บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดเลือกวิธีการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

4.1.1 ผลการปรับสภาพ แกลบ ฟางข้าว และรำข้าว

การประเมินวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมต่อวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรใดๆ จะดูจากปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยหลังการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดส (เซลโลไบเอส) การทดลองเริ่มต้นทำโดยการสุ่มใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดสที่ 30 และ 60 หน่วยต่อกรัมวัสดุ ตามลำดับ พบว่า แกลบ และ รำข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วย NaOH ที่อุณหภูมิห้อง ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงกว่าเมื่อปรับสภาพด้วย H_2SO_4 หรือการอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (autoclave) ในขณะที่ ฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วย NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จะให้ผลที่ดีที่สุด (ดังตารางที่ 4)

โดยแกลบจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 61 มก.ต่อกรัมของแกลบ เมื่อกระทำด้วย 1 % NaOH ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 120 นาที แต่เมื่อพิจารณาที่เวลา 30 นาที ซึ่งสามารถให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถึง 47.5 มก.ต่อกรัมของแกลบ โดยใช้เวลาน้อยกว่าถึง 4 เท่า จึงเลือกสภาวะนี้ในการปรับสภาพแกลบแทน

รำข้าวให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดถึง 430 มก. ต่อกรัมของรำข้าว เมื่อผ่านการปรับสภาพด้วย 1 % NaOH ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาเพียง 10 นาที ในขณะที่ฟางข้าวให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากถึง 743 มก.ต่อกรัมของฟางข้าว เมื่อผ่านการปรับสภาพด้วย 1 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ หลังการปรับสภาพด้วยวิธีการต่างๆ แล้วย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและ เบตา-กลูโคสิเดส ที่ความเข้มข้น 80 และ 60 หน่วยต่อกรัมวัสดุในระบบ 1 กรัมวัสดุใน 50 มล.ของ อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 40 °ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิดวัสดุการเกษตร	วิธีการปรับสภาพ	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก.ต่อกรัมวัสดุ) ที่ปลดปล่อยจากชานอ้อยปรับสภาพ ที่เวลาต่างๆ หลังการย่อยด้วยเอนไซม์				
		10 นาที	15 นาที	30 นาที	60 นาที	120 นาที
แกลบ	5% H_2SO_4	26	43.5	33	29.5	24
	1% NaOH	17.5	22	47.5	52	61
	autoclave	ND	17.5	36	47	ND
	autoclave+1%NaOH	ND	30.5	23	42.5	ND
ฟางข้าว	5% H_2SO_4	110	113	121	120	121
	1% NaOH	295.5	351.5	407	530	622
	autoclave	ND	89	139	143.5	ND
	autoclave+1%NaOH	ND	743	635.5	596.5	ND
รำข้าว	5% H_2SO_4	204	228	249	246.5	270.5
	1% NaOH	430	370	361	410	401.5
	autoclave	ND	222.5	219	238.5	ND
	autoclave+1%NaOH	ND	65.5	219.5	151.5	ND

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

เพิ่มการทดลองโดยใช้วัสดุทางการเกษตรอีกตัวหนึ่ง คือ ชานอ้อยโดยทำการปรับสภาพด้วยวิธีการทั้งทางกลร่วมกับวิธีทางเคมี เช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์ โดยการทดลองขั้นต้นใช้เซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดส ที่ความเข้มข้น 656 และ 16 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย เพื่อให้มีการย่อยอย่างสมบูรณ์ พบว่า วิธีการปรับสภาพโดยการอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (autoclave) หรือ การกระทำด้วย H_2SO_4 ได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกมาต่ำกว่าการกระทำด้วย NaOH มาก ตลอดจนให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นสุทธิ ต่ำกว่าก่อนการปรับสภาพ (ตารางที่ 5 และ 6) จากตารางทั้งสองแสดงให้เห็นว่าการใช้ 1 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะให้น้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด การใช้เวลานานขึ้นหรือการเพิ่มปริมาณ NaOH ไม่มีผลต่อการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์มากนัก แม้ว่าที่ 4 % NaOH ร่วมกับการ autoclave 15 นาที จะให้ผลมากกว่า แต่ด้วยเหตุผลในเชิงเศรษฐกิจจึงเลือกการปรับสภาพด้วย 1 % NaOHร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที โดยวิธีนี้สามารถให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อย 1134 มก.ต่อกรัมชานอ้อย หรือคิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นสุทธิ 959 มก.ต่อกรัมชานอ้อย

จากผลการทดลองเมื่อย่อยชานอ้อยปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์ทั้งสอง ในความเข้มข้นสูง จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า เมื่อย่อยฟางข้าว แกลบ และรำข้าวด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่ำ จึงทำการทดลองย่อยวัสดุทั้งสี่ชนิดที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดสที่ความเข้มข้น 656 และ 16 หน่วยต่อกรัมวัสดุในระบบ 1 กรัมของวัสดุนั้นๆ ใน 50 มล.ของอะซีเตทบัฟเฟอร์ (2 %) ความเป็นกรด-ด่าง 4.8 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ในจำนวนวัสดุทั้งสี่ชนิด ชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 1 % NaOH ร่วมกับอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 1040 มก. ต่อกรัมชานอ้อย ส่วนฟางข้าว ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีและสภาวะเดียวกัน ให้น้ำตาลรีดิวซ์ 897.5 มก.ต่อกรัม ในขณะที่รำข้าวซึ่งปรับสภาพด้วย 1 % NaOH ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 372.5 มก.ต่อกรัมรำข้าว ส่วนแกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วย วิธีเดียวกับรำข้าว เป็นเวลา 30 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพียง 30.5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยโดยวิธีการต่างๆ ที่ใช้ปรับสภาพชานอ้อยเพื่อการย่อยต่อด้วยเซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดส ปริมาณ 656 และ 16 หน่วยต่อกรัม ตามลำดับ

วิธีการปรับสภาพชานอ้อย	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(มก./ก.วัสดุ)ที่ปลดปล่อยจากชานอ้อยปรับสภาพที่เวลาต่างๆหลังการย่อยด้วยเอนไซม์				
	10 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที
1% H_2SO_4 RT.	164	176	172.5	160.5	159
2% H_2SO_4 RT.	163	149	142.5	145.5	156
3% H_2SO_4 RT.	157	175	178.5	169.5	157
4% H_2SO_4 RT.	163.5	163.5	165	180	176
5% H_2SO_4 RT.	164	171	182	195	190.5
1% NaOH RT.	208.5	275	325.5	396	388.5
4% NaOH RT.	621	780	846	858	879
6% NaOH RT.	621	714	717	723	753
8% NaOH RT.	777	822	912	909	1194
10% NaOH RT.	804	831	906	798	888
4% NaOH 100°C	825	816	1041	1050	1086
	ระยะเวลาที่ใช้ในการ autoclave				
	15 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที
Autoclave *	34.5	38.5	37	ND	ND
1%NaOH+Autoclave	1134	1038	1032	ND	ND
2%NaOH+Autoclave	1008	1056	1092	ND	ND
4%NaOH+Autoclave	1092	1005	1284	ND	ND
6%NaOH+Autoclave	1062	777	1062	ND	ND
8%NaOH+Autoclave	1056	1002	1038	ND	ND

หมายเหตุ ค่าเหล่านี้เป็นค่าที่ได้โดยหักน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดที่เวลาศูนย์ของการเติมเอนไซม์แล้ว
ชานอ้อยที่ไม่ผ่านการปรับสภาพหลังย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมีน้ำตาลรีดิวซ์ 175 มก./ก.วัสดุ
* Autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ. เวลา 15 30 60 นาที
ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นที่เวลาต่างๆ ของชานอ้อยที่ปรับสภาพด้วยวิธีการต่างๆ เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดสที่ความเข้มข้น 656 และ 16 หน่วยต่อกรัมวัสดุ ตามลำดับ

วิธีการปรับสภาพชานอ้อย	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(มก./ก.วัสดุ)ที่ปลดปล่อยจากชานอ้อยปรับสภาพที่เวลาต่างๆหลังการย่อยด้วยเอนไซม์				
	10 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที
1% H_2SO_4 RT.	0	0	0	0	0
2% H_2SO_4 RT.	0	0	0	0	0
3% H_2SO_4 RT.	0	0	3.5	0	0
4% H_2SO_4 RT.	0	0	0	5	0
5% H_2SO_4 RT.	0	0	7	20	15.5
1% NaOH RT.	33.5	100	150.5	221	210
4% NaOH RT.	446	605	671	683	704
6% NaOH RT.	446	639	542	548	577.5
8% NaOH RT.	602	647	737	734	1019
10% NaOH RT.	629	656	731	622.5	723
1N NAOH 100°C	650	641	866	875	911
	ระยะเวลาที่ใช้ในการ autoclave				
	15 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที
Autoclave *	0	0	0	ND	ND
1%NaOH+Autoclave	959	863	857	ND	ND
2%NaOH+Autoclave	833	881	917	ND	ND
4%NaOH+Autoclave	917	830	1109	ND	ND
6%NaOH+Autoclave	887	602	887	ND	ND
8%NaOH+Autoclave	881	827	863	ND	ND

หมายเหตุ * Autoclave ที่ความดัน 15 lb/in^2 อุณหภูมิ 121°C 15 30 60 นาที ค่าเหล่านี้เป็นค่าที่ได้หักน้ำตาลรีดิวซ์ของชานอ้อยที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ 175 มก.ต่อกรัมชานอ้อยออกแล้ว

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

มก.ต่อกรัมแกลบ ดังแสดงในตารางที่ 7

4.1.2 <u>การย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ 70 และ 10 หน่วยของเซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดส ตามลำดับ</u>

จากการทดลองของ Mishra and et al.,(1984); ปราณี สถิรพิพัฒน์กุล, (2531)และ Fox and et al.,(1989) พบว่าการย่อยวัสดุทางการเกษตรไม่จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งสองสูงมากขนาดนี้ ดังนั้น จึงลดความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดส ในการย่อยวัสดุทั้งสี่ลงเป็น 70 และ 10 หน่วยต่อกรัมวัสดุ ตามลำดับ แล้วทำการทดลองเช่นเดิม พบว่า ที่ความเข้มข้นนี้ยังคงย่อยฟางข้าว ชานอ้อย แกลบ และรำข้าว ได้ผลเช่นเดิม โดยฟางข้าวและชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 1 % NaOH ร่วมกับอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 843 มก.ต่อกรัม และ 727.5 มก.ต่อกรัม ตามลำดับ ในขณะที่แกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 1 % NaOH อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ 23.5 มก.ต่อกรัม และรำข้าวซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วย 1 % NaOH อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ให้น้ำตาลรีดิวซ์ 455 มก.ต่อกรัม (ตารางที่ 8)

4.2 <u>ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และ เอนไซม์เบตา-กลูโคสิเดส</u>

4.2.1 <u>ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม</u>

เนื่องจากความเป็นกรดด่างมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และเบตา-กลูโคสิเดสในการย่อยวัสดุทางการเกษตร ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองโดยใช้บัฟเฟอร์ต่างๆ ที่ครอบคลุมความเป็นกรดด่าง ตั้งแต่ 4.0-9.0 และใช้สภาวะการทดลอง ตามข้อ 3.13.1 โดยใช้ชานอ้อยเป็นตัวแทนของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้จากรูปที่ 5 พบว่าที่ pH 4.8 เอนไซม์ทั้งสองทำงานได้ดีที่สุด โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ปลดปล่อยสูงสุด 0.83 มก.ต่อกรัมชานอ้อย ซึ่งสอดคล้องกับเอกสารประกอบการใช้เอนไซม์

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดสที่ความเข้มข้น 656 และ 16 หน่วยต่อกรัมวัสดุ ตามลำดับ ในระบบ 1 กรัมวัสดุ ในอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 บ่มเป็นเวลา 24 ชม. 40 °ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

วัสดุ	วิธีการปรับสภาพ	น้ำตาลรีดิวซ์(มก./ก.) ที่ปลดปล่อยจากชานอ้อยปรับสภาพที่เวลาต่างๆ หลังการย่อยด้วยเอนไซม์						วัสดุที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ
		10 นาที	15 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	
ฟางข้าว	1% NaOH+ autoclave	ND	897.5	852.5	828	ND	ND	157
ชานอ้อย	1% NaOH+ autoclave	ND	1040.5	878.5	836	ND	ND	87
แกลบ	1% NaOH	21	19	30.5	33	ND	46.5	29
รำข้าว	1% NaOH	372.5	ND	282	278.5	354	226	190.5

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

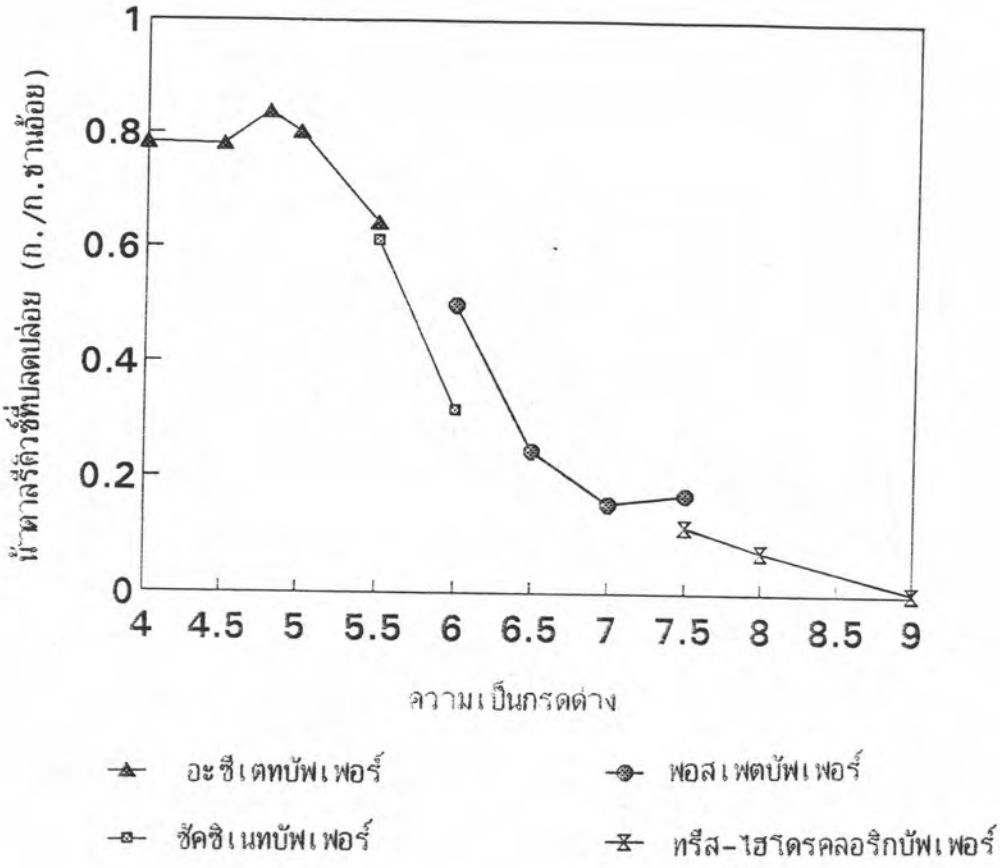
ค่าที่แสดง เป็นค่าที่หักน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาศูนย์ออกแล้ว

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดสที่ความเข้มข้น 70 และ 10 หน่วยต่อกรัมวัสดุ ตามลำดับ ในระบบ 1 กรัมวัสดุ ในอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 บ่มเป็นเวลา 24 ชม. 40 °ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

วัสดุ	วิธีการปรับสภาพ	น้ำตาลรีดิวซ์ (มก./ก.) ที่ปลดปล่อยจากชานอ้อยปรับสภาพที่เวลาต่างๆ หลังการย่อยด้วยเอนไซม์						วัสดุที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ
		10 นาที	15 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	
ฟางข้าว	1% NaOH+ autoclave	ND	843	743	555.5	ND	ND	102.5
ชานอ้อย	1% NaOH+ autoclave	ND	727.5	631.5	442.5	ND	ND	79.5
แกลบ	1% NaOH	13.5	15	23.5	19	ND	20	24.5
รำข้าว	1% NaOH	455	ND	447	319	313	274	143

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

ค่าที่แสดง เป็นค่าที่หักน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาศูนย์ออกแล้ว



รูปที่ 5 ผลของความเป็นกรดด่าง (pH) ต่อการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเบตา-กลูโคสิเดสใน 2% (w/v) ของสารละลายชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 1 % NaOH ร่วมกับการ autoclave 15 นาทีใน 0.05 M.ของ บัฟเฟอร์ซึ่งแปรผันความเป็นกรดด่างต่างๆ โดยใช้สภาวะในการย่อยคือ ความเข้มข้นของเซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดสที่ 70 และ 10 units ต่อกรัมชานอ้อย ตามลำดับ อุณหภูมิ 40 ^{o}ซ. ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ช.ม.

