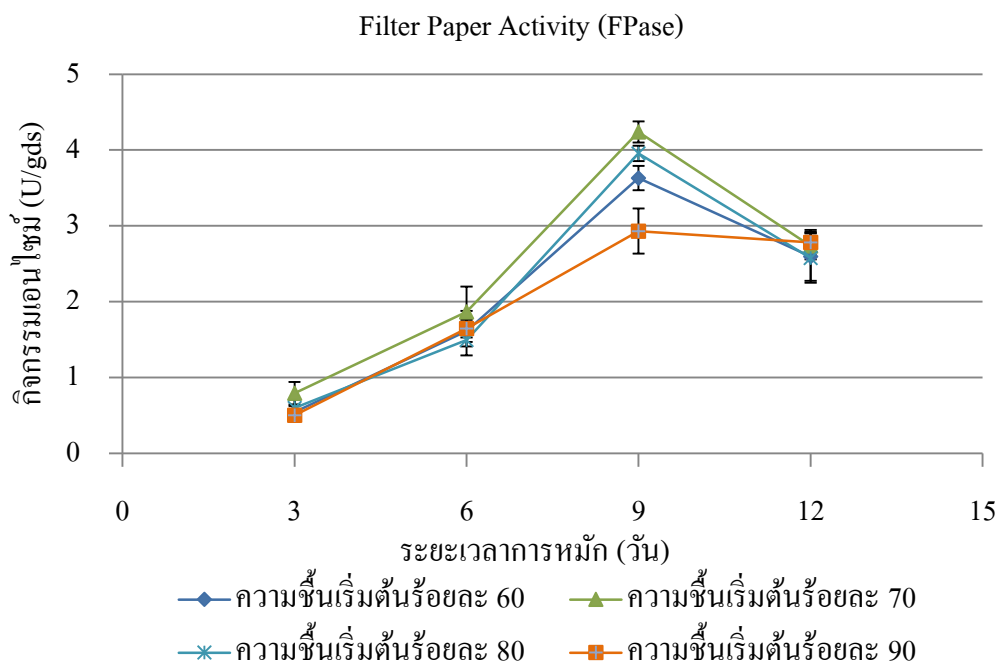


ภาพที่ ๙๘ ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *T. pavonia* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต



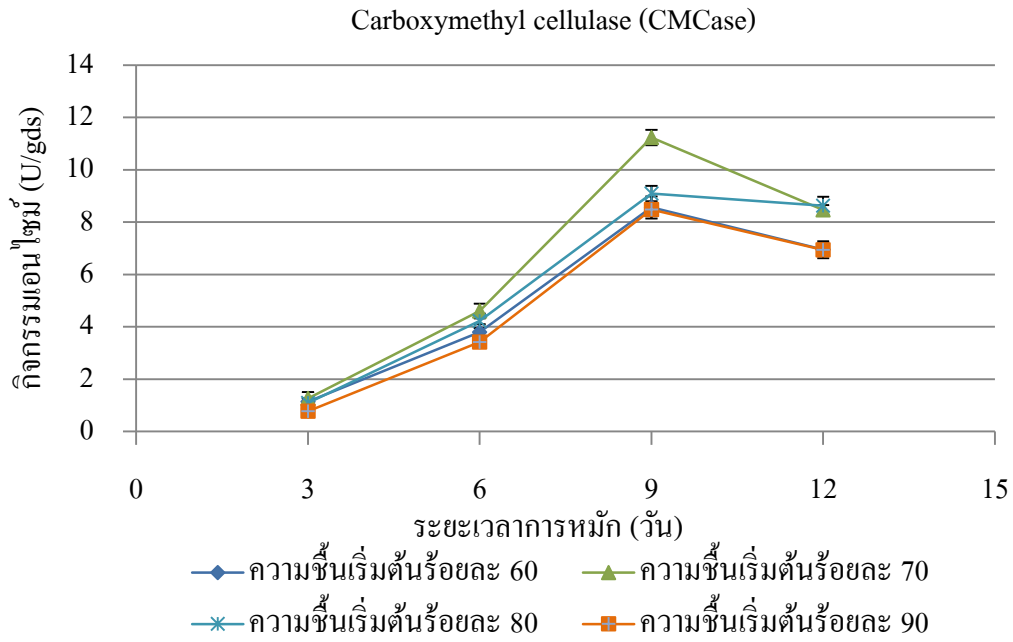
ภาพที่ ๙๙ ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *T. pavonia* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักในสภาพอาหารแข็งที่มีเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต 2 กรัม จากเชื้อรา *T. pavonia* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบโอส เจลลี่สูงสุดเท่ากับ 4.239 ± 0.138 , 11.232 ± 0.299 และ 0.732 ± 0.061 ยูนิต์ต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ในวันที่ 9 ของการหมัก แสดงผลการทดลองในภาพที่ ง10-ง12

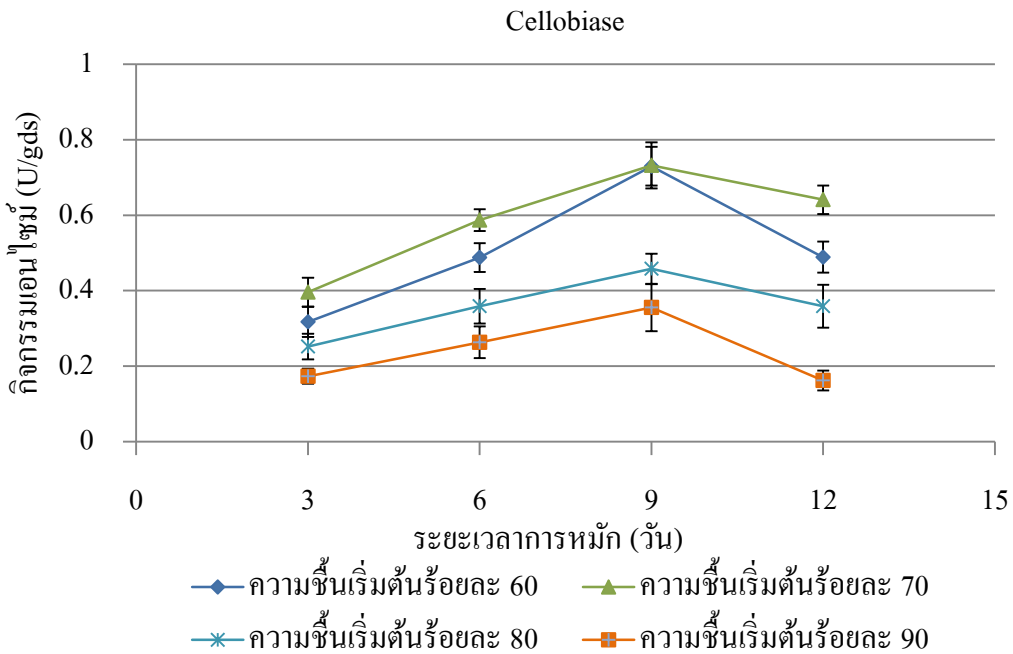


ภาพที่ ง10 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *T. pavonia* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

ลิขสิทธิ์ © by Chiang Mai University
All rights reserved

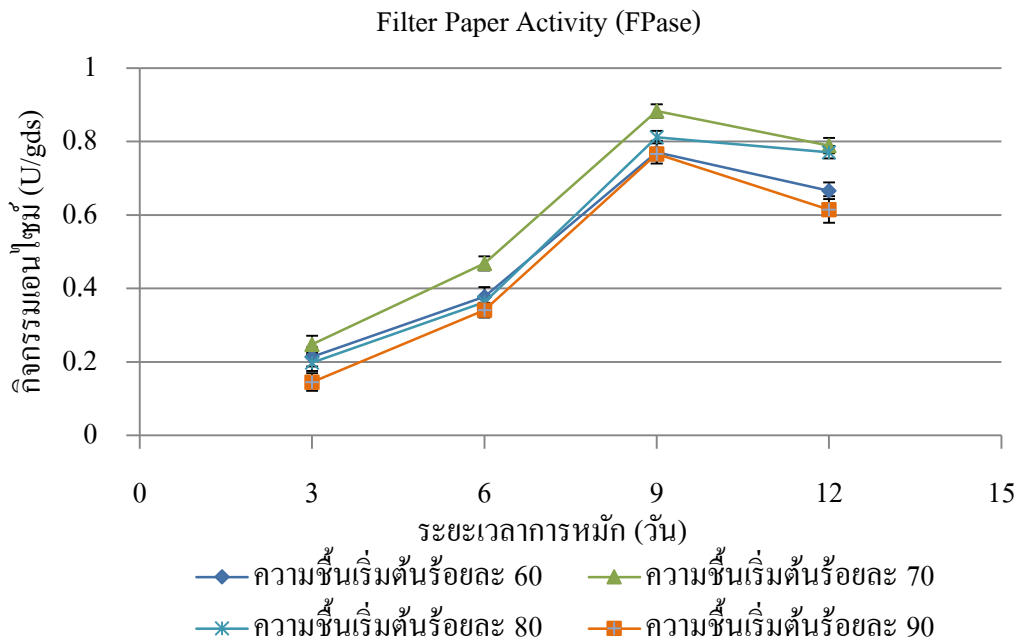


ภาพที่ 11 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *T. pavonia* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต



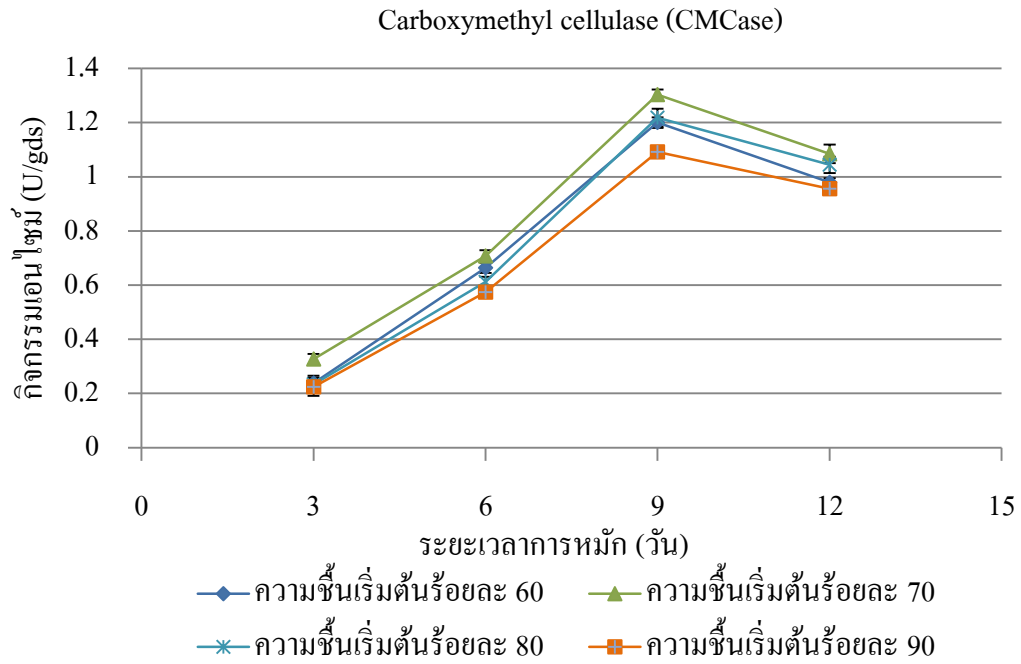
ภาพที่ 12 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *T. pavonia* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักในสภาพอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต 2 กรัม จากเชื้อรา *G. australe* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.883 ± 0.018 , 1.303 ± 0.019 และ 0.150 ± 0.006 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ในวันที่ 9 ของการหมัก แสดงผลการทดลองในภาพที่ ง13-ง15

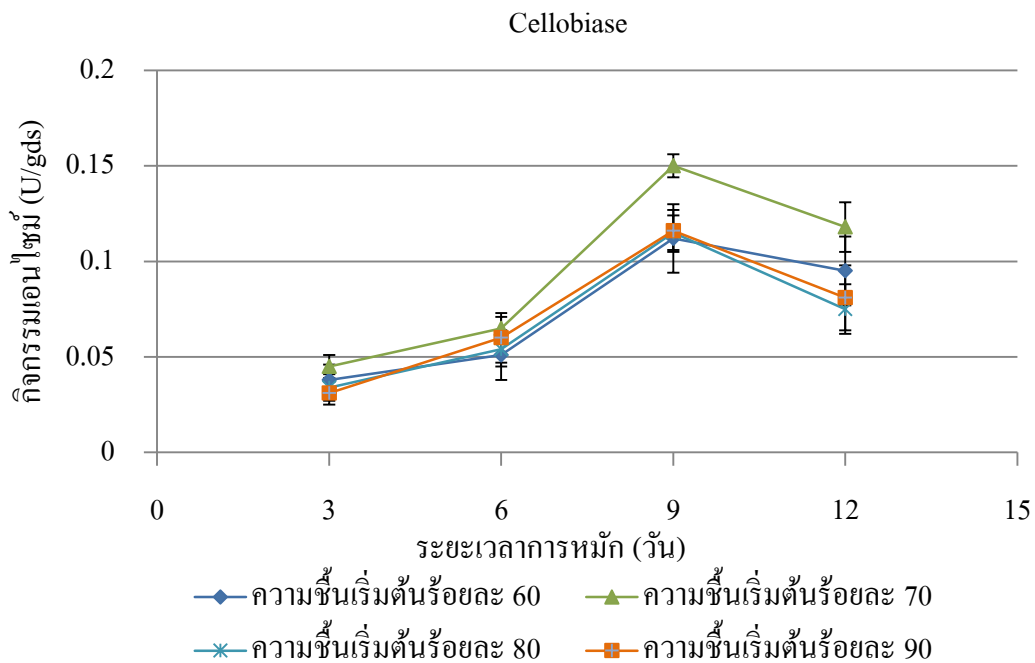


ภาพที่ ง13 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. australe* เมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

