การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61

นางสาว สุภาพร ชาติวรพงศา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536

ISBN 974-583-463-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018913 i1971162OX

Utilization of Agricultural Wastes For The Production of Dextranase by *Penicillium* sp. strain 61

Miss Suphaporn Chatworapongsa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-463-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตเดกซ์แทรนเนส โดย *Penicillium sp.* สายพันธุ์ 61
โดย	นางสาวสุภาพร ชาติวรพงศา
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน
ปีการศึกษา	2536

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ มหามนตรี)

.....ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณพยัคฆ์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สุภาพร ชาติวรพงศ์ : การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 (UTILIZATION OF AGRICULTURAL WASTES FOR THE PRODUCTION OF DEXTRANASE BY *Penicillium* sp. STRAIN 61)
อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน, 120 หน้า. ISBN 974-583-463-7

การปรับสภาพวัสดุทางการเกษตร อันได้แก่ ฟางข้าว แกลบ รำข้าว และชานอ้อย ซึ่งบดและร่อนคัดขนาด 50 เมช (mesh) ด้วยวิธีต่าง ๆ ทั้งทางกายภาพ และ/หรือทางเคมี ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* และเบตา-กลูโคสิเดส จาก *Aspergillus niger* พบว่า วิธีที่เหมาะสมในการปรับสภาพ ฟางข้าว และชานอ้อย คือ การใช้ 1% NaOH ที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับแกลบและรำข้าว คือการใช้ 1% NaOH ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 และ 10 นาที ทำการย่อยวัสดุปรับสภาพนี้ด้วยเซลลูเลส และเบตา-กลูโคสิเดส ที่ความเข้มข้น 656 และ 16 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักแห้งจะสามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ 897.5 1040.5 30.5 และ 372.5 มก.ต่อกรัมวัสดุทางการเกษตร ตามลำดับ

สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส และเบตา-กลูโคสิเดส ในการย่อยวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพ คือเอนไซม์ 40 และ 60 หน่วยต่อกรัม วัสดุทางการเกษตร ตามลำดับ ย่อยสารละลาย 4% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของวัสดุทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยวิธีที่เหมาะสมใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 ที่อุณหภูมิ 40°ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ไฮโดรเลเสทของชานอ้อย สามารถใช้เลี้ยงรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ดี โดยสูตรอาหารดัดแปลงที่ใช้จะประกอบด้วย 0.1% ไฮโดรไลเสทของชานอ้อย (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) เป็นแหล่งคาร์บอน 1.0% เดกซ์แทรน เป็นสารยักนำการสร้างเอนไซม์ 0.2% $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0 โดย 0.2% ของสารสกัดจากยีสต์ก็มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ด้วย ผลผลิตของเดกซ์แทรนเนสที่ได้จะอยู่ในระหว่าง 35-42 หน่วยต่อมล.อาหารเลี้ยงเชื้อ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

...ในกรอบสีเขียว...

C326146 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: DEXTRANASE / AGRICULTURAL WASTE / *Penicillium*

SUPHAPORN CHATWORAPONGSA : UTILIZATION OF AGRICULTURAL WASTES FOR THE PRODUCTION OF DEXTRANASE BY *Penicillium* sp. STRAIN 61. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., 120 pp., ISBN 974-583-463-7

Agricultural wastes including rice straw, rice husk, rice bran, and sugarcane bagasse sized into 50 mesh were pretreated with various methods both physical and/or chemical means. The pretreated materials were further digested with cellulase from *Trichoderma reesei* and β-glucosidase from *Aspergillus niger*. The most appropriate condition for pretreating rice straw and bagasse judging from amount of reducing sugar released was 1% NaOH at 121°C. and 15 lbs/in^2 for 15 minutes while in case of rice husk and bran was 1% NaOH at room temperature for 30 and 10 minutes respectively. Afterthat they were subjected to hydrolysed by cellulase and β-glucosidase at 656 and 16 units/gram dry weight of material yielding reducing sugar equivalent to 897.5, 1040.5, 30.5 and 372.5 mg/gram of material for rice straw, bagasse, rice husk and rice bran respectively.

The optimum conditions for cellulase and β-glucosidase activities upon a 4% solution of pretreated materials (w/v) were at 40 and 60 units/gram of pretreated substrate in 0.05 M acetate buffer, pH 4.8, 40°C. for 24 hrs. with agitation rate of 200 rpm. It was observed that hydrolysate from bagasse could be used for cultivating *Penicillium* sp. strain 61 for dextranase production. The modified medium contained 0.1% bagasse hydrolysate (w/v equivalent to glucose) as C-source, 1.0% dextran as inducer, 0.2% $NaNO_3$ as N-source with initial pH of 6.0 supplemented with 0.2% yeast extract when used for cultivation of the above organism could give dextranase in the range of 35-42 units/ml.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ แนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ผศ.ดร.หรรษา ปุณพยัคฆ์ และ รศ.วีระวุฒิ มหามนตรี ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล แห่งภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ และ อาจารย์ชุติมณฑน์ วีระภาสพงษ์ แห่งภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่มีส่วนช่วยเหลือให้คำแนะนำ ในการใช้เครื่องมือ และ อุปกรณ์ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณวิศิษฐ์พร เผื่อนพิภพ และ เจ้าหน้าที่ในโครงการหลวงสวนจิตรลดาทุกท่าน และบริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด ที่กรุณาเอื้อเฟื้อวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร บริษัท อีสต์เอเชียติ๊ก (ประเทศไทย) จำกัด ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเอนไซม์ที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์นี้โดยตลอด รวมทั้งคุณบัณฑิต ฝั่งสินธุ์ ที่กรุณาช่วยเหลือในการเก็บรักษาเชื้อ โดยวิธี Lyophilization

