

การคัดเลือกและการผลิตเอนไซม์อาหารสัตว์จากเชื้อราชอบร้อน

Thermomyces lanuginosus (Tsiklinskaya)

Selection and Production of Animal Feed Enzymes by Thermophilic Fungi,

Thermomyces lanuginosus (Tsiklinskaya)

คำนำ

ปัจจุบันมีแนวโน้มว่าเศรษฐกิจจะมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ประชากรส่วนมากจึงนิยมบริโภคเนื้อสัตว์มากขึ้น ทำให้มีการขยายตัวของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพิ่มขึ้นด้วย การใช้อาหารที่มีคุณภาพต่ำ ซึ่งทำให้การเจริญเติบโตของสัตว์ช้า เสียเวลาในการเลี้ยง ส่งผลให้เนื้อสัตว์ไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด การเลี้ยงสัตว์ให้ได้คุณภาพ การศึกษาค้นคว้าเพื่อหาแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ผลิตอาหารสัตว์ใหม่ ๆ มาใช้เลี้ยงสัตว์ ตลอดจนการศึกษาเพื่อทราบส่วนประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้ในอาหารสัตว์ รวมถึงการศึกษาถึงความต้องการอาหารของสัตว์แต่ละประเภท ช่วงอายุ การให้ผลผลิตที่แน่นอนทำให้ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมกับสัตว์ได้ เพื่อให้อาหารสัตว์มีโภชนาการต่าง ๆ สมดุลครบถ้วนตามความต้องการของสัตว์ด้วยการปรับปรุงในหลาย ๆ ด้านจึงเป็นสิ่งสำคัญ และเพื่อให้มีผลผลิตและประสิทธิภาพที่ดีขึ้น จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงการเลี้ยงสัตว์ให้ได้คุณภาพในหลาย ๆ ด้าน เช่น การปรับปรุงทางพันธุกรรม การจัดการดูแลและรักษาโรคที่ได้รับการพัฒนาโดยใช้เทคโนโลยีและความรู้ใหม่ ๆ

การใช้เอนไซม์เพิ่มเข้าไปในอาหารสัตว์เป็นอีกหนึ่งวิธีสำหรับการพัฒนาคุณภาพอาหารสัตว์ให้มีประสิทธิภาพ ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์มีหลายชนิดด้วยกัน ที่นิยมใช้กันได้แก่ เอนไซม์ ไซลานีส บิตากลูแนนส บิตากาแลคโตซิเดส ไฟเตส โปรติเอส และอะไมเลส (Ogden, 1995; Ronald, 1997) แหล่งของเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์สามารถสกัดได้จากหลายแหล่ง เช่น เอนไซม์จากพืช สัตว์ รวมทั้งจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา (Chesson, 1993) เชื้อราที่ชอบร้อน *Thermomyces lanuginosus* เป็นเชื้อราสายพันธุ์หนึ่งที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์ได้ เช่น เอนไซม์ ไซลานีส บิตากลูแนนส บิตากาแลคโตซิเดส ไฟเตส โปรติเอส และอะไมเลส เป็นต้น เอนไซม์ที่พบส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติการทำงานที่อุณหภูมิสูงและทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี (Purkarthofer *et al.*, 1993; Alam *et al.*, 1994; อานนท์และคณะ, 2543) เอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ต้องเป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติการทำงานที่อุณหภูมิสูงและมีความทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี เนื่องจากในระหว่าง

ขั้นตอนการผลิตอาหารสัตว์จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 75-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที (Perry, 1995; Walch, 2002)

Khucharoenphisan and Kitpreechavanich (2004) ได้แยกเชื้อราชอบร่อน *T. lanuginosus* จากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยพบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 89 สายพันธุ์ ทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยใยเลนได้ โดยมีความหลากหลายในด้านความสามารถในการผลิตเอนไซม์และการทนร้อน ซึ่งมีเชื้อ 11 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยใยเลนได้สูงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีใยเลนจากไม้เป็นสับสเตรต มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 101-108 หน่วยต่อมิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสภายหลังการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 5 วัน โดยเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อนี้มีค่าครึ่งชีวิตที่ 70 องศาเซลเซียส เท่ากับ 266 นาที นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าซังข้าวโพดจัดเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่สามารถใช้เป็นสับสเตรตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *T. lanuginosus* (อานนท์ และคณะ, 2542)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำเชื้อราชอบร่อน *T. lanuginosus* ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ มาคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่ใช้ในอาหารสัตว์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นวัตถุดิบทั้งการเพาะเลี้ยงแบบ solid state และ submerge culture ได้ดีและสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่ทนกรดและทนร้อนได้ดี ตลอดจนศึกษาถึงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์ได้ในปริมาณสูง

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่ใช้ในอาหารสัตว์ได้สูง สามารถทนกรดและทนร้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีขี้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ
2. ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่ใช้ในอาหารสัตว์

การตรวจเอกสาร

1. องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน องค์ประกอบทั้งสามมีปริมาณแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด เนื้อเยื่อ อายุ สภาพแวดล้อมในการเจริญ สภาพทางสรีรวิทยา รวมทั้งวิธีการที่ใช้วิเคราะห์ โดยทั่วไป เซลลูโลสในผนังเซลล์พืชจะอยู่ในรูปลิกโนเซลลูโลสโดยอยู่ร่วมกับเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Norkrans, 1967; Kirk, 1983) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วย เซลลูโลส 32-50 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 22-35 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 15-35 เปอร์เซ็นต์ ตารางที่ 1 แสดงปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินของวัสดุเหลือทิ้งชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรบางชนิด

ชนิดของวัสดุเหลือทิ้ง	องค์ประกอบ(เปอร์เซ็นต์)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ฟางข้าวสาลี	50	30	15
ฟางข้าวโอ๊ต	49.3	25	14-22
ฟางข้าว	35	25	17
ซังข้าวโพด	45	35	15
คอกข้าวโพด	35	25	35
เปลือกข้าวโพด	32	28	13
ชานอ้อย	33	22	14
ไม้เนื้อแข็ง	45.8	30.7	20.3
ไม้เนื้ออ่อน	43.8	24.5	29.5
รำข้าวสาลี	8.7	28	3.2

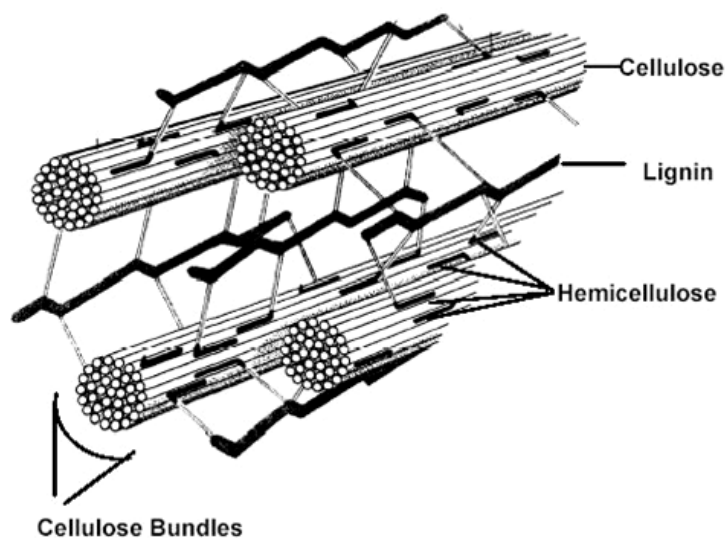
ที่มา : ดัดแปลงจาก Bisaria (1991)

1.1 องค์ประกอบผนังเซลล์ของพืช

องค์ประกอบที่พบในผนังเซลล์พืชส่วนใหญ่สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นองค์ประกอบหลัก (major component) และองค์ประกอบรอง (minor component) โดยส่วนที่เป็นองค์ประกอบหลักประกอบด้วยส่วนที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ และสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compounds) ส่วนองค์ประกอบรองประกอบด้วย สารละลายที่เป็นกลาง (neutral solvents) ปริมาณสารประกอบแต่ละกลุ่มมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืช และส่วนประกอบต่าง ๆ ส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช มีปริมาณของสารประกอบต่าง ๆ ที่ไม่เท่ากัน

พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีมวลโมเลกุลสูงที่พบมากในผนังเซลล์พืชได้แก่ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส สารทั้งสองมีความสัมพันธ์กันและมักอยู่รวมกันเรียกว่าโฮโลเซลลูโลส (holocellulose) โดยมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 60-80 ของสารประกอบทั้งหมด เซลลูโลสเป็นโครงสร้างหลักของผนังเซลล์จะถูกล้อมรอบด้วยเมทริกซ์ที่เป็นเฮมิเซลลูโลส และทั้งหมดถูกห่อหุ้มด้วยลิกนิน ในชั้น middle lamella ไม่พบว่ามีพันธะเคมีระหว่างเซลลูโลสกับเฮมิเซลลูโลสแต่จะยึดกันด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์และพันธะไฮโดรเจน ส่วนเฮมิเซลลูโลสกับลิกนินยึดกันด้วยพันธะโควาเลนต์

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประมาณร้อยละ 40-50 ในผนังเซลล์พืช พบมากที่สุดในส่วนของผนังเซลล์ชั้นที่สอง (secondary cell wall) และจะมีปริมาณลดต่ำลงในส่วน of middle lamella ลักษณะเป็นพอลิเมอร์สายตรง ไม่มีกิ่งก้านสาขา และเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) ของ β -D-glucose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-glucosidic linkage โดยมีค่า degree of polymerization อยู่ในช่วงประมาณ 100 ถึงมากกว่า 10,000 ซึ่งเกาะรวมกันภายใน crystalline microfibrils เซลลูโลสมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20,000 ถึง 75,000 ดาลตัน ซึ่งเท่ากับ 100-4,000 หน่วยกลูโคส โมเลกุลของเซลลูโลสเรียงตัวเป็นมัดเรียกว่า ไฟบริล โดยมีพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลกลูโคสที่อยู่ใกล้กันของเซลลูโลสสายหนึ่งกับเซลลูโลสอีกสายหนึ่งเชื่อมต่อกันเป็นไฟบริล นอกจากนั้นเซลลูโลสที่พบในทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งมีความทนต่อกรดได้มากกว่าเฮมิเซลลูโลส แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของผนังเซลล์พืช

ที่มา: Patrick (2002)

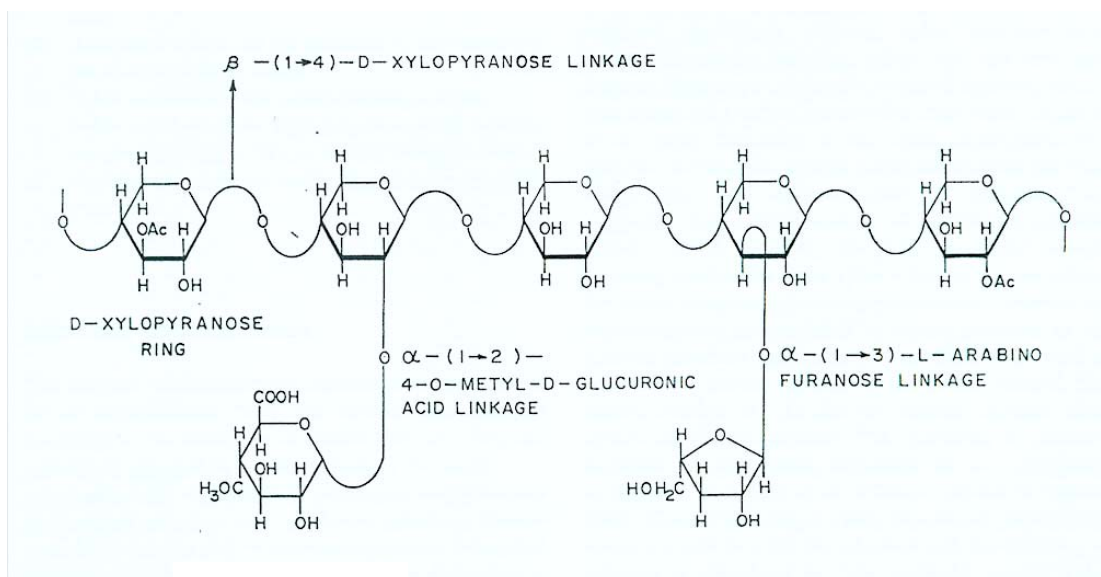
เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส โดยพบประมาณร้อยละ 20-30 ในผนังเซลล์พืชพบมากใน ส่วนของ middle lamella สามารถสกัดได้ด้วยสารละลายที่เป็นด่าง เฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบ เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ประกอบด้วย ไซแลน (xylan) กลูโคแมนแนน (glucomannans) กาแลคเตน (galactans) และกลูแคน (glucan) ไซแลนเป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุด ในเฮมิเซลลูโลส โดยมีโครงสร้างหลักที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic linkage ของ น้ำตาลไซโลส และมีกิ่งก้านเป็นน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลต่าง ๆ

เฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่ถูกย่อยด้วยกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส และยังสามารถถูกย่อยได้ด้วยด่าง เฮมิเซลลูโลสมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ น้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบได้แก่ D-xylose, D-mannose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, 4-O-methyl-D-glucuronic acid, D-galacturonic acid และ D-glucuronic acid น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในเฮมิเซลลูโลสที่พบไม่บ่อยนัก เช่น L-rhamnose, L-fucose และ methyl neutral sugar พอลิแซ็กคาไรด์ที่สำคัญที่จัดเป็น เฮมิเซลลูโลส คือ ไซแลน (xylan) และแมนแนน (mannan) ไซแลนประกอบด้วย D-xylopyranose ประมาณ 200 หน่วยต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic linkage ไซแลนจากแหล่งต่าง ๆ จะมี โครงสร้างหลักเหมือนกันแต่ต่างกันตรงโซ่ด้านข้าง โดยโซ่ด้านข้างที่พบทั่วไปได้แก่

L-arabinofulanoose, D-glucuronic acid, 4-O-methyl-D-glucuronic acid และ acetic acid (Goodwin and Mercer, 1972; Wong *et al.*, 1988) แสดงดังภาพที่ 2

สมบัติทั่วไปของไซเลน คือ ละลายในด่างโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสูง (4.9-9.8 เปอร์เซ็นต์) และอุณหภูมิสูง (70-100 องศาเซลเซียส) (Tsao *et al.*, 1982) จากคุณสมบัตินี้จึงนิยมนำไซเลนจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยสารละลายด่างที่ร้อน (Chen and Anderson, 1980) ไซเลนที่อยู่ในสารละลายด่างสามารถแยกออกโดยทำสารละลายให้เป็นกลาง (Goodwin and Mercer, 1972) หรือตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ (Bonner, 1950; Draper, 1976) นอกจากนั้นไซเลนยังละลายได้ในกรด (Kamiyama *et al.*, 1974; Fanta *et al.*, 1984) ค่า optical rotation ของไซเลนมีค่าเป็นลบสูง ไม่เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) กับ Fehling's solution ผนังเซลล์ของพืชล้มลุก โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร อาทิ เช่น ชังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว แกลบ ฯลฯ มีไซเลนเป็นองค์ประกอบอยู่มากที่สุด คือประมาณ 15-35 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าในผนังเซลล์ของไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน ซึ่งมีเพียง 20-25 และ 7-12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ไซเลนเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน ทำให้การจัดตัวของโมเลกุลไม่เป็นระเบียบ มีน้ำตาลไซโลสเป็นโครงสร้างหลัก และมีกิ่งก้านเป็นน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาลต่าง ๆ ผลัดกันที่ได้จากการย่อยไซเลนมักพบ อะราบินโนไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (arabinoxyloligosaccharides) และ acidic ด้าน non-reducing end แสดงว่าอีกด้านหนึ่งของพันธะมีกิ่งก้านช่วยป้องกันการย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนส นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพต่อความจำเพาะต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสด้วย เนื่องจากโครงสร้างของไซเลนทำให้ย่อยได้ยากจึงต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่มย่อยไซเลนซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโครงสร้างหลัก ได้แก่ เอนโดไซลานเนส (endoxylanase) และบีตาไซโลซิเดส (β-xylosidase) และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโซ่กิ่ง (branch chain) ได้แก่ แอลฟากลูคูโรนิเดส (α-glucuronidase) อะซิทธิลไซเลนเอสเทอเรส (acetyl xylan esterase) แอลฟาอะราบินโนฟูรานซิเดส (α-arabinofuranosidase) และฟีนอลิกแอซิดเอสเทอเรส (phenolic acid esterase) โดยเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มทำงานร่วมกันในการเปลี่ยนไซเลนให้เป็นน้ำตาลไซโลส



ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของไซเลน

ที่มา: Eriksson (1990)

ลิกนิน (lignin) เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่มีอยู่ในพืชซึ่งจัดเป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากหน่วย phenylpropanoid ซึ่งได้แก่ p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol (Sjostrom, 1981) หน่วยย่อยเหล่านี้จะจับตัวเป็นกันเป็นโครงสร้างสามมิติ โดยสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของวงแหวนฟีนอลกับคาร์บอนตำแหน่งบีตาของโซ่ด้านข้างของลิกนิน ซึ่งประกอบด้วย cinnamyl alcohol aldehyde และ hydroxylated การจับกันด้วยพันธะเอสเทอร์และการสร้างเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ทำให้โมเลกุลของลิกนินมีความแข็งแรงทนต่อการย่อย (Evans, 1987) ลิกนินในโครงสร้างไม่มีอยู่ประมาณร้อยละ 20-35 พบมากในส่วนกลางของ middle lamella (Norkrans, 1967; Cowling and Kirk, 1976) เป็นสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลสูงและไม่มีโครงสร้างที่แน่นอนในธรรมชาติ สามารถสร้างพันธะโควาเลนต์กับหมู่ L-arabinosyl และ glucuronosyl residue ของไซเลน จึงเป็นไปได้ว่ามีการสร้าง cross-link ระหว่างลิกนินกับไซเลนหรือไซเลนกับพอลิแซ็กคาไรด์อื่น ๆ ลิกนินในเนื้อไม้มีหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างเยื่อชั้นนอก (outer layer) ของเส้นใย (fiber) และเป็นสิ่งที่เพิ่มความแข็งแรงให้แก่เส้นใย จึงทำให้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสถูกห่อหุ้มเอาไว้ เป็นเหตุให้การย่อยสลายประกอบคาร์โบไฮเดรตทั้งสองชนิดเกิดได้ช้าและเกิดในปริมาณต่ำ

ลิกนินละลายได้ดีในสารละลายต่างที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิสูง 130-280 องศาเซลเซียส (Avgerinos and Wang, 1983) และสามารถถูกออกซิไดซ์ด้วยสารต่าง ๆ เช่น H_2O_2 $NaClO_2$ ซึ่งมีผลให้ลิกนินเกิดการแตกตัวและละลายออก นอกจากนี้สารละลายบางชนิดก็สามารถใช้สกัดลิกนินได้ เช่น ethylene glycol benzene-ethanol (Fiechter, 1986)

1.2 องค์ประกอบทางเคมีของซังข้าวโพด

ปัจจุบันมีการนำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีอยู่หลากหลายชนิดมาใช้ประโยชน์เพื่อเป็นแหล่งพลังงานใหม่ทดแทนพลังงานจากแก๊สธรรมชาติ เพื่อผลิตแหล่งโปรตีน เอนไซม์หรือผลิตสารเคมีที่สำคัญทางอุตสาหกรรม การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรส่วนใหญ่เน้นการใช้ประโยชน์ของเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นเพื่อเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งอย่างสมบูรณ์จึงได้มีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากไซเลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสควบคู่ไปกับการใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสให้เป็นสารที่มีราคาสูง ซังข้าวโพดเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีมากในประเทศไทย จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรรายงานไว้ว่าในปี 2544-2545 มีผลผลิตรวมของซังข้าวโพดทั้งประเทศ 4.47 ล้านตัน และทำให้มีซังข้าวโพดซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งเป็นจำนวน 814,600 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2549) และเนื่องจากซังข้าวโพดเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดหนึ่งที่มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสสูง ถึง 42.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Oliveira *et al.*, 2005) และมีปริมาณไซเลนสูงถึง 31.3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ดังนั้นซังข้าวโพดจึงเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่มีศักยภาพค่อนข้างสูงสำหรับเป็นแหล่งไซเลนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของซังข้าวโพด (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง)

Fraction	% dry weight
Glucan	34.4
Xylan	31.3
Araban	3.01
Acetyl groups	3.08
Uronic acid	3.36
Klason lignin	18.8
Protein	4.30
Ash	1.30
Other (by diff.)	0.46

ที่มา : Parajo *et al.* (2004)

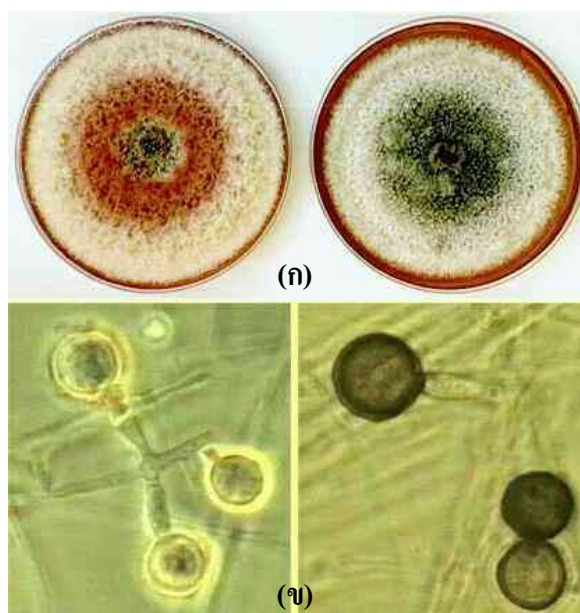
2. เชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* (Tsiklinskaya)

เชื้อรา *T. lanuginosus* เป็นเชื้อราชอบร้อนที่พบกระจายอยู่ทั่วไป เช่น ดินสวน กองปุ๋ยหมัก เป็นต้น เชื้อนี้ได้แยกครั้งแรกโดย Tsiklinskaya เมื่อปี ค.ศ. 1899 ได้ให้ชื่อว่า *T. lanuginosus* และต่อมาได้เสนอให้เป็นชื่อ *Humicola lanuginosa* (Griffon and Maublanc) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเชื้อราสกุล *Thermomyces* ได้มีการจัดจำแนกแยกออกมาจากสกุล *Humicola* โดยอาศัยลักษณะของฟิวสเปอร์และก้านชูสปอร์ที่แตกต่างกัน เชื้อรา *Thermomyces* จำแนกได้เป็น 4 ชนิดได้แก่ *T. lanuginosus*, *T. verrucosus*, *T. ibadanensis* และ *T. stellatus* (Cooney and Emerson, 1964; Domsch *et al.*, 1993)

2.1 ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *T. lanuginosus*

เชื้อรา *T. lanuginosus* เป็นเชื้อราที่เพาะเลี้ยงง่ายและเจริญได้เร็วบนอาหารมาตรฐานทั่วไป ไม่เปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารต่างชนิดกัน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร YpSs agar ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้เร็ว และหลังการเพาะเลี้ยง 2 วันมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร หรือมากกว่า ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏมีเส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่

และมีความสูงน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร แต่ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเทาหรือเทาออกเขียว โดยเริ่มจากบริเวณตรงกลางโคโลนี และสีจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมม่วงตามลำดับ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูเข้มหรือสีไวน์แดง เนื่องจากสารบางชนิดที่ถูกปล่อยออกมาจากเส้นใย เมื่อเจริญเต็มที่โคโลนีจะเป็นสีน้ำตาลทึบจนถึงดำ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นเส้นใยไม่มีสี มีก้านชูสปอร์ (aleuriophores) ที่ค่อนข้างสั้นวัดความยาวได้ 10-15 ไมโครเมตร ชูเข้าหาแสง ซึ่งปกติไม่พบการแตกแขนงของก้านชูสปอร์ แต่พบบ้างที่แตกแขนงใกล้เคียง 1 หรือ 2 แขนง ก้านชูสปอร์มีผนังกันแต่ตั้งเกดได้ยาก บนปลายของก้านชูสปอร์มีสปอร์ aleuriospores 1 สปอร์ สปอร์ที่มีอายุน้อยจะไม่มีสี ผิวเรียบ แต่เมื่อสปอร์อายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและมีผนังสปอร์ด้านนอกหนา ผิวมีลักษณะขุ่นยับไม่เรียบ รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-10 ไมโครเมตร ทั้งสปอร์ที่อายุน้อยและสปอร์แก่จะถูกแยกออกจากก้านชูสปอร์ตรงบริเวณรอยต่อระหว่างก้านชูสปอร์ โดยก้านชูสปอร์ ใ้รรอยต่อกับสปอร์จะมีลักษณะโป่งออก (ภาพที่ 3) (Cooney and Emerson, 1964; Domsch *et al.*, 1993)



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *T. lanuginosus* (ก) ลักษณะโคโลนี และ (ข) ลักษณะสัณฐานวิทยา

ที่มา : Deacon (2006)

3. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *T. lanuginosus*

เชื้อรา *T. lanuginosus* เป็นเชื้อราชอบร้อนที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์ไซลานเนส แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส โปรติเอส ไลเปส และบีตากลูโคซิเดส เป็นต้น

1. เอนไซม์ไซลานเนส หน้าที่หลักของเอนไซม์ไซลานเนสคือ ย่อยพันธะของไซแลนที่มีไซโลสเป็นโครงสร้างหลักและมีกิ่งก้านเป็นน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาลต่าง ๆ เชื้อรา *T. lanuginosus* เป็นเชื้อราที่ชอบร้อน และเป็นสายพันธุ์หนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในระดับสูง (Kitpreechavanich *et al.*, 1984a) และไม่พบการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการฟอกขาวและการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ *T. lanuginosus* จะสร้างได้ปริมาณมากเมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุหมักที่ประกอบด้วยซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่างและรำข้าวสาลี (วิเชียรและคณะ, 2536) การสร้างเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *T. lanuginosus* ได้สูงสุดภายในเวลา 5 วัน เมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่าง รำข้าวสาลี และแกลบ ในอัตราส่วน 5:5:2 เป็นวัสดุหมัก ซึ่งได้เอนไซม์ 725-729 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมัก (อานนท์และคณะ, 2543) Purkarthofer *et al.* (1993) พบว่าอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ *T. lanuginosus* โดยการเพาะเลี้ยงแบบ solid state ที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก นอกจากเชื้อ *T. lanuginosus* สร้างเอนไซม์ไซลานเนสแล้วยังสร้างเอนไซม์ชนิดอื่นในปริมาณต่ำ ซึ่งได้แก่เอนไซม์บีตาไซโลซิเดส บีตากลูโคซิเดส อะราบิโนซิเดส อะซิติลเอสเทอเรส และเพคตินเอส แต่ไม่พบเอนไซม์เซลลูเลส (Kitpreechavanich *et al.*, 1984a; Purkarthofer *et al.*, 1993; Alam *et al.*, 1994)

Reddy *et al.* (2002) ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* SSBP ในถังหมักขนาด 30 ลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศทำให้มีการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสเพิ่มขึ้น โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด 6750 nkat/ml เมื่อให้อากาศในอัตรา 0.75 vvm ภายในเวลา 48 ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศสูงถึง 1.25 vvm ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสลดลงเหลือ 2500 nkat/ml

Xiong *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* DSM 10635 โดยวิธีการหมักแบบ submerge culture ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน พบว่าการใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมักจะให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุด และเอนไซม์ไซลานเนสบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 25.5 กิโลดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 3.7 ผลของสับสเตรตต่อความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงของเอนไซม์ไซลานเนสมีผลเฉพาะในสภาวะที่เป็นกรด ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ในสภาวะที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ birchwood xylan ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 4 และ 5 ให้ค่าครึ่งชีวิตเป็น 7 และ 4 เท่าของสภาวะที่ไม่เติมไซแลน ในขณะที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 ให้ค่าครึ่งชีวิตเป็น 1.5 เท่าของสภาวะที่ไม่เติมไซแลน นอกจากนี้ความเสถียรไม่เพิ่มขึ้นในสภาวะที่มีไซแลนเป็นสับสเตรตที่พีเอช 9.0

Puchart *et al.* (1999) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส แมนนาเนส และเพคตินเนส จากเชื้อรา *T. lanuginosus* 17 สายพันธุ์พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนได้ หลายสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนส เมื่อใช้ กลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) และซังข้าวโพดเป็นสับสเตรต ในสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงนั้นจะไม่ผลิตเอนไซม์ β -mannanase และ arabinan-degrading enzyme ในขณะที่ในสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้น้อยจะพบกิจกรรมของ mannanolytic enzyme และ arabinan-degrading enzyme สูง

2. เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยโมเลกุลแป้งให้เล็กลงจนกระทั่งได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและมอลโตส เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสบริสุทธิ์จาก *T. lanuginosus* 1457 มีน้ำหนักโมเลกุล 54-57 กิโลดาลตัน (Jensen *et al.*, 1988) ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของแอลฟาอะไมเลสจาก *T. lanuginosus* ATCC 34626 เท่ากับ 58 กิโลดาลตัน ด้วยวิธี SDS-PAGE (Petrova *et al.*, 2000) ขณะที่น้ำหนักโมเลกุล 61 กิโลดาลตัน ด้วยวิธี electrophoretic homogeneity (Nguyen *et al.*, 2002) จากรายงานการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *Humicola lanuginosa* พบว่าการเติม tween 80 ลงไปในอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิตแอลฟาอะไมเลสในสภาวะที่ให้อากาศสามารถเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ 2.7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่เติม (Arnesen *et al.*, 1998) เมื่อศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* พบว่า maltodextrin เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดคือ L- asparagine (Nguyen *et al.*, 2000) การปรับปรุงสายพันธุ์ *T. lanuginosus* ด้วยเทคนิค intraspecific protoplast fusion สามารถเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ 5 เท่าของการผลิตโดยสายพันธุ์ดั้งเดิม (Rubinder *et al.*, 2000) ส่วนการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตและ *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) เพื่อเหนี่ยวนำให้ *T. lanuginosus* กลายพันธุ์ พบว่าคัดเลือกสายพันธุ์ที่

เพิ่มผลผลิตของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ 7 เท่าของการผลิตจากสายพันธุ์ดั้งเดิม (Rubinder *et al.*, 2002)

3. เอนไซม์กลูโคอะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่สลายพันธะ β -1,4-glycosidic linkage และ β -1,6-glycosidic linkage ได้จาก non-reducing end ของโมเลกุลแป้งให้ผลผลิตเป็น β -D-glucose ในระหว่างการเจริญในอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบพบว่า เชื้อรา *T. lanuginosus* สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยสามารถย่อยได้ทั้งแป้งดิบและแป้งที่ละลายน้ำให้เป็นกลูโคสได้ 70 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมงแสดงถึงความเป็นเอนไซม์ที่ไม่ไวต่อการถูกยับยั้งด้วยผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end product inhibition) (Maheshwari *et al.*, 2000) เอนไซม์กลูโคอะไมเลสบริสุทธิ์จากเชื้อรา *T. lanuginosus* A 236 มีน้ำหนักโมเลกุล 72,000 ดาลตันเมื่อตรวจวัดด้วยวิธี SDS-PAGE กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์คือ 70 องศาเซลเซียส สับสเตรตที่ดีที่สุดสำหรับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสคือ แป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) รองลงมาคือ อะไมโลเพคติน (amylpectin) อะไมโลส (amylose) เดกตริน (dextrin) ไกลโคเจน (glycogen) มอลโตไตรโอส (maltotriose) และ มอลโตส (maltose) ตามลำดับ (Li *et al.*, 1998)

4. เอนไซม์โปรติเอส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยโมเลกุลโปรตีนให้เป็นสายเปปไทด์สั้น ๆ หรือเป็นกรดอะมิโน เชื้อรา *T. lanuginosus* สามารถผลิต alkali protease (Ong *et al.*, 1973; 1976; Stevenson *et al.*, 1975; Shenolikar *et al.*, 1975) มีรายงานว่ากิจกรรมของ alkali protease สามารถถูกกระตุ้นด้วย cysteine และ serine (Shenolikar *et al.*, 1975) และถูกยับยั้งด้วยสารบางชนิด เช่น *p*-chloromercuribenzoate ซึ่งไปทำปฏิกิริยากับ thiols อิสระหรือ Hg^{2+} นอกจากนี้ยังมี phenylmethylsulfonylchloride ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสได้ (Hasnain *et al.*, 1992) การทำเอนไซม์โปรติเอสให้บริสุทธิ์ด้วย gel filtration พบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 237 กิโลดาลตัน (Hasnain *et al.*, 1992)