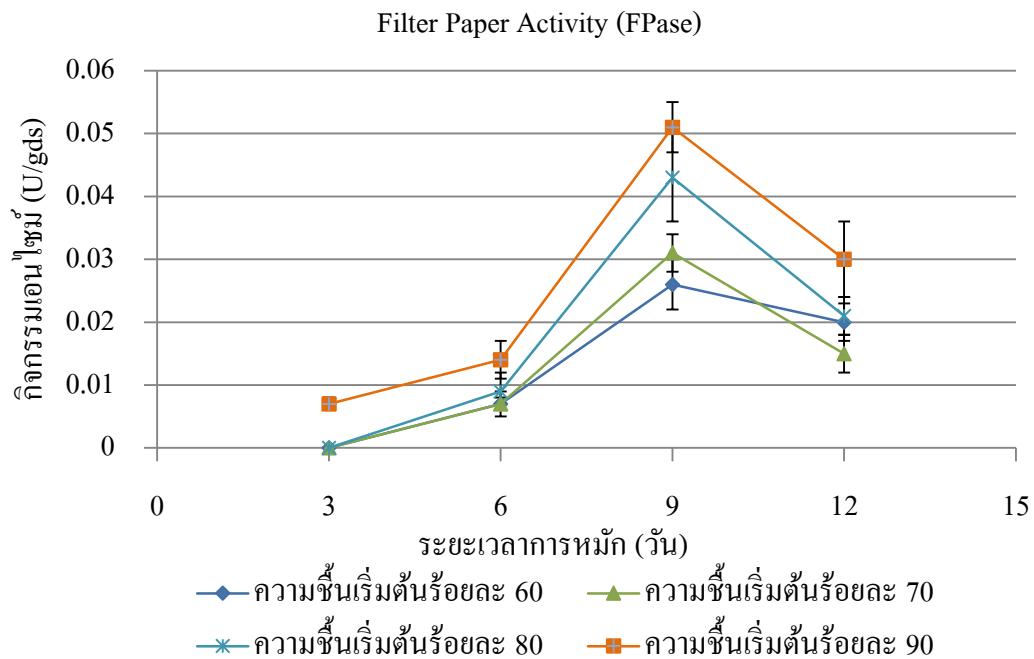


ภาพที่ 14 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. australe* เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต



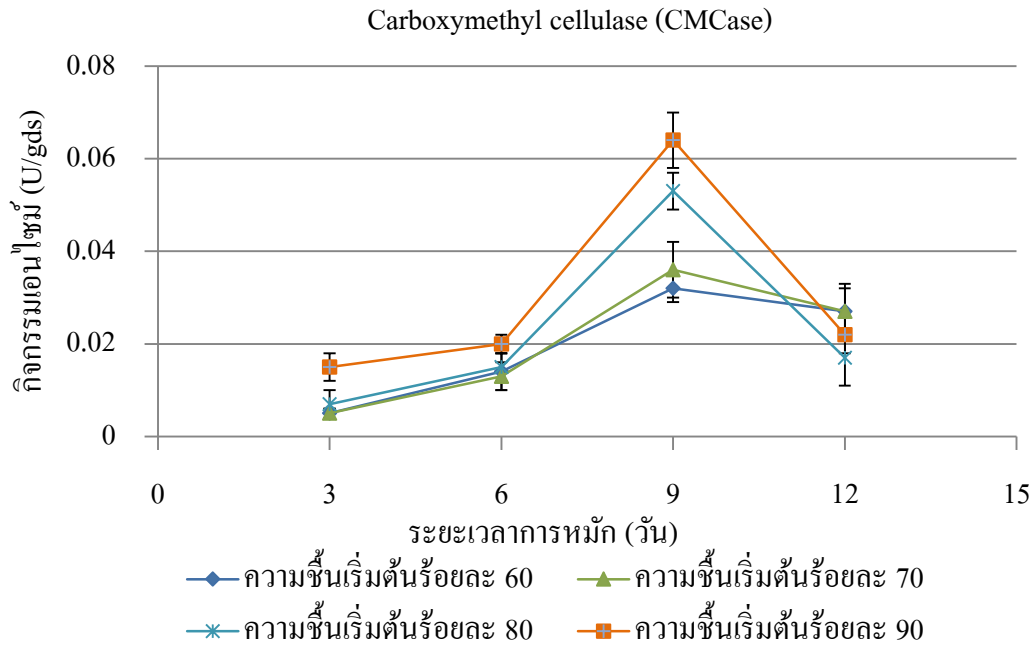
ภาพที่ 15 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. australe* เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักในสภาพอาหารแข็งที่มีกาบมะพร้าวเป็นสับสเตรต 2 กรัม จากเชื้อรา *G. australe* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.051 ± 0.004 , 0.064 ± 0.006 และ 0.024 ± 0.004 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 90 ในวันที่ 9 ของการหมัก แสดงผลการทดลองในภาพที่ ง16-ง18

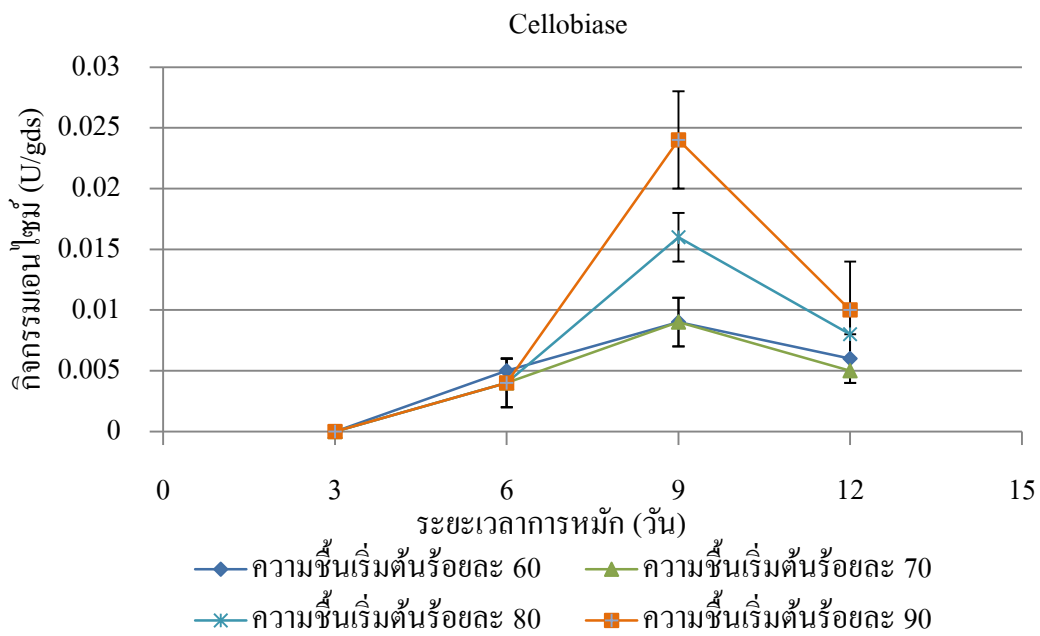


ภาพที่ ง16 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. australe* เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



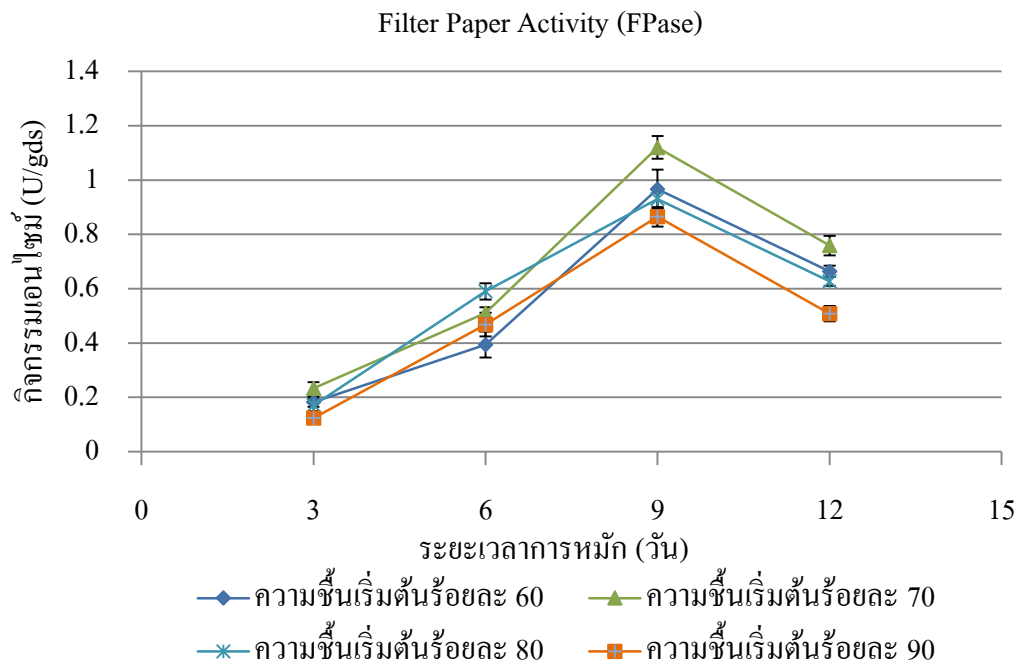
ภาพที่ 17 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. australe* เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 18 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. australe* เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

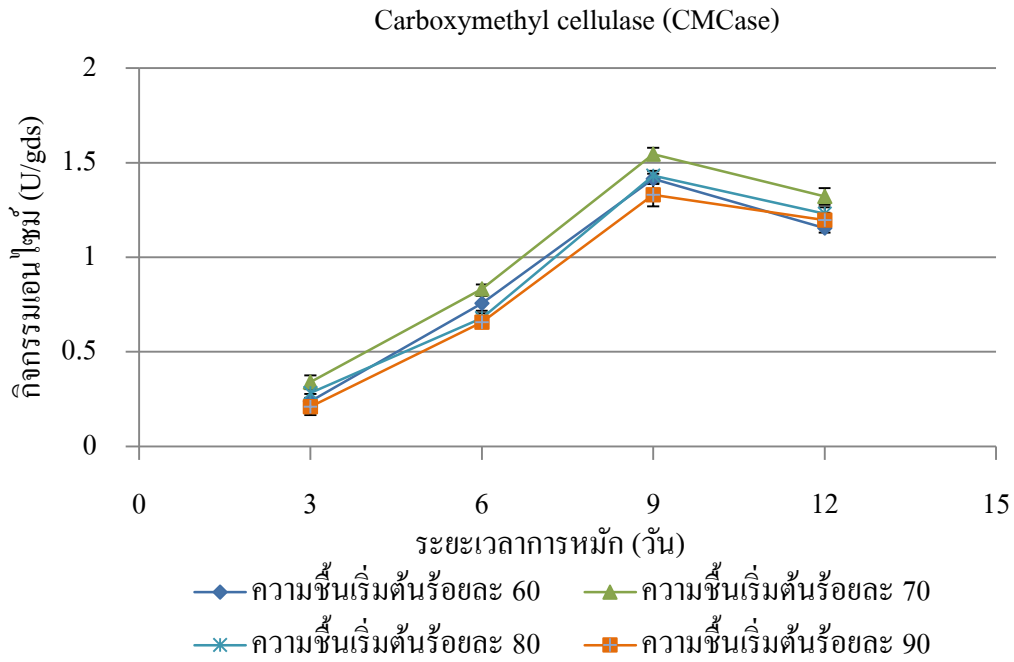
ภาพที่
G.