เซลลูคลาส (ชื่อทางการค้าของเอนไซม์เซลลูเลส) ของบริษัท Novo, Denmark

4.2.2 ชนิดของบัฟเฟอร์

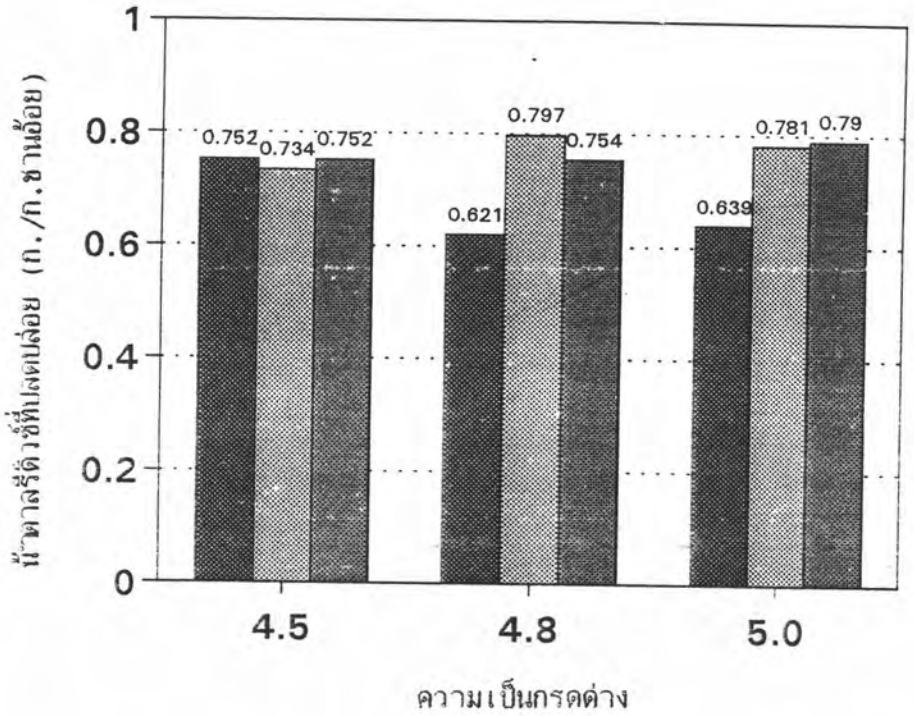
เนื่องจากที่ความเป็นกรดด่าง 4.8 สามารถปรับได้โดยบัฟเฟอร์หลายชนิด ทั้งนี้บัฟเฟอร์ต่างชนิดกันอาจมีผลต่างกันต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสอง ดังนั้นจึงทำการทดลองโดยใช้บัฟเฟอร์ต่างๆ อันได้แก่ ซิเตรท อะซีเตท และซัคซิเนทบัฟเฟอร์มาใช้ในระบบโดยปรับความเป็นกรดด่างครอบคลุม 4.5,4.8 และ 5.0 ใช้สภาวะการทดลองตามข้อ 3.13.2 ผลการทดลองในรูปที่ 6 พบว่าอะซีเตทบัฟเฟอร์ ที่ความเป็นกรดด่าง 4.8 และซัคซิเนท ที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากไฮโดรไลเสทที่ได้นี้จะนำไปใช้เลี้ยง *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากการศึกษาของเอก (2532) พบว่าเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสนี้จะมีความเสถียรต่ออะซีเตทบัฟเฟอร์มากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 สำหรับการทำงานของเซลลูเลสและ เบตา-กลูโคสิเดส

4.2.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอนไซม์เซลลูเลส และเบตา-กลูโคสิเดส โดยการย่อยสารละลายชานอ้อย (2 % น้ำหนัก/ปริมาตร) ใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 ด้วยเซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดส ปริมาณ 70 และ 10 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย แปรผันอุณหภูมิระหว่าง 30° - 60°ซ. พบว่าที่อุณหภูมิ 40°ซ. เอนไซม์ทั้งสองมีการทำงานได้ดีที่สุด โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด เมื่อย่อยชานอ้อย เป็นเวลา 24 ชม. แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 55°ซ. พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะลดต่ำลงมาก ดังแสดงในรูปที่ 7

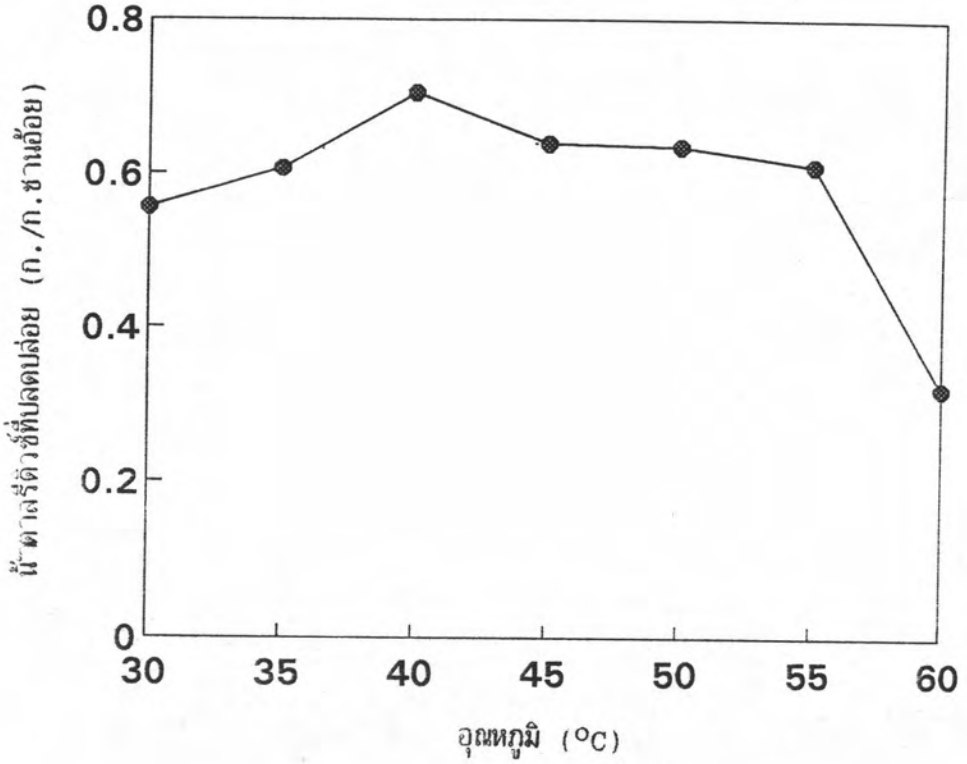
4.2.4 ปริมาณเซลลูเลสต่อการย่อยชานอ้อย

จากการทดลองที่ผ่านมานั้นปริมาณของเอนไซม์ทั้งเซลลูเลสหรือเบตา-กลูโค



รูปที่ 6 ผลของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดส โดยย่อยชานอ้อยในสภาวะเช่นเดียวกับรูปที่ 5 แต่มีการแปรผันชนิดของบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ ดังแสดง

- ซิเตรทบัฟเฟอร์
- อะซีเตทบัฟเฟอร์
- ซัคซิเนทบัฟเฟอร์



รูปที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดส ที่ความเข้มข้น 70 และ 10 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย ตามลำดับใน 2 % (w/v) ของชานอ้อยปรับสภาพใน 0.05 M.อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 โดยใช้สภาวะการย่อยที่อุณหภูมิ 40 °ซ. ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

สิเดส ต่างเป็นค่าที่สุ่มเลือกขึ้นมา ซึ่งอาจไม่ใช่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ดังนั้นศึกษาหาปริมาณของเซลลูเลสที่เหมาะต่อระบบ โดยแปรปริมาณตั้งแต่ 10 - 100 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย (โดยไม่เติมเบตา-กลูโคสิเดส) ทำการย่อยสารละลาย 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของชานอ้อยใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 4.8 ปริมาตรรวม 50 มล. เป็นเวลา 24 ชม. จากผลการทดลองในรูปที่ 8 พบว่าที่ปริมาณ 80 และ 100 หน่วยของเอนไซม์เซลลูเลส ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูง จึงเลือก 2 ระบบนี้ในการศึกษาขั้นต่อไป

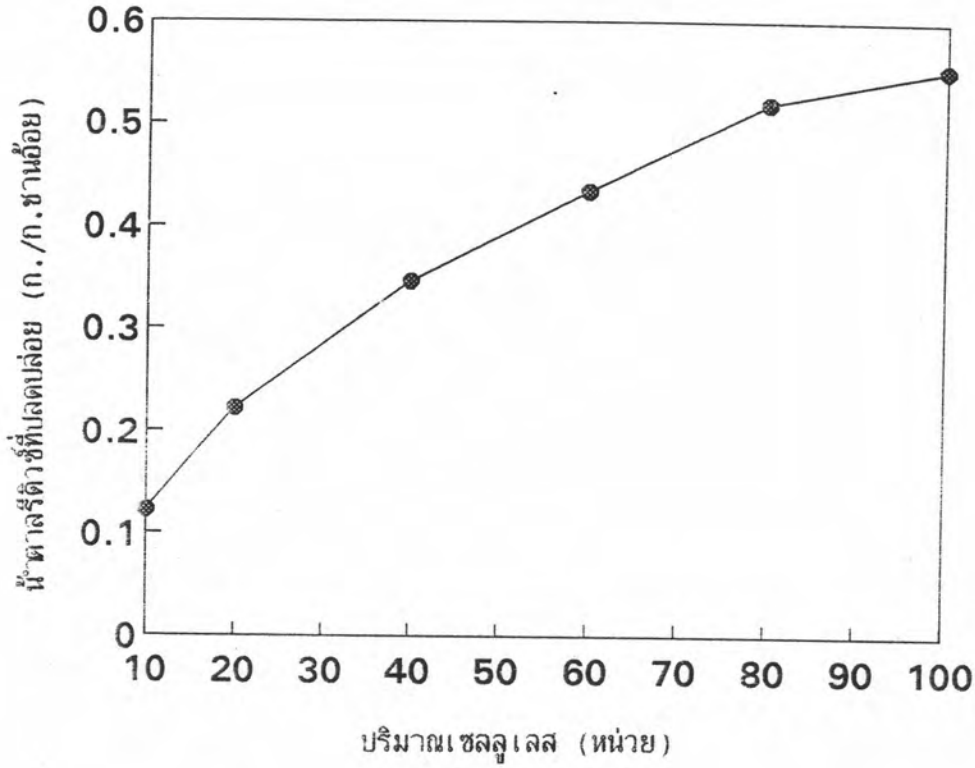
4.2.5 เวลาที่เหมาะสมสำหรับการย่อยชานอ้อยด้วยเซลลูเลส

เปรียบเทียบการใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้น 80 และ 100 หน่วยต่อกรัมของชานอ้อย ในการย่อยสารละลาย 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของชานอ้อยใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 4.8 ปริมาตรรวม 50 มล. ที่อุณหภูมิ 40° ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 0-72 ชั่วโมงตามวิธีการทดลองในข้อ 3.13.5 พบว่าที่เวลาต่างๆ ทั้งสองความเข้มข้นของเซลลูเลสให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วย่อยต่อด้วย 60 หน่วยของเบตา-กลูโคสิเดสอีก 6 ชม. จะทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบเพิ่มมากขึ้น แต่ทั้งสองความเข้มข้นยังคงให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นด้วยเหตุผลทางความประหยัด จึงเลือกความเข้มข้นของเซลลูเลสที่ 80 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย ย่อยเป็นเวลา 24 ชม. ดังแสดงในรูปที่ 9

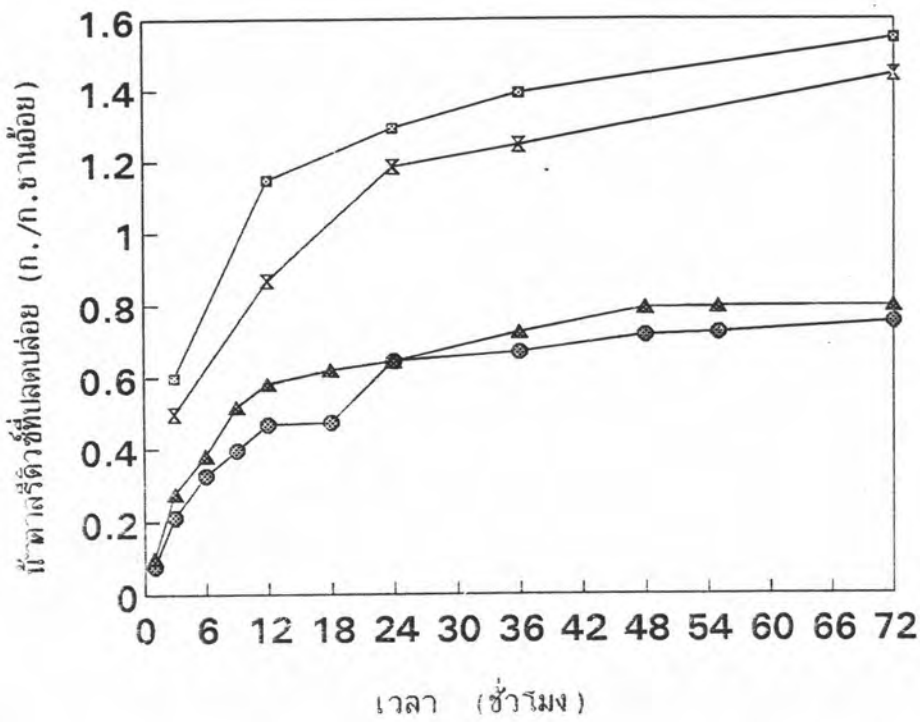
4.2.6 เวลาในการเติมเบตา-กลูโคสิเดส

จากผลการทดลองข้อ 4.2.5 พบว่าเวลาในการเติม เบตา-กลูโคสิเดส โดยเติมพร้อมกับเซลลูเลส หรือการแยกเติมภายหลังอาจมีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยได้ จึงทดลองโดยใช้ระบบ