5. เอนไซม์ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยโมเลกุลของไขมันได้ผลผลิตเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน จากการแยกเชื้อราชอบร้อนจากปุ๋ยหมักและดินตัวอย่าง ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง มาจำแนกชนิดพบว่าเป็นเชื้อรา *Humicola lanuginosa* S-38 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุด เมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 27,500 ดาลตัน พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 8.0 และมีความเสถียรที่พีเอช 7.0-10.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 60 องศาเซลเซียส และเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ 55 เปอร์เซ็นต์ ที่ 70 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที เอนไซม์ไลเปสถูกยับยั้งด้วย n-alcohols fatty acid และ surface active agent การยับยั้งด้วย n-alcohols เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มสับสเตรต ส่วนการยับยั้งด้วย fatty acid และ bile salt เพิ่มขึ้นเมื่อเติมแคลเซียมไอออน

(Smith *et al.*, 1966; Mattson *et al.*, 1970; Arima *et al.*, 1972; Liu *et al.*, 1972, 1973a, 1973b, 1973c) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า betaine มีผลช่วยให้เอนไซม์ไลเปสเสถียรต่ออุณหภูมิสูงได้ดีขึ้น (Soderlund *et al.*, 2002)

6. เอนไซม์ไฟเตส เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์กรดไฟติกเพื่อเพิ่มฟอสฟอรัสในอาหารสัตว์ Berka *et al.* (1998) ศึกษาการแสดงออกของยีน *phy A* สำหรับการสร้างเอนไซม์ไฟเตสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* พบว่า เอนไซม์ไฟเตสมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 65 องศาเซลเซียส และยังมีกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงกว่า 75 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมอยู่ช่วง 6.0-6.5 ในขณะที่เอนไซม์ไฟเตสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* มีกิจกรรมสูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 5.5 และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

7. เอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส มีรายงานที่สามารถย่อย cellobiose *p*-nitrophenyl- β -D-glucosidase, larchwood xylan, xylobiose และ *p*-nitrophenyl- β -D-xyloside เอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสของเชื้อ *Humicola lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce มีน้ำหนักโมเลกุล 135,000 กิโลดาลตัน เมื่อวิเคราะห์ด้วย gel filtration และ 110,000 กิโลดาลตัน เมื่อวิเคราะห์ด้วย electrophoresis อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียส และพีเอชที่เหมาะสมคือ 4.5 (Anand and Vithayathil, 1989)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อรา *T. lanuginosus* สามารถสร้างเอนไซม์ได้อีกหลายชนิด เช่น trehalase invertase β -galactosidase และ β -galacturonase (Maheshwari *et al.*, 2000)

4. เอนไซม์ที่ใช้สำหรับอาหารสัตว์

4.1 สาเหตุของการใช้เอนไซม์ในอาหารสัตว์

เนื่องจากในปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารสัตว์มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้มีการแข่งขันทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้น จึงมีความพยายามที่จะค้นคว้าเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงสัตว์ให้สูงขึ้น มีการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อการพัฒนาดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง ในการตรวจสอบเอนไซม์ที่แสดงออกถึงคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ที่ทำให้เหมาะสมแก่การนำมาใช้ในอาหารสัตว์ โดยเฉพาะเอนไซม์ที่สามารถทนความร้อนได้สูง (Walch, 2002) Bedford (2001) สรุปสาเหตุของการใช้เอนไซม์ในอาหารสัตว์ไว้ดังนี้

4.1.1 เพื่อทำลาย anti-nutritional factors ที่พบอยู่ในอาหารสัตว์และเป็นสารที่ไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ ส่งผลให้ความสามารถในการย่อยของสัตว์ลดลง

4.1.2 เพื่อเพิ่มปริมาณแป้ง โปรตีนและแร่ธาตุที่อยู่ในไฟเบอร์ของผนังเซลล์พืช ซึ่งเอนไซม์ที่มีอยู่ในกระเพาะสัตว์ไม่สามารถย่อยได้ให้อยู่รูปที่สามารถนำไปใช้ได้ เช่น ฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปกรดไฟติกในเมล็ดธัญพืช

4.1.3 เพื่อทำลายพันธะทางเคมีในวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ ซึ่งเอนไซม์ในกระเพาะสัตว์ไม่สามารถย่อยได้

4.1.4 เพื่อส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ในสัตว์ที่อายุน้อย เนื่องจากสัตว์ที่ยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่เพียงพอต่อระบบการย่อยของมัน

เอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์สามารถสกัดได้จากแหล่งต่าง ๆ เช่น เอนไซม์จากพืช สัตว์จุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา (Chesson, 1993) ตัวอย่างเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์แสดงดังตารางที่ 3

4.2 สมบัติของเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์

1. เอนไซม์ที่ใช้ต้องมีความเสถียรเมื่อเข้าไปในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของสัตว์มีความเป็นกรดสูง เช่น ในกระเพาะหมูในสภาวะที่มีอาหารสัตว์อยู่เต็มกระเพาะพบว่ามีพีเอชประมาณ 3.5 (Wenk, 2001) ส่วนในกระเพาะสัตว์ปีกมีพีเอชอยู่ในช่วง 3.4-4.8 (วิโรจน์, 2537) ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ต้องสามารถทนและทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด นอกจากนี้เอนไซม์ยังต้องมีความสามารถในการต้านทานการย่อยจากเอนไซม์โปรติเอส เช่น เอนไซม์เปปซิน ที่มีอยู่ในกระเพาะอาหารสัตว์ด้วย (Walch, 2002)

2. เอนไซม์ที่ใช้ต้องมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากในระหว่างขั้นตอนการผลิตอาหารสัตว์มีความจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 75-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2-3 นาที (Walch, 2002)

3. เอนไซม์ที่ใช้ต้องมีความเสถียรเมื่อเติมลงในอาหารสัตว์ เนื่องจากอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์แต่ละชนิดจะมีส่วนประกอบของอาหารแตกต่างกัน เอนไซม์จะต้องทนต่อสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเก็บรักษาอาหารสัตว์นั้น ๆ โดยไม่เสียสภาพก่อนที่จะนำอาหารนั้นไปให้สัตว์กิน (Perry, 1995)

4. การทำปฏิกิริยากันระหว่างสับสเตรตและเอนไซม์ เอนไซม์ที่ใช้ต้องมีความจำเพาะต่อสับสเตรตซึ่งเป็นส่วนประกอบที่อยู่ในอาหารสัตว์ (Perry, 1995)

5. ความสามารถของสัตว์ในการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาระหว่างสับสเตรตและเอนไซม์ไปใช้ ส่วนใหญ่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์จะเป็นสารโมเลกุลเล็ก ๆ ซึ่งสัตว์สามารถที่จะย่อยและดูดซึมไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว (Perry, 1995)

4.3 บทบาทและกลไกการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์

บทบาทการทำงานของเอนไซม์ส่วนใหญ่จะเข้าไปย่อยในส่วน non starch polysaccharides รวมทั้ง oligosaccharides ที่พบในธัญพืช เนื่องจากสารดังกล่าวจะทำให้ระบบทางเดินอาหารของสัตว์เกิดความหนืดเพิ่มมากขึ้น การย่อยได้ของสัตว์ลดลง ส่งผลไปถึงความสามารถในการดูดซึมอาหารของสัตว์ลดลงด้วย (Bedford, 2001) กลไกการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์จะแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของเอนไซม์โดยเอนไซม์ที่นิยมนำมาใช้ในอาหารสัตว์ มีดังนี้

1. เอนไซม์ไซลานเนส เป็นเอนไซม์ที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (Wong and Sadler, 1991) เอนไซม์ไซลานเนสสามารถลดความหนืดของอาหารสัตว์โดยการย่อยอะราบีโนไซแลน ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ระบบทางเดินอาหารของสัตว์มีความหนืดเพิ่มขึ้น หน้าที่หลักของเอนไซม์ไซลานเนสคือ ย่อยพันธะของไซแลนที่มีไซโลสเป็นโครงสร้างหลักและมีกิ่งก้านเป็นน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาลต่าง ๆ ดังนั้นจากโครงสร้างที่ซับซ้อนของไซแลนจึงต้องการกิจกรรมของระบบเอนไซม์ที่ประกอบด้วยกลุ่มเอนไซม์หลายชนิดที่ทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ที่ย่อยโครงสร้างหลัก ได้แก่ endo β -1,4- xylan xylohydrolase และ บีตาไซโลซิเดส ส่วนเอนไซม์ที่ย่อยกิ่งก้าน ได้แก่ แอลฟาอะราบีโนฟูราโนซิเดส (α - arabinofuranosidase) แอลฟากลูคูโรนิเดส (α - glucuronidase) และ อะซิทิลเอสเทอเรส (acetyl esterase) โดยเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มทำงานร่วมกันในการเปลี่ยนไซแลนให้เป็นไซโลส (Sunna and Antranikien, 1997)

เอนไซม์ที่ย่อยไซเลน จัดอยู่ในกลุ่ม glycan hydrolase ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มของ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยพันธะ 1,4- xylopyranosyl linkage ของ arabinoxylan, arabinogalactan-4-O-methyl-D-glucuronoxylan และ glucuronoxylan เอนไซม์ดังกล่าวแบ่งออกเป็น 2 ชนิด (Dekker and Richard, 1976) คือ

1. Endo β -1,4- xylan xylohydrolase (EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ย่อยพันธะ 1,4- glycosidic linkage ของ xylopyranoside แบบสุ่ม (ภาพที่ 4) โดยจะย่อยโมเลกุลของไซเลน ซึ่งจะได้อผลผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก เช่น xylobiose, xylotriose และ xylotetraose ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์และสายพันธุ์จุลินทรีย์ เอนไซม์ไซลานเนสยังแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามความสามารถในการย่อย 1,3 -L- arabinoxylan และ arabinoglucuronoxylan คือ

1.1 arabinose - liberating endoxylanase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อย arabinoxylan และ arabinoglucuronoxylan ตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของ xylose และ arabinose

1.2 non arabinose - liberating endoxylanase เป็นเอนไซม์ที่ไม่สามารถย่อย arabinoxylan และ arabinoglucuronoxylan ตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของ xylose และ arabinose

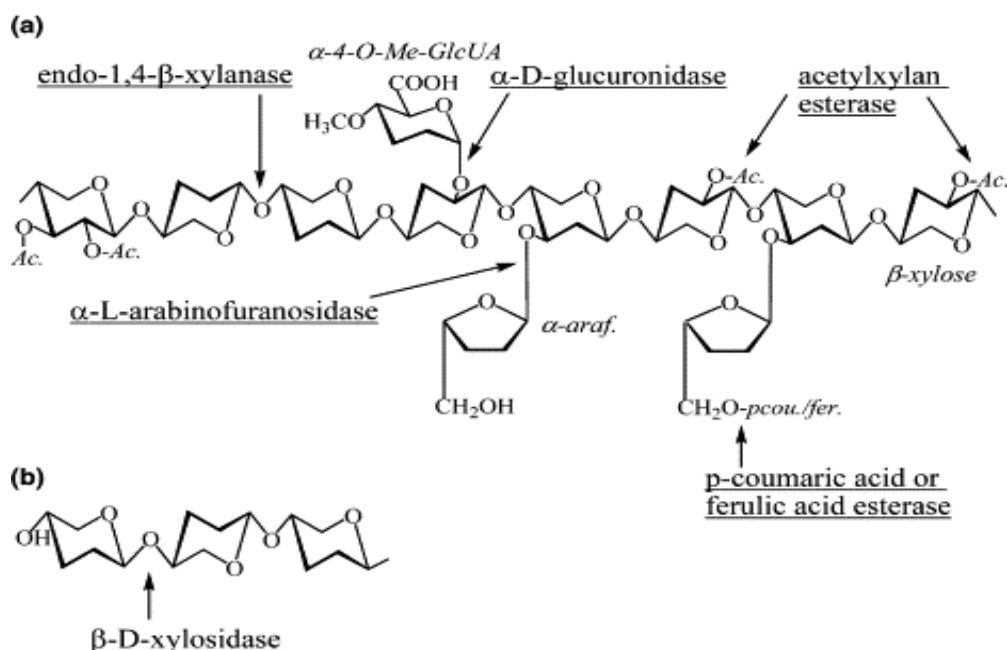
2. Exo β -1,4 - xylan xylohydrolase หรือเรียกสั้น ๆ ว่า β - xylosidase (EC 3.2.1.37) โดยจะย่อยโมเลกุลของ xylooligosaccharides ซึ่งเกิดจากการย่อยไซเลนด้วยเอนไซม์ไซลานเนส โดยเอนไซม์จะย่อยโมเลกุล xylooligosaccharides ของน้ำตาลไซโลสจากปลาย non - reducing ที่ละโมเลกุล ได้น้ำตาลไซโลส (ภาพที่ 4)

นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อีกกลุ่มหนึ่งที่แม้จะไม่ได้ย่อยโมเลกุลหลักของไซเลน แต่เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสำคัญ ซึ่งทำหน้าที่ย่อยโซ่ด้านข้างของโมเลกุลไซเลน ทำให้การย่อยโมเลกุลของไซเลนสมบูรณ์ เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่

1. α - glucuronidase (EC 3.2.1.99) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อย 1,2 - α -glucuronoxylan และ 4 - O - methyl - D - glucuronic acid ตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุลของไซโลส และ glucuronic acid โดยกิจกรรมของแอลฟาไกลูคูโรนิเดสตรวจพบในเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์มีน้อย

2. α - arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อย 1,3 - α -arabinofuranoxylan ตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุลของไซโลสและอะราบินโนส

3. acetyl esterase หรือ acetyl xylan esterase (EC 3.2.1.72) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อย 1,2 - acetyl group ตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุลของไซโลส และ acetyl group



ภาพที่ 4 ตำแหน่งที่เอนไซม์เข้าย่อยพันธะต่าง ๆ ในไซเลน

ที่มา : Collins *et al.* (2004)

การใช้เอนไซม์ไซลานเนสในอาหารสัตว์ยังช่วยลด anti-nutritional effects ของ ไซแลนที่มีอยู่ในธัญพืชที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ ช่วยลดความหนืดและช่วยรักษาปริมาณน้ำ ทำให้สัตว์ สามารถรับธาตุอาหารเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังลดความต้องการน้ำ และทำให้มูลสัตว์แห้งขึ้นด้วย (Cosson *et al.*, 1999)

จากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* พบว่าเอนไซม์ไซลานเนสเป็นเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000 ดาลตัน โดยใช้วิธี gel filtration และได้น้ำหนักโมเลกุล 21,000 ดาลตันโดยใช้วิธี SDS-PAGE (Kitpreechavanich *et al.*, 1984b) แต่ Anand *et al.* (1990) พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 22,000 ดาลตันโดยใช้วิธี SDS-PAGE และ 29,000 ดาลตันโดยใช้วิธี gel filtration เอนไซม์ไซลานเนส จากเชื้อรา *T. lanuginosus* DMS 5826 เมื่อทำให้บริสุทธิ์แล้ววิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS electrophoresis วิธี gradient gel electrophoresis และ วิธี gelfiltration มีน้ำหนักโมเลกุล 25.5, 24.0 และ 22.5 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Cesar and Mrsa, 1996)

Gomes *et al.* (1993) ทำการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* RT9 และ MH4 โดยใช้รำข้าวสาลีและซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมักพบว่าทั้งสองสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีเมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก ซึ่งสูงกว่าเป็น 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้รำข้าวสาลี เป็นวัสดุหมัก นอกจากนี้พบว่าเมื่อเก็บเซลล์แห้งของเชื้อรา *T. lanuginosus* DMS 5826 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนานหลายเดือนทำให้สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสไปบางส่วน แต่ไม่สูญเสีย กิจกรรมของเอนไซม์เมื่อเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ส่วน Damaso *et al.* (2002a) รายงานว่าเมื่อเก็บ เอนไซม์ไซลานเนสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่เติมสาร stabilizing agent ก็ไม่ทำให้สูญเสีย กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส

Singh *et al.* (2000a) ได้ทดสอบความคงทนของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ต่าง ๆ 9 สายพันธุ์ พบว่าเอนไซม์จากเชื้อ *T. lanuginosus* SSBP มีความ คงตัวมากที่สุด โดยกิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเหลือ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และลดลงเหลือเพียง 45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้ยังศึกษาถึงแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากสายพันธุ์ SSBP พบว่า ซังข้าวโพดให้ความเสถียรของเอนไซม์สูงสุด

William (2000) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไฮโดรไลติกในการปรับปรุงคุณค่าของอาหารสัตว์ การเติมเอนไซม์ไฮโดรไลติกลงไปเพื่อกระตุ้นอัตราการเจริญเติบโต โดยเข้าไปมีส่วนในการปรับปรุงความสามารถในการย่อยและปรับปรุงคุณภาพของฟางข้าวที่ใช้เป็นอาหารของสัตว์ ตัวอย่างการใช้เอนไซม์ไฮโดรไลติกในอาหารสัตว์ เช่น การเติมลงไปในการอาหารไก่ที่มีข้าวสาลี ข้าวไรย์ และเมล็ดธัญพืชต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ โดยเอนไซม์จะไปมีผลทำให้ความหนืดของอาหารลดลง การย่อยอาหารและการดูดซึมอาหารของไก่ดีขึ้น ทำให้ไก่ได้รับพลังงานอย่างเพียงพอ

2. เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์จะไปย่อยพันธะ α -1,4 glycosidic ระหว่างโมเลกุลของกลูโคสบนสายตรง แบบสุ่ม เกิดเป็นสารผสมของกลูโคส มอลโตส โอลิโกแซ็กคาไรด์และ limit dextrin ทำให้น้ำแป้งใสขึ้น เรียกว่ากระบวนการ liquefaction

การศึกษาองค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิต amylolytic enzymes จากเชื้อรา *T. lanuginosus* ATCC 34626 โดยศึกษาผลกระทบของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว โดยการคัดเลือกเชื้อรา *T. lanuginosus* บนสับสเตรตหลายชนิด ได้แก่ แป้ง อะไมโลเพคติน เดกแทรน เดกทริน กลูโคส มอลโตไตรโอสและมอลโตส พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 92-125 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 6-13 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในระหว่างการทดสอบแหล่งไนโตรเจน พบว่า L-asparagine เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีแหล่งหนึ่ง พีเอชที่เหมาะสมของอาหารที่ใช้ในการหมักคือ 4.9 โดยใช้ 100 มิลลิโมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ (citrate buffer)

มีการประยุกต์ใช้ Response Surface Method (RSM) สำหรับการวิจัยหาความเข้มข้นที่เหมาะสมขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิต โดย second –order polynomial model ให้ค่านัยสำคัญ 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) สำหรับทั้งสองเอนไซม์ ความเข้มข้นของ L- asparagine ถูกปรับเป็น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นของแป้งถูกปรับเป็น 6.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และ 2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกลูโคอะไมเลส amylolytic enzymes (แอลฟาอะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส) จากเชื้อรา *T. lanuginosus* ATCC 34626 เมื่อถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่า แอลฟาอะไมเลสมีน้ำหนักโมเลกุล 61 กิโลดาลตัน ส่วนกลูโคอะไมเลสมีน้ำหนักโมเลกุล 75 กิโลดาลตัน ค่า pI ของแอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 3.5-3.6 ส่วนกลูโคอะไมเลสเท่ากับ 4.1-4.3 และค่าพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ทั้ง 2 คือ 4.6-6.6 และ 4.4-5.6 ตามลำดับ โดยอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ทั้งสอง จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า Zn^{2+} มีผลไปยับยั้งกิจกรรมของทั้งสองเอนไซม์ ส่วน Mn^{2+} และ Fe^{2+} เป็นตัวกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ส่วน Ca^{2+} และ Ba^{2+}

เป็นตัวกระตุ้นกิจกรรมของแอลฟาอะไมเลส นอกจากนี้ทั้งสองเอนไซม์มีครึ่งชีวิตนานกว่า 1 วัน ที่ 60 องศาเซลเซียส โดยพิสูจน์ได้ว่าเป็นเอนไซม์ทนอุณหภูมิสูงในช่วงพีเอช 4.5-8.5 แต่เอนไซม์ทั้งคู่สูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็วเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียสหรือที่พีเอชต่ำกว่า 4.0 ลำดับกรดอะมิโนบริเวณ N-terminal 37 residues แรกของแอลฟาอะไมเลสบริสุทธิ์จาก *T. lanuginosus* ATCC 34626 เปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโน 37 residues แรกของ แอลฟาอะไมเลสบริสุทธิ์จาก *Aspergillus oryzae* และ *Emmericella nidulans* พบว่าส่วนใหญ่แล้วมีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกัน (Nguyen *et al.*, 2000, 2002)

Petrova *et al.* (2000) รายงานว่า 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-ethyl)-carbodiimide (40-100 มิลลิโมลาร์) และ N-bromosuccinimide (0.1-1 มิลลิโมลาร์) สามารถยับยั้งกิจกรรมของ เอนไซม์ แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *T. lanuginosus*

Rubinder *et al.* (2002) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสด้วยการทำให้เชื้อรา *T. lanuginosus* กลายพันธุ์ด้วยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตและ NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนต่อ catabolite repression และสายพันธุ์ที่เป็น partial constitutive โดยสายพันธุ์ III 51 เป็นสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้เป็น 7 เท่าของสายพันธุ์ดั้งเดิม และรายงานว่าการใช้ 2.1 เปอร์เซ็นต์ แป้งข้าวโพด 0.46 เปอร์เซ็นต์ กากถั่วเหลือง พีเอชเริ่มต้นที่ 5.8 เหมาะสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลสมากที่สุดโดยมี กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 192 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Kunamneni *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* โดยการหมักแบบ solid state และใช้สับสเตรตที่เป็นของแข็ง เช่น ข้าวสาลี ชั่งข้าวโพด ข้าว ข้าวบาเลย์ เมล็ดธัญพืช และข้าวโพดบด พบว่าการเพาะเลี้ยงบนข้าวสาลีให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส สูงกว่าสับสเตรตชนิดอื่น คือ 534 หน่วยต่อกรัมข้าวสาลี ภายใต้การเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเป็นเวลา 120 ชั่วโมง อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.0 ความชื้นเริ่มต้น 90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/w) ความเข้มข้นของสารละลายเกลือ 1.5:10 (v/w) และอัตราส่วนของน้ำหมักสับสเตรตต่อปริมาตรฟลาสก์คือ 1:100 และเติม แป้งที่ละลายน้ำ (1 เปอร์เซ็นต์ w/w) และ เพปโทน (1 เปอร์เซ็นต์ w/w) และใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติเพื่อทำนายองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่าการใช้ แป้งที่ละลายน้ำ 71.1 กรัมต่อกิโลกรัม เพปโทน 91.97 กรัมต่อกิโลกรัม และสารละลายเกลือแร่ 175.05 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ค่ากิจกรรมของ

เอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 5.085×10^5 หน่วยต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการใช้สถิติทำนาย และเมื่อทำการทดลองโดยใช้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวข้างต้นในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสพบว่าได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 4.946×10^5 หน่วยต่อกิโลกรัม เป็นค่าที่ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนาย

3. เอนไซม์โปรติเอส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยโมเลกุลโปรตีนให้เป็นสายเปปไทด์สั้น ๆ หรือเป็นกรดอะมิโน เพื่อให้สัตว์สามารถดูดซึมไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้อัตราการเจริญของสัตว์ดีขึ้น Ong *et al.* (1972) รายงานว่าเชื้อราชอบร้อนหลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ โดยเฉพาะ *Humicola lanuginosa* และ *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* เป็นเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ปริมาณสูงและยังพบว่า 0.25 มิลลิโมลาร์ *p*-chloromercuribenzoate (*p*CMB) มีผลยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อรา *H. lanuginosa* ได้

4. เอนไซม์ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยโมเลกุลของไขมันได้ผลผลิตเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน Liu *et al.* (1972, 1973a, 1973b, 1973c) รายงานว่า *H. lanuginosa* S38 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในสภาวะการเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 7.0 อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm นอกจากนี้ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสยังคงเหลือ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ 70 องศาเซลเซียส 20 นาทีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสลดลงเหลือ 35 เปอร์เซ็นต์

5. เอนไซม์ไฟเตส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา dephosphorylation ทำให้เกิดการสลายพันธะเอสเทอร์ของกรดไฟติก ซึ่งเป็นสารประกอบฟอสเฟตที่พบในเมล็ดธัญพืช และเป็นองค์ประกอบในอาหารสัตว์ (Papagiani *et al.*, 1999) ฟอสฟอรัสส่วนใหญ่ที่พบในเมล็ดธัญพืชจะอยู่ในรูปกรดไฟติกถึง 60-90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสัตว์กระเพาะเคี้ยวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในปริมาณต่ำ (Berka *et al.*, 1998) ดังนั้นจึงมีการประยุกต์เอาเอนไซม์มาย่อยกรดไฟติกและเพิ่มปริมาณฟอสเฟตให้กับอาหารสัตว์โดยใช้เอนไซม์ไฟเตส (William, 2000)

6. เอนไซม์บีตากลูแคนเนส เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้ในอาหารสัตว์ เนื่องจากสามารถย่อยพันธะของบีตากลูแคนซึ่งเป็นโมเลกุลของกลูโคสที่ต่อกันเป็นเส้นตรงด้วยพันธะที่หลากหลาย เช่น 1,4-B-; 1,3-B-; 1,6- B-; 1,3-B- และ 1,6- B- ; 1,3-B- และ 1,4- B-; 1,2-B- และ 1,4-B- ทำให้โครงสร้างของบีตากลูแคนมีความซับซ้อน พบได้ในธัญพืชและเอนโดสเปิร์มของเมล็ดธัญพืช ดังนั้นในการย่อย

ปีตากุลแคนได้อย่างสมบูรณ์จึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไม่พบ รายงานว่าสร้างได้จากเชื้อรา *T. lanuginosus*

4.4 การใช้เอนไซม์ในอาหารสัตว์

4.4.1 การใช้เอนไซม์ในอาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยว (non-ruminant) มีการนำเอนไซม์มาใช้กันอย่างกว้างขวางและมีการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในอาหารสัตว์ทางการค้าจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด (ตารางที่ 4) เนื่องจากอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์กระเพาะเดี่ยวส่วนใหญ่เป็นธัญพืช ซึ่งมีสารที่ไม่ใช่พอลิแซ็กคาไรด์ (non polysaccharide) เป็นองค์ประกอบจำนวนมาก ถ้าไม่มีการเติมเอนไซม์อาจส่งผลให้อัตราการเจริญของสัตว์ลดลง และในส่วนของระบบทางเดินอาหารของสัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่มีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสารที่ไม่ใช่พอลิแซ็กคาไรด์ได้ ดังนั้นการใช้เอนไซม์เข้าไปช่วยย่อยจึงจำเป็นและมีประโยชน์ต่อสัตว์กลุ่มนี้เป็นอย่างมาก ตัวอย่างของสัตว์กระเพาะเดี่ยว ได้แก่ หมูซึ่งกินรำข้าวเป็นอาหารจำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลาย ๆ ชนิดช่วยย่อยเพราะรำข้าวมีส่วนประกอบของโปรตีน ไขมัน และเยื่อ นอกจากนี้ยังมีพวกสัตว์ปีก เช่น ไก่ เป็ด เป็นต้น (Graham and Balnave, 1995) ผลจากการย่อยสารพวกเฮมิเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบในธัญพืชนั้น ส่วนหนึ่งจะทำให้ได้น้ำตาลออกมา ผลพลอยได้จากการเติมเอนไซม์ลงไปในอาหารสัตว์คือโรงเรือนไม่สกปรกมากเพราะอาหารถูกย่อยหมด ของเสียที่ไก่ขับถ่ายออกมาจะแห้งและไม่เหม็นยวมาก นอกจากนี้ไข่ไก่ยังมีความสะอาดด้วย

4.4.2 การใช้เอนไซม์ในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ruminant) จากการศึกษาของ Beauchemin *et al.* (1997) พบว่าไม่มีความจำเป็นในการเติมเอนไซม์ลงในอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องเนื่องจากภายในกระเพาะของมันมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยพวกเยื่อใยสูงอยู่แล้ว และพบว่าเอนไซม์ในอาหารสัตว์ไม่สามารถทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนในกระเพาะสัตว์ได้ อย่างไรก็ตามมีการใช้ปริมาณของเอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ระหว่างช่วง 0.01-1 เปอร์เซ็นต์ของอาหารสัตว์ โดยขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหารและชนิดของเอนไซม์ เอนไซม์ที่ใช้ส่วนใหญ่คือ ไซลานเนส และ เอนโดเซลลูเลส

ตารางที่ 4 เอนไซม์ไฮลาลเนสที่ผลิตเพื่อใช้ทางการค้าและการนำไปใช้

Commercial name	Microorganisms	Fermentation condition	Application
Allzym	<i>Aspergillus niger</i>	Submerge	Animal feed improvement
Amano 90	<i>A. niger</i>	Solid	Pharmaceutical analysis, food industry
bio-Feed Plus	<i>Humicola insolens</i>	Submerge	Animal feed
EcopulpX-200	<i>Tricoderma reesei</i>	Submerge	Cellulose pulp bleach
Ecosane	<i>T. reesei</i>	Submerge	Animal feed
Grindazym	<i>A. niger</i>	Submerge	Bird and pig feed
Irgazyme	<i>T. longibranchiatum</i>	Submerge	Paper industry and animal feed
Multifect XT	<i>T. longibranchiatum</i>	Submerge	Food industry
Pulpzyme	<i>Bacillus</i> sp.	Submerge	Cellulose and paper industry
Solvay pentonase	<i>T. reesei</i>	Submerge	Starch and bread making
Sternzym HC	<i>T. reesei</i>	Solid	Bread making
Sumizyme X	<i>T. koningii</i>	Solid	Manufacture of mushroom and vegetable extract, bread making, enzymatic peeling of cereal , animal feed
Xylanase	<i>Tricoderma</i> sp.	Submerge	Carbohydrate structural studies
Xylanase GS35	<i>T. reesei</i>	Submerge	Cellulose pulp bleach and animal feed

ที่มา : ดัดแปลงจาก Polizeli *et al.* (2005)

5. การผลิตเอนไซม์ในกระบวนการหมักโดยใช้ขี้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ

การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์เป็นแนวทางหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ (Chahal, 1985) การผลิตเอนไซม์ไฮโดลัสโดยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อมีทั้งในสภาวะการหมักแบบ solid state และการหมักแบบ submerge culture ข้อได้เปรียบของการหมักแบบ submerge culture เมื่อเปรียบเทียบกับหมักแบบ solid state คือ สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในระหว่างกระบวนการหมักได้ดีและง่ายกว่า มีประโยชน์และเหมาะสมสำหรับขั้นตอนการทดสอบเอนไซม์ในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ต่าง ๆ อย่างไรก็ตามการหมักแบบ solid state มีข้อดีเหนือกว่าการหมักแบบ submerge culture คือ สามารถให้ผลผลิตต่อหน่วยวัสดุหมักสูงกว่า ไม่ค่อยพบปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปของสปอร์จึงไม่จำเป็นต้องใช้ถังเตรียมเชื้อเริ่มต้น (seed tank) เทคนิคการให้อากาศในวัสดุหมักทำได้ง่ายกว่าในสภาพการหมักแบบ submerge culture นอกจากนี้การหมักแบบ solid state ซึ่งเป็นการเจริญของจุลินทรีย์บนวัสดุแข็งที่ไม่มีน้ำในรูปอิสระแต่จะอยู่ในลักษณะดูดซึมนั้นจะเหมาะสมกับเชื้อรา ซึ่งมีความสามารถในการขนส่งไปตามวัสดุหมักอันมีผลทำให้สามารถสัมผัสกับอาหารได้อย่างใกล้ชิด มีผลทำให้การสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่า (Chahal, 1985; Biswas, 1988)

อานนท์และคณะ (2543) ได้ศึกษา การสร้างเอนไซม์ไฮโดลัสของเชื้อรา *T. lanuginosus* ในการเพาะเลี้ยงแบบ solid state ได้สูงสุดภายในเวลา 5 วัน เมื่อใช้ขี้ข้าวโพดที่ผ่านการแช่ต่าง รำข้าวสาลี และแกลบ ในอัตราส่วน 5:5:2 เป็นวัสดุหมัก ซึ่งได้เอนไซม์ไฮโดลัส 725-729 หน่วยต่อกรัม วัสดุหมัก Purkarthofer *et al.* (1993) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. lanuginosus* ในวัสดุหมักขี้ข้าวโพดพบว่าอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ไฮโดลัสของเชื้อ และ Alam *et al.* (1994) ได้รายงานการใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. lanuginosus* แบบ solid state โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นวัสดุหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ไฮโดลัส

