วิทยานิพนธ์

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งโดยเห็ดนางรม, *Pleurotus ostreatus* DOA 10

PRODUCTION OF NON STARCH POLYSACCHARIDE HYDROLASE BY *PLEUROTUS OSTREATUS* DOA 10

นางสาวณัฐฐา เพ็ญสุภา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ | เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งโดยเห็ดนางรม, *Pleurotus ostreatus* DOA 10

Production of Non Starch Polysaccharide Hydrolase by *Pleurotus ostreatus* DOA 10

นามผู้วิจัย นางสาวณัฐฐา เพ็ญสุภา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

กรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณัฐกานต์ นิตยพัธน์, Ph.D.)

กรรมการ .....

(อาจารย์อัจฉรา พยัพพานนท์, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ๒๙ **เดือน** มีนาคม **พ.ศ.** ๒๕๕๑

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งโดยเห็ดนางรม, *Pleurotus ostreatus* DOA 10

Production of Non Starch Polysaccharide Hydrolase by *Pleurotus ostreatus* DOA 10

โดย

นางสาวณัฐฐา เพ็ญสุภา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2551

ณัฐฐา เพ็ญสุภา 2551: การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งโดยเห็ดนางรม, *Pleurotus ostreatus* DOA 10 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D. 149 หน้า

ศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจากเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* DOA 10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Mandel's solution ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือเพาะเลี้ยงโดยใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 5.5 เป็นเวลา 9 วัน ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (EC 3.2.1.4) เอนไซม์เพคติเนส (EC 3.2.1.15) เอนไซม์ไซลาเนส (EC 3.2.1.8) และเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส (EC 3.2.1.6) เป็น 2.650, 3.664, 8.870 และ 18.113 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ การทำสารละลายเอนไซม์ให้เข้มข้นด้วยเทคนิคอัลตร้าฟิวเตรชั่นโดยใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 10,000 ดาลตัน ส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสมีค่าสูงขึ้นเป็น 194.72, 366.54, 640.25 และ 336.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นศึกษาผลของสารต่างๆต่อกิจกรรมเอนไซม์และความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ พบว่าสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต สารละลายแมงกานีสซัลเฟต สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จะช่วยเพิ่มค่ากิจกรรมเอนไซม์และไม่ก่อให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง โดยสารละลายแมงกานีสซัลเฟตจะช่วยเพิ่มค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดโดยมีค่าเพิ่มขึ้น 151.08 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตจะเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสและเอนไซม์ไซลาเนสโดยมีค่าเพิ่มขึ้น 89.17 และ 15.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารละลายโคบอลต์คลอไรด์จะเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสสูงสุดคือมีค่าเพิ่มขึ้น 44.82 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าสารละลายกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์ จะช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์โดยเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสยังคงมีกิจกรรมเอนไซม์เหลืออยู่ 11.11, 68.56, 8.31 และ 14.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ 70 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 15 นาที ซึ่งการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งและผลกระทบของสารต่างๆ สามารถนำไปสู่การประยุกต์ใช้ภาคอุตสาหกรรมต่อไป

ณัฐฐา เพ็ญสุภา
ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อประธานกรรมการ 19 / มี.ค. / 51

Nattha Bensupa 2008: Production of Non Starch Polysaccharide Hydrolase by *Pleurotus ostreatus* DOA 10. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Suttipun Keawsompong, Ph.D. 149 pages.

Non starch polysaccharide hydrolase from *Pleurotus ostreatus* DOA 10 grown in submerged culture with Mandels' solution was investigated. The effect of carbon sources, nitrogen source, temperature and initial pH in enzyme production were studied. The result shown the best culture condition of *P. ostreatus* DOA 10 to produced non starch polysaccharide hydrolase was 3 % corncob as sole carbon source, 0.5 % peptone as nitrogen source, incubation at 28°C and pH 5.5 as initial pH for 9 days. The hydrolytic enzyme activities reached maximum on day 9 with 2.650, 3.664, 8.870 and 18.113 unites/ml for carboxymethylcellulase (CMCase, EC 3.2.1.4) pectinase (EC 3.2.1.15) xylanase (EC 3.2.1.8) and beta-glucanase (EC 3.2.1.6), respectively. Enzyme concentration was done by ultrafiltration technique with 10,000 daltons. The concentrated enzymes had 194.72, 366.54, 640.25 and 336.70 % higher than homogenated enzyme for CMCase, pectinase, xylanase and beta-glucanase, respectively. The effects of chemicals to non starch polysaccharide hydrolase activities and thermostability at 70°C were revealed. The result showed that cobalt chloride, magnesium chloride, magnesium sulfate, manganese sulfate, potassium chloride and sodium chloride were gave positive result for enzymes activities. Manganese sulfate could increase activity of CMCase upto 151.08 % and magnesium sufate increased pectinase and xylanase activities upto 89.17 and 15.72 %, respectively. Betaglucanse was also increased by cobalt chloride. The best stabilizer was 2M glycerol in which enzymes were stable over 70°C for 15 minutes and gave relative activities of CMCase, pectinase, xylanase and beta-glucanase at 11.11, 68.56, 8.31 and 14.22 percentages, repectively. Knowleaged of enzyme production and effect of ionic substance and sugar alcohol to stability and activity of non starch polysaccharide hydrolase were lead to using these enzymes for biotechnological application in industry.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

19 / Mar / 2008

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ช่วยเหลือในการวางแผนการวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณัฐกานต์ นิตยพัธน์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก อาจารย์ อัจฉรา พยัพพานนท์ กรรมการที่ปรึกษาวิชารองและผู้ช่วยศาสตราจารย์ปรารถนา ปรารถนาดี ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบคุณสมาชิกร่วมห้องปฏิบัติการทุกๆคนสำหรับคำแนะนำ คำปรึกษา บรรยากาศที่ดีในการทำงานและการให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ชายทั้งสองรวมถึงญาติมิตรที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา

ณัฐฐา เพ็ญสุภา

มีนาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	29
สรุป	109
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	111
ภาคผนวก	117
ภาคผนวก ก	118
ภาคผนวก ข	125
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	149

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบหลักในสารประกอบเพคติน	6
2	ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจาก *P. ostreatus* DOA 10 จากการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	36
3	ผลได้เอนไซม์ที่ได้จากการใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	45
4	ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ได้จากการใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคา-ไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	51
5	ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ได้จากการใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	59
6	ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์จากการใช้เพปโตนที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	66
7	ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ	72
8	ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซต์จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่างๆ	78
9	ค่าต่างๆของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งที่ผ่านขั้นตอนการทำอัลตร้าฟิวเตรชั่น	81

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข1	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีนจากเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 ที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตเอนไซม์	126
ข2	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีน จากเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 ซึ่งใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์	128
ข3	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีนจากเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 ซึ่งใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์	130
ข4	กิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีนจากเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	132
ข5	กิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีนจากเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 ที่ใช้เพปโตนที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	134
ข6	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีนที่อุณหภูมิ 28 และ 37 องศาเซลเซลเซียส	136
ข7	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีนที่สภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้น	137
ข8	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งเมื่อผสมเอนไซม์กับสารละลายไอออนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	138
ข9	ผลของความเข้มข้นของสารไอออนิกต่อค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ (%))	139
ข10	ผลของความเข้มข้นของสารไอออนิกต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส	140
ข11	ผลของความเข้มข้นของสารไอออนิกต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส	141

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ข12	ผลของความเข้มข้นของสารไอออนิกต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส	142
ข13	ผลของความเข้มข้นของสารไอออนิกต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลส	143
ข14	ผลของสารละลายไอออนต่อความเสถียรของเอนไซม์	144
ข15	ผลของน้ำตาลแอลกอฮอล์ต่อความเสถียรของเอนไซม์	146
ข16	ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อความเสถียรของเอนไซม์	147
ข17	ผลกระทบของสารผสมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์ กับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	148

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของสารประกอบเซลลูโลส	5
2	โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบเพคติน	7
3	สารประกอบเพคตินในผนังเซลล์พืช	7
4	โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบไซแลน	8
5	การทำงานของเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสซึ่งเป็นแบบจำลองการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส และเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส	10
6	เห็ดนางรม, *Pleurotus ostreatus*	13
7	ผลของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรในการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA	29
8	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์	32
9	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ	39
10	ผลของความเข้มข้นของซังข้าวโพดซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ	40
11	ผลของน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน	42
12	ผลของซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน	47
13	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10	53
14	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์	55
15	ผลของความเข้มข้นของเพปโตนต่อการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10	62
16	ผลของความเข้มข้นของเพปโตนต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์	63
17	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10	68
18	กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	70
19	ผลของค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่อการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10	73
20	ผลของค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	74

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	ผลของสารไอออนิกต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	86
22	ผลของความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกต่อกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลส	88
23	ผลของความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกต่อกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส	90
24	ผลของความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส	91
25	ผลของความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกต่อกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส	93
26	ผลของสารเติมแต่งต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	94
27	ผลของสารไอออนิกต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิ-แซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	96
28	ผลของสารเติมแต่งต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิ-แซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	102
29	ผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	106
30	ผลของการผสมสารไอออนิกที่ส่งผลดีต่อกิจกรรมเอนไซม์กับสารกลีเซอรอลที่ช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง	108

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งโดยเห็ดนางรม, *Pleurotus ostreatus* DOA 10

Production of Non Starch Polysaccharide Hydrolase by *Pleurotus ostreatus* DOA 10

คำนำ

ปัจจุบันธุรกิจด้านเอนไซม์มีการขยายตัวอย่างรวดเร็วเนื่องจากความต้องการของภาคอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งนำเอนไซม์ไปใช้แทนที่การใช้สารเคมีในกระบวนการผลิตหรือผสมในผลิตภัณฑ์สุดท้าย เอนไซม์กลุ่มย่อยสลายเป็นเอนไซม์กลุ่มหนึ่งที่มีการใช้กันมากในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์ อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ฯลฯ ในกระบวนการผลิตเอนไซม์นั้นพบว่าต้นทุนการผลิตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์จะเกี่ยวข้องกับวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งหากสามารถลดต้นทุนในส่วนนี้ได้จะทำให้ต้นทุนการผลิตโดยรวมลดลง ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีราคาไม่แพง และจะส่งผลไปยังอุตสาหกรรมที่บริโภคเอนไซม์ทำให้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้โดยมีต้นทุนในการผลิตต่ำลง เอนไซม์มีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับการใช้สารเคมี คือมีความจำเพาะกับสารบางชนิดทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ สามารถควบคุมการทำงานได้ และไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม แต่ข้อด้อยของเอนไซม์คือเอนไซม์มีความเสถียรต่ำ ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อเพิ่มความเสถียรให้เอนไซม์ พบว่าการทำให้เอนไซม์มีความเสถียรสามารถทำได้หลายวิธีและการใช้สารเคมีในการปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากมีกระบวนการไม่ซับซ้อนเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม การผลิตเอนไซม์มีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงหลายประการ เช่น แหล่งที่มาของเอนไซม์ กระบวนการผลิตและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ เป็นต้น สำหรับแหล่งที่มาของเอนไซม์ เอนไซม์จากจุลินทรีย์นับว่าเป็นแหล่งเอนไซม์ที่มีความโดดเด่นกว่าเอนไซม์ที่ได้จากพืชและสัตว์ เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์น้อยกว่า ส่วนการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์นั้นจะพิจารณาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหมาะสมและไม่ใช่จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) นิยมใช้เอนไซม์จากเชื้อราเนื่องจากให้ปริมาณเอนไซม์สูงและมีค่ากิจกรรม

เอนไซม์ที่เหมาะสม เห็ดนางรม (Oyster mushroom หรือ *Pleurotus ostreatus*) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มรา ขนาดใหญ่ (macro fungi) ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสได้ เพราะในธรรมชาติเห็ดนางรมจะเจริญบนวัสดุที่มีส่วนประกอบเป็นสารประเภทลิกโนเซลลูโลสจึง สามารถสร้างและผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารประเภทลิกโนเซลลูโลสเพื่อนำไปใช้ในการ เจริญเติบโตได้ นอกจากนี้สภาวะแวดล้อมและกระบวนการหมัก เช่น สารอาหาร อุณหภูมิที่ใช้ใน กระบวนการหมัก ค่าความเป็นกรดด่างล้วนมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นจึงควรศึกษาถึงสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์

งานวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาถึงสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์และ การผลิตเอนไซม์ เพื่อนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่ แป้งในอุตสาหกรรม โดยใช้วัตถุดิบที่มีราคาไม่สูงหรือเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมทดแทนการ ใช้สารที่มีมูลค่าสูงในกระบวนการผลิตเพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิตและปรับปรุงคุณสมบัติของ เอนไซม์ให้มีกิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นและมีความเสถียรต่ออุณหภูมิมากขึ้น

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจากเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10

2. ศึกษาแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจากเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10

3. ศึกษาผลของสารไอออนิกและน้ำตาลแอลกอฮอล์ต่อค่ากิจกรรมและความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจากเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10

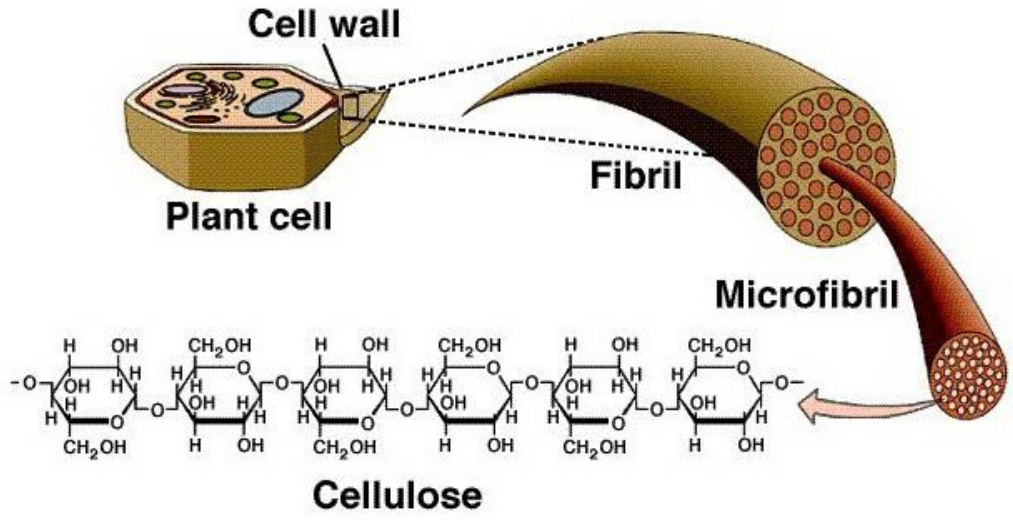
การตรวจเอกสาร

1. สารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (Non Starch Polysaccharide, NSP)

สารพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ที่ย่อยสลายยาก เช่น ไซแลน (xylan) อะราบิโนไซแลน (arabinoxylan) และเส้นใยเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งเป็นเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำ บางครั้งอาจเรียกว่า “ใยอาหาร” เนื่องจากเอนไซม์จากกระเพาะของสัตว์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสารเหล่านี้ได้ สารพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งนั้นพบมากในผนังเซลล์พืชและธัญพืช เช่น ปลายข้าวประกอบด้วย บีต้ากลูแคน (ß-glucan) 30-60 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักแห้งและอะราบิโนไซแลน 50-80 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักแห้ง (Newman, 2007) พืชและธัญพืชมักจะถูกนำไปใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ในส่วนที่ให้พลังงาน เช่น ข้าวโพด ปลายข้าว รำละเอียด มันสำปะหลังและวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ให้โปรตีน เช่น กากถั่วเหลือง เมล็ดถั่วเหลือง กากปาล์ม น้ำมัน กากเมล็ดฝ้าย กากเมล็ดทานตะวัน เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้จะมีคุณค่าทางโภชนาการสูง แต่สัตว์ที่บริโภควัตถุดิบอาหารสัตว์ซึ่งมีส่วนประกอบของสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจะไม่สามารถรับคุณค่าทางสารอาหารได้เต็มที่เนื่องจากเอนไซม์จากตัวสัตว์ไม่สามารถย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งได้ (Sheppy, 2001) นอกจากนี้สารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งอาจส่งผลกระทบต่อความหนืดในกระเพาะของสัตว์กระเพาะเดี่ยว เนื่องจากสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งมักจะอยู่ในรูปอะซิทิล (acetylated form) ซึ่งการที่สารอยู่ในรูปแบบนี้จะมีผลต่อคุณสมบัติทาง physicochemical ของสารพอลิแซคคาไรด์และความสามารถในการละลายของสารอีกด้วย ดังนั้นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์จะทำให้ความหนืดในกระเพาะอาหารสูงขึ้นซึ่งจะขัดขวางกระบวนการย่อยและการดูดซึมอาหารของสัตว์

1.1 สารประกอบเซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งมีโครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (glucose) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า -1,4- ไกลโคซิดิก (ß-1,4- glycosidic bond) ในแต่ละโมเลกุลของเซลลูโลสจะเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและภายนอกโมเลกุล (intra- และ inter-molecular hydrogen bond) ทำให้โครงสร้างของเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นใยซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ มีการเรียงตัวแบบเป็นระเบียบ (microcrystalline) และไม่เป็นระเบียบ (paracrystalline หรือ amorphous) โดยในผนังเซลล์พืชนั้นจะมีเซลลูโลสประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Cullen and Kersten, 1992) ขนาดของโมเลกุลเซลลูโลสแสดงในรูปของน้ำตาลกลูโคสต่อ 1 โมเลกุลของเซลลูโลส (degree of polymerization) โดยจะขนาดโมเลกุลของสารประกอบเซลลูโลสจะอยู่ในช่วง 100-14,000 หน่วย (glucose unit) ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา (Beguin and Aubert, 1994)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารประกอบเซลลูโลส
ที่มา: Moore *et al.* (1998)

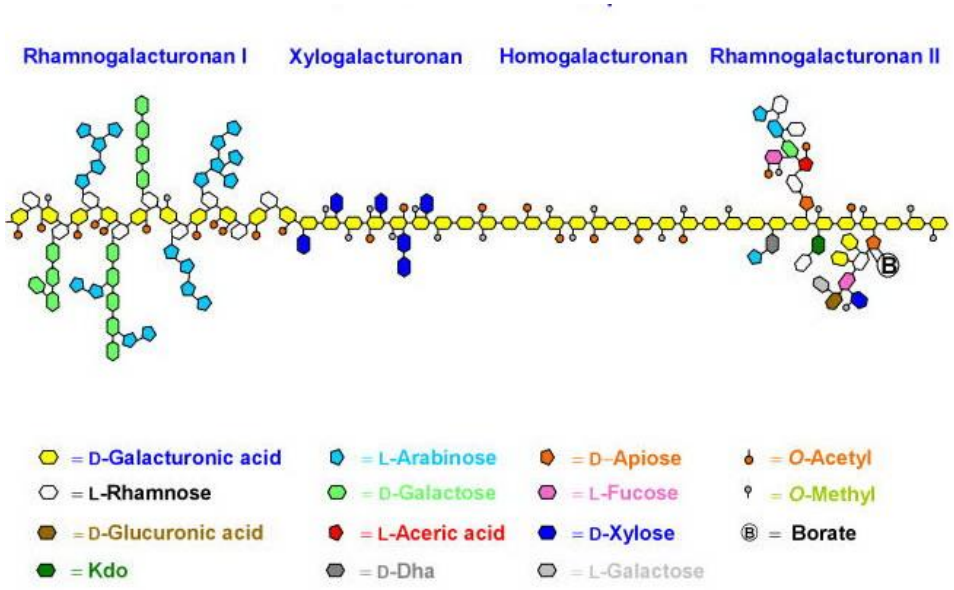
1.2 สารประกอบเพคติน (Pectin)

สารประกอบเพคติคเป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งพบมากในพืชชั้นสูงบริเวณผนังเซลล์ชั้นมิลเดิลลาเมลลา (middle lamella) และผนังเซลล์ชั้นปฐมภูมิ (primary cell wall) โดยสารประกอบเพคตินเป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นกรดกาแลคทูโรนิค (galacturonic acid) เมทานอล (methanol) และน้ำตาลที่มีศักย์ไฟฟ้าเป็นกลาง (neutral sugar) เช่น น้ำตาลไพราโนส (D-pyranose) น้ำตาลไซโลส (D-xylose) และน้ำตาลแรมโนส (D-rhamnose) เป็นต้น ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟ่า -1,4-ไกลโคซิดิก (α-1,4-glycosidic linkage)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบหลักในสารประกอบเพคติน

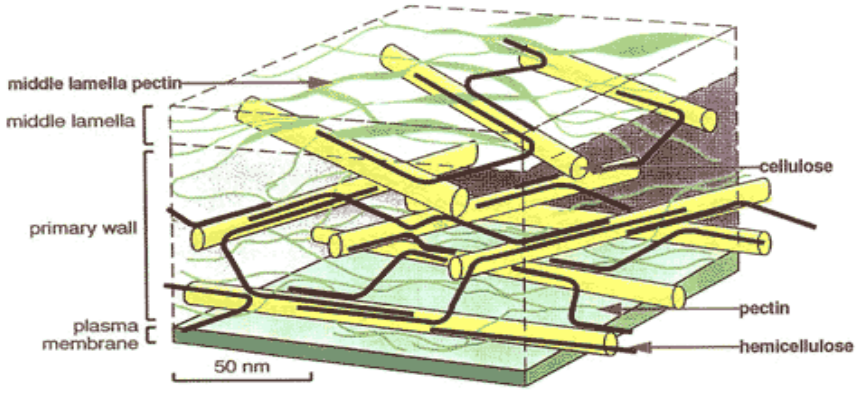
สารประกอบ	องค์ประกอบหลัก
กรดเพคติค (pectic acid) หรือ เพคเตท (pectate)	พอลิกาแลคทูโรนิคแอซิด (polygalacturonic acid)
เพคตินหรือเพคติเนท (pectinate)	กรดเพคติคที่เชื่อมต่อกับเมทานอลหรือน้ำตาลที่มีศักย์ไฟฟ้าเป็นกลาง (neutral sugar)
โปรโตเพคติน (protopectin)	กรดเพคติคที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืช

เพคตินที่พบในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของโปรโตเพคติน (protopectin) ซึ่งเป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำเนื่องจากมีการเชื่อมต่อของสารประกอบเพคตินกับไอออนต่างๆ (Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Fe^{2+}) ทำให้สารประกอบนี้มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (insolubility) สารประกอบเพคตินในผนังเซลล์พืชจะเชื่อมต่อกับสารประกอบต่างๆ เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส นอกจากนี้ยังเชื่อมต่อโดยสร้างพันธะระหว่างหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ของเพคตินกับหมู่เบส (basic group) ของโปรตีนที่อยู่ในผนังเซลล์พืชอีกด้วยและจากลักษณะโครงสร้างของสารประกอบเพคตินที่มีลักษณะโค้งงอเมื่ออยู่ในสารละลายจะส่งผลให้สารประกอบเพคตินมีความยืดหยุ่นและมีลักษณะเป็นวุ้นเนื่องจากมีโมเลกุลของอะราบิโนกาแลกแทน (arabinogalactans) เป็นสายโซ่กิ่ง ด้วยคุณสมบัติพิเศษนี้ทำให้สารประกอบเพคตินถูกนำไปใช้เป็นสารก่อให้เกิดการแขวนลอยซึ่งไม่ละลายน้ำจึงมีลักษณะเป็นวุ้น (jelly agent) และใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด(thickener agent) ซึ่งถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบเพคติน

ที่มา: Scheller (2007)

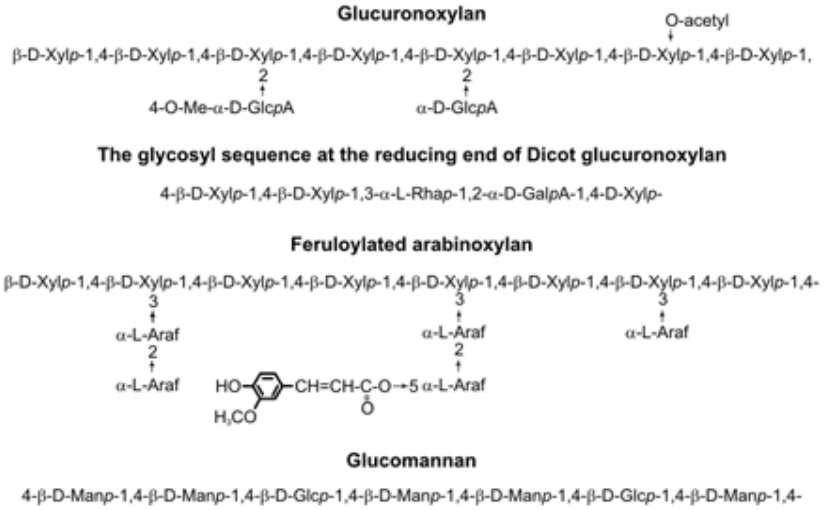


ภาพที่ 3 สารประกอบเพคตินในผนังเซลล์พืช

ที่มา: Internation Pectin Producers Association [IPPA] (2001)]

1.3 สารประกอบไซแลน (Xylan)

ไซแลนเป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลไซโลส (D-xylose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า -1,4- ไกลโคซิดิก (ß-1,4- glycosidic linkage) เป็นสายโซ่หลัก ส่วนสายโซ่กิ่งจะประกอบด้วย น้ำตาลอะราบิโนส (arabinose) น้ำตาลแอลฟ่าอะราบิโนฟูราโนส (alpha-L-arabino-furanose) ซึ่งจะเชื่อมต่อกับคาร์บอนที่ 3 ของน้ำตาลไซโลส และกรดกลูคูโรนิค (D-glucuronic หรือ O-2-methyl-D-glucuronic acid) จะเชื่อมต่อกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของน้ำตาลไซโลส ซึ่งเป็นสายโซ่หลัก โดยสารประกอบไซแลนเป็นสารที่พบมากในเฮมิเซลลูโลสและเป็นส่วนสำคัญในผนังเซลล์พืชซึ่งจะอยู่ระหว่างลิกนินกับคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆ ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวพบว่ามีปริมาณไซแลนมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง (Seyis and Aksoz, 2005)



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบไซแลน

ที่มา: Willie and Stefan (n.d.)

2. เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง

เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีการนำไปใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์จะมีการเติมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารสัตว์ (Bhat and Bhat, 1997) โดยเอนไซม์กลุ่มนี้จะประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด เช่น

2.1 เอนไซม์เซลลูเลส

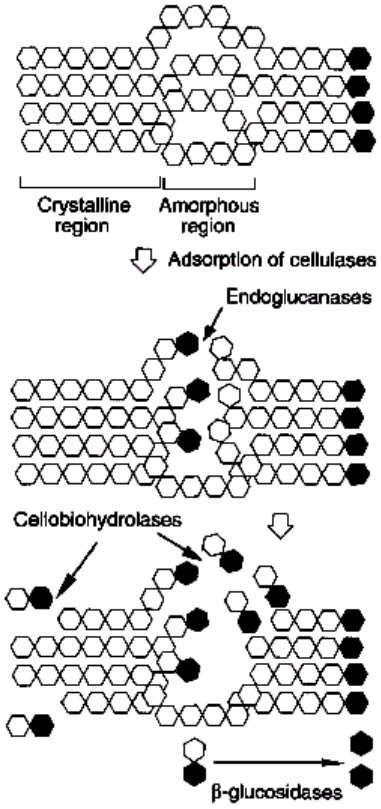
เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสจะพบในจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งในราและแบคทีเรียโดยเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสเป็นเอนไซม์ผสม (multicomponent enzyme) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดทำงานร่วมกันดังนี้

2.1.1 เอนไซม์ไฮโดรเจนบอนเดส (hydrogen bondase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการย่อยสลายเซลลูโลสเป็นพอลิแซคคาไรด์สายสั้นๆ โดยเอนไซม์นี้จะทำให้พันธะไฮโดรเจนที่อยู่ในโมเลกุลอ่อนลงและมีสภาพเหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์บีต้า -1,4-กลูคาเนส (ß-1,4-glucanase)

2.1.2 เอนไซม์บีต้า -1,4- กลูคาเนส (ß-1,4-glucanase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยพอลิ-แซคคาไรด์สายสั้นๆ ให้เป็นน้ำตาลที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและสามารถย่อยอนุพันธุ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose, CMC) ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) แต่ไม่สามารถย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถแบ่งเป็น 2 ชนิดตามการทำงานของเอนไซม์ คือ เอนโดกลูคาเนส (Endo-ß-glucanase, EC 3.2.1.4) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะบีต้า -1,4- ไกลโคซิดิก (ß-1,4-glycosidic linkage) และย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสแบบสุ่ม (random) โดยมีความจำเพาะกับสารประกอบเซลลูโลสที่มีโครงสร้างไม่เป็นระเบียบและอนุพันธ์ของสารประกอบเซลลูโลส เช่น เซลลูโล-โอลิโกแซคคาไรด์ (cello-oligosaccharide) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและโอลิโกเมอร์(oligomer) เช่น เซลโลไบโอส (cellobiose) เป็นต้น และเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสบางตัวสามารถย่อยสลายสารประกอบกลูแคน (glucan) จากข้าวบาร์เลย์ ซึ่งมีโครงสร้างเป็นน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า -1,3- และบีต้า -1,4- ไกลโคซิดิก ส่วนเอนไซม์บีต้า-1,4-

กลูคาเนสที่มีการทำงานอีกแบบหนึ่งคือ เอกโซบีต้า-1,4- กลูคาเนส (Exo-ß-1,4-glucanase, EC 3.2.1.91) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะไกลโคซิดิก (ß-1,4-glycosidic linkage) และย่อยสลายเซลลูโลสจากด้านปลายรีดิวซ์ (reducing end) หรือ ปลายนอนรีดิวซ์ (non reducing end) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอสซึ่งบางครั้งเอนไซม์กลุ่มนี้ถูกเรียกว่า “เอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส” (cellobiohydrolase, CBH)

2.1.3 เอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส (ß–glucosidase, EC 3.2.1.2) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะไกลโคซิดิก (ß-1,4-glycosidic linkage) และย่อยสลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเอนไซม์บีต้า -1,4-กลูคาเนส เช่น เซลโลไบโอส เซลโลเด็กซ์ตริน (cellodextrin) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคส



ภาพที่ 5 การทำงานของเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสซึ่งเป็นแบบจำลองการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส และเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส

ที่มา: Beguin and Aubert (1994)

2.2 เอนไซม์เพคติเนส

เอนไซม์ย่อยสลายเพคตินนั้นจะพบทั้งในแบคทีเรียและรา เช่น *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp.และ *Fusarium* sp. เป็นต้น (Maria *et al.*, 2000) สามารถแบ่งเอนไซม์ตามหน้าที่และการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายเพคติเนสได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้

2.2.1 กลุ่มเอนไซม์โปรโตเพคตินเนส (protopectinase) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยโปร-โตเพคตินให้เป็นเพคตินที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้

2.2.2 กลุ่มเพคตินเอสเตอเรส (pectin esterase, EC 3.1.1.11) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดหมู่เมทิล (methyl group) ออกจากโมเลกุลของเพคติน

2.2.3 กลุ่มเพคตินดีโพลิเมอร์ไรซิ่งค์ (pectin depolymerizing) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างเพคตินสายยาวให้กลายเป็นเพคตินสายสั้นๆ โดยจะประกอบด้วยเอนไซม์ ต่างๆ ดังนี้ เอนไซม์พอลิกาแลกทูโรเนส (Polylgalacturonase) ซึ่งจะมีการทำงานทั้งแบบสุ่ม (Poly (α-1,4-galacturonide) gluconohydrolase, EC 3.2.1.15) และจำเพาะกับปลายด้านนอนรีดิวซ์ของโครงสร้าง (Poly (α-1,4-galacturonide) galacturono-hydrolase, EC 3.2.1.17) เอนไซม์กลุ่มนี้จะจำเพาะกับโมเลกุลของกาแลคทูโรแนน (D-galacturonan) ส่วนเอนไซม์พอลิเมทิลกาแลกทูโรเนส (Polymethylgalacturonase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะกับโมเลกุลของกาแลกทูโรแนนที่มีหมู่เมทิลจะมีการทำงานทั้งแบบสุ่ม (Endo-type) และแบบที่จำเพาะกับปลายนอนรีดิวซ์ของโมเลกุล (Exo-type) ที่เป็นส่วนประกอบในสารประกอบเพคตินเช่นกัน โดยเอนไซม์พอลิเมทิลกาแลกทูโรเนสนั้นจะตัดพันธะแอลฟ่า -1,4-ไกลโคซิดิก ซึ่งจะช่วยกระตุ้นการย่อยสลายเพคติน ส่วนเอนไซม์พอลิเมทิลกาแลกทูโรเนตไลเอส (Polymethyl galacturonate lyase, PMGL) หรือ พอลิเมท็อกซีกาแลกทู-โรไนด์ไลเอส (Polymethoxy galacturonide lysae, EC 4.2.2.10) และพอลิกาแลกทูโรเนตไลเอส (Poly-galacturonate lyase, PGL) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะไกลโคซิดิกจากกระบวนการ transelimination และพันธะที่ไม่อิ่มตัวในโมเลกุลของกรดกาแลกทูโรนิคระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 5 ในด้านปลายนอนรีดิวซ์ ซึ่งจะมีทั้งการทำงานแบบสุ่ม (Poly (1,4-α-D-galacturonide) lyase, EC 4.2.2.2) และแบบที่จำเพาะกับปลายนอนรีดิวซ์ (Poly (1,4)-α-D-galacturonide lyase, EC 4.2.2.9)

2.3 เอนไซม์ไซลาเนส

เอนไซม์ที่ย่อยสลายสารประกอบไซแลนเป็นเอนไซม์ที่มีการทำงานร่วมกัน (synergism) และมีความซับซ้อนโดยจะประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดดังนี้