ก) ย่อยสารละลาย 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของชานอ้อยใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 4.8 ปริมาตรรวม 50 มล. ด้วยเอนไซม์ เซลลูเลส 80 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย ร่วมกับ เบตา-กลูโคสิเดส 60 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย ที่อุณหภูมิ



รูปที่ 8 ผลของความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อการย่อยชานอ้อยใน 2% (w/v)ของสารละลายชานอ้อยปรับสภาพ ใน 0.05 M.อะซีเตทบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 4.8 โดยสภาวะการย่อยคือ ที่อุณหภูมิ 40 °ซ.,ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที,เป็นเวลา 24 ชม.แต่แปรผันความเข้มข้นของเซลลูเลสตั้งแต่ 10-100 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย



รูปที่ 9 ผลเวลาที่เหมาะสมสำหรับการย่อยชานอ้อยด้วยเซลลูเลส เปรียบเทียบระหว่าง 80 และ 100 หน่วยต่อกรัมชานอ้อยในระบบ 2 %(w/v) สารละลายชานอ้อยใน 0.05 M. อะซีเตทบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 4.8 ในสภาวะที่อุณหภูมิ 40 °ซ., ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที, เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มการย่อยด้วย 60 หน่วยของเบตา-กลูโคสิเดสต่ออีก 6 ชั่วโมง ในสภาวะเดิม

40° ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.97 กรัมต่อกรัมชานอ้อย (รูปที่ 10)

ข) ย่อยสารละลาย 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของชานอ้อยด้วยเซลลูเลส 80 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย เป็นเวลา 24 ชม.แล้วหยุดปฏิกิริยาของเซลลูเลส โดยต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นแล้วจึงทำการย่อยต่อด้วย เบตา-กลูโคสิเดสปริมาณ 60 หน่วยต่อกรัมชานอ้อยอีก 6 ชม.ในสภาวะเดียวกัน พบว่าระบบนี้ปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ 0.73 กรัมต่อกรัมชานอ้อย (รูปที่ 10)

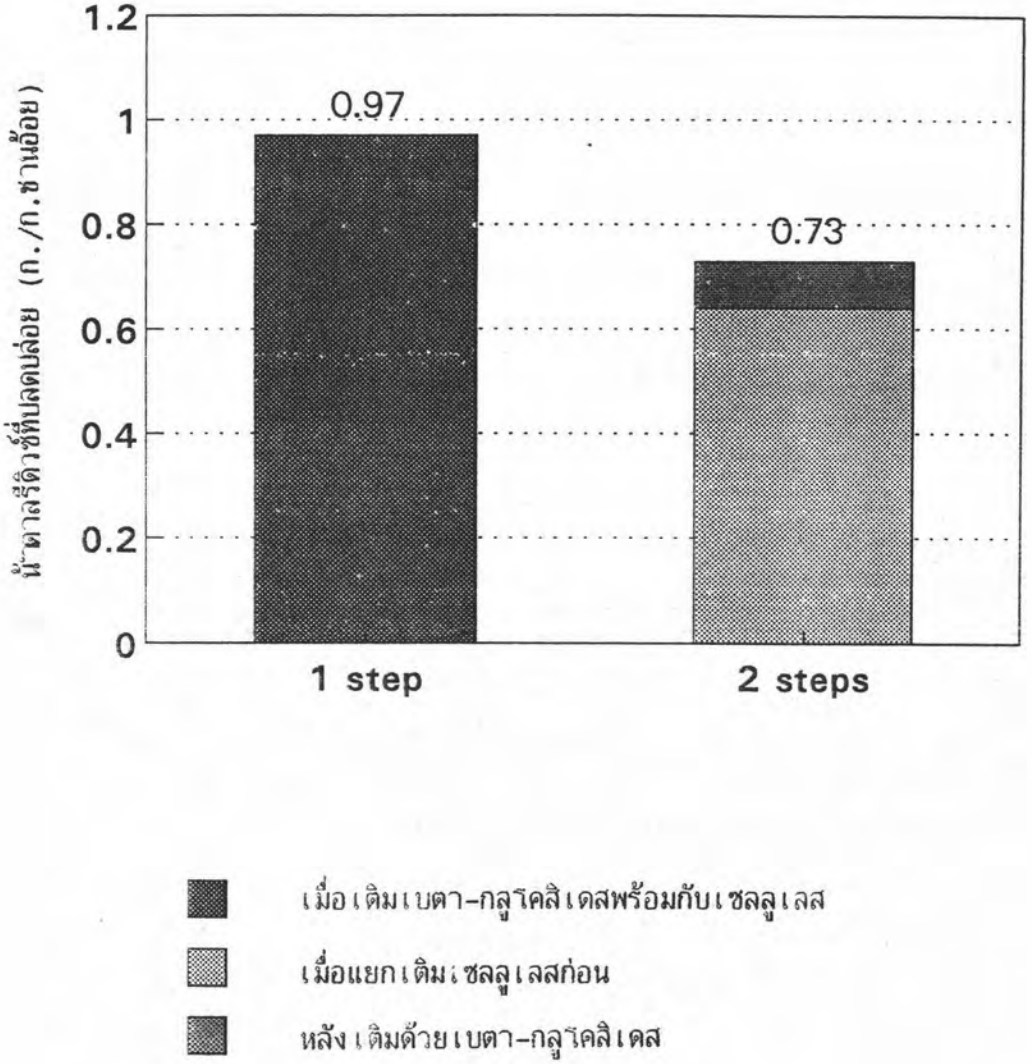
จากผลการทดลองข้อ ก) และ ข้อ ข) จึงเลือกการเติมเบตา-กลูโคสิเดสพร้อมกับการเติมเซลลูเลสสำหรับการย่อยชานอ้อยต่อไป

4.2.7 <u>ปริมาณเบตา-กลูโคสิเดส</u>

เมื่อทดลองแปรผันปริมาณ เบตา-กลูโคสิเดสตั้งแต่ 5 - 240 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย โดยใช้ความเข้มข้นของเซลลูเลส 80 หน่วยต่อกรัมในทุกกรณี ทำการย่อยสารละลาย 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของชานอ้อยใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 พบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์มากขึ้นจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น แต่เมื่อผ่านพ้น 120 หน่วยต่อกรัมชานอ้อยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยเพิ่มขึ้น จะมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ดังแสดงในรูปที่ 11 เพื่อความมั่นใจในการย่อยจึงเลือกปริมาณของเอนไซม์เบตา-กลูโคสิเดสที่ 120 หน่วยสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

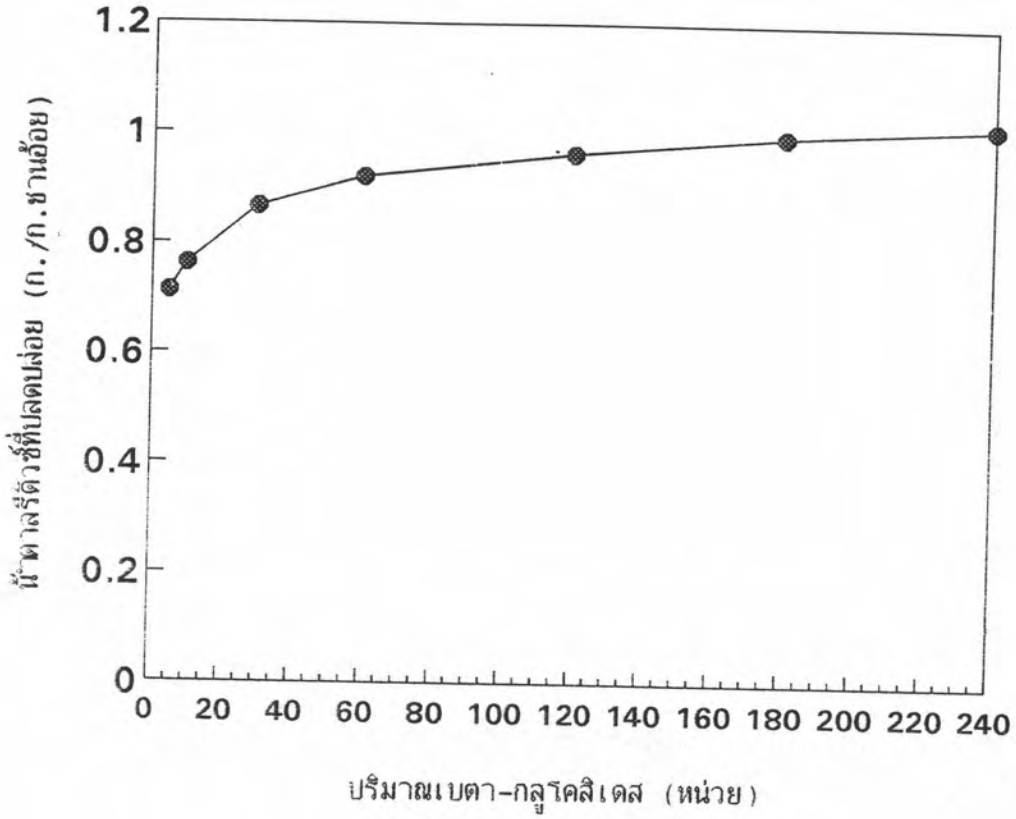
4.2.8 <u>ปริมาณชานอ้อยที่เหมาะสม</u>

จากการทดลองที่ผ่านมาปริมาณชานอ้อยที่ใช้ในระบบเป็น 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) มาโดยตลอด ดังนั้นจึงทำการทดลองเพื่อ หาปริมาณชานอ้อยที่เหมาะสมต่อปริมาณเอนไซม์และสภาวะที่เหมาะสมข้างต้นโดยแปรผันปริมาณของชานอ้อย ตั้งแต่ 1-20 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)ในอะซีเตทบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 4.8 ปริมาตรรวม 50 มล. ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดส ปริมาณ 80 และ 120 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย ที่อุณหภูมิ 40° ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที พบว่า เมื่อปริมาณชานอ้อยสูงขึ้น ปริมาณน้ำตาล



รูปที่ 10 เปรียบเทียบเวลาในการเติมเอนไซม์เบตา-กลูโคสิเดส ระหว่างการเติม 60 หน่วยของเบตา-กลูโคสิเดส พร้อมกับ เติม 80 หน่วยของเซลลูเลส และการเติมเซลลูเลสย่อยชานอ้อยเป็นเวลา 24 ชม. ก่อนแล้วจึงเติมเบตา-กลูโคสิเดส ย่อยต่ออีก 6 ชม. ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.13.6

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



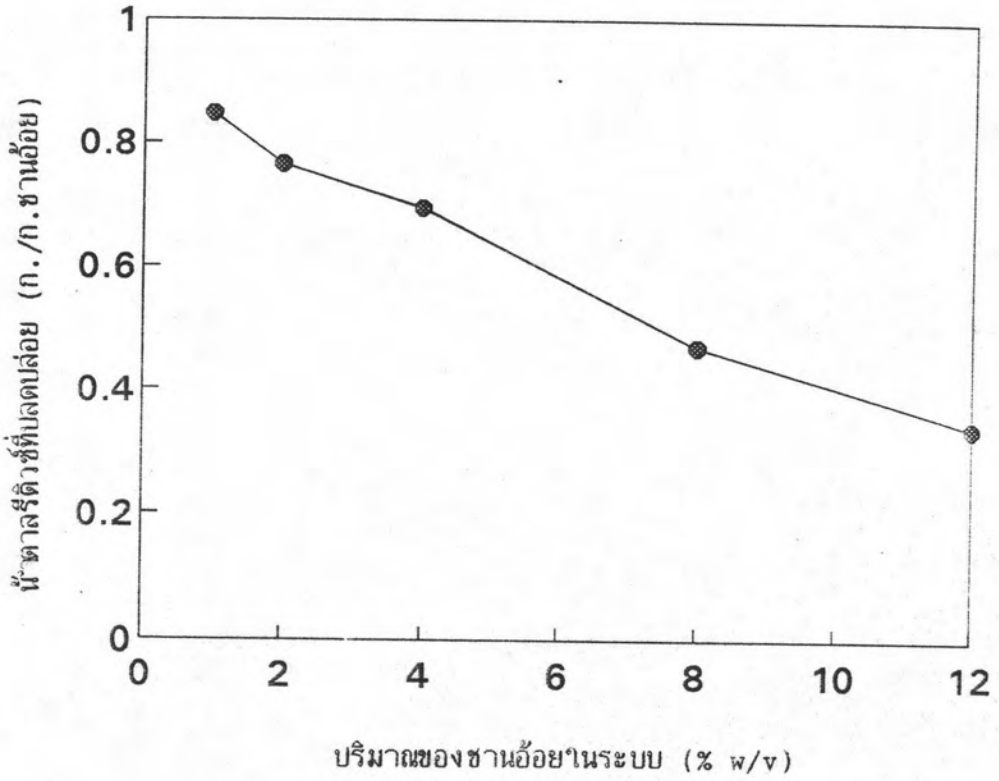
รูปที่ 11 ผลความเข้มข้นของเบตา-กลูโคสิเดสต่อการย่อยชานอ้อย โดยใช้สภาวะการย่อยที่ 2 %(w/v) สารละลายชานอ้อยปรับสภาพใน 0.05 M. อะซีเตทบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 4.8 ความเข้มข้นเซลลูเลส 80 หน่วยต่อกรัม พร้อมกับการเติมเบตา-กลูโคสิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 40 °ซ., ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

รีดิวซ์ต่อกรัมชานอ้อยจะลดลง ดังแสดงในรูปที่ 12 และหากใช้ปริมาณชานอ้อยสูงกว่า 12 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วสารละลายของชานอ้อยที่ได้จะมีลักษณะข้น,หนืด จนไม่สามารถนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ จากตารางที่ 9 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ปลดปล่อยของการทดลองนี้ เลือกใช้ปริมาณชานอ้อยเริ่มต้นที่ 4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ซึ่งให้ปริมาณสัมพัทธ์ของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยเป็น 80 % ของปริมาณสูงสุด (เมื่อใช้ชานอ้อย 1 % น้ำหนัก/ปริมาตร) เพื่อใช้งานต่อไป