Xiong *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไฮโดลัสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* DSM 10635 โดยวิธีการหมักแบบ submerge culture ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน พบว่าการใช้ขี้ข้าวโพดเป็นวัสดุหมักจะให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดลัสสูงที่สุดเท่ากับ 1,180 หน่วยต่อมิลลิลิตร Reddy *et al.* (2002) ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตเอมิเซลลูเลสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* SSBP ในถังหมักขนาด 30 ลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศทำให้มีการผลิตเอนไซม์ไฮโดลัสเพิ่มขึ้น โดยให้

กิจกรรมของเอนไซม์ไลซานสูงสุด 6,750 nkat/ml ที่ 0.75 vvm ภายในเวลา 48 ชั่วโมง โดยปริมาณการผลิตเอนไซม์ไลซานสูงสุดเท่ากับ 330,000 nkat/l/h ในสภาวะการหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 0.5 และ 0.75 vvm ในขณะที่ Singh *et al.* (2000c) รายงานว่าการผลิตเอนไซม์ไลซานจากเชื้อรา *T. lamuginosus* SSBP ด้วยการหมักแบบ submerge culture ในระดับฟลาस्कที่ใช้ขังข้าวโพดเป็นวัสดุหมักให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลซานสูงสุดเท่ากับ 56,500 nkat/ml

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์

6.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

6.1.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงานของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ (Boze *et al.*, 1995) นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้วปริมาณของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อการเจริญของเซลล์โดยตรง การเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนและการใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์เป็นสิ่งที่สำคัญในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเซลล์

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในกระบวนการหมักระดับห้องปฏิบัติการต้องคำนึงถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาไปเป็นระดับนำร่องและระดับอุตสาหกรรมด้วย ดังนั้นราคาวัตถุดิบที่ใช้จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ต้องพิจารณาให้เหมาะสม กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น แป้งจากธัญพืชชนิดต่าง ๆ แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง และแป้งมันสำปะหลัง หรืออาจใช้ข้าวโพดหรือเมล็ดธัญพืชที่บดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ในปัจจุบันวัตถุดิบที่ได้รับความนิยมและมีการศึกษาเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อมักเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรและของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหาร (Akidumils and Glatz, 1998) เช่น รำข้าว กากน้ำตาล หางนม น้ำแช่ข้าวโพด การนำวัตถุดิบเหล่านี้มาใช้นอกจากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบในรูปของผลผลิตที่ได้แล้วยังสามารถลดปัญหาการจัดการของเสียเหล่านี้ได้อีกด้วย (Akidumils and Glatz, 1998)

Alam *et al.* (1994) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการใช้รำข้าวสาลี รำข้าว เชื้อไม้ที่ผ่านการฟอกด้วยซัลไฟต์ ชานอ้อย จี๊เลื้อยที่ผ่านการแช่ด่าง ฟางข้าวที่ผ่านการแช่ด่าง และปอกระเจาบดผ่านการแช่ด่างเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *T. lanuginosus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในสภาพการหมักแบบ solid state พบว่ารำข้าวสาลีเป็นวัสดุหมักที่เหมาะสมที่สุดโดยผลิตได้เท่ากับ 1843.6 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมัก ในขณะที่ Hog and Deckwer (1995) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อรา *T. lanuginosus* โดยใช้รำข้าวสาลีให้เอนไซม์ไซลานเนสต่ำกว่าการใช้ขังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก ส่วนอานนท์และคณะ (2542) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *Humicola lanuginosa* ในระดับพลาสติกขนาด 250 มิลลิเมตรที่บรรจุวัสดุหมักปริมาณ 12 กรัมซึ่งประกอบด้วยขังข้าวโพดแช่ด่าง รำข้าวสาลี และแกลบ ที่มีความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 725-729 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน บนวัสดุหมักในอัตราส่วนระหว่าง 5:5:2-4:6:2 เมื่อเพิ่มปริมาณขังข้าวโพดแช่ด่างหรือรำข้าวสาลีทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง แม้ว่าการเพิ่มรำข้าวสาลีทำให้การเจริญเพิ่มขึ้นก็ตาม การเติมไซเลนจากไม้ 0.12-0.75 กรัมลงในวัสดุหมักมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.30-1.58 เท่า นอกจากนี้ Christopher *et al.* (2005) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *T. lanuginosus* ATCC 46882 โดยใช้ชานอ้อยด้วยการหมักแบบ solid state ที่ความชื้นเริ่มต้น 83 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 5,098 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักภายในเวลา 4 วัน

6.1.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์จะใช้ไนโตรเจนในการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้ไนโตรเจนได้แตกต่างกันไป บางชนิดสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ บางชนิดสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจะต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อนั้นๆ (Boze *et al.*, 1995)

Purkathofer *et al.* (1993) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยีสต์สกัด เนื้อสกัด เลซีนเพปไทด์ ฟิชเพปไทด์ ฟิชเพปไทด์ผสมยีสต์บด 30 เปอร์เซ็นต์ กากถั่วเหลือง และเมล็ดฝ้าย เพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. lanuginosus* ที่ใช้ขังข้าวโพดหรือไซเลนเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในสภาพการหมักแบบ submerge culture พบว่า ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส นอกจากนี้ยังได้ศึกษาปริมาณยีสต์สกัดที่เติมในวัสดุหมัก

ซังข้าวโพดบดในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *T. lanuginosus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนสในสภาพการหมักแบบ solid state พบว่าปริมาณ ยีสต์สกัดที่เหมาะสมคือ 1.75 เปอร์เซ็นต์

อานนท์และคณะ (2542) ศึกษาการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เปปโตน ยูเรีย แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แอมโมเนียมซัลเฟตและ แอมโมเนียมไนเตรต คิดเป็น น้ำหนักไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 กรัมลงในวัสดุหมัก 12 กรัมที่ประกอบด้วยซังข้าวโพดแช่ด่าง รำข้าวสาลี และแกลบ อัตราส่วน 5:5:2 ซึ่งเติมไซแลนจากไม้ 0.25 กรัม พบว่า เปปโตนและยูเรียไม่ส่งเสริมการ สร้างเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *Humicola lanuginosa* ให้เพิ่มขึ้นซึ่งแสดงให้เห็นว่าในวัสดุหมักที่มี รำข้าวสาลีเป็นส่วนประกอบนั้นมีแหล่งไนโตรเจนที่เพียงพอต่อการสร้างเอนไซม์ อย่างไรก็ตามการ เติมเปปโตนมีผลทำให้การเจริญที่วัดจากปริมาณกลูโคซามีนสูงขึ้นซึ่งมีปริมาตรเท่ากับ 19.64 มิลลิกรัม ต่อวัสดุหมักแห้งเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุหมักที่ไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจนอื่นซึ่งมีปริมาณกลูโคซามีน เท่ากับ 14.95 มิลลิกรัมต่อวัสดุหมักแห้งภายหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อนาน 120 ชั่วโมง ส่วน $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NH_4NO_3 มีผลให้การสร้างเอนไซม์ไซลานเนสลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ วัสดุหมักที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนคือเชื้อผลิตเอนไซม์ได้ 184.7 210.0 และ 236.4 หน่วยต่อกรัม วัสดุหมักแห้งตามลำดับและวัสดุหมักที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเชื้อผลิตเอนไซม์ได้ 1,294.8 หน่วยต่อ กรัมวัสดุหมักแห้ง ทั้งนี้เนื่องจากวัสดุหมักที่เติมแหล่งไนโตรเจนประเภทแอมโมเนียมมีผลทำให้พีเอช ของวัสดุหมักลดลงอย่างมาก ซึ่งอาจมีผลยับยั้งกิจกรรมของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์และ ความคงทนของเอนไซม์

Damaso *et al.* (2002a) ได้ทำการศึกษาถึงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ ไซลานเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* IOC-4145 พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ ซึ่งได้แก่ โซเดียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมคลอไรด์ มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ไซลานเนส เพียงเล็กน้อย ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์สามารถส่งเสริมการสร้างเอนไซม์ไซลานเนส ได้ดีกว่า โดยเฉพาะ peptone-meat extract และยูเรีย ที่ทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ 872 และ 775 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

6.1.3 สารเหนี่ยวนำ

เอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ชนิดเหนี่ยวนำ (inducible enzyme) ซึ่งจุลินทรีย์จะสร้างขึ้นได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีสารชักนำ (inducer) เท่านั้น ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์เหล่านี้จึงต้องมีการเติมสารชักนำลงไปในการเลี้ยงเชื้อด้วย ตามปกติแล้วสารชักนำมักจะเป็นสับสเตรตของเอนไซม์หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายสับสเตรต

เอนไซม์ที่ย่อยไซลเลนเป็นเอนไซม์ชนิดเหนี่ยวนำ การเติมสารชักนำลงไปในการเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลทำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้น (Beiley *et al.*, 1992) Alam *et al.* (1994) พบว่าการเติมสารละลายไซลเลน 0.7 เปอร์เซ็นต์ลงในวัชคูลัมกร้าข้าวสาลี มีผลทำให้เชื้อ *T. lanuginosus* สร้างเอนไซม์ไซลเลนสเพิ่มขึ้น 28.2 เปอร์เซ็นต์ แต่กับเชื้อ *Thermoascus auratiacus* การเติมสารละลายไซลเลนดังกล่าวไม่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ไซลเลนส นอกจากนี้ยังพบว่าไซลเลนช่วยทำให้การสร้างเอนไซม์ไซลเลนสและบีตาไซโลซิเดส ของเชื้อ *Aspergillus ochraceus* และ *Taralomyces byssoclamydoides* เพิ่มขึ้น (Yoshioka *et al.*, 1981; Biswas *et al.*, 1988) ยังมีการศึกษาถึงการใส่แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ เพื่อเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลเลนสจากเชื้อ *T. lanuginosus* พบว่าไซโลสและเพนโทซานสามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลเลนสได้ (ขวัญชัย, 2544; Purkathofer *et al.*, 1993; Maheshwari *et al.*, 2000) นอกจากนี้น้ำตาลเพนโทสหลายชนิดสามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลเลนสในเชื้อ *T. lanuginosus* ได้พอ ๆ กับไซลเลนและไซโลไบโอส จากการศึกษาการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลเลนสของเชื้อ *T. lanuginosus* ในสภาพ resting cell พบว่าการเหนี่ยวนำโดยไซลเลนนั้นเกิดช้ากว่าการใช้ไซโลสประมาณ 2 ชั่วโมง ไซลเลน ไซโลไบโอส และไซโลส ที่เหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ได้อยู่ในช่วง 10.0-333.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์ได้ 7,100 1,225 และ 850 nkat/ml ตามลำดับ ส่วนไลโซส อะราบินอส และไรโบสมีผลเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ได้ในปริมาณต่ำมากระหว่าง 2.7-13.8 nkat/ml ในขณะที่กลูโคสมีผลไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซลเลนส (Purkathofer and Steiner, 1995) และการย่อยไซโลไบโอสโดยเอนไซม์บีตาไซโลซิเดสให้เป็นไซโลสซึ่งเกิดขึ้นภายในเซลล์ ไซโลสปริมาณมากสามารถก่อให้เกิด catabolite repression ต่อการสร้างเอนไซม์ไซลเลนสได้ แต่บางครั้งพบว่าไซโลสสามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลเลนสได้ใน *Melanocarpus albomyces*, *Pullularia pullulanas*, *Aspergillus terreus*, *A. niger*, *A. sydowii* และ *T. lanuginosus* (Hrmova *et al.*, 1989; Ghosh and Nanda, 1994; Purkathofer and Steiner, 1995) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า birchwood xylan สามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลเลนสได้ แต่อะราบินอส กาแลกโตส กลูโคสและกลีเซอรอลไม่สามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลเลนสได้ (Bhuiyan *et al.*, 1997) ส่วนฟรุคโตส กลูโคส มอลโตสมีผลไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซลเลนส (Damaso, 2002)

ขวัญชัย (2544) ศึกษาการสร้างเอนไซม์ไซลานสด้วยการเพาะเลี้ยงระดับฟลาสกในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ โดยเชื้อราที่ชอบร้อน *Humicola lanuginosa* (Griffon and Maublance) Bunce ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ไซลานสได้ดี และไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าไซเลนสามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลานสได้ 19.8 หน่วยต่อมิลลิกรัม ในขณะที่ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ และไซโลส มีผลต่อการเหนี่ยวนำน้อยกว่าคือ 1.10 และ 0.37 หน่วยต่อมิลลิกรัมตามลำดับ เมื่อใช้น้ำตาลอะราบินอส กลูโคส และไซโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอนจะพบการสร้างเอนไซม์ไซลานสได้ในปริมาณต่ำ แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานสเมื่อใช้น้ำตาลกาแล็กโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของไซเลนที่สามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลานสได้ดีที่สุด คือ 10-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม โดยเชื้อรา *H. lanuginosa* สร้างเอนไซม์ไซลานสได้ 16.2 หน่วยต่อมิลลิกรัม ดังนั้นสรุปได้ว่าการเติมไซเลนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์เจริญแล้วสามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อราสังเคราะห์เอนไซม์ไซลานสและเอนไซม์บีตาไซโลซิเดสได้เพิ่มขึ้น ขณะที่การเติมไซโลสลงในอาหารที่มีไซเลนมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไซลานสที่เหนี่ยวนำโดยไซเลน

6.2 ปัจจัยทางกายภาพ

ปัจจัยทางกายภาพเป็นปัจจัยที่สำคัญและยากในการควบคุมในกระบวนการหมักแบบ solid state ซึ่งได้แก่ ความชื้น อุณหภูมิ การให้อากาศ รูปร่างและขนาดวัสดุหมัก การเตรียมวัสดุหมัก (pretreatment) และระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วิเชียรและคณะ, 2536; Nishio *et al.*, 1981; Biswas, 1981; Sargantanis *et al.*, 1993) วัสดุหมักที่มีขนาดที่เหมาะสมจะมีพื้นที่ผิวให้จุลินทรีย์ยึดเกาะได้มาก แต่ถ้ามีขนาดเล็กเกินไปจะทำให้เกิดการถ่ายเทอากาศได้ไม่ดี ความชื้นและอุณหภูมิเป็นปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญที่สุดในการควบคุมการหมักแบบ solid state โดยเป็นปัจจัยควบคุมการสร้างเอนไซม์ การไหลเวียนอากาศจะเปลี่ยนแปลงไปพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงความชื้นของวัสดุหมัก (Aidoo *et al.*, 1982; Moo-Young *et al.*, 1983; Biswas *et al.*, 1988)

อานนท์และคณะ (2542) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสร้างเอนไซม์ไซลานสของเชื้อรา *Humicola lanuginosa* โดยเพาะเลี้ยงบนวัสดุหมักที่มีความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์โดยประกอบด้วยขังข้าวโพดแช่ต่าง รำข้าวสาลีและแกลบในอัตราส่วน 5:5:2 ซึ่งเติมไซเลนจากไม้ 0.25 กรัม โดยบ่มที่อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55 และ 58 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเชื้อรา *H. lanuginosa* สร้างเอนไซม์ไซลานสได้สูงสุดเท่ากับ 1,500 หน่วย

ต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ภายหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน การหมักที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทำให้การสร้างเอนไซม์ไฮโดรลีสลดลงเล็กน้อยโดยเชื้อผลิตได้เท่ากับ 1,330 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียสหรือมากกว่า 50 องศาเซลเซียสมีผลให้การสร้างเอนไซม์ลดลงอย่างมาก สำหรับการศึกษาค้นคว้าของความสัมพันธ์ต่อการสร้างเอนไซม์ไฮโดรลีสโดยเพาะเลี้ยงบนวัสดุหมักที่ประกอบด้วยขี้ข้าวโพดแช่ต่าง รำข้าวสาลีและเกลบในอัตราส่วน 5:5:2 ซึ่งเติมไซเลนจากไม้ 0.25 กรัม บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้ความชื้นเริ่มต้นที่ 60, 65, 70, 73 และ 76 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเอนไซม์ไฮโดรลีสเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์โดยเชื้อสร้างเอนไซม์ได้ 1,500 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้งภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน นอกจากนี้ยังศึกษาผลของความหนาวัสดุหมักและอัตราการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ไฮโดรลีสของเชื้อรา

H. lanuginosa โดยใช้การหมักแบบถาดในถังหมักห้องปฏิบัติการที่มีการให้อากาศขึ้นและมีถาดไม้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 เซนติเมตรบนวัสดุหมักที่ประกอบด้วยขี้ข้าวโพดแช่ต่าง รำข้าวสาลีและเกลบและไซเลนจากไม้ในอัตราส่วน 5:5:2:0.25 ที่มีความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความหนาของวัสดุหมัก 1, 2 และ 5 เซนติเมตร โดยให้อากาศขึ้นในอัตรา 0.06, 0.24 และ 0.45 ลิตรอากาศต่อชั่วโมงต่อกรัมวัสดุหมักแห้งพบว่าในสภาวะการหมักที่ไม่ได้ให้อากาศการเพิ่มความหนาของวัสดุหมักมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลงอย่างมาก การให้อากาศช่วยให้อัตราการผลิตและปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น การให้อากาศระหว่าง 0.06-0.24 ลิตรอากาศต่อชั่วโมงต่อกรัมวัสดุหมักแห้งมีผลให้การผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 1,577-1,764 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง การเพิ่มความหนาวัสดุหมักเป็น 5 เซนติเมตรภายใต้การเพาะเลี้ยงที่ให้อากาศมีผลให้การผลิตเอนไซม์ลดน้อยลงโดยได้เอนไซม์เท่ากับ 1,324 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง

6.2.1 ความเป็นกรด-เบส

ความเป็นกรด-เบส มีผลโดยตรงต่ออัตราการเจริญและระบบเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ โดยอัตราการเจริญจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อพีเอชสูง หรือต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสม จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงของพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกัน วัสดุส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่พีเอชต่ำและพีเอชที่เหมาะสมคือ 5 แต่อาจเจริญได้ที่พีเอชสูงกว่า 7 จึงจัดเป็นพวกชอบกรดไม่แท้จริง (facultative acidophile) บางชนิดเจริญได้ที่พีเอชต่ำมาก ๆ จัดเป็นพวกชอบกรดอย่างแท้จริง (obligate acidophile) ส่วนจุลินทรีย์บางพวกสามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่มีพีเอชมากกว่า 7 จัดเป็นพวกชอบด่าง (alkaliphile) Petrova *et al.* (2000) รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ดั้งเดิมเท่ากับ 5.0 แต่สำหรับสายพันธุ์กลายพีเอชที่เหมาะสมคือ 4.5 ในขณะที่ มีรายงานไว้มากมายเกี่ยวกับพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ไฮโดรลีสที่ผลิตจากเชื้อรา

T. lanuginosus ซึ่งแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ Jiang *et al.* (2005) รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมคือ 6.2 Nguyen *et al.* (2002) รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมของเชื้อ *T. lanuginosus* ATCC 34626 อยู่ในช่วง 4.6-6.6 Li *et al.* (2005) รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 7-7.5 ส่วน Singh *et al.* (2000d) และ Xiong *et al.* (2004) รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.0-6.5

6.2.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการเกิดกิจกรรมของเซลล์จุลินทรีย์ แต่ละชนิดมีความต้องการอุณหภูมิเพื่อการเจริญเติบโตที่ต่างกัน อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเรียกว่า optimum temperature โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์จะคงที่ที่อุณหภูมิหนึ่งตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุด แต่อุณหภูมิของการเจริญจะแปรผันในช่วงกว้าง

Singh *et al.* (2000a) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ไซลานเนส ของเชื้อ *T. lanuginosus* คือ 70 องศาเซลเซียส และได้ทดสอบความคงทนของเอนไซม์ไซลานเนส จากเชื้อ *T. lanuginosus* 9 สายพันธุ์ พบว่าเอนไซม์จากเชื้อ *T. lanuginosus* SSBP มีความคงตัวมากที่สุด โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บไว้ที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และลดลงเหลือเพียง 45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้ยังพบว่า culture filtrate ของเชื้อ *T. lanuginosus* SSBP ที่เลี้ยงบนซังข้าวโพดมีความคงตัวมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับความคงตัวของ culture filtrate ของเชื้อ *T. lanuginosus* SSBP ที่เลี้ยงบน oat spelts xylan, birchwood xylan, locust beangum รำข้าวสาลี และชานอ้อย

6.2.3 ปริมาณออกซิเจน

การเลี้ยงเชื้อในสถานะที่มีการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอเชื้อจะมีการเจริญได้ดี เนื่องจากในสถานะที่มีการให้อากาศจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายอาหารและสร้างพลังงานได้สูง ความต้องการออกซิเจนของจุลินทรีย์ยังขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนที่เชื้อสามารถใช้ได้ง่ายรวดเร็ว ความเข้มข้นสูงจะทำให้เชื้อเจริญได้อย่างรวดเร็ว (Daniel *et al.*, 1979)

Reddy *et al.* (2002) ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตเอมิเซลลูเลสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* SSBP ในถังหมักขนาด 30 ลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศทำให้มีการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสเพิ่มขึ้น โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด 6,750 nkat/ml ที่ 0.75 vvm ภายในเวลา 48 ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศสูงถึง 1.25 vvm ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสลดลงเหลือ 2,500 nkat/ml ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์บีตาแกลูโคซิเดสเท่ากับ 0.40 nkat/ml และคงที่ในระหว่างการหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 0.75-1.0 vvm

7. การปรับปรุงสายพันธุ์ *T. lanuginosus*

Damaso *et al.* (2003) ศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ไซลานเนสทนร้อนจากเชื้อรา *T. lanuginosus* IOC-4145 ในยีสต์ *Pichia pastoris* โดยวิธี cDNA cloning พบว่าเชื้อยีสต์สามารถปล่อยเอนไซม์ออกมาในระดับสูง นอกจากนี้ยังพบว่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซลานเนส การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจาก recombinant ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตรภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ 148 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์ดั้งเดิมและ recombinant คือ 75 องศาเซลเซียส และยังพบกิจกรรมถึง 60 เปอร์เซ็นต์ที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 80 นาที หรือ 40 นาทีที่ 80 องศาเซลเซียส

Chadha *et al.* (1999) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ ATCC 26909, ATCC 22083, DEN 1457, IMI 8400 และ BSI พบว่าทุกสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ในปริมาณสูงและผลิตเอนไซม์ไซลานเนส 2 แบบ ได้แก่ xylanase I และ xylanase II ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 25 และ 54 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และเมื่อทำให้สายพันธุ์ BSI กลายพันธุ์ด้วยการใช้แสงอัลตราไวโอเลตหรือ *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) ทำให้ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้เพิ่มขึ้น โดยพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้เป็น 2.5 เท่า (2,506 หน่วยต่อมิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ดั้งเดิม (1,018 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

8. วิธีการวิเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์

การวิเคราะห์เอนไซม์ไซลานเนสและแอลฟาอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์ มีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่

8.1 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ นิยมใช้อยู่ 2 วิธี คือ วิธี DNS (dinitrosalicylic acid) เป็นวิธีการที่ไวต่อไอออนของโลหะและเหมาะสำหรับนำมาใช้ในการหาปริมาณน้ำตาลที่มีระดับสูงอยู่ในช่วง 1-5 มิลลิกรัม และอีกวิธีคือ Somogyi-Nelson เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่มีระดับต่ำ (10-50 ไมโครกรัม) การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์นิยมใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส เซลลูเลสและอะไมเลส เป็นต้น

8.2 การใช้สับสเตรตสร้างพันธะโควาเลนต์กับสี Remazol Brilliant Blue (colorimetric assays) ซึ่งเป็นการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดสีที่เกิดขึ้นของสารละลายที่เกิดขึ้นหลังจากเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรตแล้ว ซึ่งการใช้สี Remazol Brilliant Blue นั้น มีข้อดีคือเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยาการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากสับสเตรตที่ไม่ถูกย่อยได้ง่าย โดยใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวทำให้ตกตะกอน

8.3 การวัดความหนืด (viscometric method) ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์บีตากลูคาเนสซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงสูงแต่วิธีการนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนานเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สับสเตรตสร้างพันธะโควาเลนต์กับสี Remazol Brilliant Blue

8.4 วิธีวิเคราะห์แบบ Enzyme-linked sorbent assay (ELSA) ใช้เพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์บีตากลูคาเนส ซึ่งมีข้อดีคือ มีความจำเพาะต่อการหาปริมาณของเอนไซม์ดีกว่าวิธีอื่น ๆ (McCleary, 2001)

9. การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)

ผู้คิดการใช้วิธีการทางสถิติสำหรับการออกแบบการทดลอง คือ Fisher ซึ่งเป็นทั้งผู้พัฒนาและเป็นบุคคลแรกที่นำเอาการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) มาใช้เป็นวิธีการเบื้องต้นในการวิเคราะห์เกี่ยวกับการออกแบบการทดลอง ซึ่งการนำไปใช้ในยุคแรก ส่วนมากจะเกี่ยวข้องกับวิทยาศาสตร์ทางการเกษตรและชีวภาพ และการนำไปใช้งานทางด้านอุตสาหกรรมครั้งแรกเริ่มปรากฏประมาณช่วง ค.ศ. 1930 ซึ่งอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องคืออุตสาหกรรมสิ่งทอ หลังจากสงครามโลกครั้งที่ 2 ยุติลง วิธีการออกแบบการทดลองก็ได้เริ่มถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเคมีและกระบวนการผลิตในสหรัฐอเมริกาและยุโรปตะวันตก กลุ่มอุตสาหกรรมเหล่านี้ได้รับประโยชน์อย่างมากในการใช้การออกแบบการทดลองสำหรับงานพัฒนาผลิตภัณฑ์และกระบวนการผลิต (ปารเมศ, 2545)

การออกแบบการทดลองเพื่อการปรับปรุงคุณภาพ (Design of Experiment: DOE) แต่ละกระบวนการผลิตนั้นต่างก็ประกอบด้วยปัจจัยมากมายหลายประการที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพ ต้นทุนการผลิต และระดับคุณภาพของกระบวนการ ซึ่งต่างก็ต้องการที่จะกำหนดหรือปรับตั้งค่าของปัจจัยเหล่านั้นอย่างเหมาะสม (Optimum setting) เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ตามที่ต้องการ แต่ปัญหาก็คือจะสามารถหา Optimum setting ของปัจจัยเหล่านั้นได้อย่างไร การออกแบบการทดลองเป็นวิธีที่จะช่วยให้เราสามารถออกแบบวิธีการทดลองอย่างเป็นระบบ เพื่อเก็บข้อมูล แล้วนำข้อมูลเหล่านั้นไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ ซึ่งจะทำได้ผลลัพธ์ที่เชื่อถือได้ทางสถิติว่าควรจะต้องปรับตั้งปัจจัยต่างๆ อย่างไรเพื่อให้ได้กระบวนการทำงานที่มีประสิทธิภาพ ต้นทุนการผลิตต่ำ และได้สินค้าคุณภาพดี การทำ DOE จะใช้เวลาและค่าใช้จ่ายในการทดลองที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับการลองผิดลองถูก การออกแบบการทดลองเป็นวิธีการทางสถิติอีกตัวหนึ่งที่น่าสนใจในกระบวนการผลิตเพื่องานด้านคุณภาพ นอกเหนือไปจากการวิเคราะห์การถดถอย (Regression analysis) ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการออกแบบการทดลองมีหลายแบบ ได้แก่ การทดลองแบบ factorial design, central composite design (CCD) เป็นต้น

วิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) เป็นการรวบรวมเอาเทคนิคทั้งทางคณิตศาสตร์และทางสถิติที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหา โดยที่ผลตอบที่เราสนใจขึ้นกับหลายตัวแปร และมีวัตถุประสงค์ที่จะหาค่าที่ดีที่สุดของผลตอบนี้ โดยมากแล้วจะแสดงพื้นผิวตอบสนองในรูปแบบของกราฟฟิก และเพื่อที่จะช่วยให้มองเห็นรูปร่างของพื้นผิวตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น โดยมากแล้วนิยมพล็อตเส้นโครงร่าง (contour plot) ของพื้นผิวตอบสนอง (ปารเมศ, 2545)

Vining and Myers (1990) กล่าวว่า Response Surface Methodology (RSM) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งในการออกแบบการทดลอง มีทฤษฎีที่น่าสนใจและถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายโดยนำมาใช้ในการพัฒนางานด้านคุณภาพในการผลิตเพื่อหาจุดที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตโดยทำการปรับปรุงเข้าหาจุดที่เหมาะสมเป็นขั้น ๆ ซึ่งเทคนิคหรือวิธีการนี้ถูกนำมาประยุกต์กับงานได้หลายด้าน Response Surface Methodology เป็นเทคนิคในการหาค่าที่ดีที่สุดสำหรับกระบวนการผลิตหรือผลิตภัณฑ์ โดยการออกแบบการทดลองโดยการกำหนดจุดทดลองต่าง ๆ และประมาณค่าตัวแปรตอบสนองหรือลักษณะทางคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (Quality Performance Characteristic) ซึ่งสัมพันธ์ต่อตัวแปรต่าง ๆ ในรูป

$$Y(x) = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum_{i < j}^k \beta_{ij} x_i^2 x_j$$

จากนั้นจึงใช้วิธีทางคณิตศาสตร์จากทฤษฎีการหาค่าที่ดีที่สุด (Optimization Theory) ให้ได้ค่าตัวแปรตอบสนองที่ดีที่สุด ซึ่งการใช้สมการกำลังสองนั้นก็เพียงพอแล้ว ในแง่ของการหาคำตอบที่ดีที่สุดเมื่อเข้าใกล้จุดที่ดีที่สุด (Montgomery, 1991)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อรา

เชื้อราที่ใช้คือเชื้อราขอบร่อน *Thermomyces lanuginosus* ที่คัดแยกจากตัวอย่างต่าง ๆ เช่น ดิน ซาก ปุ๋ย เปลือกไม้ เป็นต้น ที่เก็บมาจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยจำนวน 89 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์เหล่านี้ได้ผ่านการทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้ทุกสายพันธุ์ (Khucharoenphaisan and Kitpreechavanich, 2004) นำเชื้อราทั้ง 89 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง yeast extract-glucose medium บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การศึกษาความสามารถผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* บนอาหารแข็ง

นำเชื้อราทั้ง 89 สายพันธุ์มาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ดังนี้ ได้แก่ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ไลเปส โปรติเอสและไฟเตส โดยนำเชื้อราที่เก็บไว้ในข้อ 1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร yeast extract -glucose medium บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วใช้ cork borer เจาะแผ่นใยเชื้อราบริเวณขอบโคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อไปวางบนอาหารที่ใช้ทดสอบ

2.1 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ปลูกเชื้อราลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar ซึ่งมีองค์ประกอบของ แป้งที่ละลายน้ำ 2 กรัม beef extract 3 กรัม เพปโทน 5 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำการรด iodine reagent ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที สังเกตและบันทึกเชื้อที่สามารถสร้างบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนี

2.2 เอนไซม์ไลเปส

ปลูกเชื้อราลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 agar ซึ่งมีองค์ประกอบของ เพปโทน 10 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัม Tween 80 10 มิลลิลิตร วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน บันทึกเชื้อที่สามารถสร้างบริเวณตกตะกอนของแคลเซียมรอบโคโลนี

2.3 เอนไซม์โปรติเอส

ปลูกเชื้อราลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Casein agar ซึ่งมีองค์ประกอบของเคซีน 10 กรัม ซีสต์ สกัด 5 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน บันทึกเชื้อที่สามารถสร้างบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนี

2.4 เอนไซม์ไฟเตส

ปลูกเชื้อราลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของกรดไฟติก 5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.5 กรัม $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.01 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 0.78 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน บันทึกเชื้อที่สามารถสร้างบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนี

นำผลที่ได้มาจัดกลุ่มความสามารถของเชื้อเพื่อเป็นข้อมูลต่อไป

3. การศึกษาความสามารถผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *T. lanuginosus*

นำเชื้อราทั้ง 89 สายพันธุ์มาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์โดยใช้ขังข้าวโพดเป็น วัตถุคิบ โดยการเพาะเลี้ยงแบบ solid state และแบบ submerge culture เอนไซม์ที่ศึกษาได้แก่ เอนไซม์ไซลานเนส และอะไมเลส

3.1 การเตรียมสับสเตรด

นำขังข้าวโพดแห้งมาสับให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนนำไปบดด้วยเครื่อง grinding mill จากนั้น นำมาร่อนแยกด้วยตะแกรงขนาด 5 mesh และนำไปอบให้แห้งที่ 70 องศาเซลเซียส 1 คืน แล้วเก็บไว้ใช้ในการหมักต่อไป ส่วนขังข้าวโพดแช่ค้างเตรียมโดยนำขังข้าวโพดที่ได้ดังกล่าวมาแช่ด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยน้ำเปล่าหลายๆ ครั้ง จนกระทั่งน้ำล้างมีพีเอชเป็นกลาง จากนั้นนำไปอบที่ 70 องศาเซลเซียส 1 คืนแล้วเก็บไว้ใช้ต่อไป

