รายงานการวิจัย

เรื่อง

การแยกและคัดเลือกเชื้อราชอบร้อนที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนส

Isolation and Screening of Xylanase-Producing Thermophilic Fungi

โดย

ดร.โสภณ บุญลือ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โดยได้รับทุนอุดหนุนจากเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2548

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2548 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีเป็นอย่างยิ่ง ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและคณะวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องมือและสถานที่ ขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพทุกท่าน ที่เอื้ออำนวยความสะดวก และจัดเตรียมอุปกรณ์สำหรับใช้ในการทำวิจัย และสุดท้ายขอขอบคุณ คุณพงศ์พันธุ์ วัชรวิชานันท์ และ คุณจำรัส แก้วแรมเรือน ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูล

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	(1)
สารบาญภาพ	(2)
สารบาญตาราง	(4)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	11
ผลและวิจารณ์	14
สรุป	35
บรรณานุกรม	36
ภาคผนวก	42

สารบาญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ส่วนประกอบของ *O*-acetyl-4-*O*-methylglucuronoxylan ของไซแลนไม้เนื้อแข็ง ตัวเลขแสดงถึงตำแหน่งคาร์บอนอะตอม ที่มีการเชื่อมเกาะกับสารชนิดอื่น	4
2. ส่วนประกอบของ arabino-4-*O*-methylglucuronoxylan ของไซแลนไม้เนื้ออ่อน ตัวเลขแสดงถึง ตำแหน่งคาร์บอนอะตอม ที่มีการเชื่อมเกาะกับสารชนิดอื่น	4
3. ลักษณะโครงสร้างของไซแลนและระบบเอนไซม์ย่อยไซแลน	5
4. เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราชอบร้อนในระหว่างการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ จำนวน 10 isolates	21
5. *Humicola lanuginosa* หรือ *Thermomyces lanuginosus*	25
6. *Paecilomyces* sp. No. 1	26
7. *Paecilomyces* sp. No. 2	27
8. *Paecilomyces* sp. No. 3	28
9. *Rhizomucor pusillus*	29
10. *Thermoascus aurantiacus*	30
11. Time course ของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Thermoascus aurantiacus* AGKKU-18-1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลง Czapek ที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ	32

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
12. Time course ของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Paecilomyces* sp. VR-22-1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลง Czapek ที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ	33
13. Time course ของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Rhizomucor pusillus* VR-9-1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลง Czapek ที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ	33

สารบาญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. คุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสทนร้อนบริสุทธิ์จากเชื้อราบางชนิด	8
2. Isolate No. ชนิดของตัวอย่างที่นำมาแยก แหล่งที่เก็บ และเดือน/ปีที่เก็บตัวอย่าง	14
3. ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ที่คัดเลือกในขั้นปฐมภูมิ ของเชื้อราชอบร้อน ที่แยกได้จากดินและวัสดุต่างๆในธรรมชาติ	18
4. ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ที่คัดเลือกในขั้นทุติยภูมิของเชื้อราชอบร้อน ที่ผ่านการคัดเลือกมาจากขั้นปฐมภูมิ	19
5. Isolates No. ชนิดของเชื้อรา และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราชอบร้อน ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในปริมาณสูง	22

บทคัดย่อ

ทำการคัดแยกเชื้อราชอบร้อนที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนส จากดินและวัสดุธรรมชาติที่มีการย่อยสลาย จากแหล่งต่างๆ ได้แก่ กองปุ๋ยหมัก หญ้าหมักอาหารสัตว์ และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นต้น โดยนำตัวอย่างมาแยกด้วยวิธี dilution plate บนอาหาร PDA ที่เติม chloramphenycol เข้มข้น 200 ppm แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 108 isolates จากนั้นนำเชื้อราทั้งหมด มาตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสขั้นปฐมภูมิ และทุติยภูมิ โดยใช้ผงซังข้าวโพด และผงไซแลนชนิด oat spelt เป็นสับสเตรท พบว่า สามารถแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้ จำนวน 30 และ 15 isolates ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบผลของอุณหภูมิต่างๆ (25, 37 และ 50) ต่อการเจริญของเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสสูงจำนวน 10 isolates พบว่าเป็นเชื้อราชอบร้อน 7 isolates และเชื้อราทนร้อน 3 isolates การจำแนกชนิดเชื้อราในกลุ่มทั้งสอง พบว่าเชื้อราชอบร้อน ได้แก่ เชื้อ *Humicola lanuginose* (*Thermomyces lanuginosus*) 2 isolates, *Paecilomyces* sp. 1 isolate และ *Thermoascus aurantiacus* 4 isolates ในขณะที่เชื้อราทนร้อน คือเชื้อ *Paecilomyces* spp. 2 isolates และ *Rhizomucor pusillus* 1 isolate การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราชอบร้อนบางชนิดในอาหารเหลวดัดแปลง Czapek ที่มีวัสดุเหนี่ยวนำธรรมชาติ 4 ชนิดเป็นองค์ประกอบ (ซังข้าวโพด แกลบ ฟางข้าว และชานอ้อย) พบว่า เชื้อรา *Thermoascus aurantiacus* AGKKU-18-1 และ *Paecilomyces* sp.VR-22-1 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงในอาหารที่มีแกลบ และซังข้าวโพดเป็นองค์ประกอบ ในขณะที่เชื้อรา *Rhizomucor pusillus* VR-9-1 มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารที่มีชานอ้อยเป็นองค์ปะกอบได้สูงกว่าวัสดุชนิดอื่นๆ 2.5-5 เท่า

คำสำคัญ : ไซลาเนส, เชื้อราชอบร้อนที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนส

Abstract

Thermophilic xylanolytic fungi were isolated from soil and degraded natural materials such as compost, silage and agricultural wastes, by dilution plate technique. The PDA containing with 200 ppm chloramphenicol was used as screening medium and incubated at 50°C. One hundred and eight fungal isolates were isolated and examined for xylanase production. The primary and secondary screening for xylanase production were performed by using corn cob powder and oat spelt xylan as substrates for activity assay, respectively. A result showed that thirty and fifteen fungal isolates were obtained from both screening, respectively. The effect of various temperatures (25, 37, and 50°C) on growth of 10 high xylanase-producing fungal isolates was investigated and found to be 7 isolates of thermophilic fungi and 3 isolates of thertolerant fungi. The identification of thermophilic fungi was namely, 2 isolates of *Humicola lanuginosa* (*Thermomyces lanuginosus*), 1 isolate of *Paecilomyces* sp. and 4 isolates of *Thermoascus aurantiacus*. Whereas, thermotolerant fungi were identified as 2 isolates of *Paecilomyces* spp. and 1 isolate of *Rhizomucor pusillus*. The xylanase production from some xylanase-producing fungi was studied on modified Czapek's broth medium. Four kinds of natural inducers (corn cob, rice husk, rice straw and sugar cane bagasse) were comprised in the medium. The results found that the xylanase from *Thermoascus aurantiacus* AGKKU-18-1 and *Paecilomyces* sp.VR-22-1 was highly produced in rice husk and corn cob containing medium. While, *Rhizomucor pusillus* VR-9-1 showed 2.5-5 times higher xylanase production on medium contained sugar cane bagasse than other plant residues.

Key words: xylanase, xylanase-producing thermophilic fungi

บทนำ

ไซแลน (xylan) เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่เป็นองค์ประกอบหลักใน เฮมิ-เซลลูโลส (hemicellulose) ที่พบเป็นอันดับสองในเซลล์ของพืชรองจากเซลลูโลส (cellulose) โดยพบในปริมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของพืช (Joseleau และคณะ, 1992) ไซแลนประกอบด้วยสายแกนหลักของโมเลกุลน้ำตาลไซโลส (β -xylopyranose residuces) ซึ่งเชื่อมต่อกันระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 4 นอกจากนี้ที่ด้านข้างของบริเวณแกนหลักของสายน้ำตาลไซโลสยังมีกลุ่มของสารชนิดอื่นต่างกันไปเชื่อมอยู่ เช่น กลุ่มของ แอล-อะลาบิโนส (L-arabinose) ดี-กาแลคโตส (D-galactose) อะซิธิล (acetyl) เฟอรูโลอิล (feruloyl) พารา-คอมาโลอิล (P-coumaroyl) และ กรดกลูคูโลนิก (glucuronic acid) เป็นต้น (Wilkie และ Woo, 1977)

เอนไซม์ไซลาเนส (xylanase) ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมหลายชนิดนอกเหนือจากการผลิตน้ำตาลไซโลสจากวัตถุดิบที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เช่นในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ซังข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าว และแกลบ เป็นต้น อุตสาหกรรมที่นำเอนไซม์ ไซลาเนสมาใช้ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ตัวอย่างเช่น การเติมเอนไซม์ไซลาเนสลงในผลิตภัณฑ์อาหารจากธัญพืช (cereal-bared food) เช่นขนมปัง พาสตา (pasta) และ ก๋วยเตี๋ยว ซึ่งจะช่วยปรับปรุงคุณภาพของขนมปังโดยทำให้เพิ่มคุณสมบัติการเกิดความอ่อนนุ่ม (dough) ของขนมปัง ทำให้ขนมปังมีปริมาตรเพิ่มขึ้น และช่วยทำให้เส้นก๋วยเตี๋ยวมีความยืดหยุ่นสูงทำให้ง่ายต่อการหยิบจับ (Rouau และคณะ, 1994 ; Hang และ Woodams, 1997 ; Jorgensen และคณะ, 1997) ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มนั้น ไซลาเนสถูกนำมาใช้ในขั้นตอนการทำใส (clarification) ในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ ไวน์ การสกัดกาแฟ น้ำมันปาล์ม แป้ง (Wong และ Saddler, 1993; Singh และคณะ, 2003, Techapun และคณะ 2003) และซีอิ้ว (Hashimoto และ Nakata 2003) ไซลาเนสยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีก ทำให้อาหารสัตว์ถูกนำมาใช้อย่างมีประสิทธิภาพ และช่วยปรับปรุงคุณภาพของสารอาหารในไซเลจ (silage) (De Vries และ Visser, 2001; Techapun และคณะ, 2003)

ในปัจจุบันนี้เอนไซม์ไซลาเนสในกลุ่มที่ทนต่อความร้อน (thermostable xylanase) ได้รับความสนใจนำมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสามารถลดปัญหาความเป็นพิษจากการปนเปื้อนของคอร์รีนในแหล่งน้ำธรรมชาติ จากกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษด้วยวิธีทางเคมีที่ใช้อยู่ดั้งเดิม (Vieille และ Zeikus, 2001) อย่างไรก็ตามในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษนั้นยังต้องทำภายใต้อุณหภูมิสูงในช่วงระหว่าง 60-90 องศาเซลเซียส ในสภาพความเป็นด่าง (pH 8-10) ด้วยการบ่มนานถึง 3-5 ชั่วโมง (Techapun และคณะ 2003) ดังนั้นไซลาเนสที่นำมาใช้ในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษจะต้องมีคุณสมบัติทนต่อความร้อน (thermostable) และลักษณะอื่นๆ ดังกล่าวด้วย

แหล่งผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ทนความร้อน (thermostable xylanase) ที่สำคัญคือ เชื้อราชอบร้อน (thermophilic fungi) ซึ่งเชื้อราในกลุ่มนี้จะผลิตเอนไซม์ไปควบคู่กับการเจริญที่อุณหภูมิสูง และ

เอนไซม์ของมันจะมีความคงทนและว่องไวต่อการทำงานภายใต้อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของมันเอง (Saboto และคณะ, 1999) แม้ว่าปัจจุบันมีรายงานการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราชอบร้อนหลายชนิดได้แก่ เชื้อ *Thermomyces lamuginosus* SSBP (Johnson และคณะ, 1999) *T. lanuginosus* (Bissoon และคณะ 2002) *Thermoascus aurantiacus* (Kalogeris และคณะ, 2003) และ *Seytalidium thermophilum* (Boonlue และคณะ 2003) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม การค้นหาเชื้อราชอบร้อนชนิดใหม่ๆ ยังดำเนินต่อไปทั้งนี้เพื่อต้องการค้นหาเอนไซม์ที่มีลักษณะทางชีวเคมีที่แตกต่างจากที่มีรายงานมาก่อน ซึ่งอาจมีประโยชน์ในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมชนิดต่างๆ ต่อไป

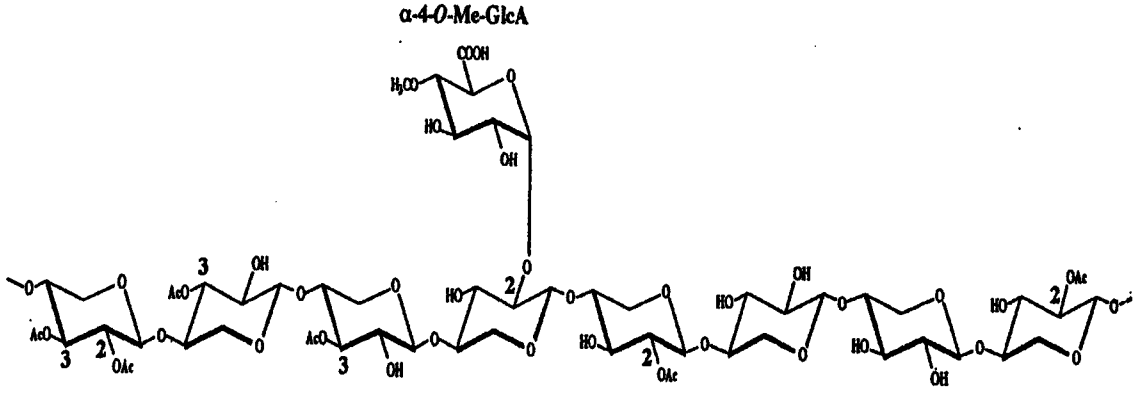
วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยก (isolation) เชื้อราชอบร้อนจากแหล่งธรรมชาติ
2. เพื่อคัดเลือก (screening) เชื้อราชอบร้อน ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด
3. เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราชอบร้อนที่มีมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูง
3. เพื่อตรวจสอบและเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะโครงสร้างของไซแลน

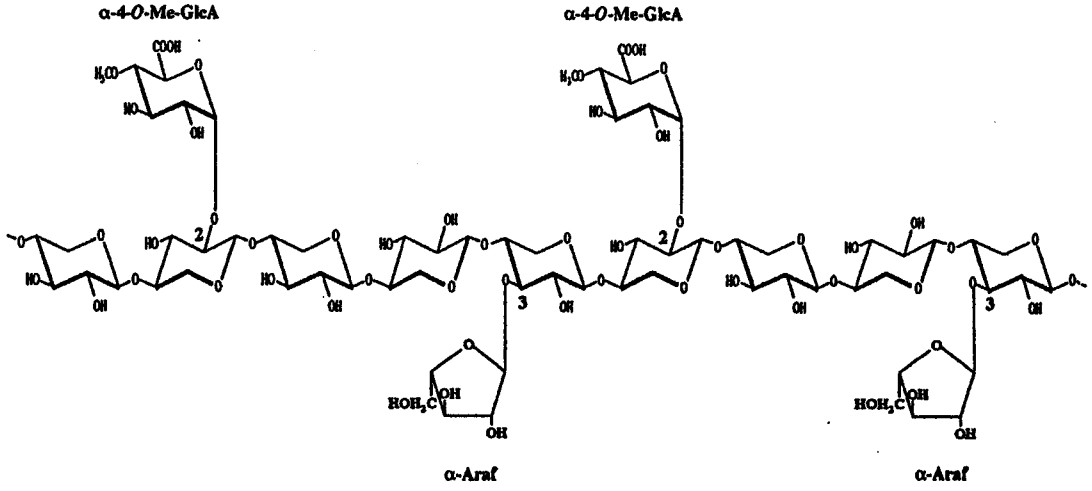
ผนังเซลล์ของพืชประกอบไปด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ 3 กลุ่ม ได้แก่ เซลลูโลส ซึ่งมีมากเป็นอันหนึ่ง รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลส และ เพคติน ตามลำดับ (Mc Neill และคณะ, 1984; De Vries และ Visser, 2001) เฮมิเซลลูโลสเป็นสารที่แทรกอยู่ระหว่างลิกนิน และ เซลลูโลส ซึ่งจะมีอยู่ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Suurnäkki และคณะ, 1997) องค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส คือ ไซแลน (Ronald และคณะ, 2001) ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ชนิดโพลีแซคคาไรด์ ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลหลายชนิด เช่น ไซโลส (xylose) อะราบิโนส (arabinose) แมนโนส (mannose) กลูโคส (glucose) กาแลคโตส (galactose) และกรดกลูคูโรนิก (glucurronic acid) เป็นต้น ปริมาณของไซแลนที่พบในพืชมีมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Josellau และคณะ, 1992) การเรียงตัวของน้ำตาลในโมเลกุลของไซแลนแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของเนื้อไม้ กล่าวคือ ไซแลนของไม้เนื้อแข็ง ซึ่งเรียกว่า *O*-acetyl-4-*O*-methylglucuronoxylan (ภาพที่ 1.) จะประกอบด้วย เบต้า-ไซโลไพราโนส (β-xylopyronose) ที่มีโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสอย่างน้อย 70 โมเลกุล การเชื่อมต่อของแต่ละโมเลกุลน้ำตาล จะมาเชื่อมต่อกันระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 4 ของแต่ละโมเลกุลน้ำตาล โดยอาศัยพันธะเบต้า-1, 4-ไกลโคซิดิค (β-1,4-glycosidic bonds) และทุกๆ โมเลกุลที่ 10 ของน้ำตาลไซโลสจะมี 4-*O*-methylglucuronic acid มาเกาะตรงตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 (C-2) ของน้ำตาลไซโลส (Woodward, 1984) โดยปกติแล้วพบว่า ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 (C-2) และ 3 (C-3) หรือ ทั้ง 2 ตำแหน่งของน้ำตาลไซโลสจะมีหมู่อะซิทิล (acetyl groups) มาเกาะ แต่ส่วนใหญ่จะเกาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) มากกว่า (Sunna และ Antranikian, 1997) การมีหมู่อะซิทิลจะมีผลต่อการละลายน้ำ และสามารถทำให้หมู่อะซิทิลหายไปได้ โดยการสกัดด้วยสารละลายด่าง (Dekker, 1989; Sunna และ Antranikian, 1997) สำหรับไซแลนไม้เนื้ออ่อนจะเรียกว่า arabino-4-*O*-methylglucuronoxylan (ภาพที่ 2.) ซึ่งจะมีปริมาณ 4-*O*-methylglucuronic acid ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (C-2) ของน้ำตาลไซโลส มากกว่าในไม้เนื้อแข็ง (Puls และ Schuseil, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่า มีการแทนที่ของหมู่อะซิทิล ด้วยหน่วยอัลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนส (α-L-arabinofuranose unit) ซึ่งเชื่อมต่อกับน้ำตาลไซโลสตรงตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 3 (C-3) โดยพันธะเบต้า-1, 3-ไกลโคซิดิค (β-1,3-glycosidic bonds) (Sunna และ Antranikian, 1997; Singh และคณะ, 2003) อัลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนสนี้ อาจเกาะกับสายโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลส ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (C-2) หรือ 3 (C-3) หรือทั้ง 2 ตำแหน่ง ของน้ำตาลไซโลส (Coughlan และ Hazlewood, 1993) นอกจากนี้ Zimbo และ Timell (1967) กล่าวว่า ไซแลนในไม้เนื้ออ่อนประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสที่สั้นกว่า ไซแลนของไม้เนื้อแข็ง และมีการแตกกิ่งของน้ำตาลน้อยกว่าด้วย