2.3.1 เอนไซม์เอนโด -1,4- บีต้าไซลาเนส (Endo-1,4-ß-D-xylanase, EC 3.2.1.8) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะไกลโคซิดิกในสารประกอบไซแลน สามารถแบ่งเอนไซม์ตามความจำเพาะต่อพันธะบีต้า -1,4- ได้ 2 ประเภท คือ เอนไซม์เอนโดไซลาเนส (Endo-xylanase) ที่จำเพาะต่อพันธะบีต้า -1,4 เท่านั้น และเอนไซม์เอนโดไซลาเนสที่ไม่จำเพาะต่อพันธะบีต้า -1,4 ซึ่งจะย่อยโครงสร้างทั้งที่อยู่ในลักษณะบีต้า -1,4- ไซแลน และพันธะบีต้า -1,4- ที่เชื่อมต่อกับสารอื่นได้ โดยมีผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ไซโลไบโอส และอนุพันธ์ เช่น อะราบิโนไซโลไบโอส ซึ่งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์อื่นๆในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบไซแลนต่อไป

2.3.2 เอนไซม์บีต้าไซโลซิเดส (ß-xylosidase, EC 3.2.1.37) จะย่อยน้ำตาลไซโล-ไบโอสและสารไซโลโอลิโกแซคคาไรด์จากด้านปลายนอนรีดิวซ์ให้ได้เป็นน้ำตาลไซโลส โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะสูงต่อเซลโลไบโอสแต่ไม่แสดงกิจกรรมต่อสารประกอบไซแลน

2.3.3 เอนไซม์แอลฟ่าอะราบิโนซิเดส (α-arabinosidase, EC 3.2.1.55) จะย่อยสารประกอบแอลฟ่าอะราบิโนฟูราโนไซด์ (alpha-arabinofuranoside) อะราบิแนน (arabinan) อะราบิโนไซแลน (arabinoxylan) และอะราบิโนกาแลกแตน (arabinogalactan) โดยตัดพันธะที่หมู่แอลฟ่า-อะราบิโนฟิวราโนซิล (alpha-arabinosyl) ทางด้านปลายนอนรีดิวซ์ (non reducing alpha-arabino-furanosyl groups)

2.3.4 เอนไซม์แอลฟ่ากลูคูโรนิเดส (α-glucuronidase, EC 3.2.1.55) ทำหน้าที่ย่อยไซโลโอลิโกเมอร์ที่มีความเป็นกรด (acidic xylo-oligomer) ซึ่งเป็นสายโซ่กิ่งของสารประกอบไซแลนให้เป็นสารประกอบพวกกรดยูโรนิค (uronic acid)

2.3.5 เอนไซม์อะซิทิลเอสเตอเรส (acetyl esterase, EC3.1.1.6) หรืออะซิทิลไซลาโน-เอสเตอเรส (acetylxylanoesterase) ทำหน้าที่ตัดหมู่อะซิทิล ออกจากโมเลกุลของน้ำตาล

3. เห็ดนางรมและเอนไซม์จากเห็ดนางรม

เห็ดนางรมเป็นสิ่งมีชีวิตที่ถูกจัดอยู่ในอาณาจักรรา (Kingdom Fungi) ไม่สามารถสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างอาหารเองได้เนื่องจากไม่มีคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) จึงดำรงชีพในลักษณะผู้ย่อยสลายของระบบนิเวศน์ (saprophytes) เห็ดนางรมเป็นราขนาดใหญ่ (Macro fungi) มีลักษณะทางกายภาพเป็นเห็ดที่มีหมวกดอกสีขาวหรือสีเทาขนาด 5-25 เซนติเมตร สร้างสปอร์ (spore) บนเบสิ-เดียม (basidium) จึงถูกจัดอยู่ในไฟลัม (Phylum) เบสิดิโอไมโคต้า (Basidiomycota) ชั้น (class) homobasidiomycetes อันดับ (order) Agaricales วงศ์ (Family) tricholomataceae สกุล (Genus) *Pleurotus* ชนิด (species) *Pleurotus ostreatus*

ภาพที่ 6 เห็ดนางรม, *Pleurotus ostreatus*
ที่มา: Volk (1998)

ในธรรมชาติมักจะพบเห็ดนางรมเจริญบนไม้เนื้อแข็ง เช่น ไม้มะเดื่อ (beechwood) ขี้เลื่อย ฟางข้าว (Zadrazill and Kurtzman, 1982) หรือวัสดุที่มีสารประกอบลิกโนเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักซึ่งเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ที่มีความซับซ้อน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเห็ดนางรมนั้นสามารถย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสได้อย่างสมบูรณ์ โดยเห็ดนางรมจะผลิตเอนไซม์ออกมาเพื่อย่อยสลายสารพอลิแซคคาไรด์และโปรตีนให้เป็นน้ำตาลและกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็กเพื่อให้สารสามารถผ่านผนังเซลล์ของเห็ดซึ่งจะประกอบด้วยกลูโคซามีน (N-acetyl glucosamine) เป็นองค์ประกอบหลักและสารดังกล่าวจึงจะถูกนำไปใช้ในการเจริญได้

เอนไซม์จากเห็ดนางรมมีหลากหลายชนิด เช่น เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส (Petr *et al*., 2005; Mikiashvili *et al*., 2006) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) (Hiroi and Erikson., 1976) เอนไซม์ไทโรซิเนส (Gheibi *et al*., 2006) เป็นต้น และเนื่องจากเห็ดนางรมสามารถย่อยสลายสารที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น สารประกอบที่พบในผนังเซลล์พืชหรือลิกนิน ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายสารพีซีพี (pentachlorophenol, PCP) เช่น สารไดออกซินและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างแบบวงแหวน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) ได้ จึงมีการนำเส้นใยเห็ดนางรมไปใช้ในการจัดการของเหลือจากอุตสาหกรรมและบำบัดสภาวะที่มีการปนเปื้อนในดิน ส่วนของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อเห็ดนางรมจะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

4. การผลิตเอนไซม์

การผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมนั้น สิ่งที่ผู้ผลิตและผู้บริโภคต้องการคือเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพ ปลอดภัยและราคาถูก ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์จำเป็นต้องศึกษาถึงแหล่งของเอนไซม์ รูปแบบการผลิตเอนไซม์ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพและปริมาณเอนไซม์ตามต้องการ ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์มีดังนี้

4.1 แหล่งที่มาของเอนไซม์

เอนไซม์เป็นสารชีวเคมีที่พบได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ ในการผลิตเอนไซม์นั้นนิยมผลิตเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่ได้ ความรวดเร็วและสะดวกในการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์นั้นมีทั้งการผลิตเอนไซม์โดยใช้เชื้อแบคทีเรียและรา เช่น เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้นั้นมีหลายสายพันธุ์ทั้งแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (aerobic bacteria) *Pseudomonas* sp. หรือ *Bacillus* sp. และ *Cellulomonas* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้อากาศหรือไม่ใช้อากาศก็ได้ (facultative anaerobic bacteria) และแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (strictly anaerobic bacteria) เช่น *Clostridium* sp. เป็นต้น โดยเชื้อ *Clostridium* sp. จะเป็นแบคทีเรียที่มีอัตราการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด แต่ไม่นิยมนำแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มาใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เนื่องจากมีอัตราการผลิตเอนไซม์ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการใช้เชื้อราและเชื้อราที่นิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสคือเชื้อราสายพันธุ์ *Trichoderma* sp. เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง (Persson *et al.*, 1991) แต่เชื้อราสายพันธุ์นี้มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถย่อยสารประกอบลิกโนเซลลูโลสได้อย่างสมบูรณ์ คือ ไม่สามารถย่อยสารประกอบลิกนินได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่เชื้อราประเภทเชื้อราขาว (white rot fungi) สามารถย่อยสารประกอบลิกโน-เซลลูโลสได้อย่างสมบูรณ์ โดยเชื้อราประเภทนี้ได้แก่ *P. ostreatus* (Baldrian and Gebriel, 2003), *Penicillium chrysosporium* (Hatakka, 1994) เป็นต้น

4.2 กระบวนการหมัก (fermentation process)

กระบวนการผลิตเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามลักษณะของอาหารเพาะเลี้ยงคือการหมักในอาหารแข็ง (solid state fermentation) และการหมักในอาหารเหลว (liquid state fermentation) ซึ่งการหมักทั้ง 2 แบบจะมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกัน ดังนี้ การหมักในอาหารแข็งมีข้อดีคือจะให้ปริมาณเอนไซม์มากกว่าการผลิตเอนไซม์ด้วยการหมักในอาหารเหลว (Pandey *et al.*, n.d.) นอกจากนี้อาหารเพาะเลี้ยง เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้นั้นไม่ซับซ้อน มีราคาไม่สูงและใช้เงินลงทุนต่ำ ส่วนข้อด้อยของการหมักแบบนี้คือ สามารถใช้ได้กับจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความชื้นต่ำเท่านั้น การควบคุมสภาวะในระหว่างการหมักทำได้ยาก อาจเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ใช้ระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์นานกว่าการผลิตด้วยการหมักในอาหารเหลว และที่สำคัญคือการแยกเอนไซม์ออกจากระบบการหมักและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์นั้นทำได้ยาก อาจมีเอนไซม์บางส่วนถูกส่วนประกอบของอาหารแข็งซึมซับไว้

(Filer, 2002) ส่วนการหมักในอาหารเหลวมีข้อดีคือ การหมักแบบนี้เหมาะสำหรับจุลินทรีย์แทบทุกสายพันธุ์ การแยกเอนไซม์ออกจากระบบการหมักนั้นทำได้ง่าย สามารถควบคุมระบบในระหว่างขั้นตอนการหมักได้ ส่วนข้อด้อยคือ อาหารเพาะเลี้ยงและอุปกรณ์หรือเครื่องมือที่ใช้มีราคาสูง

จากการศึกษาค่าใช้จ่ายในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกระบวนการผลิตทั้ง 2 แบบ พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตโดยการหมักในสภาวะอาหารเหลวมีค่าใช้จ่าย 20 เหรียญสหรัฐต่อการผลิตเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 1 กิโลกรัมในขณะที่การผลิตเอนไซม์ด้วยการหมักในอาหารแข็งจะมีค่าใช้จ่ายเพียง 0.2 เหรียญสหรัฐต่อเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (Tengerdy and Szakacs, 2003) แต่ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์นิยมใช้กระบวนการหมักในอาหารเหลว แม้ว่าการหมักในอาหารแข็งจะให้ผลผลิตเอนไซม์มากกว่าในต้นทุนที่เท่ากัน แต่การผลิตเอนไซม์ในกระบวนการหมักในอาหารแข็งจะมีปัญหาในการควบคุมสภาวะต่างๆระหว่างการหมัก ใช้ระยะเวลานานในการผลิตเอนไซม์และยังมีปัญหาด้านการเก็บเกี่ยวเอนไซม์อีกด้วย

4.3 อาหารเพาะเลี้ยง

อาหารเพาะเลี้ยงจะประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุต่างๆ โดยแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อจะเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส หรือน้ำตาลที่มีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถผ่านผนังเซลล์ได้ เช่น เด็กซ์โตรส (dextrose) แมนนิทอล (manitol) เป็นต้น สำหรับการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งนั้นส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์คือ เชื้อที่มีการเจริญเติบโตดี จะมีการผลิตเอนไซม์สูง ดังนั้นอาหารเพาะเลี้ยงต้องมีความเหมาะสม สนับสนุนการเจริญและอาจมีส่วนของสารที่ก่อให้เกิดการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย เช่น การศึกษาของ Adejoye *et al*. (2006) ที่ศึกษาถึงผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อ *P. florida* รายงานว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อคือ เด็กซ์โตรส น้ำตาลกลูโคสและแมนนิทอล ซึ่งจะส่งเสริมการเจริญของเส้นใยแต่ไม่ก่อให้เกิดการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย ดังนั้นหากต้องการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ เช่น สารประกอบเซลลูโลสควรเลือกแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมทั้งการเจริญและกระตุ้นผลิตเอนไซม์คือ เซลโลไบโอส (cellobiose) และซอร์ฟอโรส (sorphorose) (Suto and Tomita, 2001) ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *P. florida* คือ เคซีน (casein) ยูเรีย (urea) แอมโมเนียมคลอไรด์ (ammonium chloride, NH_4Cl) และมอลต์สกัด (malt extract) ส่วนโซเดียมไนเตรท

(sodium nitrate, $NaNO_3$) และ แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate, $(NH_4)_2SO_4$) จะไม่ส่งผลต่อการเจริญของเส้นใย

สารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนนั้นเป็นส่วนหนึ่งที่ส่งผลต่อต้นทุนการผลิตเอนไซม์ ซึ่งการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมต้นทุนในการผลิตจะเป็นค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับการเตรียมวัตถุดิบและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักให้พร้อมทำงาน ซึ่งจำเป็นต้องใช้วัสดุที่มีราคาไม่สูงมากเพื่อลดต้นทุนในการผลิตด้วยเหตุผลนี้จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการนำวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรมาใช้ทดแทนส่วนประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีราคาสูง ตัวอย่างงานวิจัย เช่น งานวิจัยของ Liming and Xueliang (2004) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* ZU-02 โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าที่ความเข้มข้นของซังข้าวโพด 40 กรัม/ลิตร เชื้อจะมีอัตราการผลิตเอนไซม์ออกมามากที่สุดคือประมาณ 31.3 ± 0.42 ยูนิต / ชั่วโมง และค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามค่าความเข้มข้นของเซลลูโลสที่มีอยู่ในซังข้าวโพด และงานวิจัยของ Juhasz *et al*. (2005) ที่ศึกษาถึงผลของแหล่งคาร์บอนต่างๆต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* พบว่าเอนไซม์ที่ได้จากการใช้ของเหลือจากการเก็บเกี่ยวข้าวโพด (corn stover) เป็นแหล่งคาร์บอนจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส I มากที่สุดคือมีค่าประมาณ 2.23 ยูนิต/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ใช้สารประกอบเซลลูโลสที่ผ่านการกำจัดลิกนิน (delignin) จากไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อนเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนงานวิจัยของ Seyis and Aksoz (2005) ที่ศึกษาถึงแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma hazianum* 1073 D3 ได้กล่าวว่ากากถั่วเหลืองก็เป็นแหล่งไนโตรเจนที่น่าสนใจ แม้ว่ากรณีที่ใช้เพปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อ *T. hazianum* 1073 D3จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมามากกว่าถึงเท่าตัว (44.9 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) แต่เนื่องจากกากถั่วเหลือง (21.8 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) นั้นเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมจึงได้เปรียบในด้านต้นทุนการผลิต

4.4 สภาวะแวดล้อมทางกายภาพ

4.4.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ สำหรับเชื้อจุลินทรีย์จำพวกรานั้นอุณหภูมิจะมีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญของเส้นใย โดยในเชื้อเห็ดนางรมที่ทดสอบการเจริญในช่วงอุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส พบว่ามีอัตราการเจริญสูง

แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมจะอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส (ปัญญาและกิตติพงษ์, 2538) และหากเอนไซม์ที่ต้องการเป็นเอนไซม์ที่มีการผลิตเอนไซม์ควบคู่กับการเจริญ (growth associate) ผลของอุณหภูมิก็จะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ด้วย

4.4.2 สภาวะความเป็นกรดด่าง (ค่าพีเอช)

เชื้อจุลินทรีย์จะสามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีความเป็นกรดด่างหรือค่าพีเอชที่แตกต่างกัน เช่น เห็ดนางรมจะสามารถเจริญได้ดีที่ค่าพีเอชที่เป็นกรดเล็กน้อย ประมาณ พีเอช 5.0-5.2 (ปัญญาและกิตติพงษ์, 2538)

5. การทำให้เอนไซม์เข้มข้นโดยใช้เทคนิคอัลตร้าฟิวเตรชั่น (ultrafiltration)

การทำให้เอนไซม์เข้มข้นคือการกำจัดน้ำและสารอื่นๆที่ไม่ต้องการออกจากสารละลายเอนไซม์ทำให้ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ลดลงแต่ปริมาณเอนไซม์ยังคงเท่าเดิม การทำให้เอนไซม์เข้มข้นมีหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีจะมีข้อเด่น และข้อด้อยแตกต่างกัน การเลือกใช้วิธีการใดนั้นจะพิจารณาจากการนำเอนไซม์ไปใช้ เช่น หากนำเอนไซม์ไปใช้ในทางการแพทย์ที่ต้องการเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูง อาจใช้วิธีที่ต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูงซึ่งจะส่งผลต่อต้นทุนการผลิต แต่หากนำเอนไซม์ไปใช้ในอุตสาหกรรมซึ่งไม่ต้องการความบริสุทธิ์ของเอนไซม์สูงอาจใช้วิธีที่ให้ผลผลิตรวดเร็วและไม่ต้องใช้เทคโนโลยีสูง เทคนิคอัลตร้าฟิวเตรชั่น (ultrafiltration) เป็นเทคนิคการแยกสารที่ใช้มากในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์ อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมเอนไซม์ ฯลฯ หลักการของการทำอัลตร้าฟิวเตรชั่น เป็นการกรองร่วมกับการใช้ความดัน (cross-flow filtration) ผ่านแผ่นกรองที่มีรูกรอง (pore size) ขนาดต่างๆ เพื่อคัดแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลตามต้องการ โดยสารละลายที่ผ่านแผ่นกรองได้จะเรียกว่า “permeate” และสารละลายที่ไม่สามารถผ่านแผ่นกรองได้จะเรียกว่า “retentate” ข้อดีของเทคนิคนี้คือ ความสามารถในการแยกสารจะขึ้นอยู่กับแผ่นกรองที่ใช้ซึ่งมีค่ากักกันโมเลกุล (molecular weight cut off, MWCO) ที่มีขนาดแตกต่างกันในการแยกสิ่งที่ไม่ต้องการออก โมเลกุลของสารที่มีขนาดเล็ก เช่น เกลือต่างๆ จะถูกกำจัดออก ซึ่งทำให้สารที่ได้มีความเข้มข้นสูงขึ้น ไม่ส่งผลเสียต่อกิจกรรมเอนไซม์ สามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่อง ง่ายต่อการนำไปใช้และใช้ระยะเวลาในการทำงานไม่มาก

6. ความเสถียรของเอนไซม์

เอนไซม์เป็นโปรตีนซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษในการเร่งปฏิกิริยาชีวเคมีโดยการลดพลังงาน (energy transition state) กระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาและมีความจำเพาะกับสับสเตรท (substrate) หรือสารตั้งต้น คุณสมบัติของเอนไซม์เป็นผลมาจากโครงสร้างของโปรตีนซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ (peptide bond) โดยกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันและสามารถแบ่งตามลักษณะของ side chain ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) หรือมีโซ่กิ่ง (side chain) ที่ไม่มีขั้ว (non polar group) เช่น โซ่กิ่งที่เป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic) และอะลิฟาติค (aliphatic) กลุ่มที่มีโซ่กิ่งที่มีขั้วแต่ไม่แสดงประจุ (uncharged polar group) กลุ่มที่มีโซ่กิ่งที่แสดงคุณสมบัติประจุบวก (positive charge polar group) และกลุ่มโซ่กิ่งที่แสดงคุณสมบัติประจุลบ (negative charge polar group) เมื่อกรดอะมิโนหลายๆตัวมาเชื่อมต่อกันจะได้เป็นสายพอลิเพปไทด์ซึ่งเป็นโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ของโปรตีน และจากคุณสมบัติของกรดอะมิโนจะเหนี่ยวนำให้มีการสร้างพันธะระหว่างกัน เช่น แรงดึงดูดจาก dispersion force, electrostatic interaction, van der waal potential, hydrogen bond และสภาวะแวดล้อมจะเหนี่ยวนำให้เกิดการม้วนพับ (protein folding) ของสายพอลิเพปไทด์ ทำให้โปรตีนมีโครงสร้างแบบสามมิติ เช่น แบบเกลียว alpha - helix และ beta sheet เรียกว่าโครงสร้างระดับทุติยภูมิ (secondary structure) ส่วนโปรตีนที่มีโครงสร้างระดับตติยภูมิ (tertiary structure) เกิดจากโปรตีนระดับทุติยภูมิมาเชื่อมต่อกันและสร้างพันธะระหว่างกันของโดเมน (domain) ส่วนที่ไม่ชอบน้ำของ side chain หรือส่วนบริเวณที่ไม่มีขั้วของกรดอะมิโน เช่น ฟีนิลอลานีน (phenylalanine) และลิวซีน (leucine) จะสร้างพันธะระหว่างกัน (hydrophobic interaction) ทำให้เกิดบริเวณที่ไม่มีขั้ว (ไม่ละลายน้ำ) ด้วยเหตุนี้การเรียงตัวของโปรตีนจะเรียงตัวโดยให้ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic region) หรือส่วนที่มีขั้วของโปรตีนอยู่บริเวณผิวนอกของโมเลกุลซึ่งจะสร้างพันธะกับน้ำ ส่วนที่ไม่มีขั้วจะรวมกันอยู่ตรงกลางโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งทำให้โปรตีนม้วนเป็นก้อนกลม เรียกว่า “สับยูนิต” (subunits) และโครงสร้างระดับจตุรภูมิ (quaternary) จะเป็นการเชื่อมต่อกันของสับยูนิตมากกว่า 2 สับยูนิต ด้วยพันธะเคมีหลายประเภท

ความเสถียรของเอนไซม์คือความสามารถในการรักษาสภาพธรรมชาติของโปรตีนในสภาวะต่างๆ ซึ่งการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ของโปรตีนนั้นจะเกิดจากการที่พันธะเคมีที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของโปรตีนถูกทำลาย ซึ่งอาจมีสาเหตุมากจากอุณหภูมิ ค่าความเป็น

กรดด่าง โลหะหรือไอออนบางตัว เป็นต้น การเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์จึงเป็นการทำให้พันธะในโมเลกุลเอนไซม์มีความแข็งแรง

จากรายงานของ Lemos *et al.* (2000) ได้ศึกษาถึงสารที่ส่งผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus awamori* รายงานว่าการเติมสารพวกพอลิออล (polyol) หรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sugar alcohol) เช่น กลีเซอรอล (glycerol) ไซลิทอล (xylitol) หรือ ซอร์บิทอล (sorbitol) ลงไปผสมกับเอนไซม์จะช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์เนื่องจากน้ำตาลแอลกอฮอล์จะไปเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมภายใน (microenvironment) เอนไซม์ ทำให้มีโครงสร้างที่แข็งแรงขึ้น อาจเป็นเพราะสารพอลิออลมีคุณสมบัติที่จะรักษา solvophobic interaction ซึ่งจำเป็นต่อโครงสร้างของเอนไซม์และคงสภาพของโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของเอนไซม์ไว้ ทำให้การจัดเรียงตัวของโมเลกุลของน้ำมีการจับตัวกัน (degree of organization) เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ hydrophobic interaction ระหว่าง non polar group เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้โปรตีนมีความเสถียร และทนต่อการเสียสภาวะธรรมชาติหรือเกิดการคลายตัว (unfolding) และ ในการศึกษาเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. พบว่าเมื่อเติมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์จะมีความเสถียรเพิ่มขึ้น และเมื่อเติมไซลิทอลที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เอนไซม์ไซลาเนสจะสามารถทนอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียสได้ถึง 300 นาที นอกจากนี้ไอออนบางชนิดยังส่งผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ด้วย เช่น ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ โปรตีนหรือเอนไซม์เกิดการเสียสภาพเนื่องจากประจุของเอนไซม์เปลี่ยนไป อาจส่งผลต่อคุณสมบัติในการละลายและความสามารถในการจับกับสารตั้งต้นทำให้กิจกรรมเอนไซม์จะลดลง จากงานวิจัยของวีระวัฒน์และคณะ (2547) ที่ศึกษาถึงไอออนที่ส่งผลต่อความเสถียรของเอนไซม์อะไมเลส (amylase)รายงานว่า Sr^{2+} เป็น stabilizer ที่ดีที่สุด เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ไอออนที่รองลงมาคือ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) แบเรียมไอออน (Ba^{2+}) และแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ตามลำดับ และมีการศึกษาที่พบว่าแคลเซียมไอออนมีบทบาทสำคัญในการรักษาโครงสร้างของเอนไซม์กลุ่มอะไมเลส โดยกลไกการทำงานของไอออน คือโมเลกุลไอออนจะไปเชื่อมกันในโมเลกุลของเอนไซม์ และจะคงโครงสร้างของเอนไซม์ให้รวมกันเป็นกลุ่มก้อน (Gupta *et al*, 2003) แป้งที่ละลายน้ำได้และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย (มอลโตเด็กซ์ตริน) ก็ส่งผลต่อความเสถียรของเอนไซม์เช่นเดียวกัน โดยจะช่วยรักษาสภาพ ณ บริเวณ active site ของเอนไซม์ (Vieille and Zeikus, 2001) ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. แหล่งจุลินทรีย์

เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยเก็บรักษาบนอาหารเพาะเลี้ยง Potato dextrose agar (PDA, Merck, Germany) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่ใช้คือกลูโคส (Carlo Erba, Germany) ซูโครส (Univar, Australia) เอวิเซล (Merck, Germany) ขี้เลื่อยและซังข้าวโพดที่ถูกร่อนผ่านตะแกรงที่มีความละเอียด 40 เมช (mesh) ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือกากถั่วเหลือง บีฟเอกซ์แทร็ค (Merck, Germany) เพปโตน (Merck, Germany) ยูเรีย (Fluka, Switzerland) และแอมโมเนียซัลเฟต (Univar, Australia)

4. สารไอออนิกและน้ำตาลแอลกอฮอล์

สารไอออนิกที่ใช้ทดสอบผลกระทบต่อกิจกรรมและความเสถียรของเอนไซม์มีดังนี้ แคลเซียมคลอไรด์ (Univar, Australia) แคลเซียมซัลเฟต (Unilab, Australia) โคบอลต์คลอไรด์ (Univar, Australia) คอปเปอร์ซัลเฟต (Carlo Erba, Germany) เฟอรัสซัลเฟต (Carlo Erba, Germany) โพแทสเซียมคลอไรด์ (Univar, Australia) ลิเทียมคลอไรด์ (BDH, England) แมกนีเซียมคลอไรด์ (Carlo Erba, Germany) แมกนีเซียมซัลเฟต (Carlo Erba, Germany) แมงกานีสซัลเฟต (Univar, Australia) โซเดียมคลอไรด์ (Univar, Australia) และซิงค์ซัลเฟต (Carlo Erba, Germany)

และน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้ กลีเซอรอล (BDH, England) ซอร์บิทอล (Fluka, Switzerland) และเตรฮาโลส (Fluka, Switzerland)

วิธีการ

1. การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

ทำการถ่ายเชื้อจากจานเพาะเลี้ยงที่มีเส้นใยของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 เจริญอยู่โดยใช้ cock borer เบอร์ 3 ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรตัดบริเวณส่วนปลายเส้นใย จากนั้นจึงนำไปวางลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเพาะเลี้ยง mushroom complete medium (MCM) ที่ผสมขี้เลื่อย 0.5 เปอร์เซ็นต์เพื่อเหนี่ยวนำให้เส้นใยของเชื้อเจริญ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นขูดส่วนเส้นใยของเชื้อที่เจริญบนจานอาหารเพาะเลี้ยง MCM จนคลุมผิวหน้าอาหารเพาะเลี้ยงจำนวน 5 จานเพาะเลี้ยง ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปทำโฮโมจิไนซ์ด้วยเครื่องโฮโมจิไน-เซอร์ (ULTRA-TURRAX®T25 basic, IKA, Germany) ที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วินาที

1.2 การผลิตเอนไซม์

ถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 1.1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเพาะเลี้ยง Mandel's solution ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ในสภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส และใช้แหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคส ซูโครส เอวิเซล ซังข้าวโพดและขี้เลื่อยที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่าง ณ วันที่ 3, 5, 7, 9 และ11 โดยกรองแยกสารละลายเอนไซม์ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และคำนวณค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ ตามวิธีการในข้อ 1.3, 1.4 และ 1.6 ตามลำดับ ส่วนเซลล์เชื้อที่กรอง

แยกนำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนตามวิธีการในข้อ 1.5

1.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

1.3.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

บ่มสารละลายสับสเตรทหรือสารตั้งต้นในกรณีนี้คือสารคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (BDH, England) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร (% wt./vol.) ในสารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างหรือพีเอช 5.0 และนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 1.2 มาบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มต่อเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959)

กำหนดให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 1 ยูนิตหมายถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) 1 ไมโครโมล ซึ่งได้จากการย่อยสลายสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส โดยการใช้เอนไซม์ภายใน 1 นาที

1.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 1.3.1 แต่ใช้สารละลายเพคติน (Sigma, Germany) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 เป็นสารละลายสับสเตรทและนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) ก่อนนำส่วนใสไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ต้องนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที

กำหนดให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 1 ยูนิตหมายถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กาแลก-โทส) 1 ไมโครโมล ซึ่งได้จากการย่อยสลายสารละลายเพคตินโดยการใช้เอนไซม์ภายใน 1 นาที

1.3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 1.2 มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 1.3.1 แต่ต่างกันที่ใช้สารละลายสับสเตรทเป็นไซแลน (Sigma, Germany) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร (% wt./vol.) ในสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 และนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) ก่อนนำส่วนใสไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ต้องนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที

กำหนดให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 1 ยูนิตหมายถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ไซโลส) 1 ไมโครโมล ซึ่งได้จากการย่อยสลายสารละลายไซแลนโดยการใช้เอนไซม์ภายใน 1 นาที

1.3.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 1.3.1 แต่ใช้สารละลายบีต้ากลูแคน (ß-glucan) (Sigma, Germany) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 เป็นสารละลายสับสเตรทและนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) ก่อนนำส่วนใสไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ต้องนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที

กำหนดให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 1 ยูนิตหมายถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) 1 ไมโครโมล ซึ่งได้จากการย่อยสลายสารละลายกลูแคนโดยการใช้เอนไซม์ภายใน 1 นาที

1.4 การวัดปริมาณโปรตีน

วัดปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์โดยวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951) โดยใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) (Sigma, Germany) เป็นสารละลายมาตรฐาน

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

1.5.1 การเตรียมตัวอย่าง

การวัดปริมาณกลูโคซามีนตามวิธีการของ Morgan-Elson ที่ปรับปรุงแล้ว (Van de loo, 1976) โดยนำตัวอย่างเซลล์ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman No.1) ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากข้อ 1.2 นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียด แล้วชั่งตัวอย่าง 0.25 กรัม นำตัวอย่างที่ได้ไปย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 20 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนใส 2 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ลูกแก้วปิดปากหลอดป้องกันการระเหย จากนั้นปรับ pH ให้เป็นกลางโดยใช้ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

1.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

นำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายอะซิทิล อะซิโตน (acetyl acetone reagent) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม เอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมสารละลายเอริชช์ (Erhich's reagent) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (glucosamine hydro-chloride) มาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณต่อไป

1.6 การคำนวณผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์, Yp/x

ในการผลิตเอนไซม์เมื่อกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นจะแสดงถึงปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์จะคำนวณจากค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งต่อกลูโคซามีน 1 ไมโครกรัม

2. ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 1 แต่จะใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ณ ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในการผลิตเอนไซม์ จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง วัดปริมาณโปรตีน วิเคราะห์การเจริญโดยวัดปริมาณกลูโคซามีนและวัดผลได้ของผลิตภัณฑ์ ตามวิธีการในข้อ 1.3-1.6 ตามลำดับ

3. ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 1 โดยเลือกแหล่งคาร์บอนที่ดี ณ ความเข้มข้นที่ส่งผลดีที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจากการทดลองในข้อ 2 และใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นกากถั่วเหลือง บีฟเอ็กซ์แทร็ค เพปโตน ยูเรียและแอมโมเนียซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในการผลิตเอนไซม์ จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง วัดปริมาณโปรตีน วิเคราะห์การเจริญโดยวัดปริมาณกลูโคซามีนและวัดผลได้ของผลิตภัณฑ์ ตามวิธีการในข้อ 1.3-1.6 ตามลำดับ

4. ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 1 ซึ่งใช้สภาวะที่ดีที่สุดจากการทดลองในข้อ 3 โดยจะใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้น 0.2-1.2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในการผลิตเอนไซม์ จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง วัดปริมาณโปรตีน วิเคราะห์การเจริญโดยวัดปริมาณกลูโคซามีนและวัดผลได้ของผลิตภัณฑ์ ตามวิธีการในข้อ 1.3-1.6 ตามลำดับ

5. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 1 แต่ใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดจากการทดลองในข้อ 4 ในระหว่างการผลิตเอนไซม์จะบ่มที่อุณหภูมิ 28 และ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง วัดปริมาณโปรตีน วิเคราะห์การเจริญโดยวัดปริมาณกลูโคซามีนและวัดผลได้ของผลิตภัณฑ์ตามวิธีการในข้อ 1.3-1.6 ตามลำดับ

6. ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 1 แต่ใช้สภาวะที่ดีที่สุดจากการทดลองในข้อ 5 ส่วนอาหารเหลวที่ใช้จะควบคุมให้มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 5.0-7.0 ในระหว่างการผลิตเอนไซม์ จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิ-แซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง วัดปริมาณโปรตีน วิเคราะห์การเจริญโดยวัดปริมาณกลูโคซามีนและวัดผลได้ของผลิตภัณฑ์ ตามวิธีการในข้อ 1.3-1.6 ตามลำดับ

7. การทำอัลตร้าฟิลเตรชั่น

นำเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองในข้อ 6 มาผ่านกระบวนการทำอัลตร้าฟิลเตรชั่น เพื่อกำจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยเครื่องอัลตร้าฟิลเตรชั่นจะประกอบด้วยปั๊ม (Masterflex ,Cole-Parmer Instrument company, Germany) และแผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุลขนาด(Minimate^{TM}TFF Capsule, Pall corporation, Germany) 10,000 และ 30,000 ดาลตัน ควบคุมให้มีความดันประมาณ 20 psi โดยทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้น 10 เท่า (เทียบจากปริมาตรที่ลดลง) จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนตามวิธีการในข้อ 1.3 และ 1.4

8. ศึกษาผลกระทบของสารไอออนิกและสารเติมแต่งต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์และความเสถียรของเอนไซม์

8.1 การเตรียมสารละลายไอออนิกและสารละลายแอลกอฮอล์

ผสมสารแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) แคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$) โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ลิเทียมคลอไรด์ (LiCl) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) ในน้ำที่ปราศจากไอออน โดยให้มีความเข้มข้นเป็น 2, 20 และ 200 มิลลิโมลาร์ ส่วนสารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์จะเตรียมโดยผสมสารละลายกลีเซอรอลและซอร์บิทอลกับน้ำที่ปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้นเป็น 4 โมลาร์ และเตรฮาโลสที่ความเข้มข้น 3 โมลาร์

