รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

การผลิตเอนไซม์ xylanase จากเชื้อราโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งของเกษตรกรรม ในขบวนการหมักแบบแห้ง

Production of Fungal Xylanase from Agricultural Waste by Solid State Fermentation

โดย

ดัญชริกา สวารชร และ นภา โล่ห์ทอง

พ.ศ. 2526

การผลิตเอนไซม์ xylanase จากเชื้อราโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมในขบวนการหมักแบบแห้ง

สัญชริตา สวารชร* และ นภา โล่ห์ทอง**

*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสด้วยเชื้อ Aspergillus รหัส 4-45-1F ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์นี้สูง โดยใช้ฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบ เปลือกถั่ว ชานอ้อย และรำข้าว เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าวัตถุดิบที่ให้ผลดีที่สุดคือ ฟางข้าว โดยที่เชื้อจะสร้างเอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงที่สุดเมื่อบดฟางข้าวให้เล็กขนาด 5 เมช เติม NH_4NO_3 0.8% ปรับให้วัสดุมีความชื้น 82% และ pH เริ่มต้น 4.5 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 6 วัน โดยใช้เชื้อเริ่มต้นประมาณ $1.2x10^5$ สปอร์/กรัม เชื้อเริ่มต้นซึ่งได้จากการเลี้ยงในอาหารซึ่งมีไซแลนบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน หรือที่เลี้ยงบน Czapek's agar สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีพอ ๆ กัน ในฟางข้าวนอกจากเอนไซม์ไซลาเนสแล้ว Aspergillus รหัส 4-45-1F จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสควบคู่กันไปด้วย crude enzyme ที่ผลิตได้จะสามารถย่อยสลายชานอ้อยไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ประมาณ 0.26 กรัม/กรัม ซึ่งให้ผลดีกว่าเมื่อใช้ฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบหรือเปลือกถั่วเป็นสับสเตรท

Production of Fungal Xylanase from Agricultural Waste by Solid State Fermentation

Ancharida Svarachorn* and Napha Lotong**

*Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

**Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University

Abstract

Comparative studies on using rice straw, bagasse, rice husk, rice bran, corn cob or penut hull as substrate for enzyme production, indicated that Aspergillus No.4-45-1F produced highest xylanase activity on rice straw. Maximum enzyme activity was obtained when 1.2×10^5 spores/gm was grown at 40°C for 6 days on substrate containing 5 mesh size straw, supplemented with 0.8% NH_4NO_3 at 82% initial moisture. The optimal initial pH was found to be 4.5 Spore inoculum obtained either from culture grown on xylan agar medium or Czapek's agar medium, gave no effect on enzyme production. In addition to xylanase, substantial amount of cellulase was also detected on rice straw medium. Hydrolysis of various cellulosic wastes : rice straw, bagasse, rice husk, corn cob and penut hull by the crude enzyme showed that highest amount of reducing sugar (0.26 gm/gm) was obtained when cane bagasse was used as substrate.

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

cellulosic material โดยทั่วไปจะประกอบด้วย cellulose, hemicellulose และ lignin ในอัตราส่วน 4:3:3 โดยประมาณ (19) ฉะนั้นการใช้ cellulosic material อย่างมีประสิทธิภาพ จึงควรคำนึงถึงการใช้ประโยชน์จาก hemicellulose และ lignin ด้วย

องค์ประกอบหลักของhemicellulose คือ xylan (6) ซึ่งเป็น polymer ของน้ำตาล xylose (7) การย่อยสลาย xylan ด้วยกรดหรือเอนไซม์ xylanase จะได้เป็นน้ำตาล xylose ซึ่งสามารถนำไปผลิตสารที่มีประโยชน์อื่น ๆ ได้ อาทิเช่น จุลินทรีย์โปรตีน (18) ethanol (10, 11, 12) butanol ; 2,3-butanediol, acetic acid (15) glucose isomerase (4) ฯลฯ เนื่องจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีความจำเพาะ (specificity) สูงกว่า น้ำตาล xylose ที่ได้จึงบริสุทธิ์กว่าและไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษอันเนื่องจากสารเคมี การย่อยสลาย xylan ด้วยเอนไซม์จึงดีกว่าการย่อยด้วยกรด

