การผลิตไซแลนเนสจาก *Aureobasidium pullulans* และผลต่อเยื่อกระดาษยูคาลิปตัส

นางสาวธาริณี พังจุนันท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543
ISBN 974-13-1187-7
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19035123

XYLANASE PRODUCTION FROM *Aureobasidium pullulans* AND ITS EFFECT ON THE EUCALYPTUS PAPER PULP

Miss Tarinee Pangjunan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Botany

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-13-1187-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	**การผลิตไซแลนเนสจาก *Aureobasidium pullulans* และผลต่อเยื่อกระดาษยูคาลิปตัส**
โดย	**นางสาวธาริณี พังจุนันท์**
สาขาวิชา	**พฤกษศาสตร์**
อาจารย์ที่ปรึกษา	**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์**

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... **คณบดีคณะวิทยาศาสตร์**

(รองศาสตราจารย์ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... **ประธานกรรมการ**

(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

..... **อาจารย์ที่ปรึกษา**

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

..... **กรรมการ**

(อาจารย์ บุญธิดา โมษิตทรัพย์)

ธาริณี พังจุนันท์ : การผลิตไซแลนเนสจาก *Aureobasidium pullulans* และผลต่อเยื่อกระดาษยูคาลิปตัส (XYLANASE PRODUCTION FROM *Aureobasidium pullulans* AND ITS EFFECT ON THE EUCALYPTUS PAPER PULP) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ; 79 หน้า. ISBN 974-13-1187-7.

เมื่อนำ *Aureobasidium pullulan* สายพันธุ์ ATCC และ NRRL เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีไซแลนเนสแอคติวิถีดีที่สุด (สายพันธุ์ ATCC 22.47 IU และ NRRL 23.99 IU) ที่ pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเมื่อใช้สภาวะเหมาะสมนี้เลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ โดยใช้แกลบ ฟางข้าว รำละเอียด และรำหยาบ 1 เปอร์เซ็นต์แทนน้ำตาลไซโลสพบว่าสายพันธุ์ ATCC จะมีไซแลนเนสแอคติวิถีสูงสุดเมื่อเลี้ยงในรำละเอียด (5.79 IU) สายพันธุ์ NRRL จะมี ไซแลนเนสแอคติวิถีสูงสุดเมื่อเลี้ยงในฟางข้าว (3.68 IU) และเมื่อนำมาเลี้ยงโดยใช้วัสดุทางการเกษตรที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าสายพันธุ์ ATCC มีไซแลนเนสแอคติวิถีดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในรำละเอียด 3 เปอร์เซ็นต์(6.97 IU) สายพันธุ์ NRRL มีไซแลนเนสแอคติวิถีดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในฟางข้าว 4 เปอร์เซ็นต์(7.18 IU) จากนั้นทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 30% ถึง 50% เอนไซม์ที่ได้จากทั้งสองสายพันธุ์ มีค่าหน่วยของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 5.17 และ 4.86 เท่าในสายพันธุ์ ATCCและNRRL ตามลำดับ และเมื่อนำเอนไซม์มาฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัส พบว่าค่าคัปปานัมเบอร์ลดลงเมื่อใช้ปริมาณของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ไซแลนเนสจากสายพันธุ์ ATCC 50 IU ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม ทำให้เยื่อกระดาษมีค่าคัปปานัมเบอร์ต่ำสุด คือ 8.3382 ค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเยื่อกระดาษที่ไม่ได้ฟอกด้วยเอนไซม์ โดยการใช้ ไซแลนเนส 50 IU ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัมให้ค่าความขาวสว่างสูงที่สุด คือ 46.17 ส่วนของเหลวที่ได้จากการฟอกเยื่อเมื่อนำไปตรวจหาโครโมฟอร์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงแสง ยูวี พบว่า การใช้ไซแลนเนสจากสายพันธุ์ ATCC ปริมาณน้อย (5 และ 25 IU ต่อกรัม) มีการดูดกลืนแสงเช่นเดียวกับการใช้ไซแลนเนสมาตรฐาน 5 IU ต่อกรัม ขณะที่ไซแลนเนสจากสายพันธุ์ ATCC 50 IU ต่อกรัม และจากสายพันธุ์ NRRL 5 25 และ 50 IU ต่อกรัม ไม่พบการดูดกลืนแสงช่วงแสง ยูวี

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2543

4072275223 : MAJOR BOTANY

KEY WORD: *A. pullulans* / XYLANASE / CHROMOPHORE

TARINEE PANGJUNAN : XYLANASE PRODUCTION FROM *Aureobasidium pullulans* AND ITS EFFECT ON THE EUCALYPTUS PAPER PULP. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D. 79 pp. ISBN 974-13-1187-7.