ภาพที่ 1. ส่วนประกอบของ *O*-acetyl-4-*O*-methylglucuronoxylan ของไซแลนไม้เนื้อแข็ง ตัวเลขแสดงถึงตำแหน่งคาร์บอนอะตอม ที่มีการเชื่อมเกาะกับสารชนิดอื่น

Ac: Acetyl group; α-4-*O*-Me-GlcA: α-4-*O*-methyglucuronic acid

ที่มา: Sunna and Antranikian (1997)



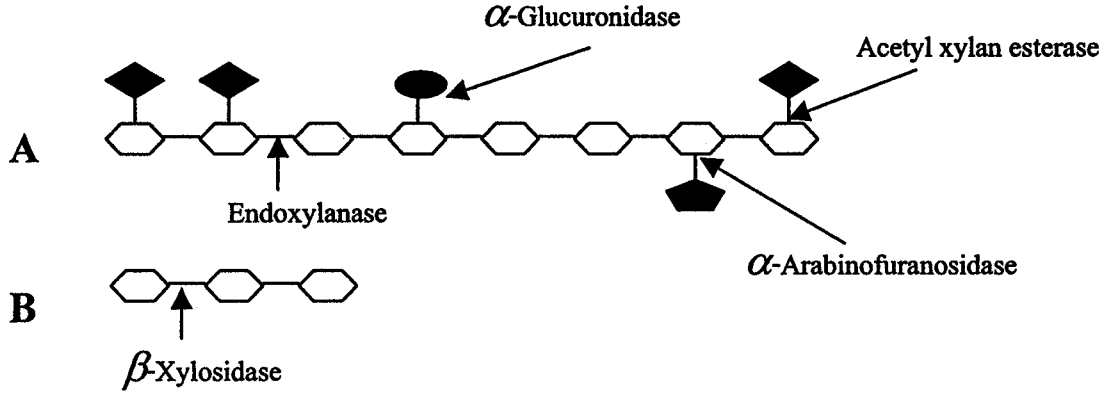
ภาพที่ 2. ส่วนประกอบของ arabino-4-*O*-methylglucuronoxylan ของไซแลนไม้เนื้ออ่อน ตัวเลขแสดงถึงตำแหน่งคาร์บอนอะตอม ที่มีการเชื่อมเกาะกับสารชนิดอื่น

α-Araf: α-Arabinofuranose; α-4-*O*-Me-GlcA: α-4-*O*-methylglucuronic acid

ที่มา: Sunna and Antranikian (1997)

2. ระบบของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนต้องการกลุ่มของ เอนไซม์ ไฮโดรไลติก (hydrolytic enzyme) ที่ทำงานร่วมกันหลากหลายชนิด (ภาพที่ 3.) เช่น เอนโดไซลาเนส (endoxylanase) แสดงกิจกรรมในการย่อยพันธะ เบต้า-1,4-ไกลโคซิดิค ที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสที่เป็นโครงสร้างหลักของ ไซแลน โดยจะย่อยจากภายในสายโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลสอย่างสุ่ม และทำให้ได้น้ำตาลโมเลกุลสั้นๆ เช่น ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharides) ไซโลไตรโอส (xylotriose) และไซโลไบโอส (xylobiose) (Reilly, 1981; Eriksson และคณะ, 1990; De Vries และ Visser, 2001) ต่อมาเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส (β-xylosidases) จะทำหน้าที่ย่อยไซโลสโมเลกุลสั้นๆ ให้เป็นน้ำตาลไซโลสโมเลกุลเดี่ยว โดยจะย่อยจากปลายด้านนอกเข้ามาด้านใน (Poutanen และ Puls, 1988; Wong และคณะ, 1988) เอนไซม์กลุ่มสุดท้ายจะทำหน้าที่ย่อยโครงสร้างกิ่งก้าน (side chain cleaving enzyme) ชนิดต่างๆ ที่เกาะอยู่กับโครงสร้างหลักของไซแลน ซึ่งได้แก่ เอนไซม์อัลฟา-กลูคูโรนิเดส (α-glucuronidase) อัลฟา-อะราบิโนฟูราโนซิเดส (α-arabinofuranosidase) และ อะซิธิลไซแลน เอสเทอเรส (acetylxylan esterase) เป็นต้น (ภาพที่ 1.) ซึ่งผลผลิตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์กลุ่มนี้คือ กรดกลูคูโรนิค (glucuronic acid) อะราบิโนส (arabinose) และ โอ-อะซิทิล (*O*-acetyl) ตามลำดับ (Maheshwari, 2000)



(A) กลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน (B) เอนไซม์ทำหน้าที่ย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไลด์

= Xylose =Acetyl group

=α-Arabinofuranose = α-4-*O*-Methylglucuronic acid

ภาพที่ 3. ลักษณะโครงสร้างของไซแลนและระบบเอนไซม์ย่อยไซแลน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sunna และ Antranikian (1997)

3. เชื้อราชอบร้อน และการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ไซลาเนสในอุตสาหกรรม

เชื้อราชอบร้อน (thermophilic fungi) และทนร้อน (thermotolerant fungi) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสูงมากในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในธรรมชาติ โดยมีความสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่ค่อนข้างกว้าง ซึ่งสามารถแยกกลุ่มของเชื้อราชอบร้อน และทนร้อนได้ โดยอาศัยความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆกัน กล่าวคือ เชื้อราชอบร้อน คือเชื้อราที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า และอุณหภูมิต่ำสุดที่จะสามารถเจริญได้คือ 20 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า ในขณะที่เชื้อราทนร้อน คือ เชื้อราที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส และต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (Cooney และ Emerson, 1964) นอกจากนี้ยังมีเชื้อรากลุ่มที่สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิที่สูงเหมาะสมในช่วง 90-105 องศาเซลเซียส ซึ่งเรียกเชื้อรากลุ่มนี้ว่า เชื้อราชอบร้อนจัด (extreme thermophilic fungi) โดยสามารถพบเชื้อรากลุ่มนี้ได้ในบ่อน้ำพุร้อน เป็นต้น (Blochl และคณะ, 1997; Broch, 1995) เชื้อราชอบร้อนเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในกองวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร วัสดุพืชที่ทับทมในป่า และบริเวณที่มีการสะสมของอินทรีย์วัตถุซึ่งเป็นบริเวณที่มีความร้อน ความชื้น และในสภาพที่มีอากาศถ่ายเทสูง (Maheshwari, 2000) เชื้อราเหล่านี้มีเอนไซม์หลายชนิด และมักจะทำงานร่วมกันในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในธรรมชาติได้ดี เช่น เอนไซม์ ไซลาเนส เซลลูเลส เพคติเนส และ อะไมเลส เป็นต้น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่พบปริมาณไซแลนเป็นองค์ประกอบสูง ได้แก่ ขี้เลื่อย ซังข้าวโพด ลำข้าวสาลี และชานอ้อย เป็นต้น วัสดุเหล่านี้ถูกนำมาใช้แปรรูปเป็นน้ำตาลไซโลส หรือ อะราบิโนส ที่มีราคาสูงขึ้น โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาเนส จากเชื้อราชอบร้อนหลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Thermoascus aurantiacus*, *Humicola lanuginosa*, *Paecilomyces varioti*, *Melanocarpus albomyces*, *Thermomyces lanuginosus*, *Chaetomium thermophile* var. *coprophile* และ *H. insolens* (Maheshwari, 2000) เป็นต้น หรืออาจนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้มาใช้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมชนิดอื่นๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ และอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เป็นต้น

เมื่อเร็วๆนี้ เอ็นไซม์ไซลาเนส ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมการฟอกเยื่อกระดาษ โดยเอนไซม์นี้จะถูกนำมาใช้ลดปริมาณคลอรีนที่ใช้ในขั้นตอนของการฟอกเยื่อกระดาษ ซึ่งจะทำให้ลดปัญหามลภาวะเป็นพิษจากการปนเปื้อนของคลอรีนในแหล่งน้ำได้ดี แต่เอนไซม์นี้จะต้องไม่มีเซลลูเลสผสมอยู่ (cellulose free) และต้องทำงานได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงประมาณ 60-90 องศาเซลเซียส และยังต้องทนความเป็นด่าง (pH 8-10) ได้ดีด้วย (Techapun และคณะ, 2003) ดังนั้นแหล่งที่ดีสำหรับเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวนี้ จึงเป็นกลุ่มของเอนไซม์จากราชอบร้อนนั่นเอง ซึ่งโดยปกติแล้วเชื้อราชอบร้อนมักจะผลิตเอนไซม์ที่ทนทานต่อความร้อน (thermostability) ได้ดี ซึ่งเอนไซม์นี้จะทนทาน และมีกิจกรรมที่ดีในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราเอง โดยที่เชื้อรามักจะผลิตเอนไซม์ไปพร้อมๆ กับการเจริญ (Saboto และคณะ, 1999) ในกลุ่มของเอนไซม์จากเชื้อราชอบร้อน พบว่าเอนไซเอนโดไซลาเนสมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการนำมาใช้ใน

การฟอกเยื่อกระดาษ (Sunna และ Antranikian, 1997) เนื่องจากมีขนาดเล็ก ซึ่งจะสามาถแทรกเข้าไปในผนังเนื้อเยื่อของเยื่อกระดาษได้ดี จึงทำให้มีประสิธิภาพสูงต่อการฟอกเยื่อกระดาษ (Saha, 2002) น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight, MW) ของเอนไซม์เอนโดไซลาเนสนี้มีขนาดต่ำกว่า 30,000 และมักมีค่า isoelectric point (*p*I) เป็นด่าง (Sunna และ Antranikian, 1997)

Bissoon และคณะ (2002) แสดงผลของเอนไซม์ไซลาเนสบริสุทธิ์ จากเชื้อรา *T. lanuginosus* SSBP ในการฟอกเยื่อกระดาษจากชานอ้อย พบว่าเอนไซมจากเชื้อรานี้ช่วยทำให้เยื่อกระดาษขาวขึ้นอย่างมาก และลดค่า kappa number ของเยื่อกระดาษ นอกจากนี้ Li และคณะ (2005) ศึกษาผลการเอนไซม์ไซลาเนสบริสุทธิ์จากเชื้อรา *T. lanuginosus* CBS288.54 ต่อการฟอกเยื่อกระดาษจากฟางข้าวสาลี พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสทำให้ความขาวของเยื่อกระดาษสูงกว่าชุดควบคุม 1.8-7.79 เปอร์เซ็นต์ และแสดงค่าความยืดตัว (tensile index) และการฉีกขาดของเยื่อกระดาษต่ำกว่าชุดควบคุม และปริมาณการใช้คลอรีนลดลงถึง 2.3 เปอร์เซ็นต์ในระหว่างการฟอกเยื่อกระดาษ และพบว่าของเชื้อนี้สามารถทำงานในการฟอกเยื่อกระดาษได้ในสภาวะที่เป็นด่างสูงที่มี pH 10.0

การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ไซลาเนสในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่มนั้น พบว่าการเติมเอนไซม์ไซลาเนสลงในผลิตภัณฑ์อาหารจากธัญพืช (cereal-bared food) เช่น ขนมปัง พาสตา (pasta) และก๋วยเตี๋ยว จะช่วยปรับปรุงคุณภาพของขนมปัง โดยทำให้เพิ่มคุณสมบัติการเกิดความอ่อนนุ่ม (dough) ของขนมปัง ทำให้ขนมปังมีปริมาตรเพิ่มขึ้น และช่วยทำให้เส้นก๋วยเตี๋ยวมีความยืดหยุ่นสูงทำให้ง่ายต่อการหยิบจับ (Rouau และคณะ, 1994 ; Hang และ Woodams, 1997 ; Jorgensen และคณะ, 1997) ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มนั้น ไซลาเนสถูกนำมาใช้ในขั้นตอนการทำใส (clarification) ในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ ไวน์ การสกัดกาแฟ น้ำมันปาล์ม แป้ง (Wong และ Saddler, 1993; Singh และคณะ, 2003, Techapun และคณะ 2003) และซีอิ้ว (Hashimoto และ Nakata 2003) ไซลาเนสยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีก โดยใช้ในการลดน้ำหนักของสัตว์ปีก ทำให้อาหารสัตว์ถูกนำมาใช้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทำให้ระบบทางเดินอาหารของไก่หนืดมากขึ้น ซึ่งทำให้ลำไส้มีการดูดซึมอย่างช้าๆ และช่วยปรับปรุงคุณภาพของสารอาหารในไซเลจ (silage) (Sunna และ Antranikian, 1997; de Vries และ Visser, 2001; Techapun และคณะ, 2003)

ตารางที่ 1. แสดงคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสทนร้อนบริสุทธิ์จากเชื้อราบางชนิด พบว่าอุณหภมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทนร้อนของเชื้อราจะอยู่ในช่วง 50-75 องศาเซลเซียส ในขณะที่ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ มีช่วงที่กว้างระหว่าง pH 2.5-6.5 ดังนั้นการนำเอนไซม์ไซลาเนสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมชนิดใดนั้น ควรที่จะพิจารณาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์จากเชื้อแต่ละชนิดที่จะนำไปใช้ เพื่อให้การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

ตารางที่ 1. คุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไซลาเนสทนร้อนบริสุทธิ์จากเชื้อราบางชนิด

ชนิดของเชื้อรา และ ประเภทของเอนไซม์	เอนไซม์	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	อุณหภูมิที่เหมาะสม	pH ที่เหมาะสม	pI	อ้างอิง
Endoxylanases						
Aspergillus. aculeatus	Fia	18	50	4	5.6	Fujimoto *และคณะ* (1995)
	Fib	26	50	5	9.0	
	FII	52	70	5	3.8	
A. awamori	I	39.0	55	55-6.0	5.7-6.7	Kormelink *และคณะ* (1993)
	II	23.0	55	5.0	3.7	
	III	26.0	45-50	4.0	3.3-3.5	
A. kawachii	A	35.0	60	5.5	6.7	Ito *และคณะ* (1992)
	B	26.0	55	4.5	4.4	
	C	29.0	50	2.0	3.5	
A. nidulans	X22	22	62	5.5	6.4	Fernández-Espinar *และคณะ* (1993) Fernández-Espinar *และคณะ* (1994)
	X34	34	56	6.0	3.4	
A. oryzae	I	28	ND	5.0	7.0	Bailey *และคณะ* (1991)
	II	26	ND	5.0	4.9	
A. sadowii	ND	30	60	5.5	ND	Ghosh และ Nanda (1994)
Aureobasidium pullulans Y2311-1	APX-II	25	54	4.8	9.4	Li *และคณะ* (1993)
A. pullulans var. *melanigenum*	ND	24	50	2.0	6.7	Ohta *และคณะ* (2001)
Fusarium proliferatum	ND	22.4	55	5.0-5.5	ND	Saha (2002)
Pycnoporus cinnabarinus	ND	50	60	5.0	ND	Sigoillot *และคณะ* (2002)
Thermomyces lanuginosus	ND	26.3	75	6.0-6.5	3.7	Bennett *และคณะ* (1998)
T. lanuginosus SSBP	ND	23.6	70	6.5	3.8	Lin *และคณะ* (1999)
β-xylosidases						
Aspergillus nidulans	xlnD	85	50	5.0	3.4	Kumar และ Ramon (1996)
A. oryzae	xylA	110	60	4.0	ND	Kitamoto *และคณะ* (1999)
A. pulverulentus	β-xylI	65	60	2.5-3.5	4.7	Sulistyo *และคณะ* (1995)
	β-xylII	100	60	4.0-5.0	3.5	
α-L-arabinofuranosidase						
Aspergillus oryzae	ND	60	60	5.5	ND	Hashimoto และ Nakata (2003)
A. sojae	X-II-A	34.3	50	5.0	3.9	Kimura *และคณะ* (1995)
A. nidulans	AbfB	65	65	4.0	3.3	Ramon *และคณะ* (1993)

ND: ไม่มีข้อมูลบันทึก

4. คุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา

Jain (1998) ศึกษาความสามารถในการทนร้อนของเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *Melanocarpus albomyces* IIS-68 ในการหมักแบบ solid state โดยการสกัดด้วยบัฟเฟอร์หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราชอบร้อนในสภาวะ solid state ซึ่งทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ถึง 25 เท่า ทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยวิธีโครมาโตกราฟี ซึ่งได้ผลผลิตของเอนไซม์ไซลาเนสที่บริสุทธิ์ถึง 6.5 เปอร์เซนต์ เอนไซม์นี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลนที่แยกได้จากไม้และฟางข้าว และยังพบว่าลักษณะของเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อนี้ทนร้อนได้ดีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 2 ชั่วโมง และทนต่อช่วง pH 5-10 และจากการสกัดด้วยบัฟเฟอร์ แสดงให้เห็นว่ามีเอนไซม์อะซิทิลเอสเทอเรส (acetyl esterase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายกิ่งก้านของไซแลนปนอยู่ด้วย