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักในสภาพอาหารแข็งที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นสับสเตรต 2 กรัม จากเชื้อรา *G. australe* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1.120 ± 0.042 , 1.546 ± 0.033 และ 0.455 ± 0.023 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ในวันที่ 9 ของการหมัก แสดงผลการทดลองในภาพที่ ง19-ง21

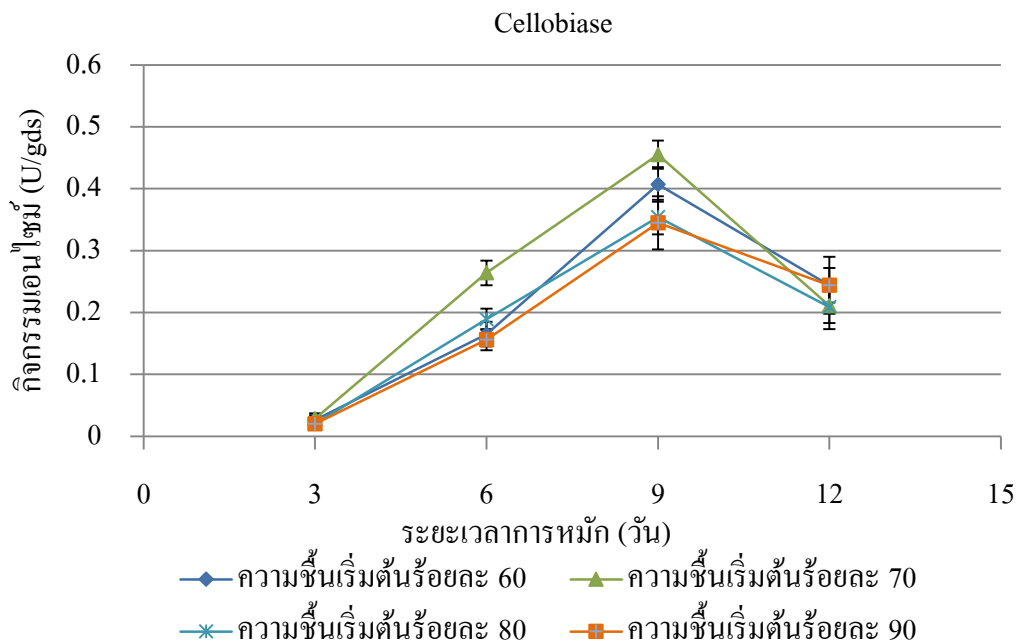


ภาพที่ ง19 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. australe* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

ลิขสิทธิ์ © by Chiang Mai University
All rights reserved

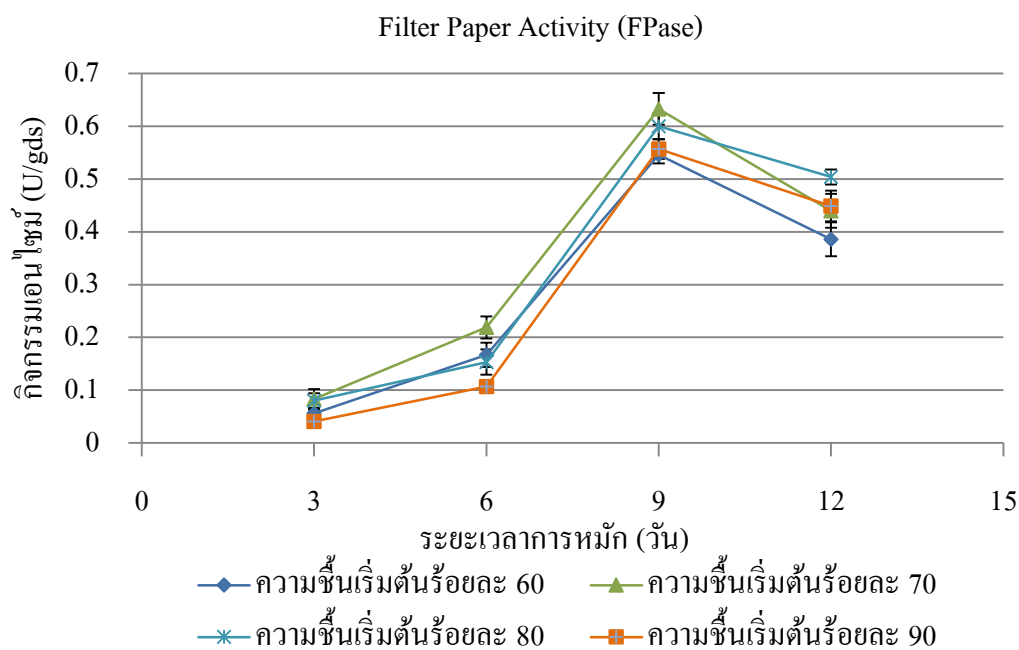


ภาพที่ 20 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. australe* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต



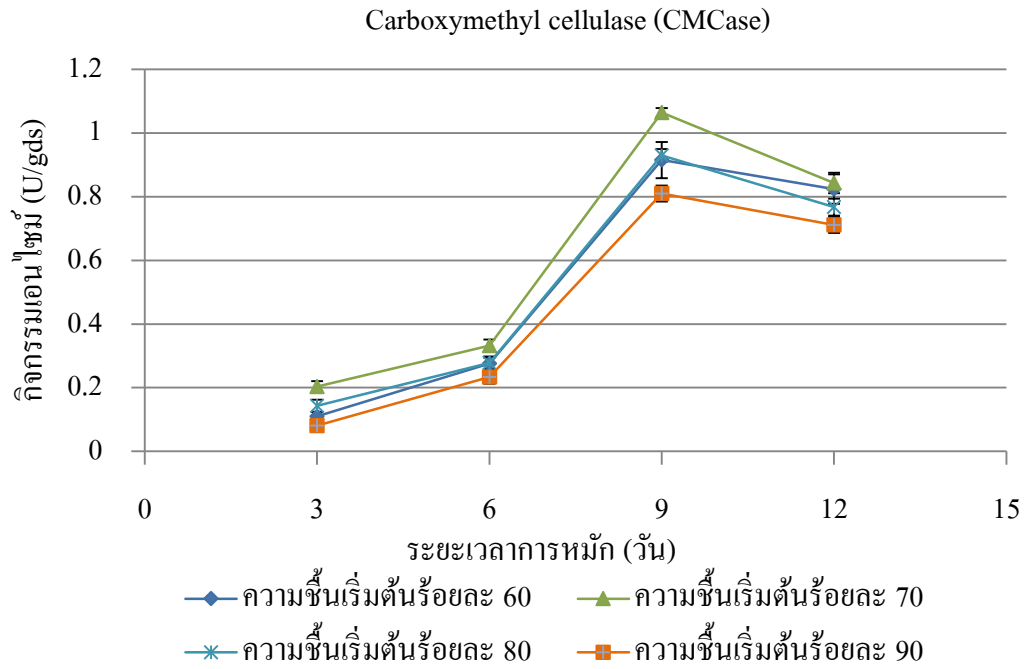
ภาพที่ 21 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. australe* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักในสภาพอาหารแข็งที่มีเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต 2 กรัม จากเชื้อรา *G. australe* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.633 ± 0.030 , 1.064 ± 0.014 และ 0.174 ± 0.016 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ในวันที่ 9 ของการหมัก แสดงผลการทดลองในภาพที่ ง22-ง24

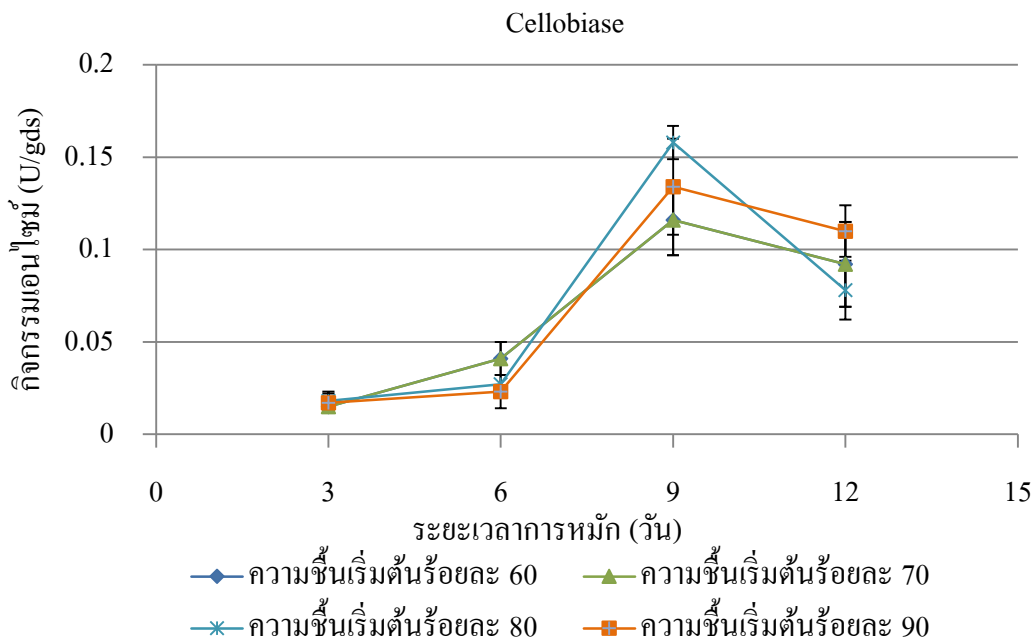


ภาพที่ ง22 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. australe* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



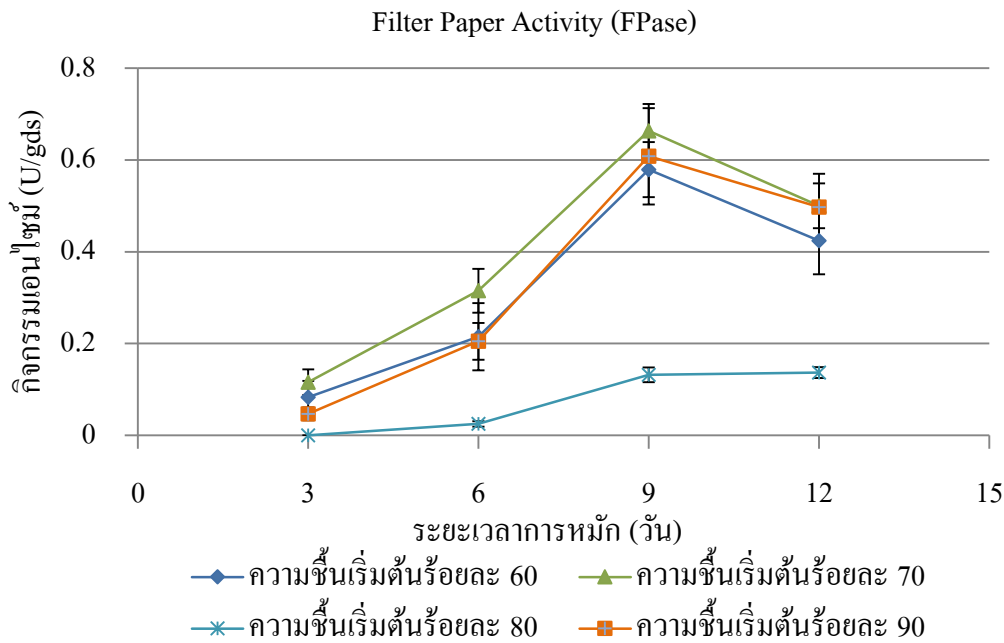
ภาพที่ 23 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. australe* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต



ภาพที่ 24 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. australe* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

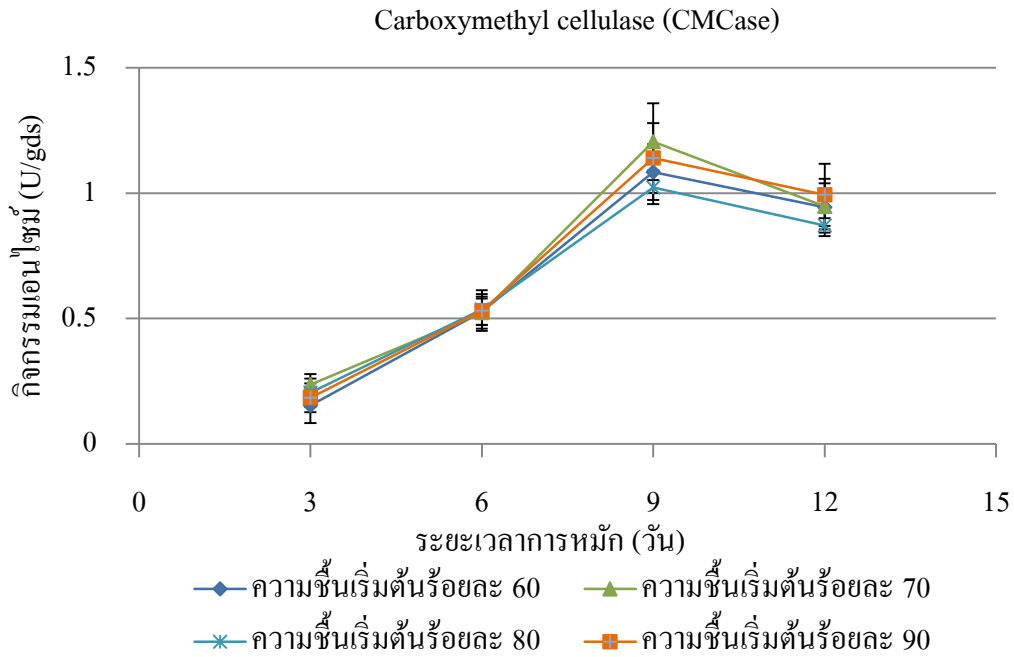
กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักในสภาพอาหารแข็งที่มีซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต 2 กรัม จากเชื้อรา *G. mastoporum* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโล ไบเอส เกลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.663 ± 0.059 , 1.205 ± 0.153 และ 0.179 ± 0.010 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ในวันที่ 9 ของการหมัก แสดงผลการทดลองในภาพที่ 25-ง