Two strains of *Aureobasidium pullulans*, ATCC and NRRL were cultivated in submerge culture containing xylose as the sole caebon source. These two strains had highest xylanase activity (ATCC 22.47 IU and NRRL 23.99 IU) at pH 5, Temperature 30° C. The optimal condition culturing *A. pullulans* along with the agricultural carbon source include for rice husk, rice straw, refined rice bran or unprocessed rice bran was used instead of 1% xylose. The ATCC strain had highest xylanase activity in refined rice bran (5.79 IU) while the NRRL strain had highest xylanase activity in rice straw (3.68 IU). In the varied concentration of carbon sources, the ATCC strain had highest xylanase activity when refined rice bran 3% was used (6.97 IU), and rice straw 4% gave the highest xylanase activity in NRRL strain (7.18 IU). After that, the enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation at 30-50% concentration; the enzyme activity increased 5.17 and 4.86 fold in ATCC and NRRL strains respectively. After the enzyme was used to bleach eucalyptus paper pulp, the Kappa number of pulp decreased when increasing the enzyme dosage. Xylanase 50 IU per g OD from ATCC strain gave lowest Kappa number at 8.3382. The brightness of pulp was slightly increase, compared to the unbleached pulp. Xylanase 50 IU per g OD from ATCC strain gave highest brightness as 46.17%. The filtrate from enzyme bleaching was measured its absorbency at UV region. Using low level of ATCC's xylanase (5 and 25 IU per g OD) gave the absorbance peaks similar to the standard xylanase treatment at 5 IU per g OD. When using xylanase from ATCC strain 50 IU per g OD, NRRL strain at 5, 25 and 50 IU per g OD and standard xylanase treatment at 25 IU per g OD did not show the UV absorbance peaks.

Department Botany Student's signature ธารินี พงษ์จันทร์

Field of study Botany Advisor's signature

Academic year 2000

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และความรู้ต่างๆอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ ตลอดจนได้กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ ที่ได้กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ บุญธิดา โมษิตทรัพย์ ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์รวมทั้งบุคลากรในภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่าน และขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่ได้เอื้อเฟื้อและให้ความช่วยเหลือจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณพ่อและแม่ที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญตาราง..... ช
สารบัญภาพ..... ฌ
บทที่
1. บทนำ..... 1
2. สำรวจเอกสาร..... 4
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการทดลอง..... 18
4. ผลการทดลอง..... 23
5. วิจารณ์ผลการทดลอง..... 50
6. สรุปผลการทดลอง..... 56

รายการอ้างอิง..... 58
ภาคผนวก..... 64
ประวัติผู้เขียน..... 79

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การฟอกสีเยื่อกระดาษด้วยไซแลนเนส	13
2	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างๆ	26
3	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างๆ	27
4	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิต่างๆกัน	28
5	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิต่างๆกัน	29
6	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ	31
7	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ	32
8	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงโดยใช้รำละเอียดที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน	33
9	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงโดยใช้ฟางข้าวที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน	34
10	เปรียบเทียบค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC และ NRRLในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมความเข้มข้นต่างๆ	35
11	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC และNRRLในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	36
12	ค่าคัปปานัมเบอร์และค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษหลังจากการฟอกด้วยไซแลนเนส	37

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน.....	5
2	โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง.....	6
3	โครงสร้างไซแลน และการย่อยสลายไซแลนที่ตำแหน่งต่างๆของกลุ่มเอนไซม์ไซแลนเนส.....	8
4	ระบบการย่อยสลายไซแลนของ *Cryptococcus albidus*.....	10
5	กลไกการทำงานของไซแลนเนสในการฟอกเยื่อกระดาษ.....	15
6	สับสเตรตของไซแลนเนสในการฟอกเยื่อโดยใช้เอนไซม์ร่วมด้วย.....	16
7	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC และ NRRL.....	23
8	เชื้อ *Aureobasidium pullulans*.....	24
9	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างๆ	26
10	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างๆ	27
11	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิต่างๆกัน	28
12	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิต่างๆกัน	29
13	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ.....	31
14	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ	32
15	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงโดยใช้รำละเอียดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน.....	33
16	ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงโดยใช้ฟางข้าวที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน.....	34

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ค่าคัปปานัมเบอร์และค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษหลังจากการฟอกด้วยไซแลนเนส.....	37
18	แผ่นทดสอบค่าความขาวสว่างจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC.....	39
19	แผ่นทดสอบค่าความขาวสว่างจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL.....	40
20	ผลการ scan ส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสของชุดควบ.....	41
21	ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสมาตรฐาน ปริมาณ 5 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม.....	42
22	ผลการ scan ส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสมาตรฐาน ปริมาณ 25 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม.....	43
23	ผลการ scan ส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ปริมาณ 5 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม.....	44
24	ผลการ scan ส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ปริมาณ 25 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม.....	45
25	ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ปริมาณ 50 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม.....	46
26	ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ปริมาณ 5 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม.....	47
27	ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ปริมาณ 25 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม.....	48
28	ผลการ scanส่วนของเหลวจากการฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ปริมาณ 50 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม.....	49