จากผลการทดลองในตารางที่ 9 เลือกสภาวะการย่อย 4 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของชานอ้อย ด้วยเซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดส ปริมาณ 80 และ 120 หน่วยต่อระบบรวมระบบรวม 50 มล.ของบัฟเฟอร์ ซึ่งมีชานอ้อยในปริมาณ 2 กรัมอยู่ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ได้แก่ การย่อยสารละลาย 4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)ของวัสดุ ในอะซีเตทบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 4.8 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดสปริมาณ 40 และ 60 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งของวัสดุการเกษตร ตามลำดับ ภายใต้อัตราการเขย่า 200รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4.3 <u>ผลของปริมาณกลูโคสต่อการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61</u>

ทำการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Fukumoto ตาม ภาคผนวก ก ซึ่งมี 1.0 % เดกซ์แทรนเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและสารชักนำการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส แต่แปรผันปริมาณกลูโคสเพิ่มเติม โดยใช้กลูโคสบริสุทธิ์ (บริษัท Merck,U.S.A.) ตั้งแต่ 0 - 1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง(30° -35° ซ.) ภายใต้การเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 วัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.2 พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณกลูโคส 0.1 % ปริมาณการสร้างเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อปริมาณกลูโคสมากกว่านี้การสร้างเอนไซม์กลับลดลง ดังแสดงในรูปที่ 13 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Fukumoto พบว่า ปริมาณโปรตีนในอาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารจะเริ่มลดลง ตั้งแต่เริ่มการเลี้ยงเชื้อ และจะลดลงจนเกือบหมดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นวันที่มีการเจริญสูงสุดจากนั้น

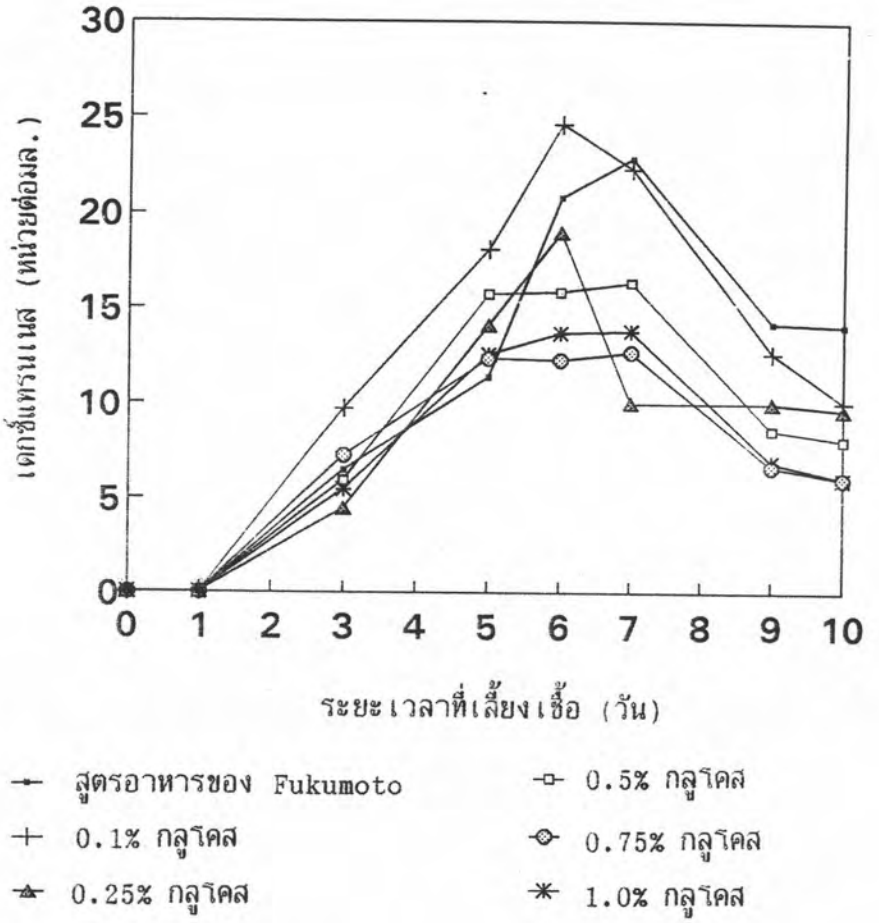


รูปที่ 12 ผลความเข้มข้นของสารละลายซานอ้อยต่อการย่อยซานอ้อย โดยแปรผันปริมาณซานอ้อย ตั้งแต่ 1-20 %(w/v)ในสารละลาย 0.05 M.อะซีเตทบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 4.8 ความเข้มข้นเซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดสที่ 80 และ 120 หน่วยต่อระบบ ในสภาวะที่อุณหภูมิ 40 °ซ. ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

ตารางที่ 9 ปริมาณชานอ้อยที่เหมาะสมต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ แปรผันปริมาณของชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วย 1% NaOH ร่วมกับการ autoclave เป็นเวลา 15 นาที ใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 ปริมาณเซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดส ที่ใช้ได้แก่ 80 และ 120 หน่วยต่อระบบของปริมาตรรวม 50 มล. บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40° ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชม.

ปริมาณของชานอ้อย (% น้ำหนัก/ปริมาตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น (มก./มล.)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นต่อกรัมชานอ้อย (ก./ก.)	ปริมาณสัมพัทธ์ของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อย[@]
1	8.48	0.848	100.0
2	15.30	0.765	90.2
4	27.74	0.694	79.5
8	37.48	0.468	55.2
12	40.60	0.338	39.8

หมายเหตุ @ ปริมาณสัมพัทธ์ จะให้ค่าสูงสุดของน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 100 % (ในที่นี้คือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 1 % ความเข้มข้นของชานอ้อย)



รูปที่ 13 เปรียบเทียบผลของปริมาณกลูโคสที่เติมเพิ่มในอาหารสูตรของ Fukumoto ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย 1.0 % เดกซ์แทรน 0.2 % K_2HPO_4 0.05 % KCl 0.05 % $MgSO_4.7H_2O$ 0.0005% $FeSO_4$ 0.2 % $NaNO_3$ และ 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ โดยแปรผันปริมาณกลูโคสตั้งแต่ 0.1 - 1.0 % ดังแสดงข้างต้น ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 เลี้ยงเชื้อในสภาวะอุณหภูมิห้อง ภายในการเขย่า 200 รอบ/นาที

การเจริญจะเริ่มลดลง อันอาจมีสาเหตุมาจากการสลาย (cell lysis) ของเซลล์ ทั้งนี้ การสร้างเดกซ์แทรนเนสจะสร้างในลักษณะที่ควบคู่ไปกับการเจริญ (Growth associate) โดยจะมีการสร้างสูงสุดในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นลักษณะความเปลี่ยนแปลงในอาหาร ทั้งที่เพิ่ม และ ไม่ได้เพิ่มกลูโคสในอาหาร แต่ในอาหารที่เพิ่มปริมาณกลูโคส 0.1% จะมีการสร้างเอนไซม์สูงสุดเร็วกว่า คือสร้างในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 14 และรูปที่ 15

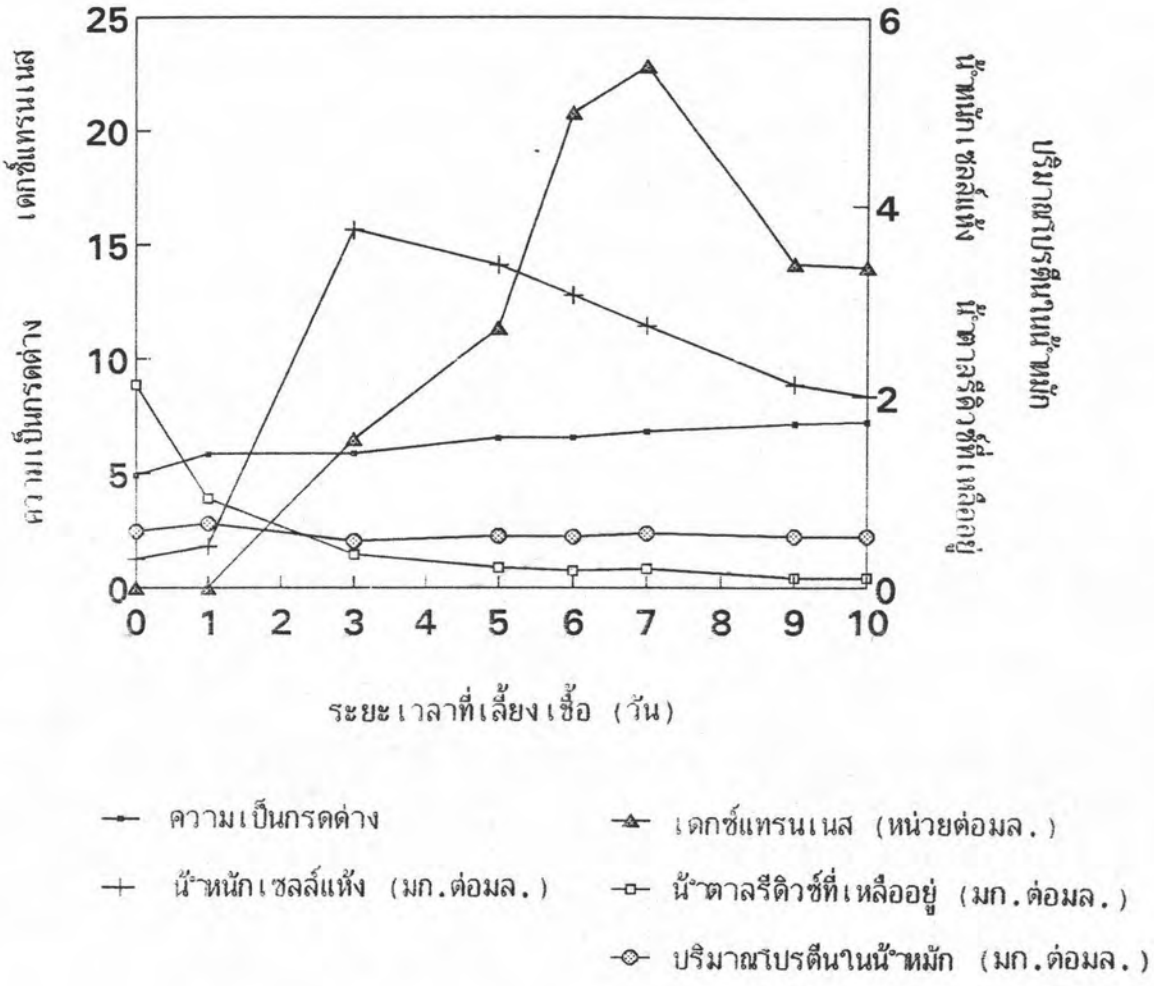
4.4. ผลการใช้ไฮโดรไลเสทของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

4.4.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

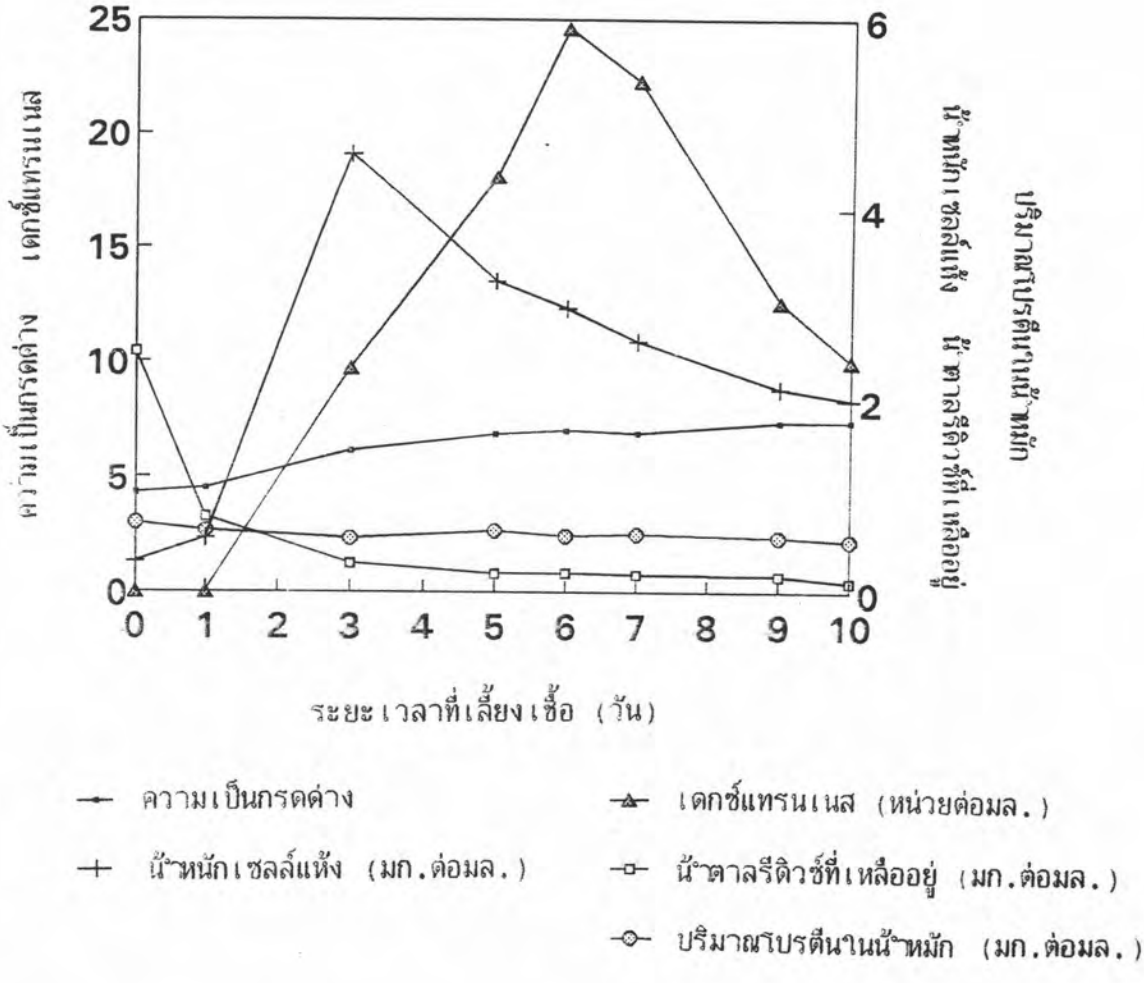
ทดลองใช้ไฮโดรไลเสทของวัสดุการเกษตรที่คัดเลือกมาทั้งหมด ซึ่งได้แก่ ชานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว และ แกลบ ในการเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 โดยใช้ในปริมาณ 0.1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส)ร่วมกับ 0.5 % ของเดกซ์แทรนซึ่งทำหน้าที่เป็นสารชักนำ (inducer) เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสทดแทน 1.0 % เดกซ์แทรนในสูตรอาหารของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก สำหรับสภาวะการเลี้ยงเชื้อจะใช้สปอร์ $5x10^7$ สปอร์ต่อมล. ที่อุณหภูมิห้อง (30 - 35°ซ.) อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.2

พบว่าการใช้ไฮโดรไลเสทของวัสดุการเกษตรทุกชนิด จะให้ปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสหรือเดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะสูงใกล้เคียงกับสภาวะควบคุม (ซึ่งใช้ 0.1 % กลูโคส ร่วมกับ 0.5 % เดกซ์แทรน) แต่ยังคงต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงด้วยสูตรอาหารของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก ซึ่งมี 1.0 % เดกซ์แทรน เป็นทั้งแหล่งคาร์บอน และ สารชักนำ ในขณะที่เมื่อเลี้ยงด้วยไฮโดรไลเสทของแกลบไม่มีแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสเลย ดังผลในรูปที่ 16ก และ 16ข ตามลำดับ