27

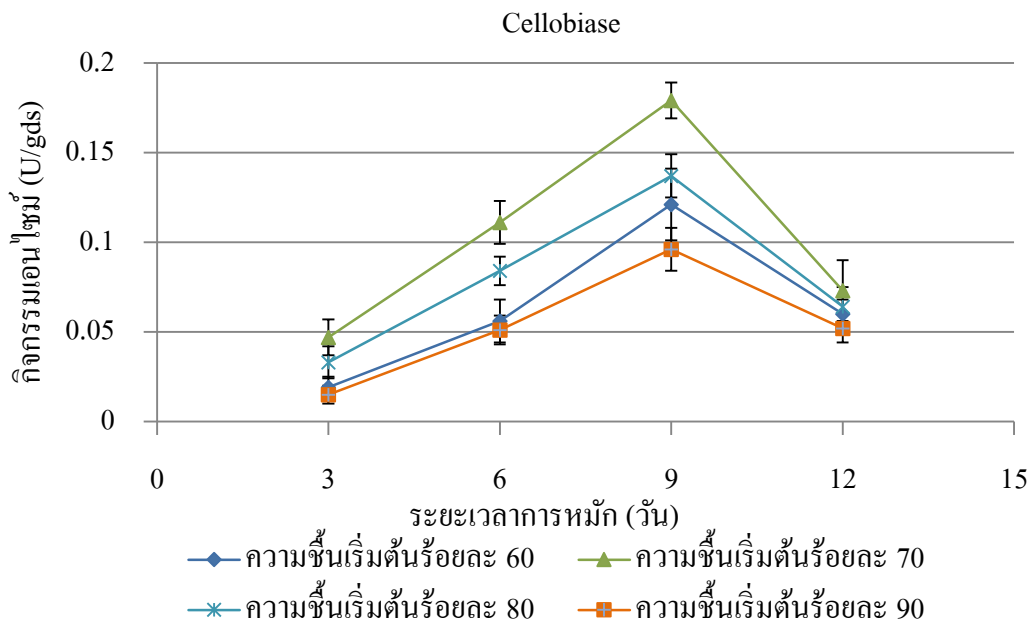


ภาพที่ 25 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. mastoporum* เมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

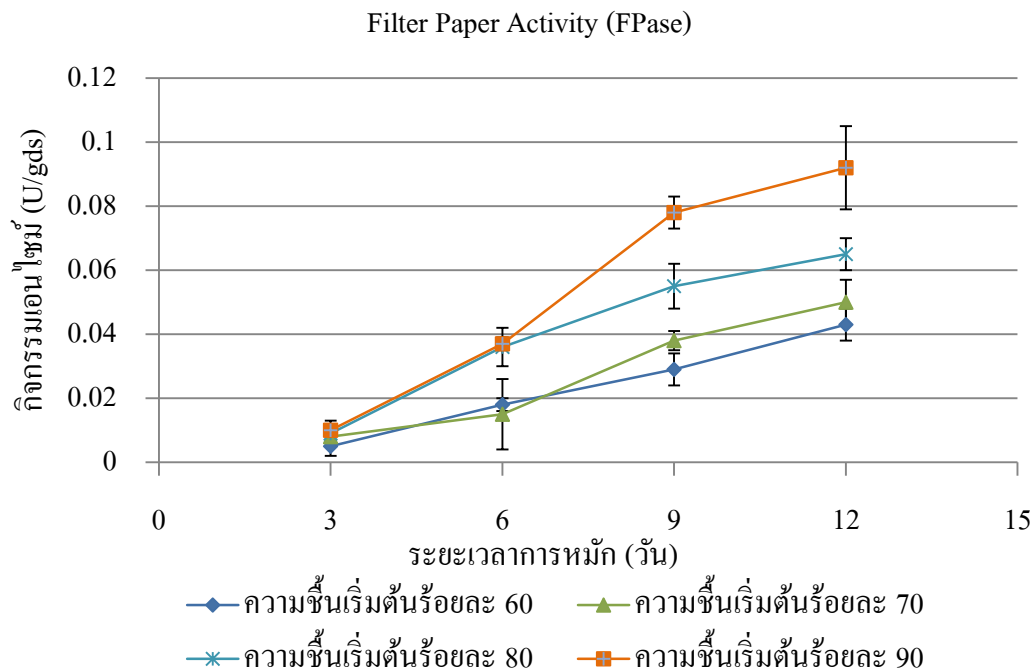


ภาพที่ 26 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. mastoporum* เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต



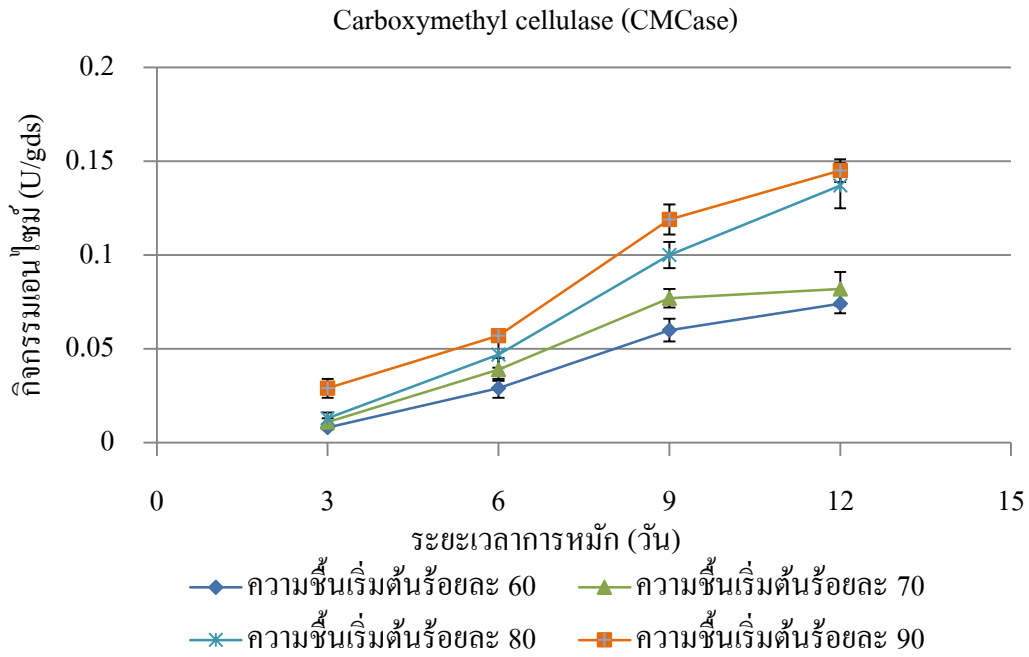
ภาพที่ 27 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. mastoporum* เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักในสภาพอาหารแข็งที่มีกาบมะพร้าวเป็นสับสเตรต 2 กรัม จากเชื้อรา *G. mastoporum* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.092 ± 0.013 , 0.145 ± 0.006 และ 0.051 ± 0.005 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 90 ในวันที่ 12 ของการหมัก แสดงผลการทดลองในภาพที่ ๖28-๖30

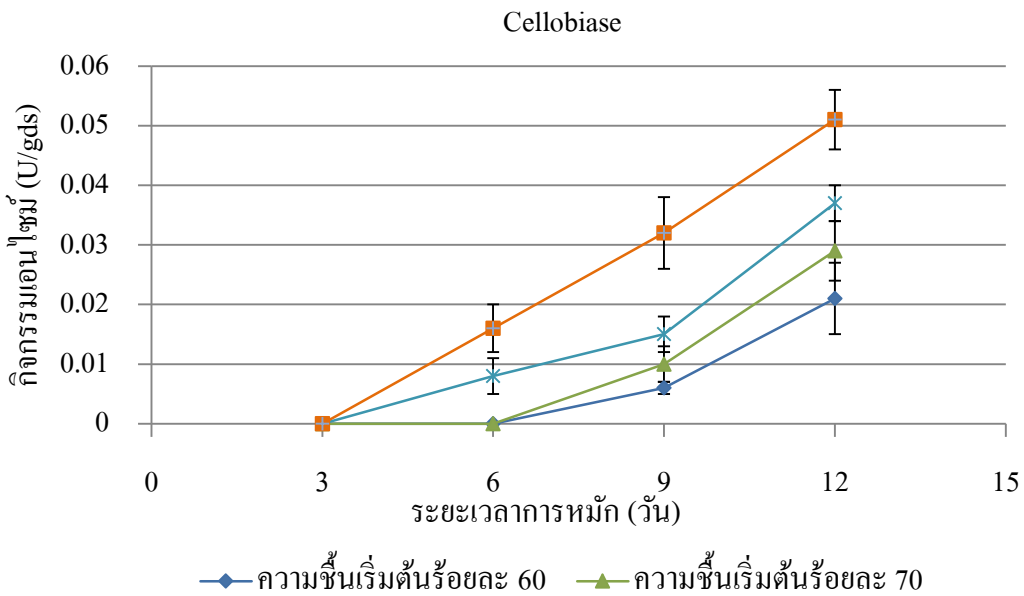


ภาพที่ ๖28 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. mastoporum* เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

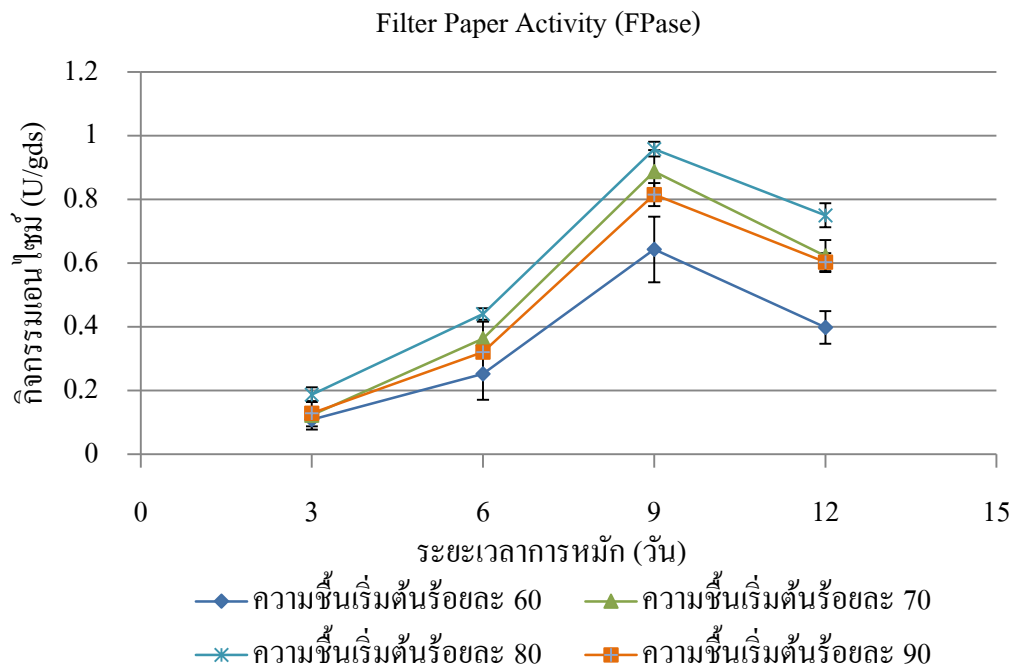


ภาพที่ 29 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. mastoporum* เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต



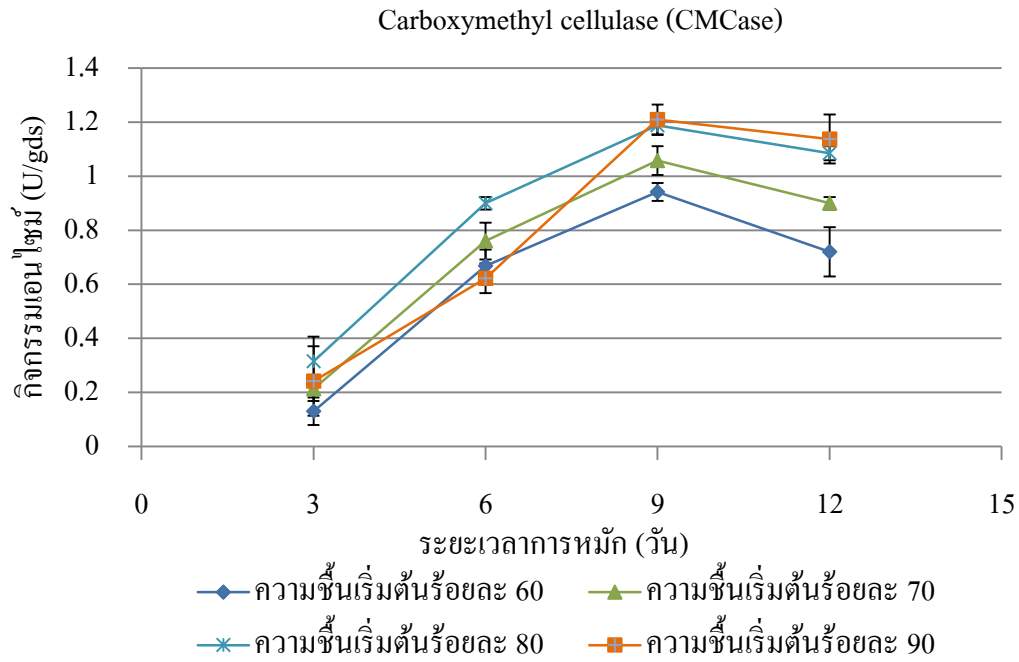
ภาพที่ 30 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. mastoporum* เมื่อใช้กาบมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักในสภาพอาหารแข็งที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นสับสเตรต 2 กรัม จากเชื้อรา *G. mastoporum* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.958 ± 0.023 , 1.188 ± 0.035 และ 0.173 ± 0.020 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในวันที่ 9 ของการหมัก แสดงผลการทดลองในภาพที่ 331-333