Abdel-sater และ El-said (2001) ได้ศึกษาการย่อยสลายไซแลน และกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราที่แยกได้จากของเสียทางการเกษตรกรรม และอุตสาหกรรม โดยใช้ตัวอย่างของเสียทางการเกษตร 2 ชนิด และอุตสาหกรรม 1 ชนิด แต่ละชนิดเก็บ 30 ตัวอย่าง นำตัวอย่างเหล่านี้ไปแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซแลนในอาหารจำเพาะวุ้นไซแลน (xylan agar) ผลพบว่า สามารถจำแนกเชื้อราได้ทั้งหมด 26 สปีชีส์ (species) จากเชื้อ 13 จีนัส (genera) นอกจากนี้ยังพบว่า ในอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ อาหารที่มีส่วนผสมของ ฟางข้าว ฟางข้าวสาลี และชานอ้อย พบเชื้อราชนิดที่เจริญมากที่สุด คือ *Aspergilles flarus*, *A. niger*, *Penicillium chrysogenum*, *P. corylogilium*, *P. funiculosam*, *P. oxalicum* และ *Trichoderma harzianum* การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่ขับออกสู่นอกเซลล์ (extracellular xylanase) ของเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญได้ในอาหารไซแลน พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ ที่อยู่ในจีนัส *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* และ *Trichoderma* สามารถย่อยสลายไซแลนได้สูงถึง 93.3 เปอร์เซ็นต์ และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด และยังพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด ของเชื้อ *Trichoderma harzianum* คือ ที่เวลา 8 วัน หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้มอลโตสและแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) และเพปโตน (peptone) เป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับให้อาหารเลี้ยงเชื้อมี pH เริ่มต้นที่ pH 6.0

Milagres และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากชานอ้อยในสภาพถังหมักแบบมีอากาศโดยเชื้อรา *T. aurantiacus* ATCC204492 พบว่าเชื้อรานี้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในถังหมักแก้วที่มีการให้อากาศ ได้ปริมาณสูงเมื่อใช้ชานอ้อยเป็นสับสเตรต โดยตรวจพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากถึง 1,597 U/ก.ภายในเวลา 10 วันในสภาพการหมักแบบ solid state อัตราการไหลของอากาศมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ปริมาณชานอ้อยเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักมีผลต่อกิจกรรมของเนไซม์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าในสภาพที่ให้อัตราการไหลของอากาศ 61 ชม./ก. และ สับสเตรต 8 ก. มีผลทำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด (1597 U/g)

Carmona และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *A. versicolor* โดยเน้นศึกษาเฉพาะเอนไซม์ xylanase II ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ในอาหารเหลวที่มีลำข้าวสาลี เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นส่วนประกอบ และปรับ pH เป็น 6.5 ละทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ถึง 28 เท่า โดยใช้ DEAE-Sephadex และ HPLC GF-510 gel filtration เอนไซม์ xylanase II มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 32 kDa และมีปริมาณคาร์โบฮเดรต 14.1 เปอร์เซ็นต์ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 6.0-7.0 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนสชนิดนี้อย่างรุนแรง คือ ปรอท (Hg^{2+}) ทองแดง (Cu^{2+}) และ SDS ในขณะที่แมงกานีส และ dithiothreitol เป็นสารกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไซแลนชนิด birchwood สูง โดยมีค่า K_m เท่ากับ 2.3 มก./มล. และมีค่า Vmax เป็น 233.1 ไมโครโมล/มก./นาที ของโปรตีน นอกจากนี้เอนไซม์แสดงการย่อยสลายไซแลนชนิด oat spelt ได้น้ำตาลสายสั้นๆ (xylooligosaccharide) เป็นผลผลิต

Li และคณะ (2005) ทำเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* CBS288.54 ให้บริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะบางประการของเอนไซม์ พบว่าเมื่อตรวจดูเอนไซม์ด้วย SDS-PAGE เอนไซม์นี้มีขนาด 26.62 kDa มี pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ pH 7.0-7.5 และทนในช่วง pH ตั้งแต่ pH 6.5-10.0 ในขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 70-75 องศาเซลเซียส และสามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียสได้ เอนไซม์นี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไซแลนสูง โดยมีค่า K_m ของเอนไซม์ต่อ birchwood, beechwood, oat spelt xylan ที่ละลายน้ำ และ oat spelt xylan ที่ไม่ละลายน้ำ เป็น 4.0, 4.7, 2.0 และ 23.4 มก./มล ตามลำดับ

Shah และ Madamwar (2005) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส และลักษณะของเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus foetidus* MTCC4898 สายพันธุ์ใหม่ โดยการหมักในอาหารเหลว (submerge fermentation) ที่มีไซแลนชนิด birchwood เป็นสับสเตรต (substrate) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า พบว่า เชื้อราผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ 210 U/มล. และมีเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณเล็กน้อย เชื้อรานี้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสชนิดที่ขับออกสู่นอกเซลล์ (extracellular xylanase) ในอาหารที่มีไซแลนชนิด birchwood ได้ดีพอๆกับ สับสเตรตที่มีเซลลูโลสปริมาณสูง โดยที่ยังคงผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณที่ต่ำมากๆ คือน้อยกว่า 0.1 FPU/ มล. จากนั้นทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำไปศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ พบว่า เอนไซม์ของเชื้อรานี้มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และที่ pH 5.3 และสามารถทนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสได้ และหลังจากบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เอนไซม์จะมีกิจกรรมเหลืออยู่เพียง 36 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพที่มีสารโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) กลีเซอรอล (glycerol) ไซแลน และทรีฮาโรส (trehalose) จะช่วยทำให้เอนไซม์ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียสได้ เอนไซม์นี้มีความเสถียร นาน 6 เดือน และ 2 สัปดาห์ เมื่อเก็บเอนไซม์ด้วยการแช่แข็ง และในอุณหภูมิของตู้เย็น ตามลำดับ

อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อรา

เก็บตัวอย่างดินและวัสดุธรรมชาติจากแหล่งต่างๆที่มีการย่อยสลายสูง บริเวณแสงแดดส่องถึง และในบริเวณที่มีการทับถมของสารอินทรีย์ ได้แก่ ในกองปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก หญ้าหมักอาหารสัตว์ กอง วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ซังข้าวโพด กองฟาง ชานอ้อย มันสำปะหลัง เศษขี้ยางพารา มะพร้าว และอื่นๆ

2. การแยกเชื้อบริสุทธิ์และการเก็บรวบรวมเชื้อรา

นำตัวอย่างดิน และวัสดุธรรมชาติมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแห้งแล้วทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างโดยทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} - 10^{-4} จากนั้นนำสารละลายเจือจางที่ระดับดังกล่าว มาทำการ spread plate หรือ pour plate โดยใช้อาหาร PDA ที่เติมสารปฏิชีวนะ chloramphenycol ความเข้มข้น 200 ppm บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จนเชื้อราเริ่มเจริญ ทำการแยกเชื้อราโดยตัดส่วนปลายเส้นใยวางลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในจานใหม่เพื่อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บรักษาเชื้อราที่แยกได้ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกันในหลอดอาหาร yeast glucose agar ชนิดเอียง

3. การคัดเลือกเชื้อราชอบร้อนที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

3.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (Primary screening)

3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อ และการเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อราจากข้อ 2. มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนี จากนั้นนำเส้นใยบนชิ้นวุ้นจำนวน 5 ชิ้น มาปลูกในอาหาร PDB ที่มีกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ที่ ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

3.1.2 การเตรียม crude enzyme

โดยนำอาหาร PDB ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในข้อ 3.1.1 มาแยกเส้นใยออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) เพื่อใช้เป็น crude enzyme สำหรับหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

3.1.3 การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส โดยปฏิบัติในสารละลายเอนไซม์ผสม ที่ประกอบด้วย ผงซังข้าวโพด (corn cob powder) จำนวน 20 มิลลิกรัม เป็นสับสเตรท (substrate) crude enzyme ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และ McILvaine buffer pH 5.0 ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร วิเคราะห์สองซ้ำต่อตัวอย่าง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ผสมนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำมาต้มในน้ำเดือดเพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บ supernatant ไปหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยวิธี Somogyi Nelson (Nelson, 1944) ดังวิธีตรวจสอบในภาคผนวก ค. ทำการรายงานค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในรูปของยูนิต (unit) ของเอนไซม์ โดยกำหนด 1 ยูนิต หมายถึงปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสที่ทำให้เกิดน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทำการตรวจสอบ

ชุดควบคุมปฏิบัติเช่นเดียวกับการหากิจกรรมของเอนไซม์ แต่ต้องทำให้เอนไซม์เสียสภาพโดยการนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที ก่อนนำไปตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์

3.1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

นำ crude enzyme จากข้อ 3.1.2 มาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry's method (Lowry และคณะ, 1951) และหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยการเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) (ภาคผนวก ค.)

3.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (Secondary screening)

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ และการเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.1 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ตัดชิ้นบริเวณขอบของโคโลนี นำเส้นใยบนชิ้นวุ้นจำนวน 5 ชิ้นมาปลูกในอาหาร PDB ที่มีกลูโคส และ oat spelt xylan ความเข้มข้น 0.1 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบ ตามลำดับ ในปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า
แบบ rotary shaker ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

3.2.2 การเตรียม crude enzyme

การเตรียม crude enzyme ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2

3.2.3 การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.1.3 แต่เปลี่ยนจากผงซังข้าวโพด เป็นผง oat spelt xylan เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายอยู่ใน McILvaine buffer pH 5.0 และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงเวลา 15 นาที

3.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.1.4

4. การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนโคโลนีมีขนาดประมาณ 3-5 เซนติเมตร ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะที่ขอบโคโลนีของเชื้อราแต่ละชนิด แล้วนำมาวางบนกึ่งกลางของจานอาหาร PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 50 องศาเซลเซียส เพื่อทำการตรวจสอบกลุ่มของเชื้อราชอบร้อน ซึ่งจะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-50 องศาเซลเซียส หรือ กลุ่มที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส และเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่า 50 องศาเซลเซียส ซึ่งจัดเป็นเชื้อราทนร้อน การตรวจสอบดังกล่าวทำโดย วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราเหล่านั้น

5. การจำแนกชนิดของเชื้อราชอบร้อน

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มาเลี้ยงบนอาหารชนิดต่างๆ ที่กำหนดไว้ในคู่มือการจัดจำแนกเชื้อราที่มีการบรรยายไว้ก่อนหน้านี้ โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตามคำแนะนำเช่นกัน จากนั้นบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อเปรียบเทียบกับคู่มือจัดจำแนกเชื้อราดังต่อไปนี้

5.1 ตรวจสอบลักษณะรูปร่าง ขนาดและสีของโคโลนี และสี (pigment) ซึ่งสร้างแล้วขับออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

5.2 ตรวจสอบลักษณะของเส้นใย และโครงสร้างที่ใช้สร้างสปอร์ของเชื้อรา ได้แก่ conidiophore, conidial head, sporangiophore, sporangium และ สปอร์แบบต่างๆ เป็นต้น ในข้อนี้สามารถทำได้โดยใช้เทคนิค slide culture ซึ่งทำโดยใช้เข็มเขี่ยเส้นใยของเชื้อราที่ต้องการศึกษา วางที่ด้านทั้งสี่ของอาหาร PDA ซึ่งตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 cm^2 ซึ่งวางอยู่บนแผ่นสไลด์ และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่อยู่ในจานแก้วที่มีสภาพเป็น moist chamber การปฏิบัติต้องทำในสภาพปลอดเชื้อ ปิดขอบจานแก้วด้วยเทปกระดาษเพื่อลดการระเหยของน้ำให้น้อยลง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิสำหรับการทดสอบตามคำแนะนำของคู่มือการจัดจำแนก เมื่อเส้นใยเชื้อราเจริญแผ่อยู่บนกระจกปิดสไลด์ จึงนำสไลด์ไปผนึกด้วยน้ำยา lactophenol ชนิดใส นำสไลด์ไปตรวจสอบโครงสร้างต่างๆ ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งวัดขนาดของโครงสร้างนั้นๆ ด้วย micrometer

6. การตรวจสอบ และเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ในวัสดุเหนี่ยวนำธรรมชาติชนิดต่างๆ

นำเชื้อราบาง isolate ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในปริมาณสูง ซึ่งผ่านการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ในข้อ 3.2 มาทำการเพาะเลี้ยงบนจานอาหารแข็ง PDA โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวดัดแปลง Czapek (modified Czapek's broth medium) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร โดยมีวัสดุเหนี่ยวนำชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ ในความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ วัสดุเหนี่ยวนำที่ใช้ ได้แก่ ซังข้าวโพด ฟางข้าว แกลบ และชานอ้อยบดละเอียด ทำการเพาะ

เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เพื่อตรวจหาช่วงเวลาของการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา ทำการเก็บตัวอย่างในปริมาตร 5 มิลลิลิตรทุกๆ 2 วัน โดยเริ่มเก็บในวันที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ทำการแยกเซลล์เชื้อราออกทุกครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ไปทำ dialysis ใน McIL vaine buffer pH 5.0 นาน 5 ชั่วโมง เพื่อกำจัดน้ำตาลออก โดยปฏิบัติในห้องเย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำ crude enzyme ไปตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3

ผลและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อราชอบร้อน จากดินและวัสดุธรรมชาติที่มีการย่อยสลายสูง

ทำการเก็บตัวอย่างดิน และวัสดุพืชต่างๆในธรรมชาติจากแหล่งต่างๆของจังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดใกล้เคียง โดยนำตัวอย่างมาทำเจือจางด้วยวิธี dilution plate จากนั้นแยกเชื้อรา โดยเทคนิค spread plate และ pour plate ในอาหาร PDA ที่เติม chloramphinical ความเข้มข้น 200 ppm แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผลพบว่า สามารถแยกเชื้อราที่เจริญได้ในอุณหภูมิดังกล่าวได้ทั้งสิ้น 108 isolates ดังแสดงในตารางที่ 2.

ตารางที่ 2. Isolate No. ชนิดของตัวอย่างที่นำมาแยก แหล่งที่เก็บ และเดือน/ปีที่เก็บตัวอย่าง

Isolate No.	ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	เดือน/ปีที่เก็บ
AGKKU-2-1, AGKKU-2-2, AGKKU-2-3	ซังข้าวโพด	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-3-1	ซังข้าวโพด	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-4-1	ซังข้าวโพด	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-5-1	เมล็ดพืชเปื่อย	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-6-1	กาบข้าวโพด	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-7-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-8-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-9-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-10-1, AGKKU-10-2	ดินแดงแห้ง	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-11-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-12-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547

ตารางที่ 2. Isolate No. ชนิดของตัวอย่างที่นำมาแยก แหล่งที่เก็บ และเดือน/ปีที่เก็บตัวอย่าง (ต่อ)

Isolate No.	ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	เดือน/ปีที่เก็บ
AGKKU-13-1, AGKKU-13-2	ดินใบไม้ทับถม	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-14-1	ดินแดงแห้ง	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-15-1	กาบข้าวโพด	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-16-1, AGKKU-16-2	หญ้าเปื่อย	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-17-1, AGKKU-17-2	ดินใบไม้ทับถม	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-18-1, AGKKU-18-2	ไม้ผุ	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-19-1, AGKKU-19-2, AGKKU-19-3, AGKKU-19-4	ดินดำเปื่อย	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-20-1	ใบไม้เปื่อย	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-21-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-22-1	หญ้าเปื่อย	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-23-1	หญ้าเปื่อย	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-24-1	ไม้ผุ	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
AGKKU-25-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	สิงหาคม/2547
M-1-1	มูลโค	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-2-1, M-2-2, M-2-3, M-2-4	ดินใบไม้ทับถม	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-3-1	ปุ๋ยคอก	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-4-1, M-4-2, M-4-3	ดินกาบมะพร้าวผุ	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-5-1	หญ้าหมัก	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-6-1, M-6-2	ดินปลูกต้นไม้	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-7-1, M-7-2	หญ้าหมักแห้ง	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-8-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-9-1	ปุ๋ยคอก	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-10-1	ดินลำดวน	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-11-1	หญ้าหมัก	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-12-1	ดินทรายแห้ง	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-13-1	ดินปลูกต้นไม้	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-14-1	ดินปลูกต้นไม้	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-15-1	ดินลำดวน	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-16-1, M-16-2	ดินผสมแกลบผุ	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547

ตารางที่ 2. Isolate No. ชนิดของตัวอย่างที่นำมาแยก แหล่งที่เก็บ และเดือน/ปีที่เก็บตัวอย่าง (ต่อ)

Isolate No.	ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	เดือน/ปีที่เก็บ
M-17-1	ดินดำปลูกต้นไม้	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-18-1, M-18-2	ดินใบไม้ทับถม	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
M-19-1	ดินดำปลูกต้นไม้	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
NS-1-1	แกลบผุ	อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา	มิถุนายน/2547
NS-2-1	ปุ๋ยคอก	อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา	สิงหาคม/2547
NS-3-1	ปุ๋ยหมัก	อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา	สิงหาคม/2547
NS-4-1	แกลบผุ	อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา	สิงหาคม/2547
NS-5-1, NS-5-2	ดินปลูกต้นไม้	อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา	สิงหาคม/2547
US-2-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.อุทุมพรพิสัย จ.ศีรสะเกษ	กรกฎาคม/2547
US-1-1, US-1-2	เศษไม้	อ.อุทุมพรพิสัย จ.ศีรสะเกษ	กรกฎาคม/2547
VR-1-1, VR-1-2	ปุ๋ยหมัก	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	มิถุนายน/2547
VR-2-1, VR-2-2	ไม้ผุ	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	มิถุนายน/2547
VR-3-1	ไม้ผุ	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-4-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-5-1, VR-5-2	รำเปื่อย	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-6-1, VR-6-2	ดินใบไม้ทับถม	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-7-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-8-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-9-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-10-1, VR-10-2	ดินใบไม้ทับถม	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-11-1	ตอซังข้าว	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-12-1	เศษไม้	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-13-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-14-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-15-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-16-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-17-1, VR-17-2	ดินใบไม้ทับถม	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-18-1	ดินใบไม้ทับถม	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	กรกฎาคม/2547
VR-19-1,VR-19-2	แกลบผุ	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	สิงหาคม/2547
VR-20-1,VR-2-2	แกลบเผา	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	สิงหาคม/2547