3.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อรามาเพาะเลี้ยงบนอาหาร yeast extract-glucose medium บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วใช้ cork borer เจาะเส้นใยเชื้อราจากอาหารเลี้ยงเชื้อไปวางบนอาหารวุ้นที่มีรำข้าวสาลี 2.8 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเติมสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใช้เข็มเจาะเชื้อที่ผ่านเปลวไฟมาเชื้อแล้วเจาะเชื้อให้สปอร์กระจาย นำสปอร์ที่ได้ไปแยกด้วยสาลีที่ปลอดเชื้อเพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นเส้นใยออกไป นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemocytometer และเจือจางให้มีสปอร์ 10^5 - 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.3 การเพาะเลี้ยง

3.3.1 การเพาะเลี้ยงแบบแห้ง (solid state culture)

ชั่งข้าวโพดทั้งที่ผ่านการแช่ด่างและไม่ผ่านการแช่ด่าง 5 กรัม รำข้าวสาลี 5 กรัม และแกลบ 2 กรัม ใส่ลงไปในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 8 x 12 นิ้ว ปากถุงครอบด้วยพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 55 มิลลิเมตร ปรับให้มีความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แล้วปิดปากถุงด้วยจุกสาลีเพื่อป้องกันการปนเปื้อนหลังการฆ่าเชื้อ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใส่กล้าเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ขยำถุงพลาสติกเพื่อให้สปอร์ของเชื้อกระจายอยู่ในอาหารอย่างทั่วถึง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดสกัดเอนไซม์ด้วยการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 36 มิลลิลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที ทำการกรองด้วยกระดาษกรองแล้วนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.3.2 การเพาะเลี้ยงแบบอาหารเหลว (submerge culture)

เพาะกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในอาหารเหลว 15 มิลลิลิตร ที่มีองค์ประกอบดังนี้ ข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร Tween 80 0.3 มิลลิลิตรต่อลิตร ยีสต์สกัด 15 กรัมต่อลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำ culture broth มากรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้สูงในอาหารแบบ solid state และใน submerge culture เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการทนกรดและทนร้อนต่อไป

4. การทดสอบความสามารถในการทนกรดของเอนไซม์ไซลานเนส

นำเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มาตรวจสอบผลของพีเอชต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ย่อยไซลานที่ไม่ละลายน้ำ โดยนำตัวอย่าง crude enzyme มาบ่มกับสารละลายซिटเรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ได้ดีและทนกรดได้ดี โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ได้ดีในการเพาะเลี้ยงแบบ solid state และใน submerge culture เพื่อทำการทดสอบต่อไป

5. การทดสอบความสามารถในการทนร้อนของเอนไซม์ไซลานเนส

นำเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มาตรวจสอบผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ย่อยไซลานที่ไม่ละลายน้ำ โดยนำตัวอย่าง crude enzyme มาบ่มกับโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และตรวจสอบหาเอนไซม์ที่เหลืออยู่ ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ได้ดีและทนร้อนได้ดี โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ได้ดีโดยใช้การเพาะเลี้ยงแบบ solid state 1 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงใน submerge culture 1 สายพันธุ์เพื่อทำการทดสอบต่อไป

6. ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากเชื้อรา *T. lanuginosus*

6.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและความคงทนของเอนไซม์

6.1.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

หากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยบ่ม crude enzyme ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ 0.5 มิลลิลิตร สารละลาย insoluble xylan 1 เปอร์เซ็นต์ ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 ที่อุณหภูมิ 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 และ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา

10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นทันทีแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส

6.1.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์

บ่ม crude enzyme ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 และ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ย่อยไซแลนไม่ละลายน้ำที่เหลือ

6.2 ศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานและความคงทนของเอนไซม์

6.2.1 ศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่เจือจางอยู่ในบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร คือ ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.5 แอซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4, 4.5 และ 5 โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6 และ 7 และทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 8 และ 9 มาบ่มกับสารละลาย insoluble xylan 1 เปอร์เซ็นต์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์นั้น ๆ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีจากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส

6.2.2 ศึกษาผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์

นำเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาบ่มกับบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร คือ ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.5 แอซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4, 4.5 และ 5 โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6 และ 7 ทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 8 และ 9 และ ไกลซีนโซเดียมไฮโดรไซด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 10 และ 11 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเอนไซม์มาหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไซแลนไม่ละลายน้ำที่เหลือ

6.3 ทดสอบความสามารถของเอนไซม์ไซแลนในการย่อยซังข้าวโพด

นำ crude enzyme ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร บ่มกับซังข้าวโพด 50 มิลลิกรัมที่อยู่ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยซังข้าวโพดด้วยวิธี DNS method

6.4 ทดสอบความสามารถของเอนไซม์ไซแลนในการยิดเกาะ

6.4.1 การเตรียมสับสเตรตที่ใช้ในการยิดเกาะ

1. ซังข้าวโพด นำซังข้าวโพดมาบดด้วยเครื่องบด grinding mill จนมีขนาด 5 mesh แช่น้ำกลั่นไว้ 1 คืน ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง แล้วนำไปอบจนแห้ง
2. แป้งมันสำปะหลัง นำแป้งมันสำปะหลังมาแช่น้ำกลั่นไว้ 1 คืน กรอง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง แล้วนำไปอบจนแห้ง
3. เซลลูโลส นำผงเซลลูโลสจากไม้ spruce (Fluka) แช่น้ำกลั่นไว้ 1 คืน จากนั้นกรองส่วนใสทิ้งแล้วล้างผงเซลลูโลส แล้วนำไปอบจนแห้ง
4. ไซแลน ซัง oat spelt xylan (Sigma) 10 กรัมมาละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตรแล้วปรับพีเอชให้เป็น 10 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ คนทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นแยกส่วนที่ละลายและไม่ละลายออกจากกันโดยใช้ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปปรับพีเอชให้เป็น 7 ด้วยสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ แล้วเก็บไว้เป็นไซแลนส่วนที่ละลายน้ำในที่เย็น ส่วนของแข็งที่ได้นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชให้เป็น 7 นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นล้างตะกอนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำนำไปล้างหลายๆ ครั้ง นำไปอบให้แห้งที่ 70 องศาเซลเซียส 1 คืน

6.4.2 การตรวจสอบการยึดเกาะกับสับสเตรตที่ไม่ละลายน้ำ

นำ crude enzyme มาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 ให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 50 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรแล้วเติมซังข้าวโพด 5 กรัม นำมาเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเอาส่วนใสไป วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะตามสมการ

$$\% \text{ Adsorption} = [(O-R)/O] \times 100$$

เมื่อ R คือ กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสที่เหลืออยู่ในส่วนใส

O คือ กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเริ่มต้น

7. ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. lanuginosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยซังข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร tween 80 0.3 มิลลิลิตรต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน 15 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้แก่ ยีสต์สกัดและเนื้อสกัด ในสถานะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สกัดเอา crude enzyme มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ

8. ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสแบบอาหารเหลวโดยใช้ซังข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ

8.1 การออกแบบการทดลอง

การทดลองเป็นการศึกษาเพื่อหาชนิดของสารอาหารที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส โดยในการศึกษานี้ได้ใช้รูปแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) โดยแบ่งปัจจัยออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้ คือ ระดับสูง (High) ระดับปานกลาง (Intermediate) และระดับต่ำ (Low) ซึ่งสามารถกำหนดค่าของปัจจัยต่าง ๆ ได้ดังตารางที่ 5 สามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 27 การทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งแต่ละการทดลองทำซ้ำ 2 ครั้ง

ตารางที่ 5 การกำหนดช่วงของปัจจัยที่ต้องการนำมาศึกษาโดยวิธี Central Composite Design

ปัจจัยที่ต้องการศึกษา		ระดับ		
X_i		-1	0	1
X_1	ชั่งข้าวโพด (กรัมต่อลิตร)	10	20	40
X_2	ยีสต์สกัด (กรัมต่อลิตร)	10	20	40
X_3	KH_2PO_4 (กรัมต่อลิตร)	0	5	10
X_4	Tween 80 (มิลลิลิตรต่อลิตร)	0	0.3	1

ตารางที่ 6 แบบการทดลองในการผลิตเอนไซม์โดยใช้ Central Composite Design

การทดลอง	ชั่งข้าวโพด (X_1)	ยีสต์สกัด (X_2)	KH_2PO_4 (X_3)	Tween 80 (X_4)
1	10	10	0	0
2	10	10	0	1
3	10	10	10	0
4	10	10	10	1
5	10	40	0	0
6	10	40	0	1
7	10	40	10	0
8	10	40	10	1
9	10	20	5	0.3
10	40	10	0	0
11	40	10	0	1
12	40	10	10	0
13	40	10	10	1
14	40	40	0	0
15	40	40	0	1
16	40	40	10	0
17	40	40	10	1

ตารางที่ 6 (ต่อ)

การทดลอง	ซังข้าวโพด (X_1)	ยีสต์สกัด (X_2)	KH_2PO_4 (X_3)	Tween 80 (X_4)
18	40	20	5	0.3
19	20	10	5	0.3
20	20	40	5	0.3
21	20	20	0	0.3
22	20	20	10	0.3
23	20	20	5	0
24	20	20	5	1
25	20	20	5	0.3
26	20	20	5	0.3
27	20	20	5	0.3

8.2 เพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้จากข้อ 4 เพื่อผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสแบบ submerge culture โดยทำการเพาะเลี้ยงตามแบบการทดลองที่ได้ออกแบบไว้ทั้ง 27 การทดลอง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเอนไซม์ และนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรไลส

8.3 นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้การหาสมการถดถอยแบบพหุคูณ (multiple regression) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์และปัจจัยที่นำมาศึกษา และนำไปทำนายค่าของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดโดยใช้วิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) โดยใช้โปรแกรม SPSS

9. การวิเคราะห์

9.1 การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนส

9.1.1 สารเคมี

สารละลายไซแลน โดยนำ oat spelt xylan (Sigma) 1 กรัม มาต้มในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จนกระทั่งเริ่มเดือดจากนั้นแยกส่วนที่ละลายและไม่ละลายออกจากกัน โดยการเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่ละลายน้ำเก็บไว้เป็นสับสเตรตส่วนที่ละลายน้ำที่มีความเข้มข้น 0.89 เปอร์เซ็นต์ (soluble xylan) ส่วนตะกอนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน ซึ่งตะกอนไซแลน 1 กรัม แล้วนำมาละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้เป็นสับสเตรตส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble xylan)

9.1.2 การวิเคราะห์

(1) หากกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายน้ำตาลไซโลสมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 3,5 dinitrosalicylic acid ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นทันทีแล้วเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน

(2) ปิเปตสารละลายสับสเตรต 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบและอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(3) เมื่อครบเวลา นำเอนไซม์ที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายสับสเตรตในข้อ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเช่นเดียวกับการหากราฟมาตรฐาน ในกรณีที่สับสเตรตเป็นไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

(4) ทำหลอดควบคุม โดยเติมสารละลาย 3,5 dinitrosalicylic acid ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเช่นเดียวกับการหากราฟมาตรฐาน

(5) การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)} = \frac{(RS_{10} - RS_0) \times 2 \times \text{dilution factor}}{\text{M.W. of xylose} \times t}$$

เมื่อ RS_{10} คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ภายหลังจากเอนไซม์เกิดกิจกรรม

RS_0 คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากหลอดควบคุม

t คือ เวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรต (10 นาที)

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ไซลานเนสคือปริมาณเอนไซม์ซึ่งสามารถย่อยสับสเตรตให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเทียบเท่ากับน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ หรือเท่ากับ 16.67 nkat

9.2 การวิเคราะห์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยวิธี Iodine Method (Nguyen, 2000)

(1) หากราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายแป้งที่มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายไอโอดีนปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 6.5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณแป้งมาตรฐาน

(2) เตรียมสารละลายแป้งเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ในโซเดียมแอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 นำไปหว่านแยกเอาเฉพาะส่วนที่ละลายเพื่อใช้เป็นสับสเตรต ปิเปตสารละลายแป้ง 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มีโซเดียมแอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 1 มิลลิลิตร อุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(3) เมื่อครบเวลา นำเอนไซม์ที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยโซเดียมแอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายสับสเตรตในข้อ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แบ่งสารละลายที่ได้มาใส่หลอดใหม่ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นหาปริมาณแป้งที่เหลือด้วยวิธีเช่นเดียวกับการหากราฟมาตรฐาน

(4) ทำหลอดควบคุม โดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย สับสเตรต 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในโซเดียมแอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายที่ได้มาใส่หลอดใหม่ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นหาปริมาณแป้งที่เหลือด้วยวิธี เช่นเดียวกับการหากราฟมาตรฐาน

(5) การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)} = \frac{(S_s - S_0) \times V \times 3 \times \text{dilution factor}}{t}$$

เมื่อ S_s คือ ปริมาณแป้งที่วัดได้ภายหลังจากเอนไซม์เกิดกิจกรรม

S_0 คือ ปริมาณแป้งที่วัดได้จากหลอดควบคุม

V คือ ปริมาตรทั้งหมดในการทดลอง ซึ่งเท่ากับ 4 มิลลิลิตร

t คือ เวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรต (5 นาที)

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือปริมาณเอนไซม์ซึ่งสามารถย่อยแป้ง ที่ละลายน้ำ 1 มิลลิกรัมภายในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่ทดสอบ

ผลและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อาหารสัตว์ของเชื้อรา *T. lanuginosus*

สำหรับเชื้อรา *T. lanuginosus* จำนวน 89 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษานี้ได้ทำการทดสอบความสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ไลเปส โปรติเอสและไฟเตสบนอาหารแข็งที่มีแหล่งสับสเตรตของเอนไซม์เป็นส่วนประกอบบนจานเพาะเลี้ยง พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ มี 80 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและ 39 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ แต่ไม่พบสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไฟเตส (ตารางผนวกที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่พบว่า เชื้อรา *T. lanuginosus* สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Petrova *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2000, 2002; Rubinder *et al.*, 2002; Kunamneni *et al.*, 2005) เอนไซม์ไลเปส (Liu *et al.*, 1972, 1973a, 1973b, 1973c) และเอนไซม์โปรติเอส (Ong *et al.*, 1972) แต่ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Berka *et al.* (1998) ที่ว่าเชื้อรา *T. lanuginosus* สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกศึกษาความสามารถของเชื้อรา *T. lanuginosus* จำนวน 89 สายพันธุ์ในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและแอลฟาอะไมเลสด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ 2 แบบ คือ solid state และ submerge culture โดยใช้ขี้ข้าวโพดเป็นส่วนประกอบของวัสดุหมัก

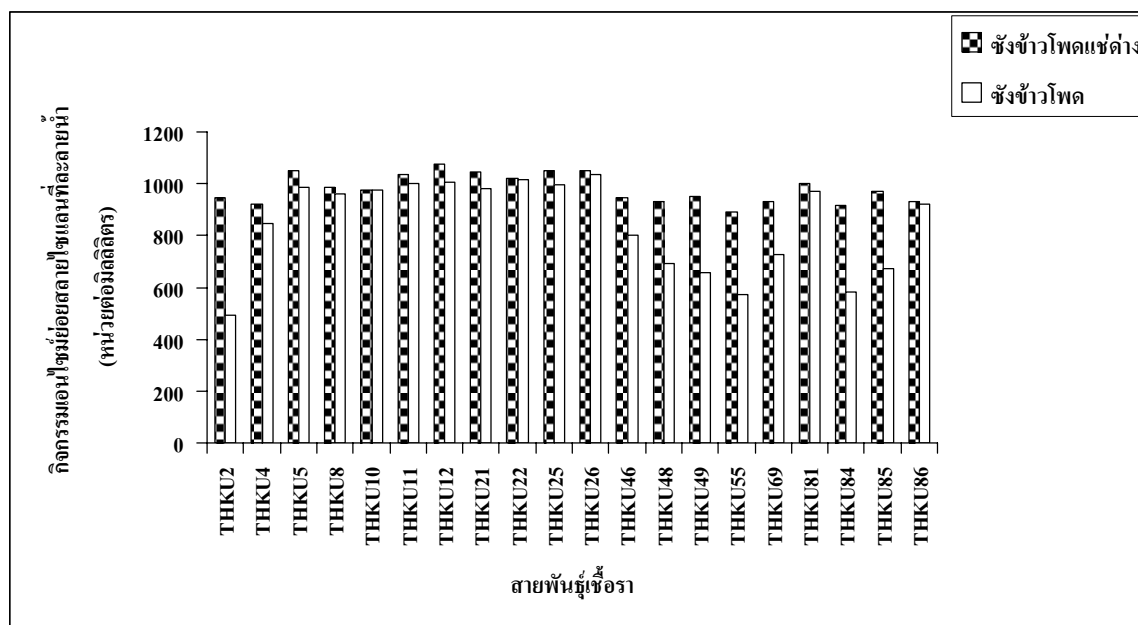
1.1 เอนไซม์ไซลานเนส

การศึกษาเอนไซม์ไซลานเนสที่ผลิตจากเชื้อ *T. lanuginosus* ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์กับไซแลนที่ละลายน้ำ (soluble xylan) และไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble xylan) โดยวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS method (1959)

1.1.1 การเพาะเลี้ยงแบบ solid state

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราบนวัสดุหมักที่ประกอบด้วยขี้ข้าวโพด 5 กรัม รำข้าวสาลี 5 กรัมและแกลบ 2 กรัม ที่ปรับความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ โดยผลิตเปรียบเทียบระหว่าง ขี้ข้าวโพดและขี้ข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่าง เป็นเวลา 5 วัน แล้วสกัดเอา crude enzyme มาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ละลายน้ำ พบว่า เชื้อราชอบร้อน *T. lanuginosus* ส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีในอาหารที่ใช้ขี้ข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่างเป็นวัสดุหมัก ผลการทดลองแสดงใน

ตารางผนวกที่ 2 มีเชื้อรา *T. lanuginosus* จำนวน 20 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำได้สูง (ประมาณ 900 หน่วยต่อมิลลิกรัม) ในอาหารที่ใช้ขี้ข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่างเป็นวัตถุดิบ ซึ่งได้แก่ เชื้อรารหัส THKU2, THKU4, THKU5, THKU8, THKU10, THKU11, THKU12, THKU21, THKU22, THKU25, THKU26, THKU46, THKU48, THKU49, THKU55, THKU69, THKU81, THKU84, THKU85 และ THKU86 ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำจากเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state โดยใช้ขี้ข้าวโพดหรือขี้ข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่างเป็นวัสดุหมัก

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เชื้อรา *T. lanuginosus* อย่างไรก็ดีตาม ชนิดของวัสดุหมัก ซึ่งในที่นี้ได้แก่ ขี้ข้าวโพด ก็มีผลเช่นเดียวกัน โดยจะเห็นได้ว่า จากเชื้อราจำนวน 20 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงในอาหารที่ใช้ขี้ข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่างนั้น ยังคงมีเชื้อราเพียง 12 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนไซม์ได้ดีในอาหารที่ใช้ขี้ข้าวโพด ส่วนอีก 8 สายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ได้ลดลง ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ THKU2, THKU46, THKU48, THKU49, THKU55, THKU69, THKU84 และ THKU85 ดังแสดงในภาพที่ 5

จากผลการศึกษาความสามารถผลิตเอนไซม์ไขมันของเชื้อรา *T. lanuginosus* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state และวัดกิจกรรมเอนไซม์ต่อไขมันที่ละลายน้ำ พบว่า THKU12 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1,075 หน่วยต่อมิลลิกรัม ซึ่งคิดเป็น 3,225 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง

ซึ่งสูงกว่าเชื้อรา *T. lanuginosus* D₂W₃ ที่ใช้ขังข้าวโพด 5 กรัมต่อลิตรเป็นวัสดุหมัก โดยมีความชื้นเริ่มต้น 80 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 2,480 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง แต่น้อยกว่าเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้จากการใช้ฟางข้าวฟางเป็นวัสดุหมัก ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 10,145 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง (Sonia *et al.*, 2005)

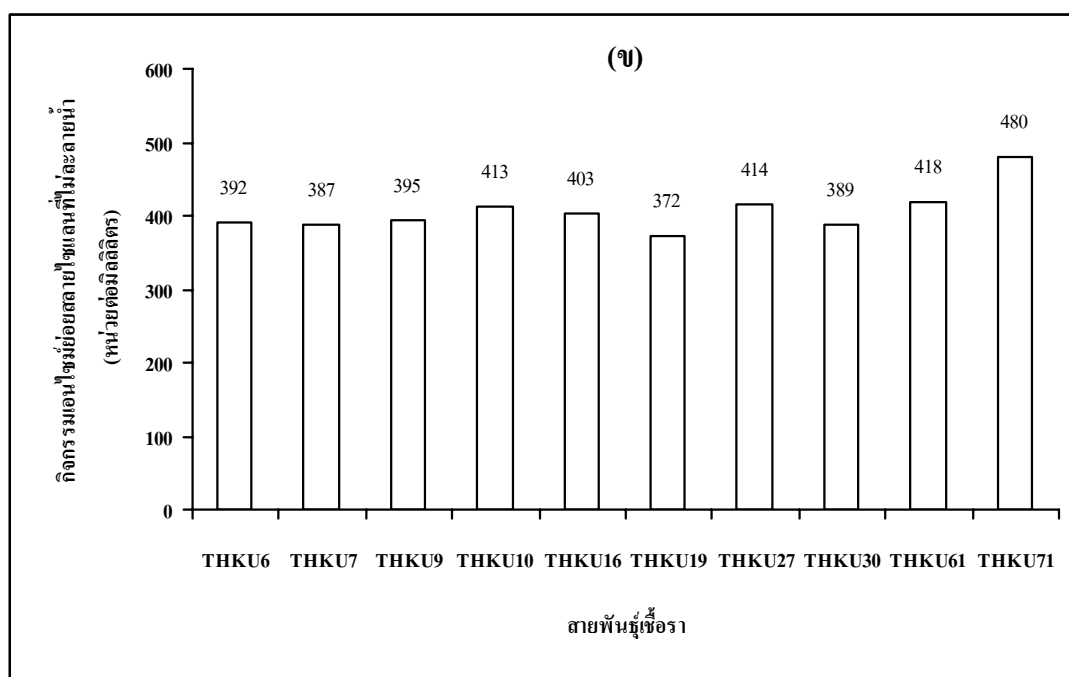
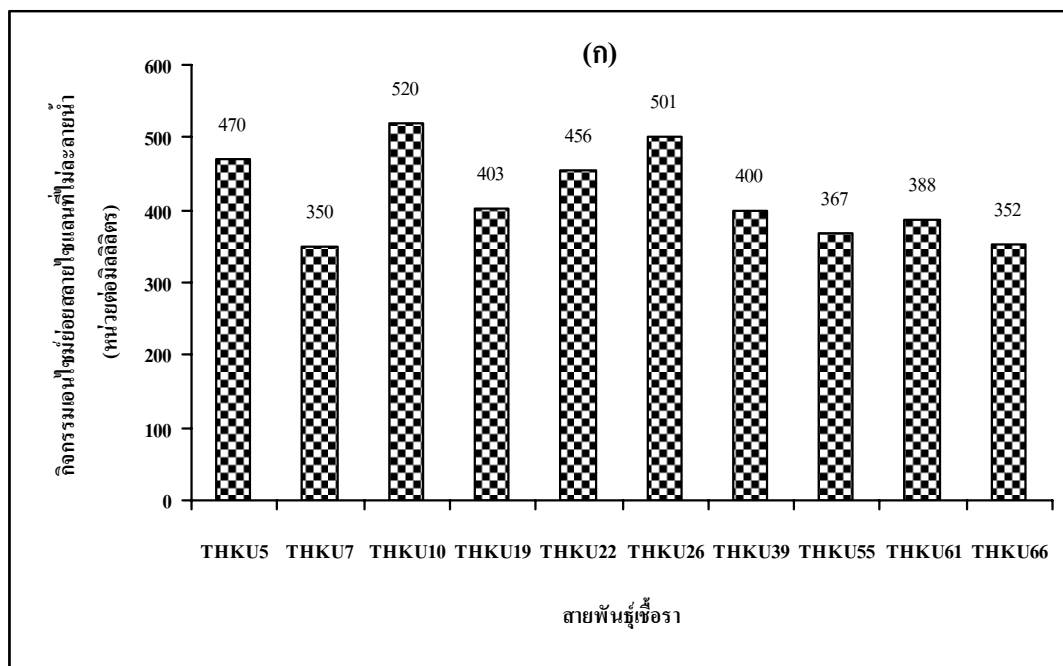
เมื่อพิจารณากิจกรรมการย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble xylan degrading activity) พบว่าเชื้อรา *T. lanuginosus* ทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซมน้อยกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ละลายน้ำ ยกเว้นสายพันธุ์ TISTR3645, THKU6 และ THKU44 ผลการทดลองแสดงในตารางผนวกที่ 3 โดยเฉพาะสายพันธุ์ TISTR3645 เป็นสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้ดีทั้งในอาหารที่ใช้ขังข้าวโพดและขังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่าง ส่วนสายพันธุ์ THKU6 และ THKU44 เป็นสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้ดีเฉพาะในอาหารที่ใช้ขังข้าวโพดเป็นส่วนประกอบของวัสดุหมัก

เชื้อรา *T. lanuginosus* ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้สูงมากกว่า 370 หน่วยต่อมิลลิกรัม ในอาหารที่ใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่างเป็นวัตถุดิบมี 10 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อรา รหัส THKU5, THKU7, THKU10, THKU19, THKU22, THKU26, THKU39, THKU55, THKU61 และ THKU66 (ภาพที่ 6ก) ซึ่งใน 10 สายพันธุ์นี้มี 3 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงในอาหารที่ใช้ขังข้าวโพดด้วย ซึ่งได้แก่ THKU7, THKU10 และ THKU61 ในขณะที่ในอาหารที่ใช้ขังข้าวโพดมีเชื้อรา 10 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้สูงในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ได้แก่ เชื้อรา รหัส THKU6, THKU7, THKU9, THKU10, THKU16, THKU19, THKU27, THKU30, THKU61 และ THKU71 (ภาพที่ 6ข)

เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนละลายน้ำได้ดีทุกสายพันธุ์นั้น ไม่ได้เป็นสายพันธุ์ที่ย่อยไซแลนไม่ละลายน้ำได้ดี พบว่า จากเชื้อรา 20 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ละลายน้ำได้นั้น มีเพียง 5 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ THKU5, THKU10, THKU22, THKU26 และ THKU55 เป็นสายพันธุ์ที่ยังคงมีกิจกรรมต่อไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้ดีด้วย

สำหรับเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้ต่ำ (น้อยกว่า 50 หน่วยต่อมิลลิกรัม) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่างมี 5 สายพันธุ์ ได้แก่ THKU4, THKU23, THKU24, THKU53 และ THKU88 ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ขังข้าวโพดนั้นมี

8 สายพันธุ์ ได้แก่ THKU2, THKU14, THKU36, THKU49, THKU55, THKU56, THKU74 และ THKU88



ภาพที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำจากเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state โดยใช้ขี้ข้าวโพดที่ผ่านการแช่ต่าง (ก) และขี้ข้าวโพด (ข) เป็นวัสดุหมักร่วมกับรำข้าวสาลีและแกลบในอัตราส่วน 5:5:2 กรัม เป็นเวลา 5 วัน

อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ศึกษานี้มีส่วนผสมระหว่าง ชังข้าวโพดและรำข้าวสาลี ดังนั้นการผลิตเอนไซม์อาจเป็นผลมาจากไซเลนที่มีอยู่ในรำข้าวสาลี ดังนั้น เพื่อเป็นการยืนยันความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ระหว่างชังข้าวโพดและชังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ ต่าง จึงได้ใช้ยีสต์สกัด 1.75 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนรำข้าวสาลี จากผลการทดลองพบว่า เชื้อรา *T. lanuginosus* สามารถใช้ชังข้าวโพดเพื่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ แต่กิจกรรมของ เอนไซม์ลดลงประมาณครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับการใช้รำข้าวสาลี ดังแสดงในตารางที่ 7 ทั้งนี้เนื่องจาก รำข้าวสาลีนอกจากทำหน้าที่เป็นแหล่งไนโตรเจนแล้วยังมีไซเลนเป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นสาร เหนียวนำการสร้างเอนไซม์ได้

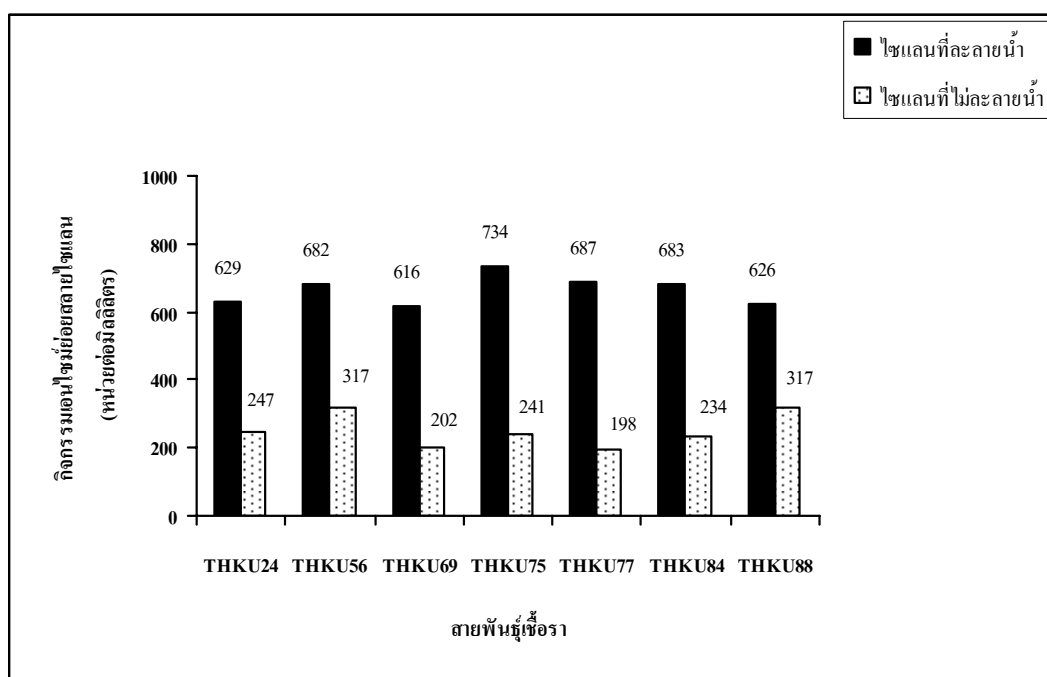
ตารางที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไซเลนที่ไม่ละลายน้ำจากเชื้อรา *T. lanuginosus* ที่เพาะเลี้ยงแบบ solid state บนวัสดุหมักที่ประกอบด้วยชังข้าวโพดกับรำข้าวสาลีหรือยีสต์สกัด

วัตถุดิบที่ใช้	สายพันธุ์เชื้อรา	แหล่งไนโตรเจน	
		รำข้าวสาลี	ยีสต์สกัด
		กิจกรรมเอนไซม์ย่อยไซเลนที่ไม่ละลายน้ำ	
		(หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
ชังข้าวโพดแช่ต่าง	THKU 5	470	219
	THKU10	520	232
	THKU19	403	292
	THKU22	456	241
	THKU26	501	248
ชังข้าวโพด	THKU10	413	281
	THKU16	403	250
	THKU27	414	316
	THKU61	418	205
	THKU71	480	337

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. lanuginosus* บนอาหารแบบ solid state โดยใช้ขี้ังข้าวโพดและขี้ังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่างเป็นวัสดุหมักนั้น พบว่าเชื้อรา *T. lanuginosus* บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ไลลาเนสได้ดีทั้งในอาหารที่มีขี้ังข้าวโพดและขี้ังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่าง ขณะที่เชื้อราบางสายพันธุ์นั้นสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ใช้ขี้ังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่างเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อรา *T. lanuginosus* บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenol oxidase) ที่สามารถย่อยลิกนินได้ (Astarci, 2003) จึงมีผลทำให้เชื้อราเจริญและใช้ขี้ังข้าวโพดเป็นสับสเตรตสำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยไซเลนได้ ส่วนการแช่ขี้ังข้าวโพดด้วยด่างนั้นเป็นการสกัดเอาลิกนินซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ขี้ังข้าวโพดออกไป ทำให้เชื้อราสามารถใช้ไซเลนได้ง่ายกว่าอาหารที่ใช้ขี้ังข้าวโพด และนอกจากนี้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ยังขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์เชื้อรา