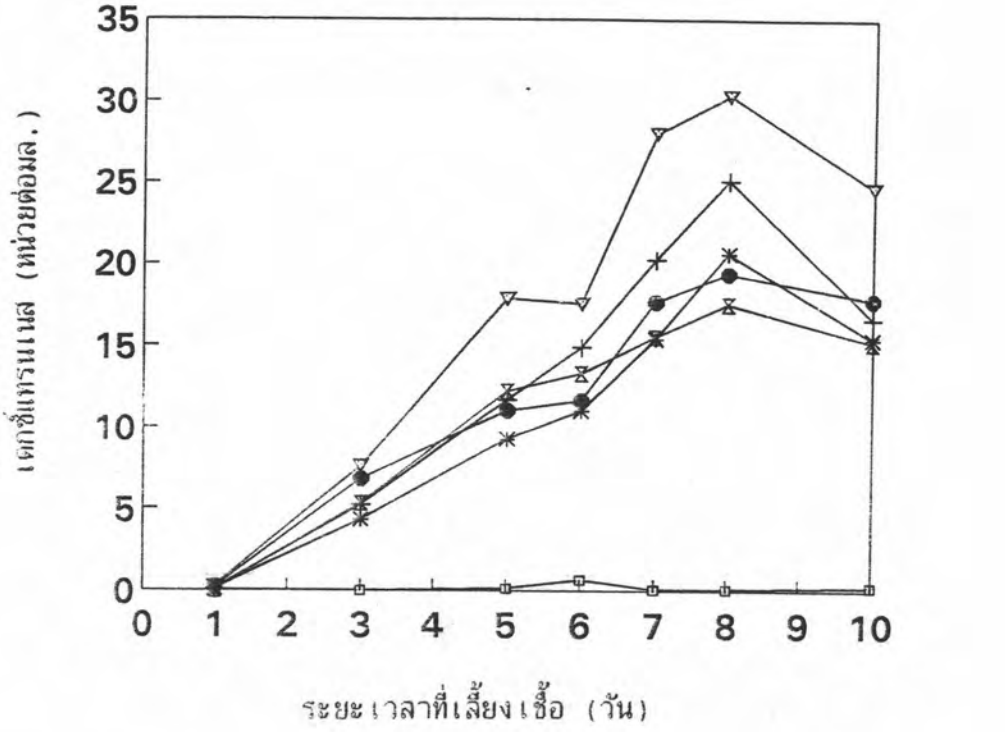
สำหรับการเจริญของรา เมื่อเลี้ยงด้วยไฮโดรไลเสทของวัสดุการเกษตรต่างๆ จะมีการเจริญใกล้เคียงกันกับเมื่อเลี้ยงในสภาวะควบคุม และในสูตรอาหารของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก ยกเว้น ในไฮโดรไลเสทของแกลบที่จะมีการเจริญต่ำสุด ดังแสดง



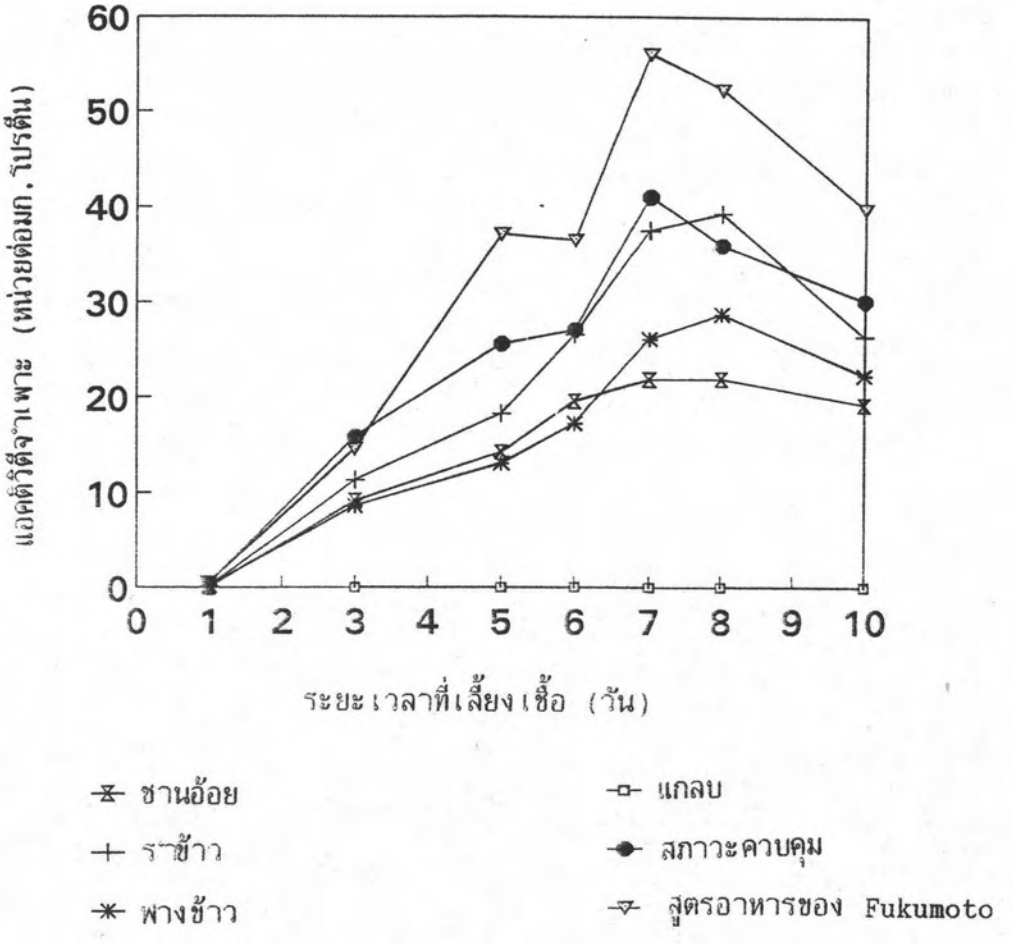
รูปที่ 14 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดด่าง น้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ การเจริญของเชื้อ และการสร้างเอนไซม์ เมื่อเลี้ยง *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Fukumoto ซึ่งประกอบด้วย 1.0 % เดกซ์แทรน 0.2 % K_2HPO_4 0.05 % KCl 0.05 % $MgSO_4.7H_2O$ 0.0005% $FeSO_4$ 0.2 % $NaNO_3$ และ 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 ในสภาวะอุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบ/นาที



รูปที่ 15 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดด่าง น้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ การเจริญของเชื้อ และการสร้างเอนไซม์ เมื่อเลี้ยง *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Fukumoto ซึ่งประกอบด้วย 1.0 % เดกซ์แทรน 0.2 % K_2HPO_4 0.05 % KCl 0.05 % $MgSO_4.7H_2O$ 0.0005% $FeSO_4$ 0.2 % $NaNO_3$ และ 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ โดยเพิ่ม 0.1 % กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 ในสภาวะอุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบ/นาที



รูปที่ 16ก ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย 0.2 % K_2HPO_4 0.05 % KCl 0.05 % $MgSO_4$ 0.0005 % $FeSO_4$ 0.2 % $NaNO_3$ 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ และมี 0.5 % เดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ และ 0.1 % ไฮโดรไลเสทของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารสูตร Fukumoto ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบ/นาที



รูปที่ 16ข ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับรูปที่ 16ก

ในรูปที่ 16 ค

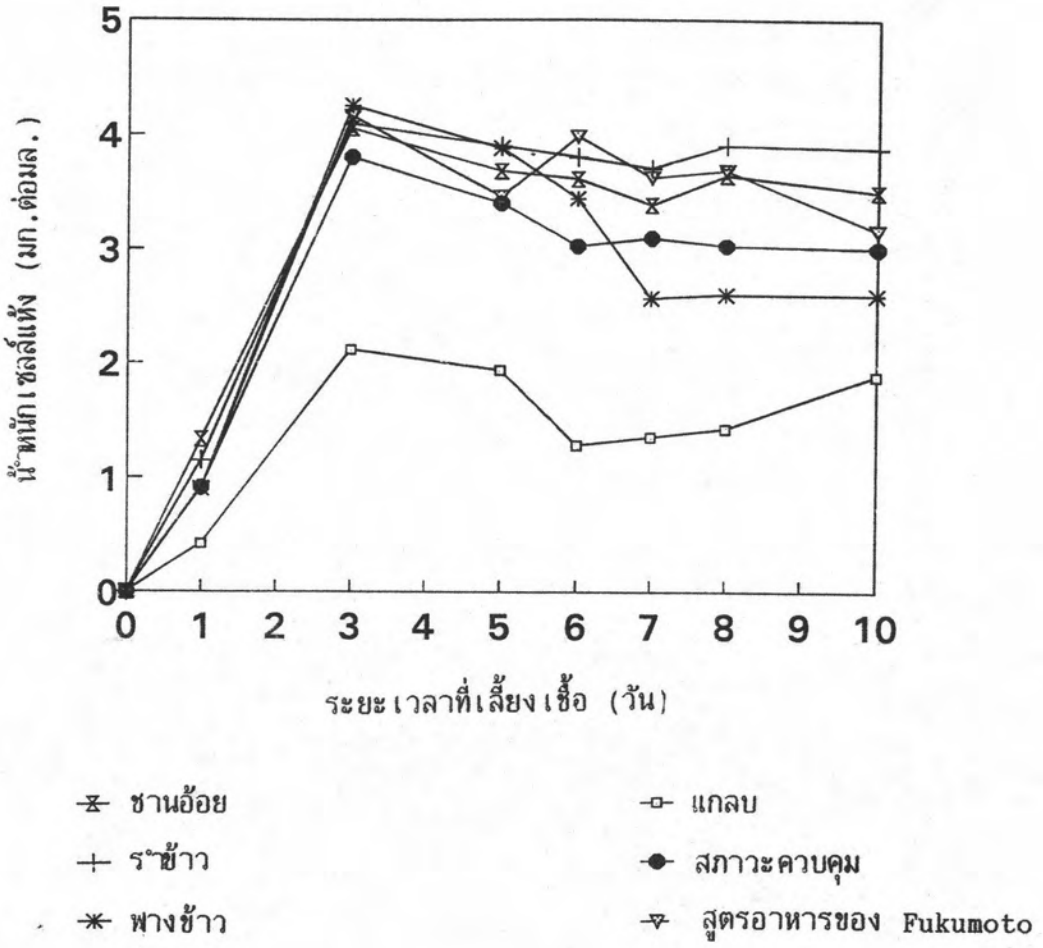
เนื่องจากงานวิจัยนี้เล็งผลทางด้านการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อราสำหรับผลิตเดกซ์แทรนเนส เพื่อการแก้ปัญหา ในอุตสาหกรรมน้ำตาล ณ จุดนี้ จึงเลือกชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในงานวิจัยนี้ โดยในการทดลองขั้นต้น พบว่า ไฮโดรไลเสทของชานอ้อยให้ปริมาณเดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีไม่แตกต่าง จากการใช้ไฮโดรไลเสทของรำข้าว หรือ ฟางข้าวมากนัก ทั้งนี้เพื่อเป็นการแก้ปัญหาแบบครบวงจรภายในโรงงานน้ำตาลทราย ซึ่งมีชานอ้อยเหลือทิ้งจากกระบวนการหีบอ้อยถึง 5 ตัน ต่ออ้อย 100 ตัน (Paturua,1989)

4.4.2. <u>เวลาในการเติมสารชักนำการสร้างเอนไซม์</u>

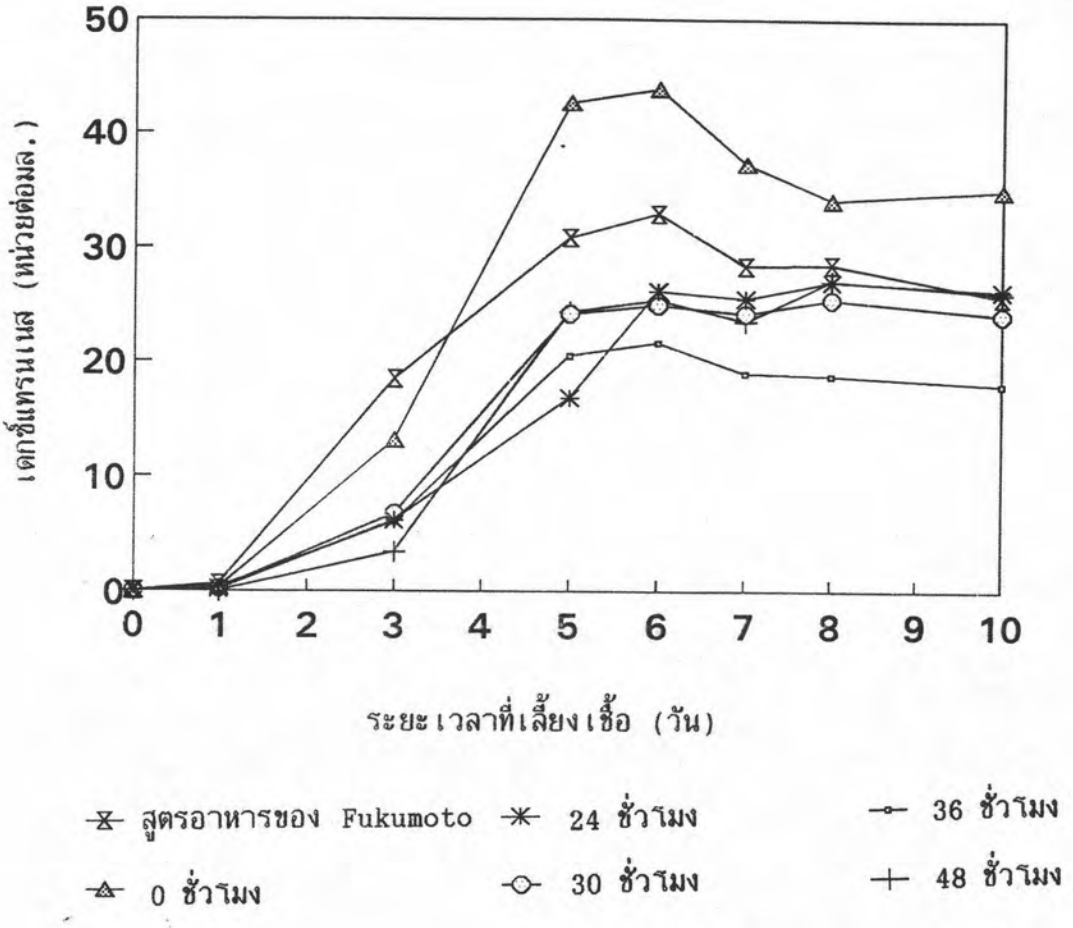
ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก โดยมี 0.1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เมื่อคิดเป็นปริมาณกลูโคส ของไฮโดรไลเสทชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน และมี 1.0 % ของเดกซ์แทรนเป็นสารชักนำ แต่แปรผันระยะเวลาการเติมเดกซ์แทรน ตั้งแต่ 0 - 48 ชม.ของการเลี้ยงเชื้อ พบว่า ที่เวลาต่างๆ ในการเติมเดกซ์แทรน เชื้อรามีการเจริญใกล้เคียงกัน (ดังรูปที่ 17 ค) แต่ที่เวลาในการเติมเดกซ์แทรน พร้อมกับเริ่มการเลี้ยงเชื้อจะให้แอคติวิติเอนไซม์ และแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในรูปที่ 17 ก และ 17 ข ในขณะที่การเติม 1.0 % เดกซ์แทรนในวันที่ 3 (หรือที่ชั่วโมงที่ 72) ของการเลี้ยงเชื้อ จะตรวจไม่พบการสร้างเอนไซม์เลย (ไม่ได้แสดงในรูป)