จุลินทรีย์หลายชนิดทั้ง เชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีสสามารถผลิตเอนไซม์ xylanase (9, 13, 17) โดยมี xylan เป็นตัวเหนี่ยวนำ (inducer) ที่ดีที่สุด (7) และจากการที่เป็นที่ประจักษ์ว่าวัสดุเหลือทิ้งทางด้านเกษตรกรรมมี xylan เป็นองค์ประกอบอยู่มากถึง 15-30% (20) ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะผลิตเอนไซม์ xylanase จากเชื้อราโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมเป็นสารตั้งต้น (substrate)

อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์และการเพาะเลี้ยง

Aspergillus รหัส 4-45-1F แยกได้จากซังข้าวโพด ในบริเวณไร่สุวรรณวาจกสิกิจ อ.ปากช่อง นครราชสีมา เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ xylanase โดยจะผลิต

เอนไซม์ xylanase ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้น 4.5 และ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ เลี้ยง Aspergillus รหัส 4-45-1F นำไว้บน xylan agar slant ซึ่งประกอบด้วย larchwood xylan บริสุทธิ์ (บริษัท Sigma) 1%, NH_4NO_3 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.02%, yeast extract 0.02% และ agar 1.5% pH เริ่มต้น 4.5 ที่อุณหภูมิ 40 °ซ

การเลี้ยงเชื้อและการเตรียม crude enzyme

เชื้อเริ่มต้นใช้ Aspergillus รหัส 4-45-1F อายุ 5 วันในสภาพ spore suspension จำนวน 1.2×10^5 สปอร์/สับสเตรท (substrate) 1 กรัม

การศึกษาชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ทำโดยปลูกเชื้อ Aspergillus รหัส 4-45-1F ลงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบ เปลือกสับหรือรำข้าวบดละเอียดขนาด 20 meshes 5%, NH_4NO_3 0.2% yeast extract 0.02% pH เริ่มต้น 4.5 อาหารบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ในปริมาณฟลาสก์ละ 50 มล. แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบ gyrotary ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 6 วัน หาประสิทธิภาพในการย่อยสลาย xylan ของ crude enzyme ในน้ำเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โดยบวนการหมักแบบแห้ง ทำโดยปลูกเชื้อ Aspergillus รหัส 4-45-1F ลงในอาหารซึ่งประกอบด้วยฟางข้าวบดละเอียดขนาด 5 meshes 2.5 กรัม NH_4NO_3 0.1 กรัม yeast extract 0.01 กรัม ความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 80% pH เริ่มต้น 4.5 อาหารบรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อขนาด 100x15 มม. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °ซ ตามระยะเวลาที่จะศึกษา เมื่อครบระยะเวลาการบ่มเชื้อ นำมาแช่ใน 0.02 M citrate phosphate buffer pH 5.8 จำนวน 25 มล. เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที นำมาแยกกากและสปอร์ออกด้วยการกรองด้วยผ้ายาวบางและการปั่นแยก (centrifuge) น้ำส่วนใส (crude enzyme) ไปหาประสิทธิภาพในการย่อยสลาย xylan

การหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเอนไซม์

xylanase activity ใช้สารละลาย larchwood xylan บริสุทธิ์ (บริษัท Sigma) เข้มข้น 1% ใน 0.02 M citrate phosphate buffer pH 5.8 เป็นสับสเตรท

cellulase activity ใช้สารละลาย carboxymethyl cellulose เข้มข้น 1% เป็นสับสเตรท

ส่วนผสมของปฏิกริยาประกอบด้วยเอนไซม์ 0.5 มล. สับสเตรท 0.5 มล. ทำปฏิกริยาที่ 50 °ซ เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกริยาโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ reducing sugar ที่เกิดขึ้นโดยวิธี ของ Somogyi-Nelson (14)