8.2 การศึกษาผลของไอออนและน้ำตาลแอลกอฮอล์ต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการกรองระดับอัลตร้าฟิลเตรชันที่มีค่าการกักกันโมเลกุล (molecular weight cut off: MWCO) ที่เหมาะสม ผสมกับสารละลายไอออนในอัตราส่วน 1 : 1 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกตามต้องการ (1 ,10 และ 100 มิลลิโมลาร์) โดยตัวแปรควบคุมคือน้ำที่ปราศจากไอออน จากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 1.3

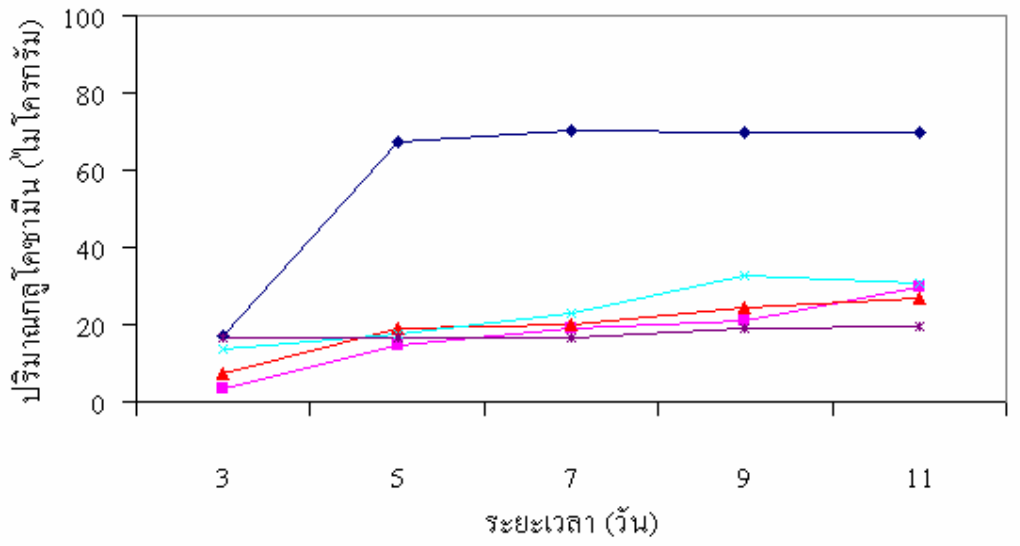
8.3 ศึกษาผลของสารไอออนิกและสารเติมแต่งต่อความเสถียรของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการกรองระดับอัลตร้าฟิลเตรชันที่มีค่าการกักกันโมเลกุล (molecular weight cut off: MWCO) ที่เหมาะสม ผสมกับสารละลายไอออนิกหรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 1 : 1 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายตามต้องการ โดยตัวแปรควบคุมคือน้ำที่ปราศจากไอออน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง ณ ที่เวลา 0, 5, 10 และ 15 นาที และนำเอนไซม์ที่ได้ไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ทันทีตามวิธีการในข้อ 1.3

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิ-แซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจาก *P. ostreatus* DOA 10

วัดการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 โดยสังเกตจากปริมาณกลูโคซามีนซึ่งเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์รา เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส เอวิเซล ซังข้าวโพดและ ขี้เลื่อยที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Mandel's solution พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 โดยให้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อจะสร้างกลูโคซามีนสูงตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีปริมาณกลูโคซามีน 17.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และมีการเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase ในช่วงวันที่ 5 ของระยะการเพาะเลี้ยงโดยมีปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งปริมาณกลูโคซามีนจะเพิ่มขึ้นเป็น 3.9 เท่า (67.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของตัวอย่างในวันที่ 3 และมีค่าเปลี่ยนแปลงไม่มากนักจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง ดังภาพที่ 7



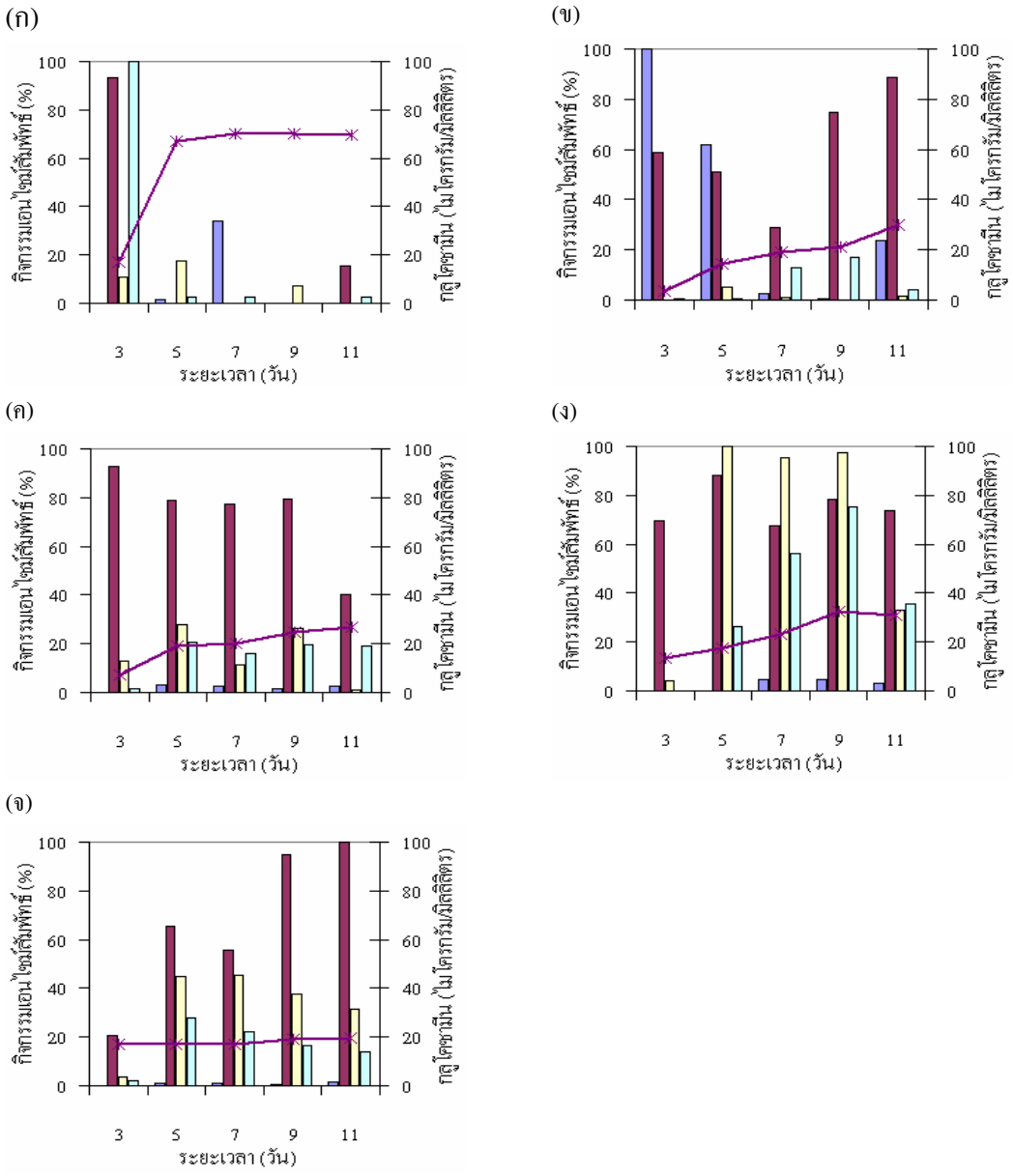
ภาพที่ 7 ผลของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรในการเจริญของเชื้อ *P.ostreatus* DOA

ส่วนกรณีที่ใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า ณ วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 มีการสร้างกลูโคซามีนเพียง 3.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่ากรณีที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 4.9 เท่าและพบว่าเชื้อมีการเจริญในลักษณะ log phase สองช่วงคือช่วงวันที่ 3-5 และวันที่ 9-11 ของการเพาะเลี้ยง คือ ปริมาณกลูโคซามีน ณ วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าเป็น 14.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นกว่าวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงถึง 4.14 เท่า และช่วงระหว่างวันที่ 9 และวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อจะมีปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มขึ้น 1.42 เท่า คือเพิ่มขึ้นจาก 21.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น 29.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กรณีที่ใช้เอวิเซลที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Mandel's solution พบว่าเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีปริมาณกลูโคซามีน 7.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ณ วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและมีค่าเพิ่มขึ้น 2.6 เท่า (19.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ณ วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณกลูโคซามีนก็จะเพิ่มขึ้นไม่มากนัก ส่วนกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรแทนแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Mandel's solution พบว่าเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 มีการสร้างกลูโคซามีนถึง 13.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณกลูโคซามีนที่ได้จากการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกับกรณีที่ใช้ขี้เลื่อยที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Mandel's solution พบว่าเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะสร้างกลูโคซามีนสูงตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่าประมาณ 16.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และหลังจากนั้นปริมาณกลูโคซามีนจะเปลี่ยนแปลงไม่มากจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงคือมีค่าประมาณ 17.6-32.5 ไมโครกรัมกลูโคซามีน/มิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงกับปริมาณกลูโคซามีนที่เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 สร้างขึ้น โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่าเมื่อใช้กลูโคสซึ่งเป็นตัวแทนของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามารถถูกดูดซึมเข้าเซลล์ได้ทำให้เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเปลี่ยนพลังงานหรือนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ได้ทันที เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จึงเข้าสู่ระยะ stationary phase อย่างรวดเร็ว (วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง) ส่วนกรณีที่ใช้ซูโครสซึ่งเป็นตัวแทนของน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุลและน้ำตาลฟรุกโตส 1 โมเลกุล เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีการเจริญในลักษณะ diauxic growth คือมีช่วง log phase 2 ช่วง อาจเป็นเพราะเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะใช้น้ำตาลบางชนิดในการสร้างเซลล์ได้ดีกว่าอีกชนิดหนึ่ง โดยเชื้ออาจเลือกใช้น้ำตาลฟรุกโตสในการเจริญจนหมดแล้วจึงเปลี่ยนมาใช้

น้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลล์แทน เช่นเดียวกับเห็ดราและยีสต์ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลฟรุกโตส (ketohexose) ได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส (aldohexose) เนื่องจากสามารถเข้าสู่กระบวนการสร้างเซลล์ได้ทันที (Wu *et al.*, 2002) ส่วนในกรณีของแหล่งคาร์บอนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะไม่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ เช่น เอวิเซล ซึ่งเป็นตัวแทนของสารประกอบเซลลูโลสที่มีโครงสร้างแบบเป็นระเบียบ (microcrystalline cellulose) ซังข้าวโพดและขี้เลื่อยเป็นตัวแทนของแหล่งคาร์บอนจากในธรรมชาติซึ่งจะมีโครงสร้างที่ซับซ้อนและประกอบด้วยสารหลายชนิด เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะเจริญได้ดีกว่าเมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาเป็นเอวิเซลและขี้เลื่อยตามลำดับ เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสารประกอบเหล่านี้ให้เป็นสารที่โมเลกุลเล็กๆเพื่อผ่านเข้าสู่เซลล์และนำไปใช้ในการเจริญทำให้อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ช้ากว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญระหว่างกรณีที่ใช้เอวิเซล ซังข้าวโพดและขี้เลื่อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญดีกว่า อาจเป็นเพราะซังข้าวโพดเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนคือมีทั้งเซลลูโลสที่เรียงตัวแบบเป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ ทั้งยังประกอบด้วยสารหลายชนิดซึ่งอาจมีสารใดสารหนึ่งที่ช่วยกระตุ้นให้เชื้อผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายซังข้าวโพดเพื่อนำไปใช้ในการเจริญ และเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ใช้เอวิเซลเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยเหตุที่โครงสร้างของเอวิเซลซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างแบบเป็นระเบียบ ดังนั้นเชื้อจึงใช้ซังข้าวโพดได้ดีกว่าเพราะซังข้าวโพดมีส่วนโครงสร้างที่มีการเรียงตัวแบบไม่เป็นระเบียบทำให้ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้ง่ายกว่า ส่วนกรณีที่ใช้ขี้เลื่อยเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น เชื้อจะมีการเจริญต่ำที่สุดอาจเป็นเพราะในขี้เลื่อยมีองค์ประกอบของลิกนินซึ่งสารประกอบลิกนินเป็นส่วนสำคัญที่รบกวนกระบวนการย่อยสลายเนื่องจากมีโครงสร้างที่ย่อยสลายยาก ทำให้เอนไซม์ย่อยสลายทำงานได้ไม่ดีนัก ส่งผลให้ได้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กซึ่งสามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้น้อย เชื้อจึงเจริญเติบโตได้ไม่ดีนักเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่นที่ใช้ในการทดลอง ดังนั้นแหล่งคาร์บอน ณ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 คือ น้ำตาลกลูโคส ซังข้าวโพด เอวิเซล น้ำตาลซูโครส และขี้เลื่อย ตามลำดับ

การวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 บนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ จะแสดงผลเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์โดยจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดมีค่าเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 8 เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส พบว่าเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลสสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง คือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์



ภาพที่ 8 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์
(ก) กลูโคส (ข) ซูโครส (ค) เอวิเซล (ง) ซังข้าวโพด (จ) ขี้เลื่อย

เท่ากับ 11.396 ยูนิต/มิลลิลิตร จากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดต่ำลงในวันที่ 5, 7 และ 9 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเป็น 7.022, 0.292 และ 0.074 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับและเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อจะเริ่มผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 1.79 เปอร์เซ็นต์ (0.204 ยูนิต/มิลลิลิตร) และค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่า 34.12 เปอร์เซ็นต์ (3.888 ยูนิต/มิลลิลิตร) จากนั้นไม่พบค่ากิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 9 และ 11 ของการเพาะเลี้ยง (0.000 ยูนิต/มิลลิลิตร) ส่วนกรณีที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เอวิเซล ซังข้าวโพดและขี้เลื่อยจะพบว่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ได้มีค่าต่ำคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ไม่เกิน 4.67 เปอร์เซ็นต์ (0.532 ยูนิต/มิลลิลิตร) ซึ่งเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดที่ได้จากการใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสสูงในทุกๆแหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เอวิเซล ซังข้าวโพดและขี้เลื่อย ซึ่งจะแสดงกิจกรรมเอนไซม์อย่างสม่ำเสมอตลอดการเพาะเลี้ยง โดยกรณีที่ใช้เอวิเซลเป็นแหล่งคาร์บอนจะพบกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสสูงตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เท่ากับ 93.04 เปอร์เซ็นต์ (1.832 ยูนิต/มิลลิลิตร) จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยจนกระทั่งสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง และเมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนพบกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสสัมพัทธ์จะอยู่ในช่วง 67.44-88.32 เปอร์เซ็นต์ (1.328-1.739 ยูนิต/มิลลิลิตร) ส่วนกรณีที่ใช้ขี้เลื่อยเป็นแหล่งคาร์บอนจะพบกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง คือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 20.52 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีค่ากิจกรรมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (1.969 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์สูงในกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนโดยเอนไซม์ที่ได้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 6.002 ยูนิต/มิลลิลิตร จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 95-97 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง

ส่วนกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสนั้นเมื่อให้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ (9.563 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์มีแนวโน้มลดต่ำลงมากโดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 2.69 เปอร์เซ็นต์ (0.257 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 5 จนไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงและแหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจรองลงมาสำหรับเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสคือ ซังข้าวโพด เนื่องจากจะให้กิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 26-75 เปอร์เซ็นต์ โดยจะมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง (7.211 ยูนิต/มิลลิลิตร)

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของค่ากิจกรรมเอนไซม์พบว่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลสจะมีค่าสูงเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน อาจเป็นเพราะโครงสร้างของน้ำตาลซูโครสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสอย่างละหนึ่งโมเลกุล สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของเชื้อราและไปกระตุ้นการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลสได้ ซึ่งให้เช่นเดียวกับตามรายงานของ Suto and Tomita (2001) ที่ได้กล่าวถึงกลไกในการเหนี่ยวนำและยับยั้งการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในเชื้อราซึ่งรายงานว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น ซอร์ฟอโรส (sorphorose) มีผลในการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในเชื้อ *T. reesei* โดยซอร์ฟอโรสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุลที่เชื่อมกันด้วยพันธะบีต้า -1,2 ไกลโคซิดิก ส่วนกรณีที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสรองลงมา แต่กรณีที่ให้แหล่งคาร์บอนเป็นสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่และซับซ้อน เช่น เอวิเซล ซังข้าวโพดและขี้เลื่อย เอนไซม์ที่ได้นั้นจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสต่ำมาก ส่วนกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงเมื่อใช้สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และซับซ้อนเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น กรณีที่ใช้ซังข้าวโพดหรือขี้เลื่อยเป็นแหล่งคาร์บอน อาจเป็นเพราะในซังข้าวโพดและขี้เลื่อยจะมีสารประกอบกาแลกแตนซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในองค์ประกอบโครงสร้างของเพคติน อาจไปช่วยเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์เพติเนสออกมาย่อยสลาย เช่นเดียวกับกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสซึ่งจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงเมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนอาจเป็นเพราะส่วนประกอบที่อยู่ในซังข้าวโพด เช่น สารประกอบเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส อะราบิโนไซแลน ฯลฯ จะช่วยกระตุ้นการทำงานและเหนี่ยวนำให้เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ได้ ส่วนกรณีของค่ากิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสจะให้ค่าสูงเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสและ ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูโคซามีนที่เชื้อสร้างขึ้นคือจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงในช่วง log phase ของการเจริญ ดังนั้นจึง

กล่าวได้ว่าเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสจะเป็นเอนไซม์แบบที่มีความเกี่ยวเนื่องกับการเจริญของเชื้อ (growth associate enzyme)

เมื่อพิจารณาที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ซึ่งบ่งบอกถึงความสามารถของเซลล์หนึ่งๆต่อการผลิตเอนไซม์ กรณีที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆในการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 2) พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงถึง 3.256 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน รองลงมาคือน้ำตาลกลูโคสซึ่งมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดเป็น 0.055 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ซังข้าวโพดซึ่งมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดเป็น 0.023 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน เอวิเซลซึ่งมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดเป็น 0.017 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีนและขี้เลื่อยซึ่งมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดเป็น 0.007 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนสพบว่ากรณีที่ใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส เอวิเซล ซังข้าวโพด และขี้เลื่อยเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนสสูงสุดเป็น 0.106, 0.331, 0.251, 0.102 และ 0.101 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ตามลำดับ ส่วนผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลาเนส พบว่ากรณีที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดคือ 0.341 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน รองลงมาคือกรณีที่ใช้ขี้เลื่อยเป็นแหล่งคาร์บอนพบ วัดค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลาเนสซึ่งมีค่า 0.162 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีนและกรณีที่ใช้เอวิเซลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเป็น 0.108 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสจะให้ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลาเนสเพียง 0.021-0.037 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน เท่านั้น และเมื่อพิจารณาจากผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์บีต้ากลูคาเนสพบว่าแหล่งคาร์บอนที่แสดงผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์บีต้ากลูคาเนสสูงคือกรณีที่ใช้น้ำตาลกลูโคส ซังข้าวโพดและขี้เลื่อยเป็นแหล่งคาร์บอนโดยผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์บีต้ากลูคาเนสจะมีค่าเป็น 0.556, 0.232 และ 0.160 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจาก *P. ostreatus* DOA 10 จากการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตเอนไซม์ (ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน)

แหล่งคาร์บอน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
กลูโคส	3	0.000	0.106	0.037	0.556
	5	0.003	0.000	0.015	0.004
	7	0.055	0.000	0.000	0.004
	9	0.000	0.000	0.006	0.000
	11	0.000	0.004	0.000	0.003
ซูโครส	3	3.256	0.331	0.000	0.013
	5	0.484	0.069	0.021	0.005
	7	0.015	0.030	0.004	0.064
	9	0.004	0.070	0.000	0.077
	11	0.090	0.058	0.003	0.013
เอวิเซล	3	0.000	0.251	0.108	0.023
	5	0.017	0.081	0.088	0.104
	7	0.014	0.075	0.033	0.075
	9	0.007	0.064	0.064	0.076
	11	0.011	0.030	0.002	0.069
ซังข้าวโพด	3	0.000	0.102	0.019	0.001
	5	0.000	0.099	0.341	0.143
	7	0.023	0.057	0.247	0.232
	9	0.016	0.048	0.180	0.222
	11	0.012	0.047	0.065	0.110

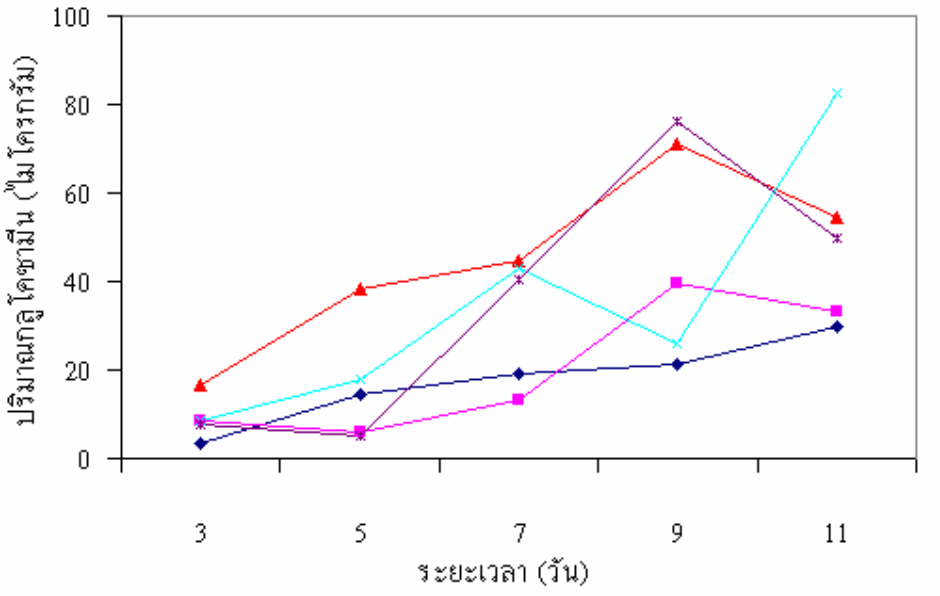
ตารางที่ 2 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
ขี้เลื่อย	3	0.000	0.024	0.013	0.012
	5	0.006	0.077	0.159	0.160
	7	0.008	0.065	0.162	0.126
	9	0.003	0.099	0.120	0.085
	11	0.008	0.101	0.096	0.069

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มาวิเคราะห์ในภาพรวมพบว่าเมื่อใช้กลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแทนแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง Mandel's solution เชื้อจะมีการเจริญสูงมาก แต่เอนไซม์ย่อยสลายที่ได้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำจึงไม่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง ส่วนกรณีที่ใช้ซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อมีการผลิตเอไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอนไซม์เพคติเนสที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงมากและให้ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอนไซม์เพคติเนสสูง และในกรณีที่ใช้ของเหลือจากอุตสาหกรรม เช่น ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อจะผลิตเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส ไซลาเนสและบีต้ากลูคาเนสสูงมาก จากผลที่เกิดขึ้นแหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจจึงเป็นซูโครสซึ่งให้ค่าผลได้ของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงมากและซังข้าวโพดที่ให้ค่าผลได้ของเอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสสูงดังนั้นจึงใช้น้ำตาลซูโครสและซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

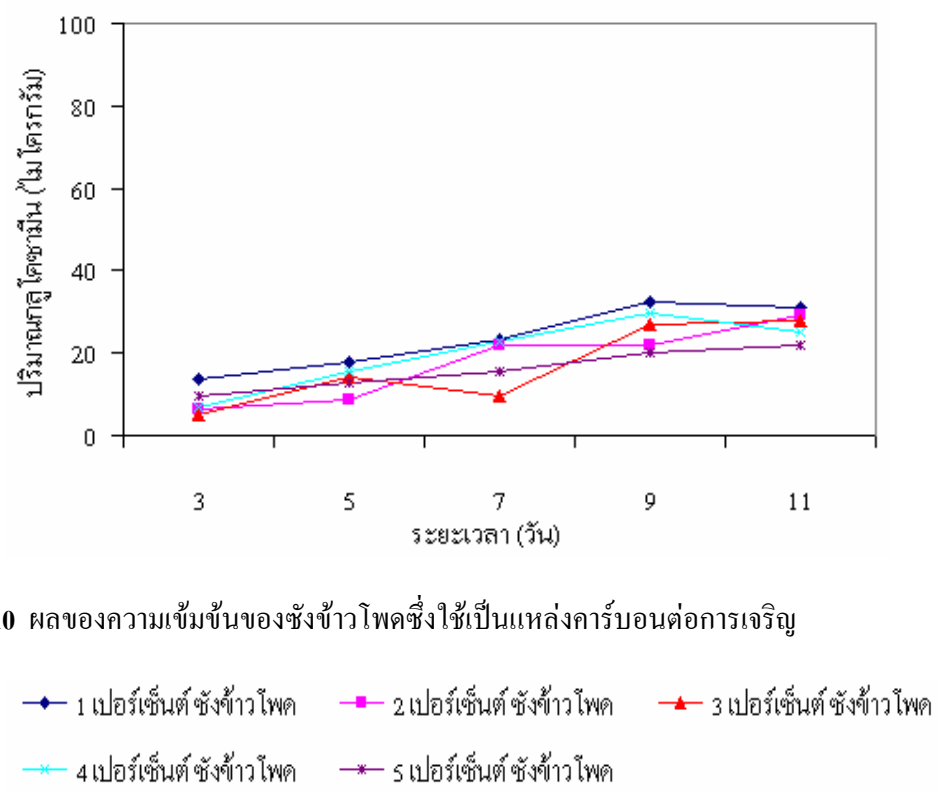
2. การศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจาก *P. ostreatus* DOA 10

เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จากการทดลองพบว่าเชื้อยังคงมีการเจริญแบบ diauxic growth ทุกความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการสร้างกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 7-9 ของการเพาะเลี้ยง โดยเพิ่มขึ้นจากวันที่ 7 (13.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ถึง 3 เท่า คือมีปริมาณกลูโคซามีน 39.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อให้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจะมีการสร้างกลูโคซามีนสูงตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นอื่นๆ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 16.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นจะเพิ่มขึ้น 2.28 เท่า ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงและกลูโคซามีนจะมีค่าเพิ่มขึ้น 2 เท่า อีกครั้งในช่วงวันที่ 7-9 ของการเพาะเลี้ยง (44.7 และ 71.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในวันที่ และ 9 ตามลำดับ) เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อจะสร้างกลูโคซามีนออกมาน้อยกว่าถึงเท่าตัว เมื่อเทียบกับปริมาณกลูโคซามีนที่ได้จากกรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เชื้อจะสร้างกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วคือเพิ่มขึ้น 2-3 เท่า ในช่วงวันที่ 5-7 และ วันที่ 9-11 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีปริมาณกลูโคซามีนสูงสุด (82.7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าในช่วงวันที่ 3-5 ของการเพาะเลี้ยง เชื้อจะสร้างกลูโคซามีนออกมาต่ำคือ มีปริมาณ 5.1-7.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากนั้นเชื้อจะสร้างกลูโคซามีนให้มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ถึง 7.96 เท่า ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง (40.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และเชื้อ *P.ostreatus* DOA 10 จะสร้างกลูโคซามีนสูงสุดในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง (76.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ดังรูปที่ 9 สามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาลซูโครสเมื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนจะส่งผลต่อการเจริญคือเมื่อให้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1-4 เปอร์เซ็นต์ เชื้อจะมีการสร้างกลูโคซามีนในปริมาณที่สูงขึ้นตามลำดับแต่เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อจะมีการเจริญลดลงอาจเป็นเพราะมีปริมาณน้ำตาลสูงเกินจึงก่อให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ



ภาพที่ 9 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ

เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 (ภาพที่ 10) เมื่อใช้ซังข้าวโพดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เชื้อจะสร้างกลูโคซามีน 13.5 ไมโครกรัมในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่า 32.5 ไมโครกรัม ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นมีแนวโน้มคงที่ กรณีที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อมีการเจริญในลักษณะ diauxic growth อย่างเห็นได้ชัดโดยเชื้อจะสร้างกลูโคซามีน 6.3 ไมโครกรัม ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 5-7 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นถึง 2.5 เท่า (ปริมาณกลูโคซามีน 8.5 และ 21.8 ไมโครกรัม ในวันที่ 5 และ 7 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ) และเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วอีกครั้งในช่วงวันที่ 9-11 ของการเพาะเลี้ยง คือมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น 1.33 เท่า โดยมีปริมาณกลูโคซามีน 21.8 และ 29.0 ไมโครกรัม ในวันที่ 9 และ 11 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ

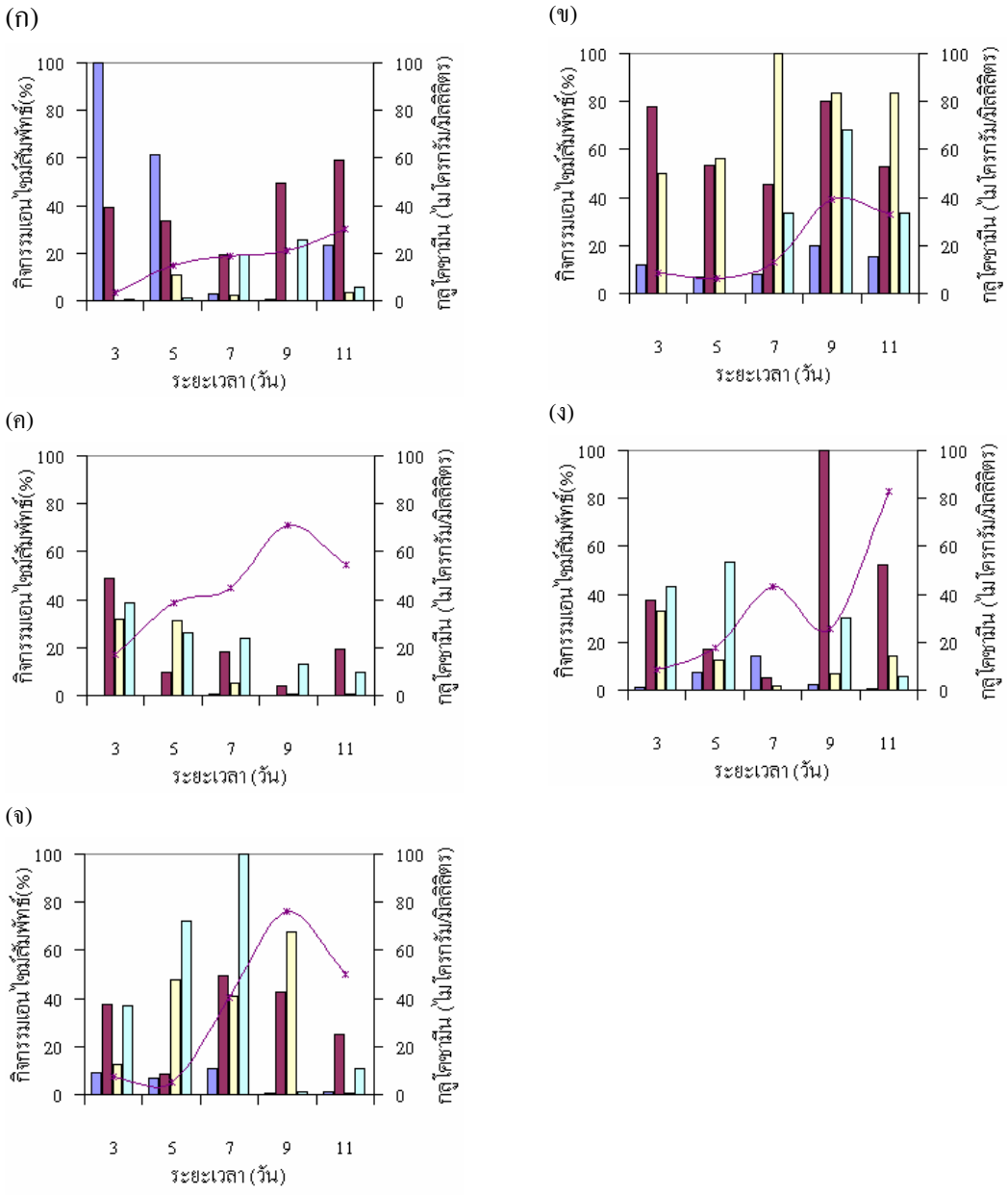


ภาพที่ 10 ผลของความเข้มข้นของซังข้าวโพดซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ

และเมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนจะมีพฤติกรรมการสร้างกลูโคซามีนเช่นเดียวกับกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์แหล่งคาร์บอน คือ มีการเจริญแบบ diauxic พบปริมาณกลูโคซามีน 5.1 ไมโครกรัมในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและมีค่าเพิ่มสูงขึ้นถึง 2.78 เท่า (14.2 ไมโครกรัม) อย่างรวดเร็วในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และจะเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในช่วงวันที่ 7-9 ของการเพาะเลี้ยงคือมีปริมาณกลูโคซามีน 9.7 และ 26.9 ไมโครกรัม ตามลำดับ ส่วนกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มสูงขึ้น 1.30-2.23 เท่า อย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงและเมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อมีการเจริญต่ำลงเมื่อเทียบกับการใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นอื่นๆเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีปริมาณกลูโคซามีน 9.6 ไมโครกรัม และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อยคือมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น 1.07-1.31 เท่าตลอดระยะการเพาะเลี้ยง ในกรณีของซังข้าวโพดนั้นจะมีการเจริญไม่แตกต่างกันมากเมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน จากการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 พบว่าเชื้อจะเจริญได้ดีที่ความเข้มข้น 1-4 เปอร์เซ็นต์แต่ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จะมีการเจริญต่ำลง

ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการใช้ซูโครสและซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งให้ผลเป็นดังนี้ เมื่อพิจารณากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ได้จากการใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงโดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ (11.396 ยูนิต/มิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาลซูโครส รองลงมาจะเป็นน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงสุดเป็น 19.72 เปอร์เซ็นต์ (2.247 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงและน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ จะผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอก-ซีเมทิลเซลลูเลสต่ำคือ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ไม่เกิน 14.46 เปอร์เซ็นต์ (1.648 ยูนิต/มิลลิลิตร) ดังปรากฏในภาพที่ 11

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สม่ำเสมอในกรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 19.08-58.91 เปอร์เซ็นต์ (0.566-1.748 ยูนิต/มิลลิลิตร) ส่วนกรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสจะมีค่าสูง โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 45.40 -80.01 เปอร์เซ็นต์ (1.347-2.374 ยูนิต/มิลลิลิตร) แต่เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสต่ำ คือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ไม่เกิน 49.07 เปอร์เซ็นต์ ตลอดการเพาะเลี้ยงส่วนกรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสสูงตั้งแต่วันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีการแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ เพคติเนสสูงสุดคือ มีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (2.967 ยูนิต/มิลลิลิตร) และกรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสสัมพัทธ์ไม่เกิน 49.28 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 11 ผลของน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน
(ก) 1 เปอร์เซ็นต์ (ข) 2 เปอร์เซ็นต์ (ค) 3 เปอร์เซ็นต์ (ง) 4 เปอร์เซ็นต์
(จ) 5 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสในกรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสต่ำคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ไม่เกิน 10.67เปอร์เซ็นต์ (0.310 ยูนิต/มิลลิลิตร) แต่เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 50.10-100 เปอร์เซ็นต์ (1.457-2.905 ยูนิต/มิลลิลิตร) ส่วนกรณีใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 3 และ4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสัมพัทธ์ไม่เกิน 32.87 เปอร์เซ็นต์ ตลอดการเพาะเลี้ยง ส่วนกรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่ากรณีที่ให้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนเล็กน้อย คือมีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสัมพัทธ์ 12.46-67.54 เปอร์เซ็นต์ (0.362-1.962 ยูนิต/มิลลิลิตร) ตลอดระยะการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสในกรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 0.72-25.42 เปอร์เซ็นต์ (0.046-1.627 ยูนิต/มิลลิลิตร) และใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 0.22 เปอร์เซ็นต์ (0.014 ยูนิต/มิลลิลิตร) จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นซึ่งจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 33.26-68.46 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะของการเพาะเลี้ยง ส่วนกรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสตั้งแต่วันที่ 3 ของเพาะเลี้ยงโดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 9.66-38.68 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง เช่นเดียวกับกรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ไม่เกิน 53.65 เปอร์เซ็นต์ (3.433 ยูนิต/มิลลิลิตร) ส่วนกรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสสัมพัทธ์สูงสุดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (6.399 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาในภาพรวมจะพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส คือ เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์มากที่สุดและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสค่ากิจกรรมเอนไซม์จะลดลง อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มสูงขึ้นจะกระตุ้นกลไกให้เชื้อยับยั้งการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (catabolic repression)

ส่วนเอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนสจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับรายงานของ Ikram-ul-Hag *et al.* (2002) ที่ทำการทดลองเกี่ยวกับผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* GCBMX-45 รายงานว่าเมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 1.0-5.0 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *A. niger* GCBMX-45 จะมีค่าสูงสุดเมื่อใช้แป้งที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและค่ากิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสจะมีค่าสูงเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อพิจารณาที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ (ตารางที่ 3) พบว่าผลได้ของเอนไซม์คาร์บอก-ซีเมทิลเซลลูเลส กรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดคือมีค่า 3.256 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และที่ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์จะให้ค่าผลได้เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสรองลงมาซึ่งมีค่า 0.164 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน แต่เมื่อความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสสูงขึ้นผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสกลับต่ำลงโดยมีค่า 0.002-0.157 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน เมื่อพิจารณาที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนสพบว่าพฤติกรรมเอนไซม์เพคติเนสจะมีค่าสูงในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและมีแนวโน้มลดต่ำลงจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง กรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครส 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์จะให้ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนสสูงที่สุด คือมีค่า 0.330-0.275 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน และที่ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 3-5 เปอร์เซ็นต์ ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จะมีค่า 0.087, 0.132 และ 0.147 ยูนิต/ไมโตรกรัมกลูโคซามีน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลาเนสพบว่าพฤติกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจะมีค่าต่ำในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและจะสูงขึ้นในวันที่ 5 และ 7 ของการเพาะเลี้ยงจากนั้นจะมีแนวโน้มลดต่ำลงจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง กรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครส 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์จะให้ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ ไซลาเนสสูงที่สุดคือมีค่า 0.268 และ 0.271 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 3-5 เปอร์เซ็นต์ จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเป็น 0.087 , 0.132 และ 0.147 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส พบว่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์บีต้ากลูคาเนสจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงขึ้นคือกรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์จะมีค่า 0.064, 0.162, 0.147, 0.323 และ 0.909 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ผลได้เอนไซม์ที่ได้จากการใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (ยูนิต/ไมโครกรัม กลูโคซามีน)

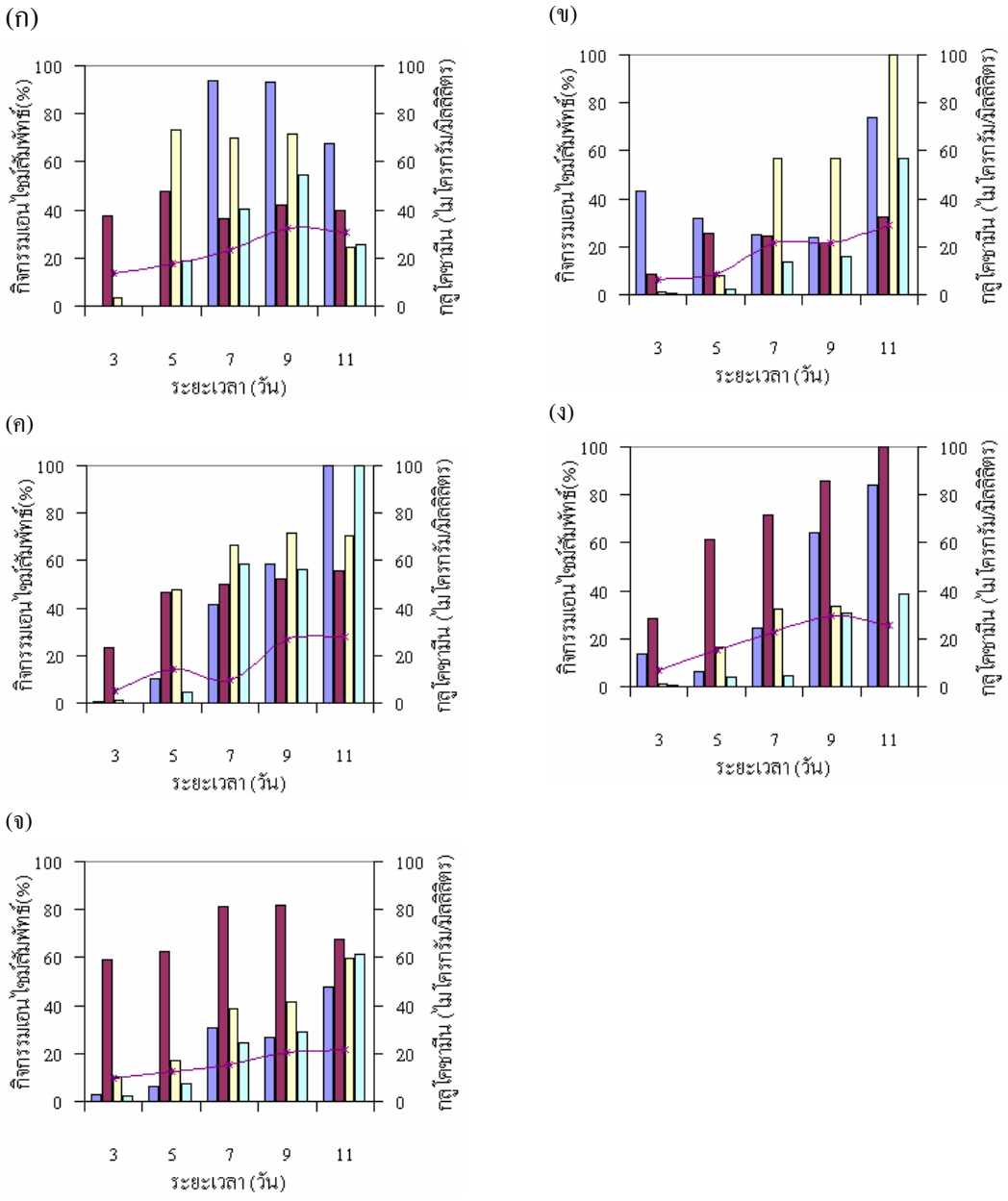
แหล่งคาร์บอน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
1% ซูโครส	3	3.256	0.331	0.000	0.013
	5	0.484	0.069	0.021	0.005
	7	0.015	0.030	0.004	0.064
	9	0.035	0.070	0.000	0.077
	11	0.090	0.058	0.003	0.013
2% ซูโครส	3	0.165	0.276	0.173	0.000
	5	0.125	0.260	0.268	0.002
	7	0.068	0.103	0.222	0.162
	9	0.057	0.060	0.062	0.111
	11	0.054	0.047	0.073	0.065
3% ซูโครส	3	0.002	0.087	0.055	0.147
	5	0.000	0.007	0.024	0.043
	7	0.000	0.012	0.003	0.034
	9	0.000	0.002	0.000	0.012
	11	0.000	0.010	0.000	0.011
4% ซูโครส	3	0.012	0.132	0.112	0.323
	5	0.048	0.028	0.020	0.194
	7	0.038	0.004	0.001	0.000
	9	0.010	0.115	0.007	0.075
	11	0.000	0.019	0.005	0.004

ตารางที่ 3 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
5% ซูโครส	3	0.134	0.147	0.048	0.313
	5	0.157	0.049	0.271	0.909
	7	0.030	0.036	0.029	0.158
	9	0.001	0.017	0.026	0.001
	11	0.002	0.015	0.000	0.014

เมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในภาพรวมจะพบว่า ณ ความเข้มข้นที่ 2 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสต่ำคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงสุดในวันที่ 9 คือ 19.72 เปอร์เซ็นต์ แต่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสสูง คือ 80.01, 83.34 และ 68.46 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน ดังนั้น ณ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์จึงเป็นความเข้มข้นที่น่าสนใจ

ส่วนกรณีที่ใช้ซังข้าวโพด ณ ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนดังภาพที่ 12 พบว่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจะมีค่าสูงเมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 67.49-93.99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนจะพบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลสสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 23.85-73.85 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อจะผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงสุดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนจะพบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 6.01-83.92 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนจะพบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสต่ำคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 2.83-47.53 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 12 แสดงผลของซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

(ก) 1 เปอร์เซ็นต์ (ข) 2 เปอร์เซ็นต์ (ค) 3 เปอร์เซ็นต์ (ง) 4 เปอร์เซ็นต์ (จ) 5 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสในกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1-3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 21.31-55.80 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะการเพาะเลี้ยง ส่วนกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง คือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 28.62 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมเอนไซม์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งแสดงกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสสูงสุดคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ หรือมีกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสเป็น 3.665 ยูนิต/มิลลิลิตรและกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสในวันที่ 3 คือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 59.92 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มสูงขึ้นซึ่งจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 62.73-82.02 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสในกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 3.18 เปอร์เซ็นต์ (0.260 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 69.78-73.36 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เพียง 1.37 เปอร์เซ็นต์ (0.112 ยูนิต/มิลลิลิตร) จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นซึ่งจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (8.181 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง กรณีใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสในวันที่ 3 ของเพาะเลี้ยง คือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 0.93 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 51.53 เท่า ในวันที่ 5 โดยจะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 47.92 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมเอนไซม์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 66.54-71.48 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสต่ำคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 1.01-48.87 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะการเพาะเลี้ยง ส่วนกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสในวันที่ 3 คือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 10.13 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มสูงขึ้นซึ่งจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 17.10-59.49 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง และเมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสในกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสต่ำคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 0.09 เปอร์เซ็นต์ (0.012 ยูนิต/มิลลิลิตร)

ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 18.95-54.32 เปอร์เซ็นต์ ตลอดการเพาะเลี้ยงคือกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสต่ำในช่วงวันที่ 3-9 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 0.80-16.04 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วคือจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 56.70 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสในวันที่ 5 ของเพาะเลี้ยง คือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 4.35 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะเพิ่มขึ้นถึง 13.43 เท่าในวันที่ 7 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 58.42 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมเอนไซม์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงสุดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (13.276 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง กรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 0.53-38.58 เปอร์เซ็นต์ และกรณีที่ใช้ ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสในวันที่ 3 คือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 2.20 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มสูงขึ้นจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่า 61.41 เปอร์เซ็นต์

แม้ว่ากรณีความเข้มข้นของซังข้าวโพดนั้นจะมีการเจริญไม่แตกต่างกันมากเมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของซังข้าวโพดจะมีส่วนในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์ โดยเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจะมีกิจกรรมเอนไซม์สูงในช่วงวันที่ 7-11 ของระยะการเพาะเลี้ยง และเมื่อใช้ความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูง (90-100%) และค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสจะแปรผันตามความเข้มข้นของซังข้าวโพด โดยเชื้อจะผลิตเอนไซม์เพคติเนสที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูง (70-100%) เมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 4-5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน แต่เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงเมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน (70-100%)

เมื่อพิจารณาข้อมูลผลได้ของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจากการใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนในตารางที่ 4 พบว่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจะมีค่าสูงสุดเมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคือซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3, 1, 4, และ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะให้ค่าผลได้เป็น 0.039, 0.024, 0.023, 0.019 และ 0.012 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ เพคติเนสจะมีค่าผลได้สูงสุดเมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน คือ มีค่า 0.226 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ส่วนซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1-4 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่าผลได้เอนไซม์เพคติเนสสูงสุดอยู่ในช่วง 0.102-0.189 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน เมื่อพิจารณาที่ผลได้ของเอนไซม์ไซลาเนสพบว่าจะมีค่าผลได้สูงสุดเมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่าผลได้ของเอนไซม์ไซลาเนสเป็น 0.561 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน และรองลงมาคือกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 1, 2, 5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.158-0.341 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน และเมื่อพิจารณาข้อมูลผลได้ของเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสพบว่าเมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่าผลได้สูงสุดซึ่งมีค่าเป็น 0.800 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน เช่นเดียวกับเอนไซม์ไซลาเนส และลำดับรองลงมาคือกรณีที่ใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 5, 2, 1 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่าผลได้เอนไซม์สูงสุดอยู่ในช่วง 0.202-0.376 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน

ดังนั้นความเข้มข้นของซังข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นความเข้มข้นที่น่าสนใจ และเมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์และผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งในกรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน จะพบว่าที่แม้ว่ากรณีที่ใช้ความเข้มข้นของซังข้าวโพด 3 เปอร์เซ็นต์จะให้กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสต่ำกว่า แต่จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงกว่าถึง 2 เท่าและมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงกว่า ดังนั้นจึงใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4 ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ได้จากการใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน)

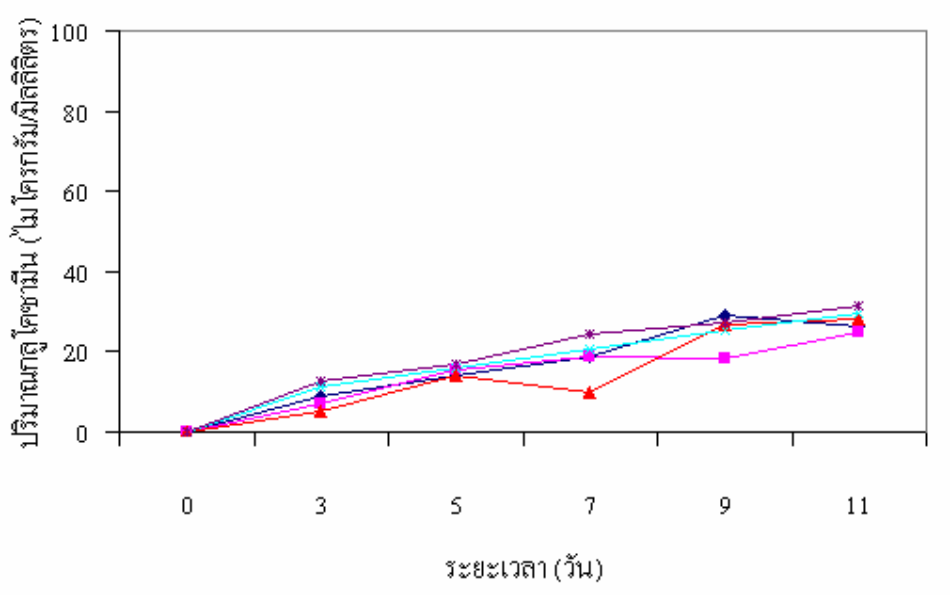
แหล่งคาร์บอน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
1% ซังข้าวโพด	3	0.000	0.102	0.019	0.000
	5	0.000	0.099	0.341	0.143
	7	0.023	0.057	0.247	0.232
	9	0.016	0.048	0.180	0.222
	11	0.012	0.047	0.065	0.110
2% ซังข้าวโพด	3	0.039	0.049	0.018	0.019
	5	0.021	0.109	0.075	0.034
	7	0.006	0.041	0.214	0.084
	9	0.006	0.036	0.213	0.098
	11	0.014	0.041	0.282	0.260
3% ซังข้าวโพด	3	0.000	0.169	0.015	0.000
	5	0.004	0.120	0.276	0.041
	7	0.024	0.189	0.561	0.800
	9	0.013	0.072	0.217	0.278
	11	0.020	0.073	0.206	0.474

ตารางที่ 4 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
4% ซังข้าวโพด	3	0.011	0.150	0.012	0.010
	5	0.002	0.144	0.087	0.034
	7	0.006	0.115	0.116	0.026
	9	0.012	0.105	0.091	0.136
	11	0.019	0.145	0.158	0.202
5% ซังข้าวโพด	3	0.002	0.226	0.086	0.030
	5	0.003	0.182	0.111	0.077
	7	0.011	0.193	0.204	0.211
	9	0.008	0.149	0.168	0.192
	11	0.012	0.114	0.224	0.376

3. การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช้แป้งจาก *P. ostreatus* DOA 10

ศึกษาถึงผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง โดยให้แหล่งคาร์บอนเป็นซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาที่การเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 พบว่าแหล่งไนโตรเจนทั้ง 5 ชนิดคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย เพปโตน บีฟเอ็กซ์แทร็ค และ กากถั่วเหลือง ทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน สังเกตจากปริมาณกลูโคซามีนที่เพิ่มขึ้นคือมีปริมาณกลูโคซามีนโดยเฉลี่ย 8.98, 15.30, 18.46, 25.40 และ 28.00 ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 3, 5, 7, 9 และ 11 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 13

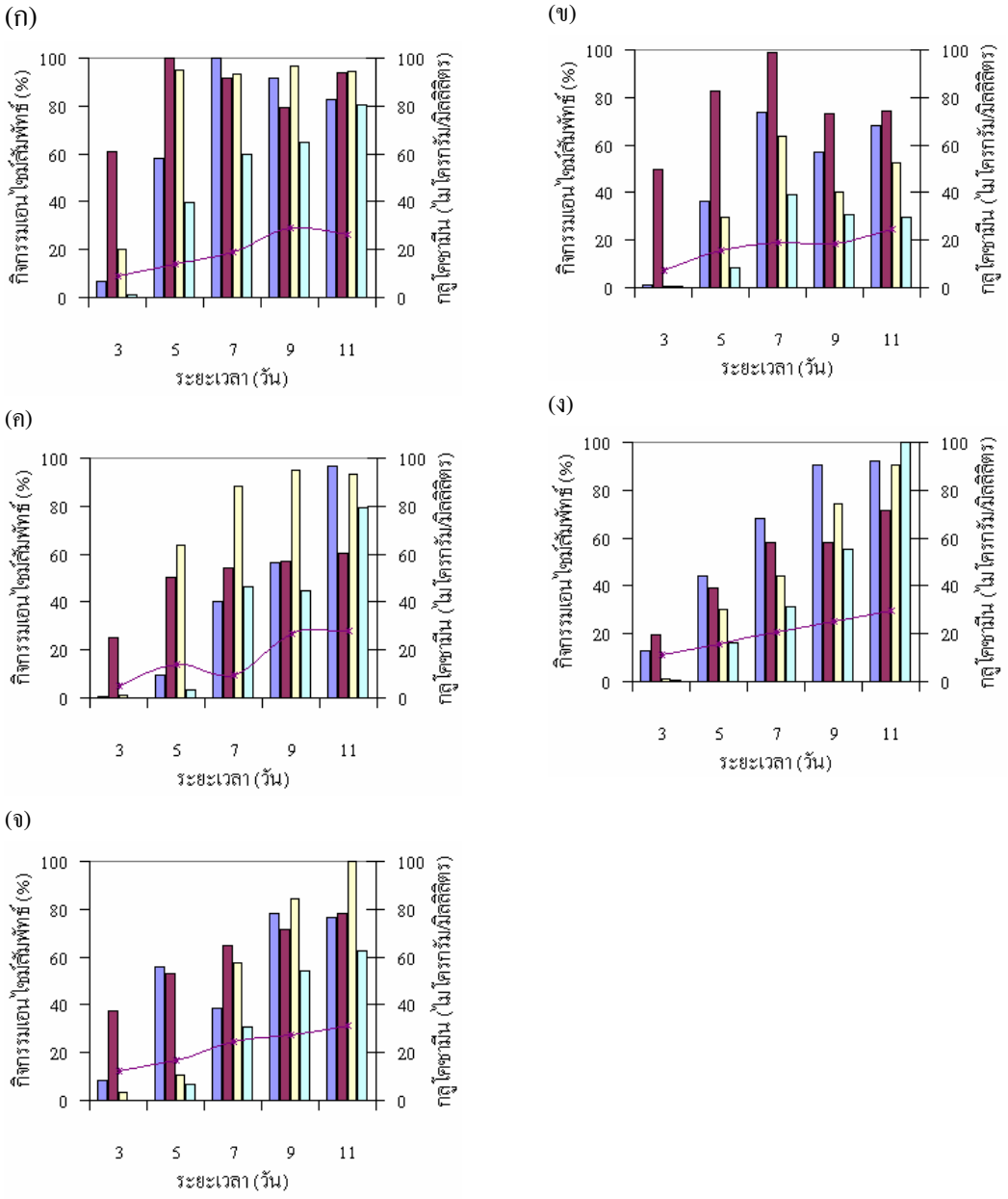


ภาพที่ 13 แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10

เมื่อศึกษาถึงผลของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 5 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย เพปโตน บีฟเอ็กซ์แทร็คและกากถั่วเหลือง พบว่าแหล่งไนโตรเจนนั้นจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อน้อยมากแต่จะส่งผลปริมาณโปรตีนที่เชื้อสร้างขึ้นโดยเมื่อให้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งโตรเจน เชื้อจะมีการผลิตโปรตีนออกมาสูง ซึ่งแสดงผลเช่นเดียวกับรายงานของ Ikram-ul *et al.* (2002) เนื่องจากเส้นใยของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 สามารถดึงไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตที่ผ่านเข้าเซลล์แล้วนำไปใช้ได้ทันที นอกจากนี้ยังพบว่าโมเลกุลของซัลเฟตยังส่งผลดีในเรื่องการเจริญของเส้นใยอีกด้วย เช่นเดียวกับเมื่อใช้เพปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีการผลิตโปรตีนในปริมาณที่สูงกว่ากรณีที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนและมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ซึ่งตรงกับรายงานของ Adejoyde *et al.* (2006) ที่ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อ *P. florida* และ Mikiashvili *et al.* (2005) ที่ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *Trametes versicolor* ซึ่งรายงานว่าเมื่อใช้เพปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนส่งผลดีต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์ซึ่งแสดงค่าในรูปกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ (ภาพที่ 14) เมื่อให้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลสสัมพัทธ์เป็น 6.5 เปอร์เซ็นต์ และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (0.585 ยูนิต/มิลลิลิตร) จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจะลดต่ำลงเล็กน้อยคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 82.56-91.79 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้ยูเรียที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (0.005 ยูนิต/มิลลิลิตร) และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 56.75-73.68 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง ในกรณีที่ใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 0.34 เปอร์เซ็นต์และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 96.75 เปอร์เซ็นต์ (0.566 ยูนิต/มิลลิลิตร) กรณีที่ใช้บีฟเอ็กซ์แทร็คที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 12.65 เปอร์เซ็นต์ และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นและมีค่าสูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 92.24 เปอร์เซ็นต์ (0.563 ยูนิต/มิลลิลิตร) และเมื่อใช้กากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 8.55 เปอร์เซ็นต์และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 77.95 เปอร์เซ็นต์ (0.456 ยูนิต/มิลลิลิตร)

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสโดยให้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 60.91 เปอร์เซ็นต์และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (3.392 ยูนิต/มิลลิลิตร) จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสจะลดต่ำลงเล็กน้อยคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 79.24-93.69 เปอร์เซ็นต์จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง เมื่อให้ยูเรียที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 49.85 เปอร์เซ็นต์ และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 14 แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์

(ก) แอมโมเนียมซัลเฟต (ข) ยูเรีย (ค) เพปโตน (ง) บีฟเอ็กซ์แทร็ค (จ) กากถั่วเหลือง

เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส
เอนไซม์เพคติเนส
เอนไซม์ไซลาเนส
เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
ปริมาณกลูโคซามีน

คือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 99 เปอร์เซ็นต์ (3.358 ยูนิต/มิลลิลิตร) จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสจะลดต่ำลงเล็กน้อยคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 72.96-74.06 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยงและเมื่อให้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 25.41 เปอร์เซ็นต์และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 50.18-60.29 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง เมื่อให้บีฟเอ็กซ์แทร็คที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 19.60 เปอร์เซ็นต์และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 71.70 เปอร์เซ็นต์ (2.432 ยูนิต/มิลลิลิตร) และเมื่อใช้กากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 37.62 เปอร์เซ็นต์และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 78.01 เปอร์เซ็นต์ (2.646 ยูนิต/มิลลิลิตร)

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสโดยให้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 20.01 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 93.24-96.71 เปอร์เซ็นต์ โดยจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง (5.962 ยูนิต/มิลลิลิตร) จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง เมื่อให้ยูเรียที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 0.65 เปอร์เซ็นต์และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 40.06-63.68 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อให้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 1.23 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 63.58-94.86 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง เมื่อให้บีฟเอ็กซ์-แทร็คที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 1.35 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 90.61 เปอร์เซ็นต์ (5.586 ยูนิต/มิลลิลิตร) และเมื่อใช้กากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่า

กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 3.55 เปอร์เซ็นต์และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (6.165 ยูนิต/มิลลิลิตร)

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสโดยให้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 1.07 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 80.35 เปอร์เซ็นต์ (13.461 ยูนิต/มิลลิลิตร) เมื่อให้ยูเรียที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 0.61 เปอร์เซ็นต์ และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ช่วง 29.42-39.10 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง และเมื่อให้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 3.44 เปอร์เซ็นต์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงสุดเป็น 79.25 เปอร์เซ็นต์ (13.276 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อให้บีฟเอ็กซ์แทร็คที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 0.67 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (16.752 ยูนิต/มิลลิลิตร) เมื่อใช้กากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะพบกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 6.82 เปอร์เซ็นต์และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 62.83 เปอร์เซ็นต์ (10.526 ยูนิต/มิลลิลิตร)

เมื่อพิจารณาถึงผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์จากตารางที่ 5 พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดคือ 0.024 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้ยูเรียที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.031 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.024 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนกรณีที่ใช้บีฟเอ็กแทร็คที่ความ

เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.021 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงและเมื่อใช้กากถั่วเหลืองความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลสสูงสุดคือ 0.019 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาถึงผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.244 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.238 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโค-ซามีน ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะให้ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.189 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเมื่อใช้บีฟเอ็กแทร็คที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.096 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงและเมื่อใช้กากถั่วเหลืองความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.107 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาถึงผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.422 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.209 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีนในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงและเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นเพปโตนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.561 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้บีฟเอ็กแทร็คที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.189 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโค-ซามีน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงและเมื่อใช้กากถั่วเหลืองความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะให้ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.197 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงและเมื่อพิจารณาถึงผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์บีต้ากลูคาเนสเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.533 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโค-ซามีน ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้ยูเรีย ณ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.348 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 7

ตารางที่ 5 ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ได้จากการใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน)

แหล่งไนโตรเจน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
แอมโมเนียมซัลเฟต	3	0.004	0.235	0.141	0.020
	5	0.024	0.244	0.422	0.478
	7	0.031	0.165	0.306	0.533
	9	0.018	0.092	0.204	0.373
	11	0.018	0.12	0.221	0.51
ยูเรีย	3	0.000	0.238	0.006	0.015
	5	0.013	0.179	0.115	0.088
	7	0.023	0.179	0.209	0.348
	9	0.018	0.135	0.135	0.283
	11	0.016	0.101	0.13	0.199
เพปโตน	3	0.000	0.169	0.015	0.000
	5	0.004	0.120	0.276	0.041
	7	0.024	0.189	0.561	0.800
	9	0.012	0.072	0.217	0.278
	11	0.020	0.073	0.206	0.474
บีฟเอ็กซ์แทร็ค	3	0.006	0.058	0.007	0.010
	5	0.016	0.084	0.117	0.169
	7	0.019	0.096	0.133	0.255
	9	0.021	0.078	0.181	0.368
	11	0.019	0.082	0.189	0.568

ตารางที่ 5 (ต่อ)

แหล่งไนโตรเจน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
กากถั่วเหลือง	3	0.004	0.102	0.018	0.000
	5	0.019	0.107	0.039	0.068
	7	0.009	0.090	0.145	0.212
	9	0.017	0.089	0.191	0.334
	11	0.014	0.085	0.197	0.336

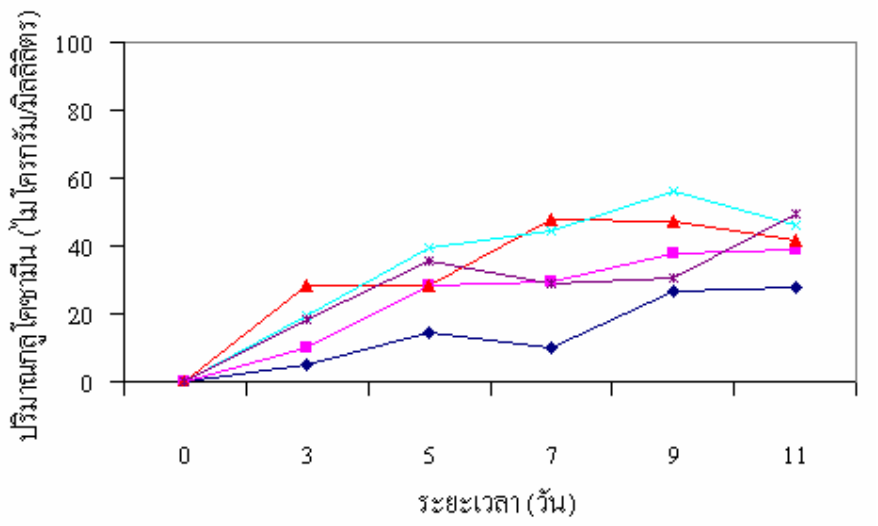
ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.800 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีนในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้บีฟเอ็กซ์แทร็คความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.568 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงและเมื่อใช้กากถั่วเหลืองความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงสุดคือ 0.336 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีนในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาในภาพรวม สังเกตได้ว่าเมื่อให้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *P. ostraetus* DOA 10 จะผลิตเอนไซม์ที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 80-100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับเมื่อใช้เพปโตนและบีฟเอ็กซ์แทร็คเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เมื่อพิจารณาผลได้เอนไซม์จะพบว่ากรณีที่ใช้เพปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ค่าผลได้เอนไซม์ไซลาเนสและบีต้ากลูคาเนสสูงที่สุด เช่นเดียวกับรายงานของ Seyis and Aksoz (2005) ที่ทำการทดลองถึงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Trichoderma harzianum* 1073 D3และแม้ว่าค่าผลได้เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอนไซม์เพคติเนสจะต่ำกว่ากรณีที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่ค่าที่ได้ก็มีค่าใกล้เคียงกัน และจากรายงานของ Kaal *et al.* (1995) กล่าวว่าเพปโตนจะช่วยส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรากลุ่มราขาว (white-rot fungi) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่

แป้ง นอกจากนี้เมื่อใช้เพปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าเชื้อมีการผลิตโปรตีนออกนอกเซลล์สูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง ณ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ คือ เพปโตนซึ่งจะใช้ในการทดลองต่อไป

4. การศึกษาผลของความเข้มข้นของเพปโตนซึ่งถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจาก *P. ostreatus* DOA 10