1.1.2 การเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture

เมื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยไซเลนของเชื้อรา *T. lanuginosus* จำนวน 89 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture ที่ประกอบด้วยขี้ังข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตรและ Tween 80 0.3 มิลลิลิตรต่อลิตร ภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เมื่อสกัดเอา crude enzyme ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไซเลนที่ละลายน้ำและไซเลนที่ไม่ละลายน้ำ ผลการทดลองได้แสดงในตารางผนวกที่ 4 พบว่ามีเชื้อรา 20 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไซเลนที่ละลายน้ำได้สูงมากกว่า 600 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้แก่ เชื้อรารหัส THKU8, THKU21, THKU22, THKU24, THKU25, THKU39, THKU45, THKU50, THKU56, THKU64, THKU67, THKU69, THKU71, THKU75, THKU77, THKU83, THKU84, THKU85, THKU86 และ THKU88 โดยใน 20 สายพันธุ์นี้มี 7 สายพันธุ์ ที่มีกิจกรรมย่อยไซเลนที่ไม่ละลายน้ำได้สูงมากกว่า 200 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้แก่ THKU24, THKU56, THKU69, THKU75, THKU77, THKU84 และ THKU88 ดังแสดงในภาพที่ 7

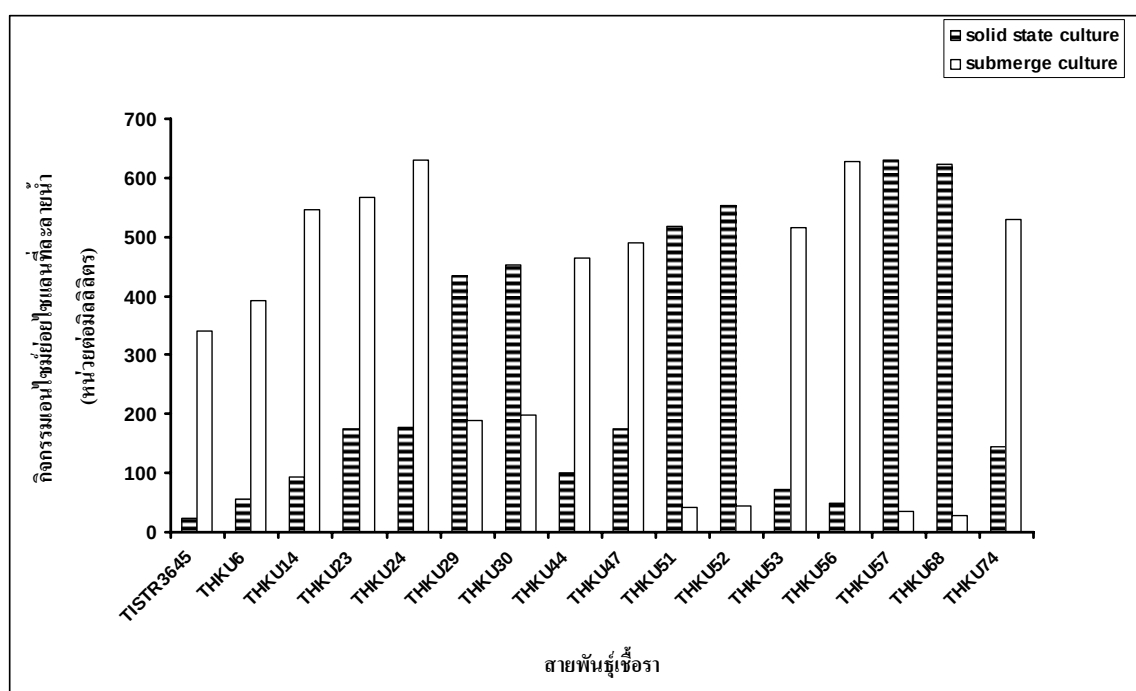


ภาพที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ไชลเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไชลเลนที่ละลายน้ำและไชลเลนที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture ที่ใช้ขังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก

ส่วนสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมย่อยไชลเลนที่ละลายน้ำสูง แต่กลับมีกิจกรรมย่อยไชลเลนที่ไม่ละลายน้ำได้ต่ำมี 13 สายพันธุ์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ THKU75 และ THKU86 ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดนั้นกลับมีกิจกรรมลดลงต่ำมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์จากสายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถในการยึดเกาะไชลเลนส่วนที่ไม่ละลายน้ำได้น้อยกว่า จึงทำให้การย่อยเกิดขึ้นได้ไม่ดี ส่วนสายพันธุ์ THKU4 ซึ่งมีกิจกรรมย่อยไชลเลนที่ไม่ละลายน้ำได้สูง (355 หน่วยต่อมิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ แต่กลับมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไชลเลนที่ละลายน้ำต่ำ

นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อรา 19 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไชลเลนที่ไม่ละลายน้ำได้ต่ำ โดยผลิตได้น้อยกว่า 50 หน่วยต่อมิลลิลิตร สายพันธุ์ดังกล่าวได้แก่ THKU2, THKU5, THKU8, THKU11, THKU14, THKU17, THKU22, THKU26, THKU29, THKU30, THKU51, THKU52, THKU57, THKU60, THKU68, THKU74, THKU79, THKU81 และ THKU89 ซึ่งในนี้มี 4 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไชลเลนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำได้ต่ำ ได้แก่สายพันธุ์ THKU51, THKU52, THKU57 และ THKU68 ดังนั้นความสามารถในการผลิตเอนไซม์อาจเป็นสมบัติของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความสามารถผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *T. lanuginosus* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบ solid state และการเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ พบว่า มีเชื้อรา 16 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ย่อยไฮโดรไลสที่ละลายน้ำใกล้เคียงกันทั้งการเพาะเลี้ยงสองแบบ ซึ่งได้แก่เชื้อรารหัส THKU9, THKU16, THKU17, THKU18, THKU31, THKU39, THKU43, THKU45, THKU50, THKU59, THKU66, THKU71, THKU72, THKU73, THKU85 และ THKU90 นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อรา 6 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ย่อยไฮโดรไลสที่ละลายน้ำสูงเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ THKU29, THKU30, THKU51, THKU52, THKU57 และ THKU68 ในขณะที่มี 10 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ย่อยไฮโดรไลสที่ละลายน้ำสูงเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ TISTR3645, THKU6, THKU14, THKU23, THKU24, THKU44, THKU47, THKU53, THKU56 และ THKU74 ดังแสดงในภาพที่ 8 ดังนั้นความสามารถในการผลิตเอนไซม์ด้วยการเพาะเลี้ยงในแต่ละแบบนี้แตกต่างกันตามสายพันธุ์ของเชื้อรา



ภาพที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไฮโดรไลสที่ละลายน้ำจากเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นวัสดุหมักในการเพาะเลี้ยงแบบ solid state และ submerge culture

จากผลการศึกษาความสามารถผลิตเอนไซม์ไลลาเนสของเชื้อรา *T. lanuginosus* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture และวัดกิจกรรมเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำพบว่า THKU86 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 737 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเชื้อรา *T. lanuginosus* IOC-4145 ที่ใช้ซังข้าวโพด 10 กรัมต่อลิตรเป็นวัสดุหมัก บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนสเท่ากับ 266 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Damaso *et al.*, 2002a) แต่น้อยกว่าเอนไซม์ไลลาเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* DSM 10635 ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนสเท่ากับ 1,180 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ซังข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตรเป็นวัสดุหมัก (Xiong *et al.*, 2004) และน้อยกว่าเอนไซม์ไลลาเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* DSM 5826 ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนสเท่ากับ 1,602 หน่วยต่อมิลลิลิตร (26,700 nkat/ml) เมื่อใช้ซังข้าวโพด 25 กรัมต่อลิตรเป็นวัสดุหมัก (Purkharthofer *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังน้อยกว่าเอนไซม์ไลลาเนส จากเชื้อรา *T. lanuginosus* ATCC 46882 ที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนสเท่ากับ 2,840 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ซังข้าวโพด 20 กรัมต่อลิตรเป็นวัสดุหมัก (Purchart *et al.*, 1999)

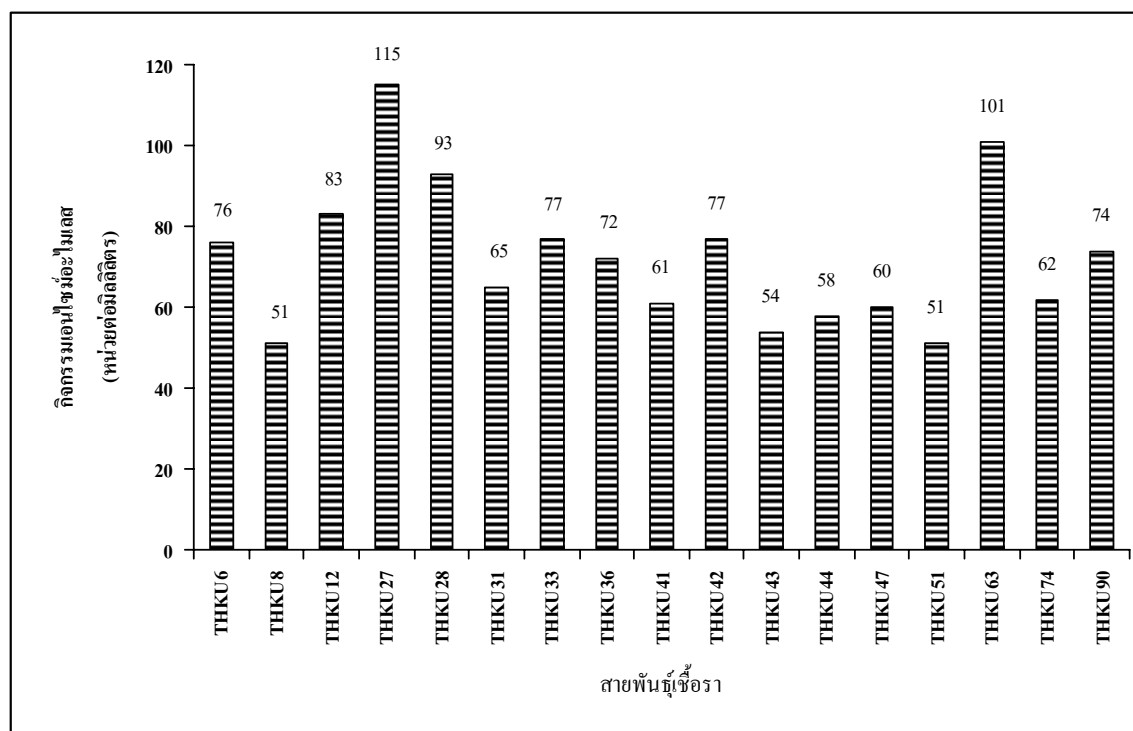
1.2 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของเชื้อรา *T. lanuginosus* ทำโดยนำเอนไซม์สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงทั้งแบบ solid state และ submerge culture มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ด้วยวิธี Iodine method (Nguyen, 2000)

1.2.1 การเพาะเลี้ยงแบบ solid state

เมื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของเชื้อรา *T. lanuginosus* 89 สายพันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงแบบ solid state ผลการทดลองแสดงในตารางผนวกที่ 5 พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีในอาหารที่ใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่างเป็นวัสดุหมัก โดยมีเชื้อราจำนวน 17 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้สูงมากกว่า 50 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้แก่ THKU6, THKU8, THKU12, THKU27, THKU28, THKU31, THKU33, THKU36, THKU41, THKU42, THKU43, THKU44, THKU47, THKU51, THKU63, THKU74 และ THKU90 ดังแสดงในภาพที่ 9 และจากเชื้อรา 17 สายพันธุ์นี้มีเชื้อรา 4 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีในอาหารที่ใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่าง แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ในอาหารที่ใช้ซังข้าวโพด ได้แก่ THKU27, THKU28, THKU31 และ THKU74 โดยเฉพาะ THKU27 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้สูงสุด 115 หน่วยต่อมิลลิลิตรแต่กลับไม่ผลิตเอนไซม์เมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก และใน

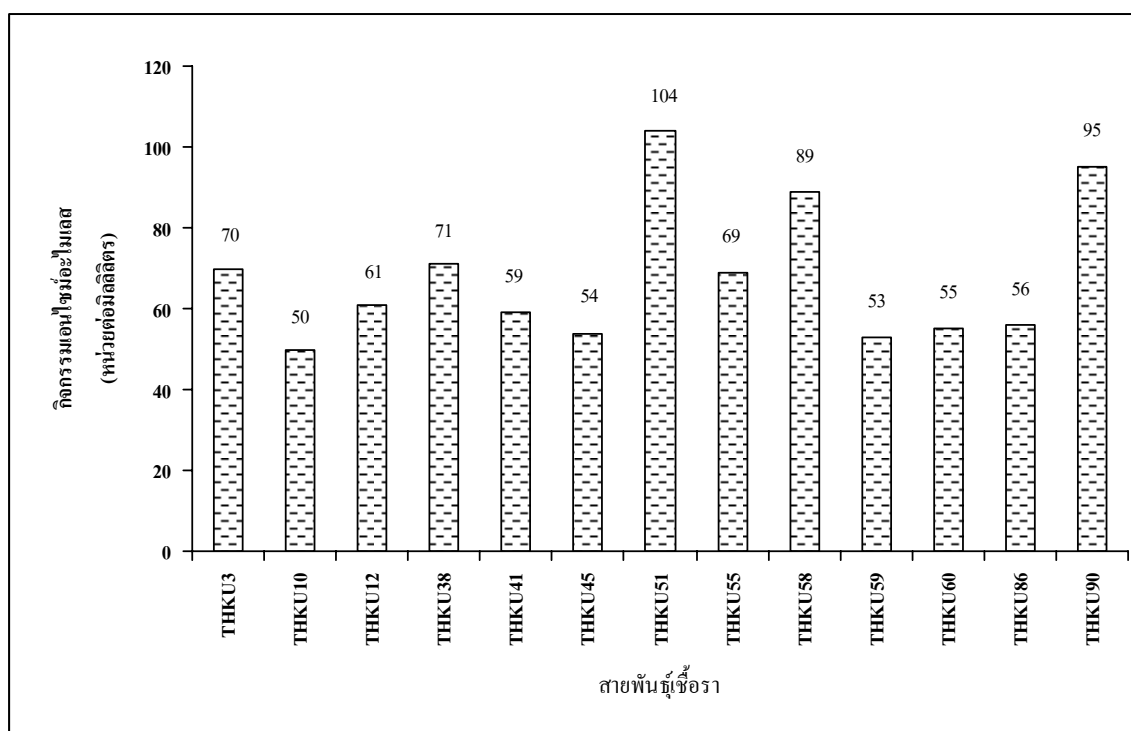
เชื้อรา 17 สายพันธุ์ดังกล่าวมีเชื้อรา 4 สายพันธุ์ ที่ยังคงสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีในอาหารที่ใช้ขังข้าวโพด ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ THKU12, THKU41, THKU51 และ THKU90



ภาพที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อใช้ขังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ต่าง ร้าข้าวสาลีและแกลบในอัตราส่วน 5:5:2 กรัมเป็นวัสดุหมัก เพาะเลี้ยงแบบ solid state ที่มีความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน

ในขณะที่มีเชื้อรา 13 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีในอาหารที่ใช้ขังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก (มากกว่า 50 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ได้แก่ THKU3, THKU10, THKU12, THKU38, THKU41, THKU45, THKU51, THKU55, THKU58, THKU59, THKU60, THKU86 และ THKU90 ดังแสดงในภาพที่ 10 เชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ THKU51 ผลิตได้ 104 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็น 312 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมัก นอกจากนี้มีเชื้อรา 10 สายพันธุ์ที่ไม่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ THKU4, THKU7, THKU9, THKU15, THKU20, THKU50, THKU54, THKU76, THKU82 และ THKU87 การที่เชื้อรา *T. lanuginosus* หลายสายพันธุ์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยขังข้าวโพดอาจมีปริมาณแป้งต่ำ สภาพการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมและอาจขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์เชื้อราสำหรับการผลิตเอนไซม์

แอลฟาอะไมเลสของเชื้อรา *T. lanuginosus* มีรายงานว่าเชื้อรา *T. lanuginosus* ATCC58160 ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีที่สุดเท่ากับ 534 หน่วยต่อกรัมรำข้าวสาลี เมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นวัสดุหมัก ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมคือ ระยะเวลาบ่มเชื้อ 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้น 90 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/w) และอัตราส่วนของน้ำหนักวัสดุหมักต่อปริมาตรฟลาสก์คือ 1:100 และเติมแป้งที่ละลายน้ำ (1 เปอร์เซ็นต์ w/w) และ เปปโตน (1 เปอร์เซ็นต์ w/w) เป็นส่วนประกอบ (Kunamneni *et al.*, 2005)

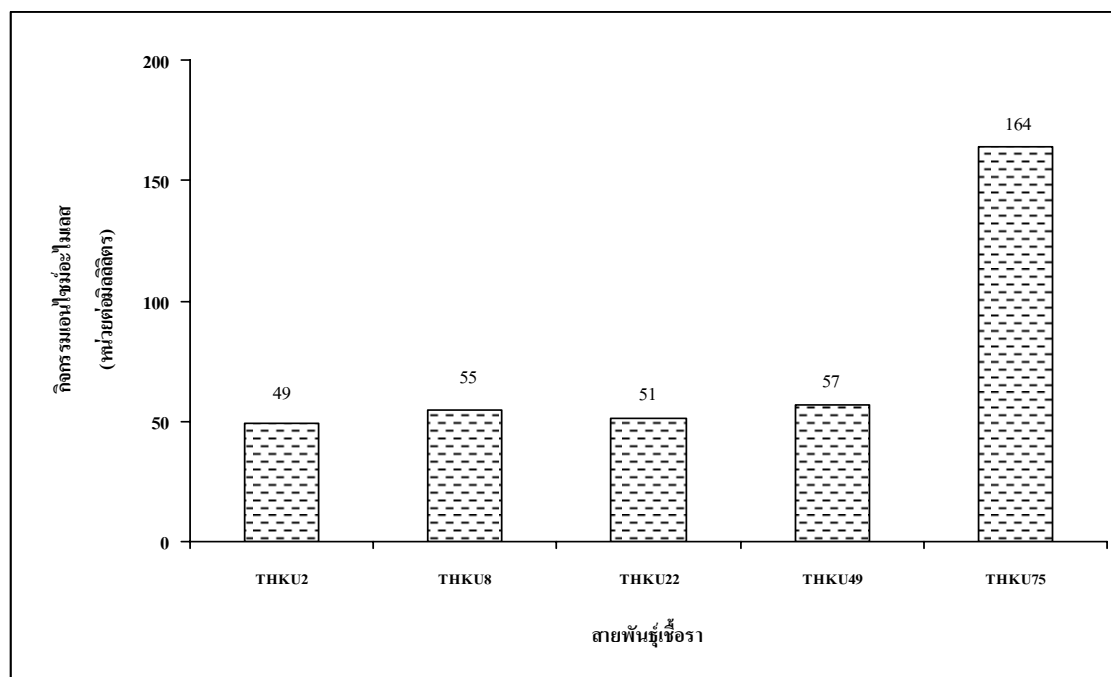


ภาพที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state โดยใช้ซังข้าวโพด รำข้าวสาลีและแกลบในอัตราส่วน 5:5:2 กรัม เป็นวัสดุหมัก ที่มีความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน

1.2.2 การเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture

เมื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของเชื้อรา *T. lanuginosus* 89 สายพันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture ที่มีซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก ผลการทดลองแสดงในตารางผนวกที่ 5 พบว่ามีเชื้อรา 5 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงได้แก่ THKU2, THKU8, THKU22, THKU49 และ THKU75 (ภาพที่ 11) โดยเฉพาะสายพันธุ์ THKU75 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์

แอลฟาอะไมเลสได้สูงสุดเท่ากับ 164 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state ที่ใช้ขังข้าวโพดเป็นแหล่งอาหารนั้น กลับพบว่าสายพันธุ์นี้ไม่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส นอกจากนี้ยังมีเชื้อรา 17 สายพันธุ์ที่ไม่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในอาหารแบบ submerge culture โดยใน 17 สายพันธุ์นี้มี 5 สายพันธุ์ที่ไม่ผลิตเอนไซม์ใน solid state ด้วย ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ THKU7, THKU9, THKU20, THKU82 และ THKU87



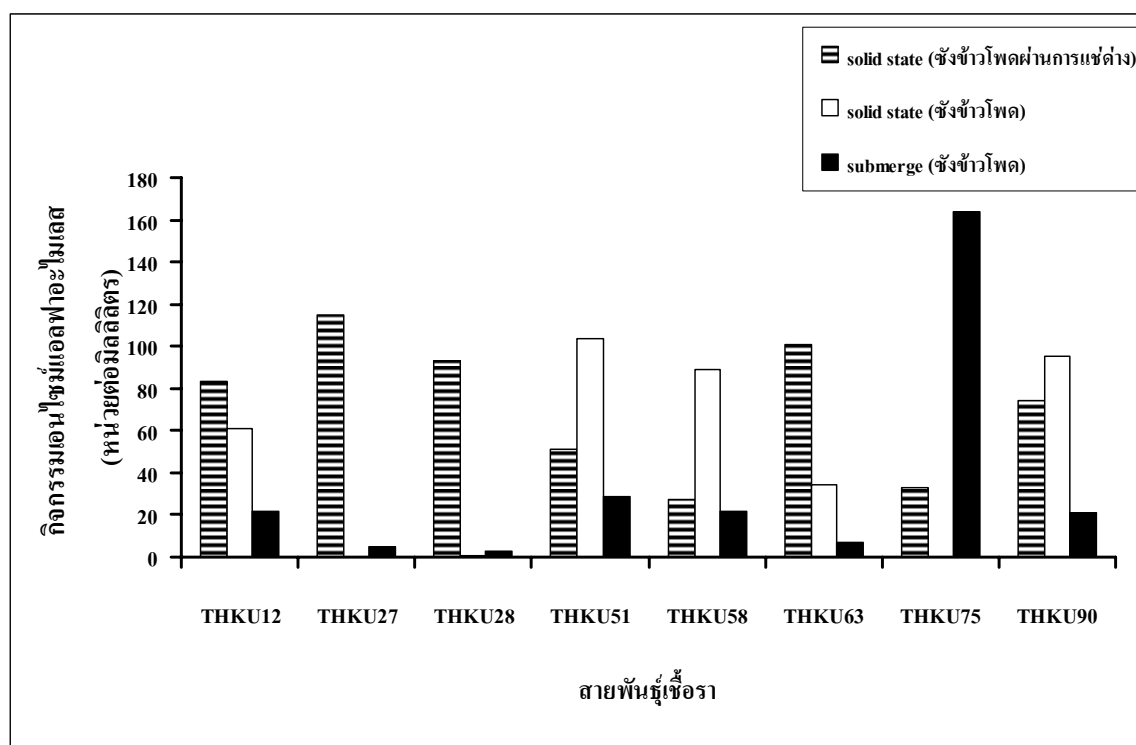
ภาพที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ THKU2, THKU8, THKU22, THKU49 และ THKU75 ที่ใช้ขังข้าวโพดเป็นวัสดุหมักทำการเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture

เมื่อพิจารณาความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของเชื้อรา *T. lanuginosus* 89 สายพันธุ์ ที่ทำการเพาะเลี้ยงแบบ solid state และ submerge culture ที่มีขังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก พบว่าสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดี โดยมีกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับหรือมากกว่า 80 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state มี 7 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ THKU12, THKU27, THKU28, THKU63, THKU51, THKU58 และ THKU90 ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture มีเพียงสายพันธุ์เดียวซึ่งได้แก่ THKU75 ดังแสดงในภาพที่ 12 ซึ่งเป็นคนละสายพันธุ์กับการเพาะเลี้ยงแบบ solid state นอกจากนี้ยังพบว่า THKU75 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่

ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีนั้นก็มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture

สำหรับความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของเชื้อรา

T. lanuginosus โดยเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture ที่มีขังข้าวโพดเป็นวัสดุหมักนี้มีสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 164 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าที่ Nguyen *et al.* (2000) รายงานว่าเชื้อรา *T. lanuginosus* ATCC 34626 ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้สูงสุดเมื่อใช้ maltodextrin เป็นแหล่งคาร์บอนเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 125 หน่วยต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ *T. lanuginosus* ATCC 34626 คือ L-asparagine 0.75 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.15 เปอร์เซ็นต์ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.005 เปอร์เซ็นต์ trace elements 0.1 ml ในขณะที่ Rubinder *et al.* (2002) รายงานว่าการใช้แป้งข้าวโพด 2.1 เปอร์เซ็นต์ คากั่วเหลือง 0.46 เปอร์เซ็นต์ ฟิเอชเรมคันทันที่ 5.8 เหมาะสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลสของเชื้อรา *T. lanuginosus* III51 ที่สุดโดยมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 192 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

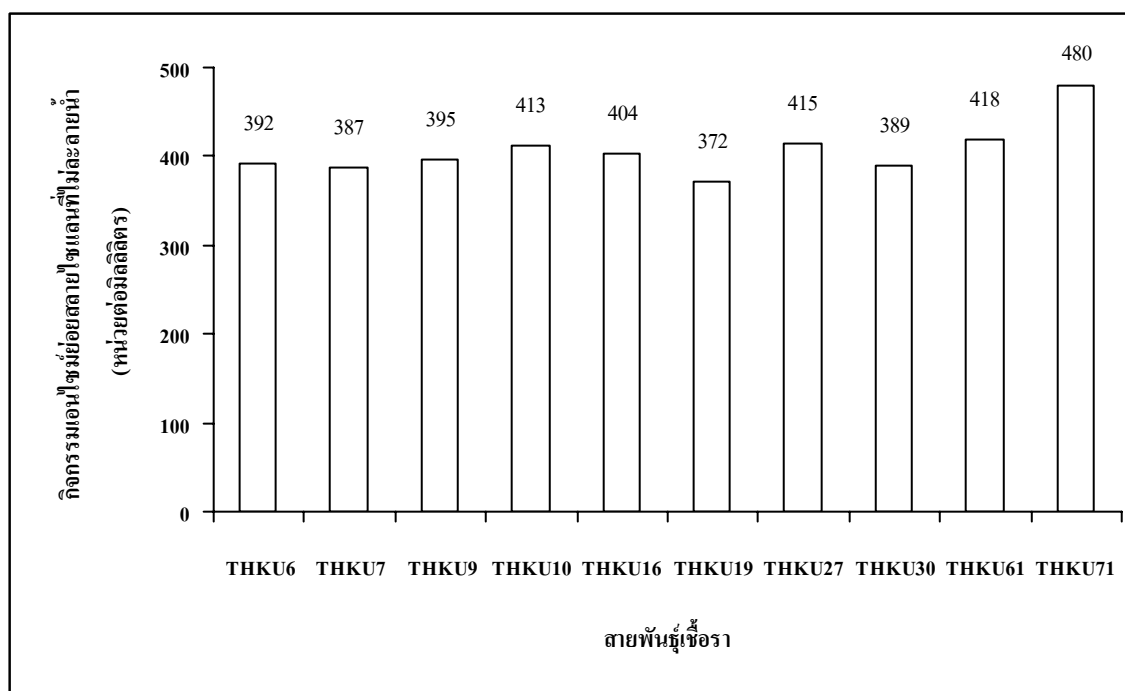


ภาพที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ขังข้าวโพดเป็นวัสดุหมักเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state และ submerge culture

2. ผลการคัดเลือกเชื้อรา *T. lanuginosus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันที่ไม่ละลายน้ำได้สูง

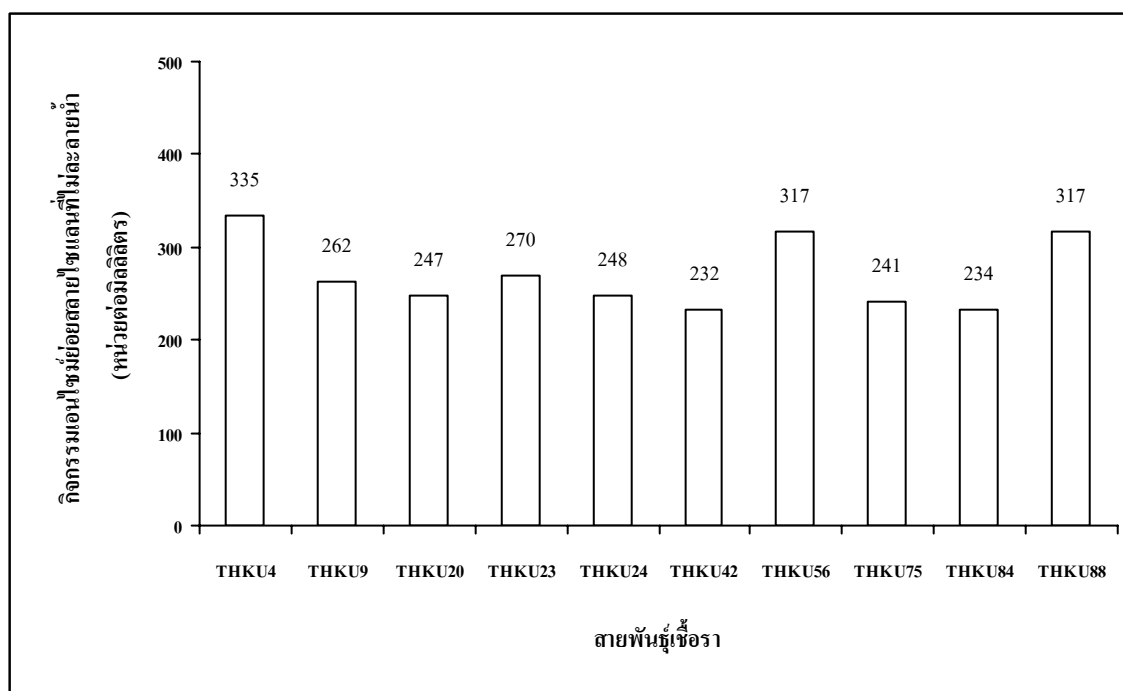
จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อาหารสัตว์ของเชื้อรา *T. lanuginosus* ทั้ง 89 สายพันธุ์นั้น ในกรณีเอนไซม์ไขมันเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state ที่ใช้ขี้ข้าวโพดและขี้ข้าวโพดที่ผ่านการแช่ต่างเป็นวัสดุหมัก แสดงให้เห็นว่าการแช่ขี้ข้าวโพดด้วยต่างมีผลต่อความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *T. lanuginosus* บางสายพันธุ์ แต่เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตจึงเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไขมันได้ดีเมื่อใช้ขี้ข้าวโพด

สำหรับการใช้ไขมันที่ละลายน้ำและไขมันที่ไม่ละลายน้ำเป็นสับสเตรตในการหากิจกรรมของเอนไซม์ไขมันนั้น พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไขมันส่อยไขมันที่ละลายน้ำมีค่าสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไขมันส่อยไขมันที่ไม่ละลายน้ำประมาณ 2 เท่า เกือบทุกสายพันธุ์ ซึ่งคล้ายกับรายงานของ Li *et al.* (2005) ที่รายงานว่าเอนไซม์ไขมันจากเชื้อรา *T. lanuginosus* CBS 288.54 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไขมันส่อยไขมันที่ละลายน้ำสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไขมันส่อยไขมันที่ไม่ละลายน้ำประมาณ 2 เท่า (1,650 และ 728 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากไขมันที่ละลายน้ำสามารถย่อยได้ง่ายกว่าไขมันที่ไม่ละลายน้ำ และความสามารถในการย่อยไขมันที่ละลายน้ำและไขมันที่ไม่ละลายน้ำขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ เมื่อวิเคราะห์ชนิดโปรตีนของ crude enzyme ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยขี้ข้าวโพดและขี้ข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีโปรตีนหลักเพียงชนิดเดียว (ภาพผนวกที่ 3) ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนของเอนไซม์ไขมันส่อยไขมัน ซึ่งมีขนาด 24.9 กิโลดาลตัน โดยเอนไซม์ไขมันส่อยไขมันสามารถย่อยไขมันที่ละลายน้ำและไขมันที่ไม่ละลายน้ำได้ต่างกันตามสมบัติของเอนไซม์ การใช้ไขมันที่ไม่ละลายน้ำเป็นสับสเตรตเพื่อวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไขมันส่อยไขมันมีประโยชน์มาก เนื่องจากในธรรมชาติไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้างของพืชและเนื้อไม้ส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถย่อยไขมันที่ไม่ละลายน้ำได้ดีจึงมีประโยชน์ในการเปลี่ยนไขมันให้เป็นโอเลโอแซคคาไรด์ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อีกมากมาย ดังนั้นจึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อรา *T. lanuginosus* ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไขมันส่อยไขมันที่ละลายน้ำสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้ขี้ข้าวโพดเป็นวัสดุหมักจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ THKU6, THKU7, THKU9, THKU10, THKU16, THKU19, THKU27, THKU30, THKU61 และ THKU71 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไขมันส่อยไขมันเท่ากับ 392, 387, 395, 413, 404, 372, 415, 389, 418 และ 480 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ดังภาพที่ 13) เพื่อทดสอบการทนกรดและทนร้อนของเอนไซม์ต่อไป