คำจำกัดความของ 1 หน่วยเอนไซม์ 1 หน่วยเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ซึ่งสามารถย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาล xylose หรือ glucose 1 ไมโครกรัมภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

การศึกษาชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมที่ย่อยสลายได้ดีโดยเอนไซม์ที่ผลิตได้

แป้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมชนิดต่าง ๆ จำนวน 2 กรัม ในเอนไซม์ที่ผลิตได้ 80 มล. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกริยาโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำมาแยกกากออกด้วยการกรองด้วยผ้าขาวบางและการปั่นแยก นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณ reducing sugar และน้ำตาลหน่วยย่อยที่เกิดขึ้นด้วยวิธี paper chromatography แบบ ascending

Paper chromatography (2)

ตัวชะประกอบ acetonitril และ 0.1M ammonium acetate ในอัตราส่วน 4:1 ทำให้เกิดสีด้วยสารละลาย diphenylamine-aniline-phosphoric acid

ผลและวิจารณ์

1. วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ xylanase

Aspergillus รหัส 4-45-1F จะผลิตเอนไซม์ xylanase ได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้มากกว่าเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมชนิดอื่น ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนถึงประมาณ 90% (ภาพที่ 1) และไม่ผลิตเอนไซม์ xylanase เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน อาจเป็นเพราะในฟานอ้อยมี glucose อยู่เป็นปริมาณมาก (ภาพที่ 10-11) เชื้อจึงเลือกใช้ glucose ในการเจริญ

2. สภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ Aspergillus รหัส 4-45-1F

2.1 ปริมาณ yeast extract ที่เหมาะสม การเติม yeast extract ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนไม่มีผลใด ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของเชื้อราชนิดนี้ (ภาพที่ 2) แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี larchwood xylan บริสุทธิ์ (บริษัท Sigma) เป็นแหล่งคาร์บอน จะต้องเติม yeast extract ในปริมาณ 0.02% จึงจะผลิตเอนไซม์ xylanase ได้มากที่สุด (3) แสดงว่านอกจากฟางข้าวจะมีราคาถูกกว่า larchwood xylan บริสุทธิ์อย่างมากแล้ว ยังมีคุณภาพดีกว่าด้วย ถ้าจะนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ xylanase เพราะไม่จำเป็นต้องเติม yeast extract

2.2 ปริมาณ NH_4NO_3 ที่เหมาะสม เชื้อราชนิดนี้จะผลิตเอนไซม์ xylanase ได้มากที่สุดเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณ NH_4NO_3 เท่ากับ 0.8% (ภาพที่ 3) ซึ่งการทดลองก่อนหน้านี้ (3) พบว่า Aspergillus รหัส 4-45-1F ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นในระยะแรก pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจะลดลง แล้วหลังจากนั้น pH ก็จะค่อย ๆ สูงขึ้น พร้อมกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์ xylanase

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซึ่งแสดงว่าเชื้อราเหล่านี้อาจใช้ NH_4^+ เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญก่อน จึงทำให้ของน้ำเลี้ยงลดลงในตอนต้นและเมื่อ NH_4^+ หมดจึงใช้ NO_3^- และเชื้อนี้ผลิตเอนไซม์ xylanase ในระยะ stationary phase ดังนั้นถ้าปริมาณ NH_4NO_3 มากกว่า 0.8% เชื้อมี NH_4^+ เพื่อการเจริญมาก จึงผลิตเอนไซม์ได้น้อยลง

2.3 ปริมาณความชื้น (substrate moisture content) ที่เหมาะสม เชื้อราชนิดนี้จะผลิตเอนไซม์ xylanase ได้มากที่สุดเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีความชื้นประมาณ 82% (ภาพที่ 4) อาจเนื่องด้วยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้นต่ำ ๆ สปอร์ซึ่งใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นมี lag phase ที่ยาวกว่า (16) และเชื้อราชนิดนี้จะผลิตเอนไซม์ xylanase ในระยะ stationary phase (3) ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จึงต่ำกว่า แต่ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีความชื้นสูงเกินระดับนี้ปรากฏว่าอาหารจะจับตัวกันเป็นก้อนทำให้การถ่ายเทอากาศไม่ดีเท่าที่ควร เชื้อจึงเจริญได้น้อย ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จึงต่ำกว่าเช่นเดียวกัน