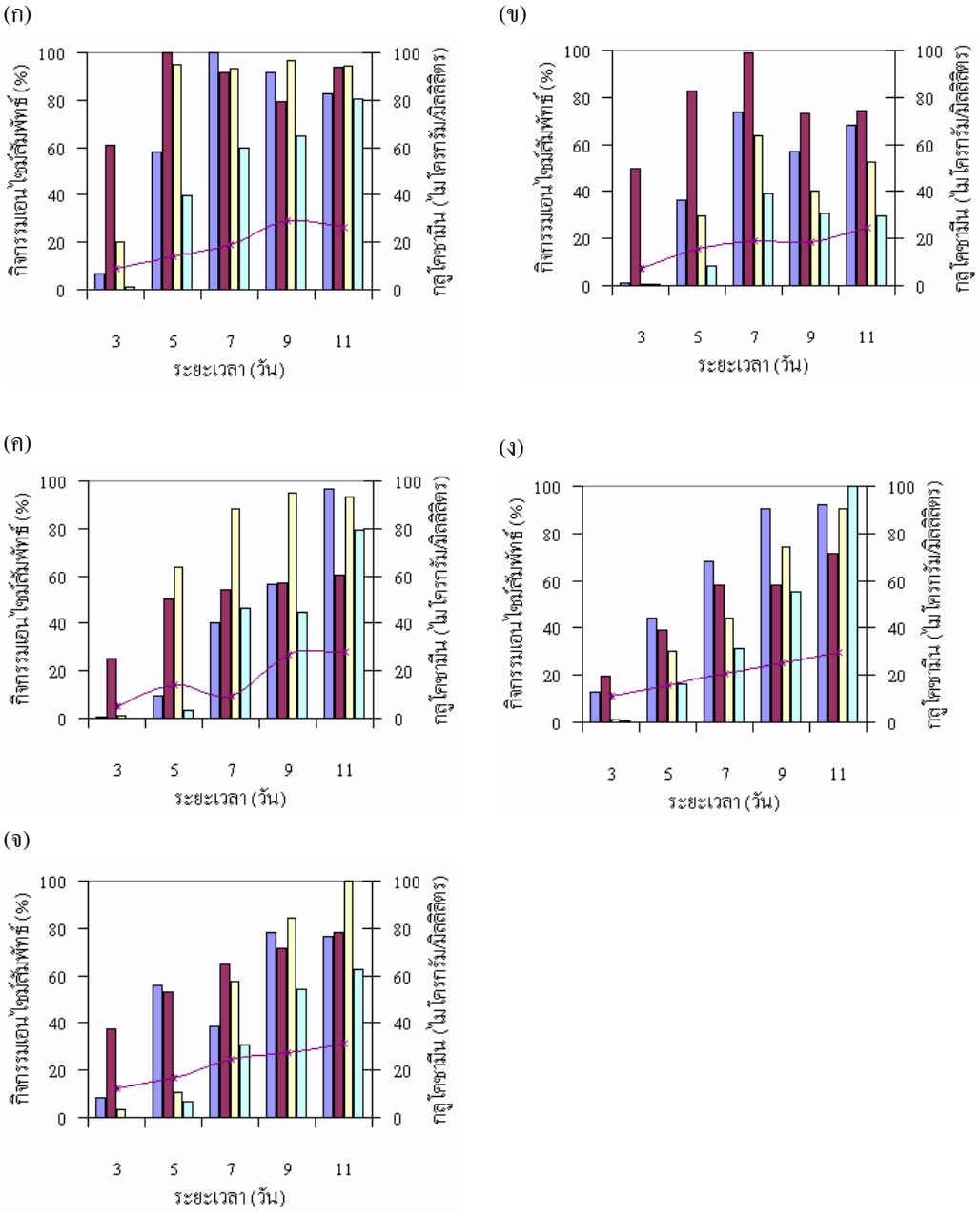
เมื่อวัดการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 ที่เพาะเลี้ยงใน Mandel's solution ซึ่งใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เพปโตนที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน ดังภาพที่ 15 เมื่อใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะสร้างกลูโคซามีน 10.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงคือจะมีปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มสูงขึ้นถึง 2.8 เท่า คือมีปริมาณกลูโคซามีน 28.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าสูงสุดเป็น 39.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อจะสร้างกลูโคซามีนสูงคือมีค่า 28.1 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตรในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง คือ มีปริมาณกลูโคซามีน 47.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจะเป็นค่าสูงสุด เมื่อใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อจะสร้างกลูโคซามีน 19.7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆจนมีปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงโดยจะมีค่า 55.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อจะสร้างกลูโคซามีน 18.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้น 1.94 เท่าในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงคือมีปริมาณกลูโคซามีน 35.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรจากนั้นปริมาณกลูโคซามีนจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 11 ของระยะการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าสูงสุดเป็น 49.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากผลการทดลองที่ได้ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเพปโตนเพิ่มขึ้น เชื้อจะสร้างกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นจนถึงที่ความเข้มข้นของเพปโตนเป็น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เชื้อจะมีการเจริญลดลง ดังนั้นความเข้มข้นเพปโตนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อคือ เพปโตนที่ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/ปริมาตรและเมื่อศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์พบว่าการเจริญของเชื้อจะแปรผันตามความเข้มข้นของเพปโตนคือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะมีแนวโน้มในการ



ภาพที่ 15 ผลของความเข้มข้นของเพปโตนต่อการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10

สร้างกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นไม่เกิน 2.0 เปอร์เซ็นต์และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น เชื้อจะมีแนวโนวการสร้างกลูโคซามีนลดลง อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของเพปโตนที่สูงเกินไปจะเป็นพิษและส่งผลเสียต่อการเจริญ

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์ซึ่งแสดงเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ ดังภาพที่ 16 กรณีที่ใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลสต่ำคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 0.12 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยจะมีกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 13.59-32.58 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะการเพาะเลี้ยง กรณีที่ใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง คือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 2.24 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงตลอดระยะการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 49.05-100 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีค่าสูงสุดเป็น 1.737 ยูนิต/มิลลิลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง กรณีใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น



ภาพที่ 16 ผลของความเข้มข้นของเพปโตนต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์
(ก) 0.2 เปอร์เซ็นต์ (ข) 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ค) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ง) 1.2 เปอร์เซ็นต์
(จ) 2.0 เปอร์เซ็นต์

14.05 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมเอนไซม์จะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นโดยกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะมีค่าอยู่ในช่วง 51.01-61.37 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง ส่วนกรณีใช้เพปโตนความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 1.55 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมเอนไซม์จะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 7.43-19.69 เปอร์เซ็นต์ และกรณีใช้เพปโตนความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 1.33-28.15 เปอร์เซ็นต์ ตลอดการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส กรณีที่ใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 35.95 เปอร์เซ็นต์ (0.862 ยูนิต/มิลลิลิตร) และมีค่าเพิ่มขึ้นโดยจะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 70.98-85.28 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง คือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 30.90 เปอร์เซ็นต์ (0.741 ยูนิต/มิลลิลิตร) และกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงโดยจะมีค่าสูงสุดในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (2.398 ยูนิต/มิลลิลิตร) กรณีใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 22.94-45.37 เปอร์เซ็นต์ กรณีใช้เพปโตนความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง คือ มีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 6.63-36.53 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรณีใช้เพปโตนความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบกิจกรรมเอนไซม์โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 33.69-43.24 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส กรณีที่ใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 1.30 เปอร์เซ็นต์ (0.076 ยูนิต/มิลลิลิตร) และกิจกรรมเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (5.848 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง กรณีที่ใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 6.91-90.03 เปอร์เซ็นต์ตลอดระยะการเพาะเลี้ยง กรณีใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 13.03-52.40

เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง ส่วนกรณีใช้เพปโตนความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 8.79 เปอร์เซ็นต์ และพฤติกรรมของกิจกรรมเอนไซม์จะมีแนวโน้มเช่นเดียวกับกรณีที่ใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 12.77-30.95 เปอร์เซ็นต์ และกรณีใช้เพปโตนความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 16.33 เปอร์เซ็นต์ (0.955 ยูนิต/มิลลิลิตร) และกิจกรรมเอนไซม์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 42.73 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส กรณีที่ใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 2.99-68.71 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง (13.276 ยูนิต/มิลลิลิตร) กรณีที่ใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนพบกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 0.64 เปอร์เซ็นต์ (0.124 ยูนิต/มิลลิลิตร) และกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (19.322 ยูนิต/มิลลิลตร) กรณีใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 5.17 เปอร์เซ็นต์ (0.999 ยูนิต/มิลลิลิตร) จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะอยู่ในช่วง 14.41-24.25 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง กรณีใช้เพปโตนความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 1.96 เปอร์เซ็นต์ และพฤติกรรมของกิจกรรมเอนไซม์จะมีแนวโน้มเช่นเดียวกับกรณีที่ใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงสุดเป็น 9.49 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่7 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีแนวโน้มลดลงจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง ส่วนกรณีใช้เพปโตนความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบกิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 2.58 เปอร์เซ็นต์ (0.498 ยูนิต/มิลลิลิตร) และกิจกรรมเอนไซม์จะมีค่าลดลงในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จึงจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 20.73 เปอร์เซ็นต์ (4.006 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ในตารางที่ 6 พบว่าเมื่อใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ค่าผลได้เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมากที่สุดโดยจะมีค่า 0.047 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีนในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง เช่นเดียวกับผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส คือจะมีค่ามากที่สุดเมื่อพบใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยจะมีค่า 0.073, 0.135 และ 0.494 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน และเมื่อพิจารณาในภาพรวมความเข้มข้นเพปโตนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ คือกรณีที่ใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะมีค่าไม่แตกต่างจากกรณีที่ใช้เพปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ ณ ความเข้มข้นเพปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์จะให้กิจกรรมเอนไซม์และผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์โดยรวมสูงกว่า

ตารางที่ 6 ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์จากการใช้เพปโตนที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน)

แหล่งไนโตรเจน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
0.2 % เพปโตน	3	0.000	0.169	0.015	0.000
	5	0.004	0.120	0.276	0.041
	7	0.024	0.187	0.556	0.791
	9	0.012	0.072	0.217	0.278
	11	0.020	0.073	0.206	0.474
0.5 % เพปโตน	3	0.004	0.073	0.040	0.012
	5	0.030	0.054	0.088	0.114
	7	0.047	0.064	0.120	0.217
	9	0.043	0.063	0.122	0.344
	11	0.044	0.055	0.135	0.494

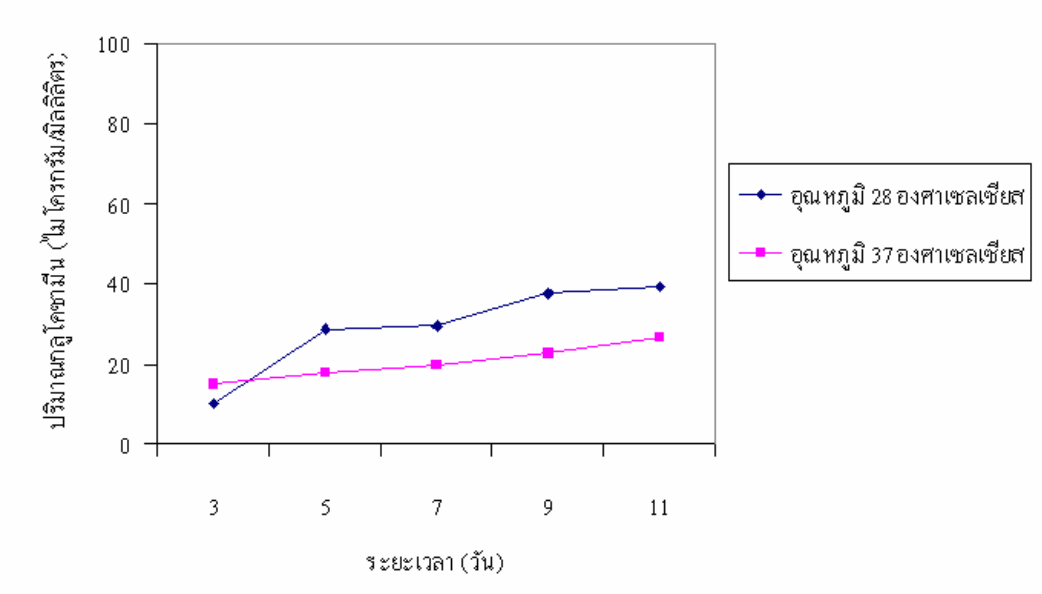
ตารางที่ 6 (ต่อ)

แหล่งไนโตรเจน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
0.8 %	3	0.009	0.031	0.027	0.036
เพปโตน	5	0.024	0.034	0.065	0.072
	7	0.022	0.012	0.057	0.098
	9	0.021	0.017	0.064	0.074
	11	0.021	0.026	0.061	0.066
1.2 %	3	0.001	0.023	0.026	0.019
เพปโตน	5	0.009	0.022	0.043	0.022
	7	0.007	0.004	0.023	0.041
	9	0.002	0.006	0.032	0.003
	11	0.005	0.005	0.016	0.009
2.0 %	3	0.009	0.057	0.052	0.027
เพปโตน	5	0.003	0.007	0.028	0.008
	7	0.005	0.006	0.044	0.045
	9	0.000	0.026	0.044	0.126
	11	0.010	0.020	0.050	0.081

ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง คือ เพปโตน ณ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์จะส่งผลเช่นเดียวกับกรณีของการสร้างกลูโคซามีนคือเชื้อผลิตเอนไซม์ซึ่งจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสสูงเมื่อใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน รวมถึงที่สภาวะนี้จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์สูงที่สุดอีกด้วย จากผลการทดลองจึงใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ในการทดลองในหัวข้อต่อไป

5. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจากเชื้อ *P. ostreatus* DOA10

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 28 และ 37 องศาเซลเซียสโดยใช้ซังข้าวโพดความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและเพปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแสดงในภาพที่ 17 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีปริมาณกลูโคซามีนในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง 10.2 ไมโครกรัมกลูโคซามีนและจะมีค่าเพิ่มขึ้น 2.79 เท่าอย่างรวดเร็วในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงคือมีค่าเป็น 28.6 ไมโครกรัมกลูโคซามีน จากนั้นจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนมีค่ามากที่สุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง คือมีค่า 39.1 ไมโครกรัมกลูโคซามีน ส่วนกรณีที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณกลูโคซามีนในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเป็น 15.2 ไมโครกรัมกลูโคซามีนและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยคือมีปริมาณกลูโคซามีนอยู่ในช่วง 17.9-26.6 ไมโครกรัมกลูโค-ซามีน จนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง

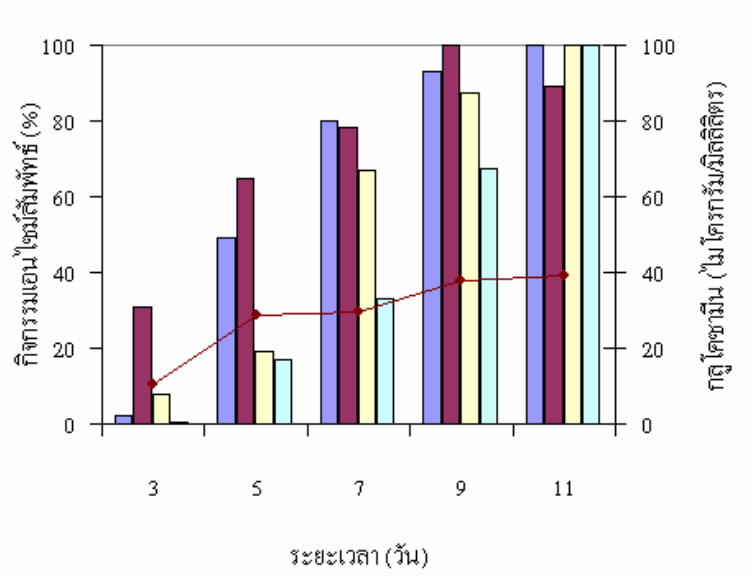


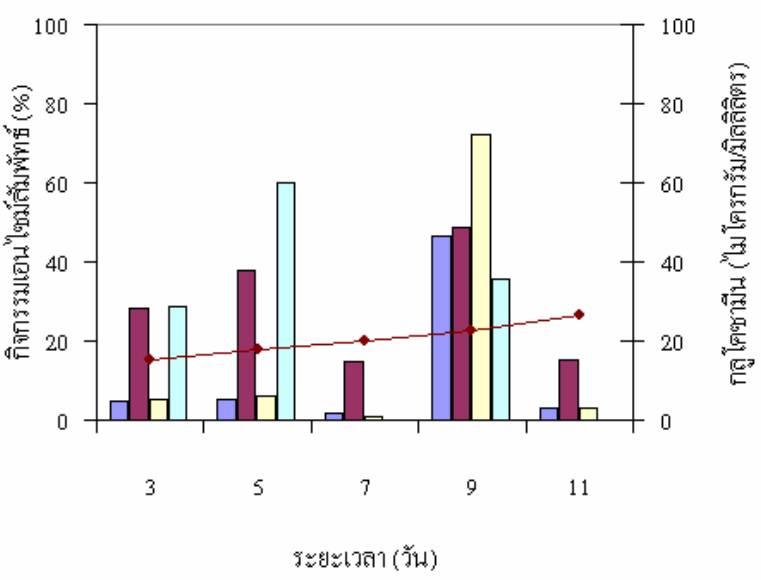
ภาพที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมซึ่งแสดงเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ดังภาพที่ 18 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลสสัมพัทธ์เป็น 2.18 เปอร์เซ็นต์ (0.038 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นมาก โดยจะมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (1.737 ยูนิต/มิลลิลิตร) ส่วนกรณีที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 4.84 เปอร์เซ็นต์ (0.084 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงจากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงเป็น 1.55 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจะมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่งในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งเป็นวันที่มีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 46.46 เปอร์เซ็นต์

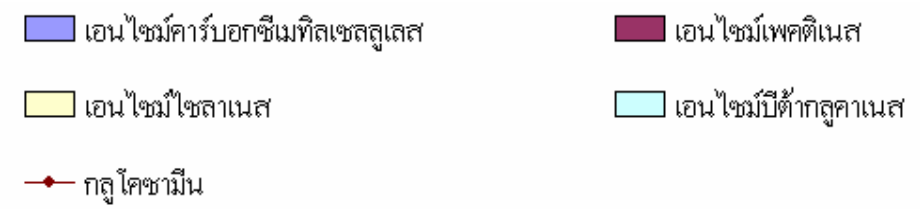
เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 30.90 เปอร์เซ็นต์ (0.741 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นมาก โดยจะมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (2.398 ยูนิต/มิลลิลิตร) ส่วนกรณีที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 28.23 เปอร์เซ็นต์ (0.677 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และมีพฤติกรรมเอนไซม์คล้ายกับเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงเป็น 14.60 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และค่ากิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่งในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวันที่มีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 48.62 เปอร์เซ็นต์ (1.166 ยูนิต/มิลลิลิตร)

พิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 7.67 เปอร์เซ็นต์ (0.404 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเป็น 2.48-3.53 เท่า โดยจะมีค่ามากที่สุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง คือมีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (5.265 ยูนิต/มิลลิลิตร) ส่วนกรณีที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 5.34 เปอร์เซ็นต์ (0.281 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและมีพฤติกรรมเอนไซม์คล้ายกับเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนส คือ





ภาพที่ 18 กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 และ 37 องศาเซลเซียส



มีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงจากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และกิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่งในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งเป็นวันที่มีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 72.25 เปอร์เซ็นต์ (3.804 ยูนิต/มิลลิลิตร) และเมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 0.64 เปอร์เซ็นต์ (0.124 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากและจะมีค่ามากที่สุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ของเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (19.322 ยูนิต/มิลลิลิตร) ส่วนกรณีที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 28.48 เปอร์เซ็นต์ (5.503 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและมีพฤติกรรมเอนไซม์คล้ายกับเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนสและเอนไซม์ไซลาเนส คือจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงโดยมีเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 60.02 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงเป็น 0.00 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 35.82 เปอร์เซ็นต์ (6.921 ยูนิต/มิลลิลิตร)

เมื่อพิจารณาที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ดังตารางที่ 7 พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในการเพาะเลี้ยง เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีผลได้ของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนสสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยจะมีค่าเป็น 0.047 และ 0.072 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ตามลำดับ เชื้อราแต่ละชนิดนั้นต้องการสภาวะในการเจริญที่แตกต่างกัน อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อรานั้นอยู่ในช่วงกว้างประมาณ 30-60 องศาเซลเซียส ตัวอย่างเช่น *Thermoascus aurantiacus* จะเจริญและมีสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับเชื้อราสายพันธุ์ที่ทนความร้อน (thermophillic strain) ชนิดอื่นๆ (Silva *et al.*, 2005)ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งยังคงเป็นสภาวะที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับรายงานของ จารุวรรณ (2548) ที่รายงานว่า เชื้อ *P.ostreatus* DOA 10 จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่ง *P. sajor-caju* (Fr.)Singer และ *P. eryngii* ก็เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 21-28 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน (Lal and Panda, 2005) และจากผลการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 เพื่อผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งจึงใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในการทดลองต่อไป เนื่องจากเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 และผลิตเอนไซม์

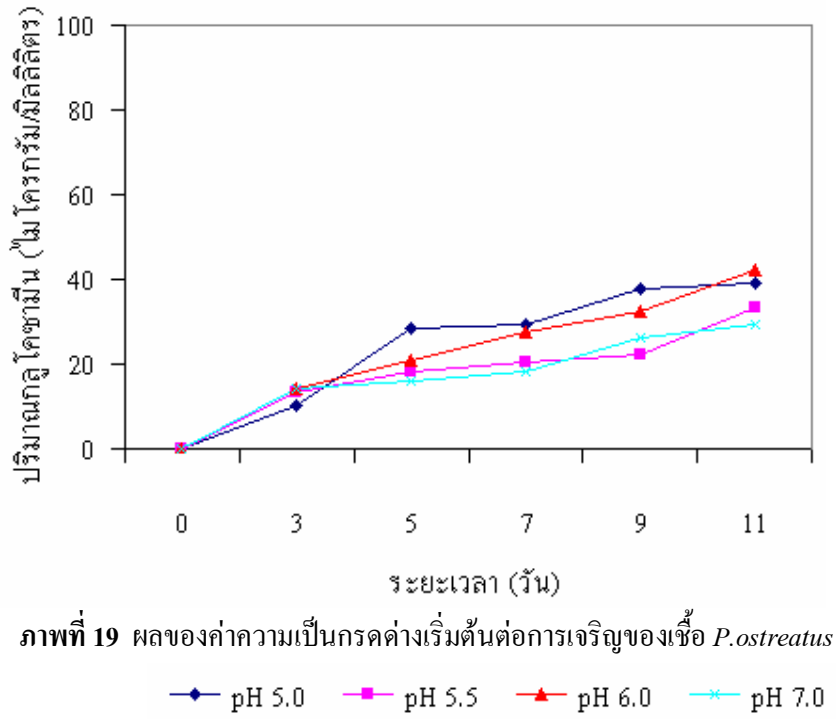
ตารางที่ 7 ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ (ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน)

อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
28	3	0.004	0.072	0.039	0.012
	5	0.030	0.054	0.088	0.114
	7	0.047	0.064	0.120	0.217
	9	0.043	0.063	0.122	0.345
	11	0.044	0.055	0.135	0.495
37	3	0.006	0.045	0.019	0.363
	5	0.005	0.051	0.018	0.649
	7	0.001	0.018	0.003	0.000
	9	0.036	0.052	0.168	0.306
	11	0.002	0.014	0.006	0.000

6. ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์

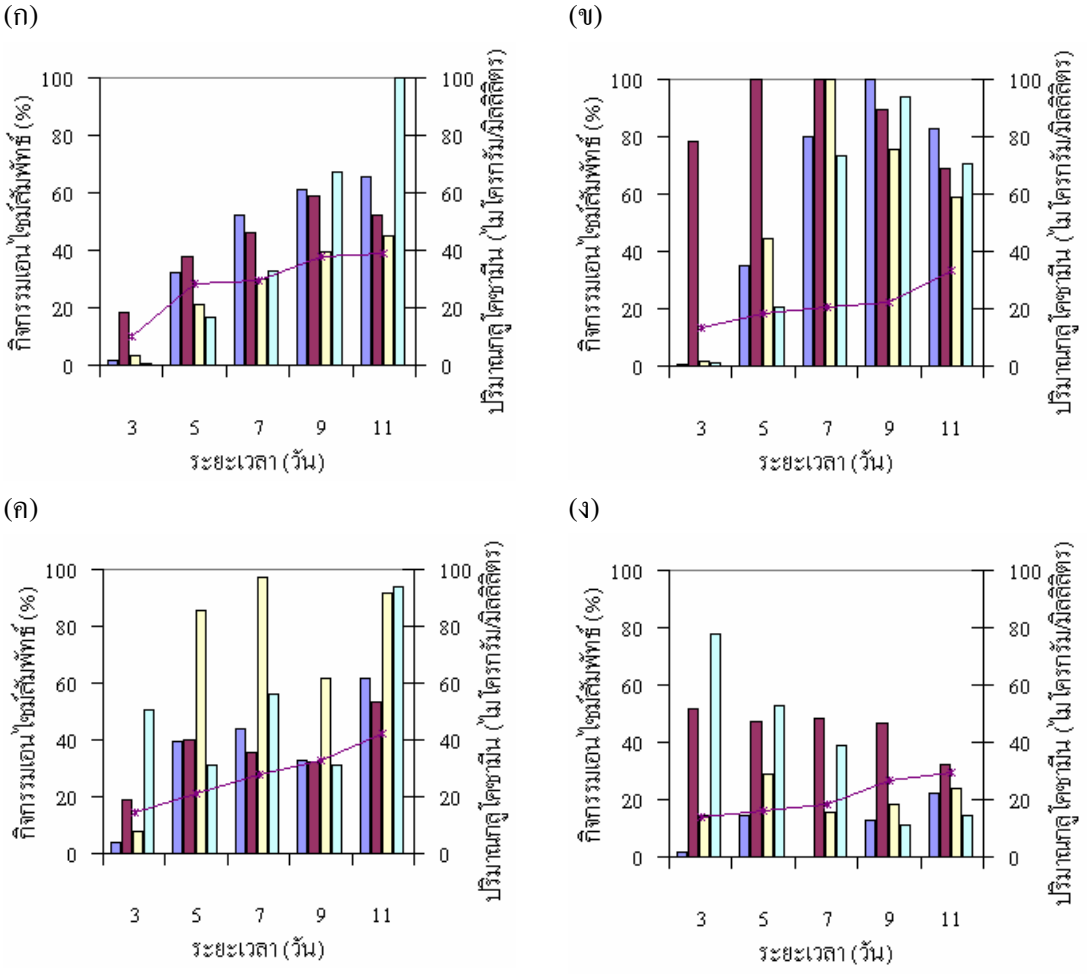
ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 เมื่อใช้ซังข้าวโพดความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และเพปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ แทนที่แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเพาะเลี้ยง Mandel's solution เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาที่ปริมาณกลูโคซามีนเพื่อศึกษาการเจริญพบว่าเชื้อจะสร้างกลูโคซามีนในปริมาณใกล้เคียงกัน ณ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่างๆ แต่ที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0 จะมีการเจริญดีที่สุด ดังภาพที่ 19

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์ ดังภาพที่ 20 ในกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0 จะพบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง คือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 1.43 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง โดยจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเป็น 65.55 เปอร์เซ็นต์ (1.737 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ในกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.5 จะพบว่าเชื้อ



ภาพที่ 19 ผลของค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่อการเจริญของเชื้อ *P.ostreatus* DOA 10

มีการสร้างเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 0.38 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยงโดยจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (2.650 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ในกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 จะพบกิจกรรมเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 3.66 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง โดยจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเป็น 61.62 เปอร์เซ็นต์ (1.633 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงและในกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 จะพบกิจกรรมเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 1.58 เปอร์เซ็นต์และจะมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 14.26 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์จะลดต่ำลงจนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 0.04 เปอร์เซ็นต์ (0.001 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง โดยจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเป็น 22.04 เปอร์เซ็นต์ (0.584 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 20 ผลของค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง
(ก) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0 (ข) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.5
(ค) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 (ง) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสในกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0 จะพบกิจกรรมเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 18.11 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง โดยจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเป็น 58.62 เปอร์เซ็นต์ (2.398 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.5 จะพบกิจกรรมเอนไซม์สูงตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 78.17 เปอร์เซ็นต์และมีค่าเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (4.091 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจะมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 89.56-99.85 เปอร์เซ็นต์ และจะมีค่าลดลงถึง 68.83 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ในกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 จะพบกิจกรรมเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 18.92 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง โดยจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเป็น 53.09 เปอร์เซ็นต์ (2.172 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงและในกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 จะพบกิจกรรมเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง คือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 51.84 เปอร์เซ็นต์ (2.121 ยูนิต/มิลลิลิตร) และจะมีกิจกรรมเอนไซม์ลดต่ำลงจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยงมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 32.22 เปอร์เซ็นต์ (1.318 ยูนิต/มิลลิลิตร) ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสในกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0 จะพบกิจกรรมเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 3.44 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง โดยจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเป็น 44.89 เปอร์เซ็นต์ (5.265 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ในกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.5 จะพบกิจกรรมเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 1.74 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (11.729 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงเป็น 75.62 และ 59.14 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 9 และ 11 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ส่วนกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 จะพบกิจกรรมเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 7.65 เปอร์เซ็นต์และมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก โดยจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเป็น 85.70 และ 97.16 เปอร์เซ็นต์ (10.052 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 5 และ 7 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์

ไซลาเนสจะมีค่าลดลงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 61.53 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 91.70 เปอร์เซ็นต์ และในกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 จะพบกิจกรรมเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 14.36 เปอร์เซ็นต์และจะมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 28.83 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์จะลดต่ำลงจนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 15.75 และ18.29 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 และ 9 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้น โดยจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็น 23.98 เปอร์เซ็นต์ (2.813 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสในกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0 จะพบกิจกรรมเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 0.64 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง โดยจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 16.93, 32.98 และ 67.37 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 5, 7 และ 9 ของการเพาะเลี้ยงและมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (19.322 ยูนิต/มิลลิลิตร)ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ในกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.5 จะพบกิจกรรมเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 1.07 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็น 20.63, 73.56 และ93.74 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 5, 7 และ 9 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงเป็น 70.29 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ส่วนกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 จะพบกิจกรรมเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 50.71 เปอร์เซ็นต์และค่ากิจกรรมเอนไซม์จะลดลงเล็กน้อย โดยจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็น 31.20 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสจะมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 55.86 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงและจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงอีกครั้งในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 31.04 เปอร์เซ็นต์ และมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 93.62 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 จะพบกิจกรรมเอนไซม์สูงตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 78.00 เปอร์เซ็นต์และหลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์จะลดต่ำลงจนสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยง โดยมีค่า

กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 52.70, 39.04,11.35 และ 14.66 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 5, 7, 9 และ 11 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ดังตารางที่ 8 พบว่าที่สภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 จะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเป็น0.170 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน และที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 5.5 จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมากที่สุดคือมีค่า 0.215 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ส่วนที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 6.0 จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลสเป็น 0.116 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีนและที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 7.0 จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเป็น 0.042 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน เมื่อพิจารณาที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนสพบว่าที่สภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 จะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนสเป็น 0.238 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน และที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 5.5 จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนสมากที่สุดคือมีค่า 0.256 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ส่วนที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 6.0 จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนสเป็น 0.153 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน และที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 7.0 จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนสเป็น 0.149 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน เมื่อพิจารณาที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลาเนสพบว่าที่สภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 จะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพคติเนสเป็น 0.515 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโค-ซามีน และที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 5.5 จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลาเนส 0.580 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ส่วนที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 6.0 จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลาเนสซึ่งจะให้ค่าสูงสุดเป็น 0.783 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีนและที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 7.0 จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซลาเนสเป็น 0.244 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีนและเมื่อพิจารณาที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์บีต้ากลูคาเนสพบว่าที่สภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 จะมีค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์บีต้ากลูคาเนสสูงสุดคือมีค่าเป็น 0.494 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน และที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 5.5 จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์บีต้ากลูคาเนสเป็น 0.816 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ส่วนที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 6.0 จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์บีต้ากลูคาเนสเป็น 0.680 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีนและที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 7.0 จะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์บีต้ากลูคาเนสเป็น 1.069 ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน ดังนั้นเมื่อพิจารณาในภาพรวมจะสังเกตว่าที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นจะไม่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อมากนัก เนื่องจาก

ตารางที่ 8 ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นแตกต่างกัน (ยูนิต/ไมโครกรัมกลูโคซามีน)

พีเอช	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
5.0	3	0.004	0.072	0.039	0.012
	5	0.030	0.054	0.088	0.114
	7	0.047	0.064	0.120	0.217
	9	0.043	0.063	0.122	0.345
	11	0.044	0.055	0.135	0.495
5.5	3	0.000	0.242	0.015	0.016
	5	0.051	0.227	0.290	0.221
	7	0.104	0.201	0.578	0.701
	9	0.119	0.165	0.399	0.815
	11	0.066	0.085	0.209	0.409
6.0	3	0.007	0.054	0.062	0.682
	5	0.050	0.078	0.478	0.287
	7	0.042	0.053	0.412	0.390
	9	0.027	0.040	0.222	0.184
	11	0.039	0.052	0.256	0.430
7.0	3	0.003	0.150	0.119	1.069
	5	0.024	0.122	0.213	0.640
	7	0.000	0.109	0.101	0.414
	9	0.013	0.072	0.081	0.083
	11	0.020	0.045	0.096	0.097

ปริมาณกลูโคซามีนที่เชื้อสร้างมีปริมาณใกล้เคียงกันแต่เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายจะพบว่าที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.5 จะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าสภาวะอื่นและผลได้ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ย่อยสลายจะมีมากเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.5