ภาพที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งแลนที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ THKU6, THKU7, THKU9, THKU10, THKU16, THKU19, THKU27, THKU30, THKU61 และ THKU71 โดยใช้ขี้ข้าวโพดเป็นวัสดุหมักแบบ solid state culture

ในทำนองเดียวกันได้คัดเลือกเชื้อรา *T. lanuginosus* ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งแลนที่ไม่ละลายน้ำได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture โดยมีขี้ข้าวโพดเป็นวัสดุหมักได้สูงจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ THKU4, THKU9, THKU20, THKU23, THKU24, THKU42, THKU56, THKU75, THKU84 และ THKU88 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเลสเท่ากับ 335, 262, 247, 270, 248, 232, 317, 241, 234 และ 317 หน่วยต่อมิลลิตร ตามลำดับ (ดังภาพที่ 14) เพื่อทดสอบการทนกรดและทนร้อนของเอนไซม์ต่อไป



ภาพที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ THKU4, THKU9, THKU20, THKU23, THKU24, THKU42, THKU56, THKU75, THKU84, และ THKU88 โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมักแบบ submerge culture

3. ผลการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไขมันที่ได้จากเชื้อรา *T. lanuginosus*

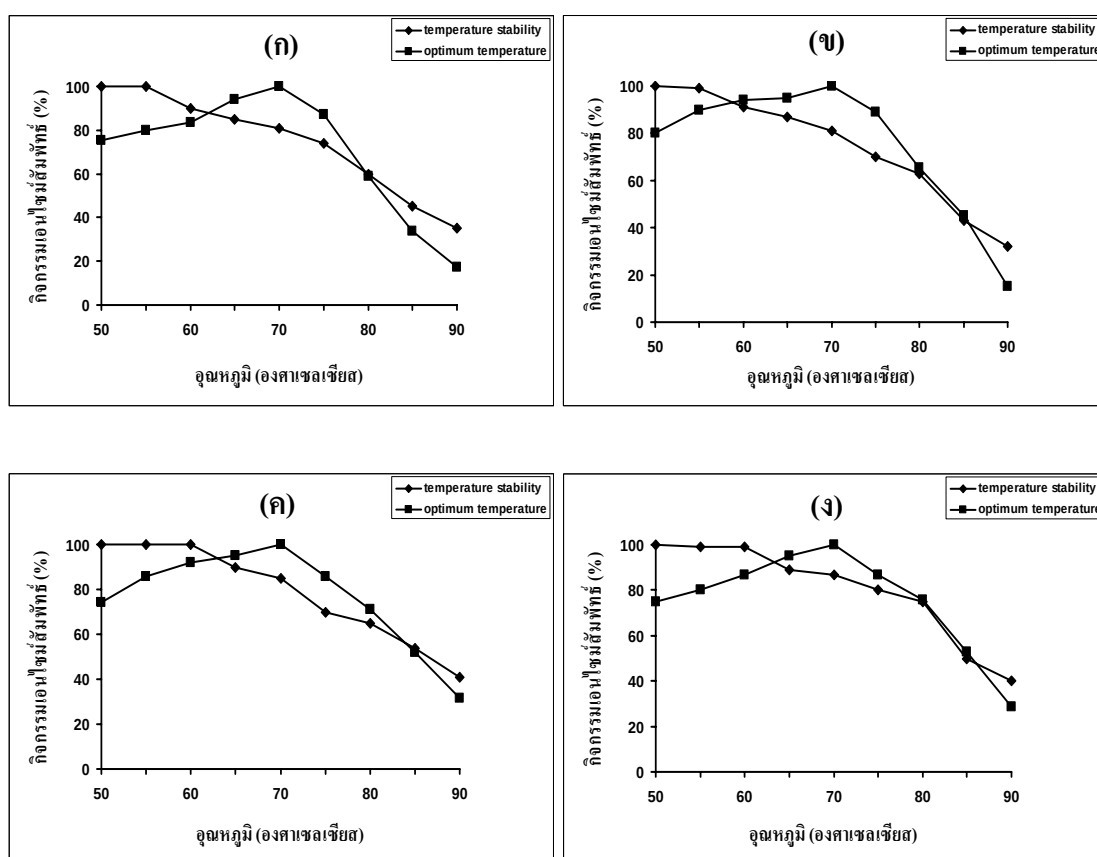
ได้ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไขมันที่ได้จากเชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture และถูกคัดเลือกเพื่อศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อรา *T. lanuginosus* อีก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ THKU75, THKU10 และ THKU27 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำได้สูง ทนกรดและทนร้อนได้ดี

3.1 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมและความคงทนของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 ในช่วงอุณหภูมิ 50-90 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ THKU10, THKU27 และ THKU75 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำสำหรับ

เชื้อรา *T. lanuginosus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ 70 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 15 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์นี้ มีค่าเช่นเดียวกับที่มีรายงานว่าในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลลาเนสของเชื้อรา *T. lanuginosus* สายพันธุ์อื่น ๆ (Singh *et al.*, 2000a; Lin *et al.*, 1999)

ส่วน Jiang *et al.* (2005) และ Li *et al.* (2005) รายงานว่าเอนไซม์ไลลาเนส จากเชื้อ *T. lanuginosus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 70-75 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลลาเนสจะแตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อรา โดยทั่วไปเอนไซม์ไลลาเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 60-75 องศาเซลเซียส (Xiong *et al.*, 2004) ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิสูง และเหมาะสำหรับนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเพื่อการผลิตอาหารสัตว์ เนื่องจากในระหว่างขั้นตอนการผลิตอาหารสัตว์มีความจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูง (Walch, 2002)



ภาพที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและความคงทนของเอนไซม์ย่อยไลลาเนสที่ไม่ละลายน้ำที่ผลิตจากเชื้อรา *T. lanuginosus* 4 สายพันธุ์ : (ก) *T. lanuginosus* THKU10 (ข) *T. lanuginosus* THKU27 (ค) *T. lanuginosus* THKU56 และ (ง) *T. lanuginosus* THKU75

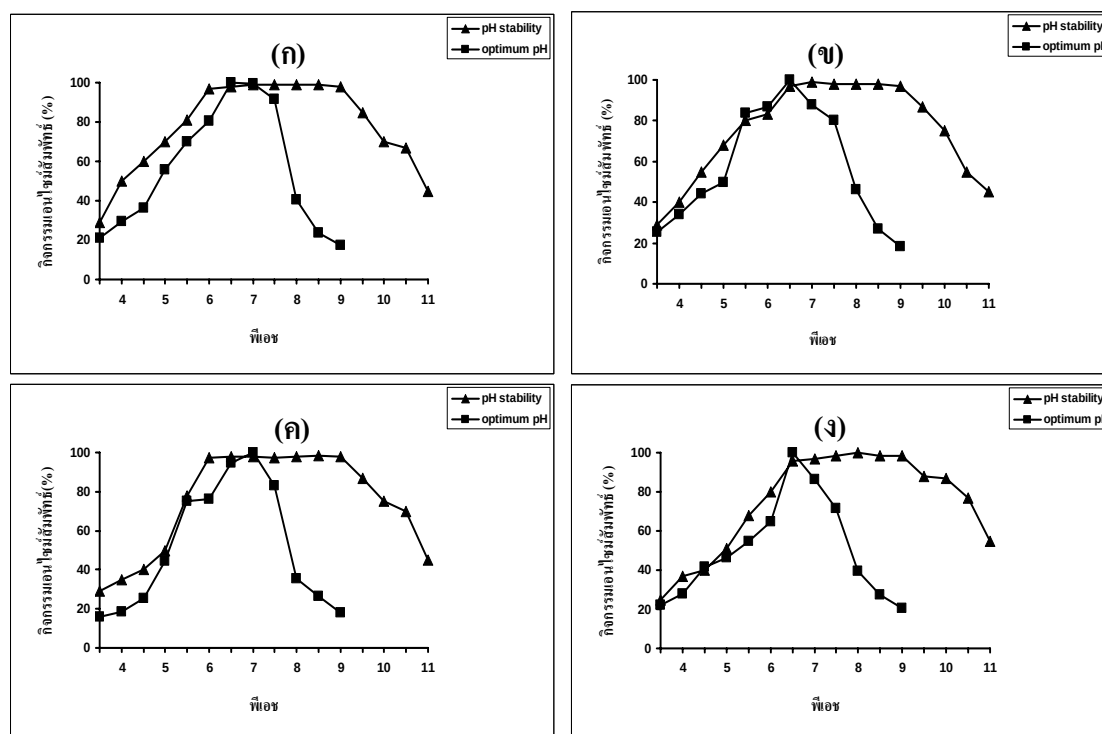
ส่วนผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำในช่วงอุณหภูมิ 50-90 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.0 นาน 30 นาที โดยใช้ crude enzyme จากเชื้อรา *T. lanuginosus* 4 สายพันธุ์ พบว่า *T. lanuginosus* THKU10 และ THKU27 สามารถทนอุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *T. lanuginosus* THKU56 และ THKU75 สามารถทนอุณหภูมิได้สูงกว่า คือ 60 องศาเซลเซียส โดยที่เอนไซม์ยังไม่สูญเสียสภาพ ดังภาพที่ 15

โดยทั่วไปเอนไซม์จากเชื้อรา *T. lanuginosus* มีความคงทนอุณหภูมิถึง 60 องศาเซลเซียส (Lin *et al.*, 1999; Bennett *et al.*, 1998; Cesar and Mrša, 1996) Jiang *et al.* (2005) พบว่าเอนไซม์ไซแลเนสของ *T. lanuginosus* มีความคงทนต่ออุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และค่อนข้างสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Singh *et al.* (2000a) ได้ทดสอบความคงทนของเอนไซม์ไซแลเนส จากเชื้อ *T. lanuginosus* 9 สายพันธุ์ พบว่าเอนไซม์จากเชื้อ *T. lanuginosus* SSBP มีความคงตัวมากที่สุด โดยกิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเหลือ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และลดลงเหลือเพียง 45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้ยังพบว่า culture filtrate ของเชื้อ *T. lanuginosus* SSBP ที่เลี้ยงบนซังข้าวโพดมีความคงตัวมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับความคงตัวของ culture filtrate ของเชื้อรา *T. lanuginosus* SSBP ที่เลี้ยงบน oat spelts xylan, birchwood xylan, locust bean gum รำข้าวสาลี และชานอ้อย

3.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมและความคงทนของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากเชื้อรา *T. lanuginosus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ในช่วงพีเอช 3.5-9 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในช่วงที่เป็นกลาง โดยอยู่ระหว่างพีเอช 6.5-7 ในขณะที่พีเอชสูงกว่า 7 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงมากดังแสดงในภาพที่ 16 แสดงว่าในช่วงพีเอชที่เป็นกรดและด่างไม่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Jiang *et al.* (2005) ที่รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส จากเชื้อรา *T. lanuginosus* คือ 6.2 Li *et al.* (2005) รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมของเชื้อรา *T. lanuginosus* CBS 288.54 อยู่ในช่วง 7-7.5 ส่วน Singh *et al.* (2000d) และ Xiong *et al.* (2004) รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.0-6.5 ซึ่งแตกต่างกับ Nguyen *et al.* (2002) ที่รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส จากเชื้อรา *T. lanuginosus* ATCC 34626 อยู่ในช่วง 4.6-6.6 ซึ่งเป็นช่วงที่กว้างและอยู่ในช่วงที่เป็นกรด

การศึกษาผลของพีเอชต่อความคงทนของ crude enzyme จากเชื้อรา *T. lanuginosus* 4 สายพันธุ์ ในช่วงพีเอช 3.5-11.0 ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ของทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถทนพีเอชได้ในช่วงกว้าง โดยเอนไซม์ของเชื้อราสายพันธุ์ THKU10 และ THKU56 ทนพีเอชได้อยู่ในช่วง 6.0-9.0 ส่วนเอนไซม์ของเชื้อรา THKU27 และ THKU75 ทนพีเอชในช่วง 6.5-9.0 (ภาพที่ 16) ซึ่งผลการทดลองนี้มีค่าการคงทนพีเอชใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลาลเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* CAU44, *T. lanuginosus* CBS 288.54 และ *T. lanuginosus* IOC-4145 ที่มีความคงทนพีเอชในช่วง 5.6-10.3, 6.5-10.0 และ 4.0-10.0 ตามลำดับ (Jiang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005 และ Damaso *et al.*, 2002a) นอกจากนี้ Singh *et al.* (2000a) รายงานว่าเอนไซม์ไซลาลเนสมีความคงทนพีเอชในช่วง 5.5-10.0 และมีรายงานอีกหลายฉบับที่รายงานว่าเอนไซม์ไซลาลเนสจาก *T. lanuginosus* มีความคงทนในช่วงพีเอชคล้ายกัน (Bennett *et al.*, 1998; Cesar and Mrša, 1996; Gomes *et al.*, 1993)



ภาพที่ 16 ผลของพีเอชต่อการทำงานและความคงทนของเอนไซม์ย่อยไซลาลที่ไม่ละลายน้ำที่ผลิตจากเชื้อรา *T. lanuginosus* 4 สายพันธุ์: (ก) *T. lanuginosus* THKU10 (ข) *T. lanuginosus* THKU27 (ค) *T. lanuginosus* THKU56 และ (ง) *T. lanuginosus* THKU75

นอกจากนี้ยังศึกษาความสามารถย่อยซังข้าวโพดของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรา

T.lanuginosus บางสายพันธุ์ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state และ submerge culture พบว่าสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบ solid state สามารถย่อยซังข้าวโพดได้อยู่ในช่วง 0.28-0.59 (ug/ml/h/U) ในขณะที่เชื้อรา *T.lanuginosus* ที่เพาะเลี้ยงแบบ submerge culture สามารถย่อยซังข้าวโพดได้อยู่ในช่วง 0.16-1.06 (ug/ml/h/U) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลเนสสูงไม่สัมพันธ์กับความสามารถย่อยซังข้าวโพด (ตารางผนวกที่ 6 และ 7) นอกจากนี้ได้ทดสอบสมบัติการยึดเกาะของเอนไซม์ไซแลเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *T.lanuginosus* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state และ submerge culture ที่มีซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนกับสับสเตรตที่ไม่ละลายน้ำชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง เซลลูโลส ซังข้าวโพด และไซแลน พบว่าเอนไซม์ไซแลเนสที่เชื้อราผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยงแบบ solid state สามารถยึดเกาะได้กับสับสเตรตที่ไม่ละลายน้ำที่นำมาทดสอบได้ค่อนข้างต่ำ โดยเอนไซม์จากสายพันธุ์ THKU10 ยึดเกาะกับซังข้าวโพดได้ดีที่สุด ยึดเกาะได้ 8.2 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ 8) ส่วนเอนไซม์ไซแลเนสที่เชื้อรา *T.lanuginosus* ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture สามารถยึดเกาะได้กับสับสเตรตที่ไม่ละลายน้ำที่นำมาทดสอบได้ค่อนข้างต่ำเช่นเดียวกัน ยกเว้นเอนไซม์จากสายพันธุ์ THKU56 ยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้ดีที่สุด ยึดเกาะได้ 20.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยึดเกาะได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ solid state ซึ่งคล้ายกับรายงานของ ขวัญชัย (2544) ที่ทดสอบสมบัติการยึดเกาะของเอนไซม์ไซแลเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *H. lanuginosa* ในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนกับสับสเตรตที่ไม่ละลายน้ำชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง เซลลูโลส ซังข้าวโพด และไซแลน พบว่าเอนไซม์ไซแลเนสสามารถยึดเกาะได้กับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้ดีที่สุด โดยยึดเกาะได้ 56.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนซังข้าวโพดและเซลลูโลสยึดเกาะได้ในปริมาณน้อยมาก โดยมีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะเพียง 4.99 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และไม่สามารถยึดเกาะกับแป้งมันสำปะหลังได้ สำหรับความสามารถการยึดเกาะเอนไซม์บีตาไซแลเนสที่ผลิตจากการเพาะเลี้ยงแบบ solid state บนวัสดุหมักที่มีซังข้าวโพด และรำข้าวสาลีนั้น พบว่าเอนไซม์ไซแลเนสไม่สามารถยึดเกาะกับแป้งมันสำปะหลังและเซลลูโลสได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ไซแลเนสที่ผลิตจากอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนและมีความสามารถในการยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำลดลงอย่างมาก โดยสามารถยึดเกาะได้เพียง 9.07 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากอาหารเหลวประมาณ 6.2 เท่า

4. ผลการทนกรดและทนร้อนของเอนไซม์ไซแลนสที่ผลิตจากเชื้อรา *T. lanuginosus*

4.1 การทนกรด

เนื่องจากในกระเพาะอาหารของหมูในสภาวะที่มีอาหารสัตว์อยู่เต็มพบว่ามีพีเอชประมาณ 3.5 (Weck, 2001) ส่วนในกระเพาะของสัตว์ปีกมีพีเอชอยู่ในช่วง 3.4-4.8 (วิโรจน์, 2537) ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์จะต้องสามารถทนและทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด โดยเฉพาะในสัตว์กระเพาะเดี่ยว (non- ruminant) และเอนไซม์ที่ใช้ต้องสามารถทำงานภายใต้สภาวะดังกล่าว ซึ่งต้องสัมพันธ์กับเวลาการเคลื่อนที่ผ่านของอาหารในกระเพาะที่มีระยะเวลาสั้นด้วย (McCleary, 2001)

Thacker and Baas (1996) รายงานว่าอาหารสัตว์จะเคลื่อนที่ผ่านกระเพาะอาหารของหมูภายในระยะเวลาสั้นๆ โดยเมื่อรวมระยะเวลาดังแต่อาหารสัตว์อยู่ในปากจนกระทั่งเคลื่อนที่ผ่านลำไส้เล็กออกมาใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง

ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการทนกรดของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ ที่พีเอช 3.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากเชื้อรา *T. lanuginosus* ที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงจำนวน 10 สายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state และ 10 สายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture จากการทดสอบพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *T. lanuginosus* 10 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ THKU10, THKU 27, THKU7 และTHKU16 ที่คัดเลือกจากการเพาะเลี้ยงแบบ solid state สามารถทนกรดได้ดี โดยยังคงเหลือกิจกรรมของเอนไซม์หลังการทดสอบเท่ากับ 28.8, 21.2, 19.9 และ 19.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนเชื้อราที่คัดเลือกจากการเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture พบว่ามี 4 สายพันธุ์ซึ่งได้แก่ THKU56, THKU75, THKU4 และ THKU84 สามารถทนกรดได้ดี โดยยังคงเหลือกิจกรรมของเอนไซม์หลังการทดสอบเท่ากับ 22.3, 20.9, 19.2 และ 18.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไซเลนที่ไม่ละลายน้ำที่เหลือหลังทดสอบความสามารถทนกรด
ที่พีเอช 3.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที

สายพันธุ์เชื้อรา ที่คัดเลืออกจาก การเพาะเลี้ยง แบบ Solid state			สายพันธุ์เชื้อรา ที่คัดเลืออกจาก การเพาะเลี้ยง แบบ Submerge		
กิจกรรม เอนไซม์เริ่มต้น	กิจกรรมเอนไซม์ คงเหลือ		กิจกรรม เอนไซม์ เริ่มต้น	กิจกรรม เอนไซม์ คงเหลือ	
(U/ml)	(%)		(U/ml)	(%)	
THKU71	480	12.2	THKU 4	335	19.2
THKU61	418	14.0	THKU56	317	22.3
THKU27	414	21.2	THKU88	317	9.8
THKU10	413	28.8	THKU23	270	13.7
THKU16	403	19.2	THKU 9	262	11.5
THKU 9	395	17.8	THKU24	247	7.9
THKU 6	392	17.9	THKU20	247	8.7
THKU30	389	9.3	THKU75	241	20.9
THKU 7	387	19.9	THKU84	234	18.3
THKU19	372	17.9	THKU42	232	16.7

Thacker and Baas (1996) ได้ทำการทดสอบความคงทนต่อพีเอชที่เป็นกรดในกระเพาะ
หนู (พีเอช 2.5-5.5) ด้วยการบ่มเอนไซม์เพนโทซานเนสที่ผลิตใช้ในทางการค้าไว้ที่พีเอชต่าง ๆ เป็น
เวลานาน 30 นาทีแล้วปรับพีเอชให้เป็น 5.5 ทันที พบว่าเอนไซม์ที่บ่มที่พีเอช 3.5 สามารถกลับมา
มีกิจกรรมได้บางส่วน (30-90 เปอร์เซ็นต์) แต่เอนไซม์ที่บ่มที่พีเอช 2.5 และที่พีเอชสูงกว่า 5.5 ไม่พบ
กิจกรรมของเอนไซม์หลังปรับพีเอชให้เป็น 5.5 นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์มีความคงทนที่พีเอช 4.5
ได้ดีที่สุด

4.2 การทนร้อน

เนื่องจากในบางขั้นตอนของการผลิตเอนไซม์อาหารสัตว์ เช่น ในขั้นตอนการอัดเม็ด ต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ซึ่งหากมีการเติมเอนไซม์ในอาหารสัตว์อาจทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผสมเข้าไปในอาหารสัตว์ได้ ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์จึงต้องมีสมบัติที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี จึงได้ทดสอบการทนร้อนของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ โดยนำ crude enzyme ที่ผลิตได้จากเชื้อราขอบร้อน *T. lanuginosus* ทั้ง 20 สายพันธุ์มาทำการทดสอบการทนร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์ของเชื้อราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ solid state 2 สายพันธุ์ คือ THKU10 และ THKU27 สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ดีที่สุด ซึ่งทนร้อนได้ใกล้เคียงกัน โดยยังคงเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำหลังการทดสอบเท่ากับ 28.2 และ 29.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ดังตารางที่ 9) เมื่อพิจารณาควบคู่ไปกับความสามารถในการทนกรดพบว่า THKU10 ทนกรดได้ดีกว่า THKU27

ส่วนเชื้อราที่เพาะเลี้ยงแบบ submerge culture ที่มีเอนไซม์ที่ทนกรดได้ดีได้แก่ THKU56, THKU75, THKU4 และ THKU84 เมื่อนำมาทดสอบพบว่า THKU56 ผลิตเอนไซม์ที่ทนอุณหภูมิสูงได้ดีที่สุด โดยยังคงเหลือกิจกรรมของเอนไซม์หลังการทดสอบเท่ากับ 58 เปอร์เซ็นต์ (ดังตารางที่ 9) Xiong *et al.* (2004) ได้รายงานการทนอุณหภูมิของเอนไซม์ไซแลนจากเชื้อรา *T. lanuginosus* DSM 106.35 พบว่าเมื่อต้มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 นาน 30 นาที ยังคงเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Jiang *et al.* (2005) ทดสอบความสามารถทนอุณหภูมิของเอนไซม์ไซแลนจากเชื้อรา *T. lanuginosus* CAU44 พบว่าเมื่อต้มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 6.2 นาน 30 นาที ยังคงเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ 80 เปอร์เซ็นต์ และ Singh *et al.* (2000a) รายงานว่า เอนไซม์ไซแลนจากเชื้อรา *T. lanuginosus* หลายสายพันธุ์ สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 70-80 องศาเซลเซียส

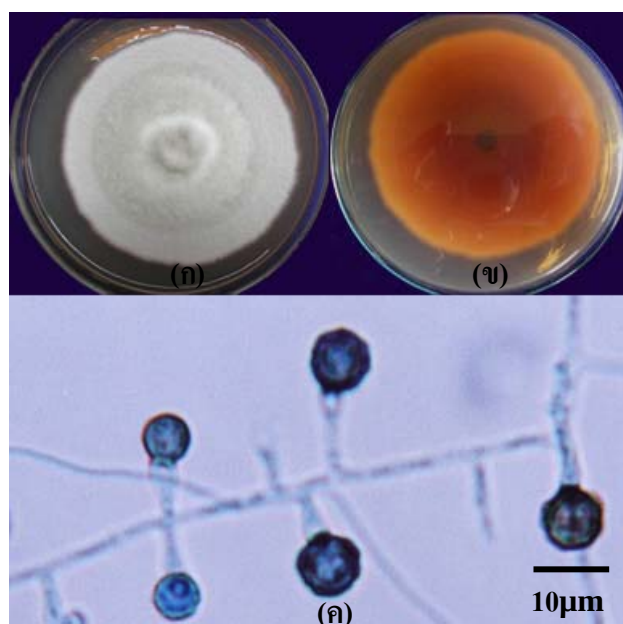
ตารางที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไขมันที่ไม่ละลายน้ำที่เหลือหลังทดสอบความสามารถ
ทนร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 เป็นเวลา 60 นาที

สายพันธุ์เชื้อรา			สายพันธุ์เชื้อรา		
ที่คัดเลือกราก	กิจกรรม	กิจกรรมเอนไซม์	ที่คัดเลือกราก	กิจกรรม	กิจกรรมเอนไซม์
การเพาะเลี้ยง	เอนไซม์เริ่มต้น	คงเหลือ	การเพาะเลี้ยง	เอนไซม์เริ่มต้น	คงเหลือ
แบบ Solid state	(U/ml)	(%)	แบบ Submerge	(U/ml)	(%)
THKU71	480	32.1	THKU 4	335	33.4
THKU61	418	20.1	THKU56	317	58.9
THKU27	414	29.4	THKU88	317	22.3
THKU10	413	28.2	THKU23	270	28.1
THKU16	403	22.3	THKU 9	262	24.2
THKU 9	395	21.8	THKU24	247	27.9
THKU 6	392	22.5	THKU20	247	38.5
THKU30	389	20.9	THKU75	241	50.2
THKU 7	387	25.9	THKU84	234	27.4
THKU19	372	26.5	THKU42	232	34.7

จากผลการทดสอบการทนกรดและการทนร้อนของเอนไซม์จากเชื้อรา *T. lanuginosus* ที่นำมาทดสอบ พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ THKU56 เป็นสายพันธุ์ที่มีเอนไซม์ย่อยไขมันที่ไม่ละลายน้ำที่ทนกรดและทนร้อนได้ดี โดยเฉพาะทนร้อนได้สูงกว่าเอนไซม์ของเชื้อราที่ทำการเพาะเลี้ยงแบบ solid state ประมาณสองเท่า ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกสายพันธุ์ THKU56 เป็นตัวแทนของเชื้อรา *T. lanuginosus* ทำการเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture ที่ผลิตเอนไซม์ไขมันที่ทนกรดและทนอุณหภูมิสูงได้ดี เพื่อใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไขมันต่อไป

5. ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56

ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YpSS อายุ 5 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีเส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.4 เซนติเมตรและความสูงน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเทาหรือเทาออกเขียว โดยเริ่มจากบริเวณส่วนกลางโคโลนี ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูเข้มหรือสีไวน์แดง ลักษณะเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เส้นใยไม่มีสี ก้านชูสปอร์ค่อนข้างสั้น และไม่แตกแขนง สร้างสปอร์รูปร่างกลมบนก้านชูสปอร์ 1 สปอร์ สปอร์ที่ยังอ่อนไม่มีสี ผิวเรียบ เมื่อสปอร์แก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและมีผนังด้านนอกหนา ผิวมีลักษณะขุ่นขี้ไม่เรียบ (ภาพที่ 17) ซึ่งลักษณะของเชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 มีลักษณะตรงกับที่รายงานโดย Cooney and Emerson (1964)



ภาพที่ 17 ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร YpSS บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข) ลักษณะโคโลนีหลังจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และ(ค) ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

6. ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

จุลินทรีย์จะใช้ไนโตรเจนในการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้ไนโตรเจนได้แตกต่างกันไป บางชนิดสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ บางชนิดสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจะต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อนั้น ๆ (Boze *et al.*, 1995)

Purkarthofer *et al.* (1993) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *T. lanuginosus* DSM 5826 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture โดยมีซังข้าวโพดเท่ากับ 31 กรัมต่อลิตร เป็นวัสดุหมัก ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่ศึกษาได้แก่ ฟิชเพปโทน เคซีนเพปโทน เมล็ดฝ้าย cornsteep powder แป้งถั่วเหลือง ยีสต์สกัดและเนื้อสกัด พบว่าเนื้อสกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส ของเชื้อรา *T. lanuginosus* DSM 5826 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 19,370 หน่วยต่อมิลลิกรัม ส่วนยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ตรงลงมา ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 1,451 หน่วยต่อมิลลิกรัม

ในการศึกษานี้จึงได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยใช้แหล่งไนโตรเจน 2 ชนิดคือเนื้อสกัดและ ยีสต์สกัด โดยเพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 แบบ submerge culture ในอาหารที่มีเนื้อสกัดหรือยีสต์สกัดความเข้มข้นต่าง ๆ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่า เชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 สามารถใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าเนื้อสกัดในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 20-30 กรัมต่อลิตรให้กิจกรรมเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำใกล้เคียงกันคือ 423- 438 หน่วยต่อมิลลิกรัม จากผลการทดลองจึงได้เลือกยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำจากเชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสด้วยวิธีหาพื้นผิวตอบสนองต่อไป

ตารางที่ 10 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันที่ไม่ละลายน้ำจากเชื้อรา

T. lanuginosus THKU56 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture ที่ใช้ซังข้าวโพด 31 กรัมต่อลิตร

แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไขมันที่ไม่ละลายน้ำ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)				
	ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)				
	10	15	20	25	30
ยีสต์สกัด	370	330	423	428	438
เนื้อสกัด	330	240	260	228	420

7. ผลการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไขมันแบบ submerge culture โดยวิธีการหาพื้นที่ผิวตอบสนอง

การใช้ซังข้าวโพดซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อเป็นวัสดุเลี้ยงเชื้อสำหรับกระบวนการผลิตเอนไซม์และเซลล์โปรตีนจากจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการหมักแบบ solid state สามารถเพิ่มผลผลิตต่อปริมาณสับสเตรตและลดต้นทุนการผลิต แต่ข้อเสียเปรียบของการหมักแบบ solid state คือการควบคุมสภาพแวดล้อมในระหว่างการหมักเป็นไปได้ยากกว่า และการขยายกำลังการผลิตไปสู่ระดับใหญ่ทำได้ยากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบ submerge culture

ดังนั้นจึงได้ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไขมันจากเชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 โดยใช้แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) โดยกำหนดปัจจัยที่ต้องการศึกษาทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของซังข้าวโพด (X_1) ความเข้มข้นของยีสต์สกัด (X_2) ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (X_3) และความเข้มข้นของ tween 80 (X_4) ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไขมันที่ไม่ละลายน้ำในการทดลองแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไขมันที่ไม่ละลายน้ำในแต่ละการทดลอง

ลำดับ	ค่าจริงของปัจจัยที่นำมาศึกษา				กิจกรรมเอนไซม์ย่อยไขมันที่ไม่ละลายน้ำ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)
	x_1	x_2	x_3	x_4	
1	10	10	0	0	128
2	10	10	0	1	126
3	10	10	10	0	186
4	10	10	10	1	160
5	10	40	0	0	121
6	10	40	0	1	124
7	10	40	10	0	126
8	10	40	10	1	80
9	10	20	5	0.3	142
10	40	10	0	0	477
11	40	10	0	1	442
12	40	10	10	0	461
13	40	10	10	1	467
14	40	40	0	0	450
15	40	40	0	1	445
16	40	40	10	0	446
17	40	40	10	1	434
18	40	20	5	0.3	550
19	20	10	5	0.3	286
20	20	40	5	0.3	301
21	20	20	0	0.3	381
22	20	20	10	0.3	386
23	20	20	5	0	396
24	20	20	5	1	344
25	20	20	5	0.3	376
26	20	20	5	0.3	362
27	20	20	5	0.3	368

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ค่าการถดถอยแบบพหุคูณ (multiple regression) ได้ค่าต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ด้วยโปรแกรม SPSS

ปัจจัย	coefficient	Computed t-value	P-value
Intercept	227.661	-7.456	0.000
X_1	28.281	8.690	0.000
X_2	14.778	4.557	0.000
X_3	0.160	0.509	0.617
X_4	-0.052	-1.701	0.104
X_1^2	-0.343	-5.405	0.000
X_2^2	-0.311	-4.899	0.000
X_3^2	0.024	0.741	0.467
X_4^2	-0.049	-1.525	0.142
$X_1 X_2$	0.038	0.447	0.660
$X_1 X_3$	0.004	0.116	0.908
$X_1 X_4$	-0.049	-1.414	0.172
$X_2 X_3$	-0.014	-0.387	0.703
$X_2 X_4$	-0.051	-1.475	0.155
$X_3 X_4$	-0.029	-0.925	0.365
R^2		0.979	