ตารางที่ 2. Isolate No. ชนิดของตัวอย่างที่นำมาแยก แหล่งที่เก็บ และเดือน/ปีที่เก็บตัวอย่าง (ต่อ)

Isolate No.	ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	เดือน/ปีที่เก็บ
VR-21-1	ชานอ้อย	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	สิงหาคม/2547
VR-22-1, VR-22-2	ปุ๋ยคอก	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	สิงหาคม/2547
VR-23-1	ปุ๋ยคอก	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	สิงหาคม/2547
VR-24-1, VR-24-2	ชานอ้อย	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	สิงหาคม/2547
VR-25-1, VR-25-2, VR-25-3	ไม้ผุ	อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	สิงหาคม/2547

2. การคัดเลือกเชื้อราชอบร้อนที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

2.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (Primary screening)

ทำการคัดเลือกเชื้อราชอบร้อนที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสในขั้นปฐมภูมิ โดยนำเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด ซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDB ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน บน rotary shaker ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นปั่นแยกเซลล์ และนำ supernatant ไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส โดยใช้ผงซังข้าวโพดเป็นสับสเตรท ผลพบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสได้ทั้งสิ้น 30 isolates จากจำนวนเชื้อราทั้งหมด 108 isolates (ตารางที่ 3.) โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดใน isolate No. VR-9-1 รองลงมาคือ VR-21-1, VR-3-1 และ AGKKU-22-1 ซึ่งมีค่า specific activity เท่ากับ 8,780.00, 5,650.00, 2,690.00 และ 2,270.00 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (mU/mg protein) ตามลำดับ

2.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (Secondary screening)

การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิเป็นการยืนยันว่าเชื้อราที่แยกได้จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้จริง โดยนำเชื้อราทั้งหมดที่ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ จำนวน 30 isolates มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหนี่ยวนำ ที่ประยุกต์จาก PDB โดยประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ ไซแลนชนิด oat spelt เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บน rotary shaker ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส โดยใช้ supernatant เป็น crude enzyme ย่อยไซแลนชนิด oat spelt เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายอยู่ใน McILvaine buffer pH 5.0 ผลพบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อราได้ จำนวน 15 isolates จากจำนวนเชื้อราทั้งหมด 30 isolates (ตารางที่ 4.) โดยแสดงค่า specific activity จากมากไปน้อยในเชื้อรา isolate No. AGKKU-18-1, NS-4-1, VR-22-1 และ VR-2-1 เท่ากับ 3,280.00, 1,280.00, 1,086.84 และ 1,070.00 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (mU/mg protein) ตามลำดับ

ตารางที่ 3. ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ที่คัดเลือกในขั้นปฐมภูมิ ของเชื้อราชอบร้อน ที่แยกได้จากดินและวัสดุต่างๆในธรรมชาติ

Isolates No.	Enzyme activity (mU/ml)	Protein concentration (mg)	specific activity (mU/mg protein)
AGKKU-13-2	75.00	0.43	175.54
AGKKU-16-1	77.33	0.68	113.19
AGKKU-18-1	43.33	0.93	46.59
AGKUU-22-1	882.47	0.39	2266.05
M-1-1	456.67	1.54	296.08
M-13-1	111.00	0.32	348.26
M-15-1	340.00	0.34	996.02
M-18-1	194.00	0.78	249.98
M-2-1	56.00	0.50	111.37
M-3-1	122.33	1.11	109.81
NS-1-1	30.00	0.15	204.01
NS-4-1	128.40	1.04	123.13
US-1-1	19.00	1.25	15.20
US-2-1	160.40	0.33	487.09
VR-1-1	27.77	2.06	13.47
VR-1-2	26.44	1.02	25.97
VR-13-1	4.97	2.00	2.49
VR-19-1	350.89	0.40	885.10
VR-19-2	396.80	1.88	211.24
VR-20-1	560.00	1.22	459.09
VR-2-1	2.82	0.22	13.10
VR-21-1	892.56	0.16	5647.73
VR-2-2	5.27	1.90	2.77
VR-22-1	292.40	2.78	105.04
VR-22-2	16.88	0.64	26.48
VR-23-1	500.00	0.68	739.38
VR-25-2	824.00	1.72	477.71
VR-3-1	25.57	0.01	2692.96
VR-5-1	45.33	0.53	85.36
VR-9-1	660.00	0.08	8783.95

หมายเหตุ AGKKU = แปลงเกษตรกรรม ม.ขอนแก่น, M = อ. เมือง จ. อุบลราชธานี, NS = อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา, US = อ. อุทุมพรพิสัย จ.ศรีสะเกษ, VR = อ. วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี

ตารางที่ 4. ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ที่คัดเลือกในขั้นทุติยภูมิของเชื้อราชอบร้อน ที่ผ่านการคัดเลือกมาจากขั้นปฐมภูมิ

Isolate No.	กิจกรรมของเอนไซม์ (mU/ml)	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)	Specific activity (mU/mg protein)
AGKKU-13-12	372.97	0.54	610.00
AGKKU-18-1	1,644.33	0.50	3,280.00
M-13-1	150.25	0.76	197.00
M-2-1	326.97	0.61	536.00
NS-4-1	751.47	0.59	1,280.00
US-1-1	78.24	0.61	128.00
US-2-1	403.72	1.09	369.00
VR-13-1	196.69	0.71	276.00
VR-19-2	283.92	0.39	733.00
VR-2-1	517.76	0.49	1,070.00
VR-2-2	107.92	0.62	175.00
VR-22-1	1,088.01	1.00	1,086.84
VR-22-2	33.56	0.84	42.46
VR-25-2	240.36	0.56	428.00
VR-9-1	174.61	0.91	192.44

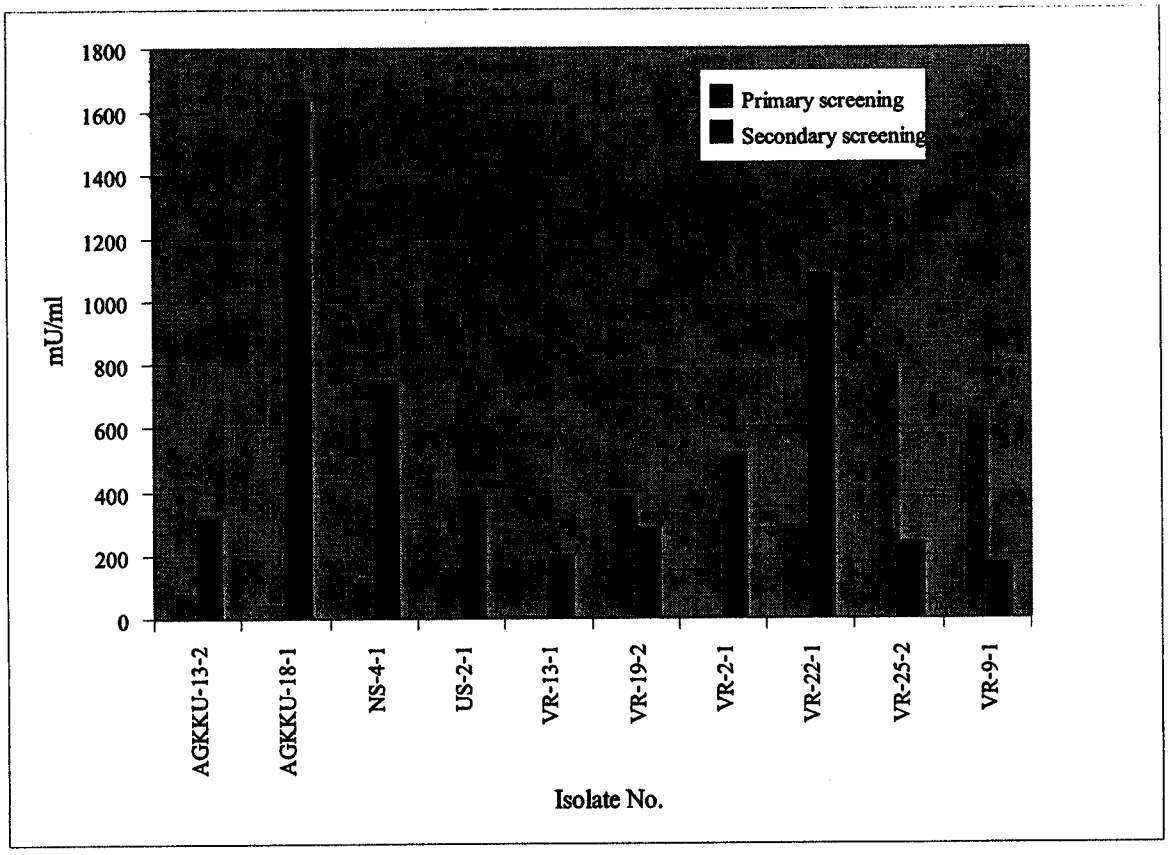
หมายเหตุ AGKKU = แปลงเกษตรกรรม ม.ขอนแก่น, M = อ. เมือง จ. อุบลราชธานี, NS = อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา, US = อ. อุทุมพรพิสัย จ.ศรีสะเกษ, VR = อ. วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี

จากภาพที่ 4. เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราชอบร้อนระหว่างการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิแล้ว พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอนไซม์ผสม โดยใช้ผงซังข้าวโพดเป็นสับสเตรทในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (ตารางที่ 2.) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่ำกว่า การใช้ผงไซแลนชนิด oat spelt เป็นสับสเตรท ดังในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (ตารางที่ 3.) ยกเว้นเชื้อรา isolate No. VR-19-2, VR-25-2 และ VR-9-1 เท่านั้น ที่ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์ในขั้นปฐมภูมิสูงกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากผงซังข้าวโพดที่ใช้ในการทดลองเป็นสับสเตรตจากธรรมชาติที่ไม่ได้มีเพียงไซแลนชนิดเดียวเท่านั้นเป็นองค์ประกอบ เหมือนกับไซแลนบริสุทธิ์ที่ผลิตเป็นการค้า แม้ว่าซังข้าวโพดจะมีไซแลนเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์มากถึง 30 เปอร์เซ็นต์ ก็ตาม (Joseleau และคณะ, 1992) แต่ผนังเซลล์ของพืชก็ยังคงมีองค์ประกอบอื่น เช่น เซลลูโลส หรือ เพคติน เป็นส่วนประกอบร่วมด้วย นอกจากนี้ การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ เป็นการตรวจสอบโดยการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรี

ดิวส์ และหากว่าเชื้อราเพียงชนิดเดียวมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าชนิด โดยที่เอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชเหล่านั้นให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ ซึ่งจะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์มีค่าสูงกว่าปกติ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ ในเชื้อรา isolate No. VR-19-2, VR-25-2, และ VR-9-1 อาจไม่ได้เกิดจากเอนไซม์ไซลาเนสเพียงชนิดเดียวเท่านั้น แต่อาจเกิดจากเอนไซม์เซลลูเลส หรือ เปคติเนส หรือ เอนไซม์อื่นๆ ร่วมด้วยก็ได้ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ จะถูกสร้างออกมาในปริมาณที่สูง และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสับสเตรทได้สูงกว่าเอนไซม์ไซลาเนสจากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (ไซแลนชนิด oat spelt เป็นสับสเตรท) และถึงแม้ว่าจะเหนี่ยวนำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้น ดังในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ โดยใช้ไซแลนชนิด oat spelt เป็นสับสเตรทแล้ว ก็ยังไม่สามารถแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสให้สูงขึ้นกว่า กิจกรรมของเอนไซม์ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิได้

มีรายงานว่าเชื้อราชอบร้อนหลายชนิดที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสร่วมกับเซลลูเลส เช่น *Thermoascus aurantiacus* (Tong และคณะ, 1980), *Chaetomium thermophile* var. *coprophile* (Gunju และคณะ, 1989), *Humicola insolens* (Naren, 1992), *H.* grisea var. *thermoidea* (Thakur และคณะ, 1992) และ *Neocallimastix frontalis* MCH3 (Gomez de Segura และ Fevre, 1993) ดังนั้นในการนำเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อราชอบร้อนไปใช้ประโยชน์ จึงต้องพิจารณาถึงคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ร่วมด้วยหรือไม่

สำหรับเชื้อราใน isolate No. AGKKU-13-2, AGKKU-18-1, NS-4-1, US-2-1, VR-13-1, VR-2-1 และ VR-22-1 พบว่า ไซแลนบริสุทธิ์ชนิด oat spelt สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงกว่า การใช้ผงซังข้าวโพดมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อราในกลุ่มนี้ ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณมากและมีประสิทธิภาพสูง อย่างไรก็ตามการนำเอนไซม์ของเชื้อราในกลุ่มนี้ ไปใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น อุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ ควรต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติของการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสร่วมด้วย ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไปในภายหลัง และจากการทดลองพบว่าการใช้ผงซังข้าวโพด เป็นซับสเตรท สำหรับการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิมีประโยชน์อย่างยิ่ง ต่อการนำมาใช้คัดเลือกเชื้อในขั้นปฐมภูมิ ซึ่งมักนิยมใช้เชื้อเป็นจำนวนมากๆในการทดสอบ อันเป็นผลให้ลดปริมาณการใช้ไซแลนบริสุทธิ์ ซึ่งมักนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ซึ่งไซแลนบริสุทธิ์นี้มักมีราคาแพง ดังนั้นการใช้วัสดุธรรมชาติที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบสูง ซึ่งมีราคาถูก จึงน่าจะช่วยลดรายจ่ายที่มีราคาสูง ในการคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้ นอกจากนี้เชื้อราส่วนใหญ่ที่ใช้ไซแลนในวัสดุธรรมชาติ เช่น ซังข้าวโพดก็มักมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่สูงด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 3. และ 4.) Boonlue และคณะ (2004) แสดงให้เห็นประโยชน์ของการนำผงซังข้าวโพดมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อราชอบร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในขั้นปฐมภูมิ และให้ผลสอดคล้องกับการทดลองนี้เช่นกัน



ภาพที่ 4. เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราชอบร้อนในระหว่างการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ จำนวน 10 isolates

3. การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่างๆต่อการเจริญ และการจำแนกชนิดของเชื้อราชอบร้อน

ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่างๆต่อการเจริญของเชื้อรา โดยนำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ จำนวน 10 isolates ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสดีที่สุด มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลานาน 7 วัน พบว่าสามารถแยกเชื้อราชอบร้อน ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จำนวน 7 isolates ได้แก่ AGKKU-18-1, AGKKU-13-2, NS-4-1, VR-1-2, VR-13-1, VR-19-2 และ VR-25-2 ในขณะที่แยกเชื้อราทนร้อนได้ทั้งสิ้น 3 isolates ได้แก่ US-2-1, VR-9-1 และ VR-22-1 ซึ่งเชื้อราดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ 25 องศาเซลเซียส ได้ด้วย (ตารางที่ 5.)

ตารางที่ 5. Isolates No. ชนิดของเชื้อรา และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราชอบร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในปริมาณสูง

Isolate No.	ชนิดของเชื้อรา	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีบนอาหาร PDA (ซม.)		
		25 (°ซ)	37 (°ซ)	50 (°ซ)
AGKKU-18-1	*Thermoascus aurantiacus*	0.0	9.0	9.0
AGKKU-13-2	*Thermoascus aurantiacus*	0.0	9.0	9.0
NS-4-1	*Humicola lanuginosa* หรือ *Thermomyces lanuginosus*	0.0	4.9	7.8
US-2-1	*Paecilomyces* sp. No.1	6.5	9.0	1.3
VR-2-1	*Paecilomyces* sp. No. 2	5.3	9.0	9.0
VR-9-1	*Rhizomucor pusillus*	4.7	9.0	2.1
VR-13-1	*Thermoascus aurantiacus*	0.0	9.0	9.0
VR-19-2	*Thermoascus aurantiacus*	0.0	9.0	9.0
VR-22-1	*Paecilomyces* sp. No. 3	1.3	7.0	2.4
VR-25-2	*Humicola lanuginosa* หรือ *Thermomyces lanuginosus*	0.0	6.1	7.7

จากนั้นนำเชื้อราทั้งหมดมาจำแนกชนิด โดยใช้เทคนิค slide culture แล้วศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้คู่มือจัดจำแนกของ Brown และ Smith (1957), Cooney และ Emerson (1964), Gilman (1957), Barnett และ Hunter (1987), Boonlue (2004) และที่มีการศึกษาไว้โดย อัจฉรา (2528) สามารถจำแนกเชื้อราได้ทั้งหมด 4 genera 6 species ได้แก่ *Humicola lanuginosa* หรือ *Thermomyces lanuginosus* 2 isolates, *Paecilomyces* sp. No.1 1 isolate, *Paecilomyces* sp. No.2 1 isolate, *Paecilomyces* sp. No.3 1 isolate, *Rhizomucor pusillus* 1 isolate และ *Thermoascus aurantiacus* 4 isolates (ตารางที่ 5.)