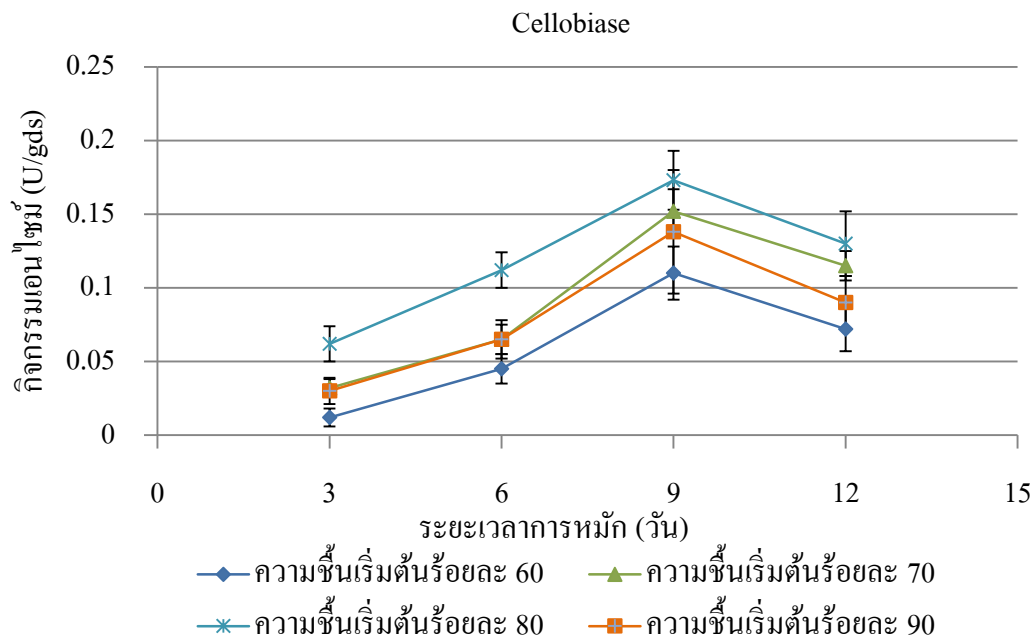


ภาพที่ 331 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. mastoporum* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

ลิขสิทธิ์ © by Chiang Mai University
All rights reserved

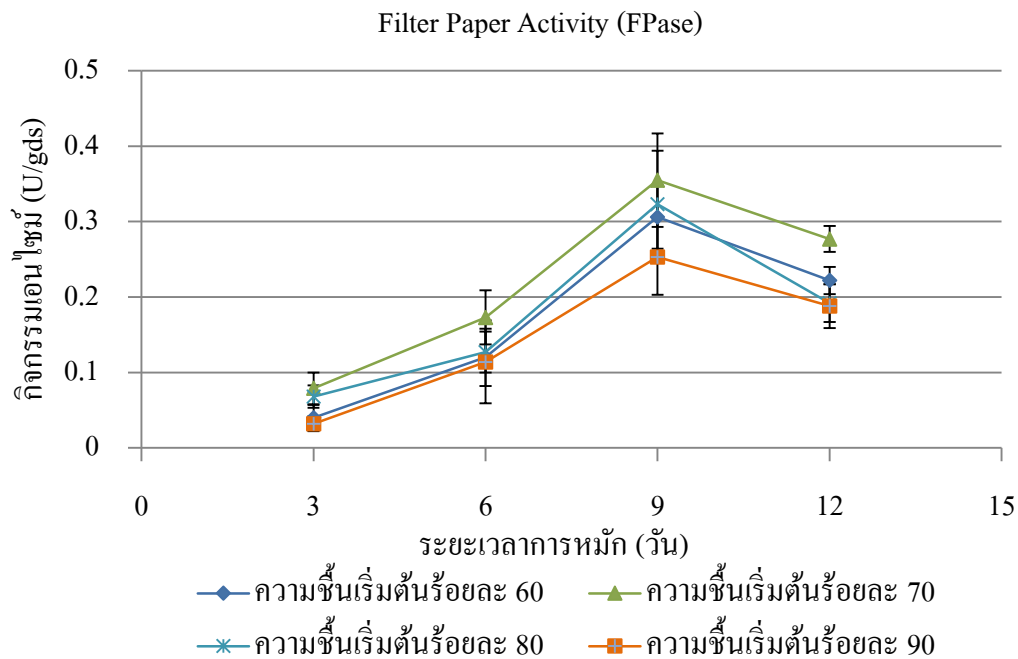


ภาพที่ 332 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. mastoporum* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต



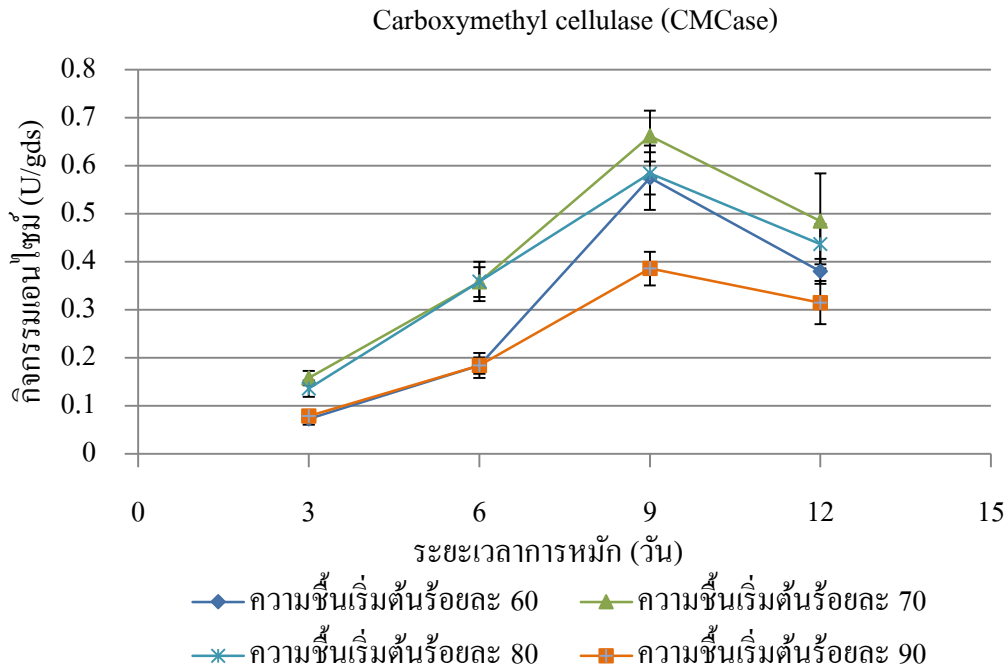
ภาพที่ 333 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. mastoporum* เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักในสภาพอาหารแข็งที่มีเปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต 2 กรัม จากเชื้อรา *G. mastoporum* มีกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper activity (FPase) Carboxymethylcellulase (CMCase) และ เซลโลไบเอส เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.355 ± 0.062 , 0.662 ± 0.053 และ 0.211 ± 0.015 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรต (U/gds) ตามลำดับ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 90 ในวันที่ 12 ของการหมัก แสดงผลการทดลองในภาพที่ 334-336

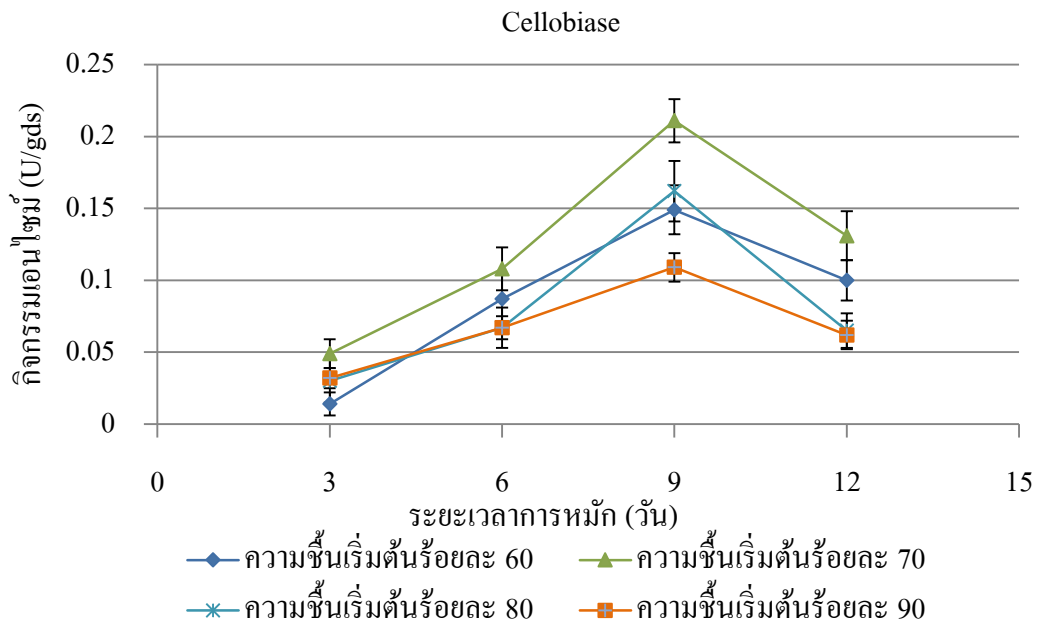


ภาพที่ 334 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Filter Paper Activity (FPase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. mastoporum* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ ง35 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Carboxymethyl cellulase (CMCase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. mastoporum* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต



ภาพที่ ง36 ผลของความชื้นต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบเอส (Cellobiase) ที่สร้างจากเชื้อรา *G. mastoporum* เมื่อใช้เปลือกถั่วลิสงที่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรต

ตารางภาคผนวกที่ 13 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

pH เริ่มต้น	Protein ($\mu\text{g/ml}$)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μg)		
		FPase (U/ μg)	CMCase (U/ μg)	Cellobiase (U/ μg)
pH 5	80.910	0.015 \pm 0.000	0.033 \pm 0.001	0.002 \pm 0.000311
pH 5.5	83.740	0.016 \pm 0.001	0.033 \pm 0.002	0.002 \pm 0.000446
pH 6	75.965	0.021 \pm 0.000	0.040 \pm 0.002	0.003 \pm 0.000395
pH 6.5	82.240	0.017 \pm 0.001	0.032 \pm 0.001	0.002 \pm 0.00023
pH 7	87.885	0.013 \pm 0.000	0.028 \pm 0.002	0.002 \pm 0.000508

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ \pm ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 14 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

pH เริ่มต้น	Protein ($\mu\text{g/ml}$)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μg)		
		FPase (U/ μg)	CMCase (U/ μg)	Cellobiase (U/ μg)
pH 5	65.336	0.01345 \pm 0.000142	0.03953 \pm 0.002	0.00295 \pm 0.000668
pH 5.5	61.372	0.01513 \pm 0.000759	0.04364 \pm 0.002	0.00439 \pm 0.0002245
pH 6	61.849	0.01824 \pm 0.000179	0.04661 \pm 0.002	0.00516 \pm 0.0001235
pH 6.5	65.321	0.01510 \pm 0.000335	0.03989 \pm 0.001	0.00418 \pm 0.0002864
pH 7	69.769	0.01324 \pm 0.000058	0.03366 \pm 0.002	0.00231 \pm 0.0001451

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ \pm ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 15 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

pH เริ่มต้น	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μ g)		
	FPase (U/ μ g)	CMCase (U/ μ g)	Cellobiase (U/ μ g)
pH 5	0.011 \pm 0.001	0.030 \pm 0.002	0.002 \pm 0.000228
pH 5.5	0.011 \pm 0.001	0.033 \pm 0.001	0.002 \pm 0.000211
pH 6	0.013 \pm 0.001	0.038 \pm 0.001	0.003 \pm 0.000265
pH 6.5	0.010 \pm 0.000	0.033 \pm 0.000	0.002 \pm 0.000358
pH 7	0.010 \pm 0.001	0.032 \pm 0.002	0.002 \pm 0.000222