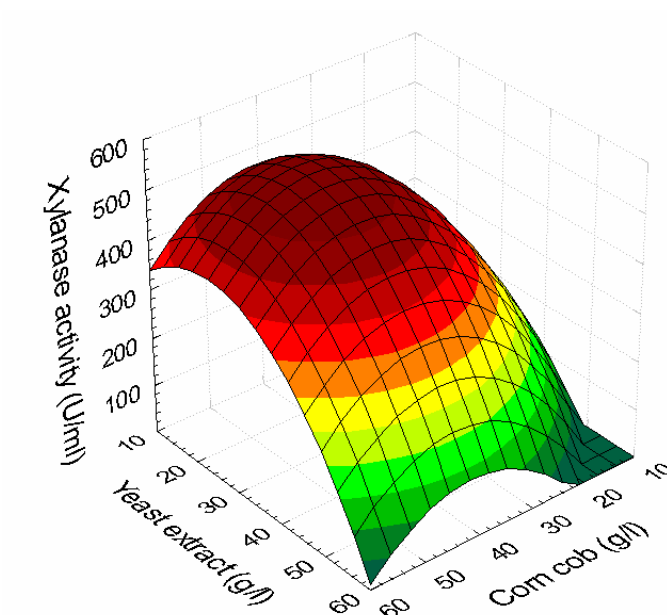
จากข้อมูลในตารางที่ 12 ทำให้ได้ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์และปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยสร้างตัวแบบของสมการถดถอย ซึ่งมีสมการดังนี้

$$Y = 220.402 + 28.281X_1 + 14.778X_2 - 0.343X_1^2 - 0.31X_2^2$$

โดย Y คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการทำนาย X_1 คือ ความเข้มข้นของซังข้าวโพด X_2 คือความเข้มข้นของยีสต์สกัด

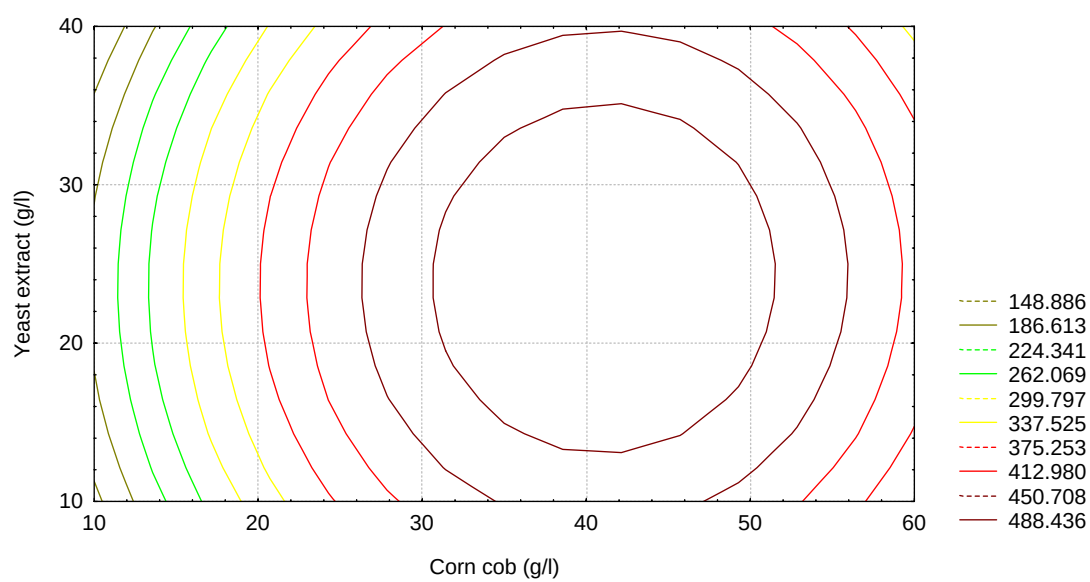
จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิธีหาสมการถดถอยที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) พบว่าความเข้มข้นของซังข้าวโพด (X_1) และความเข้มข้นของยีสต์สก็ด (X_2) เท่านั้นที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (X_3) และความเข้มข้นของ tween 80 (X_4) ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส นอกจากนี้สองปัจจัยร่วม (X_1X_2 , X_1X_3 , X_1X_4 , X_2X_3 , X_2X_4 และ X_3X_4) ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเช่นเดียวกัน เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของปัจจัยทั้ง 2 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อกิจกรรมของการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.979 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ทั้ง 2 ปัจจัยมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส 97.9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการหาพื้นผิวตอบสนองเพื่อทำนายค่าของปัจจัยทั้ง 2 ที่มีผลทำให้เชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 ผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด พบว่า ความเข้มข้นของซังข้าวโพดเท่ากับ 41 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของยีสต์สก็ดเท่ากับ 24 กรัมต่อลิตร เป็นค่าที่ทำนายว่าจะทำให้เชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้สูงที่สุดเท่ากับ 526.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยพื้นผิวตอบสนอง แสดงในภาพที่ 18 และเพื่อที่จะช่วยให้มองเห็นรูปร่างของพื้นผิวตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น โดยมากแล้วนิยมพล็อตเส้นโครงร่าง (contour plot) ของพื้นผิวตอบสนอง ดังแสดงในภาพที่ 19 และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารอาหารที่ได้จากการทำนายพบว่าเชื้อรา THKU56 สามารถผลิตเอนไซม์ได้เท่ากับ 541 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนาย นอกจากนี้ยังพบว่า มีกิจกรรมเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ละลายน้ำได้ 1,450 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 239 หน่วยต่อมิลลิลิตร Purkarthofer *et al.* (1993) ทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสต่อไซแลนที่ละลายน้ำของเชื้อรา *T. lanuginosus* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก พบว่า trace element ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อรา *T. lanuginosus* และจากการใช้วิธีหาพื้นผิวตอบสนอง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจากเดิม 1,602 หน่วยต่อมิลลิลิตร (26,700 nkat/ml) เป็น 2,172 หน่วยต่อมิลลิลิตร (36,200 nkat/ml) เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยซังข้าวโพด 31.2 กรัมต่อลิตร ยีสต์สก็ด 30.2 กรัมต่อลิตรและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

Damaso *et al.* (2002a) ได้ทำการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสต่อไซแลนที่ละลายน้ำ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวจากเชื้อรา *T. lanuginosus* โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ 2^{4-1} fractional factorial design (FFD) ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของซังข้าวโพดและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อ โดยความเข้มข้นของซังข้าวโพดที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 18 การวิเคราะห์หาพื้นผิวตอบสนองของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำจากเชื้อรา

T. lanuginosus THKU56



ภาพที่ 19 Contour plot ของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำจากเชื้อรา

T. lanuginosus THKU56

สรุปผลการทดลอง

เมื่อศึกษาความสามารถผลิตเอนไซม์อาหารสัตว์ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อราขอบรื้อน *Thermomyces lanuginosus* จำนวน 89 สายพันธุ์ในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบ solid state และ submerge culture โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบ solid state บนวัสดุหมัก 12 กรัมที่ประกอบด้วย ซังข้าวโพด รำข้าวสาลีและกลบ ในอัตราส่วน 5:5:2 กรัม โดยใช้ซังข้าวโพดหรือซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่าง ที่ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เชื้อรา *T. lanuginosus* ที่เจริญบนวัสดุหมักที่ใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่างผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำได้ดีกว่าเชื้อราที่เลี้ยงบนซังข้าวโพด พบว่ามีเชื้อราจำนวน 20 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำได้สูง (มากกว่า 900 หน่วยต่อมิลลิลิตร) แต่ใน 20 สายพันธุ์นี้มีเชื้อรา 12 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีมากทั้งในอาหารที่ใช้ซังข้าวโพดหรือซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่าง ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไขมันที่ไม่ละลายน้ำนั้นมิกิจกรรมน้อยกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำ การแช่ซังข้าวโพดด้วยด่างมีผลให้ลิกนินละลายน้ำออกไปได้บางส่วนและโครงสร้างของลิกนินและเซลลูโลสพองตัว และง่ายต่อการเจริญของเชื้อราส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ อย่างไรก็ตามเชื้อรา *T. lanuginosus* หลายสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีแม้ว่าจะใช้ซังข้าวโพดหรือซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่างเป็นวัตถุดิบ ซึ่งความสามารถในการผลิตเอนไซม์ขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์เชื้อรา

เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture ซึ่งประกอบด้วยซังข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 15 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตรและ tween 80 0.3 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อรา *T. lanuginosus* ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำได้สูงกว่าไขมันที่ไม่ละลายน้ำ แต่มี 7 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมย่อยไขมันที่ละลายน้ำและไขมันที่ไม่ละลายน้ำได้ดี (มากกว่า 200 หน่วยต่อมิลลิลิตร) สำหรับเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำได้สูงสุด คือสายพันธุ์ THKU86 และ THKU75 ซึ่งผลิตเอนไซม์ได้ 737 และ 734 มิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันที่ไม่ละลายน้ำได้สูงสุด คือสายพันธุ์ THKU4, THKU56 และ THKU88 ซึ่งผลิตเอนไซม์ได้ 335, 317 และ 317 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state เป็นคนละสายพันธุ์กับที่ผลิตเอนไซม์ได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture

จากการศึกษาความสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของเชื้อรา *T. lanuginosus* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state พบว่าเชื้อราผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ค่อนข้างต่ำไม่ว่าจะใช้ขี้ข้าวโพดหรือขี้ข้าวโพดที่ผ่านแช่ด่างก็ตาม โดยเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้สูงสุดเมื่อใช้ขี้ข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่างเป็นวัสดุหมัก คือสายพันธุ์ THKU27 มีกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 115 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้สูงสุดเมื่อใช้ขี้ข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก คือสายพันธุ์ THKU51 มีกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 104 หน่วยต่อมิลลิลิตร สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture พบว่าเชื้อรา THKU75 ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้สูงถึง 164 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture ด้วย

เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์จึงได้คัดเลือกเชื้อรา *T. lanuginosus* ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้สูงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ใช้ขี้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ ในกรณีการเพาะเลี้ยงแบบ solid state ได้คัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ได้สูง (มากกว่า 370 หน่วยต่อมิลลิลิตร) จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ THKU6, THKU7, THKU9, THKU10, THKU16, THKU19, THKU27, THKU30, THKU61 และ THKU71 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 392, 387, 395, 413, 404, 372, 415, 389, 418 และ 480 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture ได้คัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ได้สูง (มากกว่า 230 หน่วยต่อมิลลิลิตร) จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ THKU4, THKU9, THKU20, THKU23, THKU24, THKU42, THKU56, THKU75, THKU84 และ THKU88 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 335, 262, 247, 270, 248, 232, 317, 241, 234 และ 317 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้สูงมาทดสอบการทนกรดที่พีเอช 3.5 และทนร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ของเชื้อราสายพันธุ์ THKU10 ที่เพาะเลี้ยงแบบ solid state ทนกรดและทนร้อนได้ดี มีกิจกรรมเอนไซม์คงเหลือ 28.8 และ 22.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ของเชื้อราสายพันธุ์ THKU56 ที่เพาะเลี้ยงแบบ submerge culture ทนกรดและทนร้อนได้ดี มีกิจกรรมเอนไซม์คงเหลือ 28.2 และ 58.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งทนร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์ของ THKU10 ประมาณ 2 เท่า ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อรา THKU56 ไปศึกษาองค์ประกอบของสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมและความคงทนของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำของเชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 ในช่วงอุณหภูมิ 50-90 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์สำหรับ THKU56 คือ 70 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับอีก 3 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ส่วนผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ของ THKU56 และ THKU75 สามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ทนอุณหภูมิได้ถึง 55 องศาเซลเซียส สำหรับพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานและความคงทนของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำที่ผลิตจากเชื้อรา *T. lanuginosus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ให้ผลคล้ายกันคือเอนไซม์ทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกลางคือ 6.5-7.0 และเอนไซม์ทนพีเอชในช่วงกว้างโดยเอนไซม์ของเชื้อรารหัส THKU56 และ THKU10 ทนพีเอชได้อยู่ในช่วง 6.0-9.0 ส่วนเอนไซม์ของเชื้อรา THKU27 และ THKU75 ทนพีเอชในช่วง 6.5-9.0

เมื่อทำการศึกษาผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้มี 2 ชนิดคือเนื้อสัตว์และยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 สามารถใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าเนื้อสัตว์ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ และที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 30 กรัมต่อลิตรให้กิจกรรมเอนไซม์ไซแลเนสสูงสุดเท่ากับ 438 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำจากเชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 เพาะเลี้ยงแบบ submerge culture โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าซังข้าวโพดและยีสต์สกัดเท่านั้นที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำอย่างมีนัยสำคัญ แต่โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และ tween 80 ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการหาพื้นผิวตอบสนองเพื่อทำนายค่าของปัจจัยทั้ง 2 ที่มีผลทำให้เชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 ผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด พบว่า ความเข้มข้นของซังข้าวโพดเท่ากับ 41 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของยีสต์สกัดเท่ากับ 24 กรัมต่อลิตรเป็นค่าที่ทำนายว่าจะทำให้เชื้อรา *T. lanuginosus* THKU56 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้สูงที่สุดเท่ากับ 526.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารอาหารที่ได้จากการทำนายพบว่าเชื้อรา THKU56 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้เท่ากับ 541 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนาย นอกจากนี้ยังพบว่า มีกิจกรรมเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ละลายน้ำได้ 1,450 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 239 หน่วยต่อมิลลิลิตร

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ขวัญชัย คุณเจริญไพศาล. 2544. การเหนี่ยวนำของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อ *Humicola lanuginosa* (GRIFFON AND MAUBLANC) BUNCE, น. 33-41. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ปารเมศ ชุตินา. 2545. การออกแบบการทดลองทางวิศวกรรม. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช, กรรณิการ์ ดวงมัลย์, สุณีย์ โชติณีนานาท และนภา โล่ห์ทอง. 2536. การใช้ประโยชน์จากขี้ข้าวโพดโดยจุลินทรีย์. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิโรจน์ จันทรัตน์. 2537. กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์ปีก. ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2549. ข้าวโพด. แหล่งที่มา:
<http://www.doae.go.th/plant/corn.html>. 15 มกราคม 2549.
- อานนท์ ประเสริฐศรี, วิเชียร กิจปรีชาวนิช, สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล, จริญญา เจตนะจิตร และนภา โล่ห์ทอง. 2543. การผลิตเอนไซม์ β -xylanase ที่ปราศจากเซลล์จากเชื้อรา *Humicola lanuginosa* (GRIFFON AND MAUBLANC) BUNCE ด้วยกระบวนการหมักแบบ solid state, น. 279-294. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 38. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Adams, P.R. 1994. Extracellular amylase activities of *Rhizomucor pusillus* and *Humicola lanuginosa* at initial stages of growth. **Mycopathol.** 128: 139-141.
- Aidoo, K.E., R. Hendey and B.J.B. Wood. 1982. Solid State Fermentation. **Adv. Appl. Microbiol.** 28: 201-236.

- Akidumila, F. and B.A. Glatz. 1998. Growth and production of *Apiotrichum curvatum* in tomato juice. **J. Food Protect.** 6: 1515-1517.
- Alam, M., I. Gomes, G. Mohiuddin and M.M. Hoq. 1994. Production and characterization of thermostable xylanase by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocellulose. **Enzyme Microb. Technol.** 16: 298-302.
- Anand, L., S. Krishnamurthy and P.J. Vithayathi. 1990. Purification and properties of xylanase from the thermophilic fungus, *Hemicola lanuginosa* (Griiffon and Maublanc) Bunce. **Arch. Biochem. Biophys.** 276: 546-553.
- Arima, K., W.H. Liu and T. Beppu. 1972. Isolation and identification of the lipolytic and thermophilic fungus. **Agric. Biol. Chem.** 36: 1913-1917.
- Arnesen, S., S.H. Eriksen, J. Olsen and B. Jensen. 1998. Increased production of alpha amylase from *Thermomyces lanuginosus* by the addition of tween 80. **Enzyme Microb. Technol.** 23: 249-252.
- Astarci, E. 2003. **Production and Biochemical Characterization of Polyphenol Oxidase from *Thermomyces lanuginosus*.** M.S. Thesis, Middle East Technical University.
- Avgerinos, G.C. and D.I.C. Wang. 1983. Selective solvent delignification for fermentation enhancement. **Biotechnol. Bioeng.** 25: 67-70.
- Bedford, M.R. and G.G. Partridge. 2001. **Enzyme in Farm Animal Nutrition.** CABI Publ., New York.
- Bennett, N.A., J. Ryan, P. Biely, M. Vrsanska, L. Kremnický, B.J. Macris, D. Kekos, P. Christakopoulos, P. Katapodis, M. Claeysens, W. Nierinckx, P. Ntauma and M.K. Bhat.

1998. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Thermomyces lanuginosus* ATCC 46882. **Carbohydr. Res.** 306: 445-455.
- Berka, R.M., M.W. Rey, K.M. Brown, T. Byan and A.V. Klotz. 1998. Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 4423-4427.
- Bhuiyan, M.M., D.J. Gomes and M.M. Hog. 1997. Introduction of cellulose-free xylanase in thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* RT9. **Bangladesh J. Biochem.** 3(1): 1-10.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic system. **Trends Biotechnol.** 3: 286-289.
- Bisaria, V. S. 1991. Bioprocess of agro-residues to glucose and chemicals, pp. 187-223. In A.M. Martin, ed. **Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products**. Elsevier Appl. Science, London and New York.
- Biswas, R.S., A.K. Mishra and G. Nanda. 1988. Xylanase and xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. **Biotechnol. Bioeng.** 31: 613-616.
- Bonner, J. 1950. **Plant Biochemistry**. Academic Press Inc., New York.
- Boze, H., G. Moulin and P. Galzy. 1995. Production of microbial biomass, pp. 170-220. In H.J. Rehm, G. Reed, A. Puhler and P. Stadler, eds. **Biotechnology : Enzyme, Biomass, Food and Feed**. 2 ed., VCH.
- Cesar, T. and V. Mrša. 1996. Purification and properties of the xylanase produced by *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microb. Technol.** 19: 289-296.
- Chadha, B.S., K. Jaswinder, K. Rubider, H.S. Saini and S. Singh. 1999. Xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* wild and mutant strains. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 15: 217-221.

- Chahal, D.S. 1985. Solid state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production. **Appl. Environ. Microbiol.** 49(1): 205-210.
- Chen, W.P. and A.W. Anderson. 1980. Extraction of hemicellulase from ryegrass straw for the production of glucose isomerase and use of the resulting straw residue for animal feed. **Biotechnol. Bioeng.** 22: 513-519.
- Chesson, A. 1993. Feed enzymes. **Anim. Feed Sci. Technol.** 45: 65-79.
- Christopher, L., S. Bisson, S. Singh, J. Szendefy and G. Szakacs. 2005. Bleach-enhancing abilities of *Thermomyces lanuginosus* xylanase produced by solid state fermentation. **Process Biochem.** 40: 3230-3235.
- Collins, T., C. Gerday and G. Feller. 2004. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanase. **FEMS Microbiol. Rev.** 29: 3-23.
- Colowick, S.P. and N.O. Kaplan. 1955. **Methods in Enzymology. Vol. 1.** Academic Press. New York.
- Cooney, D.G. and R. Emerson. 1964. **Thermophilic Fungi an Account of Their Biology Activity and Classification.** W.H. Freeman and Company, San Francisco and London.
- Cosson, T., A.M.P. Vendrell, B.G. Teresa, D. Rene, P. Taillade and J. Brufau. 1999. Enzymatic assays for xylanase and β -glucanase feed enzymes. **Anim. Feed Sci. Technol.** 77: 345-353.
- Cowling, E.B. and T.K. Kirk. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrate for enzymatic conversion process. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 6: 95-123.

- Damaso, M.C.T., C.M.M.C. Andrade and N. Jr. Pereira. 2002(a). Production and properties of the cellulose-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Brazilian J. Microbiol.** 33: 333-338.
- Damaso, M.C.T., C.M.M.C. Andrade and N. Jr. Pereira. 2002(b). Use of corn cob for endoxylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Biochem. Biotechnol.** 84-86: 821-834.
- Damaso, M.C.T., M.S. Almeida, E. Kurtenbach, O.B. Martins, N. Jr. Pereira, C.M.M.C. Andrade and R.M. Albano. 2003. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 6064-6072.
- Daniel, I.C.W., C.L. Cooney, A.L. Demain, P. Dunnill, A.E. Humphrey and M.D. Lilly. 1979. Aeration and agitation, pp. 157-193. In C.G. Heden, ed. **Ferment. Enzyme Technol.** John Wiley & Sons Inc., New York.
- Deacon, J. 2006. The microbial world: Thermophilic microorganism. Available Source: <http://www.helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/thermo.htm>, March 1, 2006.
- Dekker, R.F.H. and G.N. Richards. 1976. Hemicellulase: Their occurrence, purification, properties and mode of action. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** 32: 278-352.
- Domsch, K.H., W. Gams and T.H. Aderson. 1993. **Compendium of Soil Fungi.** Academic Press, London.
- Draper, S.R. 1976. **Biochemical Analysis in Crop Science.** Oxford university Press, Oxford.
- Eriksson, K.E.L., R.A. Blanchette and P. Ander. 1990. **Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components.** Springer Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Evan, C. 1987. Lignin degradation. **Process Biochem.** 22(4): 102-104.

- Fanta, F.F., T.P. Abbott, A.I. Herman, R.C. Burr and W.M. Doane. 1984. Hydrolysis of wheat straw hemicellulose with trifluoroacetic acid fermentation of xylose with *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnol. Bioeng.** 26: 1122-1125.
- Fiechter, A. 1986. Biodegradation of lignocellulosic materials. **Microbial Utilization of Renewable Res.** 5: 283-290.
- Ghosh, M. and G. Nanda. 1994. Physiological study on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzyme in *Aspergillus sydowii* MG 49. **FEMS. Microbiol. Lett.** 117: 151-156.
- Gomes, J., H. Purkarthofer, M. Hayn, J. Kapplmuller, M. Sinner, and W. Steiner. 1993. Production of a high level of cellulose-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 39: 700-707.
- Goodwin, T.W. and E.I. Mercer. 1972. **Introduction of Plant Biochemistry.** 1st ed. Pergamon Press, New York.
- Graham, H. and D. Balnave. 1995. Dietary Enzymes for Increasing Energy Availability, pp. 295-309. In John, Wallance. R. and A. Chesson, eds. **Biotechnology in Animal Feed and Animal Feeding.** VCH.
- Hasnain, S., K. Adeli and A.C. Storer. 1992. Purification and characterization of an extracellular thiol-containing serine proteinase from *Thermomyces lanuginosus*. **Biochem. Cell Biol.** 70: 177-122.
- Hoq, M.M., C. Hempel and W.D. Deckwer. 1994. Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9: Effect of agitation, aeration and medium component on production. **J. Biotechnol.** 37: 49-58.

- Hoq, M.M. and W.D. Deckwer. 1995. Cellulase-free xylanase by thermophilic fungi: a comparison of xylanase production by two *Thermomyces lanuginosus* strains. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43: 604-609.
- Hrmova, M., P. Biely and M. Vrsanska. 1989. Cellulose and xylan-degrading enzyme of *Aspergillus terreus* and *A. niger*. **Enzyme Microb. Technol.** 11: 610-616.
- Jensen, B., J. Olsen and K. Allermann. 1988. Purification of extracellular amyolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Can. J. Microbiol.** 34: 218-223.
- Jiang, Z. Q., S. Q. Yang, S. S. Tan, L. T. Li and X. T. Li. 2005. Characterization of a xylanase from the newly isolated thermophilic *Thermomyces lanuginosus* CAU44 and its application in bread making. **Lett. Appl. Microbiol.** 41: 69-76.
- Kamiyama, Y., Y. Hirabayashi, Y. Sakai and T. Kobayashi. 1974. Xylose production by hydrolysis of corncobs with dilute sulfurous acid. **J. Ferment. Technol.** 52(9): 669-675.
- Khucharoenphaisan, K. and Kitpreechavanich, V. 2004. High thermostable xylanase producing *Thermomyces lanuginosus* isolated from Thailand, vol 2: 447-451. **KMITL International Conference on Intergration of Science and Technology for Sustainable Development**, Bangkok, Thailand.
- Kirk, T.K. 1983. Degradation and conversion of lignocellulose, pp. 226-295. In J.E. Smith, D.R. Berry and B. Kristiansen (eds). **The Filamentous Fungi Fungal Technology**. Jonh Wiley & Sons Inc., New York.
- Kitpreechavanich, V., M. Hayashi and S. Nagai. 1984(a). Production of xylan degrading enzyme by thermophilic fungi, *Aspergillus fumigatus* and *Humicula lanuginosa*. **J. Ferment. Technol.** 62(1): 63-69.

-
- _____. 1984(b). Purification and properties of endo-(1,4)- β -xylanase from *Humicola lanuginosa*. **J. Ferment. Technol.** 62: 415-420.
- Kunamneni, A., K.S. Kumar and S. Singh. 2005. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for enhanced production of α -amylase in solid state fermentation by *Thermomyces lanuginosus*. **African J. Biotechnol.** 4(7): 708-716.
- Li, Duo-Chuan, Y. Yi-Jung, P. You-Liang and S. Chong-Yao. 1998. Purification and characterization of extracellular glucoamylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Mycol. Res.** 102: 568-572.
- Li, X.T., Z.Q. Jiang, L.T. Li, S. Yang, W.T. Feng, J.Y. Fan and I. Kusakabe. 2005. Characterization of cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS288.54 and its biobleaching effect on wheat straw plup. **Bioresour. Technol.** 96: 1370-1379.
- Lin, J., L.M. Nollovu, S. Singh and B. Pillay. 1999. Purification and biochemical characteristics of β -D-xylanase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* SSBP. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 30: 73-79.
- Liu, W.H., T. Beppu and K. Arima. 1972. Cultural condition and some properties of the lipase of *Humicola lanuginosa* S-38. **Agric. Biol. Chem.** 36: 1919-1924.
- Liu, W.H., T. Beppu and K. Arima. 1973 (a). Purification and general properties of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. **Agric. Biol. Chem.** 37: 157-163.
- _____. 1973 (b). Physical and chemical properties of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. **Agric. Biol. Chem.** 37: 2493-2499.
- _____. 1973 (c). Effect of various factors on lipase action of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. **Agric. Biol. Chem.** 37: 2487-2492.

- Llias, M and M.M. Hoq. 1998. Effect of agitation rate on the growth and production of xylanase-free of cellulose by *Thermomyces lanuginosus* MH4 in bioreactor. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 14: 765-767.
- Maheshwari, R., G. Bharadwaj and M.K. Bhat. 2000. Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64: 461-488.
- Mattson, F.H., R.A. Volpenhein and L. Benjamin. 1970. Inhibition of lipolysis by normal alcohols. **J. Biol. Chem.** 245: 5335-5340.
- McCleary, B.V. 2001. Analysis of Feed Enzymes, pp. 85-107. In Bedford, R., Michael and Gary G. Partridge, eds. **Enzyme in Farm Animal Nutrition**. GABI Publishing.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.
- Montgomery, D.C. 1984. **Design and Analysis of Experiment**. John Wiley and Sons, New York.
- Moo-Young, M., A.R. Moreira and R.P. Tengerdy. 1983. Principle of Solid State Fermentation, pp. 117-144. In J-E Smith., D.R. Berry and B. Kristiansen , eds. **The Filamentous Fungi. Fungal Technol.** John Wiley and Sons Inc., New York.
- Nguyen, Q.D., J.M. Rezessy-Szabo and A. Hoshcke. 2000. Optimisation of composition of media for the production of amylolytic enzymes by *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626. **Food Technol. Biotechnol.** 38: 229-234.
- Nguyen, Q.D., J.M. Rezessy-Szabo, M. Claeysens, I. Stals and A. Hoshcke. 2002. Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme Microb. Technol.** 31: 345-352.

- Nishio, N., H. Korisu and S. Nagai. 1981. Thermophilic cellulase production by *Taralomyces* sp. in solid state cultivation. **J. Ferment. Technol.** 59(5): 407-417.
- Norkrans, B. 1967. Cellulose and cellulolysis. **Adv. Appl. Microbiol.** 9: 91-215.
- Ogden, J.M. 1995. **Feeding Trial to Evaluate the Effects in Feed Enzyme Inclusion upon Growth, Food Conversion Ratio and Carcass Composition of Pigs.** M.S. thesis, University of Bristol, UK.
- Ong, P.S. and G.M. Gaucher. 1973. Protease production by thermophilic fungi. **Can. J. Microbiol.** 19: 129-133.
- _____. 1976. Production, purification and characterization of thermomycolase, the extracellular serine protease of the thermophilic fungus *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*. **Can. J. Microbiol.** 22: 165-176.
- Papagianni, M., S.E. Nokes and K. Filer. 1999. Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochem.** 35: 397-402.
- Parajo, J.C., G. Garrote, J.M. Cruz and H. Dominguez. 2004. Production of xylooligosaccharides by autolysis of lignocelulosic materials. **Trends in Food Sci. Technol.** 15: 115-120.
- Patrick, C.G. 2002. Biocatalysis for the synthesis of polymer precursors. Available Source: <http://webpages.sdsmt.edu/~pgilcrea/research.html>. November 21, 2005.
- Perry, F.G. 1995. Biotechnology in Animal Feeds, pp. 1-15. In John, Wallance. R. and A. Chesson, eds. **Biotechnology Animal Feeds and Animal Feeding.** VCH.
- Petrova, S.D., S.Z. Ilieva, N.G. Bakalova, A.P. Atev, M.K. Bhat and D.N. Kolev. 2000. Production and characterization of extracellular alpha amylases from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* (wild and mutant strains). **Biotechnol. Lett.** 22: 1619-1624.

- Polizeli, M.L.T.M., A.C.S. Rizzatti, R. Monti, H.F. Terenzi, J.A. Jorge and D.S. Amorim. 2005. Xylanase from fungi: Properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 67: 577-591.
- Puchart, V., P. Katapodis, P. Biely, L. Kremnický, P. Christakopoulos, M. Vrsanska, D. Kekos, B.J. Macris and M.K. Bhat. 1999. Production of xylanase, mannanases and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microb. Technol.** 24: 355-361.
- Purkharthofer, H., M. Sinner and W. Steiner. 1993. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* : Optimization of production in submerged and solid state culture. **Enzyme Microb. Technol.** 15: 677-682.
- Purkharthofer, H. and W. Steiner. 1995. Induction of endoxylanase in the fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microb. Technol.** 17: 114-118.
- Reddy, V., P. Reddy, B. Pillay and S. Singh. 2002. Effect of aeration on the production of hemicelluloses by *Thermomyces lanuginosus* SSBP in a 30 L bioreaction. **Process Biochem.** 37: 1221-1228.
- Ronald, R.M. 2004. Enzyme Enhancement of the Nutrition Value of Cereal: Role of Viscous, Water soluble, non starch polysaccharides in Chick Performance. **Enzyme in Poult. Swine Nutr.** 11: 1-10.
- _____. 1997. Enzyme in Poultry and Swine Nutrition. Available Source: <http://www.Idrc.ca/Books/focus/821/chp2.html>, February 25, 2004.
- Rubinder, K., B.S. Chadha, N. Singh, H.S. Saini and S. Singh. 2002. Amylase hyperproduction by deregulated mutants of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **J. Industrial Microb. Biotechnol.** 29: 70-74.

- Rubinder, K., B.S. Chadha, S. Singh and H.S. Saini. 2000. Amylase hyper-producing haploid recombinant strains of *Thermomyces lanuginosus* obtained by intraspecific protoplast fusion. **Can. J. Microbiol.** 46: 669-673.
- Sargantanis, J., M.N. Karins, U.G. Musphy and D. Ryoo. 1993. Effect of operating conditions on solid state fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 42: 149-158
- Schlacher, A., K. Holzmann, M. Hayn, W. Steiner and H. Schwab. 1996. Cloning and characterization of the gene for the thermostable xylanase Xyn A from *Thermomyces lanuginosus*. **J. Biotechnol.** 49:211-218.
- Shenolikar, S. and K.J. Stevenson. 1992. Purification and partial characterization of a thiol proteinase from the thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. **Biochem. J.** 205: 147-152.
- Singh, S., B. Pillay and B.A. Prior. 2000(a). Thermostability of β -xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. **Enzyme Microb. Technol.** 26: 502-508.
- Singh, S., B. Pillay and B.A. Prior. 2000(b). Production and properties of hemicellulase by a *Thermomyces lanuginosus*. **J. Appl. Microbiol.** 88: 975-982.
- Singh, S., J.C. du Preez, B. Pillay and B.A. Prior. 2000(c). The production of hemicellulase by *Thermomyces lanuginosus* strain SSBP influence of agitation and dissolved oxygen tension. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 54: 698-704.
- Singh, S., P. Reddy, J. Haarhoff, P. Biely, B. Janse, B. Pillay, D. Pillay and B.A. Prior. 2000(d). Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase. **J. Biotechnol.** 81: 119-128.
- Sjostrom, E. 1981. **Wood Chemistry Fundamentals and Applications.** Academic press, New York.