สำหรับลักษณะโดยละเอียดของเชื้อราชอบร้อน จำนวน 4 genera 6 species ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อราชอบร้อนที่บรรยายไว้ โดย Brown และ Smith (1957), Cooney และ Emerson (1964), Gilman (1957) และที่มีการศึกษาไว้โดย อัจฉรา (2528) มีดังต่อไปนี้

Humicola lanuginosa* หรือ *Thermomyces lanuginosus

จากการศึกษาลักษณะเชื้อ *Humicola lanuginosa* (ภาพที่ 5.) มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Humicola lanuginosa* ที่บรรยายไว้โดย Cooney และ Emerson (1964), Boonlue (2004) และที่มีการศึกษาไว้โดย อัจฉรา (2528) คือมีลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Yeast starch agar ได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.0 เซนติเมตร ภายในเวลา 72 ชั่วโมง ผิวหน้าโคโลนีเป็นเส้นใยปุย ฟูนุน ขึ้นมาจากผิวหน้าอาหารอย่างสม่ำเสมอ และมีลักษณะคล้ายผ้าสักหลาด โคโลนีเป็นสีขาวครีม ที่เวลา

24-48 ชั่วโมง และต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเทาอมเขียว โดยเริ่มจากศูนย์กลางของโคโลนีออกมา ด้านใต้โคโลนี พบ pigment สีแดงส้มสกัดออกมาบนอาหารวุ้น เส้นใยสีขาว มี septate ขนาด 2-3 µm aleuriophore จะเกิดในลักษณะตั้งฉากกับ hypha ขนาดความยาว 10-15 µm มักเกิดเดี่ยวๆไม่แตกกิ่งก้าน เกิดเป็นจำนวนมากอยู่บน hypha aleuriospore เมื่อยังอ่อนมักเกิดเดี่ยวๆบน aleuriophore มีลักษณะใสไม่มีสี และผนังเรียบ แต่เมื่อ aleuriospore แก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม มีรูปร่างกลม และผนังขรุขระ และผนังสปอร์ด้านนอกหนาขึ้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4-10 µm aleuriospore ที่แก่ เมื่อหลุดจาก aleuriophore จะมี aleuriophore attachment หักติดอยู่เสมอ

***Paecilomyces* sp. No. 1**

จากการศึกษาลักษณะเชื้อ *Paecilomyces* sp. No. 1 (ภาพที่ 6.) มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Paecilomyces* group ที่บรรยายไว้โดย Brown และ Smith (1957) คือมีลักษณะของโคโลนีที่เจริญอย่างรวดเร็วบนอาหาร Malts extract agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.0 เซนติเมตร ผิวหน้าโคโลนีเป็นเส้นใยฟู สีขาว เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้นโคโลนีจะมีลักษณะแบนราบและมีสีน้ำตาลอ่อน ด้านใต้โคโลนีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีเหลือง conidia ค่อนข้างมีความซับซ้อน ซึ่งเกิดขึ้นมาจาก phialide ที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับเชื้อในกลุ่ม *Penicillium* spp. แต่มีความซับซ้อนน้อยกว่า และไม่มีกิ่งก้านที่แตกแขนงมาก conidiophore เกิดจาก aerial hypha มีความยาว 18-80 µm เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-4 µm ผนังเรียบ มี septate พบ phialide มีลักษณะรูปร่างเป็น flask-shaped ขนาดยาว 40-60 µm เส้นผ่าศูนย์กลาง 10-30 µm conidia มีลักษณะเป็น oval-shaped ต่อกันเป็นสายยาว และมีผนังเรียบ ขนาด 5-10 x 16-20 µm

***Paecilomyces* sp. No. 2**

ลักษณะเชื้อ *Paecilomyces* sp. No. 2 (ภาพที่ 7.) มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Paecilomyces* group ที่บรรยายไว้โดย Brown และ Smith (1957) คือมีลักษณะของโคโลนีที่เจริญอย่างรวดเร็วบนอาหาร Malts extract agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.0 เซนติเมตร ผิวหน้าโคโลนีเป็นเส้นใยฟู สีขาว และเมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้นโคโลนีมีลักษณะแบนราบ สีขาวขุ่น และมีหยดน้ำลักษณะใสไม่มีสีอยู่บนโคโลนี ลักษณะด้านใต้โคโลนีมีสีขาวจนถึงสีขาวขุ่น conidiophore เกิดจาก aerial hypha มีความยาว 18-90 µm เส้นผ่าศูนย์กลาง 10-15 µm ผนังเรียบ มี septate พบ phialide มีลักษณะรูปร่างเป็น flask-shaped ขนาดยาว 30-40 µm เส้นผ่าศูนย์กลาง 15 µm conidia มีลักษณะเป็น oval-shaped ต่อกันเป็นสายยาว และมีผนังเรียบ ขนาด 5-10 x 5-15 µm

***Paecilomyces* sp. No. 3**

มีลักษณะของโคโลนีที่เจริญอย่างรวดเร็วบนอาหาร Malts extract agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.0 เซนติเมตร ผิวหน้าโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายเกลียวที่ฟั่นเป็นเชือก นูน ขึ้นมาจากผิวหน้าอาหารไม่สม่ำเสมอ มีลักษณะคล้ายผ้าสักหลาด และขอบของโคโลนีขรุขระ โคโลนีมีสีขาว และจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น หรืออาจมีสี

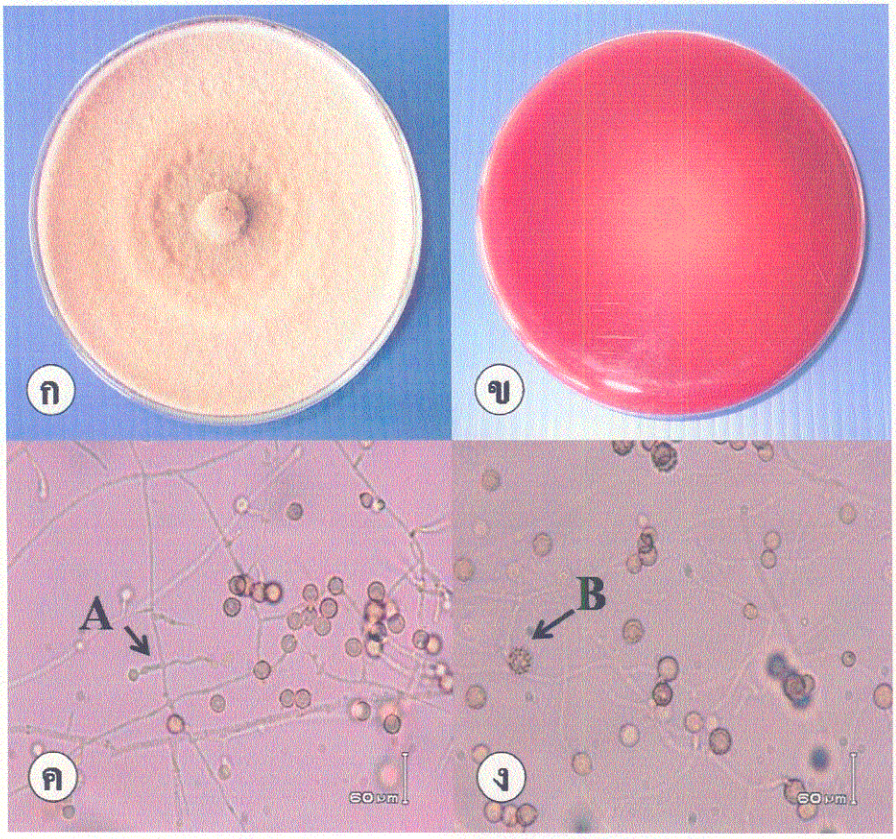
น้ำตาลอ่อน ลักษณะด้านใต้โคโลนีมีสีเหลือง และมีสีแดงส้ม เมื่อเชื้ออายุมากขึ้น (ภาพที่ 8.) conidiophore เกิดจาก aerial hypha มีความยาว 60-150 µm เส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 µm ผนังเรียบ มี septate พบ phialide มีลักษณะรูปร่างเป็น flask-shaped ขนาดยาว 60-80 µm เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 µm conidia มีลักษณะเป็น oval-shaped ต่อกันเป็นสายยาว และมีผนังเรียบ ขนาด 6-10 x 15-20 µm (Brown และ Smith , 1957)

Rhizomucor pusillus

มีลักษณะของโคโลนีที่เจริญอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 37 องซาเซลเซียส บนอาหาร Malts extract agar โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.0 เซนติเมตร ภายในเวลา 96 ชั่วโมง เส้นใยเจริญฟูขึ้นจากผิวอาหารสูงประมาณ 2 มิลลิเมตร มีลักษณะคล้ายสนามหญ้า หนาแน่นจนคล้ายผ้าสักหลาด โคโลนีระยะแรกมีสีขาว จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเข้มขึ้นเมื่อเชื้ออายุมากขึ้น ด้านใต้โคโลนีมีลักษณะสีขาวขุ่นจนถึงสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 9.) ในระยะเริ่มแรกของการเจริญพบ sporangiosphore ที่ยังไม่แตกกิ่งก้าน และมีลักษณะใสไม่มีสี ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล บางครั้งเป็นสีเทา และเริ่มแตกกิ่งก้านสาขา มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-20 µm และสร้าง septum อยู่ด้านล่างของ sporangium โดย sporangium มีขนาด 50-80 µm มีสีเทาอ่อน ต่อมาจะเป็นสีน้ำตาล โดยมีผนังใสไม่มีสี หรือเมื่อ sporangium แตกจะมีผนังกระจัดกระจายน้อย columellae มีสีฟ้าจนถึงสีน้ำตาล ลักษณะรูปร่างเป็น oval หรือ pear-shaped มีขนาดใหญ่ ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดของ sporangium โดยสูงถึง 60 µm และโดยปกติจะมีโครงสร้างคล้ายถ้วย sporangiospore มีขนาด 2.5-4 µm รูปร่างกลม บางครั้งอาจเป็นรูปไข่ หรือคล้ายผลชมพู่ และ biscuit-shaped ผนังสปอร์มีลักษณะเป็นชิ้นผลึกเล็กๆรวมกันอยู่ ไม่พบ gammae และ zygotes (Gilman, 1957)

Thermoascus aurantiacus

ลักษณะของโคโลนีมีการเจริญอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนอาหาร Malts extract agar โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.0 เซนติเมตร ที่เวลานาน 7 วัน เส้นใยเจริญราบกับอาหาร มีทั้งเส้นใยที่เจริญบนผิววุ้นอาหาร และเส้นใยที่เจริญใต้วุ้นอาหาร ซึ่งขณะอ่อนจะพบเส้นใยฟูเหนืออาหารขึ้นมา มีลักษณะการเจริญเหมือนกับเชื้อราของ *Rhizopus* แต่เมื่ออายุมากกว่า 72 ชั่วโมง เส้นใยลักษณะดังกล่าวจะฟุบลง โคโลนีจะมีสีครีม เหลืองนวลเหนียว เป็นลักษณะคล้ายหนัง ด้านใต้โคโลนีมีสีน้ำตาลอมส้ม เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น จะสร้าง fruiting body หรือ ascocarp ชนิดที่ปิดสนิท ซึ่งเรียกว่า cleistothecium ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ pseudoparenchyma จำนวนมากมาย ascocarp รูปร่างไม่แน่นอน ผนังขรุขระ มีสีเหลืองหรือสีส้มอ่อนๆ จนกระทั่งเป็นสีน้ำตาลแดง (ภาพที่ 10.) ภายใน ascocarp พบถุง ascus สร้างกระจัดกระจายอยู่ และถุง ascus จะหลุดออกมาภายนอก เมื่อทำให้ ascocarp แตก ascus มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 180-200 µm ภายในมี ascospore 8 อัน มีรูปร่างเป็นรูปไข่ (oval) จนรูปกลมรี (elliptical) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-7 x 5-6 µm (อัจฉรา, 2528; Cooney และ Emerson, 1964)



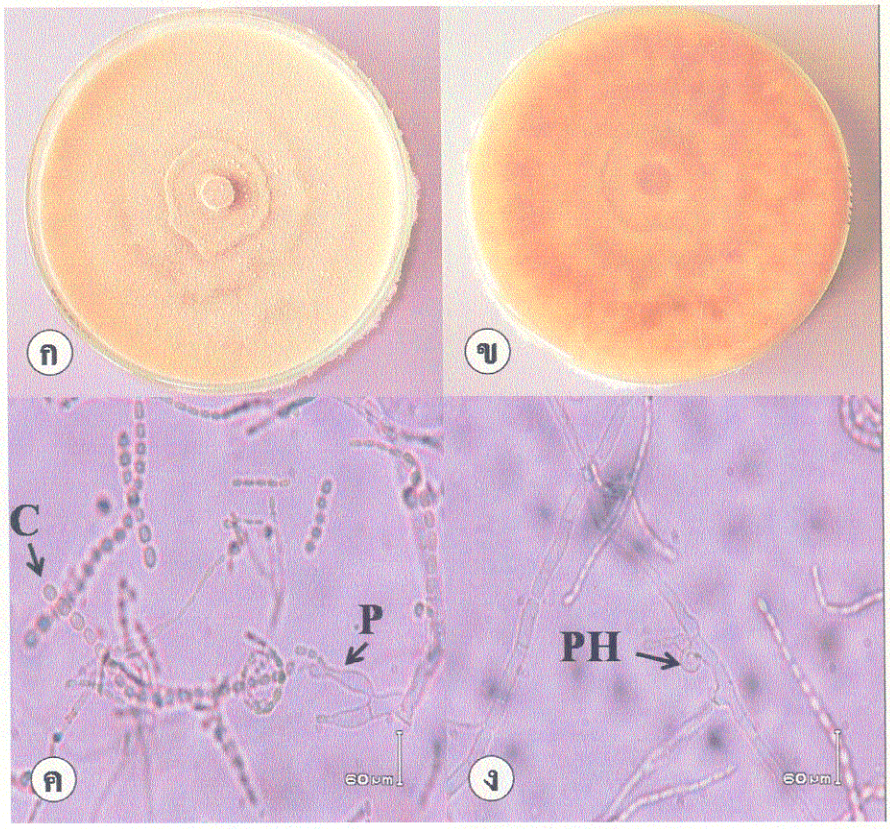
ภาพที่ 5. *Humicola lanuginosa* หรือ *Thermomyces lanuginosus*

ก. ลักษณะด้านบนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Yeast starch agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

ข. ลักษณะด้านใต้โคโลนีที่เจริญบนอาหาร Yeast starch agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

ค. ลักษณะของ aleuriophore (A) มีลักษณะใสไม่มีสี ผนังเรียบ และมีลักษณะโป่งพอง และที่ปลายมี aleuriospore

ง. เมื่อ aleuriospore แก่ (B) จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีรูปร่างกลม ผนังขรุขระ และผนังสปอร์ด้านนอกมีความหนามากขึ้น



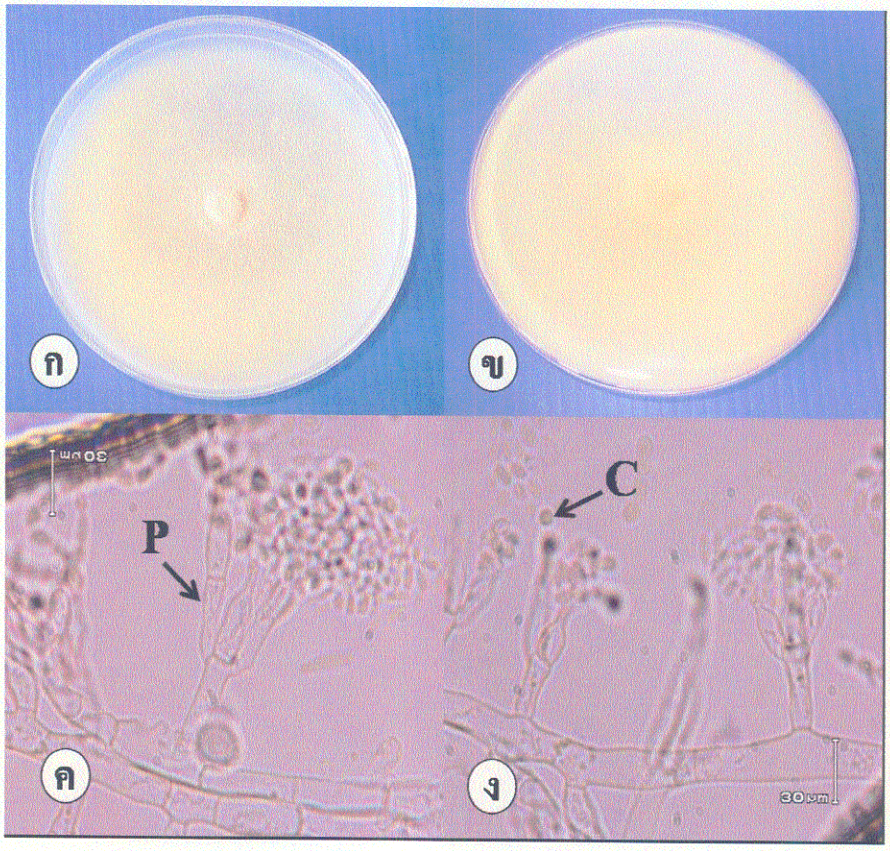
ภาพที่ 6. *Paecilomyces* sp. No. 1

ก. ลักษณะด้านบนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Malt extract agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

ข. ลักษณะด้านใต้โคโลนีที่เจริญบนอาหาร Malt extract agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

ค. ลักษณะของ conidia (C) กลม ต่อกันเป็นสายบน phialide (P) ที่มีลักษณะรูปร่างเป็น flask-shaped

ง. ลักษณะของ phialide head ที่ม้วนงอเป็นเกลียว (PH)