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ \pm ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 16 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 70 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

pH เริ่มต้น	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μ g)		
	FPase (U/ μ g)	CMCase (U/ μ g)	Cellobiase (U/ μ g)
pH 5	0.01358 \pm 0.00007	0.03572 \pm 0.0021	0.00155 \pm 0.0004002
pH 5.5	0.01346 \pm 0.00087	0.03455 \pm 0.0012	0.00261 \pm 0.0002863
pH 6	0.01810 \pm 0.00139	0.04202 \pm 0.0000	0.00393 \pm 0.0003877
pH 6.5	0.01405 \pm 0.00103	0.03610 \pm 0.0001	0.00269 \pm 0.0003723
pH 7	0.01257 \pm 0.00094	0.03218 \pm 0.0019	0.00197 \pm 0.000268

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ \pm ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 17 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ

pH เริ่มต้น	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μ g)		
	FPase (U/ μ g)	CMCase (U/ μ g)	Cellobiase (U/ μ g)
25 องศาเซลเซียส	0.01686 \pm 0.00124	0.03367 \pm 0.00225	0.00205 \pm 0.00017
30 องศาเซลเซียส	0.01911 \pm 0.00095	0.03613 \pm 0.00002	0.00224 \pm 0.00025
37 องศาเซลเซียส	0.01412 \pm 0.00120	0.03096 \pm 0.00180	0.00168 \pm 0.00025

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ \pm ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 18 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ

pH เริ่มต้น	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μ g)		
	FPase (U/ μ g)	CMCase (U/ μ g)	Cellobiase (U/ μ g)
25 องศาเซลเซียส	0.01167 \pm 0.00119	0.03025 \pm 0.00156	0.00300 \pm 0.00020
30 องศาเซลเซียส	0.01646 \pm 0.00107	0.03353 \pm 0.00023	0.00390 \pm 0.00017
37 องศาเซลเซียส	0.01195 \pm 0.00104	0.02863 \pm 0.00022	0.00239 \pm 0.00012

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ \pm ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 19 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ

pH เริ่มต้น	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μ g)		
	FPase (U/ μ g)	CMCase (U/ μ g)	Cellobiase (U/ μ g)
25 องศาเซลเซียส	0.01520 \pm 0.00055	0.03814 \pm 0.00167	0.00310 \pm 0.00006
30 องศาเซลเซียส	0.02009 \pm 0.00094	0.04475 \pm 0.00014	0.00430 \pm 0.00036
37 องศาเซลเซียส	0.01162 \pm 0.00023	0.03627 \pm 0.00136	0.00269 \pm 0.00042

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ \pm ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ ๒๒๐ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ ๑ ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ

pH เริ่มต้น	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/μg)		
	FPase (U/μg)	CMCase (U/μg)	Cellobiase (U/μg)
25 องศาเซลเซียส	0.00143±0.00139	0.00323±0.00316	0.00234±0.00294
30 องศาเซลเซียส	0.00170±0.00630	0.00365±0.00809	0.00292±0.00195
37 องศาเซลเซียส	0.00101±0.00103	0.00283±0.00359	0.00243±0.00798

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ ๒๒๑ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ ๑ ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/μg)		
	FPase (U/μg)	CMCase (U/μg)	Cellobiase (U/μg)
(NH ₄) ₂ SO ₄ ชุดควบคุม	0.023±0.001	0.040±0.002	0.002±0.000
NH ₄ NO ₃	0.019±0.000	0.034±0.000	0.002±0.000
NH ₄ Cl	0.014±0.001	0.027±0.000	0.001±0.000
yeast extract	0.033±0.003	0.047±0.004	0.004±0.000
peptone	0.022±0.002	0.042±0.001	0.003±0.000

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ ๒๒ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/μg)		
	FPase (U/μg)	CMCase (U/μg)	Cellobiase (U/μg)
(NH ₄) ₂ SO ₄ ชุดควบคุม	0.021±0.001	0.037±0.002	0.004±0.001
NH ₄ NO ₃	0.014±0.001	0.029±0.000	0.002±0.000
NH ₄ Cl	0.016±0.000	0.027±0.000	0.002±0.000
yeast extract	0.033±0.000	0.042±0.001	0.006±0.000
peptone	0.025±0.003	0.038±0.002	0.004±0.001

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ ๒๓ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/μg)		
	FPase (U/μg)	CMCase (U/μg)	Cellobiase (U/μg)
(NH ₄) ₂ SO ₄ ชุดควบคุม	0.020±0.002	0.038±0.000	0.004±0.000
NH ₄ NO ₃	0.019±0.001	0.038±0.002	0.003±0.000
NH ₄ Cl	0.016±0.000	0.033±0.002	0.002±0.000
yeast extract	0.026±0.000	0.043±0.003	0.005±0.000
peptone	0.021±0.002	0.039±0.001	0.005±0.000

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ ± ด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 24 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μ g)		
	FPase (U/ μ g)	CMCase (U/ μ g)	Cellobiase (U/ μ g)
(NH ₄) ₂ SO ₄ ชุดควบคุม	0.018±0.001	0.037±0.003	0.003±0.000
NH ₄ NO ₃	0.014±0.002	0.031±0.002	0.002±0.000
NH ₄ Cl	0.013±0.000	0.029±0.001	0.002±0.000
yeast extract	0.021±0.003	0.046±0.000	0.004±0.000
peptone	0.018±0.000	0.035±0.000	0.004±0.000

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าการทดลอง 2 ซ้ำ และ \pm ค่ายส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 25 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัวแทนยวมน้ำ

น้ำตาลแลคโตส	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μ g)		
	FPase (U/ μ g)	CMCase (U/ μ g)	Cellobiase (U/ μ g)
control	0.022±0.002	0.044±0.001	0.003±0.000
0.5 % w/w	0.021±0.000	0.042±0.001	0.006±0.001
1.00 % w/w	0.025±0.002	0.046±0.003	0.007±0.001
1.50 % w/w	0.032±0.003	0.053±0.001	0.009±0.000
2.00 % w/w	0.027±0.000	0.047±0.001	0.008±0.001

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ ชุดที่มีค่า pH 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่เติมตัวแทนยวมน้ำ

ตารางภาคผนวกที่ ง26 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัวแทนยว่นา

น้ำตาลแลคโตส	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μ g)		
	FPase (U/ μ g)	CMCase (U/ μ g)	Cellobiase (U/ μ g)
control	0.020 \pm 0.001	0.034 \pm 0.000	0.004 \pm 0.000
0.5 % w/w	0.019 \pm 0.000	0.035 \pm 0.000	0.006 \pm 0.000
1.00 % w/w	0.022 \pm 0.000	0.041 \pm 0.001	0.008 \pm 0.000
1.50 % w/w	0.024 \pm 0.003	0.044 \pm 0.003	0.009 \pm 0.001
2.00 % w/w	0.020 \pm 0.001	0.036 \pm 0.000	0.008 \pm 0.000

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ ชุดที่มีค่า pH 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่เติมตัวแทนยว่นา

ตารางภาคผนวกที่ ง27 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัวแทนยว่นา

น้ำตาลแลคโตส	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μ g)		
	FPase (U/ μ g)	CMCase (U/ μ g)	Cellobiase (U/ μ g)
control	0.021 \pm 0.000	0.041 \pm 0.001	0.005 \pm 0.000
0.5 % w/w	0.020 \pm 0.001	0.037 \pm 0.000	0.006 \pm 0.000
1.00 % w/w	0.022 \pm 0.001	0.035 \pm 0.001	0.006 \pm 0.000
1.50 % w/w	0.029 \pm 0.001	0.054 \pm 0.005	0.013 \pm 0.001
2.00 % w/w	0.027 \pm 0.001	0.041 \pm 0.000	0.009 \pm 0.000

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ ชุดที่มีค่า pH 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่เติมตัวแทนยว่นา

ตารางภาคผนวกที่ ๒๒๘ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นตัวเหนียว

น้ำตาลแลคโตส	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/μg)		
	FPase (U/μg)	CMCase (U/μg)	Cellobiase (U/μg)
control	0.021±0.001	0.038±0.000	0.004±0.000
0.5 % w/w	0.021±0.000	0.039±0.002	0.005±0.001
1.00 % w/w	0.020±0.001	0.039±0.002	0.006±0.000
1.50 % w/w	0.024±0.002	0.048±0.003	0.012±0.001
2.00 % w/w	0.019±0.001	0.038±0.001	0.006±0.000

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ ชุดที่มีค่า pH 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่เติมตัวเหนียว

ตารางภาคผนวกที่ ๒๒๙ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวเหนียว

เวราทิลแอลกอฮอล์	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/μg)		
	FPase (U/μg)	CMCase (U/μg)	Cellobiase (U/μg)
control	0.02361±0.00005	0.04440±0.00003	0.00317±0.00015
0.25 mM	0.02382±0.00077	0.04123±0.00098	0.00398±0.00028
0.50 mM	0.02427±0.00033	0.04609±0.00421	0.00431±0.00043
0.75 mM	0.03125±0.00264	0.05390±0.00283	0.00565±0.00057
1.00 mM	0.02573±0.00003	0.04518±0.00223	0.00559±0.00047

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ ชุดที่มีค่า pH 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่เติมตัวเหนียว

ตารางภาคผนวกที่ ง30 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวเหนี่ยวนำ

เวราทิลแอลกอฮอล์	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μ g)		
	FPase (U/ μ g)	CMCase (U/ μ g)	Cellobiase (U/ μ g)
control	0.02149 \pm 0.00020	0.03739 \pm 0.00035	0.00490 \pm 0.00010
0.25 mM	0.02246 \pm 0.00016	0.03780 \pm 0.00168	0.00517 \pm 0.00029
0.50 mM	0.02744 \pm 0.00207	0.02443 \pm 0.02688	0.00783 \pm 0.00087
0.75 mM	0.02047 \pm 0.00013	0.03842 \pm 0.00090	0.00606 \pm 0.00002
1.00 mM	0.02045 \pm 0.00080	0.04005 \pm 0.00178	0.00595 \pm 0.00060

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ ชุดที่มีค่า pH 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่เติมตัวเหนี่ยวนำ

ตารางภาคผนวกที่ ง31 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. coccineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวเหนี่ยวนำ

เวราทิลแอลกอฮอล์	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μ g)		
	FPase (U/ μ g)	CMCase (U/ μ g)	Cellobiase (U/ μ g)
control	0.02345 \pm 0.00121	0.04231 \pm 0.00184	0.00537 \pm 0.00001
0.25 mM	0.02399 \pm 0.00177	0.04234 \pm 0.00256	0.00564 \pm 0.00054
0.50 mM	0.02553 \pm 0.00210	0.04531 \pm 0.00344	0.00639 \pm 0.00073
0.75 mM	0.02993 \pm 0.00390	0.05379 \pm 0.00049	0.00628 \pm 0.00005
1.00 mM	0.02835 \pm 0.00134	0.04884 \pm 0.00232	0.00591 \pm 0.00061

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ ชุดที่มีค่า pH 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่เติมตัวเหนี่ยวนำ

ตารางภาคผนวกที่ ง32 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *P. sanguineus* โดยใช้เปลือกถั่วลิสงเป็นสับสเตรต ในวันที่ 9 ของการหมัก ค่า pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเวราทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวเหนียวน้ำ

น้ำตาลแลคโตส	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (U/ μ g)		
	FPase (U/ μ g)	CMCase (U/ μ g)	Cellobiase (U/ μ g)
control	0.02125 \pm 0.00014	0.03909 \pm 0.00158	0.00418 \pm 0.00028
0.25 mM	0.02214 \pm 0.00104	0.03866 \pm 0.00075	0.00445 \pm 0.00013
0.50 mM	0.03029 \pm 0.00142	0.05421 \pm 0.00297	0.00724 \pm 0.00109
0.75 mM	0.02558 \pm 0.00156	0.04541 \pm 0.00060	0.00490 \pm 0.00006
1.00 mM	0.02520 \pm 0.00107	0.04293 \pm 0.00349	0.00475 \pm 0.00010

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ ชุดที่มีค่า pH 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่เติมตัวเหนียวน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นายเมธัส ชูเวช

วัน เดือน ปี เกิด 9 กรกฎาคม พ.ศ. 2528

ประวัติการศึกษา ปีการศึกษา 2551 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ปีการศึกษา 2557 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลงานตีพิมพ์ Methus Chuwech and Nuansri Rakariyatham. 2014. Potential of peanut hulls as substrates for fungal cellulase bioproduction through solid state fermentation. *KKU Research Journal*. Supplement issue, 245-253.



มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
rights reserved



Potential of Peanut Hulls as Substrates for Fungal Cellulase Bioproduction Through Solid State Fermentation

Methus Chuwech¹ and Nuansri Rakariyatham^{2*}

¹ Division of Biotechnology, Graduate School, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*

*Correspondent author: nuansri1@yahoo.com

Abstract

One of the main challenges of cellulosic bio-ethanol production is the cellulase enzyme. Cellulase is used in the hydrolysis of cellulose to sugars for the fermentation of bio-ethanol, but the commercial cellulase enzyme preparations are very expensive. This study has attempted to use peanut hulls as a substrate for cellulase production via solid-state fermentation (SSF) by white-rot fungus, *Ganoderma australe*. The effects of moisture content, culture temperature and initial pH value on cellulase biosynthesis were observed for optimal production in flask fermentors. The activities of different cellulase enzymes, namely filter paper activity (FPase), carboxymethyl cellulase (CMCase) and β -Glucosidase (cellobiase) were carried out using filter paper, carboxymethylcellulose and cellobiose as the substrate, respectively. The optimal FPase activity (0.062 ± 0.017 IU/ml), CMCase activity (0.426 ± 0.074 IU/ml) and cellobiase activity (0.035 ± 0.007 IU/ml), were obtained after 9 days of cultivation with an initial 70% of moisture content, a temperature of 25°C and an initial pH of 5.5. These results suggest that the crude cellulase production under SSF using peanut hulls as a substrate could be an alternative choice for commercial enzyme preparations.