4.4.3 <u>ปริมาณของแหล่งคาร์บอนและปริมาณสารชักนำการสร้างเอนไซม์</u>

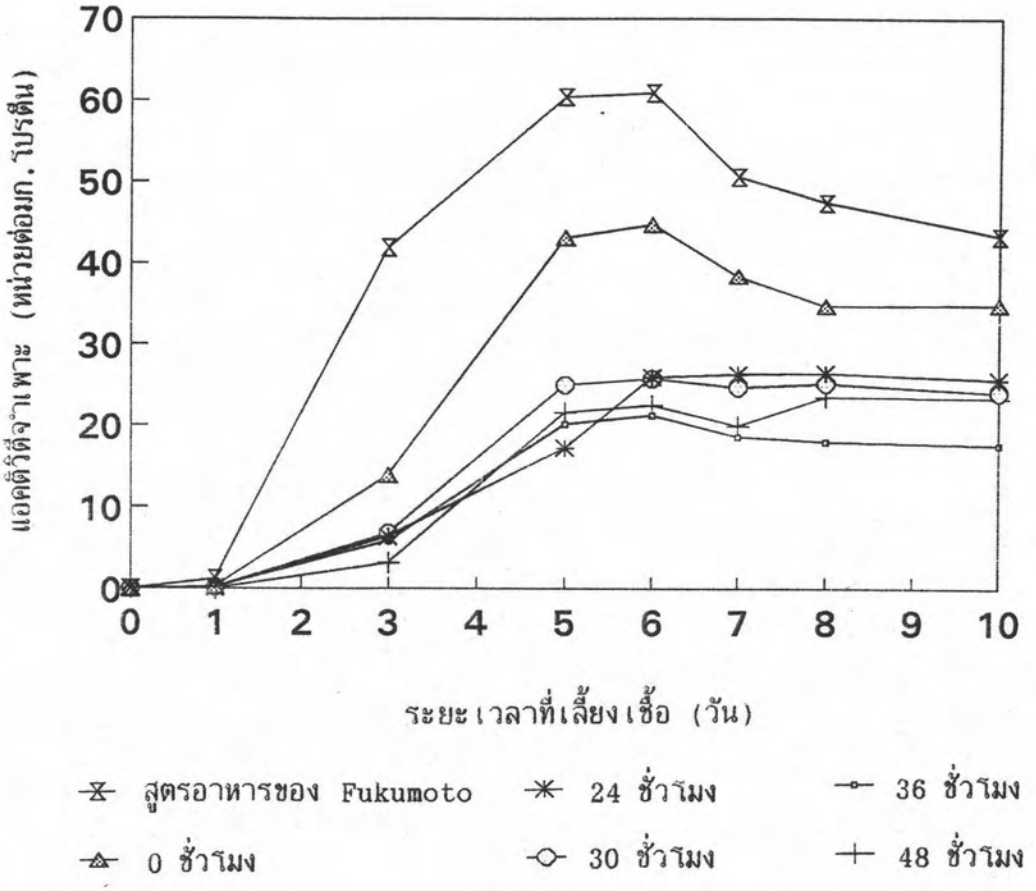
เนื่องจากเดกซ์แทรนเป็นทั้งแหล่งคาร์บอน และ สารชักนำการสร้างเอนไซม์แต่ในระบบการทดลองจะใช้เดกซ์แทรนในแง่ของสารชักนำมากกว่า ซึ่งทำให้ปัญหาของปริมาณไฮโดรไลเสทที่ใช้ร่วมกับปริมาณของเดกซ์แทรนในอัตราส่วนที่เหมาะสมกระทำได้ยาก ดังนั้นจึงทำการทดลอง โดยใช้หลักการออกแบบ ทาง Complete Randomized Design แบบ Factorial Design (3x3) โดยแปรผันปริมาณไฮโดรไลเสทชานอ้อย เท่ากับ



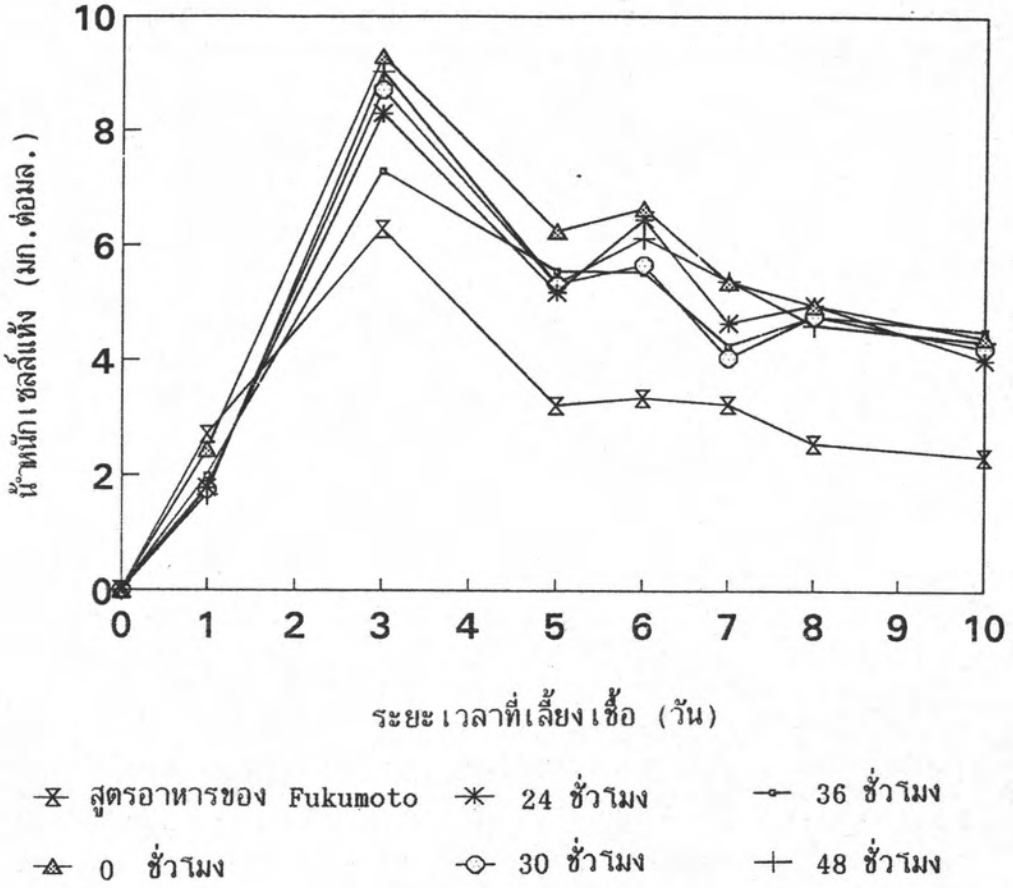
รูปที่ 16ค ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ โดยมีสภาวะการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับรูปที่ 16ค



รูปที่ 17ก ผลของระยะเวลาการเติมเดกซ์แทรนต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. สายพันธ์ 61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งประกอบด้วย 0.1 % ไฮโดรไลเสทของชานอ้อย (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) 0.2 % K_2HPO_4 0.05 % KCl 0.05 % $MgSO_4$ 0.0005 % $FeSO_4$ 0.2 % $NaNO_3$ 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ และมี 1.0 % เดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ โดยแปรผันระยะเวลาการเติมตั้งแต่ 0-48 ชม. ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบ/นาที



รูปที่ 17ข ผลของระยะเวลาการเติมเดกซ์แทรน ต่อแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 โดยมีสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับรูปที่ 17ก



รูปที่ 17ค ผลของระยะเวลาการเติมเดกซ์แทรน ต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ โดยมีสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับรูปที่ 17ก

0.1 0.25 และ 0.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) และ ปริมาณเดกซ์แทรนเท่ากับ 0.5 0.75 และ 1.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)

พบว่า ปริมาณของไฮโดรไลเสทมีผลสัมพันธ์โดยตรงต่อการเจริญของราโดยการเจริญจะมากขึ้นตามปริมาณไฮโดรไลเสท ดังแสดงในตารางที่ 12

สิ่งที่มีผลต่อเดกซ์แทรนเนสแอคติวิตี และ แอคติวิตีจำเพาะคือปริมาณเดกซ์แทรน โดยที่ปริมาณเดกซ์แทรนสูงขึ้นจะชักนำการสร้างเอนไซม์มากขึ้นเช่นกัน (ดังแสดงในตารางที่ 10 และ 11) จากตารางที่ 10 ปริมาณ 0.1 % ไฮโดรไลเสทชานอ้อย (น้ำหนักต่อปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) และปริมาณ 1.0 % เดกซ์แทรน จะให้เดกซ์แทรนเนสสูงสุดถึง 30.22 หน่วยต่อมล.

4.5 <u>ชนิดของแหล่งไนโตรเจน</u>

จากการทดลองข้างต้น ได้สูตรอาหารดัดแปลงจากสูตรของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก ดังนี้ คือ 0.1 % ของไฮโดรไลเสทชานอ้อย (น้ำหนักต่อปริมาตรคิดเป็นปริมาณกลูโคส) เป็นแหล่งคาร์บอน และ 1.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของเดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ 0.2 % K_2HPO_4 0.05% KCl 0.05% $MgSO_4.7H_2O$ 0.0005 % $FeSO_4$ 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ และ 0.2 % $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

- ทำการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยการใช้ไฮโดรไลเสทของวัสดุทางการเกษตร อันได้แก่ กากเมล็ดฝ้าย กากเมล็ดทานตะวัน และ กากถั่วเหลืองในปริมาณ 0.2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน $NaNO_3$

รูปที่ 18ก - 18ค แสดงถึงผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส แอคติวิตีจำเพาะ และ น้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ พบว่าการใช้ไฮโดรไลเสทของวัสดุการเกษตรเป็นแหล่งไนโตรเจน มีผลให้การเจริญของราสูงกว่าเมื่อใช้ $NaNO_3$ โดยไฮโดรไลเสทของกากถั่วเหลือง จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดถึง 6 มก. ต่อมล. (ดังรูปที่ 18 ค) แต่ให้ปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเพียง 19.44 หน่วยต่อมล. และไฮโดรไลเสทของกากเมล็ดทานตะวัน จะให้ปริมาณเอนไซม์ต่ำสุดเพียง 15.9 หน่วยต่อมล. ในขณะที่ $NaNO_3$ จะให้ปริมาณเอนไซม์สูงถึง 32.22 หน่วยต่อมล. (รูปที่ 18 ก)

ตารางที่ 10 ผลของปริมาณของแหล่งคาร์บอนและเดกซ์แทรนต่อการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยเลี้ยง *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 ในสูตรอาหาร ของ Fukumoto ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.16.3

% เดกซ์แทรน	เดกซ์แทรนเนสแอคติวิตี (หน่วย/มล.)		
	% ไฮโดรไลเสทของชานอ้อย (คิดเป็นปริมาณกลูโคส)		
	0.1	0.25	0.5
0.5	9.78(7)	9.04 (6)	8.24 (6)
0.75	19.11(6)	19.26 (5)	16.96 (5)
1.0	30.22(6)	28.33 (7)	17.56 (5)

หมายเหตุ 1. แอคติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อใน สูตรอาหารของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก เท่ากับ 23.56 หน่วยต่อมล. ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ

2. ค่าในวงเล็บ เป็นวันที่เชื้อมีการสร้างเอนไซม์สูงสุด

ตารางที่ 11 ผลของปริมาณของแหล่งคาร์บอน และ เดกซ์แทรนต่อแอคติวิตีจำเพาะในการเลี้ยง *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ในสูตรอาหารของ Fukumoto ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.16.3

% เดกซ์แทรน	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)		
	% ไฮโดรไลเสทของชานอ้อย (คิดเป็นปริมาณกลูโคส)		
	0.1	0.25	0.5
0.5	18.91 (6)	13.49 (6)	9.36 (6)
0.75	38.22 (6)	28.32 (5)	18.04 (5)
1.0	53.02 (6)	38.73 (6)	19.09 (5)

<u>หมายเหตุ</u> 1.แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก เท่ากับ 52.36 หน่วยต่อมก.โปรตีน ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ

2.ค่าในวงเล็บ เป็นวันที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด

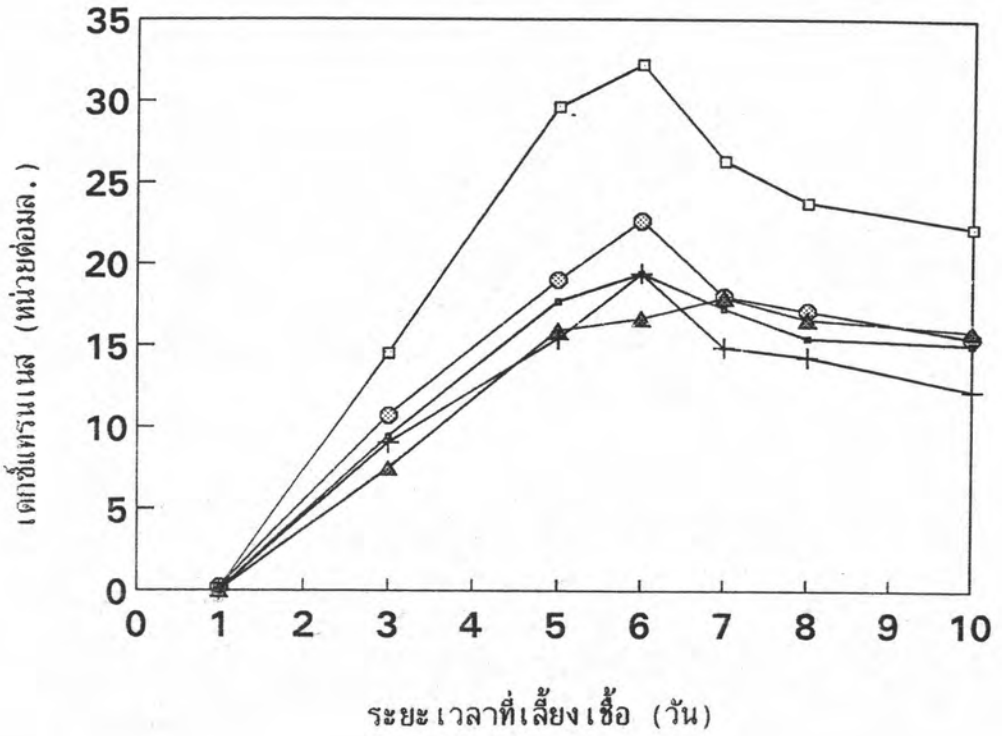
ตารางที่ 12 ผลของปริมาณของแหล่งคาร์บอน และ ปริมาณเดกซ์แทรนต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ ในการเลี้ยง *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Fukumoto ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.16.3