เชื้อราแต่ละชนิดนั้นต้องการสภาวะในการเจริญที่แตกต่างกันและค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นมีความสำคัญต่อการเจริญเนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดจะมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกันเช่น *Trametes versicolor* จะเจริญได้ดีที่สภาวะความเป็นกรดด่าง 6.0 และเชื้อ *P. ostreatus* จะเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 (Snajdr and Baldrian, 2007) เป็นต้น นอกจากนี้ค่าความเป็นกรดด่างยังส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนซึ่งมีคุณสมบัติเป็น amphoteric molecule คือมีส่วนที่แสดงความเป็นกรด (COO^-) และด่าง (NH_3^+) ซึ่งมักจะอยู่ที่ผิวโมเลกุลโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนที่ส่งผลต่อประจุโดยรวมของโมเลกุลโปรตีน เช่น กรดกลูตามิค (glutamic acid) กรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) ณ สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเป็นกลาง (pH 7.0) จะมีประจุ -1.0 อาร์จีนีน ไลซีน ที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเป็นกลาง (pH 7.0) จะมีประจุ +1.0 ฮิสทีดีน(histidine)ที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็นกลาง (pH 7.0) จะมีประจุ +0.5 ไทโรซีน(tyrosine) และซีสเตอีน (cysteine) ที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่างเป็นกลาง (pH 7.0) จะมีประจุ 0.0 เป็นต้น ดังนั้นค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงขึ้นหรือมีไฮโดรเจนไอออน (hydrogen ion, H^+) เพิ่มขึ้น จะส่งผลต่อความสามารถในการจับตัวของเอนไซม์คือไฮโดรเจนไอออนจะไปแย่งไอออนของโลหะ (metal ion) หรือสารที่มีประจุบวก (cation) ซึ่งจะจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ที่ตำแหน่ง binding site และหากไอออนของโลหะนั้นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็จะทำให้เอนไซม์นั้นมีค่ากิจกรรมลดลง ดังนั้นสรุปได้ว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนไปจะส่งผลต่อประจุบนโมเลกุลของโปรตีนซึ่งหากเกิดกับโมเลกุลของกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้กับตำแหน่ง active site จะส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ ความเสถียรของโครงสร้างโปรตีน ความสามารถในการละลายและความสามารถในการจับ (binding) กับสารตั้งต้น (substrate) และสภาวะความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 และการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งคือมีค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.5 เช่นเดียวกับรายงานของ จารุวรรณ (2548) ที่รายงานว่า เชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดเล็กน้อย อาจเป็นเพราะเอนไซม์ที่เชื้อผลิตออกมานั้นสามารถทำงานได้ดีที่สภาวะดังกล่าวจึงช่วยส่งเสริมให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดีเช่นเดียวกัน เช่น เอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสและเอนไซม์กลุ่มไซลาเนส มีสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.5-5.5 เป็นต้น จึงอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งที่ได้จากเชื้อ

P. ostreatus DOA 10 มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ growth associate enzyme คือมีการผลิตเอนไซม์ได้มากเมื่อเชื้อมีการเจริญดี

7. การทำให้เอนไซม์เข้มข้นด้วยเทคนิคอัลตร้าฟิวเตรชั่น

นำเอนไซม์ย่อยสลายที่ผลิตจากเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวโดยใช้สูตรอาหาร Mandel's solution ซึ่งแทนที่แหล่งคาร์บอนด้วยซังข้าวโพดความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์และแทนที่แหล่งไนโตรเจนด้วยเพปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสที่มีสภาวะค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.5 เป็นเวลา 9 วัน มาผ่านเครื่องอัลตร้าฟิว-เตรชั่นเพื่อทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้นและกำจัดสิ่งเจือปนหรือสารที่มีขนาดโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น ไอออนต่างๆออกจากสารละลายเอนไซม์ โดยการทดลองครั้งนี้จะเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุลขนาด 10,000 และ 30,000 ดาลตัน ดังแสดงในตารางที่ 9

เมื่อพิจารณาที่เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสพบว่าเมื่อใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 10,000 ดาลตันกิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจาก 2.650 ยูนิต/มิลลิลิตร เป็น 7.810 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่า purification เป็น 0.44 เท่า เมื่อใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 30,000 ดาลตัน กิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจาก 2.650 ยูนิต/มิลลิลิตร เป็น 7.175 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่ากรณีที่ใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 10,000 ดาลตันและมีค่า purification เป็น 0.64 เท่า เมื่อพิจารณาที่เอนไซม์เพคติเนสพบว่าเมื่อใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 10,000 ดาลตันกิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจาก 3.664 ยูนิต/มิลลิลิตร เป็น 17.094 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่า purification เป็น 0.70 เท่า เมื่อใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 30,000 ดาลตันกิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจาก 3.664 ยูนิต/มิลลิลิตร เป็น 15.140 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่ากรณีที่ใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 10,000 ดาลตัน เช่นเดียวกับกรณีเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลู-เลสและมีค่า purification เป็น 0.98 เท่า เมื่อพิจารณาที่เอนไซม์ไซลาเนสพบว่าเมื่อใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 10,000 ดาลตันกิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจาก 8.870 ยูนิต/มิลลิลิตร เป็น 65.660 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่า purification เป็น 1.11 เท่า เมื่อใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล30,000 ดาลตัน กิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจาก 8.870 ยูนิต/มิลลิลิตร เป็น 54.832 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่ากรณีที่ใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 10,000 ดาลตัน และมีค่า purification เป็น 1.46 เท่า เมื่อพิจารณาที่เอนไซม์บีต้ากลูคาเนสพบว่าเมื่อใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 10,000 ดาลตัน กิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจาก 18.113

ตารางที่ 9 ค่าต่างๆของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งที่ผ่านขั้นตอนการทำอัลตร้าฟิวเตรชั่น

	Fraction	Vol. (ml)	Enzyme activity (U/ml)	Total activity (U)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg. protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Carboxymethylcellulase	Crude enzyme	200	2.650	530.0	8.124	1624.8	0.326	100.00	1.00
	10K Reten-trate	20	7.810	156.2	54.204	1084.08	0.144	29.471	0.441
	10K Filtrate	180	0.000	0.000	3.417	615.06	0.000	0.000	0.00
	30K Reten-trate	20	7.175	143.5	34.272	685.44	0.209	27.075	0.641
	30K Filtrate	180	0.108	19.44	3.137	564.66	0.034	3.668	0.104
Pectinase	Crude enzyme	200	3.664	732.8	8.124	1624.80	0.451	100	1.00
	10K Retentrate	20	17.094	341.88	54.204	1084.08	0.315	46.65	0.70
	10K Filtrate	180	1.181	212.58	3.417	615.06	0.346	29.01	0.77
	30K Retentrate	20	15.140	302.8	34.272	685.44	0.442	41.32	0.98
	30K Filtrate	180	2.621	471.78	3.137	564.660	0.835	64.38	1.85

ตารางที่ 9 (ต่อ)

	Fraction	Vol. (ml)	Enzyme activity (U/ml)	Total activity (U)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Xylanase	Crude enzyme	200	8.870	1774.00	8.124	1624.80	1.092	100	1.00
	10K Retentrate	20	65.660	1313.2	54.204	1084.08	1.211	74.02	1.11
	10K Filtrate	180	2.697	485.46	3.417	615.06	0.789	27.36	0.72
	30K Retentrate	20	54.832	1096.64	34.272	685.44	1.600	61.82	1.46
	30K Filtrate	180	1.772	318.96	3.137	564.66	0.565	17.98	0.52
Beta-glucanase	Crude enzyme	200	18.113	3622.6	8.124	1624.8	2.230	100	1.00
	10K Retentrate	20	79.100	1582	54.204	1084.08	1.459	43.67	0.65
	10K Filtrate	180	0.973	175.14	3.417	615.06	0.285	4.83	0.13
	30K Retentrate	20	58.501	1170.02	34.272	685.44	1.707	32.30	0.76
	30K Filtrate	180	0.458	82.440	3.137	564.66	0.146	2.28	0.065

ยูนิต/มิลลิลิตร เป็น 79.100 ยูนิต/มิลลิลิตร และมีค่า purification เป็น 0.65 เท่า เมื่อใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 30,000 ดาลตัน กิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจาก 58.501 ยูนิต/มิลลิลิตร เป็น 7.175 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่ากรณีที่ใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 10,000 ดาลตันและมีค่า purification เป็น 0.76 เท่า และในการทำอัลตร้าฟิวเตรชั่นเมื่อใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 30,000 ดาลตัน จะใช้ระยะเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ส่วนกรณีที่ใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 10,000 ดาลตัน จะใช้เวลานานกว่าคือใช้ระยะเวลาประมาณ 5 ชั่วโมง แต่จะทำให้ได้สารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า ซึ่งในอุตสาหกรรมจะใช้แรงดันสูงจึงไม่มีปัญหาในเรื่องของระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการ

การทำให้เอนไซม์เข้มข้นโดยวิธีอัลตร้าฟิวเตรชั่นนั้นเป็นการกรองแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าค่ากักกันโมเลกุลของแผ่นกรองออกจากสารละลายเอนไซม์ โดยแผ่นกรองจะมีค่ากักกันโมเลกุลตั้งแต่ 1,000-10,000 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้แต่ในกรณีของงานในด้านโปรตีนมักใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุลอยู่ในช่วง 3,000-1,000,000 ดาลตัน และจากการทดลองในกรณีของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 10,000 ดาลตันจะมีโปรตีนหลุดออกมาเล็กน้อยแต่ไม่พบกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในส่วนของฟิวเตรท (filtrate) คือมีค่าเป็น 0.000 ยูนิต/มิลลิลิตร แต่เมื่อใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 30,000 ดาลตัน จะพบกิจกรรมในส่วนฟิวเตรทเล็กน้อย (0.108 ยูนิต/มิลลิลิตร) เป็นไปได้ว่าโปรตีนที่เป็นเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจะมีขนาดใหญ่กว่า 10,000 ดาลตัน แต่อาจมีบางโมเลกุลที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 30,000 ดาลตัน ทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์น้อยลงเช่นเดียวกับเอนไซม์ไซลาเนส เอนไซม์บีต้ากลูคาเนสอาจเป็นไปได้ว่าโมดุลของโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบในโมเลกุลของเอนไซม์นั้นๆหรือส่วนของเอนไซม์ที่มีขนาดเล็กจะหลุดออกไปตามแรงดันในกระบวนการทำอัลตร้าฟิวเตรชั่น ทำให้เอนไซม์ที่ได้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำลง จากผลการทดลองที่ได้ จึงใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุล 30,000 ดาลตัน ในการทำอัลตร้าฟิวเตรชั่นเพื่อทำให้สารละลายเอนไซม์เข้มข้นขึ้นเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

8. ผลของสารไอออนิกต่อกิจกรรมเอนไซม์

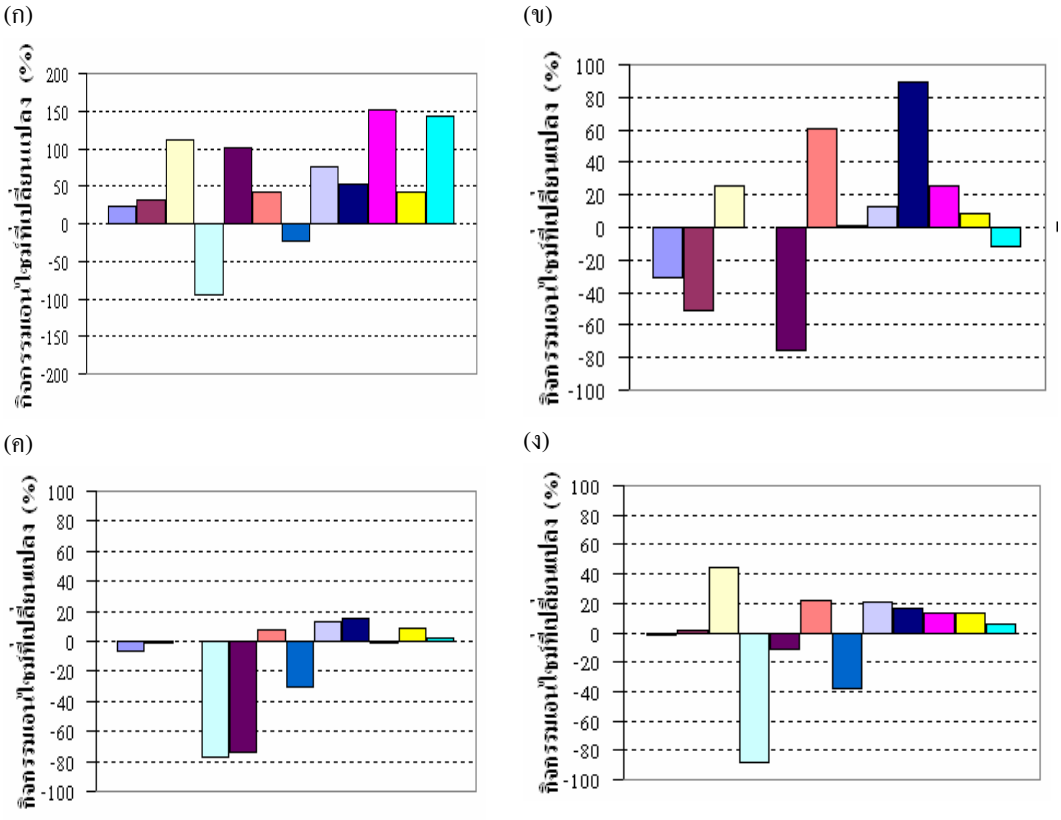
นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำอัลตร้าฟิวเตรชั่นมาทดสอบผลของสารไอออนิก เนื่องจากไอออนบางตัวจะไปจับที่แอคทีฟ ไซต์ หรือที่สายโซ่ของโปรตีนซึ่งอาจมีผลช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ แต่ไอออนบางตัวอาจก่อให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ดังนั้นจึงศึกษาถึงผลกระทบของสารไอออนิกโดยเปรียบเทียบจากค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยการผสมเอนไซม์กับสารละลายไอออนิกโดยใช้สารละลายไอออนิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ศึกษาถึงผลกระทบของไอออนลบและไอออนบวกโดยเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์กับชุดควบคุมซึ่งแสดงผลเป็นกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบกับการผสมเอนไซม์กับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (Ca^{2+}และ Cl^{-}) กับแคลเซียมซัลเฟต (Ca^{2+}และ SO_4^{2-}) และแมกนีเซียมคลอไรด์ (Mg^{2+}และ Cl^{-}) กับแมกนีเซียมซัลเฟต (Mg^{2+}และSO_4^{2-}) พบว่าพฤติกรรมของเอนไซม์ที่ผสมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และแคลเซียมซัลเฟตมีพฤติกรรมกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 122.82 และ 131.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพคติเนสคือ มีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ต่ำกว่าชุดควบคุมคือ มีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 69.23 และ 49.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์กับสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 176.09 และ 151.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ไอออนดังกล่าวยังส่งผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เพคติเนสให้มีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงกว่าชุดควบคุมคือมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 112.59 และ189.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและพฤติกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อผสมสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมซัลเฟตก็จะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงกว่าชุดควบคุมเช่นเดียวกัน โดยจะมีค่า 113.18 และ115.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสจะมีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่อผสมสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมซัลเฟตก็จะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงกว่าชุดควบคุมเช่นเดียวกัน โดยจะมีค่า 121.07 และ116.99 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จึงอาจสรุปได้ว่าไอออนลบมีผลกระทบต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์น้อยกว่าไอออนบวก

พิจารณาค่ากิจกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการเติมสารไอออนิกต่างๆ และใช้น้ำที่ปราศจากไอออนเป็นตัวควบคุม ซึ่งแสดงผลในภาพที่ 21 พบว่าสารละลายไอออนิกที่ส่งผลดีต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีดังนี้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) แคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$) โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) โพแทสเซียม คลอไรด์ (KCl) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) โดยสารละลายแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) โคบอลต์ คลอไรด์ ($CoCl_2$) และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) จะช่วยกระตุ้นให้มีกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเพิ่มสูงกว่าชุดควบคุมถึง151.08, 142.93, 112.50 และ101.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์จะส่งผลดีต่อกิจกรรมเอนไซม์เช่นกันและมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าชุดควบคุม 76.08, 51.62, 41.30, 31.52 และ22.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์จะมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากันคือ 8.926 ยูนิต/มิลลิลิตร แต่สารละลายลิเทียมคลอไรด์ (LiCl) และ คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) มีผลยับยั้งเอนไซม์ ทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีค่าลดลงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์ต่ำกว่าชุดควบคุมถึง 22.83 และ 94.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เพคติเนสจะพบว่าสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟต จะส่งผลดีต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยแมกนีเซียมซัลเฟต โพแทสเซียมคลอไรด์ แมงกานีสซัลเฟต โคบอลต์คลอไรด์จะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าชุดควบคุมถึง 89.17, 60.50, 25.88 และ 25.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารละลายเฟอรัสซัลเฟต แคลเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ และซิงค์ซัลเฟตจะยับยั้งการทำงานเอนไซม์ทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลง คือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำกว่าชุดควบคุม 75.52, 50.69, 30.76 และ 11.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ส่วนสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต เฟอรัสซัลเฟต ลิเทียมคลอไรด์ ในสารละลายเอนไซม์จะทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสลดต่ำลงมากคือมีกิจกรรมเอนไซม์ต่ำกว่าชุดควบคุมถึง 76.79, 73.64 และ 30.53 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีสารละลายไอออนิกเช่นแมกนีเซียมซัลเฟต แมกนีเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมคลอไรด์ที่ช่วยกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเล็กน้อยคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 15.22, 13.18, 8.42 และ7.48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมื่อพิจารณาที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสพบว่าสารละลายโคบอลต์คลอไรด์จะส่งผลดีต่อ



ภาพที่ 21 ผลของสารละลายไอออนิกต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง

(ก) เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ข) เอนไซม์เพคติเนส (ค) เอนไซม์ไซลาเนส (ง) เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส

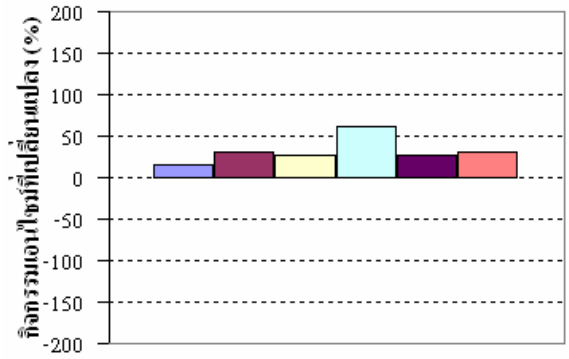
ค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นถึง 44.82 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโพแทสเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต และโซเดียมคลอไรด์ช่วยกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสเล็กน้อยคือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 22.11 21.07, 16.99, 13.89 และ 13.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตจะส่งผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส มีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงต่ำกว่าชุดควบคุม 88.25 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาในภาพรวมพบว่าสารละลายที่ส่งผลดีและไม่ก่อให้เกิดการยับยั้งต่อเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนส และเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส คือ สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต และโซเดียมคลอไรด์ ส่วนสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและเฟอรัสซัลเฟตจะยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาร์ด์ที่ไม่ใช่แป้ง อาจเป็นเพราะคอปเปอร์ไอออนจะสร้างพันธะกับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน (aromatic amino acid) ซึ่งเหนี่ยวนำให้โปรตีนเสียสภาพเนื่องจากเกิดกระบวนการออกซิเดชั่น (oxidation) (Stohs and Bagchi, 1995) ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมเอนไซม์ต่ำลง และจากผลการทดลองสารไอออนิกที่ส่งผลดีต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งคือ สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต และโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งจะใช้ในทดลองในหัวข้อต่อไป

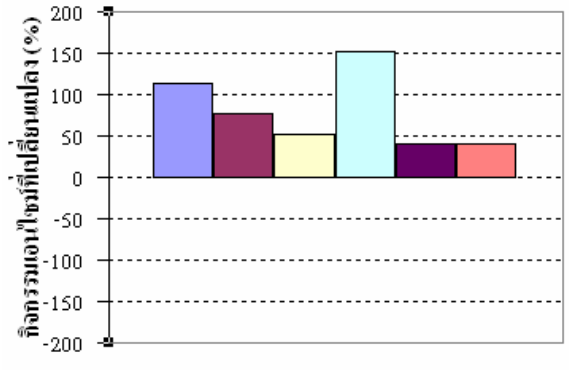
9. ผลกระทบของความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกต่อกิจกรรมเอนไซม์

ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกคือ สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต และโซเดียมคลอไรด์ซึ่งเป็นสารไอออนิกที่ส่งผลดีต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง โดยเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ของชุดควบคุมซึ่งใช้น้ำที่ปราศจากไอออนกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการผสมสารละลายไอออนที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อพิจารณาที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโคบอลต์คลอไรด์สูงขึ้น ส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้น คือที่เมื่อผสมเอนไซม์กับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์จะมีกิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้น 14.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผสมเอนไซม์กับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์จะมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 112.50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อผสมเอนไซม์กับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ จะมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงถึง 152.18 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต โพแทสเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ ที่จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และไม่ก่อให้เกิดการยับยั้งเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นคือมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 26.08-151.08 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์แมงกานีสซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และแมกนีเซียมคลอไรด์ ส่งผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิล เซลลูเลสลดต่ำลงถึง 44.02, 17.94 และ 2.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 22

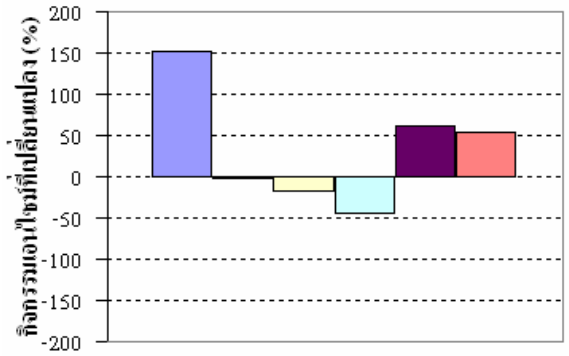
(ก)



(ข)

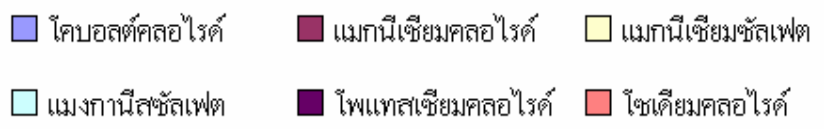


(ค)



ภาพที่ 22 ผลของความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกต่อกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลส

(ก) 1 มิลลิโมลาร์ (ข) 10 มิลลิโมลาร์ (ค) 100 มิลลิโมลาร์

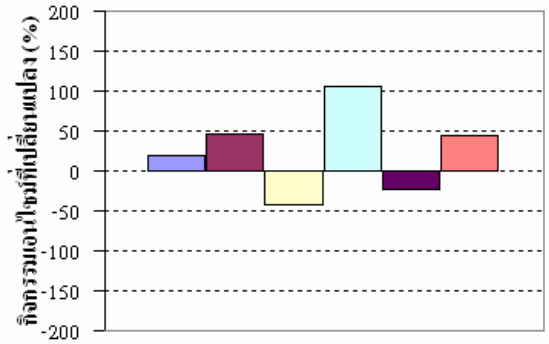


เมื่อพิจารณาที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้นของสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ส่งผลดีมากต่อกิจกรรมเอนไซม์คือมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นถึง 146.87 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในทุกความเข้มข้นคือมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 8.39-68.89 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารละลายแมงกานีสซัสเฟตที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ จะทำให้เกิดตะกอนและทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นถึง 107.70 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 23

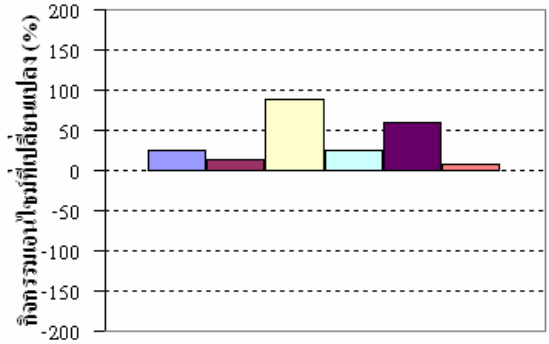
เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสต่อสารละลายไอออนพบว่า สารละลายไอออนอาจจะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อยคือมีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 94.05-115.96 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ และแมงกานีสซัลเฟตขึ้นจะทำให้กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าต่ำลงคือที่ความเข้มข้นของสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ 1 มิลลิโมลาร์ สารละลายไอออนิกจะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสให้มีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 10.04 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโคบอลต์คลอไรด์เป็น 10 มิลลิโมลาร์จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลง 0.08 เปอร์เซ็นและที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์จะก่อให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คือมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงถึง 57.48 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับสารละลายแมงกานีสซัลเฟตซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้น 24.15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผสมสารละลายแมงกานีศซัลเฟตความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์จากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกขึ้นเป็น 10 และ 100 มิลลิโมลาร์พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์จะลดลง 0.60 และ 55.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารละลายไอออนิกชนิดอื่นนั้นจะส่งผลดีกับเอนไซม์ไซลาเนสเฉพาะที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์เท่านั้นโดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 7.84-13.18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงดังภาพที่ 24

จากนั้นจึงนำสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ผสมกับสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบว่าผลของสารละลายผสมดังกล่าวจะช่วยส่งเสริมค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอนไซม์บีด้ากลูคาเนส คือ มีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นถึง 101.09 และ 19.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพคติเนส และเอนไซม์ไซลาเนส คือมีกิจกรรมเอนไซม์ลดต่ำลง 24.82 และ 17.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าสารไอออนิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ส่งผลดีต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งคือ สารละลายโคบอลต์

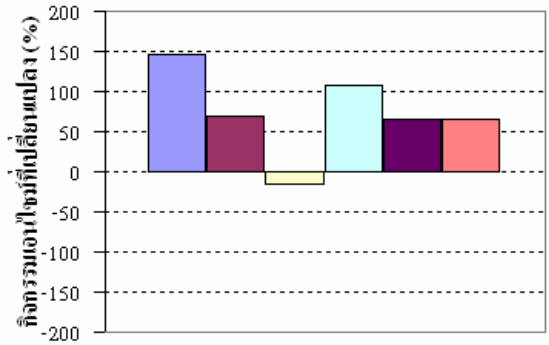
(ก)



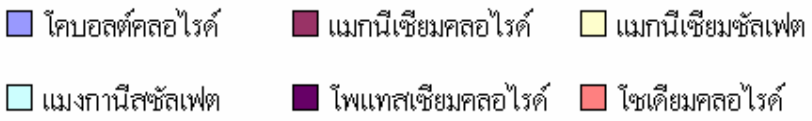
(ข)



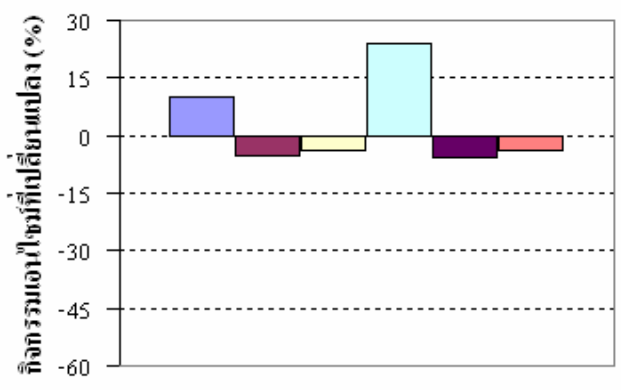
(ค)



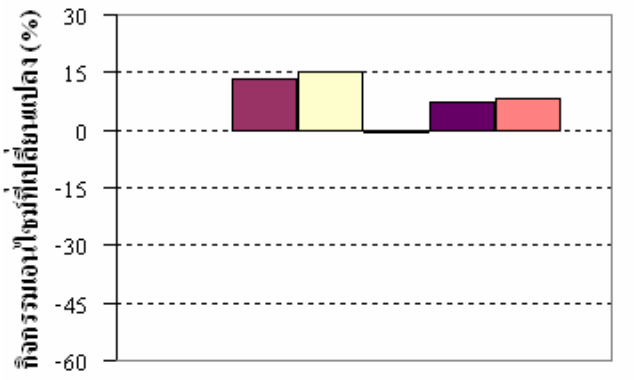
ภาพที่ 23 ผลของความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกต่อกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส
(ก) 1 มิลลิโมลาร์ (ข) 10 มิลลิโมลาร์ (ค) 100 มิลลิโมลาร์



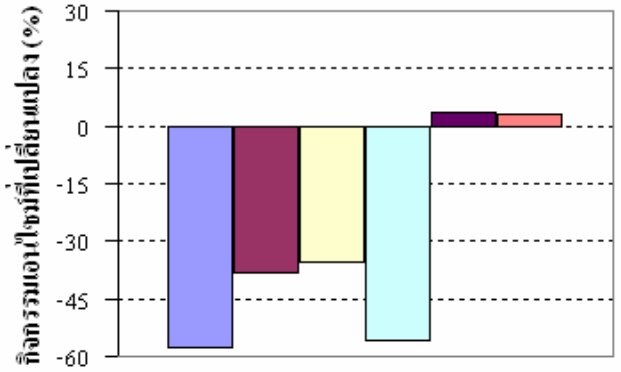
(ก)



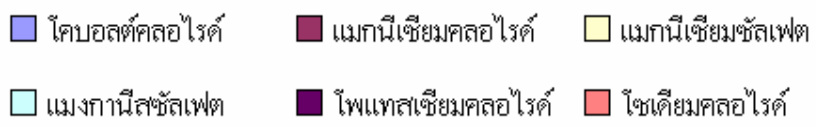
(ข)



(ค)



ภาพที่ 24 ผลของความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส
(ก) 1 มิลลิโมลาร์ (ข) 10 มิลลิโมลาร์ (ค) 100 มิลลิโมลาร์



คลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต โพแทสเซียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์

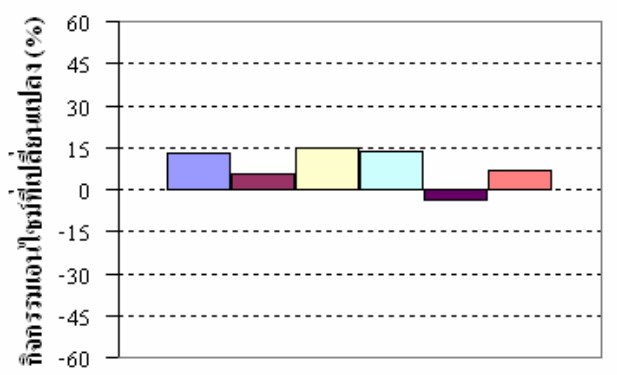
เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส พบว่าสารละลายไอออนิกจะส่งผลดีต่อกิจกรรมเอนไซม์เมื่อมีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ คือมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 13.76-44.82 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายไอออนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์จะก่อให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลง 15.46-39.76 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่ยังช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสให้มีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 5.97 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 25

จากนั้นจึงนำสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ผสมกับสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบว่าผลของสารละลายผสมดังกล่าวจะช่วยส่งเสริมค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส คือ มีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นถึง 101.09 และ 19.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่ได้ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เพคติเนส และเอนไซม์ไซลาเนส คือมีกิจกรรมเอนไซม์ลดต่ำลง 24.82 และ 17.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับการใช้สารละลายไอออนเดี่ยวๆ และจากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าสารไอออนิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ส่งผลดีต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งคือ สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต โพแทสเซียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์

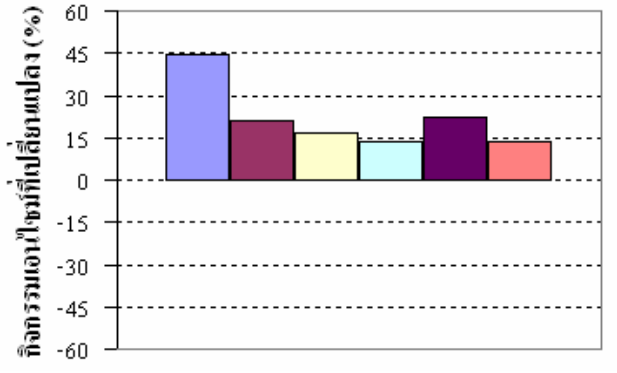
10. ศึกษาผลของสารเติมแต่งต่อกิจกรรมเอนไซม์

เนื่องจากในอุตสาหกรรมจะมีการเติมสารเติมแต่งเพื่อช่วยเพิ่มความเสถียรให้เอนไซม์ เช่น แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง และสารพวกน้ำตาลแอลกอฮอล์ซึ่งสารเติมแต่งบางชนิดอาจส่งผลเสียต่อกิจกรรมเอนไซม์ได้ ดังนั้นจึงศึกษาถึงผลกระทบของการเติมแต่งคือแคลเซียมคลอไรด์ กลีเซอรอล ซอร์บิทอล และน้ำตาลเตรฮาโลสต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง จากการทดลองจะพบว่าแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ มีส่วนช่วยให้กระตุ้นให้เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีค่ากิจกรรมสูงขึ้นคือ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นถึง 102.62 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารละลายพวกน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น เตรฮาโลส

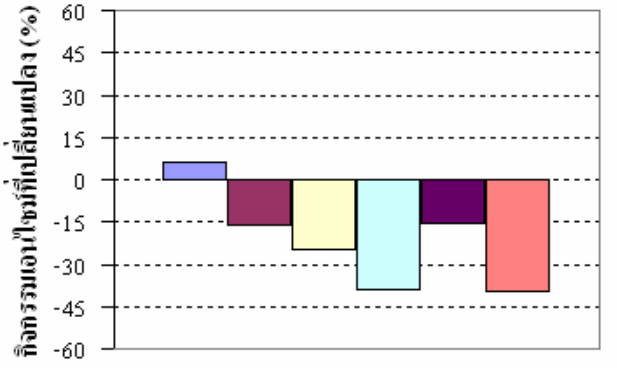
(ก)



(ข)



(ค)



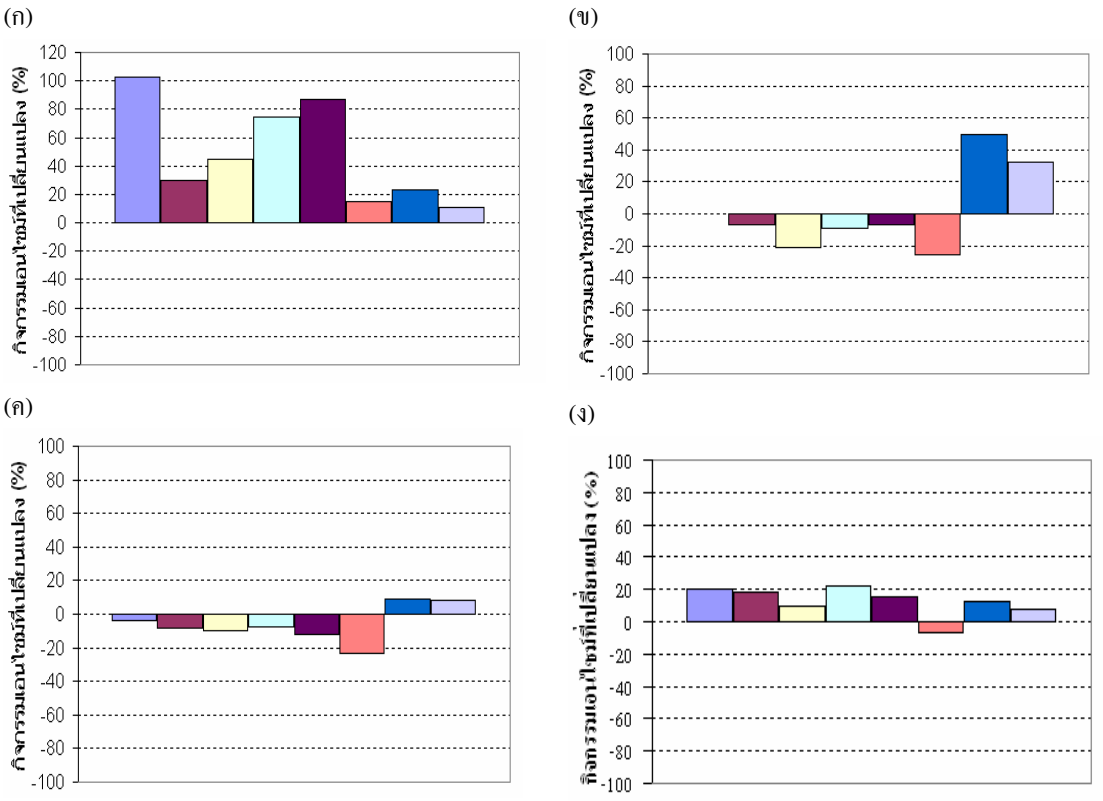
ภาพที่ 25 ผลของความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกต่อกิจกรรมเอนไซม์บีต้า กลูคาเนส