ขอขอบพระคุณ สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (STDB) ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ มารดา และขอขอบคุณ ญาติพี่น้อง ซึ่งให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ผู้เขียนจนสำเร็จการศึกษา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูป ..... ฌ
คำย่อ ..... ฎ
บทที่
1. บทนำ 1
2. อุปกรณ์และสารเคมี 21
3. วิธีดำเนินการทดลอง 25
4. ผลการทดลอง 40
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 86
เอกสารอ้างอิง 98
ภาคผนวก 107
ประวัติผู้เขียน 120

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ 12

2 แสดงผลดีและผลเสียในการย่อยวัสดุทางการเกษตรด้วยกรด..... 14

3 แสดงผลดีและผลเสียในการย่อยวัสดุทางการเกษตรด้วยเอนไซม์..... 15

4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากการย่อยฟางข้าว แกลบ และรำข้าวด้วยเซลลูเลส และเบตา-กลูโคสิเดส ปริมาณ 80 และ 60 หน่วยต่อกรัมวัสดุ.... 41

5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากการย่อยชานอ้อยด้วยเซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดสปริมาณ 656 และ 16 หน่วยต่อกรัมวัสดุ..... 43

6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุทธิที่ปลดปล่อยจากการย่อยชานอ้อยด้วยเซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดส ปริมาณ 656 และ 16 หน่วยต่อกรัมวัสดุ..... 44

7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากการย่อยฟางข้าว แกลบ รำข้าวและชานอ้อยด้วย เซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดส ปริมาณ 656 และ 16 หน่วยต่อกรัมวัสดุ..... 46

8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากการย่อยฟางข้าว แกลบ รำข้าวและชานอ้อยด้วย เซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดส ปริมาณ 70 และ 10 หน่วยต่อกรัมวัสดุ..... 47

9 ผลของปริมาณชานอ้อยที่เหมาะสมต่อการย่อยด้วยเอนไซม์..... 60

10 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนและปริมาณเดกซ์แทรนต่อการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส..... 73

11 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนและปริมาณเดกซ์แทรนต่อแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส..... 74

12 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนและปริมาณเดกซ์แทรนต่อการเจริญของเซลล์..... 75

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 แสดงองค์ประกอบในเซลล์พืช 7

2 แสดงลักษณะการจัดเรียงตัวของหน่วยกลูโคสในเซลลูโลส 8

3ก แสดงส่วนของเซลลูโลสที่เป็นผลึกและเซลลูโลสอสัณฐาน 8

3ข แสดงการจัดเรียงตัวของเซลลูโลสภายในเซลล์พืช 9

4 แสดงการย่อยเซลลูโลสด้วยระบบเอนไซม์เซลลูเลส 17

5 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์ 48

6 ผลของชนิดของบัฟเฟอร์ต่อการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์ 50

7 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดสในการย่อยชานอ้อย 51

8 ผลของความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อการย่อยชานอ้อย 53

9 ผลของเวลาที่เหมาะสมในการย่อยชานอ้อยด้วยเซลลูเลส 54

10 เปรียบเทียบเวลาในการเติมเอนไซม์เบตา-กลูโคสิเดสในการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์ 56

11 ผลของความเข้มข้นของเบตา-กลูโคสิเดสต่อการย่อยชานอ้อย 57

12 ผลของปริมาณชานอ้อยต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ 59

13 ผลของปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้นต่อการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส 61

14 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของการเจริญ การสร้างเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ ความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร Fukumoto ซึ่งปรับปรุงโดยเอก แสงวิเชียร 63

15 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของการเจริญ การสร้างเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ ความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร Fukumoto ซึ่งปรับปรุงโดยเอก แสงวิเชียร และเพิ่มปริมาณกลูโคส 0.1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) 64

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16ก	ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61.....	65
16ข	ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ เดกซ์แทรนเนส.....	66
16ค	ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญของเซลล์.....	68
17ก	ผลของระยะเวลาในการเติมเดกซ์แทรนต่อการผลิตเอนไซม์ เดกซ์แทรนเนส โดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61.....	69
17ข	ผลของระยะเวลาในการเติมเดกซ์แทรนต่อแอคติวิตีจำเพาะของ เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส.....	70
17ค	ผลของระยะเวลาในการเติมเดกซ์แทรนต่อการเจริญของเซลล์.....	71
18ก	ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61.....	76
18ข	ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อแอคติวิตีจำเพาะของ เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส.....	77
18ค	ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญของเซลล์.....	78
19ก	ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61.....	80
19ข	ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ เดกซ์แทรนเนส.....	81
19ค	ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเซลล์.....	82
20ก	ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61.....	83
20ข	ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ เดกซ์แทรนเนส.....	84
20ค	ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการเจริญของเซลล์.....	85

คำย่อ

°ซ.	=	องศาเซลเซียส
ชม.	=	ชั่วโมง
มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
ก.	=	กรัม
°C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซนต์
(w/v)	=	น้ำหนัก/ปริมาตร
RT	=	อุณหภูมิห้อง