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี xylan บริสุทธิ์ เป็นแหล่งคาร์บอน หรือ Czapek's agar เตรียมเชื้อเริ่มต้นไม่มีผลใด ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของเชื้อนี้ (ภาพที่ 5) ทั้ง ๆ ที่เชื้อรานี้จะไม่ผลิตเอนไซม์ xylanase เลยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose เป็นแหล่งคาร์บอน (3)

2.5 ขนาดของฟางข้าวบดที่เหมาะสม เชื้อรานี้จะผลิตเอนไซม์ xylanase ได้มากที่สุดเมื่อฟางข้าวบดมีขนาด 5 meshes (ภาพที่ 6) อาจเป็นด้วยว่าฟางข้าวที่มีขนาด 4 มม. ที่ใช้นั้นมีพื้นที่ผิวเพื่อการเจริญของเชื้อน้อยกว่า ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จึงต่ำกว่า แต่ฟางข้าวบดขนาด 20 meshes เมื่อนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจะจับตัวเป็นก้อน ทำให้การถ่ายเทอากาศไม่ดี เชื้อเจริญเติบโตได้น้อย ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จึงต่ำกว่าเช่นเดียวกัน

2.6 ความจำเป็นในการนึ่งฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการปลูกเชื้อ การนึ่งหรือไม่นึ่งฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการปลูกเชื้อ ไม่มีผลใด ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase

024532

ของเชื้อนี้ (ภาพที่ 7) แสดงว่าไม่มีความจำเป็นที่จะต้องนึ่งฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อก่อน เพราะไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นเลย และการใช้ความร้อนปรับสภาพ (pretreat) cellulosic material เพื่อให้จุลินทรีย์ย่อยสลายได้มากขึ้นนั้น (8) มีผลต่อการย่อยสลาย cellulose มีใช่ xylan

2.7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม การเพิ่มเชื้อเริ่มต้นเป็น $1.2x10^6$ หรือ $1.2x10^7$ สปอร์/ฟางข้าว 1 กรัม ไม่มีผลใด ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของเชื้อนี้ (ภาพที่ 8) ดังควรเลือกใช้เชื้อเริ่มต้นเพียง $1.2x10^5$ สปอร์/ฟางข้าว 1 กรัม เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการเตรียมเชื้อเริ่มต้น

2.8 ปริมาณเอนไซม์ xylanase ที่ผลิตได้ในสภาวะที่เหมาะสม (ผลการทดลองจากข้อ 2.1-2.7) เชื้อรานี้จะผลิตเอนไซม์ xylanase สูงที่สุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง โดยผลิตได้เท่ากับ 168,108 หน่วยเอนไซม์/ฟางข้าว 1 กรัม ซึ่งนอกจากเอนไซม์ xylanase แล้วยังตรวจพบเอนไซม์ cellulase ด้วยในปริมาณ 3350 หน่วยเอนไซม์/ฟางข้าว 1 กรัม ซึ่งจากผลการเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ cellulase ที่ Aspergillus รหัส 4-45-1F ผลิตขึ้นกับที่ A.fumigatus Fres. (V_1) ซึ่ง นฤมล (1) รายงานว่าผลิตเอนไซม์ cellulase ได้สูงนั้น พบว่าปริมาณเอนไซม์ cellulase ที่ผลิตได้เท่า ๆ กัน นั่นแสดงว่า Aspergillus รหัส 4-45-1F นี้มีประสิทธิภาพสูงทั้งการผลิตเอนไซม์ xylanase และ cellulase อันจะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการนำเอา crude enzyme นี้ไปย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมซึ่งมี cellulose และ xylan เป็นองค์ประกอบหลักไปเป็น fermentable sugar ต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อไป

3. ผลการศึกษาชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมที่ย่อยสลายได้ดีโดยเอนไซม์ที่ผลิตได้

เอนไซม์ที่ผลิตได้ย่อยสลายฟางข้าวได้ดีที่สุด โดยปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวเท่ากับ 0.26 กรัม/ฟางข้าว 1 กรัม มากกว่าที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมชนิดอื่นที่ทดสอบถึงกว่า 60% (ภาพที่ 10) และจากการวิเคราะห์ด้วย paper chromatography พบว่า reducing sugar ส่วนใหญ่ที่ได้คือ glucose และ xylose (ภาพที่ 11)

เอกสารอ้างอิง

1. นฤมล เรืองฤทธินนท์. 2526. เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสของ Aspergillus fumigatus Fresenius (V_1) ที่แยกได้จากกองขยะ. กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

2. ปราโมทย์ ศิริโรจน์. 2521. การคัดเลือกสายพันธุ์และการเลี้ยงยีสต์ที่มีโปรตีนสูงในน้ำทิ้งจากขบวนการแปรรูปอาหารกึ่งเหลือง. กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

3. ฮัญชริดา ล่วารชร. 2524. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ xylanase และศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต. กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

4. Chan, W.R. and A.W. Anderson. 1980. Extraction of Hemicellulose from Ryegrass Straw for the Production of Glucose Isomerase and Use of the Resulting Straw Residue for Animal Feed. Biotech. Bioeng. 22:519-531.

5. Detroy, R.W.; R.L. Cunningham and A.I. Hermam 1982. Fermentation of Wheat Straw Hemicelluloses to Ethanol by Pachysolen tannophilus. Biotech, Bioeng. Symp. 12:8189.

6. Esteban, R.; J.R. Villanueva and T.G.Villa. 1982. β-D Xylanase of Bacillus circulans WL-12. Can. J. Microbiol. 28:733-739.

7. Hampton, F.A.; W.N. Hawarth and E.L. Hirst. 1929. Polysaccharides Part IV. The Constitution of Xylan. J.Chem.Soc. 1739-1753.

8. Jurasek, L. 1979. Dev. Ind. Microbiol. 20:177-183. in Mes-Hartree, M.; C.Hogan; R.D. Hayes and J.N. Saddler. 1983. Enzymatic Hydrolysis of Agricultural Residues by Trichoderma Cellulases and the Fermentation of the liberated Sugars to Ethanol. Biotech. lett. 5(2):101-106.

9. Lotong, N; V. Kitprechavanich; Y. Tani and H. Okada. 1980. Investigation of Xylanase Producing Microorganisms in Thailand. Proceeding of JSPS-NRCT Seminar on Agro-Industry Including Microbial Technology. Microbial Utilization of Renewable Resource. Osaka, Japan. 1:66-72.

10. Maleszka, R. and H. Schneider. 1982a. Fermentation of D-Xylose, Xylitol and D-Xylulose by Yeast. Can. J. Microbiol. 28:360-363

11. Maleszka, R. and H. Schneider. 1982b. Concurrent Production and Consumption of Ethanol by Cultures of Pachysolen Tannophilus Growing on D-Xylose. Appl. Env. Microbiol. 44(4):909-912.

12. Margaritis, A. and P. Bajpai. 1982. Direct Fermentation of D-Xylose to Ethanol by Kluyveromyces marxianus Strains. Appl. Env. Microbiol. 44(5):1039-1041.

13. Nakanishi, K.; T. Yasui and T. Kobayashi. 1976 a. A Preliminary Experiment on the Xylanase Production by Streptomyces sp. J. Ferment Technol. (Japan), 54:813-817.

14. Nelson, N. 1944. A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. J. Biol. Chem. 153:375-380.

15. Saddler, J.H.; E.K.C. Yu; M. Mes-Hartree; N. Levitin and H.H. Brownell. 1982. Utilization of Enzymatically Hydrolyzed Wood Hemicelluloses by Microorganisms for Production of Liquid Fuels. App. Env. Microbiol. 45(1):153-160.