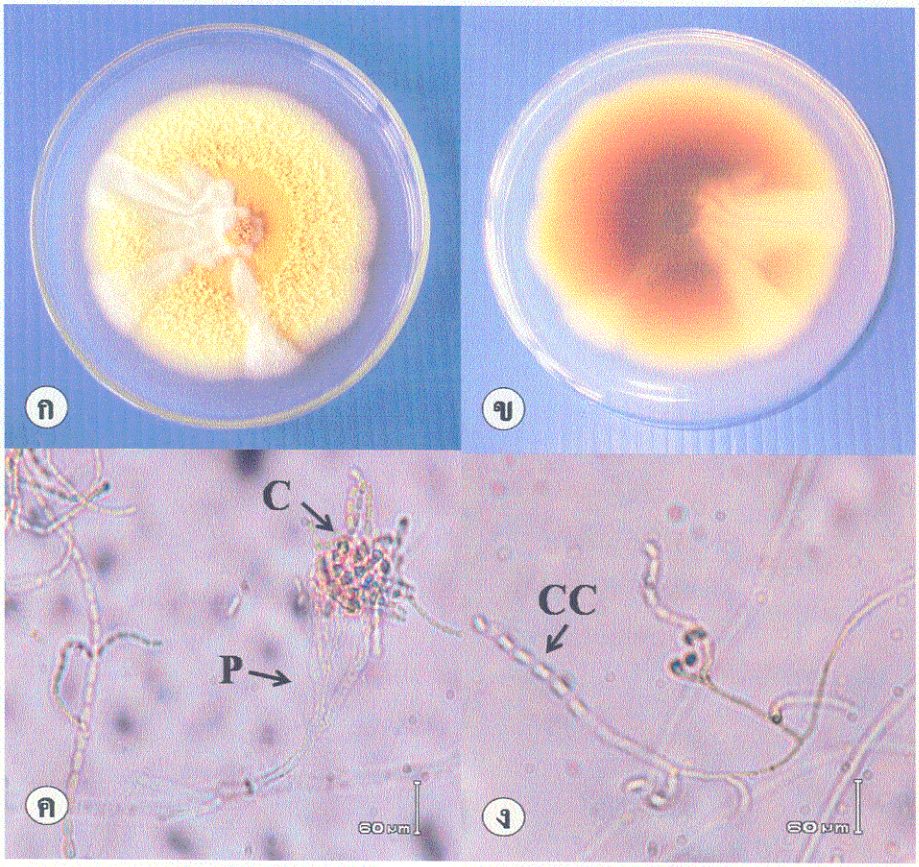
ภาพที่ 7. *Paecilomyces* sp. No. 2

ก. ลักษณะด้านบนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Malt extract agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

ข. ลักษณะด้านใต้โคโลนีที่เจริญบนอาหาร Malt extract agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

ค. phialide (P) ซึ่งมีลักษณะรูปร่างเป็น flask-shaped มีลักษณะโครงสร้างคล้าย *Penicillium* group

ง. ลักษณะของ conidia (C) กลมรี



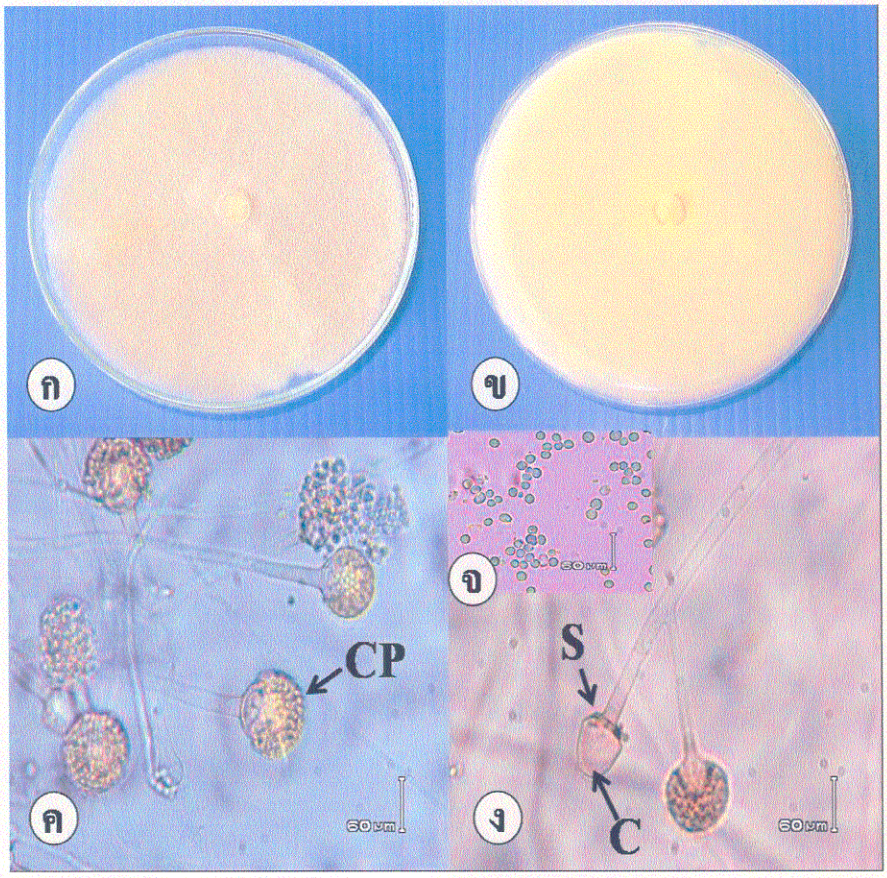
ภาพที่ 8. *Paecilomyces* sp. No. 3

ก. ลักษณะด้านบนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Malt extract agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

ข. ลักษณะด้านใต้โคโลนีที่เจริญบนอาหาร Malt extract agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

ค. ลักษณะกลุ่มของ conidia (C) กลมรี มีลักษณะเป็นสายยาว phialide (P) มีลักษณะรูปร่างเป็น flask-shaped

ง. ลักษณะของเส้นสาย conidia (CC) ที่เจริญบน phialide เดี่ยว



ภาพที่ 9. *Rhizomucor pusillus*

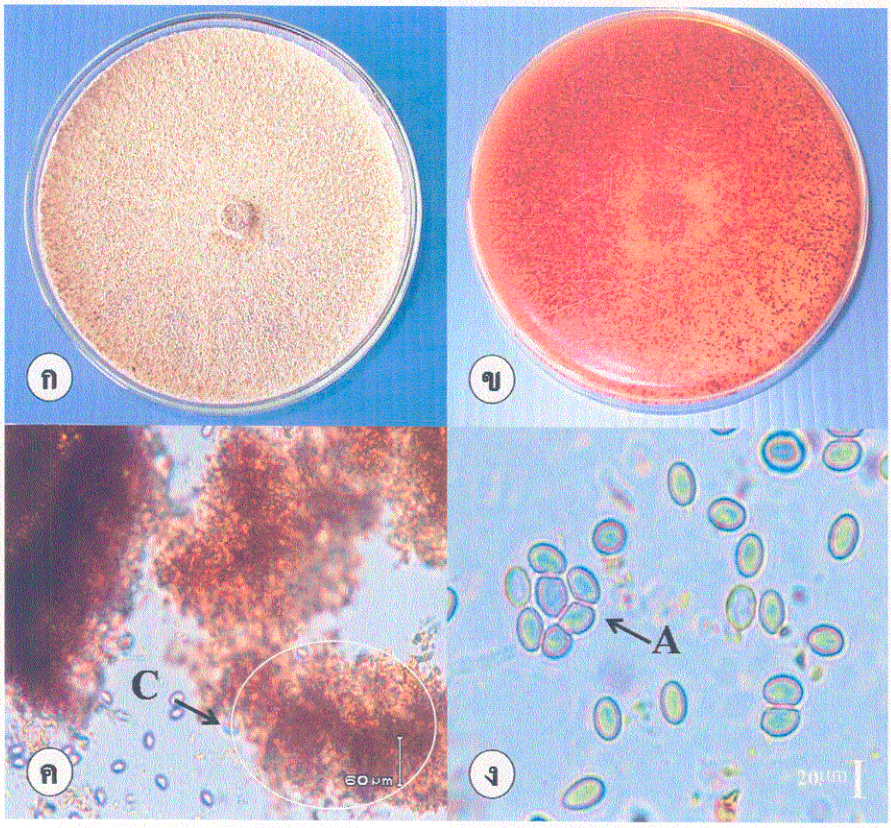
ก. ลักษณะด้านบนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Malt extract agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

ข. ลักษณะด้านใต้โคโลนีที่เจริญบนอาหาร Malt extract agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

ค. ลักษณะของ columellate sporangium (CP) สีเทาอ่อน และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแก่

ง. ลักษณะของ columellae (C) สีฟ้าจนถึงสีน้ำตาล และขนาดใหญ่คล้ายถ้วยพบโครงสร้าง septum (S) อยู่ด้านล่างของ sporangium

จ. ลักษณะของ sporangiospores กลม บางครั้งอาจเป็นรูปไข่ หรือคล้ายผลชมพู่ และ biscuit-shaped



ภาพที่ 10. *Thermoascus aurantiacus*

ก. ลักษณะด้านบนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Malt extract agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

ข. ลักษณะด้านใต้โคโลนีที่เจริญบนอาหาร Malt extract agar ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

ค. ลักษณะของ cleistothecium (C) ที่ทำให้แตก มีสีเหลือง หรือสีส้มอ่อนๆจนกระทั่งเป็นสีน้ำตาลแดง

ง. ลักษณะของ ascus (A) ภายใน มี 8 ascospore และ ascospore รูปไข่ จนถึงรูปกลมรี

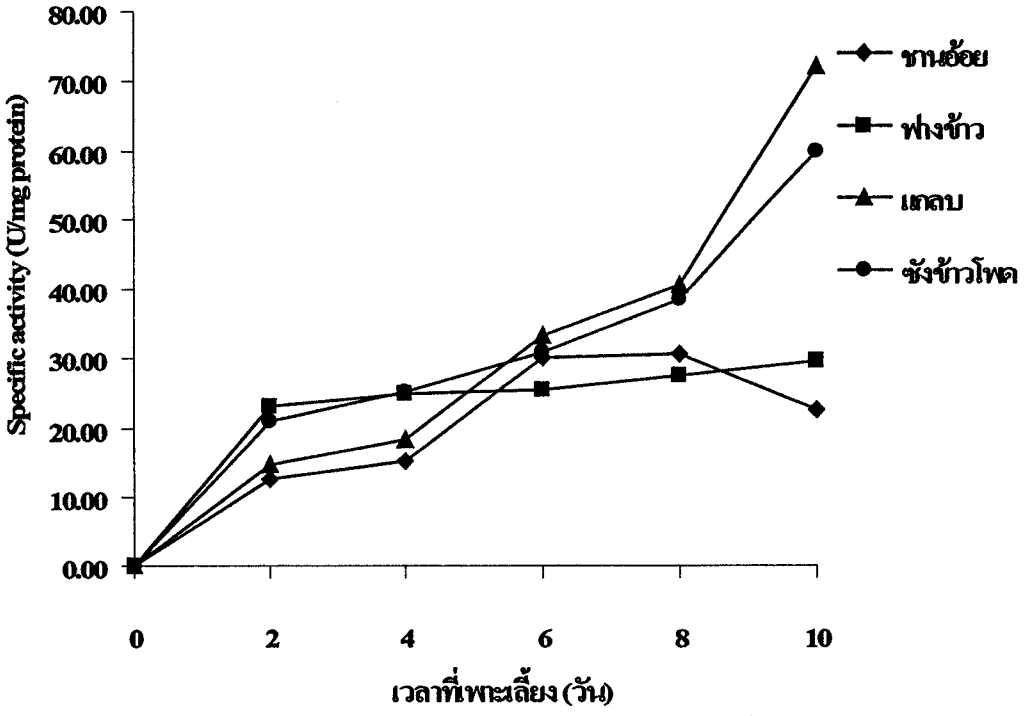
4. การตรวจสอบ และเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ในวัสดุเหนี่ยวนำธรรมชาติชนิดต่างๆ

ภาพที่ 11. แสดง time course ของการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อรา *Thermoascus aurantiacus* AGKKU-18-1 โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นวัสดุเหนี่ยวนำธรรมชาติ พบว่า เชื้อราสามรถผลิตเอนไซม์ ไซลาเนสได้ดีที่สุดในอาหารที่มีแกลบเป็นองค์ ประกอบ รองลงมาคือ ซังข้าวโพด โดยพบว่าเชื้อราจะค่อยๆ ผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นในอาหารที่มีวัสดุทั้งสองชนิดนี้ จนกระทั่งในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ก็ยังคงมีแนวโน้มของการผลิตสูงขึ้นต่อไป โดยพบ specific activity ของเอนไซม์อยู่ที่ ประมาณ 72 และ 60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (U/mg protein) สำหรับการผลิตเอนไซม์ในอาหารที่มีฟางข้าวเป็นส่วนผสม มีรูปแบบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ที่คล้ายคลึงกับการผลิตเอนไซม์ในอาหารที่มีแกลบ และซังข้าวโพดเป็นองค์ประกอบ โดยการผลิตเอนไซม์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และยังคงมีแนวโน้มสูงขึ้นหลังการเพาะเลี้ยงนาน 10 วัน แต่มีค่า specific activity ต่ำกว่าอาหารที่มี แกลบ และซังข้าวโพดเป็นองค์ประกอบ ประมาณครึ่งหนึ่ง (30 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และในขณะที่อาหารที่มีชานอ้อย พบว่าการผลิตเอนไซม์ค่อยๆ เพิ่มขึ้น จนสูงสุดในวันที่ 8 (31 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และลดลงในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง (23 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)

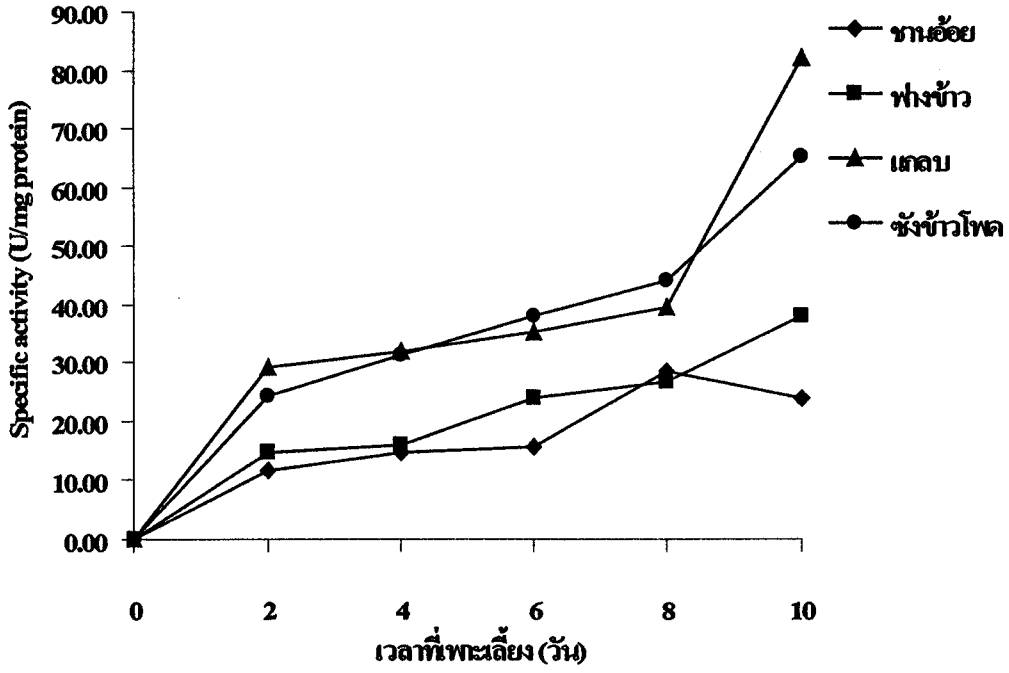
เชื้อรา *Paecilomyces* sp. VR-22-1 มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดี ในอาหารที่มี แกลบและซังข้าวโพดเป็นองค์ประกอบ โดยจะค่อยๆ ผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณใกล้เคียงกัน ซึ่งในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ก็ยังคงมีแนวโน้มที่จะผลิตเอนไซม์สูงขึ้น โดยพบค่า specific activity ในอาหารทั้งสอง ที่ 82 และ 66 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (ภาพที่ 12.) การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *Paecilomyces* sp. VR-22-1 ในอาหารที่มีฟางข้าว และชานอ้อย มีรูปแบบเช่นเดียกันกับ การผลิตเอนไซม์โดยเชื้อรา *Thermoascus aurantiacus* AGKKU-18-1 โดยพบการผลิตเอนไซม์สูงสุด ในอาหารที่มีฟางข้าวเป็นองค์ประกอบ ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง (38 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ในขณะที่พบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารที่มีชานอ้อย เป็นองค์ประกอบ ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง (29 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อราชนิดนี้ ในอาหารที่มีแกลบ และซังข้าวโพดเป็นองค์ประกอบ จะสูงกว่าในอาหารที่มีฟางข้าว และชานอ้อย ประมาณ 2 เท่า

การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อรา *Rhizomucor pusillus* VR-9-1 พบว่ามีลักษณะการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ในอาหารที่มีวัสดุเหนี่ยวนำทั้ง 4 ชนิด เป็นองค์ประกอบ คล้ายคลึงกัน (ภาพที่ 13.) โดยการผลิตเอนไซม์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งสูงสุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง และลดลงในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารที่มีชานอ้อยเป็นองค์ประกอบ โดยเชื้อรา *Rhizomucor pusillus* VR-9-1 นี้ ให้ค่า specific activity สูงกว่าอาหารที่มีวัสดุเหนี่ยวนำชนิดอื่นๆ เป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะในวันที่ 6, 8 และ 10 ของการเพาะเลี้ยง โดยพบว่า ค่า specific activity ของเอนไซม์ที่ผลิตในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ในอาหารที่มีชานอ้อย (74 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) สูงกว่า