- Smith, J.L. and J.A. Alford. 1966. Inhibition of microbial lipases by fatty acids. **Appl. Microbiol.** 14: 699-705.
- Soderlund, T.K. Zhu, A. Jutila and P.K.L. Kinnunen. 2002. Effect of betaine on the structural dynamics of *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** . 26: 75-83.
- Sonia, K.G., B.S. Chadha and H.S. Saini. 2005. Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D₂W₃) under solid state fermentation. **Bioresour. Technol.** 96: 1561-1569.
- Stevenson, K.J. and G.M. Gaucher. 1975. The substrate specificity of thermomycolase, an extracellular serine proteinase from the thermophilic fungus *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*. **Biochem. J.** 151: 527-542.
- Sunna, A. and C. Autranikian. 1997. Xylanolytic enzyme from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.** 17: 39-67.
- Thacker, P.A. and T.C. Baas. 1996. Effect of gastric pH on the activity of exogenous pentosanase and the effect of pentosanase supplementation of the diet on the performance of growing-finishing pig. **Anim. Feed Sci. Technol.** 63: 187-200.
- Tsao, G., T. Ladisch, M. Voloch and P. Bienkowaki. 1982. Production of ethanol and chemical from cellulosic materials. **Process Biochem.** September/October: 34-38.
- Vining, G.G. and R.H. Myers. 1990. Combining taguchi and response surface philosophia dual response approach. **J. Quality Technol.** 22: 38-45.
- Walch, G. 2002. **Proteins Biochemistry and Biotechnology.** John Wiley and Sons, Ltd., New York.

- Wenk, C. 2001. The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. **Anim. Feed Sci. Technol.** 90: 21-33.
- William, C. 2000. **Feed Enzymes for Pigs**. Revealing Research. Alberta Pork Research Centre.
- Wong, K.K.Y., L.U.L. Tan and J.N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: function and applications. **Microbiol. Rev.** 52: 305-317.
- Xiong, H., A. Nyssola, J. Janis, O. Pastinen, N. von Weymarn, M. Leisola and O. Turunen. 2004. Characterization of the xylanase produced by submerged cultivation of *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635. **Enzyme Microb. Technol.** 35: 93-99.
- Yoshioka . H., S. Chavanich, N. Nilubol and S. Hiyashida. 1981. Production and characterization of thermostable xylanase from *Tricoderma byssochlamidoides* YH-50. **Agric. Biol. Chem.** 45(3): 579-586.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

Soluble starch	2	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Bacto agar	15	กรัม

2. อาหารสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปส

Peptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1	กรัม
Tween 80	10	กรัม
Bacto agar	20	กรัม

3. อาหารสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ฟอสเฟตัส

Phytic acid	5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัม
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.01	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.78	กรัม
Bacto agar	15	กรัม

4. อาหารสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส

Sodium caseinate	2	กรัม
Glucose	1	กรัม
K_2HPO_4	0.2	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4$	trace	กรัม
Bacto agar	20	กรัม

5. Yeast extract-Glucose medium

Yeast extract	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	20	กรัม

6. Yeast extract-Starch medium (YpSS)

Yeast extract	4	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
Soluble starch	15	กรัม
Bacto agar	20	กรัม

7. Wheat bran medium

Wheat bran	100	กรัม
Agar	15	กรัม

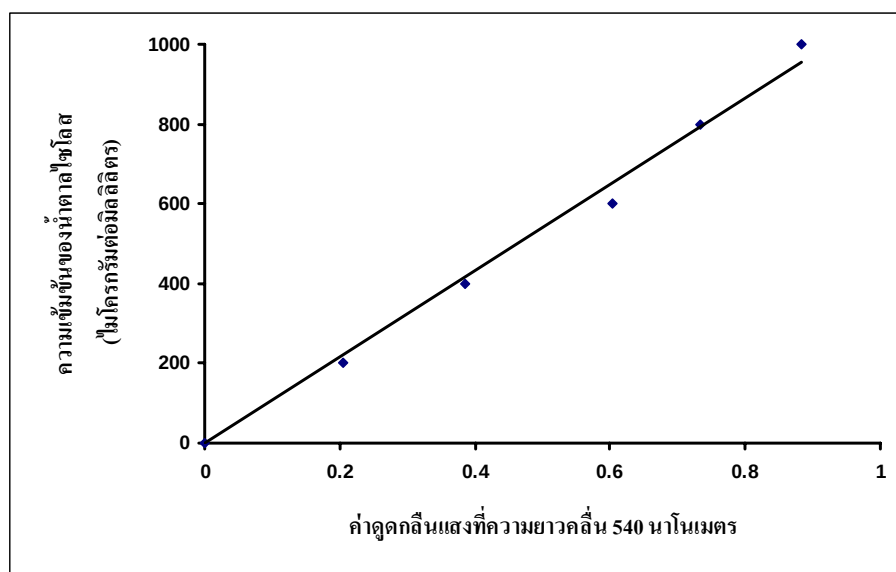
ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

1.1 เอนไซม์ไซลาลเนส

DNS reagent

เตรียมโดยชั่ง 3,5 dinitrosalicylic acid 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมฟีนอล 2 กรัม แล้วเติมโซเดียมไนไตรท์ 0.5 กรัมค่อย ๆ เติมสารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 200 กรัมที่อยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากันนำไปอังในอ่างน้ำร้อนจนสารละลายใส จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส

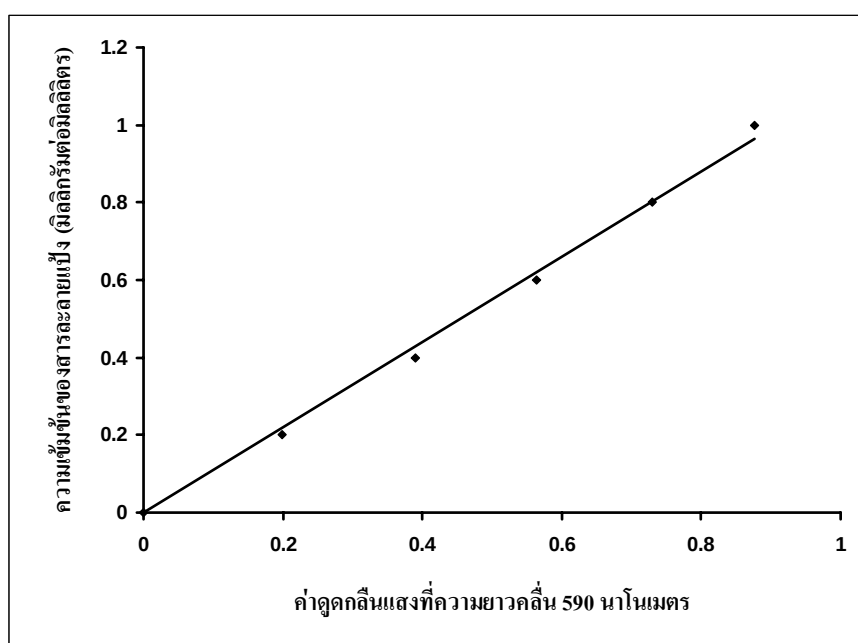
1.2 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

Iodine reagent

- (1) เตรียมสารละลายไอโอดีน 0.02 เปอร์เซ็นต์ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
- (2) เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย 0.5 นอร์มอล

ไฮโดรคลอริก

- (3) ผสมสารในข้อ (1) และ (2) ให้เข้ากันแล้วเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานของแป้ง

2. การนับจำนวนสปอร์ โดยใช้ Haemocytometer

2.1 เช็ดสไลด์และ cover glass ของ haemocytometer ให้สะอาด วาง cover glass ให้อยู่ตรงกลางสไลด์ แล้วใช้ฟาสเจอร์ปีเปิดดูดสารละลายสปอร์ มาแตะที่ขอบ cover glass ให้สารละลายสปอร์แทรกไประหว่าง cover glass และสไลด์จนเต็มพอดี

2.2 นำไปนับจำนวนสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ที่ objective กำลังขยาย 40 เท่า นับจำนวนสปอร์ในแต่ละช่องเล็ก ทำการนับสปอร์ไม่น้อยกว่า 10 ช่อง

4.3 คำนวณจำนวนสปอร์

$$\begin{aligned}
 \text{ขนาดความลึกของ haemocytometer ที่ใช้} &= 0.1 \text{ มิลลิเมตร} \\
 \text{ขนาดพื้นที่ของแต่ละช่องเล็ก} &= 0.0025 \text{ ตารางมิลลิเมตร} \\
 \text{เพราะฉะนั้นปริมาตรของแต่ละช่องเล็ก} &= 0.00025 \text{ ลูกบาศก์มิลลิเมตร} \\
 \text{จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร} &= \frac{\text{จำนวนสปอร์ที่นับได้} \times 10^3}{\text{จำนวนช่องที่นับ} \times 0.00025}
 \end{aligned}$$

3. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก

3.1 อบกระดองฟอยล์ที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง

3.2 นำตัวอย่างใส่ลงในกระดองฟอยล์หาน้ำหนัก ชั่งหาน้ำหนักทั้งหมด (น้ำหนักตัวอย่าง = น้ำหนักทั้งหมด - น้ำหนักกระดองฟอยล์)

3.3 นำตัวอย่างในกระดองฟอยล์หาน้ำหนักอบที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส ตลอดคืน

3.4 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก นำค่าน้ำหนักของกระดองฟอยล์ที่หาน้ำหนักมาหักออก ผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของน้ำหนักตัวอย่างที่ได้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่าง} - \text{น้ำหนักแห้ง})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

4. การเตรียมแอซิดบัพเฟอร์ (Colowick and Kaplan, 1955)

สารละลาย A: 0.2 M acetic acid (CH_3COOH 11.55 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M sodium acetate (CH_3COONa 16.4 กรัม หรือ $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 27.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

เตรียมโดยผสมสารละลายตามพีเอชที่ต้องการแล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรทั้งหมดครบ 100 มิลลิลิตร

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
46.3	3.7	3.6
44.0	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.0	30.0	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.5	5.2
8.8	41.2	5.4
4.8	45.2	5.6

5. การเตรียมซีเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Colowick and Kaplan, 1955)

สารละลาย A: 0.1 M citric acid (19.21 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate (53.65 กรัม ของ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ หรือ 71.7 กรัม ของ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
44.6	5.4	2.6	24.3	25.7	5.0
42.2	7.8	2.8	23.3	26.7	5.2
39.8	10.2	3.0	22.2	27.8	5.4
37.7	12.3	3.2	21.0	29.0	5.6
35.9	14.1	3.4	19.7	30.3	5.8
33.9	16.1	3.6	17.9	32.1	6.0
32.3	17.7	3.8	16.9	33.1	6.2
30.7	19.3	4.0	15.4	34.6	6.4
29.4	20.6	4.2	13.6	36.4	6.6
27.8	22.2	4.4	9.1	40.9	6.8
26.7	23.3	4.6	6.5	43.6	7.0
25.2	24.8	4.8			

แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรทั้งหมดครบ 100 มิลลิลิตร

6. การเตรียมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Colowick and Kaplan, 1955)

สารละลาย A: 0.2 M monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัม หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรทั้งหมดครบ 200 มิลลิลิตร

7. การเตรียม Tris(hydroxymethyl) aminomethane buffer (Colowick and Kaplan, 1955)

สารละลาย A: 0.2 M Tris(hydroxymethyl) aminomethane (24.2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M HCl

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH
50.0	44.2	7.2
50.0	41.4	7.4
50.0	38.4	7.6
50.0	32.5	7.8
50.0	26.8	8.0
50.0	21.9	8.2
50.0	16.5	8.4
50.0	12.2	8.6
50.0	8.1	8.8
50.0	5.0	9.0

แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรทั้งหมดครบ 200 มิลลิลิตร

8. การเตรียม glycine-NaOH buffer (Colowick and Kaplan, 1955)

สารละลาย A: 0.2 M glycine ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 10.01 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M Sodium hydroxide (NaOH 8.0 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตรและสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ

B (มิลลิลิตร)	พีเอช	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
4.0	8.6	22.4	9.6
6.0	8.8	27.2	9.8
8.8	9.0	32.0	10.0
12.0	9.2	38.6	10.4
16.8	9.4	45.5	10.6

แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรทั้งหมดครบ 200 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
ข้อมูลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ๑๑ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ไลเปส โปรติเอสและไฟเตส
ของเชื้อรา *T. lanuginosus*

สายพันธุ์ เชื้อรา	amylase	lipase	protease	phytase	สายพันธุ์ เชื้อรา	amylase	lipase	protease	phytase
TISTR3645	+	+	-	-	THKU27	+	+	+	-
THKU2	+	+	+	-	THKU28	+	+	-	-
THKU3	+	+	-	-	THKU29	+	+	-	-
THKU4	+	+	-	-	THKU30	+	+	+	-
THKU5	+	+	-	-	THKU31	+	+	-	-
THKU6	+	+	-	-	THKU32	+	+	+	-
THKU7	+	+	+	-	THKU33	+	+	-	-
THKU8	+	+	-	-	THKU34	+	+	-	-
THKU9	+	+	+	-	THKU35	+	+	+	-
THKU10	+	+	-	-	THKU36	+	+	+	-
THKU11	+	+	+	-	THKU37	+	+	+	-
THKU12	+	+	-	-	THKU38	+	+	-	-
THKU13	+	+	-	-	THKU39	+	+	-	-
THKU14	+	+	-	-	THKU40	+	+	-	-
THKU15	+	+	+	-	THKU41	+	+	+	-
THKU16	+	+	+	-	THKU42	+	+	+	-
THKU17	+	+	-	-	THKU43	+	+	-	-
THKU18	+	+	-	-	THKU44	+	+	+	-
THKU19	+	+	-	-	THKU45	+	+	-	-
THKU20	+	+	-	-	THKU46	+	+	-	-
THKU21	+	+	-	-	THKU47	+	+	-	-
THKU22	+	+	-	-	THKU48	+	+	+	-
THKU23	+	+	+	-	THKU49	+	+	+	-
THKU24	+	+	+	-	THKU50	+	+	-	-
THKU25	+	+	-	-	THKU51	+	+	-	-
THKU26	+	+	+	-	THKU52	+	+	+	-

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

สายพันธุ์ เชื้อรา	amylase	lipase	protease	phytase	สายพันธุ์ เชื้อรา	amylase	lipase	protease	phytase
THKU53	+	+	+	-	THKU72	+	-	+	-
THKU54	+	-	+	-	THKU73	+	+	-	-
THKU55	+	+	+	-	THKU74	+	+	+	-
THKU56	+	+	-	-	THKU75	+	-	-	-
THKU57	+	+	-	-	THKU76	+	-	+	-
THKU58	+	+	-	-	THKU77	+	+	+	-
THKU59	+	-	+	-	THKU78	+	+	-	-
THKU60	+	+	-	-	THKU80	+	+	+	-
THKU61	+	-	+	-	THKU81	+	+	-	-
THKU62	+	+	-	-	THKU82	+	+	-	-
THKU63	+	+	+	-	THKU83	+	+	+	-
THKU64	+	+	-	-	THKU84	+	+	+	-
THKU65	+	+	-	-	THKU85	+	+	-	-
THKU66	+	+	+	-	THKU86	+	-	-	-
THKU67	+	+	+	-	THKU87	+	+	+	-
THKU68	+	+	+	-	THKU88	+	+	-	-
THKU69	+	-	-	-	THKU89	+	+	+	-
THKU70	+	+	-	-	THKU90	+	-	-	-
THKU71	+	+	+	-	THKU91	+	+	-	-

+ หมายถึง ผลิตเอนไซม์

- หมายถึง ไม่ผลิตเอนไซม์

ตารางผนวกที่ ค2 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำจากเชื้อรา *T.lanuginosus* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state โดยใช้วัสดุหมักที่มีความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ประกอบด้วยขังข้าวโพดหรือขังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่าง 5 กรัม รำข้าวสาลี 5 กรัมและเกลบ 2 กรัมเป็นเวลา 5 วัน ที่ 50 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)		สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยไขมันที่ละลายน้ำ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	
	ขังข้าวโพด*	ขังข้าวโพด		ขังข้าวโพด*	ขังข้าวโพด
TISTR3645	187	23	THKU25	1050	994
THKU2	944	495	THKU26	1051	1036
THKU3	468	359	THKU27	518	454
THKU4	923	846	THKU28	510	440
THKU5	1052	985	THKU29	536	434
THKU6	353	57	THKU30	554	453
THKU7	465	430	THKU31	517	429
THKU8	986	961	THKU32	541	423
THKU9	516	440	THKU33	630	395
THKU10	975	977	THKU34	480	435
THKU11	1035	1001	THKU36	561	206
THKU12	1075	1007	THKU38	485	385
THKU13	540	446	THKU39	599	628
THKU14	507	93	THKU40	480	571
THKU15	497	448	THKU41	475	590
THKU16	605	462	THKU42	553	437
THKU17	565	438	THKU43	425	426
THKU18	516	426	THKU44	265	100
THKU19	614	580	THKU45	607	651
THKU20	578	433	THKU46	947	800
THKU21	1046	980	THKU47	439	175
THKU22	1023	1016	THKU48	933	692
THKU23	189	174	THKU49	952	655
THKU24	191	177	THKU50	627	607

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยไฮโดรไลสที่ละลายน้ำ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)		สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยไฮโดรไลสที่ละลายน้ำ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ซังข้าวโพด*	ซังข้าวโพด		ซังข้าวโพด*	ซังข้าวโพด
THKU51	469	519	THKU72	598	603
THKU52	608	552	THKU73	594	594
THKU53	358	73	THKU74	553	144
THKU54	605	424	THKU75	549	567
THKU55	892	575	THKU76	591	643
THKU56	127	49	THKU77	431	507
THKU57	618	631	THKU78	425	465
THKU58	267	530	THKU79	642	455
THKU59	94	470	THKU80	445	332
THKU60	479	103	THKU81	999	969
THKU61	626	654	THKU82	596	602
THKU62	607	630	THKU83	446	463
THKU63	711	264	THKU84	917	583
THKU64	613	650	THKU85	970	674
THKU65	552	468	THKU86	930	920
THKU66	616	598	THKU87	596	627
THKU67	521	502	THKU88	9	241
THKU68	604	624	THKU89	397	449
THKU69	931	729	THKU90	464	493
THKU70	603	475	THKU91	415	441
THKU71	621	647			

* ซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่าง

ตารางผนวกที่ ค3 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไขมันที่ไมละลายน้ำจากเชื้อรา *T.lanuginosus* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state โดยใช้วัสดุหมักที่มีความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยซังข้าวโพดหรือซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ค้าง 5 กรัม รำข้าวสาลี 5 กรัม และแกลบ 2 กรัม เป็นเวลา 5 วัน ที่ 50 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยไขมันที่ไมละลายน้ำ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)		สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยไขมันที่ไมละลายน้ำ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	
	ซังข้าวโพด*	ซังข้าวโพด		ซังข้าวโพด*	ซังข้าวโพด
TISTR3645	324	329	THKU25	312	278
THKU2	306	24	THKU26	501	300
THKU3	347	66	THKU27	242	414
THKU4	29	298	THKU28	258	222
THKU5	470	271	THKU29	311	365
THKU6	251	392	THKU30	321	389
THKU7	352	387	THKU31	286	345
THKU8	189	271	THKU32	229	209
THKU9	333	395	THKU33	236	299
THKU10	520	413	THKU34	172	297
THKU11	312	270	THKU36	184	43
THKU12	262	240	THKU38	148	154
THKU13	314	339	THKU39	400	212
THKU14	146	34	THKU40	247	155
THKU15	329	323	THKU41	192	213
THKU16	311	403	THKU42	159	130
THKU17	187	273	THKU43	325	226
THKU18	244	281	THKU44	57	304
THKU19	403	372	THKU45	120	345
THKU20	234	294	THKU46	271	79
THKU21	265	261	THKU47	91	214
THKU22	456	271	THKU48	228	155
THKU23	40	137	THKU49	368	22
THKU24	46	135	THKU50	300	293

ตารางผนวกที่ ค3 (ต่อ)

สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยไฮโดรไลติกที่ไม่ละลายน้ำ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)		สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยไฮโดรไลติกที่ไม่ละลายน้ำ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	
	ซังข้าวโพด*	ซังข้าวโพด		ซังข้าวโพด*	ซังข้าวโพด
THKU51	149	102	THKU72	237	337
THKU52	312	232	THKU73	262	286
THKU53	107	148	THKU74	75	39
THKU54	298	89	THKU75	252	286
THKU55	367	30	THKU76	123	265
THKU56	52	45	THKU77	128	186
THKU57	315	348	THKU78	229	194
THKU58	61	126	THKU79	228	341
THKU59	13	186	THKU80	125	52
THKU60	153	54	THKU81	244	256
THKU61	388	418	THKU82	186	370
THKU62	262	276	THKU83	210	129
THKU63	167	72	THKU84	264	275
THKU64	299	288	THKU85	55	310
THKU65	182	59	THKU86	183	345
THKU66	352	342	THKU87	176	315
THKU67	202	202	THKU88	18	101
THKU68	188	325	THKU89	105	233
THKU69	168	283	THKU90	293	259
THKU70	269	216	THKU91	194	26
THKU71	315	480			

* ซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ด่าง

ตารางผนวกที่ ๔ กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture ในฟลาสก์ที่มีอาหารที่ประกอบด้วยซังข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร tween 80 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 15 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน ที่ 50 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิกรัม)		สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	
	ไซแลนที่ ละลายน้ำ	ไซแลนที่ ไม่ละลายน้ำ		ไซแลนที่ ละลายน้ำ	ไซแลนที่ ไม่ละลายน้ำ
TISTR3645	341	108	THKU25	670	65
THKU2	575	13	THKU26	352	20
THKU3	479	185	THKU27	530	89
THKU4	451	335	THKU28	557	88
THKU5	582	30	THKU29	189	27
THKU6	393	80	THKU30	198	25
THKU7	527	92	THKU31	433	63
THKU8	619	43	THKU32	486	139
THKU9	473	262	THKU33	551	128
THKU10	506	92	THKU34	491	139
THKU11	538	45	THKU36	514	174
THKU12	548	110	THKU38	517	149
THKU13	513	135	THKU39	602	102
THKU14	546	10	THKU40	382	101
THKU15	555	157	THKU41	469	101
THKU16	506	86	THKU42	537	232
THKU17	459	36	THKU43	464	136
THKU18	423	95	THKU44	465	152
THKU19	409	91	THKU45	636	173
THKU20	499	247	THKU46	509	99
THKU21	617	139	THKU47	491	169
THKU22	649	49	THKU48	498	99
THKU23	568	270	THKU49	488	88
THKU24	629	247	THKU50	633	148

ตารางผนวกที่ ค4 (ต่อ)

สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ไลลาเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)		สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ไลลาเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	ไลแลนที่ ละลายน้ำ	ไลแลนที่ ไม่ละลายน้ำ		ไลแลนที่ ละลายน้ำ	ไลแลนที่ ไม่ละลายน้ำ
THKU51	42	46	THKU72	591	118
THKU52	45	7	THKU73	568	73
THKU53	516	133	THKU74	529	3
THKU54	570	80	THKU75	734	241
THKU55	448	121	THKU76	514	138
THKU56	682	317	THKU77	687	198
THKU57	36	18	THKU78	385	112
THKU58	464	126	THKU79	392	13
THKU59	482	79	THKU80	427	112
THKU60	220	7	THKU81	341	28
THKU61	567	133	THKU82	551	101
THKU62	557	124	THKU83	625	97
THKU63	478	198	THKU84	683	234
THKU64	605	120	THKU85	686	70
THKU65	563	82	THKU86	737	133
THKU66	588	177	THKU87	564	147
THKU67	613	171	THKU88	626	317
THKU68	29	15	THKU89	511	10
THKU69	616	202	THKU90	529	119
THKU70	555	75	THKU91	525	65
THKU71	636	136			

ตารางผนวกที่ ๑๕ กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของเชื้อรา *T. lanuginosus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแบบ solid state และ submerge culture

สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิกรัม)			สายพันธุ์ เชื้อรา	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิกรัม)		
	Solid State		Submerge		Solid State		Submerge
	ซังข้าวโพด*	ซังข้าวโพด	ซังข้าวโพด		ซังข้าวโพด*	ซังข้าวโพด	ซังข้าวโพด
TISTR3645	8	15	15	THKU26	13	10	26
THKU2	18	45	49	THKU27	115	0	5
THKU3	31	70	17	THKU28	93	1	3
THKU4	0	0	8	THKU29	34	32	12
THKU5	30	36	4	THKU30	39	34	15
THKU6	76	16	0	THKU31	65	4	32
THKU7	0	0	0	THKU32	29	3	7
THKU8	51	8	55	THKU33	77	30	21
THKU9	3	0	0	THKU34	33	15	23
THKU10	14	50	39	THKU36	72	44	8
THKU11	49	25	13	THKU38	41	71	13
THKU12	83	61	22	THKU39	45	27	9
THKU13	42	0	10	THKU40	30	48	8
THKU14	13	0	2	THKU41	61	59	15
THKU15	1	0	8	THKU42	77	18	36
THKU16	5	0	0	THKU43	54	23	4
THKU17	29	0	0	THKU44	58	12	42
THKU18	27	0	0	THKU45	16	54	17
THKU19	22	0	12	THKU46	5	30	0
THKU20	0	0	0	THKU47	60	21	30
THKU21	22	30	10	THKU48	8	94	14
THKU22	30	9	51	THKU49	28	0	57
THKU23	9	15	20	THKU50	0	0	7
THKU24	23	16	0	THKU51	51	104	29
THKU25	25	18	0	THKU52	3	11	7

ตารางผนวกที่ ค5 (ต่อ)

กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส				กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส			
สายพันธุ์ เชื้อรา	(หน่วยต่อมิลลิลิตร)			สายพันธุ์ เชื้อรา	(หน่วยต่อมิลลิลิตร)		
	Solid State		Submerge		Solid State		Submerge
	ซังข้าวโพด*	ซังข้าวโพด	ซังข้าวโพด		ซังข้าวโพด*	ซังข้าวโพด	ซังข้าวโพด
THKU53	8	11	11	THKU73	13	12	4
THKU54	0	3	4	THKU74	62	0	4
THKU55	27	69	12	THKU75	33	0	164
THKU56	20	21	17	THKU76	0	0	20
THKU57	20	0	6	THKU77	25	21	25
THKU58	27	89	22	THKU78	41	25	18
THKU59	2	53	22	THKU79	0	41	14
THKU60	26	55	21	THKU80	14	15	15
THKU61	38	41	5	THKU81	2	7	31
THKU62	16	11	0	THKU82	0	0	2
THKU63	101	34	7	THKU83	15	11	25
THKU64	7	11	8	THKU84	0	10	20
THKU65	23	16	0	THKU85	17	34	6
THKU66	15	2	7	THKU86	25	56	43
THKU67	43	21	32	THKU87	0	0	2
THKU68	7	0	5	THKU88	25	28	31
THKU69	30	36	44	THKU89	15	33	21
THKU70	14	0	0	THKU90	74	95	21
THKU71	6	21	0	THKU91	17	35	24
THKU72	7	1	16				

* ซังข้าวโพดที่ผ่านการแช่ต่าง

หมายเหตุ: การเพาะเลี้ยงแบบ solid state ทำการสกัดเอนไซม์จากวัสดุหมักด้วยน้ำกลั่น 36 มิลลิลิตร
กรองเอาน้ำใสไว้วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ตารางผนวกที่ ๑๖ ความสามารถในการย่อยซังข้าวโพดของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *T. lanuginosus*
สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ solid state

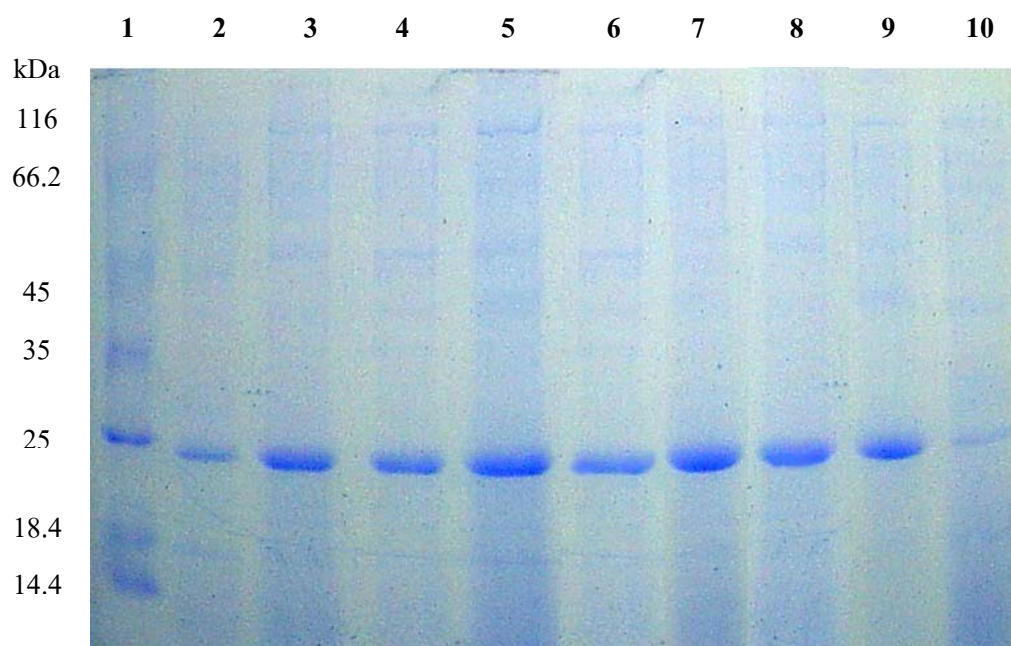
สายพันธุ์เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ ไม่ละลายน้ำ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	ความสามารถในการย่อย ซังข้าวโพด (ug/ml/h/U)
THKU71	480	0.37
THKU61	418	0.39
THKU27	414	0.28
THKU10	423	0.44
THKU16	403	0.36
THKU 9	395	0.49
THKU 6	392	0.37
THKU30	389	0.44
THKU 7	387	0.59
THKU19	372	0.41

ตารางผนวกที่ ค7 ความสามารถในการย่อยซังข้าวโพดของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *T. lanuginosus*
สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ submerge culture

สายพันธุ์เชื้อรา	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ ไม่ละลายน้ำ (หน่วยต่อมิลลิกรัม)	ความสามารถในการย่อย ซังข้าวโพด (ug/ml/h/U)
THKU 4	335	0.92
THKU56	317	0.95
THKU88	317	0.16
THKU23	270	0.38
THKU 9	262	0.59
THKU24	247	0.60
THKU20	247	0.37
THKU75	241	1.06
THKU84	234	0.31
THKU42	232	0.26

ตารางผนวกที่ ค8 ความสามารถในการยิดเกาะสับสเตรตไม่ละลายน้ำของเอนไซม์ไฮลาเนสจากเชื้อ
รา *T. lanuginosus* สายพันธุ์ต่าง ๆ

สายพันธุ์เชื้อรา	เปอร์เซ็นต์การยิดเกาะ			
	ซังข้าวโพด	ไฮแลนไม่ละลายน้ำ	เซลลูโลส	แป้งมันสำปะหลัง
เพาะเลี้ยงแบบ solid state culture				
TISTR3645	4.5	3.2	3.3	0
THKU 6	5.6	3.7	3.4	0
THKU10	8.2	3.8	4.5	0
THKU16	3.2	3.4	2.2	0
THKU27	5.1	4.9	3.1	0
THKU44	2.3	2.2	4.7	0
เพาะเลี้ยงแบบ submerge culture				
THKU 4	3.0	13.7	1.7	0
THKU20	4.1	5.7	2.9	0
THKU56	9.8	20.3	5.6	0
THKU75	6.3	5.6	3.6	0
THKU85	5.9	3.0	3.2	0
THKU86	8.3	5.3	2.5	0



ภาพผนวกที่ ค1 โครมาโทแกรมของ SDS-PAGE จากส่วนโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. lanuginosus* ในอาหาร submerge culture และ solid state ที่มีขังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก

1: โปรตีนมาตรฐาน (kDa)

2: *T. lanuginosus* TISTR3645 ในอาหาร submerge culture

3: *T. lanuginosus* THKU4 ในอาหาร submerge culture

4: *T. lanuginosus* THKU74 ในอาหาร submerge culture

5: *T. lanuginosus* TTHKU75 ในอาหาร submerge culture

6: *T. lanuginosus* THKU86 ในอาหาร submerge culture

7: *T. lanuginosus* TISTR3645 ในอาหาร solid state

8: *T. lanuginosus* TTHKU6 ในอาหาร solid state

9: *T. lanuginosus* THKU10 ในอาหาร solid state

10: *T. lanuginosus* THKU44 ในอาหาร solid state