Keywords: cellulosic bio-ethanol, solid-state fermentation, cellulase, *Ganoderma australe*, peanut hulls

1. Introduction

In the context of green energy, one of the main challenges of cellulosic bio-ethanol production is the cellulase enzyme itself, which is used in the hydrolysis of cellulose to fermentable sugars for bio-ethanol production. The bioconversion of cellulose to fermentable sugars requires the synergistic action of the complete cellulase system, comprised of endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (cellobiohydrolases; EC 3.2.1.91) and β -glucosidases or cellobiase (EC 3.2.1.21) (1-3). However,

production cost of the enzymes is very high and accounts for about 40–60% of the total production cost (4). In recent years, research efforts have been focused on lowering the cost of the enzymes. The use of agro-industrial waste and its byproducts as substrates in solid-state fermentation (SSF) is one of the alternative choices in reducing cellulase costs (5). The SSF process obtained higher yields in a shorter time period than the submerged fermentation (SmF) applications (6). Chahal *et al.* (7) had reported a higher yield of cellulase from *Trichoderma reesei* in SSF cultures, compared to SmF. Tengerdy *et al.* (8) compared

cellulase production in SmF and SSF systems and had indicated that there was about a 10-fold reduction in the production cost when SSF is employed for production. SSF are strongly recommended in systems for producing cellulase at a lower price, over SmF (9). There are several reports that have described the use of agro-industrial wastes for cellulase production, but there have still been very few reports on the utilization of peanut hulls. In Thailand, peanut hulls are by-products in the peanut processing industry and are abundant sources of less expensive forms of biomass (10). There have been no specific reports on cellulase production from peanut hulls. From this point of view, we developed a method for utilizing peanut hulls as a substrate for producing cellulase by white rot fungus. *Ganoderma australe* which was isolated and identified by our laboratory (11). This is the first report on production of cellulase enzymes by *G. australe* from peanut hulls.

The aim of the present study was to optimize various factors, including the level of moisture content, initial pH and temperature, for the maximum yield of cellulase in SSF using peanut hulls as a substrate, which is considered a value-added bio-product.

2. Materials and Methods

2.1 Microorganisms

The fungal strain, *G. australe* was isolated and identified by our laboratory and was cultivated on potato dextrose agar (PDA) plates containing 2.0% agar and incubated at ambient temperatures for 7 days.

2.2 Detection of microbial cellulase on agar plate

A preliminary qualitative analysis for cellulolytic activity was conducted using Congo red dye (12). *G. australe* was grown on CMC agar containing (0.2% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄, 0.05% KCl, 0.2% carboxymethyl cellulose (CMC) sodium salt, 0.02% peptone, and 1.7% agar). Plates were incubated at ambient temperatures for 3 days. The agar medium was

flooded with 0.1% Congo red dye for 15 to 20 minutes, and then de-stained with 1M NaCl for 15 minutes. The formation of a clear zone of hydrolysis indicated cellulose degradation.

2.3 Substrates and pretreatment

Peanut hulls used in this experiment were obtained from a local market in Chiang Mai. These materials were dried overnight in a hot air oven (60°C) before being finely crushed and stored in air-tight containers. The pretreatment of peanut hulls was then carried out separately by treating them with 0.5% (w/v) H₂SO₄ and 2.5% NaOH at 121°C for 15 min. The pretreated residues were washed extensively to the neutral pH (7.0) level and dried at 60°C in the oven.

2.4 Fiber analysis

To determine the lignocellulosic composition of peanut hulls, the cellulose, hemicellulose and lignin content were routinely established using the neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and acid detergent lignin (ADL), and then were analyzed by the method of Van Soest *et al.* (13). Cellulose content was estimated as the difference between ADF and ADL, hemicellulose content was estimated as being between NDF and ADF, and lignin content was estimated as the difference between ADL and the ash.

The components that were estimated by these tests is summarized below:

NDF = lignin and Acid Insoluble Ash + cellulose + hemicellulose

ADF = lignin and Acid Insoluble Ash + cellulose

ADL = lignin and Acid Insoluble Ash

2.5 Optimization of cellulase production under solid state fermentation (SSF)

Solid state fermentation was carried out in 250 ml erlenmeyer flasks, each having 2.0 g of dried pretreated peanut residue. The initial moisture was adjusted to 60, 70, 80 and 90% with the mineral salt solution [(NH₄)₂SO₄, 0.5 g l⁻¹; KH₂PO₄, 0.5 g l⁻¹; MgSO₄, 0.5 g l⁻¹ and pH 5.5]. The flasks were sterilized by autoclaving at 121°C (15

psi), and allowed to cool at room temperature. Inoculation was performed using a sterile cork borer, in 7-day old mycelium agar disc (diameter, 0.6 cm.) and incubated at 25°C in an incubator for 12 days. The maximum levels of enzyme production were selected for further optimization of the SSF production process.

2.5.1 Optimization of fermentation time period and moisture content

To optimize conditions for fermentation, flasks containing 2.0 g of dried pretreated peanut residue were used with various levels of moisture content (60, 70, 80 and 90%), and periods of fermentation time (3, 6, 9 and 12 days). Other factors were constant at the initial pH value of 5.5, with a fermentation temperature of 25°C. Fermented products were harvested in triplicate at the specified fermentation times and analyzed for cellulase activities.

2.5.2 Optimization of temperature and initial pH

To determine the optimum temperature, triplicate flasks containing 2.0 g of dried pretreated peanut residue were adjusted to a constant initial pH value of 7.0, inoculated and subjected to fermentation at varying temperatures (20, 25 and 30°C). To investigate the effects of the initial pH value on enzyme production, pH values were varied (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 and 7.5) with inoculation and fermentation being performed at 25°C for a specified time period of 9 days.

2.6 Enzyme extraction

The enzymes were extracted by adding 15 ml of 50 mM citrate buffer (pH 4.8) to the solid state cultures and the contents were shaken on a rotary shaker at 150 rpm for 60 min at room temperature. The contents in the flasks were then filtered through a metallic sieve and the solid residue was pressed to remove any remaining liquid, followed by centrifugation (10000 x g for 15 min at 4°C). The supernatant was saved and analyzed for its enzyme activities.

2.7 Enzyme activity assays

Samples were collected every 3 days during the

fermentation process for the determination of cellulase activity (Filter paper activity (FPase), carboxymethyl cellulase (CMCase) and cellobiase) according to standard IUPAC procedures and were then expressed as international units (IU) by Ghose (14). Filter paper activity (FPase) was assayed by measuring the release of reducing sugars in a reaction mixture of Whatman's No. 1 filter paper (1.0 x 6.0 cm.) as a substrate in 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.8) at 50°C, after 60-min of incubation. Carboxymethyl cellulase (CMCase) activity was assayed by measuring the release of reducing sugars in a reaction mixture containing 0.5 ml of crude enzyme and 0.5 ml of 2% (w/v) of CMC (Sigma) solution in 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.8) incubated at 50°C for a period of 30 min. The liberated reducing sugars were measured using 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), according to the method of Miller (15). One international unit of FPase and CMCase activity is the amount of enzyme that releases 1 μ mol of glucose per min during the hydrolysis reaction. Cellobiase activity was determined using 15 mM cellobiose (Fluka) at 50°C after 30 min of incubation. One international unit of cellobiase activity is the amount of enzyme that forms 2 μ mol of glucose per min from cellobiose. The values of enzymatic activity were expressed as U/ml.

2.8 Data analysis

Lignocellulosic composition and the enzyme activity values are expressed as the mean \pm S.D. of three replications calculated using MS Excel 2007.

3. Results and Discussion

3.1 Detection of microbial cellulase on agar plate

The fungal strain, *G. australe* was grown on CMC agar plates and checked for the cellulolytic activity by incubation at ambient temperatures for 3 days. The cellulase activity was indicated as a clear orange halo after being stained with 1% Congo red solution. *G. australe* showed a

clear zone with a diameter of 17 mm. This result indicated that *G. australe* had the potential to produce cellulolytic enzymes.

3.2 Fiber analysis

Table I. shows the linocellulosic composition as NDF, ADF, and ADL, cellulose, hemicellulose, and lignin content of each composition before and after pretreatment of peanut hulls. Cellulose content in untreated peanut hulls and pretreated peanut residue were 38.7% and 33.8%, respectively. The acid-base pretreatment significantly hydrolyzed the hemicellulose and lignin contents by decreasing their percent values from 22.7 and 20.6 percent, to 7.8 and 8.6 percent, respectively.

3.3 Optimization of cellulase production under solid state fermentation (SSF)

In the present study, maximum enzyme production occurred 9 days of *G. australe* was best suited for FPase and CMCase revealing the yields 0.048 ± 0.005 U/mL and 0.382 ± 0.033 U/mL as depicted in Figure 2-3, and cellobiase yields of 0.028 ± 0.005 U/mL (Figure 4) was observed with an initial 70% of moisture content. On further incubation, the enzyme yields declined gradually at the end of 12 days It might be due to the depletion of nutrients, accumulation of harmful by-products in the culture medium and proteolysis of enzyme. This finding is in accordance to the finding of Tsao *et al.* (16). During SSF, both high and low moisture contents affect enzyme activity (17).

Table 1. Lignocellulose composition of peanut hulls.

Sample	Untreated Peanut hulls	Pretreated-Peanut residue
%NDF	82.0207 ± 0.5001	50.2533 ± 2.6880
%ADF	59.3392 ± 0.7176	42.4677 ± 1.5874
% Hemicellulose	22.6815 ± 0.9420	7.7856 ± 2.5270
% Cellulose	38.7230 ± 0.8968	33.8184 ± 1.5723
% Lignin	20.6162 ± 0.660	8.6493 ± 1.9386
% Acid Insoluble Ash	1.2911 ± 0.4888	1.1424 ± 0.0631



Figure 1. *Ganoderma australe* showed a clear zone of hydrolysis, which indicates CMC degradation.

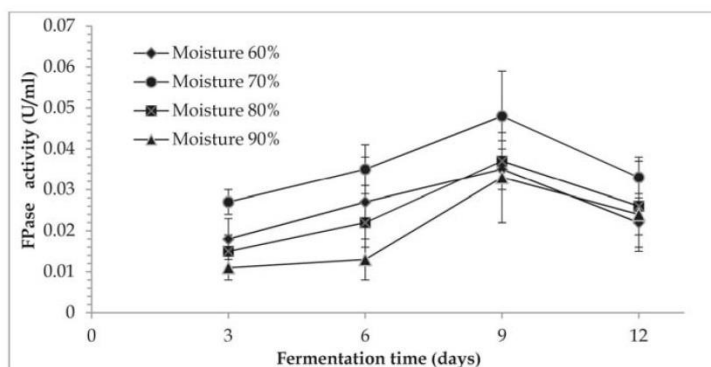


Figure 2. Fermentation time profiles of filter paper cellulase (FPase) activity of peanut hulls.

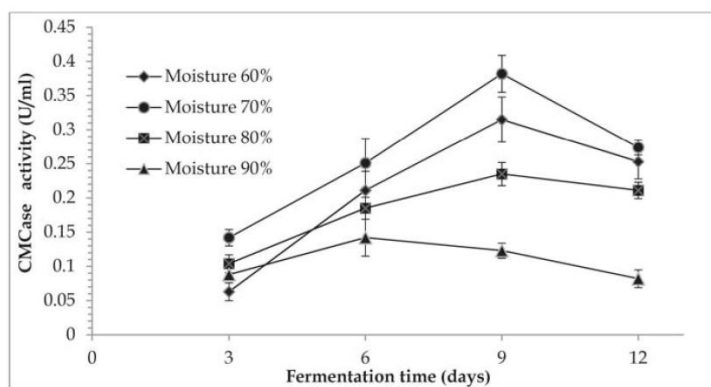


Figure 3. Fermentation time profiles of carboxymethyl cellulase (CMCase) activity of peanut hulls.

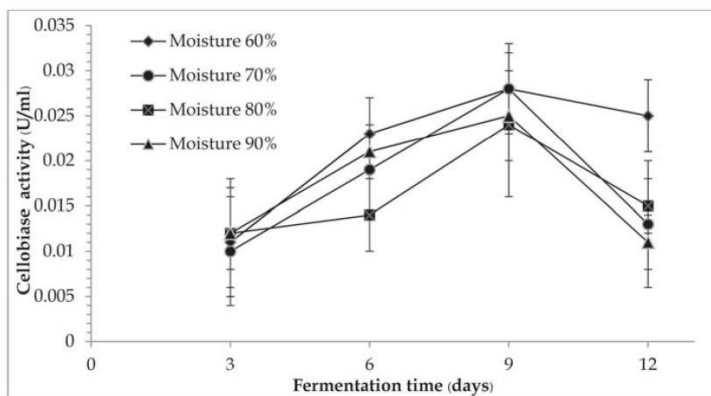


Figure 4. Fermentation time profiles of cellobiase activity of peanut hulls.