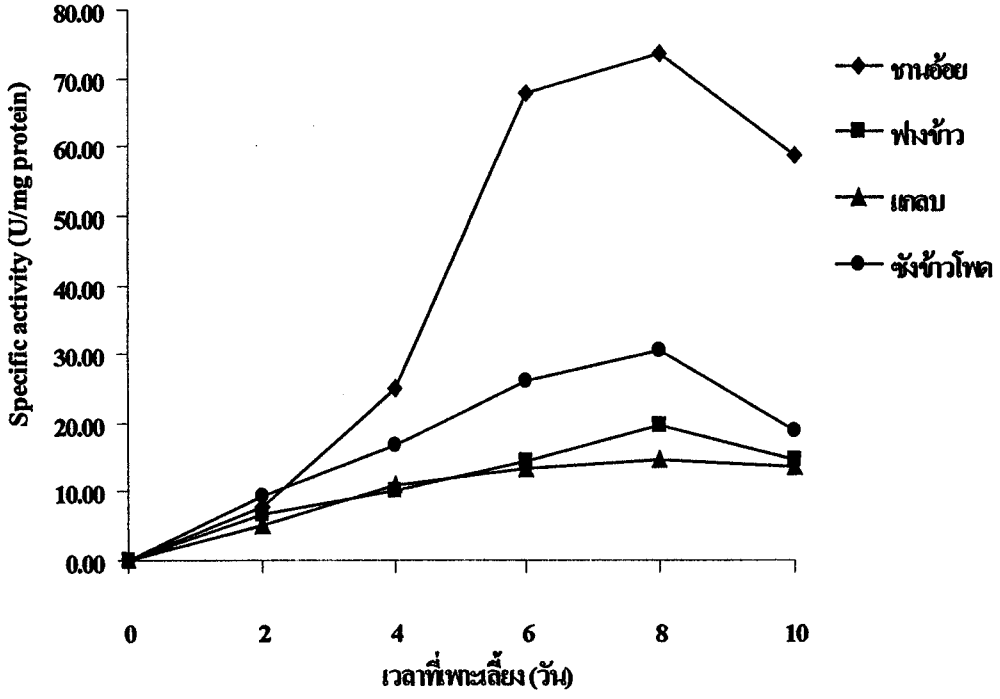
ในอาหารที่มีซังข้าวโพด แกลบ และ ฟางข้าว ประมาณ 2.5 (30 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน), 5 (15 ยูนิต ต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และ 4 (20 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า การผลิตเอนไซม์ในอาหารที่มีฟางข้าว และแกลบเป็นองค์ประกอบโดยเชื้อราชนิดนี้ มีค่าใกล้เคียงกันตลอดการเพาะเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 11. Time course ของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Thermoascus aurantiacus* AGKKU-18-1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลง Czapek ที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ



ภาพที่ 12. Time course ของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Paecilomyces* sp. VR-22-1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลง Czapek ที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ



ภาพที่ 13. Time course ของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Rhizomucor pusillus* VR-9-1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลง Czapek ที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบ

เชื้อราชอบร้อนมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในการการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แตกต่างกัน โดยพบว่าเชื้อรา *Thermoascus aurantiacus* AGKKU-18-1 และ *Paecilomyces* sp. VR-22-1 สามารถแสดงกิจกรรมการย่อยสลายไซแลนใน แกลบ และ ซังข้าวโพดได้ดีกว่า ฟางข้าวและชานอ้อย ในขณะที่ เชื้อ *Rhizomucor pusillus* VR-9-1 แสดงการย่อยสลายของไซแลนในชานอ้อยได้ดีกว่าวัสดุเหนี่ยวนำชนิดอื่นๆ Milagres และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จากชานอ้อยในสภาพถังหมักแบบมีอากาศโดยเชื้อรา *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492 พบว่า เชื้อรานี้สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในถังหมักได้ปริมาณสูง เมื่อใช้ชานอ้อยเป็นสับสเตรต ในขณะที่เชื้อราชอบร้อน *Thermomyces lanuginosus* สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูง ในอาหารที่มีซังข้าวโพดเป็นองค์ประกอบ (Purkarthofer และคณะ, 1993; Puchart และคณะ, 1999) Lenartovicz และคณะ (2003) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Aspergillus fumigatus* มีการย่อยสลายซังข้าวโพด ได้ดีกว่าการย่อยลำข้าวสาลี ชานอ้อย และฟางข้าวสาลี ตามลำดับ

จากการทดลองจะเห็นว่า เชื้อราชอบร้อนแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และ น้ำตาลโมเลกุลคู่ หรือน้ำตาล 3 โมเลกุลขึ้นไปมาต่อกัน นอกจากปริมาณน้ำตาลที่มีเพิ่มขึ้นแล้ว ปริมาณโปรตีนก็มีเพิ่มขึ้นด้วย ดีพร้อม (2547) กล่าวว่าเชื้อราชอบร้อนในกลุ่ม *Humicola* spp. และ *Tolura* spp. มีบทบาทในการทำปุ๋ยหมักสำหรับการเพิ่มผลผลิตเห็ดฝรั่งหรือแชมปิญอง และการเพาะเห็ดฟาง ตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน โดยทำการเลี้ยงเส้นใยของเชื้อราดังกล่าว ให้เป็นฝ้าขาวๆ เพื่อเป็นการเพิ่มโปรตีน และอาหารแก่ปุ๋ยหมัก แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนก่อนใช้เพาะเห็ดต่อไป ดังนั้นหากนำเชื้อราชอบร้อนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงเหล่านี้ ไปใช้ผลิตเป็นหัวเชื้อในการผลิตปุ๋ยหมักที่ทำจาก แกลบ ซังข้าวโพด และชานอ้อย เพื่อนำมาใช้เพาะเลี้ยงเห็ด ก็น่าจะทำให้เห็ดมีการเจริญเติบโตที่ดี และให้ผลผลิตสูงขึ้น เนื่องจากความเป็นประโยชน์ของสารอาหาร ที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการ เกษตรเหล่านี้ และอีกทั้งเป็นการช่วยนำวัสดุเหลือทิ้งทางการ เกษตร ที่มีมากในจังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัดใกล้เคียง มาใช้ประโยชน์ในการเพาะเห็ดมากขึ้น อันเป็นการลดต้นทุนการผลิต และลดความสิ้นเปลืองในการกำจัดวัสดุเหล่านี้ ซึ่งจะได้มีการนำเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณสูงๆเหล่านี้ ไปศึกษาในการทำปุ๋ยหมักที่มี ซังข้าวโพด แกลบ ฟางข้าว และ ชานอ้อยเป็นส่วนประกอบในการทดลองขั้นต่อไป และแม้ว่าเชื้อราชอบร้อนเหล่านี้ สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดี โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในผลการทดลอง แต่ปริมาณการผลิตยังคงไม่สูงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อราชอบร้อนชนิดอื่น เช่น *Thermoascus aurantiacus* หรือ *Thermomyces lanuginosus* ดังนั้นการตรวจหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เพื่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมชนิดอื่นๆ จึงมีความจำเป็น ซึ่งจะได้ดำเนินการเช่นกันในการทดลองต่อไป

สรุป

การคัดแยกเชื้อราชอบร้อนที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนสจากดินและวัสดุธรรมชาติ ที่มีการย่อยสลายสูงจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ กองปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก หญ้าหมักอาหารสัตว์ กองวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นต้น โดยนำตัวอย่างมาแยกด้วยวิธี dilution plate บนอาหาร PDA ที่เติม chloramphenycol เข้มข้น 200 ppm แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 108 isolates จากนั้นนำเชื้อราทั้งหมด มาคัดเลือกความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสขั้นปฐมภูมิ และขั้นทุติยภูมิ โดยใช้ผงซังข้าวโพด และ ไซแลนชนิด oat spelt เป็นสับสเตรท ผลพบว่า สามารถแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้ จำนวน 30 และ 15 isolates ตามลำดับ

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่างๆ (25, 37 และ 50 องศาเซลเซียส) ต่อการเจริญของเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนสในปริมาณสูง จำนวน 10 isolates ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเป็นเชื้อราชอบร้อน จำนวน 7 isolates และเชื้อราทนร้อน 3 isolates โดยเชื้อราดังกล่าว สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และทำการจัดจำแนกชนิดเชื้อราในกลุ่มทั้งสอง พบว่าเชื้อราชอบร้อน ได้แก่ เชื้อ *Humicola lanuginosa* หรือ *Thermomyces lanuginosus* 2 isolates, *Paecilomyces* sp. 1 isolate (No. 2) และ *Thermoascus aurantiacus* 4 isolates ในขณะที่เชื้อราทนร้อน คือ เชื้อ *Paecilomyces* spp. 2 isolates (No. 1, 3) และ *Rhizomucor pusillus* 1 isolate

การศึกษาการในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราชอบร้อนบางชนิด ในอาหารเหลวดัดแปลง Czapek ที่มีวัสดุเหนี่ยวนำธรรมชาติชนิดต่างๆ (ซังข้าวโพด แกลบ ฟางข้าว และ ชานอ้อย) เป็นองค์ประกอบ พบว่า เชื้อรา *Thermoascus aurantiacus* AGKKU-18-1 และ *Paecilomyces* sp.VR-22-1 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดี ในอาหารที่มีแกลบ และซังข้าวโพด เป็นองค์ประกอบ ในขณะที่เชื้อรา *Rhizomucor pusillus* VR-9-1 มีการผลิตเอนไซม์สูงสุดในอาหารที่มี ชานอ้อยเป็นองค์ประกอบ

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบมีความเป็นไปได้ในการนำเชื้อราชอบร้อนที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนสปริมาณสูงไปใช้เป็นหัวเชื้อในการทำปุ๋ยหมักสำหรับการเพาะเห็ด โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีมากในเขตจังหวัดอุบลราชธานี เช่น แกลบ ชานอ้อย หรือ ซังข้าวโพด เป็นวัสดุหมัก อันเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดวัสดุเหล่านี้ และเป็นการลดต้นทุนการผลิตเห็ด เนื่องจากการซื้อวัสดุเพาะ เช่น ขี้เลื่อย กากมันสัมปะหลัง หรือเมล็ดนุ่นมาจากแหล่งอื่น นอกจากนี้ เชื้อราเหล่านี้ยังมีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงในอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นจะต้องมีการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิต

เอนไซม์ในปริมาณสูง รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อเหล่านี้เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

ดีพร้อม ไชวงศ์เกียรติ (2548) "พัฒนาการของการใช้จุลินทรีย์ และสารธรรมชาติในการเพิ่มผลผลิตเห็ด", *เห็ดไทย ๒๕๔๗* **ISSN 0125-8311**, 1-5.

อัจฉรา เครือศรีสวัสดิ์. 2528. การศึกษาเชื้อราที่เจริญในอุณหภูมสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Abdel-Sater, A.H.M. El-Said. (2001) "Xylan-dermposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes", *International Biodeterioration & Biodegradation* **47**, 15-21.

Bailey, M.J., Puls, J. and Poutanen, K. (1991) "Purification and properties of two xylanases from *Aspergillus oryzae*", *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**, 380-389.

Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1987) *Illustrated genera of imperfect fungi, fourth edition* (Macmillan Publishing Company, a division of Macmillan Inc., USA).

Bennett, N.A., Ryan, J., Biely, P., Vrsanska, M., Kremnicky, L., Macris, B.J., Kekos, D., Christakopoulos, P., Katadis, P., Claeyssens, M., Nerinckx, W., Ntauma, P. and Bhat, M.K. (1998) " Biochemical and catalytical properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Thermomyces lanuginosus* ATCC 46882", *Carbohydr. Res.* **306**, 445-455.

Bissoon, S., Christov, L. and Singh, S. (2002) "Bleach boosting effects of purified xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp", *Process Biochem.* **37**, 567-572.

Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W. and Stetter, K.O. (1997) "*Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C", *Extremophiles* **1**, 14-21.

Boonlue, S. (2004) "Isolation and Enzyme Characterization of Xylanase-Producing Thermophilic fungi", (Ph.D. Thesis. Graduate School of Applied Bioscience, Hiroshima Perfectural University).

Boonlue, S., Aimi, T. and Morinaga T. (2003) "Molecular characterization of a xylanase-producing thermophilic fungus isolated from Japanese soil", *Curr. Microbiol.* **47**, 119-124.

Broch, T.D. (1995) "The road to Yellowstone- and beyond", *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 1-28.

Brown, A.H.S. and Smith, G. (1957) "The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssochlamys* Westling", *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **40**, 17-89.

Carmona, E.C., Fialho, M.B., Buchgnani, E.B., Coelho, G.D., Brocheto-Braga, M.R., Jorge, J.A. (2005) "PProduction, purification and characterization of minor form of xylanase from Asperigillus versicolor" *Process Biochem.* **40(1)**, 359-364.

Carmona, E.C., Fialho, M.B., Buchnani, E.B., Coelho, G.D., Brocheto-Braga, M.R. and Jorge, J.A. (2005) "Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versiolor*", *Process Biochem.* **40(1)**, 359-364.

Cooney, D.G. and Emerson, R. (1964) *Thermophilic Fungi, an Account of Their Biology Activities and Classification* (W.H. Freeman and Company: San Francisco).

Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P. (1993) "β-1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications", *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**, 259-289.

De Vries, R.P. and Visser, J. (2001) "*Aspegillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 497-522.

Dekker, R.F.H. (1989) "Biodegradation of the hetero-14-linked xylans", *ACS Symp. Ser.* **399**, 619-629.

Eriksson, K.E.L., Blanchette, R.A. and Ander, P. (1990) *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components* (Springer: Berlin).

Fernández-Espinar, M.T., Piñaga, F., de Graaff, L., Visser, J., Ramón, D. and Vallés, S. (1994) "Purification and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 555-562.

Fernández-Espinar, M.T., Piñaga, F., Sanz, P., Ramón, D. and Vallés, S. (1993) "Purification and characterization of neutral endoxylanase from *Aspergillus nidulans*", *FEMS Mirobiol. Lett.* **113**, 223-228.

Fujimoto, H., Ooi, T., Wang, S.-L., Takiwaza, T., Hidaka, H., Murao, S. and Arai, M. (1995) "Purification and properties of three xylanases from *Aspergillus aculeatus*", *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 538-540.

Gilman J.C. (1957) "A manual of soil fungi, second edition", (The lowa state University Press, Ames, lowa, USA).

Gomez de Segura, B. and Fevre, M. (1993) "Purification and characterization of two 1,4-β-xylan endohydrolases from the ruminal fungus *Neocallimastix frontalis*" *Appl. Environ. Microbial.* **59**, 3654-3660.

Gunju, R.K., Murthy, S.K. andVithayathil, J.P. (1989) "Purification and characterization of two xylanases from *Chaetomium thermophile var. coprophile*", *Can. J. Microbiol.* **35**, 836-842.

Hang, Y.D. and Woodams, E.E. (1997) "Xylanolytic activity of commercial juice-processing enzyme preparations", *Lett. Appl. Microbiol.* **24**, 389-392.

Hashimoto, T and Nakata, Y. (2003) "Synergistic degradation of arabinoxylan with α-L-arabinofuranosidase, xylanase and β-xylosidase from soy sauce koji mold, *Aspergillus oryzae*, in high salt condition", *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 164-169.

Hashimoto, T and Nakata, Y. (2003) "Synergistic degradation of arabinoxylan with α-L-arabinofuranosidase, xylanase and β-xylosidase from soy sauce koji mold, *Aspergillus oryzae*, in high salt condition", *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 164-169.

Ito, K., Ogasawara, H., Sugimoto, T. and Ishikawa, T. (1992) "Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*", *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 547-550.

Jain. (1994) "Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS-68", *Bioresource Technol.* **94**,32-37.

Johnson, L., Larr, M., Suren, S. and Balakrishna, P. (1999) "Characteristics of β-D-xylanase from thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP", Biotechnol. Appl. Biochem. **30**, 73-79.

Jorgensen, O.B., Si, J.Q. and Jakobsen, T.S. (1997) "Xylanolytic enxyme as bread improver", *Trends Food Sci. Technol.* **8**, 248.

Joseleau, J.P., Comtat, J. and Ruel, K. (1992) "Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls", in Visser, J., Beldman, G., Kuster-van Someren, M.A. and Voragen, A.G.J., (eds) *Xylans and xylanases* (Elsevier: Amsterdam), 1-15.

Kalogeris, E., Iniotaki, F., Topakas, E., Christakopoulos, P., Kekos, D. and Macris, B.J. (2003) "Performance of an intermittent agitation rotation drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw", *Bioresource Technol.* **86**, 207-213.

Kimura, I., Sasahara, H. and Tajima, S. (1995) "Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*", *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 334-339.

Kitamoto, N., Yoshino, S., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N. (1999) "Sequence analysis, overexpression, and antisense inhibition of a β-xylosidase gene, *xylA*, from *Aspergillus oryzae* KBN616", *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 20-24.

Kormelink, F.J.M., Searle-van Leuwen, M.J.F., Wood, T.M. and Voragen, A.G.J. (1993) "Purification

and characterization of three endo-(1,4)-β-xylanases and one β-xylosidase from *Aspergillus awamori*", *J. Biotechnol.* **27**, 249-265.

Kumar, S. and Ramon, D. (1996) "Purification and regulation of the synthesis of a β-xylosidase from *Aspergillus nidulans*", *FEMS Microb. Lett.* **135**, 287-293.

Lenartovicz, V., de Souza, C.G.M., Moreira, F.G. and Peralta, R.M. (2003) "Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β-xylosidase by *Aspergillus fumigatus*", *Process Biochem.* **38(12)**, 1775-1780.

Li, X.-L., Zhang, Z.-Q., Dean, J.F.D., Eriksson, K.-E. and Ljungdahl, L.G. (1993) "Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1" *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3212-3218.

Li, X.T., Jaing, Z.Q., Li, L.T., Yang, S.Q., Feng, W.Y., Fan, J.Y. and Kusakabe, I. (2005) "Characterization of cellulose-free, neutral xylanasefrom *Thermomyces lanuginosus* CBS288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp", *Bioresources Technol.* **96**, 1370-1379.

Lin, J., Ndlovu, L.M., Singh, S. and Pillay, B. (1999) "Purification and biochemical characteristics of β-D-xylanase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*-SSBP", *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**, 73-79.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) "Protein measurement with the folin phenol reagent", *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Maheshwari, R., Bharadwaj, G. and Bhat, K. (2000) "Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 461-488.

Mc Neill, M., Darvill, A.G., Fry, S.C. and Albersheim, P. (1984) " Structure and function of the primary cell walls of plants", *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 625-663.

Milagres, A.M.F., Santos, E., Piovan,T. and Roberto, I.C. (2004) "Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor", *Process Biochem.* **39(11)**, 1387-1391.

Naren, A.P. (1992) "Structure and function of xylanases from four thermophilic fungi" *(Ph.D. Thesis. Indian instutute of science, Bangalore).*

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

Ohta, K., Moriyama, S., Tanaka H., Shige, T. and Akimoto H. (2001) "Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* and sequence

analysis of the encoding gene", *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 262-270.

Poutanen K. and Puls, J. (1988) "Characteristics of *Trichoderma reesei* β-xylosidase and its use in hydrolysis of solubilized xylans", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 425-432.