% เดกซ์แทรน	น้ำหนักแห้งของเซลล์ (มก./มล.)		
	% ไฮโดรไลเสทของชานอ้อย (คิดเป็นปริมาณกลูโคส)		
	0.1	0.25	0.5
0.5	3.27	4.03	6.22
0.75	3.84	4.46	6.79
1.0	4.85	5.04	7.71

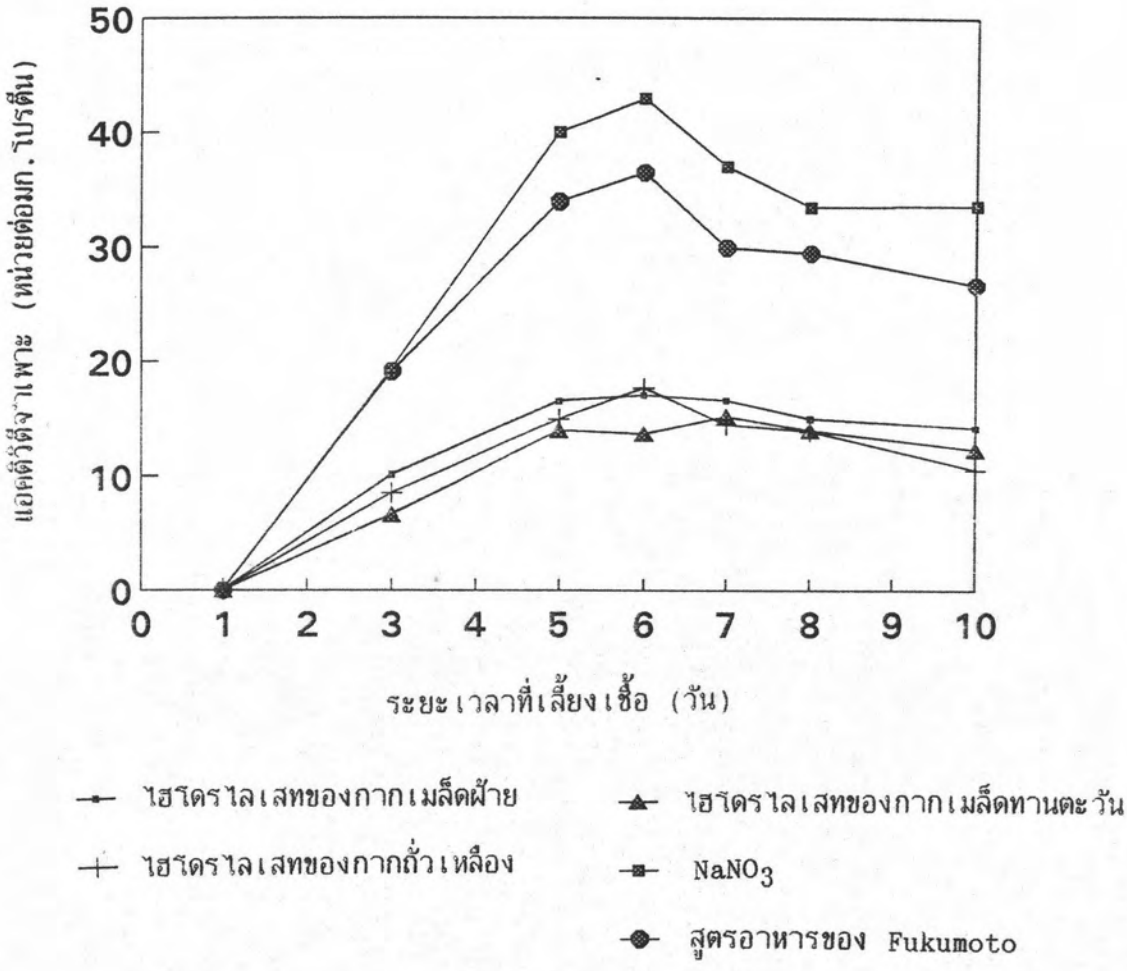
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ 1. ในสูตรอาหาร แต่ละปริมาณของไฮโดรไลเสทและเดกซ์แทรน พบว่าเชื้อมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ

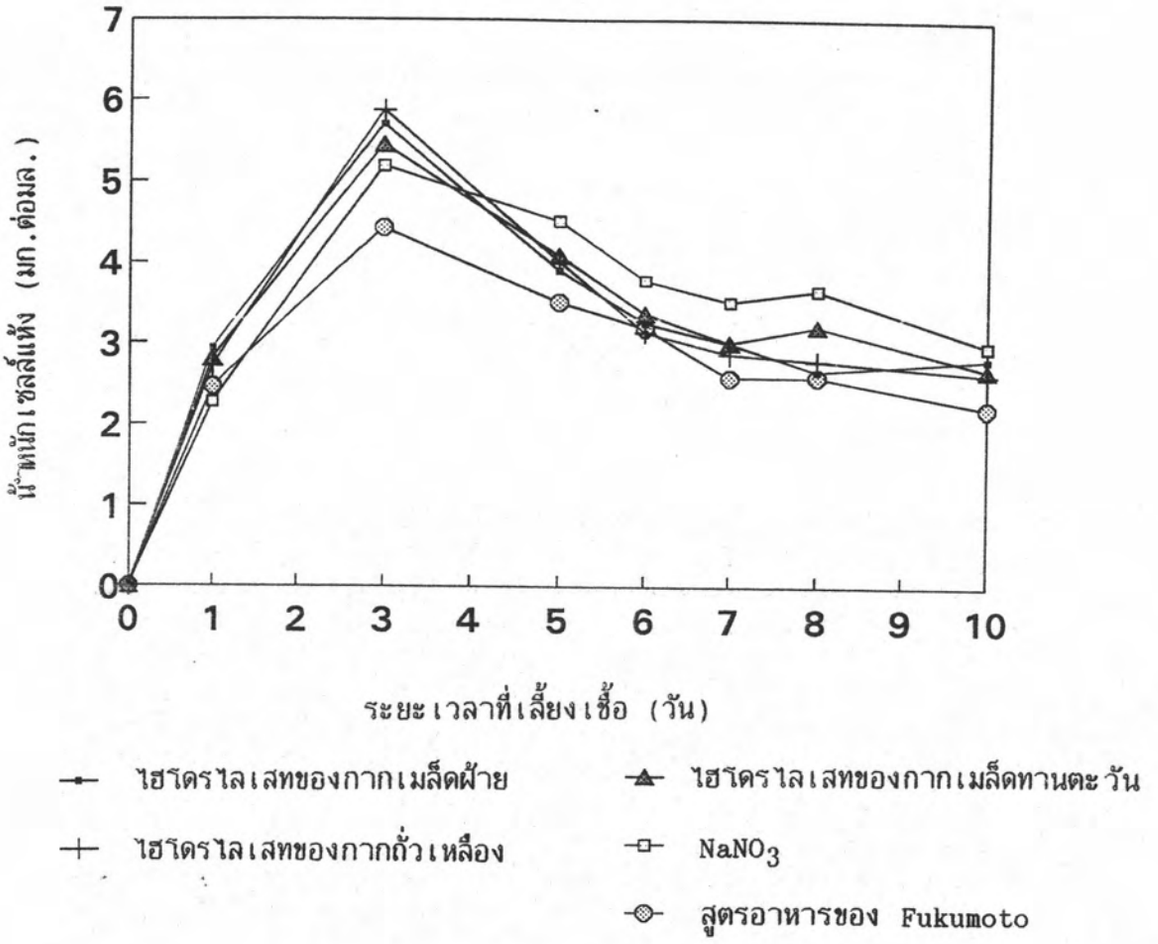
2. น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก เท่ากับ 4.17 มก.ต่อมล.ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน



รูปที่ 18ก ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ในปริมาณ 0.2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย 0.1 % ไฮโดรไลเสทของชานอ้อย (น้ำหนักต่อปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) 0.2 % K_2HPO_4 0.05 % KCl 0.05 % $MgSO_4$ 0.0005 % $FeSO_4$ 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ และมี 1.0 % เดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 เลี้ยงเชื้อในสภาวะอุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบ/นาที



รูปที่ 18ข ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ในปริมาณ 0.2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ต่อแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส สภาวะที่ในการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับรูปที่ 18ก



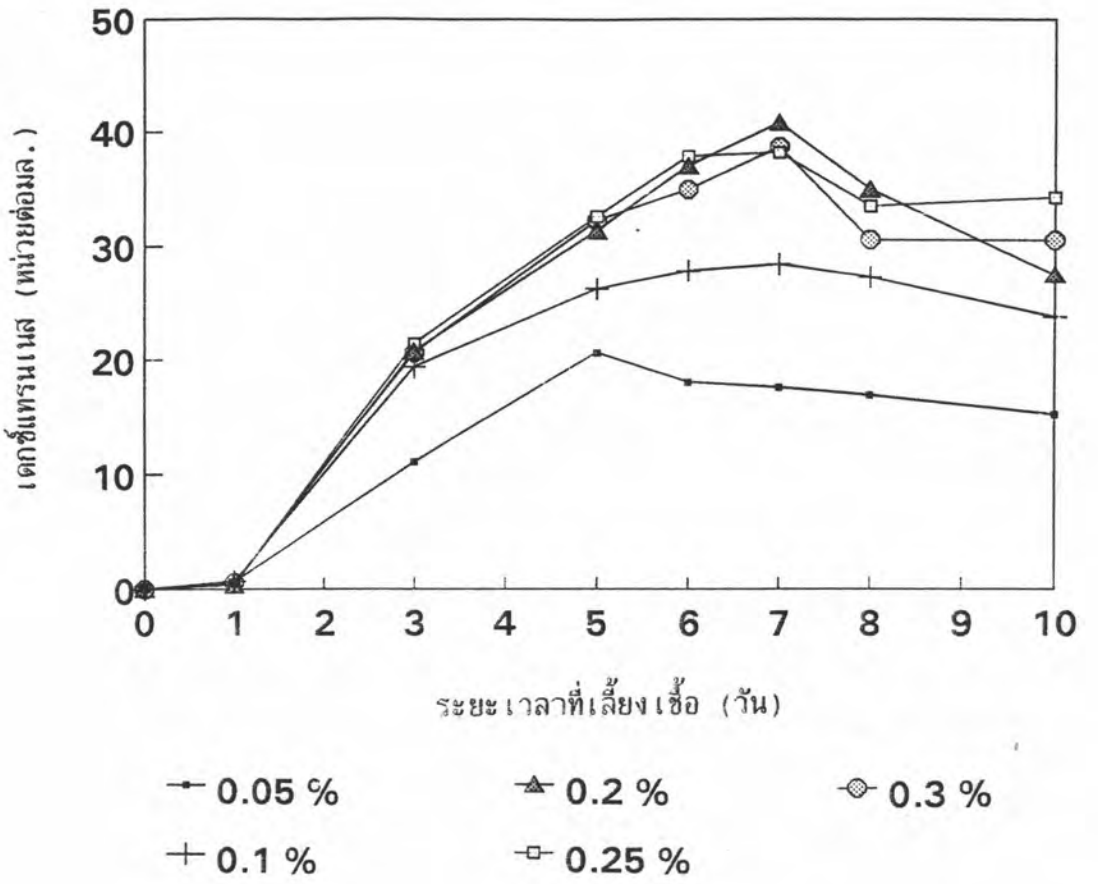
รูปที่ 18ค ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ในปริมาณ 0.2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ โดยมีสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับรูปที่ 18ก

4.6 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

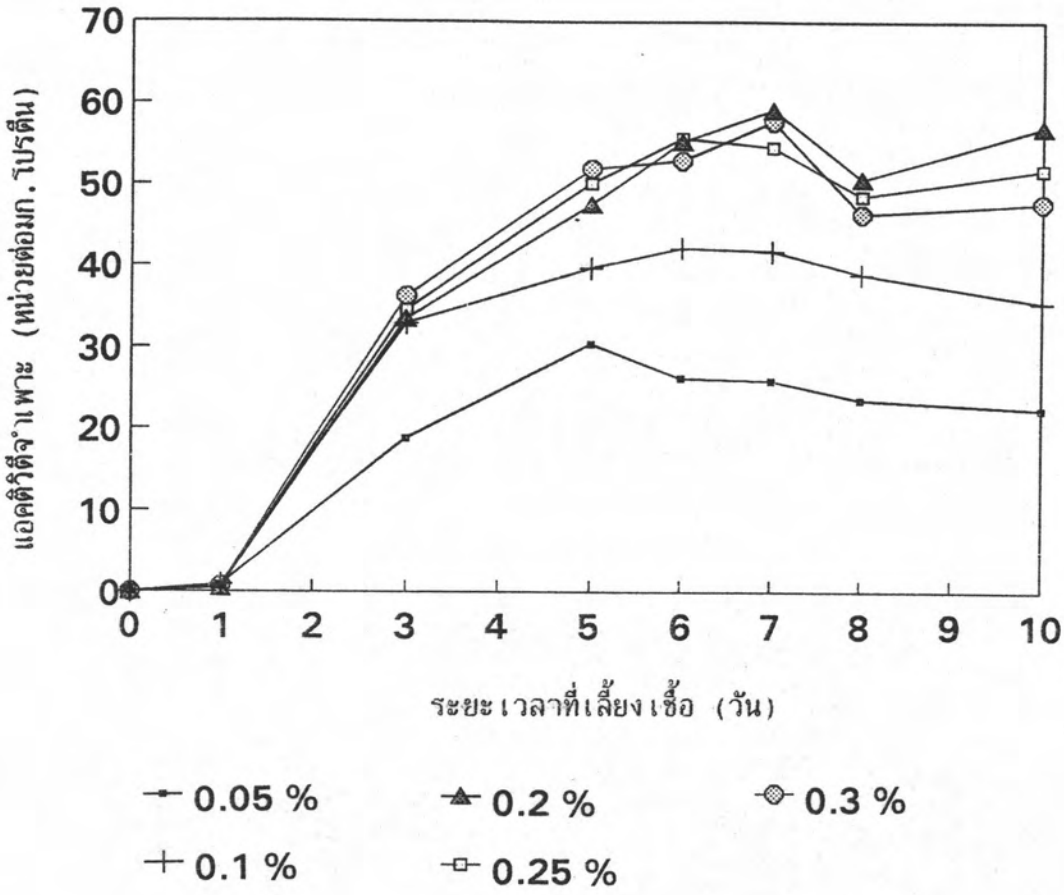
จากผลการทดลองข้อ 4.5 พบว่า $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สามารถให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด ดังนั้น จึงทำการทดลองเพื่อหาปริมาณ $NaNO_3$ ที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารสูตรดัดแปลง ซึ่งมี 0.1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) ของไฮโดรไลเสทชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน 1.0 % เดกซ์แทรน เป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ 0.2 % K_2HPO_4 0.05% KCl 0.05% $MgSO_4.7H_2O$ 0.0005 % $FeSO_4$ 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ แต่แปรผันปริมาณของ $NaNO_3$ ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน ตั้งแต่ 0.05 - 0.3 % พบว่าเมื่อปริมาณของ $NaNO_3$ สูงขึ้น จะทำให้มีการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสสูงขึ้น แต่เมื่อปริมาณ $NaNO_3$ สูงกว่า 0.2 % จะไม่มีผลช่วยเสริมการสร้างเอนไซม์ หรือ แอคติวิตีเอนไซม์เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด (รูปที่ 19 ก และ 19 ข) สำหรับการเจริญของรา จากผลการทดลองในรูปที่ 19 ค พบว่า เมื่อปริมาณของ $NaNO_3$ เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเจริญมากนัก

4.7 ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการสร้างเอนไซม์

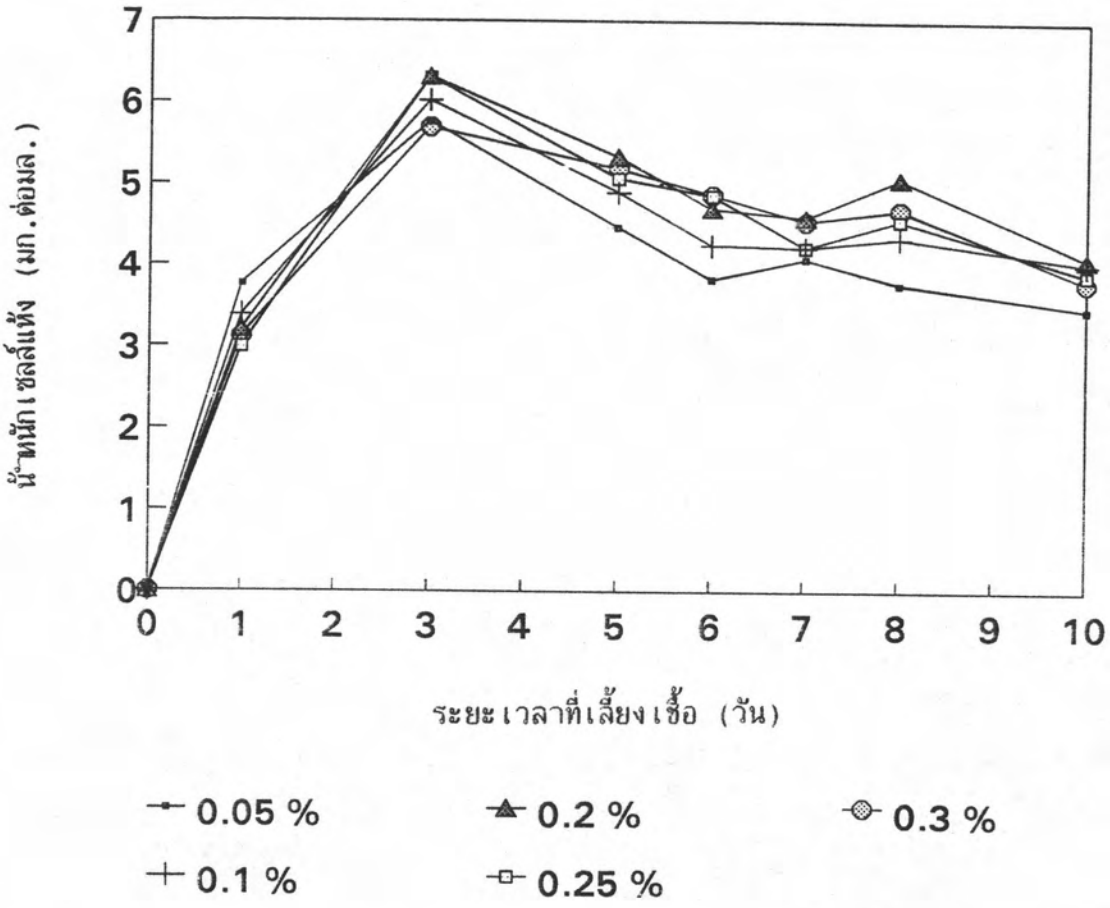
จากการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรดัดแปลงซึ่งมี 0.1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) ของไฮโดรไลเสทชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน 1.0 % ของเดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ และ 0.2 % $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน เปรียบเทียบผลระหว่างเมื่อ เติม และ ไม่เติม 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ จากรูปที่ 20 ก พบว่า อาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์จะมีผลทำให้มีการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้มากกว่าอาหารที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากยีสต์ รวมทั้งทำให้มีแอคติวิตีจำเพาะมากกว่าด้วย (รูปที่ 20ข) นอกจากนี้ ยังช่วยทำให้มีการเจริญมากกว่าด้วย (รูปที่ 20 ค)



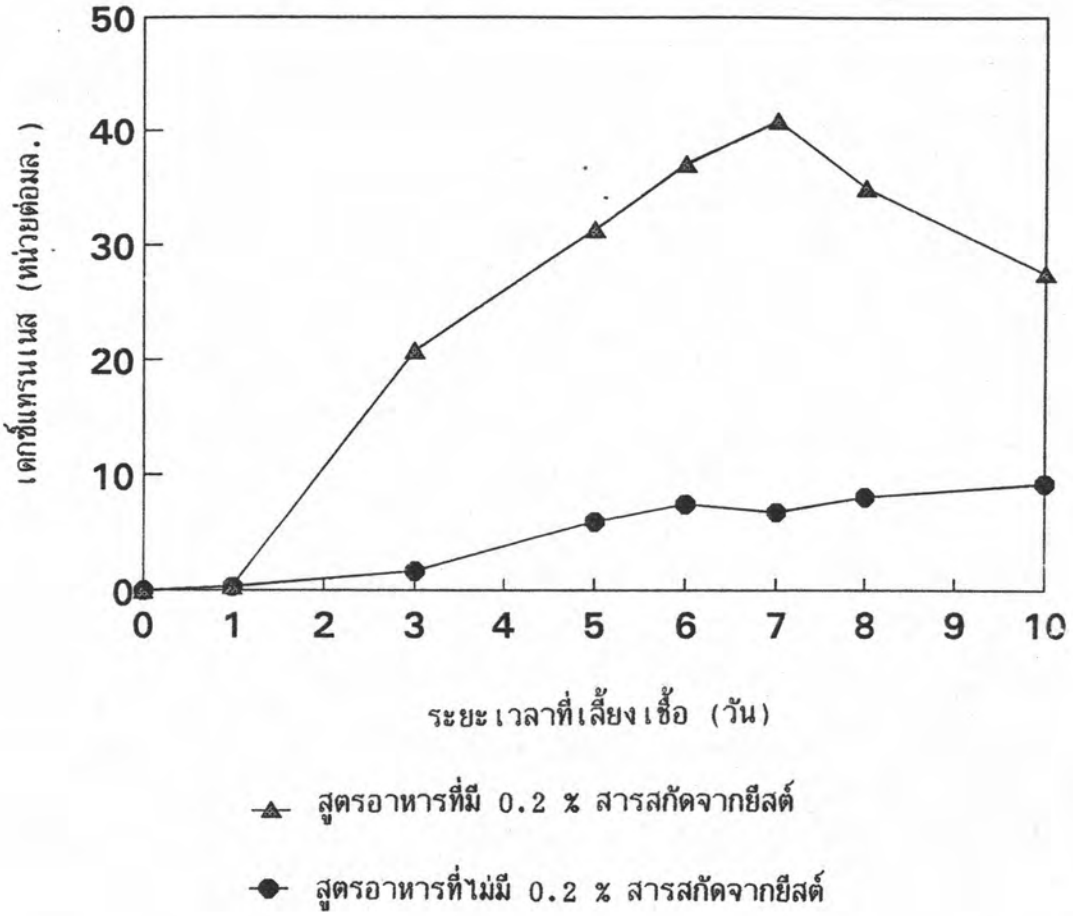
รูปที่ 19ก ผลของปริมาณ $NaNO_3$ ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย 0.1 % ไฮโดรไลเสทของชานอ้อย (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) 0.2 % K_2HPO_4 0.05 % KCl 0.05 % $MgSO_4$ 0.0005 % $FeSO_4$ 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ 1.0 % เดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ และแปรผันปริมาณ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0.05 - 0.3 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 เลี้ยงเชื้อในสภาวะอุณหภูมิห้องงง ภายใต้การเขย่า 200 รอบ/นาที



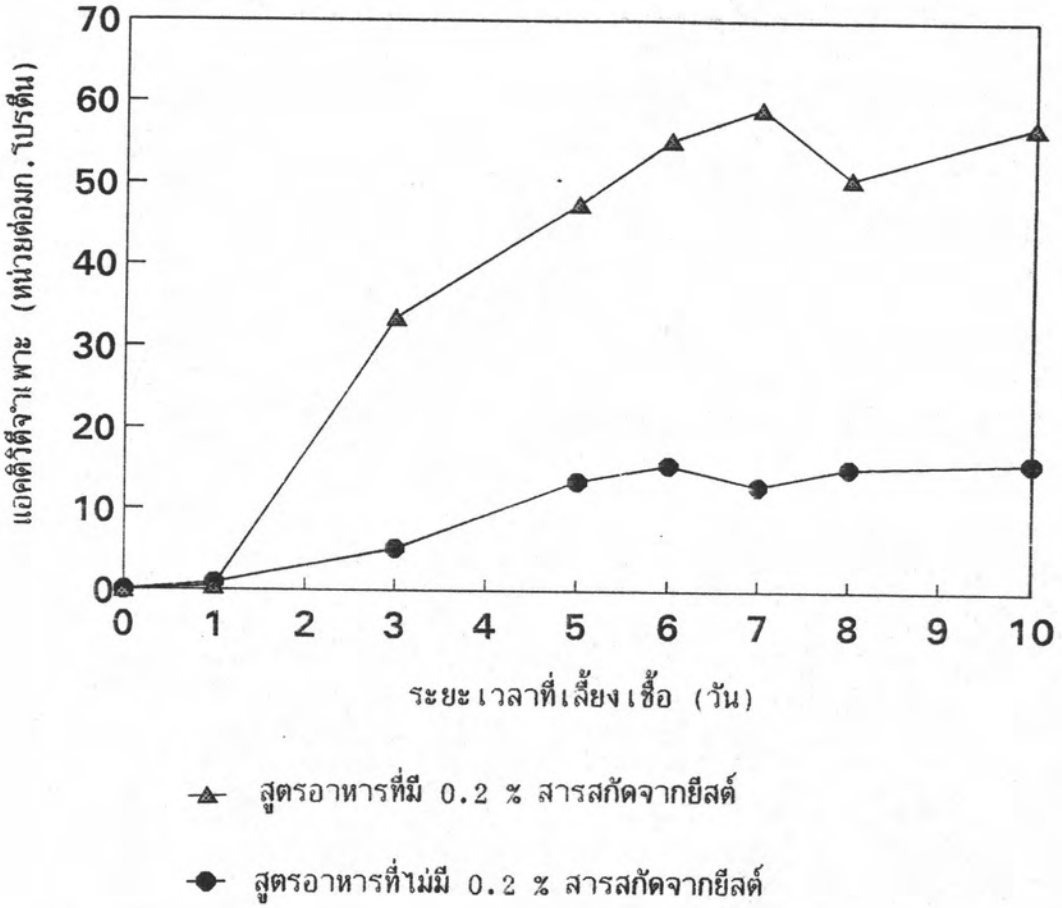
รูปที่ 19ข ผลของปริมาณ $NaNO_3$ ต่อแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับรูปที่ 19ก



รูปที่ 19ค ผลของปริมาณ $NaNO_3$ ต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ โดยมีสภาวะในการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับ รูปที่ 19ก

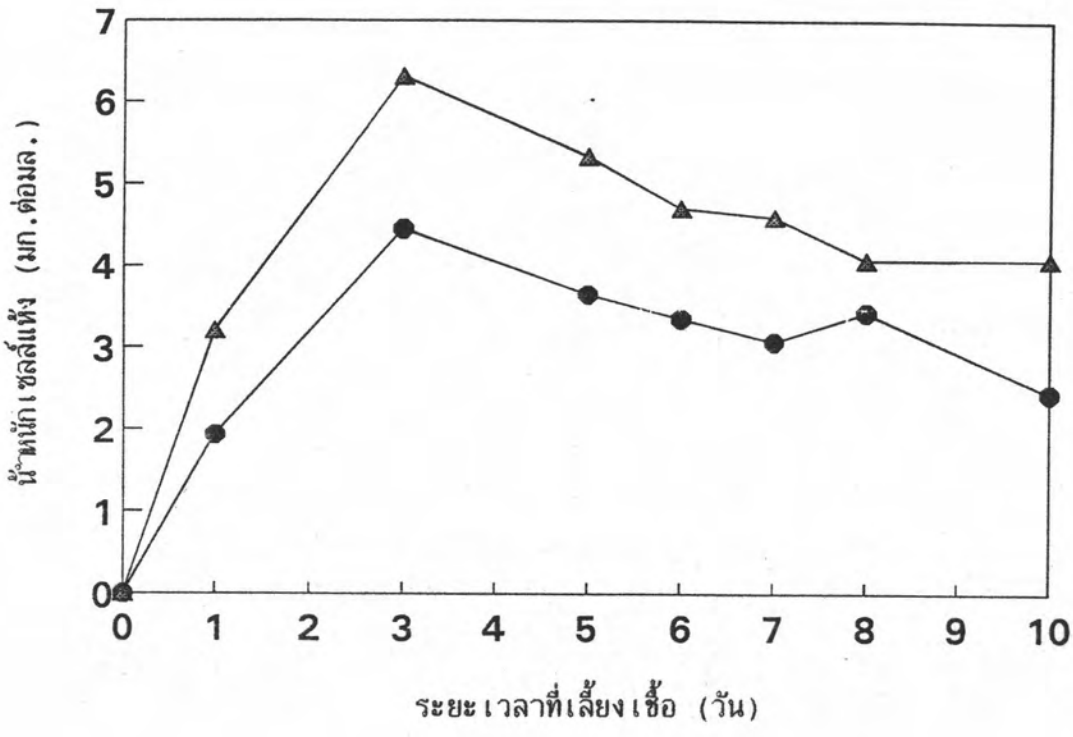


รูปที่ 20ก ผลเปรียบเทียบการเติมและไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ ในปริมาณ 0.2 % (w/v) ต่อการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งประกอบด้วย 0.1 % ไฮโดรไลเสทของชานอ้อย (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) 0.2 % K_2HPO_4 0.05 % KCl 0.05 % $MgSO_4$ 0.0005 % $FeSO_4$ 1.0 % เดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ 0.2 % $NaNO_3$ เป็นเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0 เลี้ยงเชื้อในสภาวะอุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบ/นาที



รูปที่ 20ข ผลเปรียบเทียบการเติมและไม่เติม 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ ต่อแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับในรูปที่ 20ก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20ค ผลเปรียบเทียบการเติมและไม่เติม 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ ต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ โดยมีสภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับ รูปที่ 20ก