The temperature of the fermentation medium is one of the parameters that has a significant influence on the end product. Figure 5 illustrates that the enzyme activity increased with an initial increase in temperature to 25°C. When cultivated at 30°C, the activity of the enzymes decreased substantially. The highest yields of FPase (0.054 ± 0.013 U/mL), CMCase (0.415 ± 0.057 U/mL) and cellobiase (0.029 ± 0.004 U/mL) were obtained at 25°C on Day 9, whereas the enzyme yield was reduced to 0.033 ± 0.011 , 0.372 ± 0.031 and 0.023 ± 0.003 U/mL, respectively, at 30°C of incubation with a significant reduction in the cellulase activity. It is a well-known fact that higher temperatures (above 30°C) alter the cell

membrane composition and stimulate protein catabolism, causing cell death (18).

To study the effect of initial pH on cellulase production, the pH value of the moistening agent was adjusted to between 5.0 and 7.5. The production profiles of all the three components, as shown in (Figure 6), depict the highest FPase (0.062 ± 0.017 U/mL), CMCase (0.426 ± 0.074 U/mL) and cellobiase (0.035 ± 0.007 U/mL) were observed at a pH value of 5.5. Any variation from this optimal pH value resulted in reduced enzyme activity. This might be due to the fact that cultivation of fungi at an unfavourable pH value may result in reduced enzyme activities by reducing accessibility of the substrate (19).

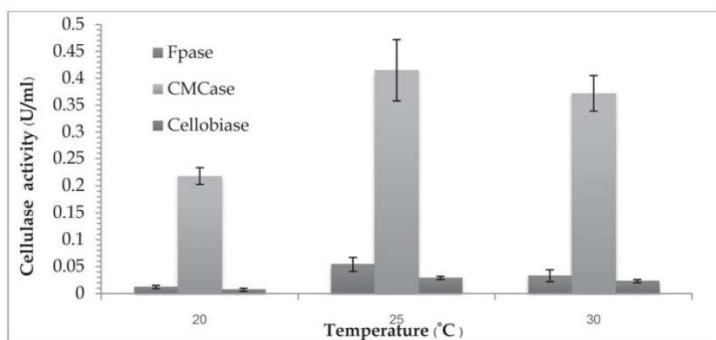


Figure 5. Cellulase activities at varying temperatures.

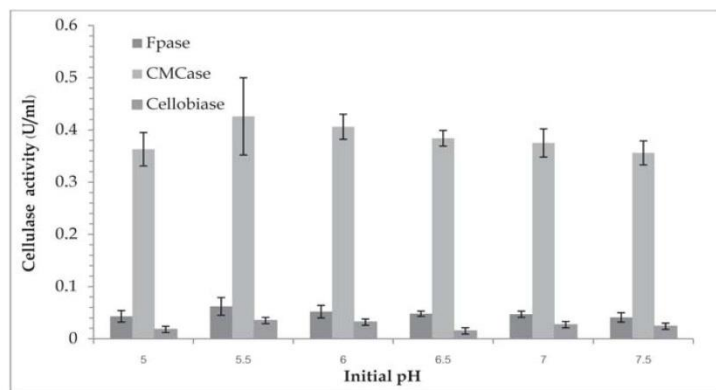


Figure 6. Cellulase activities at different pH levels.

4. Discussions

In this investigation, we studied the potential of utilizing peanut hulls as substrate for cellulase production under SSF by *G. australe* isolated and identified by our laboratory. The use of abundantly available and cost-effective agro-industrial waste residues that were once considered useless, are presently being recognized as a potential raw material in achieving higher cellulase yields and reducing the overall cost of enzyme production (20). Cellulase production under SSF is gaining considerable interest because it is a cost effective form of technology that has been suggested to be capable of reducing production costs by 10 fold and has the ability to provide much higher yields, when compared to the submerged fermentation method (8,21). The present study demonstrated that the peanut residue could provided the maximum levels of cellulase, with yields of 0.062 ± 0.017 , 0.426 ± 0.074 , and 0.035 ± 0.007 IU/ml for FPase, CMCCase and cellobiase, respectively, after 9 days of cultivation with an initial 70% moisture content and an initial pH value of 5.5. The production of CMCCase was always higher than FPase, and this phenomenon is in accordance with other reported findings (22-26). In the case of cellobiase, from Fig.4, it is obvious that cellobiase activity was the lowest. There were no significant differences for days 9 and 12. When cellobiase secretion is low, cellobiose accumulates instead of glucose (27). Cellobiose accumulation acts as a feedback inhibitor of cellulose depolymerization by endo and exoglucanases (28-29) which is a critical factor in the industrial scale conversion of cellulose to glucose. A study of the time course is of prime importance for the cellulase synthesis of fungi, the maximum enzyme production occurred at 9 days with the highest yields. In a similar study for cellulase production by *T. reesei*, cellulase yields remained fairly constant over the 3-5 days of fermentation, with a maximum yield observed at Day 4 (30). Some factors like moisture content is essential for microbial

metabolism, and its depletion affects the diffusion of the solute, and the osmotic change (31). During SSF, both high and low moisture contents affect enzyme productivity. Furthermore, the effect of pH value on cellulase production was studied and it was found that the acidic pH range of 5.5 was optimal for enzyme production. The enzyme activity increased to the maximum level, followed by a slight decrease in activity. Das *et al.* (32) also observed that cellulase activity was optimum at a pH value of 4.8. The variation of pH from the optimum level causes denaturation of the enzymes and reduces enzyme synthesis ability. In a similar study by Dinis *et al.* (33) the production of ligninolytic enzymes during wheat straw its activity was very high, comparatively with CMCCase. There were no significant differences for days 7, 14 and 21 and the maximum value observed was on *Trametes versicolor* on day 28 (0.03 U/ml). In the case of CMCCase activity the most active producer appeared to be *Ganoderma applanatum*, with a maximum value (0.13 U/ml) on day 14, while in *Trametes versicolor* (0.07 U/ml), *Phlebia rufa* (0.06 U/ml) and *Bjerkandera adusta* (0.02 U/ml) was observed on day 7. While all fungi produced FPase activity was very low, comparatively with CMCCase.

5. Conclusion

Successful attempts have been made to utilize peanut hulls, a highly abundant form of agro-industrial waste, as a substrate for the production of cellulase complex by *G. australe* under SSF, in order to develop a low cost production system. Fairly good amounts of FPase, CMCCase, and cellobiase were obtained. This process highlighted the potential of these raw materials for enzyme production, thereby reducing the cost of cellulase production. Further utilization, in terms of novel inducer and scale up studies, need to be carried out in order to exploit these inexpensively produced commercial cellulase enzyme preparations in the second-generation biofuel

production process.

6. Acknowledgement

The author would like to thank the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University and the Division of Biotechnology, Graduate School, Chiang Mai University for their contributive support to this research study

7. References

- (1) Milala MA, Shugaba A, Gidado A, Ene AC, Wafer JA. Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme productions by *Aspergillus niger*. Res J Agr Biol Sci. 2005; 1(4): 325-328.
- (2) Bansal N, Tewari R, Gupta JK, Soni SK, Soni R. A novel strain of *Aspergillus niger* producing a cocktail of industrial depolymerising enzymes for the production of second generation biofuels. Bioresour Technol. 2011;6(1):552-569.
- (3) Deswal D, Khasa YP, Kuhad RC. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis sp.* RCK2010 under solid state fermentation. Bioresour Technol. 2011; 102(10): 6065-72.
- (4) Ahamed A, Vermette P. Culture based strategies to enhance cellulose enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-30 in bioreactor culture conditions. Biochem Eng J. 2008;40(3): 399-407.
- (5) Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products, Process Biochem. 2000;35(10): 1153-1169.
- (6) Dhillon GS, Brar SK, Verma M, Tyagi RD. Recent advances in citric acid bio-production and recovery. Food Bioproc Technol. 2011;4(4): 505-529.
- (7) Chahal DS. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. Appl Environ Microbiol. 1985;49(1): 205-210.
- (8) Tengerdy RP. Cellulase production by solid substrate fermentation. J Sci Ind Res. 1996 55: 313-316.
- (9) Vintila T, Dragomirescu M, Jurcoane S, Vintila D, Caprita R, Maniu M. Production of cellulase by submerged and solid-state cultures and yeasts selection for conversion of lignocellulose to ethanol. Rom Biotechnol Lett. 2009;14(1): 4275-4281.
- (10) Sukharomana S, Dobkuntod B. Peanut in the Thai food system : A macro perspective. peanut in local and global food systems series report No. 8 ; 2003.
- (11) Tanruean K, Chandet N, Rakariyatham N. Bioconversion of ferulic acid into high value metabolites by white rot fungi isolated from fruiting-body of the polypore mushroom. J Med Bioen. 2013; 2(3): 168-172.
- (12) Ramesh CK, Richa S, Hena D, Som D, Arvind G, A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. Curr Microbiol. 2008; 57(5): 503-507.
- (13) Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J Dairy Sci. 1991;74(10): 3583-3597.
- (14) Ghose TK, Measurement of cellulase activities. Pure Appl Chem. 1987;59(2): 257-268.
- (15) Miller GL, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 1959;31(3): 426-428.
- (16) Tsao GT, Xia L, Cao N, Gong CS. Solid state fermentation with *Aspergillus niger* for cellobiose production. Appl Biochem Biotechnol 2000; 84-86(1): 743-749.
- (17) Anto H, Trivedi UB, Patel KC, Glucoamylase production by SSF using rice flake manufacturing waste products as substrate. Bioresour Technol. 2000; 97(10): 1161-1166.

- (18) da Silva R, Lago ES, Merheb CW, Macchione MM, Park YK, Gomes E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. *Braz J Microbiol.* 2005; 36(3): 235–241.
- (19) Bakri Y, Jawahar M, Arabi MIE. Improvement of xylanase production by *Cochliobus sativus* in submerged culture. *Food Technol Biotechnol.* 2008; 46(1): 116-118.
- (20) Karmakar M, Ray RR. Extra cellular endoglucanase production by *Rhizopus oryzae* in solid and liquid state fermentation of agro waste. *Asian J Biotechnol.* 2010;2(1): 27–36.
- (21) Singhania RR, Sukumaran RK, Pillai A, Prema P, Szakacs G, Pandey A. Solid-state fermentation of lignocellulosic substrates for cellulase production. *Indian J Biotechnol.* 2006;5(3): 332-336.
- (22) Quiroz-Castaneda RE, Balcazar-Lopez E, Dantan-Gonzalez E, Martinez A, Folch-Mallol J, Anaya CM. Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electron J Biotechnol.* 2009; 12(4): 1-8.
- (23) Teoh YP, Mashitah MD. Cellulase production by *Pycnoporus sanguineus* on oil palm residues through pretreatment and optimization study. *J Appl Sci.* 2010; 10(12): 1036-1043.
- (24) Elisashvili V, Kachlishvili E, Penninckx M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Ind Microbiol Biotechnol.* 2008; 35(11): 1531-1538.
- (25) Kachlishvili E, Penninckx MJ, Tsiklauri N, Elisashvili V. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World J Microbiol Biotech.* 2005; 22(4): 391-397.
- (26) Khan MMH, Ali S, Fakhru'l-Razia A, Alam MZ. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 2007; 42(4): 381-386.
- (27) Stockton BC, Mitchell DJ, Grohmann K, Himmel ME. Optimum beta-d-glucosidase supplementation of cellulase for efficient conversion of cellulose to glucose. *Biotechnol Lett.* 1991; 13(1): 57-62.
- (28) Morais H, Ramos C, Forgacs E, Jakab A, Cserhati T. Enzyme production of *Pleurotus ostreatus* evaluated by the three-way principal component analysis. *Eng Life Sci.* 2004; 4(2): 165-170.
- (29) Howell JA, Stuck JD. Kinetics of solka floc cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulase. *Biotechnol Bioeng.* 1975;17(6): 873-893.
- (30) Singhania RR, Sukumaran RK, Pillai A, Prema P, Szakacs G, Pandey A. Solid-state fermentation of lignocellulosic substrates for cellulase production. *Indian J Biotechnol.* 2006;5(3): 332-336.
- (31) De Loecker R, Goossens W, Van DV, Verwilghen R, De Loecker W. Osmotic effects of dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer. *Cryobiology.* 1993; 30(3): 279–285.
- (32) Das M, Banerjee R, Bal S. Multivariable parameter optimization for the endoglucanase production by *Trichoderma reesei* Rut C30 from *Ocimum gratissimum* seed. *Braz Arch Biol Technol.* 2008; 51(1): 35-41.
- (33) Dinis MJ, Bezerra RM, Nunes F, Dias AA, Guedes CV, Ferreira LM, Cone JW, Marques GS, Barros AR, Rodrigues MA. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresour Technol.* 2009; 100(20):4829-35.