Puchart, V., Katapodis, P., Biely, P., Kremnick'y, L., Christakopoulos, P., Vrsanská, M., Kekos, D., Macris, B.J. and Bhat, M.K. (1999) "Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*", *Enzyme Microb. Technol.* **24**, 355-361.

Purkarthofer, H., Sinner, M. and Steiner, W. (1993) "Cellulase free xylanase from *Themomyces lanuginsus*: optimization of production in submerged and solid-state culture", *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 677-682.

Puls, J. and Schuseil, J. (1993) "Chemistry of hemicelluloses: relation ship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis", in Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P. (eds) *Hemicelluloses and hemicellulases* (Portland Press: London), 1-27.

Ramon, D., van der Veen, P. and Visser, J. (1993) "Arabinan degrading enzymes from *Aspergilus nidulans*: induction and purification", *FEMS Microbiol. Lett.* **113**, 15-22.

Reilly, P.J. (1981) "Xylanases: Structure and function", in Hollaender, A.E.Ed. (ed) *Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals* (Plenum Press: New York), 111-129.

Rouau, X., El-Hayek, N.L. and Moreau, D. (1994) "Effect of enzyme preparation containing pentosanases on bread making quality of flours in relation to change in pentosan properties", *J. Cereal Sci.* **19**, 259-272.

Saboto, D., Nucci, R., Rossi, M., Gryczyniski, Z. and Lakowicz, J. (1999) "The β-glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100°C", *Biophys. Chem.* **81**, 23-31.

Saha, B.C. (2002) "Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*", *Process Biochem.* **37**, 1279-1284.

Saha, B.C. (2002) "Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*", *Process Biochem.* **37**, 1279-1284.

Shah, A.R. and Madamwar, D. (2005) "Xylanase production by newly isolated Aspergilus foetidus strain and its characterization", *Process Biochem.* **40(5)**, 1763-1771.

Sigoillot, C., Lomascolo, A., Record, E., Robert, J.L., Asther, M. and Sigoillot, J.C. (2002) "Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and new xylanase", *Enzyme Microb. Technol.*

31, 876-883.

Singh, S., Madlala, A.M. and Prior, B.A. (2003) "*Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases", *FEMS Microbiol. Rev.* **765**, 1-14.

Sulistyo, J., Kamiyama, Y. and Yasui, T. (1995) "Purification and some properties of *Aspergillus pulverulentus* β-xylosidase with transxylosylation capacity", *J. Ferment. Bioeng.* **79**, 17-22.

Sunna, A. and Antranikian, G. (1997) "Xylanolytic enzymes from fungi and Bacteria", *Critical Rev. Biotechnol.* **17**, 39-67.

Suurnäkki, A., Tenkanen, M., Buchert, J. and Viikari, L. (1997) "Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps", *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **57**, 261-287.

Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M. and Sasaki, K. (2003) "Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesss: a review", *Process Biochem.* **38**, 1327-1340.

Thakur, I.S., Rana, B.K. and Johri, B.N. (1992) "Multiplicity of xylanase in *Humicola grisea var. thermoidea*", in Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M.A. and Voragen, A.G.J. (eds.), *Xylans and xylanases* (Amsterdam: Elsevier), 511-514.

Tong, C.C., Cole, A.L. and Shepherd, M.G. (1980) "Purification and properties of the cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*", *Biochem. J.* **191**, 83-94.

Vieille, C. and Zeikus, G.J. (2001) "Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 1-43.

Wilkie, K.C.B. and Woo, S.L. (1977) "A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses", *Carbohydr. Res.* **57**, 145-162.

Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. (1988) "Multiplicity of β-1,4-xylanase in microorganisms: function and applications", *Microbiol. Rev.* **52**: 305-317.

Woodward, J. (1984) "Xylanases: functions, properties and applications", *Top. Enzyme Ferment. Biotechol.* **8**, 9-30.

Zimbo, M. and Timell, T.E. (1967) "Studies on a native xylan from Norway spruce (*Picea abies*): I. Isolation and constitution", *Svensk. Papperstid* **70**, 695-701.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Malt extract agar (MEA; After Blakeslee, 1915)

มีส่วนประกอบดังนี้ malt extract 20.0 กรัม polypeptone 1.0 กรัม glucose 20.0 กรัม วุ้นผง 15.0 กรัม และน้ำประปา 1 ลิตร ละลายส่วนผสมดังกล่าวให้ผสมเข้ากันดี แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Potato Dextrose agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ

มีส่วนประกอบดังนี้ มันฝรั่ง 200 กรัม dextrose 20 กรัม วุ้นผง 15 กรัม ยาปฏิชีวนะ chloramphenycol ความเข้มข้น 200 ppm และน้ำกลั่น 1 ลิตร <u>วิธีเตรียม</u> หั่นมันฝรั่งปอกเปลือกแล้วเป็นชิ้นเล็กๆ รูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มจนสุกกรองเอาแต่น้ำ ละลายส่วนประกอบดังกล่าวให้ผสมเข้ากันดี ปรับปริมาตรอาหารเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 5-6 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl แล้วจึงเติมวุ้น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Potato Dextrose broth

การเตรียม ปฏิบัติเช่นเดียวกับ การเตรียมในข้อ 1. แต่ในไม่ต้องเติมผงวุ้น

4. Yeast glucose agar (Emerson, 1941)

มีส่วนประกอบดังนี้ yeast extract-s 5.0 กรัม glucose 10.0 กรัม วุ้นผง 20 กรัม และน้ำประปา 1 ลิตร ละลายส่วนผสมดังกล่าวให้ผสมเข้ากันดี แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Yeast starch agar (YpSs) (Emerson, 1941)

มีส่วนประกอบดังนี้ yeast extract-s 4.0 กรัม K_2HPO_4 1.0 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม soluble starch 15.0 กรัม วุ้นผง 20 กรัม และน้ำประปา 1 ลิตร ละลายส่วนผสมดังกล่าวให้ผสมเข้ากันดี แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข.

สารเคมี (บัฟเฟอร์)

McIL-vaine Buffer เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A กับ B ตาม pH ที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.1 M Citric acid Monolybdate (21 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M Dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4) หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 28.4 กรัม หรือ 71.7 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

A (มล.)	B (มล.)	pH	A (มล.)	B (มล.)	pH
19.60	0.40	2.2	12.90	7.10	3.8
18.76	1.24	2.4	12.29	7.71	4.0
17.82	2.18	2.6	11.72	8.28	4.2
16.83	3.17	2.8	11.18	8.82	4.4
15.89	4.11	3.0	10.65	9.35	4.6
15.06	4.94	3.2	10.14	9.86	4.8
14.30	5.7	3.4	9.70	10.30	5.0
13.56	6.44	3.6	9.28	10.72	5.2

ภาคผนวก ค.

สารเคมี และวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีการ Nelson-Somogyi (Nelson, 1994)

1.1 สารเคมีและวิธีการเตรียม

1.1.1 สารละลายน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน

เตรียม stock solution น้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลตร โดยชั่งน้ำตาลไซโลสด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียดให้ได้ปริมาณ 0.75 กรัม ใส่ใน volumetric flask เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายดีแล้วดูดมา 2 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จาก stock solution นี้ นำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้น 15-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.1.2 การเตรียม Copper reagent (สารละลาย A) การเตรียมสารละลายนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1.1.2.1 เตรียมสารละลาย 10% $CuSO_4$ $5H_2O$ 100 มิลลิลิตร (10 g. /100 ml.)

1.1.2.2 เตรียมสารละลาย Phosphate–tartrate โดยละลายสาร ต่อไปนี้เข้าด้วยกัน

- Na_2HPO_4 28 กรัม (หรือ Na_2HPO_4 .$7H_2O$ 70.55 g.) ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน
- เติม Potassium sodium tartrate (tetrahydrate) 40 กรัม ละลายให้เข้ากัน
- เติม 1 N NaOH 100 มิลลิลิตร
- เติม Na_2SO_4 (Anhydrous) 120 กรัม

ปรับปริมาตรให้ครบ 900 มิลลิลิตร ทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ถ้ามีตะกอน กรองด้วยกระดาษ whatman NO.4

นำสารละลายในข้อ 1.1.2.2 เติมลงในสารละลายข้อ 1.1.2.1 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้

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

1.1.3.1 ละลาย Ammoniummolybdate [$(NH4)_6MO_7O_2.4H_2O$] 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.1.3.2 ละลาย Disodium Arsenate ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) 3 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายในข้อ 1.1.3.2 และข้อ 1.1.3.1 เข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใช้

1.2 วิธีการวิเคราะห์

1.2.1 หากราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายน้ำตาลไซโลสมาตรฐานความเข้มข้น 15 - 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2.2 ใส่สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ

1.2.3 เติมสารละลาย copper reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

1.2.4 เติมสารละลาย Nelson ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ 15 นาที

1.2.5 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล

1.2.6 สำหรับตัวอย่างที่จะหาน้ำตาลรีดิวส์ ทำการวิเคราะห์โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับ ข้อ 1.2.2-1.2.5 ถ้าตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลสูง ต้องเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้ และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ตามวิธี Lowry (Lowry และคณะ, 1951)

2.1 สารเคมีและวิธีการเตรียม

2.1.1 โปรตีนมาตรฐาน เตรียมโดยใช้ Albumin Bovine, F-V (BSA = Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมเป็น stock เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เตรียมทั้งหมด 10 มิลลิกรัมต่อ10 มิลลิลิตร)

2.1.2 สารละลาย **Lowry solution A** คือ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 N NaOH โดยเตรียมเพียง 100 มิลลิลิตร

2.1.3 สารละลาย **Lowry solution B** คือ

- $CuSO_4.5H_2O$ เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์
- Sodium potassium tartrate เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์
- น้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

<u>หมายเหตุ</u>

1. สารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ และ Sodium potassium tartrate เตรียมแยกกัน โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า ของที่กำหนด ดังนั้นจึงเท่ากับ 1% และ 2% ตามลำดับ

2. ผสมสารละลายทั้งสองก่อนใช้ โดยใช้ปริมาตรเท่ากัน เมื่อคำนวณความเข้มข้นจะมีความเข้มข้นของสารละลายทั้งสองเท่ากับ 0.5% และ 1% ตามลำดับ

2.1.4 สารละลาย Folin-Ciocalteu's Phenol reagent เตรียมโดยนำ Folin-Ciocalteu's Phenol reagent มาผสมในอัตราส่วน 1:1 ก่อนใช้เท่านั้น

2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.1 ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้ Albumin Bovine, F-V ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 20 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.2 ใส่สารละลายโปรตีนมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ

2.2.3 เตรียมสารละลาย **Lowry mixers A:B** ในอัตราส่วน **50:1** มิลลิลิตร

2.2.4 เติมสารละลายผสม **Lowry (A+B)** ในข้อ 2.2.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ ผสมให้เข้ากันด้วย vortex

2.2.5 บ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 องซาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.2.6 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 's Phenol reagent ที่เจือจางในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดทดสอบผสมให้เข้ากันด้วย vortex

2.2.7 บ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 องซาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.2.8 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความขาวคลื่น 770 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐาน ระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน

2.2.9 สำหรับตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน สามารถวิเคราะห์ โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2 - 2.2.8 ถ้าตัวอย่างมีโปรตีนในระดับสูง ต้องเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้ และหาปริมาณโปรตีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ง.

การคำนวณ ยูนิต (Unit) ของเอนไซม์

1 ยูนิตของเอนไซม์ไซลาเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ไซลาเนส ที่ทำให้เกิดน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทำการตรวจสอบ

แปลงหน่วยความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไปเป็นปริมาณไซโลส (ไมโครโมล) โดยใช้ความเข้มข้นที่เทียบได้จากกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่าง 11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นของผลผลิตน้ำตาลไซโลส ในเอนไซม์ผสมที่ทำการตรวจสอบปฏิกิริยา (enzyme reaction mixture) เท่ากับ 2.2 มิลลิลิตร (2200 ไมโครลิตร) คำนวณหาน้ำหนักไซโลสหน่วยเป็น ไมโครโมล โดย

- เริ่มจากคำนวณหาว่าความเข้มข้น 11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีความเข้มข้นเท่าไรในปริมาตรทั้งหมด 2.2 มิลลิลิตร

ในสารละลายเอนไซม์ผสมที่ทำการตรวจสอบปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร มีน้ำตาลเข้มข้น 11 ไมโครกรัม

ถ้าในสารละลายเอนไซม์ผสมที่ทำการตรวจสอบปฏิกิริยา 2.2 มิลลิลิตร จะมีน้ำตาลเข้มข้นเท่ากับ (11 x 2.2)/ 1 = 24.2 ไมโครกรัม

ถ้ากำหนดให้มวลโมเลกุลของไซโลสเท่ากับ 150 กรัมต่อโมล

ดังนั้น คำนวณหาน้ำหนักมวล = มวล (กรัม) /มวลโมเลกุล

แทนค่า = 24.2/150 = 0.16 ไมโครโมล/180 นที (ในกรณีเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยานาน 3 ชั่วโมง)

ถ้าเวลา 1 นาที จะมีปริมาณน้ำตาลไซโลส = 8.88×10^{-4} ไมโครโมลต่อนาที

เปลี่ยนให้เป็นหน่วย ยูนิตต่อมิลลิลิตรของเอนไซม์

แต่ 8.88×10^{-4} ไมโครโมลต่อนาที มาจากเอนไซม์ 200 ไมโครลิตร ดังนั้น ต้องเปลี่ยนหน่วยเป็น ยูนิตต่อมิลลิลิตร คำนวณโดย

สารละลายเอนไซม์ 200 มิลลิลิตร มีหน่วย = 8.88×10^{-4} ไมโครโมลต่อนาที

ถ้าสารละลายเอนไซม์ 1000 ไมโครลิตร มีหน่วย = $(8.88 \times 10^{-4} \times 1000) / 200$

= 4.44×10^{-3} ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Specific activity คำนวณโดย

Specific activity = ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (U /mg protein)

(ยูนิตต่อมิลลิลิตร, u /ml)/(โปรตีน มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, mg/ml) = ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

แทนค่า $(4.44 \times 10^{-3})/4.3$ = ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

$= 1.03 \times 10^{-3}$ ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

= 1.03 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (mU/mg protein)

รายงานผลในหน่วย *มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (mU/mg protein)

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ-สกุล: นายโสภณ บุญลือ

Mr.Sophon Boonlue

2. เพศ: ชาย **วันเดือนปีเกิด:** 5 มิถุนายน 2512

3. ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์

4. ที่ทำงาน: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
อ.วารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี รหัสไปรษณีย์ 34190
โทรศัพท์ และโทรสาร: 045-288380
E-mail address: bsophon@sci.ubu.ac.th

5. ที่อยู่ปัจจุบัน: 273/79 หมู่ 23 หมู่บ้านบุศรินทร์ ซอย 6 ถนน มลิวัลย์ ตำบลบ้านเป็ด
อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น รหัสไปรษณีย์ 40000
โทรศัพท์: 043-235845

6. ประวัติการศึกษา:

	ชื่อย่อปริญญา	วิชาเอกสาขา	ชื่อสถาบันการศึกษา (ประเทศ)	ปีที่สำเร็จการศึกษา
6.1 ปริญญาตรี	วท.บ.	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประเทศไทย	2535
6.2 ปริญญาโท	วท.ม.	จุลชีววทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย	2540
6.3 ปริญญาเอก	Ph.D.	Applied Biosciences	Hiroshima Prefectural University Japan	2004

7. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ: จุลชีววิทยาทางการเกษตร เอนไซม์เทคโนโลยี พันธุศาสตร์ของเชื้อรา

8. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในระดับชาติและนานาชาติ:

8.1 Boonlue, S., Suwanarit, P., Kumpee, T., Suwanarit, A., and Hoefner, W. (1997) "Influence of duration and temperature on spore germination of VA mycorrhizal fungi stored in dry soil", *Proceeding of workshop on VA mycorrhiza and its application in agriculture and environment*, 17-19 February, 1977. Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University.

8.2 Boonlue, S., Aimi, T. and Morinaga, T. (2003) "Molecular characterization of a xylanase-producing thermophilic fungus isolated from Japanese soil", *Current Microbiology* 47,119-124.

8.3 Boonlue, S., Aimi, T., Kitamoto, Y., and Morinaga, T. (2003) "Nucleotide sequence of xylanase

encoding gene in G/11 family from *Scytalidium thermophilum*", DNA Sequence (Sumitted)

8.4 Boonlue, S., Aimi, T. and Morinaga, T. (2004) "Purification and characterization of xylanase from *Scytalidium thermophilum"*, *Process Biochemistry*, (Submitted)

8.5 Boonlue, S. (1997) "Viability in soils, infection ability in corn and groundnut and effects on growth of corn of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi" *Thesis in Master of Science*, Kasetsart university, Bangkok, Thailand.

8.6 Boonlue, S. and Pukahuta, C. (1999) "Species of VA mycorrhizal fungi in saline soil area of Ubonratchathani province" *Report of research submitted to NRCT*, Bangkok, Thailand.

9. ประสบการณ์ทำงานวิจัย

1999 Training course in JSPA-NRCT Core University Program on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications in Thailand and Japan, September 20th- October 31st

2000 Training course in JSPA-NRCT Core University Program on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications in Thailand and Japan, April 16th- August 26th

2001-2004 Ph.D. program in Applied Biosciences (research). Hiroshima Prefectural University. Thesis title: Isolation and Enzyme Characterization of Xylanase-Producing Thermophilic Fungi.

10. ภาระงานในปัจจุบัน

10.1 งานประจำ: ประธานกรรมการบริหารหลักสูตรจุลชีววิทยา และสมาชิกภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ที่มีภาระหน้าที่หลักในการสอนวิชา จุลชีววิทยาทางการเกษตร ชีววิทยาของเห็ด วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของเห็ด จุลชีววิทยาเบื้องต้น การวิคราะห์โดยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ วิทยาศาสตร์ในชีวิตประจำวัน

10.2 งานวิจัยที่กำลังทำ: โครงการวิจัยเรื่อง การแยกและคัดเลือกเชื้อราชอบร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ทุนสนับสนุนการวิจัย เงินรายได้มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2547 (1 ต.ค.-30 ก.ย.) ***โดยทำหน้าที่เป็นหัวหน้าโครงการ***