(ก) 1 มิลลิโมลาร์ (ข) 10 มิลลิโมลาร์ (ค) 100 มิลลิโมลาร์

โคบอลต์คลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต

แมงกานีสซัลเฟต โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์

กลีเซอรอล และซอร์บิทอลจะส่งผลดีต่อกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยจะกระตุ้นให้มีกิจกิจกรรมเอนไซม์มีค่าสูงขึ้น 74.74, 44.91 และ 29.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 26

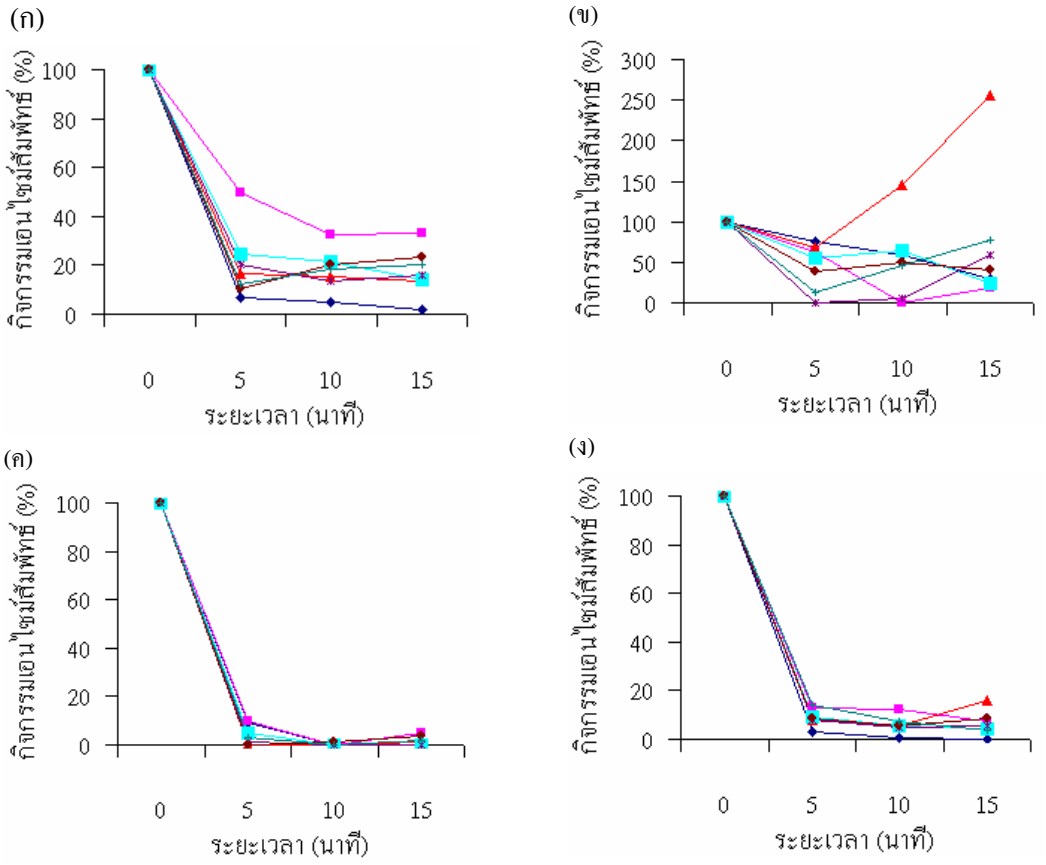


ภาพที่ 26 ผลของสารเติมแต่งต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง
(ก) เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ข) เอนไซม์เพคติเนส (ค) เอนไซม์ไซลาเนส
(ง) เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส พบว่าไม่มีสารใดมีผลช่วยในการกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์เช่นเดียวกับเอนไซม์ไซลาเนส และเมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสพบว่าแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์จะช่วยกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์เล็กน้อยคือมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 10.08-22.58 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของสารละลายกลีเซอรอลต่อกิจกรรมเอนไซม์พบว่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีกิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อผสมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ คือมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 87.04 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และกิจกรรมเอนไซม์จะลดต่ำลงเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงขึ้น ส่วนกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสจะมีแนวโน้มคงที่ไม่ว่าจะนำไปผสมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 0.5, 2.0 หรือ 2.5 โมลาร์

11. ผลของสารไอออนิกและน้ำตาลแอลกอฮอล์ต่อความเสถียรของเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนซึ่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงจะก่อให้เกิดการเสียสภาพ ดังนั้นการผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้สารเติมแต่งเพื่อเพิ่มความเสถียร เช่น แคลเซียมคลอไรด์ และสารจำพวกน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น กลีเซอรอล ซอร์บิทอล ซึ่งสารเหล่านี้จะช่วยรักษาสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงได้ จากการทดลองจะพบว่าความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมินั้นมีความสำคัญต่อการนำเอนไซม์ไปใช้ในอุตสาหกรรมมาก เช่นในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์จะมีกระบวนการอัดเม็ดซึ่งต้องใช้ความร้อนในการทำงาน และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนจึงสามารถเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติเมื่อได้รับอุณหภูมิสูงดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาถึงสารที่ช่วยเพิ่มความเสถียรให้เอนไซม์ โดยศึกษาผลของไอออนและน้ำตาลแอลกอฮอล์ต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่บ่ม ณ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0-15 นาที ซึ่งกำหนดให้แสดงผลของกิจกรรมเอนไซม์ ณ เวลาที่ 0 นาที เป็นกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ และในการทดลองนี้จะให้น้ำที่ปราศจากไอออนเป็นชุดควบคุม ซึ่งแสดงผลดังภาพที่ 27 เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ในกรณีของชุดควบคุมเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ (ที่ 0 นาที) เหลือเพียง 6.49 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 5.02 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป15 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่เพียง 1.94 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่ใช้สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 27 ผลของสารไอออนิกต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง

(ก) เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ข) เอนไซม์เพคติเนส (ค) เอนไซม์ไซลาเนส (ง) เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส

เหลือ 49.63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 32.64 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 33.18 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่ใช้สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 16.83 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 15.35 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 13.27 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 24.40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 21.67 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 14.36 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้สารละลายแมงกานีสซัลเฟตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 20.42 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 13.51 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 15.69 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรณีที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 10.39 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะพบกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นคือมีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 20.47 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 23.49 เปอร์เซ็นต์และกรณีที่ใช้สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 12.17 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกรณีที่ผสมเอนไซม์กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 18.63 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 20.42 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสในกรณีของชุดควบคุมจะพบว่าเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงเล็กน้อยคือจาก 100 เปอร์เซ็นต์ (ที่ 0 นาที) เหลือเพียง 75.09 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 59.80 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์อยู่เพียง 29.56 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่ใช้สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์

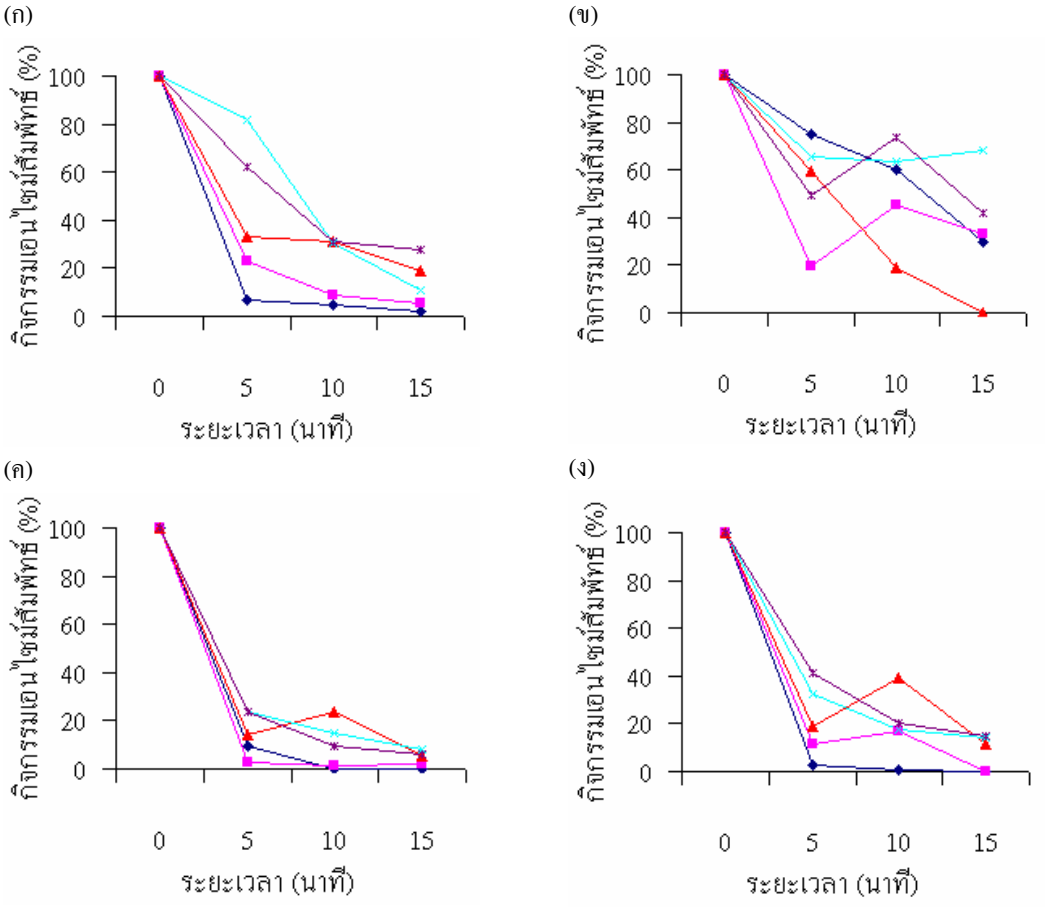
แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 62.12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 19.27 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่ใช้สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 67.92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นคือเอนไซม์สัมพัทธ์ 146.24 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เพิ่มสูงขึ้นถึง 255.56 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 55.01 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย คือมีค่าเป็น 64.07 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 23.63 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้สารละลายแมงกานีสซัลเฟตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีจะไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 4.85 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์กลับเพิ่มสูงขึ้นเป็น 58.57 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรณีที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 38.97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะพบกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นคือมีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 48.88 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 39.90 เปอร์เซ็นต์และกรณีที่ใช้สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 13.10 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกรณีที่ผสมเอนไซม์กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 45.14 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 76.51 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ในกรณีของชุดควบคุมจะพบว่าเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ (ที่ 0 นาที) เหลือเพียง 9.20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 0.08 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ ในกรณีที่ใช้สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 9.96 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 0.13 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 4.97 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่ใช้สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 0.27 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที ไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 1.09 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 4.77 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะไม่พบกิจกรรมเอนไซม์เช่นเดียวกับเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที กรณีที่ใช้สารละลายแมงกานีสซัลเฟตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีจะมีพฤติกรรมคล้ายกับการนำเอนไซม์ผสมกับสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์โดยกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 1.45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะไม่พบกิจกรรมเอนไซม์เช่นเดียวกับเมื่อบ่มที่เวลา 15 นาที ส่วนกรณีที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 0.00 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะพบกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นคือมีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 1.11 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 3.60 เปอร์เซ็นต์และกรณีที่ใช้สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 2.98 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะไม่พบกิจกรรมเอนไซม์และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 1.61 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสในกรณีของชุดควบคุมจะพบว่าเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ (ที่ 0 นาที) เหลือเพียง 2.86 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 0.44 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ ในกรณีที่ใช้สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 13.08 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 12.46 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 7.23 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 7.69 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 5.26 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 16.07 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 9.23 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 5.57 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 4.01 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่ใช้สารละลายแมงกานีสซัลเฟตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 8.21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 4.84 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 5.45 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรณีที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 8.41 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จะพบกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นคือมีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 5.23 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 8.65 เปอร์เซ็นต์และกรณีที่ใช้สารละลายโพแทสเซียม คลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 14.04 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกรณีที่ผสมเอนไซม์กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 7.25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 3.78 เปอร์เซ็นต์

ส่วนกรณีที่ใช้สารเติมแต่ง (additive) เช่น กรณีที่ใช้สารพวกน้ำตาลแอลกอฮอล์จะให้ผลดังภาพที่ 28 คือกรณีที่นำสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 22.69 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 8.91 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 5.54 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้สารละลายซอร์บิทอลความเข้มข้น 2 โมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 32.82 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 31.31 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะเหลือกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 18.80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 2 โมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงเล็กน้อยจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เป็น 82.08 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงอีกโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 30.69 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที จะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 11.11 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้สารละลาย เตรฮาโลสความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 62.18 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 31.00 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 27.58 เปอร์เซ็นต์

สารละลายพวกสารเติมแต่งหรือ สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์จะส่งผลต่อความเสถียรของเอนไซม์เพคติเนสดังนี้ คือเมื่อผสมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 19.91 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกับกรณีที่ผสมเอนไซม์กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 45.15 เปอร์เซ้นต์ และมเอเวลาผ่านไป 15 นาที จะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 33.03 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้สารละลายซอร์บิทอลความเข้มข้น 2 โมลาร์ ผสมกับเอนไซม์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ



ภาพที่ 28 ผลของสารเติมแต่งต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง

(ก) เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ข) เอนไซม์เพคติเนส (ค) เอนไซม์ไซลาเนส (ง) เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส

59.75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 19.12 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะไม่พบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ กรณีที่ใช้สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 2 โมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 65.87 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงเล็กน้อยโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 63.32 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 68.56 เปอร์เซ็นต์และกรณีที่ใช้สารละลายเตรฮาโลสความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 49.08 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าเพิ่มสูงขึ้นโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 73.40 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 42.02 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาที่เอนไซม์ไซลาเนสพบว่าสารละลายพวกสารเติมแต่งหรือสารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์จะให้ผลดังนี้ คือเมื่อผสมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 2.86 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลง โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 1.10 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที จะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 1.83 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้สารละลายซอร์บิทอลความเข้มข้น 2 โมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 14.45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 23.33 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 5.45 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่ใช้สารละลายกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 2 โมลาร์ ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 23.87 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 15.10 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 8.31 เปอร์เซ็นต์และกรณีที่ใช้สารละลายเตรฮาโลสความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 23.68 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงโดยมี

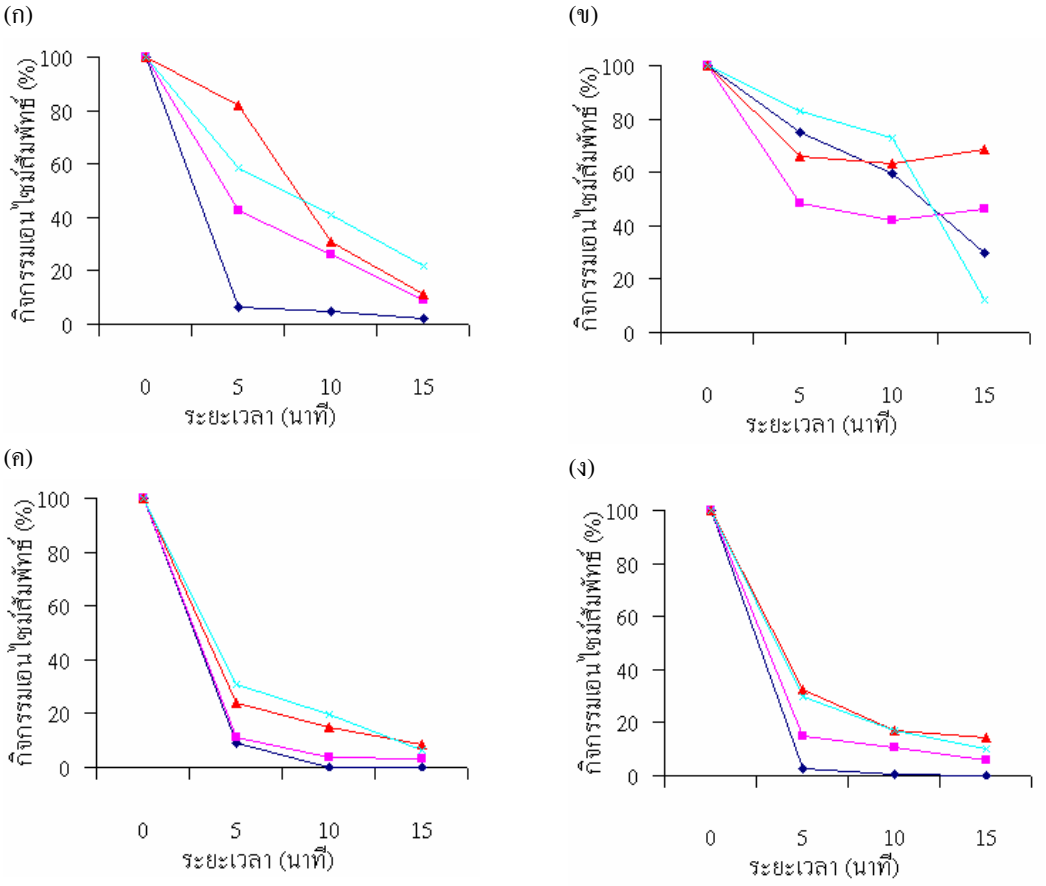
กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 9.48 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 5.75 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาผลของสารละลายพวกสารเติมแต่งหรือ สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ต่อความเสถียรของเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสจะให้ผลดังนี้ คือเมื่อผสมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 11.60 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกรณีที่ผสมเอนไซม์กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์และโพแทสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 16.64 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ กรณีที่ใช้สารละลายซอร์บิทอลความเข้มข้น 2 โมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 18.63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 39.00 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 11.30 เปอร์เซ็นต์ กรณีที่ใช้สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 2 โมลาร์ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 32.62 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 17.23 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 14.22 เปอร์เซ็นต์และกรณีที่ใช้สารละลายเตรฮาโลสที่ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ผสมกับเอนไซม์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์จะลดลงจาก 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 41.24 เปอร์เซ็นต์และเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 20.55 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีจะพบกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 14.63 เปอร์เซ็นต์

การเติมสารน้ำตาลแอลกอฮอล์ผสมกับเอนไซม์จะช่วยเพิ่มความเสถียรของโปรตีน เนื่องจากสารพวกน้ำตาลแอลกอฮอล์จะไปเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมภายใน (micro-environment) เอนไซม์ทำให้โปรตีนมีโครงสร้างที่แข็งแรงขึ้น อาจเป็นเพราะสารดังกล่าวจะส่งผลต่อการจัดเรียงตัวของโมเลกุลของน้ำ โดยจะเพิ่มการจับตัวกัน (degree of organization) ของโมเลกุลของน้ำ ซึ่งจะทำให้พันธะที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) ซึ่งจะเกิดระหว่างโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว (non polar group) เพิ่มสูงขึ้นและคงสภาพของโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของ

โปรตีน ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้โปรตีนมีความเสถียร และทนต่อการเสียสภาวะธรรมชาติหรือเกิดการคลายตัว (unfolding) (Angelo *et al.* 20) ดังนั้นเมื่อพิจารณาที่น้ำตาลแอลกอฮอล์พบว่ากลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์ จะทำให้เอนไซม์โดยรวมมีความเสถียรมากที่สุด โดยเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสยังสามารถทำงานได้แม้จะผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาจเป็นเพราะคุณสมบัติของกลีเซอรอลที่สามารถรักษา solvophobic interaction ของเอนไซม์ ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ยังคงไม่เปลี่ยนไปส่งผลให้เอนไซม์ยังคงทำงานได้เมื่อผ่านสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงหรือทนต่ออุณหภูมิได้นานขึ้น แสดงในภาพที่ 28 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลกลับพบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลง อาจเป็นไปได้ว่าโมเลกุลของกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้นอาจจะไปบดบังในส่วนของ active site ทำให้การจับกันของเอนไซม์และสารตั้งต้นทำได้ยากขึ้นซึ่งจะส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์โดยรวม ดังภาพที่ 29 และเมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เมื่อผลมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์กับสารละลายไอออนที่ส่งผลดีต่อกิจกรรมเอนไซม์คือ โคบอลต์คลอไรด์และแมกนีเซียมซัลเฟตกลับพบว่าเอนไซม์นั้นทนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสได้น้อยกว่าเมื่อใช้เพียงกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์เพียงอย่างเดียว อาจเป็นเพราะทั้งกลีเซอรอลและสารละลายไอออนจะแย่งกันจับเอนไซม์ทำให้โมเลกุลของกลีเซอรอลจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ได้น้อยจึงทำให้ไม่สามารถรักษาโครงสร้างโครงสร้างของเอนไซม์เมื่อผ่านสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงได้

เมื่อพิจารณาในภาพรวมพบว่าเอนไซม์เพคติเนสที่ผลิตจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 จะมีความเสถียรมากกว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ช่วยทำให้เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้นถึง 7.65, 6.50 และ 17.10 เท่า เมื่อเวลาผ่านไป 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ (เทียบกับชุดควบคุม)ในกรณีของเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส สารละลายโคบอลต์คลอไรด์จะช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้นถึง 4.57, 28.31 และ 7.23 เท่า เมื่อเวลาผ่านไป 5,10 และ 15 นาที ตามลำดับ ส่วนสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เพคติเนส สังเกตจากเมื่อบ่มเอนไซม์ที่ผสมสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ณ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตจะส่งผลดีต่อความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสเช่นเดียวกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ คือ

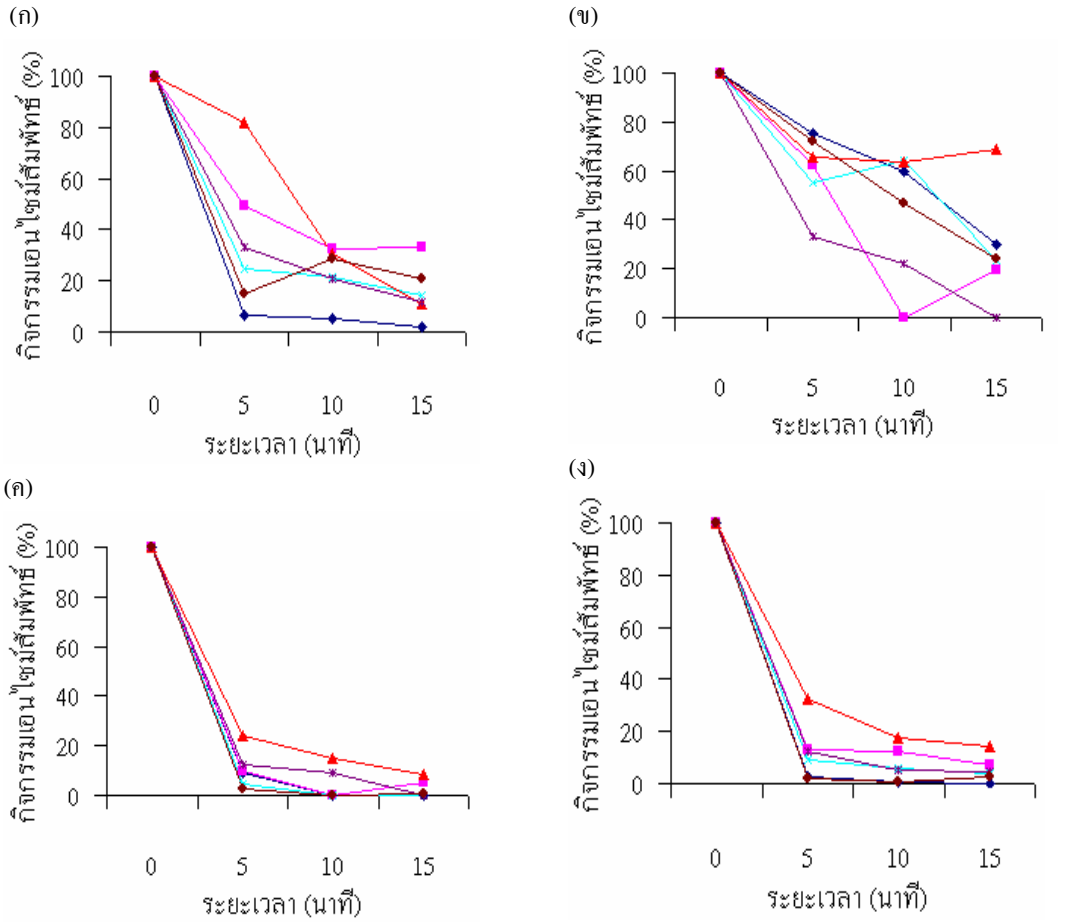


ภาพที่ 29 ผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง

(ก) เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ข) เอนไซม์เพคติเนส (ค) เอนไซม์ไซลาเนส (ง) เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส

เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์ของชุดควบคุมแล้วสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น10 มิลลิโมลาร์ ช่วยทำให้เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นถึง 3.75, 4.31 และ 7.40 เท่า เมื่อเวลาผ่านไป 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ (เทียบกับชุดควบคุม) ในกรณีของเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตจะช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้นถึง 3.23, 12.66 และ 4.01 เท่า เมื่อเวลาผ่านไป 5,10 และ 15 นาที ตามลำดับ

เมื่อศึกษาถึงผลกระทบของสารผสมกลีเซอรอล 2 โมลาร์กับโคบอลต์คลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และความเสถียรของเอนไซม์ดังแสดงในภาพที่ 30 พบว่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 123.45, 149.30, 108.72 และ 112.06 ตามลำดับ ส่วนกรณีทำผสมเอนไซม์กับสารละลายที่ประกอบด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 2 โมลาร์กับสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบว่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 111.04, 132.18, 108.55 และ 107.26 ตามลำดับ ดังนั้นเอนไซม์จะทำงานได้ดีเมื่อใช้เพียงกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เพียงตัวเดียว



ภาพที่ 30 ผลของการผสมสารไอออนิกที่ส่งผลดีต่อกิจกรรมเอนไซม์กับสารละลายกลีเซอรอลที่ช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง

(ก) เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ข) เอนไซม์เพคติเนส (ค) เอนไซม์ไซลาเนส (ง) เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส

สรุป

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช้แป้งโดยเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 คือซังข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก/ปริมาตร เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก/ปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และมีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่พีเอช 5.5 เป็นระยะเวลา 9 วัน

การทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นด้วยเทคนิคอัลตร้าฟิวเตรชั่นโดยใช้แผ่นกรองที่มีค่ากักกันโมเลกุลเป็น 10,000 ดาลตันสามารถเพิ่มกิจกรรมให้เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ประมาณ 3 เท่า เพิ่มกิจกรรมให้เอนไซม์เพคติเนสได้ประมาณ 5 เท่า เพิ่มกิจกรรมให้เอนไซม์ไซลาเนสได้ประมาณ 7 เท่า และเพิ่มกิจกรรมให้เอนไซม์บีต้ากลูคาเนสได้ประมาณ 4 เท่าของค่ากิจกรรมเอนไซม์ก่อนการกรอง

สารไอออนิกที่ส่งผลดีต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง โดยแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าชุดควบคุมและไม่ก่อให้เกิดการยับยั้งคือ สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต สารละลายแมงกานีสซัลเฟต สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยสารละลายดังกล่าวจะทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเป็น 112.50, 76.08, 51.62, 151.08, 41.30 และ 41.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับเอนไซม์เพคติเนสซึ่งจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 25.53, 12.60, 89.17, 25.88, 60.50 และ 8.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนผลกระทบของสารไอออนิกต่อกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสจะส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 44.82, 21.07, 16.99, 13.88, 22.11 และ 13.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่สารละลายไอออนิกจะส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสน้อยมากโดยสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์และสารละลายโซเดียมคลอไรด์จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 13.18, 15.22, 7.48 และ 8.42 เปอร์เซ็นต์ และสารไอออนิกที่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งคือ คอปเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

สารไอออนิกเช่น โคบอลต์คลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต โพแทสเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์จะส่งผลดีต่อความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอก-ซีเมทิลเซลลูเลสที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส คือมีกิจกรรมเอนไซม์หลงเหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที สูงกว่าชุดควบคุม คือมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 33.18, 13.27, 14.36, 15.69, 20.42 และ 23.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับเอนไซม์บีต้ากลูคาเนสซึ่งจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 7.23, 16.07, 4.01, 5.45, 3.78 และ 8.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารละลายไอออนิกที่ช่วยเพิ่มความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เพคติเนส คือสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ สารละลายแมงกานีสซัลเฟต สารละลายโซเดียมคลอไรด์ และสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์หลงเหลืออยู่ ณ เวลา 15 นาที เป็น 255.56, 58.57, 39.90 และ 76.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารละลายไอออนิกที่เพิ่มความเสถียรให้เอนไซม์ไซลาเนส คือสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์หลงเหลืออยู่ ณ เวลา 15 นาที เป็น 4.97, 1.09, 3.60 และ 1.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สารเติมแต่ง คือ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ สารละลายกลีเซอรอลและซอร์บิทอลที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์และเตรฮาโลสที่ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์นั้นจะส่งผลดีต่อกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 102.62, 29.51, 44.91 และ 74.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส คือมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 20.61, 17.86, 10.08 และ 22.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จะไม่ส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสและเอนไซม์ไซลาเนส

ส่วนสารพวกน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นสารเติมแต่งที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูง 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าชุดควบคุม คือกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์ โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส หลงเหลืออยู่ 11.11, 68.56, 8.31 และ 14.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จารุวรรณ สนมวัฒนะวงศ์. 2548. **เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสในเห็ดนางรม, *Pleurotus ostreatus* 10.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538. **เทคโนโลยีการเพาะเห็ด.** ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์รั้วเขียว, กรุงเทพฯ.

วีระวัฒน์ แช่มปรีดา, รัชดาภรณ์ ศรีปรางค์, สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์, ลิลี่ เอื้อวิไลจิตร, เบญจพร บัวบาน และ กัญญาวิมว์ กีรติกร. 2547. A novel thermotolerant alpha-amylase from an endophyte BCC4124 isolated in Thailand: biochemical characterisation and investigation on external stabilising factor, *ใน* **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วทท.) ครั้งที่ 30.** สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, กรุงเทพฯ

Adejoye, O.D., B.C. Adebayo-Tayo, A.A. Ogunjobi, O.A. Olaoye and F.I. Fadahunsi. 2006. Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Pleurotus florida*, a Nigeria edible mushroom. **African J. Biotecnol.** (5): 1319-1323.

Baldrian, P. and J. Gabriel. 2003. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*.. **FEMS Microbiol. Lett.** (206): 69-74.

_____, P., V. Valaskova, V. Merhautova and J. Gabriel. 2005. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in presence of copper, manganese, lead and zinc. **Res. Microbiol.** (156): 670-676.

Beguin, P. and J.P. Aubert. 1994. The biological Degradation of Cellulose. **FEM Microbiol. Rev.** (13): 25-58.

Bhat, M.K. and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and Their potential industrial. **Biotechnol. Adv.** (15): 583-620.

Cullen, D. and P. Kerstan. 1992. Fungal enzymes for lignocellulose degradation, pp. 100-131. *In* Kinghorn J.R. and Turner G., eds. **Applied molecular genetics for filamentous fungi.** Chapman & Hall, New York.

Filer, K. 2002. Industrial production of enzymes for the feed industry, pp. 1-16. *In* S. Roussos, C.R. Soccol, and A. Pandey, eds. **New Horizons in Biotechnology.** Kluwer Academic Publishers, USA.

Gheibi, N., A.A. Saboury, K. Haghbeen and A.A. Moosavi-Movahedi. 2006. The effect of some osmolytes on the activity and stability of mushroom tyrosinase. **J. Biosci.** 31: 355-362.

Gupta, G., P. Gigras, H. Mohapatra, V.K. Goswami and B. Chauhan. 2003. Microbial α-amylase: a biotechnological perspective. **Process Biochem** (38): 1599-1616.

Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiol. Rev.** (13): 125-135.

Hiroi,T. and K.E. Eriksson. 1976. Influence of cellulose on the degradation of lignin by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Microbiological degradation of lignin Part I.** 5: 157-161.

Ikram-ul, H., A. Khan, W.A. Butt, S. Ali and M.A. Qadder. 2002. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Xylanase Production by Mutant Strain of *Aspergillus niger* GCMBX-45. **J. Biosci.** 2: 143-144.

International Pectin Producers Association [IPPA]. 2001. **Facts about Pectin.** What is pectin?. Available Source: http://www.ippa.info/what_is_pectin.html, October 5, 2007.

Juhasz, T., Z. Szengyel and K. Reczey, M. Siika-Aho and L. Viikari. 2005. Characterization of cellulase and hemicellulase produced by *Trichoderma reesei* on various carbon source. **Process Biochem.** 40: 3519-3525.

Kaal, E.E.J., J.A. Field and T.W. Joyce. 1995. Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. **Biores. Technol.** 53: 133-139.

Newman, K. **Mechanisms of Enzymes in Poultry Production.** Poultry Industry. Available Source: http://www.engormix.com/mechanisms_of_enzymes_in_e_article_82_AVG.htm, December 13, 2007

Lal, N. and T. Panda. 2005. Studies on protein enrichment in sawdust by *Pleurotus sajor-caju*. **Bioprocess and Biosystems engineering** 2007 12(4): 163-165.

Lemos, J.L.S., E.P.S. Bon, M.F.E Santana and N. Pereira. 2000. Thermal stability of xylanases produced by Aspergillus awamori. **Brazilian J. Microbiol.** 31: 206-211.

Liming, X. and S. Xueliang. 2004. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Biores. Technol.** 91: 259-262.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Determination of protein with Folin-Ciocalteau reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-270.

Maria, F.S.T., J.L.L. Filho and N. Duran. 2000. Carbon source effect on pectinase production from *Aspergillus japonica*. **Brazilian J. Microbiol**. 31: 286-290.

Mikiashvili, N., S.P. Wasser, E. Nevo and V. Elisashvili. 2006. Effects of carbon and nitrogen source on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 22: 999-1002.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicyclic acid reagent for determination of reducing sugar.. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 5: 193-219.

Moore, R., D. Clark and D. Vodopish. 1998. **Arrangement of Fibrils, Microfibrils and Cellulose in Cell Walls.** Botany images Grouped by Topic. Available Source: http://www.ualr.edu/botany/cellulose_microfibrils, October 5, 2007.

Moorthy, V.K, R. Chandramohanan and V. S. Harikumar. 2003. Effect of Temperature on Yield of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) singer. **Adv. Agr. Biotechnol.** 2007

Pandey, A., P. Selvakumar, C.R. Soccol and P. Nigam. n.d. **Solid state fermentation for the production of industrial enzymes.** Available Source: http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles23.htm, November 14, 2007.

Persson, I, F. Tjerneld and B. Hahn-Hagerdal. 1991. Fungal Cellulolytic Enzyme Production: A Review. **Process Biochem.** 26: 65-74.

Petr, B., V. Valaskova, V. Merhautova and J. Gabriel. 2005. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. **Res. Microbiol.** 156: 670-676.

Scheller, H.V. n.d. **Pectin.** Biosynthesis of Cell Wall Polysaccharide. Available Source: http://www.ukplbio.kvl.dk/plbio/cellwall.htm, October 5, 2007.

Seyis, I. and N. Aksoz. 2005. Xylanase Production from *Trichoderma hazianum* 1073 D3 with Alternative Carbon and Nitrogen sources. **Food technol. Biotechnol.** 43(1): 37-40.

Sheppy, C. 2001. The Current Feed Enzyme Market and Likelt Trends., pp. 1-11. *In* M.R. Bedford and G.C. Partridge, eds. **ENZYMES IN FARM ANIMAL NUTRITION.** CABI Publishing, UK.

Silva, R., S.L. Ellen, W. Carolina, M.M. Mariana, K.P. Yong and G. Eleni. 2005. Production of Xylanase and CMCase on Solid State Fermentation in Different Residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian J. Microbiol.** 36: 235-241.

Snajdr, J. and Baldrian P. 2007. Temperature Affects on Production,Activity and Stability of Ligninolytic Enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. **Folia Microbiol.** 52(5): 498-502.

Stohs, S.J. and D. Badchi. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of heavy metals. **Free Radic Biol Med.** 18: 31-36.

Suto, M and F. Tomita. 2001. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **J. Biosci. Bioengng.** 92(4): 305-311.

Teixeira, M.F.S., J.L.L. Filho and N. Duran. 2000. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. **Brazilian J. Microbiol.** (31): 286-290.

Tengerdy, R.P. and G. Szakacs. 2003. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochem. Engng. J.** (13): 169-179.

Volk, T.J. 1998. **Tom Volk's Fungus of the Month for October 1998.** *Pleurotus ostreatus*, the oyster mushroom. Available Source: http://www.tomvolkfungi.net/, January 4, 2008.

Van de loo, H.M. 1976. An Improve method for the quantitative determination hexosamine according to Elson and Morgan. **Anal. Biochem** (76): 556-560.

Vieille, C. and G. Zeikus. 2001. Hhyperthermophilic enzyme: sources, uses and molecularmechanisms for thermostability. **Microbiol Mol. Biol. Rev** 65 (1): 1-43.

Zadrazil, F. and R.H. Kurtzman. 1982. The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics., pp. 277-298. *In* S.T. Chang and T.H Quimio, eds. **Tropical Mushrooms Biological Nature and Cultivation Methods.** Polydesign Printing Co.,Ltd., Hong Kong.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเพาะเลี้ยงและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Mushroom Complete (MCM)

Glucose	20	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
Gelatin peptone	2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
KH_2PO_4	0.46	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Agar	1.5	เปอร์เซ็นต์

ปรับพีเอชเป็น 5.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Mandel's Mineral Solution

แหล่งคาร์บอน (wheat bran)	5	เปอร์เซ็นต์
Gelatin peptone	0.2	เปอร์เซ็นต์
$NaNO_3$	3	กรัม
KH_2PO_4	3	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.5	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	7.5×10^{-3}	กรัม
$MnSO_4.H_2O$	2.5×10^{-3}	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	2×10^{-3}	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

1.1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

1.1.1. การเตรียมสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายกรดซิตริก (citric acid) ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 24.3 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ปริมาตร 25.7 มิลลิลิตร จากนั้น ปรับพีเอชเป็นพีเอช 5 โดยใช้สารละลายทั้งสองแล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.1.2. การเตรียมสารละลาย DNS

ชั่ง dinitrosalicylic acid 20 กรัมละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตรคนจนละลาย ค่อย ๆ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (32 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากัน นำไปอังบนอ่างน้ำร้อน ค่อย ๆ เติม โซเดียม-โพแทสเซียมตาร์เตท (K-Na tartate) 600 กรัม ลงไป คนจนกระทั่งสารละลายใส ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 2000 มิลลิลิตร

1.1.3. การเตรียมสารละลายสับสเตรท

ชั่งสับสเตรท (คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เพคติน ไซแลน และ บีต้า-กลูแคน) 1 กรัม ละลายในสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเล เพคติเนส ไซแลนเนส กลูคาเนส ตามลำดับ

1.2. วิธีการทดสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

เติม DNS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างหรือสารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยแช่ในน้ำเย็น เป็นเวลา 5 นาทีแล้วจึงเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

1.3. การเตรียมกราฟมาตรฐานของการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคส กาแลกโทส และไซโลส ที่ความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังกล่าว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม DNS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาล หาค่าความชันเพื่อนำไปใช้ในการคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์

2. การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry *et al.* 1951)

2.1. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

สารละลาย A

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20กรัมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

สารละลาย B

a) สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 2 เปอร์เซ็นต์ โดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

b) สารละลายโซเดียม-โพแทสเซียมตาร์เตรท 3.5 เปอร์เซ็นต์ โดยละลายโซเดียม-โพแทสเซียมตาร์เตรท 3.5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำสารละลายในข้อ a มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเจือจางสารละลายในข้อ b ให้มีความเข้มข้นเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำ สารละลายทั้งสองที่ผ่านการเจือจางแล้วมาผสมกันโดยมีอัตราส่วน 1: 1

สารละลาย C

ผสมสารละลาย Aและ B ในอัตราส่วน 50: 1 ซึ่งต้องเตรียมสารใหม่ก่อนการทดสอบทุกครั้ง

สารละลาย D

เจือจางสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ในอัตราส่วน 1:1 และต้องเตรียมสารใหม่ก่อนการทดสอบทุกครั้ง

2.2. วิธีการทดสอบ

นำตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย C ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย D .ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

2.3. การเตรียมกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

เตรียมสารละลาย bovine serum albumin ที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย BSA มาตรฐานปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย C ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย D . ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเขียนกราฟซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย BSA มาตรฐาน

3. <u>การวัดปริมาณกลูโคซามีน</u>

3.1. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

สารละลาย Acetyl Acetone Reagent

เติมอะซิทิลอะซิโตน (acetyl acetone) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ในสารละลายไดโซเดียมคาร์บอเนต ที่มีความเข้มข้น 1.25 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลาย Erhich's reagent

ชั่งสาร p – dimethylaminobenzaldehyde 1.6 กรัม ใส่ในสารละลายที่ประกอบด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 30 มิลลิลิตร และ เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ 95% ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (เก็บในที่เย็น)

3.2. การเตรียมกราฟกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน

เตรียมสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานที่ได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย acetyl acetone reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม เอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม Erhich's reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น เพื่อใช้ในการคำนวณต่อไป

ภาคผนวก ข

ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางผนวกที่ ข1 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีนจากเชื้อ *P. ostreatus* DOA 10 ที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตเอนไซม์

แหล่งคาร์บอน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้า กลูคาเนส	ปริมาณโปรตีน	ปริมาณกลูโคซามีน
กลูโคส	3	0.000	1.835	0.643	9.563	3.852	17.2
	5	0.204	0.000	1.042	0.257	2.796	67.2
	7	3.888	0.000	0.000	0.257	4.193	70.3
	9	0.000	0.000	0.428	0.000	3.262	69.9
	11	0.000	0.305	0.000	0.232	3.883	69.8
ซูโครส	3	11.396	1.157	0.000	0.046	5.809	3.5
	5	7.022	1.002	0.310	0.072	5.032	14.5
	7	0.292	0.566	0.073	1.224	2.733	19.0
	9	0.074	1.474	0.000	1.627	3.179	21.1
	11	2.684	1.748	0.102	0.376	3.406	29.9
เอวิเซล	3	0.000	1.832	0.788	0.168	3.582	7.3
	5	0.330	1.552	1.681	1.990	3.293	19.2
	7	0.281	1.521	0.669	1.505	3.148	20.2
	9	0.181	1.568	1.572	1.862	3.168	24.5
	11	0.290	0.790	0.059	1.832	3.769	26.7
ซังข้าวโพด	3	0.000	1.375	0.260	0.012	5.446	13.5
	5	0.000	1.739	6.002	2.516	7.238	17.6
	7	0.532	1.328	5.709	5.352	5.902	23.1
	9	0.528	1.546	5.859	7.211	8.304	32.5
	11	0.382	1.453	1.994	3.395	4.752	30.9

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส	ปริมาณโปรตีน	ปริมาณกลูโคซามีน
ขี้เลื่อย	3	0.000	0.404	0.211	0.194	5.218	16.8
	5	0.103	1.294	2.679	2.683	4.773	16.8
	7	0.130	1.098	2.723	2.110	4.804	16.8
	9	0.065	1.863	2.268	1.598	3.116	18.9
	11	0.148	1.969	1.876	1.353	3.086	19.5

<u>หมายเหตุ</u> กิจกรรมเอนไซม์แสดงในหน่วย ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนแสดงในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณกลูโคซามีนแสดงในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ข2 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีนที่ได้จากเชื้อ *P.ostreatus* DOA 10 ซึ่งใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์

ซูโครสที่ความเข้มข้น	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส	ปริมาณโปรตีน	ปริมาณกลูโคซามีน
1%	3	11.396	1.157	0.000	0.046	5.809	3.5
ซูโครส	5	7.022	1.002	0.310	0.072	5.032	14.5
	7	0.292	0.566	0.073	1.224	2.733	19.0
	9	0.74	1.474	0.000	1.627	3.179	21.1
	11	2.684	1.748	0.102	0.376	3.406	29.9
2%	3	1.386	2.317	1.457	0.000	9.132	8.4
ซูโครส	5	0.761	1.586	1.634	0.014	7.855	6.1
	7	0.891	1.347	2.905	2.128	10.716	13.1
	9	2.247	2.374	2.432	4.381	12.428	39.4
	11	1.775	1.561	2.421	2.142	11.179	33.1
3%	3	0.032	1.456	0.930	2.475	5.840	16.8
ซูโครส	5	0.015	0.280	0.910	1.655	4.494	38.4
	7	0.041	0.547	0.145	1.517	2.371	44.7
	9	0.015	0.124	0.020	0.848	2.174	71.2
	11	0.003	0.575	0.013	0.618	1.895	54.3
4 %	3	0.104	1.120	0.955	2.746	9.339	8.5
ซูโครส	5	0.844	0.498	0.362	3.433	7.434	17.7
	7	1.648	0.155	0.049	0.000	3.665	42.9
	9	0.260	2.967	0.191	1.936	4.628	25.8
	11	0.058	1.549	0.418	0.371	4.742	82.7

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

ซูโครสที่ความเข้มข้น	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส	ปริมาณโปรตีน	ปริมาณกลูโคซามีน
5% ซูโครส	3	1.021	1.120	0.362	2.376	5.363	7.6
	5	0.799	0.249	1.382	4.635	7.486	5.1
	7	1.207	1.462	1.185	6.399	4.142	40.6
	9	0.077	1.257	1.962	0.076	4.421	76.1
	11	0.104	0.734	0.0132	0.680	2.899	49.8

หมายเหตุ กิจกรรมเอนไซม์แสดงในหน่วย ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนแสดงในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณกลูโคซามีนแสดงในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ข3 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีนจากเชื้อ *P.ostreatus* DOA 10 ซึ่งใช้ซังข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์

แหล่งคาร์บอน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส	ปริมาณโปรตีน	ปริมาณกลูโคซามีน
1% ซังข้าวโพด	3	0.000	1.375	0.260	0.012	5.446	13.5
	5	0.000	1.739	6.002	2.516	7.238	17.6
	7	0.532	1.328	5.709	5.352	5.902	23.1
	9	0.528	1.546	5.859	7.211	8.304	32.5
	11	0.382	1.453	1.994	3.395	4.752	30.9
2% ซังข้าวโพด	3	0.246	0.306	0.112	0.119	8.570	6.3
	5	0.180	0.928	0.639	0.291	7.828	8.5
	7	0.140	0.886	4.667	1.824	3.807	21.8
	9	0.135	0.781	4.652	2.130	4.853	21.8
	11	0.418	1.189	8.181	7.528	5.339	29.0
3% ซังข้าวโพด	3	0.002	0.862	0.076	0.000	7.227	5.1
	5	0.057	1.702	3.920	0.577	4.670	14.2
	7	0.236	1.833	5.444	7.756	7.993	9.7
	9	0.330	1.924	5.848	7.482	5.322	26.9
	11	0.566	2.045	5.757	13.276	5.816	28.0

ตารางผนวกที่ ข3 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส	ปริมาณโปรตีน	ปริมาณกลูโคซามีน
4% ซังข้าวโพด	3	0.078	1.049	0.083	0.070	8.225	7.0
	5	0.034	2.246	1.350	0.532	6.927	15.6
	7	0.137	2.628	2.662	0.605	6.644	22.9
	9	0.362	3.136	2.719	4.049	4.973	29.8
	11	0.475	3.665	3.998	5.122	5.294	25.3
5% ซังข้าวโพด	3	0.016	2.173	0.829	0.292	5.108	9.6
	5	0.035	2.299	1.399	0.975	6.896	12.6
	7	0.175	2.969	3.147	3.242	6.150	15.4
	9	0.152	3.006	3.396	3.870	6.720	20.2
	11	0.269	2.478	4.867	8.153	8.332	21.7

หมายเหตุ กิจกรรมเอนไซม์แสดงในหน่วย ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนแสดงในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณกลูโคซามีนแสดงในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ข4 กิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีนจากเชื้อ *P.ostreatus* DOA 10 ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ ในการผลิตเอนไซม์

แหล่งไนโตรเจน	เวลา (วัน)	เอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิล เซลลูเลส	เอนไซม์ เพคติเนส	เอนไซม์ ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้า กลูคาเนส	ปริมาณ โปรตีน	ปริมาณ กลูโคซามีน
แอมโมเนียม	3	0.038	2.066	1.239	0.180	2.620	8.8
ซัลเฟต	5	0.340	3.392	5.864	6.643	3.006	13.9
	7	0.585	3.108	5.748	10.021	4.221	18.8
	9	0.537	2.688	5.962	10.892	3.627	29.2
	11	0.483	3.178	5.828	13.461	4.238	26.4
ยูเรีย	3	0.005	1.691	0.040	0.103	4.256	7.1
	5	0.211	2.807	1.809	1.385	4.197	15.7
	7	0.431	3.358	3.926	6.550	4.425	18.8
	9	0.332	2.475	2.47	5.181	4.345	18.3
	11	0.400	2.512	3.231	4.928	4.618	24.8
เพปโตน	3	0.002	0.862	0.076	0.000	7.227	5.1
	5	0.057	1.702	3.920	0.577	4.670	14.2
	7	0.236	1.833	5.444	7.756	7.993	9.7
	9	0.330	1.924	5.848	7.482	5.322	26.9
	11	0.566	2.045	5.757	13.276	5.816	28.0
บีฟเอ็กซ์แทร็ค	3	0.0740	0.665	0.083	0.113	5.671	11.4
	5	0.259	1.323	1.854	2.678	3.924	15.8
	7	0.399	1.968	2.736	5.253	4.318	20.6
	9	0.529	1.966	4.578	9.300	4.021	25.3
	11	0.563	2.432	5.586	16.752	4.235	29.5

ตารางผนวกที่ ข4 (ต่อ)

แหล่งไนโตรเจน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส	ปริมาณโปรตีน	ปริมาณกลูโคซามีน
กากถั่วเหลือง	3	0.050	1.276	0.219	0.000	3.596	12.5
	5	0.328	1.801	0.666	1.1432	2.751	16.9
	7	0.226	2.196	3.532	5.181	2.713	24.4
	9	0.456	2.434	5.206	9.120	3.513	27.3
	11	0.448	2.646	6.165	10.526	3.586	31.3

หมายเหตุ กิจกรรมเอนไซม์แสดงในหน่วย ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนแสดงในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณกลูโคซามีนแสดงในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ข5 กิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีนจากเชื้อ *P.ostreatus* DOA 10 ที่ใช้เพปโตนที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์

แหล่งไนโตรเจน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส	ปริมาณโปรตีน	ปริมาณกลูโคซามีน
0.2%	3	0.002	0.862	0.076	0.000	7.227	5.1
เพปโตน	5	0.057	1.702	3.920	0.577	4.670	14.2
	7	0.236	1.833	5.444	7.756	7.993	9.8
	9	0.330	1.924	5.848	7.482	5.322	26.9
	11	0.566	2.045	5.757	13.276	5.816	28.0
0.5%	3	0.0378	0.741	0.404	0.124	11.314	10.2
เพปโตน	5	0.852	1.55	2.506	3.272	7.631	28.6
	7	1.389	1.880	3.533	6.372	6.848	29.4
	9	1.616	2.398	4.607	13.018	7.462	37.8
	11	1.737	2.136	5.265	19.322	7.469	39.1
0.8%	3	0.244	0.862	0.762	0.999	12.573	28.1
เพปโตน	5	0.695	0.975	1.866	2.070	10.378	28.6
	7	1.066	0.550	2.727	4.686	9.571	47.6
	9	0.975	0.806	3.006	3.516	8.690	47.3
	11	0.886	1.088	2.560	2.784	8.739	41.9

ตารางผนวกที่ ข5 (ต่อ)

แหล่งไนโตรเจน	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส	ปริมาณโปรตีน	ปริมาณกลูโคซามีน
1.2% เพปโตน	3	0.027	0.445	0.514	0.378	13.957	19.7
	5	0.342	0.876	1.708	0.875	12.411	39.3
	7	0.318	0.159	1.034	1.833	11.314	44.7
	9	0.129	0.308	1.810	0.182	11.641	55.9
	11	0.224	0.217	0.747	0.429	11.731	46.3
2.0% เพปโตน	3	0.166	1.037	0.955	0.498	28.322	18.3
	5	0.103	0.261	1.010	0.288	21.571	35.6
	7	0.141	0.176	1.261	1.311	18.120	28.9
	9	0.027	0.808	1.364	3.879	18.303	30.7
	11	0.489	1.002	2.499	4.006	17.571	49.6

หมายเหตุ กิจกรรมเอนไซม์แสดงในหน่วย ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนแสดงในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณกลูโคซามีนแสดงในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ข6 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีนที่อุณหภูมิ 28 และ 37 องศาเซลเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (วัน)	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส	ปริมาณโปรตีน	ปริมาณกลูโคซามีน
28	3	0.038	0.741	0.404	0.124	11.314	10.25
	5	0.852	1.55	2.506	3.272	7.631	28.58
	7	1.389	1.880	3.533	6.372	6.848	29.38
	9	1.616	2.398	4.607	13.018	7.462	37.78
	11	1.737	2.136	5.265	19.322	7.469	39.07
37	3	0.084	0.677	0.281	5.503	9.191	15.17
	5	0.092	0.912	0.330	11.597	10.761	17.86
	7	0.027	0.350	0.056	0.000	7.921	20.00
	9	0.807	1.166	3.804	6.921	10.278	22.60
	11	0.053	0.367	0.151	0.000	7.655	26.58

หมายเหตุ กิจกรรมเอนไซม์แสดงในหน่วย ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนแสดงในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณกลูโคซามีนแสดงในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ข7 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนและปริมาณกลูโคซามีนที่สภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้น (Initial pH)

พีเอช	เวลา (วัน)	เอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์ เพคติเนส	เอนไซม์ ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้า กลูคาเนส	ปริมาณ โปรตีน	ปริมาณ กลูโคซามีน
5.0	3	0.0378	0.741	0.404	0.124	11.314	10.25
	5	0.852	1.55	2.506	3.272	7.631	28.58
	7	1.389	1.880	3.533	6.372	6.848	29.38
	9	1.616	2.398	4.607	13.018	7.462	37.78
	11	1.737	2.136	5.265	19.322	7.469	39.07
5.5	3	0.010	3.198	0.204	0.206	12.435	13.19
	5	0.930	4.091	5.235	3.9861	9.284	18.06
	7	2.115	4.085	11.729	14.213	8.062	20.28
	9	2.650	3.664	8.870	18.113	8.124	22.22
	11	2.190	2.816	6.937	13.582	7.603	33.19
6.0	3	0.097	0.774	0.897	9.798	9.733	14.36
	5	1.042	1.631	10.052	6.029	7.952	21.02
	7	1.167	1.458	11.396	10.794	9.032	27.69
	9	0.865	1.310	7.217	5.998	8.159	32.56
	11	1.633	2.172	10.755	18.089	6.627	42.05
7.0	3	0.042	2.121	1.684	15.072	15.100	14.10
	5	0.378	1.936	3.382	10.183	12.494	15.90
	7	0.001	1.975	1.847	7.543	11.842	18.20
	9	0.340	1.910	2.145	2.193	10.071	26.41
	11	0.584	1.318	2.813	2.832	9.205	29.23

หมายเหตุ กิจกรรมเอนไซม์แสดงในหน่วย ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนแสดงในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณกลูโคซามีนแสดงในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ข8 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายเมื่อผสมเอนไซม์กับสารละลายไอออนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ต่อกิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)

สารละลายไอออน	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอนไซม์เพคติเนส	เอนไซม์ไซลาเนส	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส
ชุดควบคุม	6.317	8.660	40.747	56.373
แคลเซียมคลอไรด์	7.725	5.996	37.940	55.755
แคลเซียมซัลเฟต	8.308	4.270	40.435	57.197
โคบอลต์คลอไรด์	13.424	10.871	40.712	81.641
คอปเปอร์ซัลเฟต	0.343	8.691	9.459	6.626
เฟอรัสซัลเฟต	12.703	2.120	10.741	49.918
โพแทสเซียมคลอไรด์	8.926	13.899	43.796	68.835
ลิเทียมคลอไรด์	4.875	8.751	28.308	34.744
แมกนีเซียมคลอไรด์	11.123	9.751	46.118	68.251
แมกนีเซียมซัลเฟต	9.578	16.382	46.949	65.951
แมงกานีสซัสเฟต	15.861	10.901	40.504	64.200
โซเดียมคลอไรด์	8.926	9.387	44.177	64.132
ซิงค์ซัลเฟต	15.346	7.661	41.717	59.497

ตารางผนวกที่ ข9 ผลของความเข้มข้นของไอออนต่อค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลส (ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ : %)

	ความเข้มข้นของสารละลายไอออน (มิลลิโมลาร์)		
	1	10	100
ชุดควบคุม	6.317	6.317	6.317
	(100.00)	(100.00)	(100.00)
โคบอลต์คลอไรด์	7.244	13.424	15.930
	(114.67)	(212.50)	(252.17)
แมกนีเซียมคลอไรด์	8.274	11.123	6.180
	(130.08)	(176.09)	(97.83)
แมกนีเซียมซัลเฟต	7.965	9.578	5.184
	(126.09)	(151.63)	(82.06)
แมงกานีสซัลเฟต	10.162	15.861	3.536
	(106.87)	(251.09)	(55.98)
โพแทสเซียมคลอไรด์	7.999	8.926	10.196
	(126.63)	(141.30)	(161.41)
โซเดียมคลอไรด์	8.205	8.926	9.716
	(129.98)	(141.30)	(153.80)

ตารางผนวกที่ ข10 ผลของความเข้มข้นของไอออนต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส
(ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ : %)

	ความเข้มข้นของสารละลายไอออน (มิลลิโมลาร์)		
	1	10	100
ชุดควบคุม	8.660 (100.00)	8.660 (100.00)	8.660 (100.00)
โคบอลต์คลอไรด์	10.387 (119.93)	10.871 (125.52)	21.379 (246.85)
แมกนีเซียมคลอไรด์	12.627 (145.80)	9.751 (112.59)	14.626 (168.88)
แมกนีเซียมซัลเฟต	4.936 (56.99)	16.382 (189.16)	7.389 (85.31)
แมงกานีสซัลเฟต	17.866 (206.29)	10.901 (125.87)	17.987 (207.69)
โพแทสเซียมคลอไรด์	6.662 (76.92)	13.899 (160.49)	14.323 (165.38)
โซเดียมคลอไรด์	12.476 (144.06)	9.387 (108.39)	14.323 (165.38)

ตารางผนวกที่ ข11 ผลของความเข้มข้นของไอออนต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ : %)

	ความเข้มข้นของสารละลายไอออน (มิลลิโมลาร์)		
	1	10	100
ชุดควบคุม	40.747 (100.00)	40.747 (100.00)	40.747 (100.00)
โคบอลต์คลอไรด์	44.836 (110.03)	40.712 (99.92)	17.324 (42.52)
แมกนีเซียมคลอไรด์	38.530 (94.56)	46.118 (113.18)	25.155 (61.73)
แมกนีเซียมซัลเฟต	39.119 (96.00)	46.949 (115.96)	26.402 (64.80)
แมงกานีสซัลเฟต	50.587 (124.15)	40.504 (99.40)	17.983 (44.13)
โพแทสเซียมคลอไรด์	38.322 (94.05)	43.796 (107.48)	42.237 (103.66)
โซเดียมคลอไรด์	39.084 (95.92)	44.177 (108.42)	42.098 (103.32)

ตารางผนวกที่ ข12 ผลของความเข้มข้นของสารไอออนิกต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูคาเนส (ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ : %)

	ความเข้มข้นของสารละลายไอออน (มิลลิโมลาร์)		
	1	10	100
ชุดควบคุม	56.372 (100.00)	56.372 (100.00)	56.372 (100.00)
โคบอลต์คลอไรด์	63.857 (113.28)	81.641 (144.82)	59.737 (105.97)
แมกนีเซียมคลอไรด์	59.668 (105.85)	68.251 (121.07)	47.309 (83.92)
แมกนีเซียมซัลเฟต	64.750 (114.86)	65.951 (116.99)	42.503 (75.40)
แมงกานีสซัลเฟต	63.926 (113.40)	64.200 (113.89)	34.332 (60.90)
โพแทสเซียมคลอไรด์	54.278 (96.28)	68.835 (122.11)	47.652 (84.53)
โซเดียมคลอไรด์	60.321 (107.00)	64.132 (113.76)	33.954 (60.23)

ตารางผนวกที่ ข13 ผลของความเข้มข้นของสารไอออนิกต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลส (ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ : %)

	ความเข้มข้นของสารละลายไอออน (มิลลิโมลาร์)		
	1	10	100
ชุดควบคุม	6.317	6.317	6.317
โคบอลต์คลอไรด์	7.244	13.424	15.930
แมกนีเซียมคลอไรด์	8.274	11.123	6.180
แมกนีเซียมซัลเฟต	7.965	9.578	5.184
แมงกานีสซัสเฟต	10.162	15.861	3.536
โพแทสเซียสคลอไรด์	7.999	8.926	10.196
โซเดียมคลอไรด์	8.205	8.926	9.716

ตารางผนวกที่ ข14 ผลของสารไอออนิกต่อความเสถียรของเอนไซม์ (ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์)

สารละลาย	เอนไซม์	ระยะเวลา (นาที)			
		0	5	10	15
ชุดควบคุม	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	6.49	5.02	1.94
	เพคติเนส	100	75.09	59.80	29.56
	ไซลาเนส	100	9.20	0.08	0.00
	บีต้ากลูคาเนส	100	2.86	0.44	0.00
10 มิลลิโมลาร์ โคบอลต์คลอไรด์	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	49.63	32.64	33.18
	เพคติเนส	100	62.12	0.00	19.27
	ไซลาเนส	100	9.96	0.13	4.97
	บีต้ากลูคาเนส	100	13.08	12.46	7.23
10 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	16.83	15.35	13.27
	เพคติเนส	100	67.92	146.24	255.56
	ไซลาเนส	100	0.27	0.00	1.09
	บีต้ากลูคาเนส	100	7.69	5.26	16.07
10 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	24.40	21.67	14.36
	เพคติเนส	100	55.01	64.07	23.63
	ไซลาเนส	100	4.77	0.00	0.00
	บีต้ากลูคาเนส	100	9.23	5.57	4.01
10 มิลลิโมลาร์ แมงกานีสซัลเฟต	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	20.42	13.51	15.69
	เพคติเนส	100	0.00	4.85	58.57
	ไซลาเนส	100	1.45	0.00	0.00
	บีต้ากลูคาเนส	100	8.21	4.84	5.45

ตารางผนวกที่ ข14 (ต่อ)

สารละลาย	เอนไซม์	ระยะเวลา (นาที)			
		0	5	10	15
10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	10.39	20.47	23.49
	เพคติเนส	100	38.97	48.88	39.90
	ไซลาเนส	100	0.00	1.11	3.60
	บีต้ากลูคาเนส	100	8.41	5.23	8.65
10 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	12.17	18.63	20.42
	เพคติเนส	100	13.10	45.14	76.51
	ไซลาเนส	100	2.98	0.00	1.61
	บีต้ากลูคาเนส	100	14.04	7.25	3.78

ตารางผนวกที่ ข15 ผลของน้ำตาลแอลกอฮอล์ต่อความเสถียรของเอนไซม์ (ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์)

สารละลาย	เอนไซม์	ระยะเวลา (นาที)			
		0	5	10	15
ชุดควบคุม	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	6.49	5.02	1.94
	เพคติเนส	100	75.09	59.80	29.56
	ไซลาเนส	100	9.20	0.08	0.00
	บีต้ากลูคาเนส	100	2.86	0.44	0.00
100 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	22.69	8.91	5.54
	เพคติเนส	100	19.91	45.15	33.03
	ไซลาเนส	100	2.86	1.10	1.83
	บีต้ากลูคาเนส	100	11.60	16.64	0.00
2 โมลาร์ ซอร์บิทอล	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	32.82	31.31	18.80
	เพคติเนส	100	59.75	19.12	0.00
	ไซลาเนส	100	14.45	23.33	5.45
	บีต้ากลูคาเนส	100	18.63	39.00	11.3
2 โมลาร์ กลีเซอรอล	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	82.08	30.69	11.11
	เพคติเนส	100	65.87	63.32	68.56
	ไซลาเนส	100	23.87	15.10	8.31
	บีต้ากลูคาเนส	100	32.62	17.23	14.22
1.5 โมลาร์ เดรฮาโลส	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	62.18	31.00	27.58
	เพคติเนส	100	49.08	73.40	42.02
	ไซลาเนส	100	23.68	9.48	5.75
	บีต้ากลูคาเนส	100	41.24	20.55	14.63

ตารางผนวกที่ ข16 ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อความเสถียรของเอนไซม์ (ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์)

สารละลาย	เอนไซม์	ระยะเวลา (นาที)			
		0	5	10	15
ชุดควบคุม	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	6.49	5.02	1.94
	เพคติเนส	100	75.09	59.80	29.56
	ไซลาเนส	100	9.20	0.08	0.00
	บีต้ากลูคาเนส	100	2.86	0.44	0.00
0.5 โมลาร์ กลีเซอรอล	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	42.48	26.24	9.30
	เพคติเนส	100	48.61	42.28	46.27
	ไซลาเนส	100	10.97	3.95	3.36
	บีต้ากลูคาเนส	100	14.87	10.73	5.84
2.0 โมลาร์ กลีเซอรอล	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	82.08	30.69	11.11
	เพคติเนส	100	65.87	63.32	68.56
	ไซลาเนส	100	23.87	15.10	8.31
	บีต้ากลูคาเนส	100	32.62	17.23	14.22
2.5 โมลาร์ กลีเซอรอล	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	100	58.70	41.05	21.99
	เพคติเนส	100	83.01	73.13	12.23
	ไซลาเนส	100	30.75	19.62	6.24
	บีต้ากลูคาเนส	100	29.78	16.99	10.13

ตารางผนวกที่ ข17 ผลกระทบของสารผสมกลีเซอรอลความเข้มข้น 2 โมลาร์ กับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง

	เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (%)	เอนไซม์เพคติเนส (%)	เอนไซม์ไซลาเนส (%)	เอนไซม์บีต้ากลูคาเนส (%)
ชุดควบคุม	**6.981**	**12.971**	**46.418**	**78.791**
	(100.00)	(100.00)	(100.00)	(100.00)
กลีเซอรอล 2 โมลาร์	**10.116**	**10.195**	**41.867**	**86.733**
	(144.92)	(78.60)	(90.20)	(110.08)
เตรฮาโลส 1.5 โมลาร์	**12.199**	**11.830**	**42.94**	**96.586**
	(174.75)	(91.21)	(92.51)	(122.58)
กลีเซอรอล 2 โมลาร์+ โคบอลต์คลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์	**8.618**	**19.366**	**50.465**	**88.296**
	(123.45)	(149.30)	(108.72)	(112.06)
กลีเซอรอล 2 โมลาร์+ แมกนีเซียมซัลเฟต10 มิลลิโมลาร์	**7.751**	**17.145**	**50.387**	**84.510**
	(111.04)	(132.18)	(108.55)	(107.26)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวณัฐฐา เพ็ญสุภา
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 14 สิงหาคม 2525
สถานที่เกิด	ขอนแก่น
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2547)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