16. Scott, W, J. 1957. Adv. Food Res. 7:83 in Nishio, N. and S. Nagai. 1980. Thermostable Cellulase Production by Taralomyces sp. in Solid-state Cultivation. Proceeding of JSPS-NRCT Seminar on Agro-Industry Including Microbial Technology. Microbial Utilization of Renewable Resources. Osaka, Japan 1:54-65.

17. Strobel, G.A. 1963. A Xylanase System Produced by Diplodia viticola. Phytopathology. 53:592-596.

18. Taniguchi, H.; Y. Kometani; M. Tanaka; R. Matsuno and T. Kamikubo. 1982. Production of Single-cell Protein from Enzymatic Hydrolyzate of Rice Straw. Eur. J. Appl Microbiol. Biotechnol. 14:74-80.

19. Tsao G.T. 1978. Cellulosic Material as a Renewable Resource. Proc. Biochem. 10(13):12-14.

20. Whistler, R.L. and C.L. Smart. 1953. Polysaccharide Chemistry. New York : Academic Press.

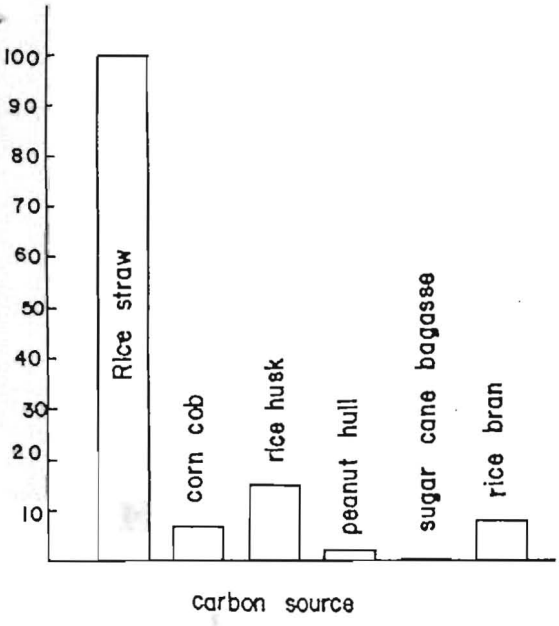


Fig 1 Effect of carbon source on xylanase production

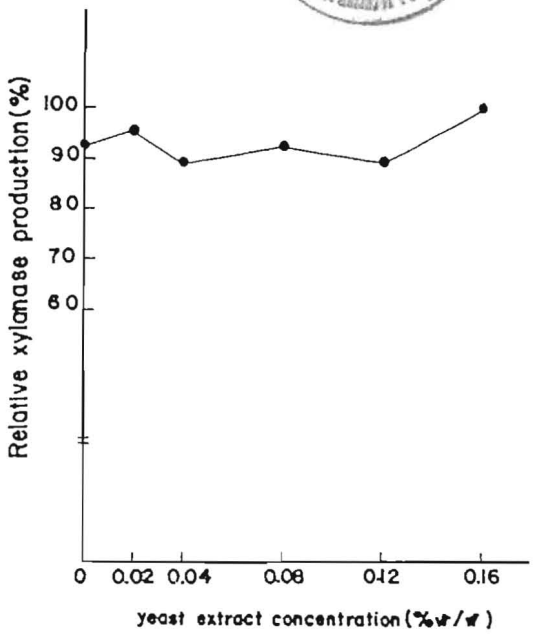


Fig 2 Effect of yeast extract concentration on xylanase production

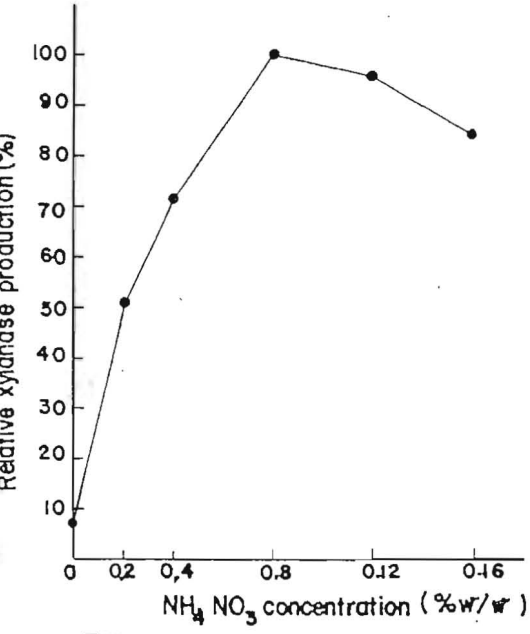


Fig 3 Effect of NH_4NO_3 concentration on xylanase production

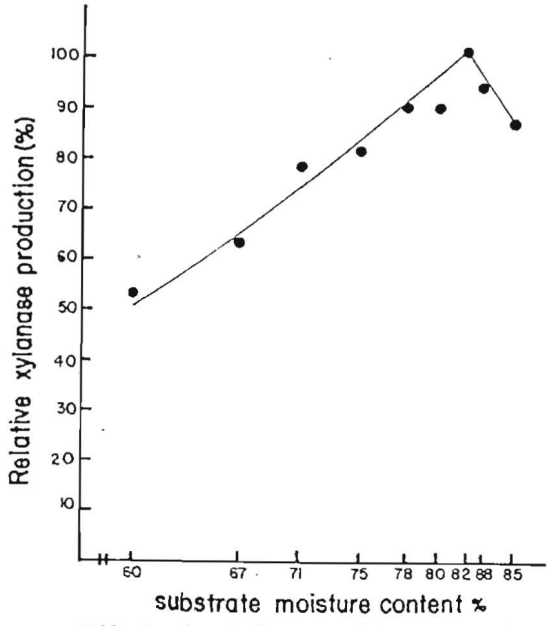
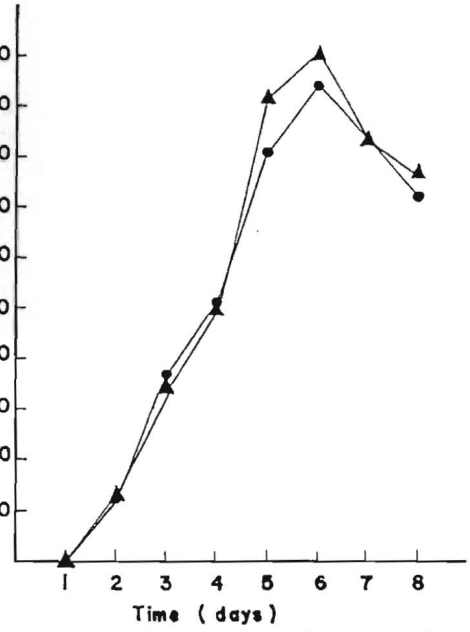


Fig 4 Effect of substrate moisture content on xylanase production



Effect of inoculum medium on xylanase production

- xylan agar medium
- Czapek's agar medium

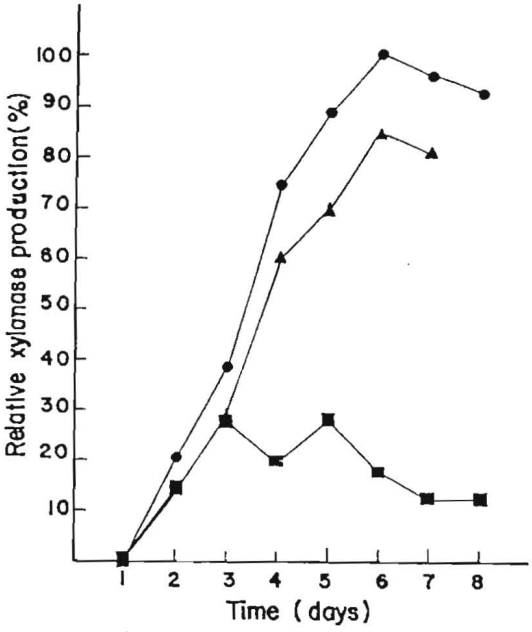
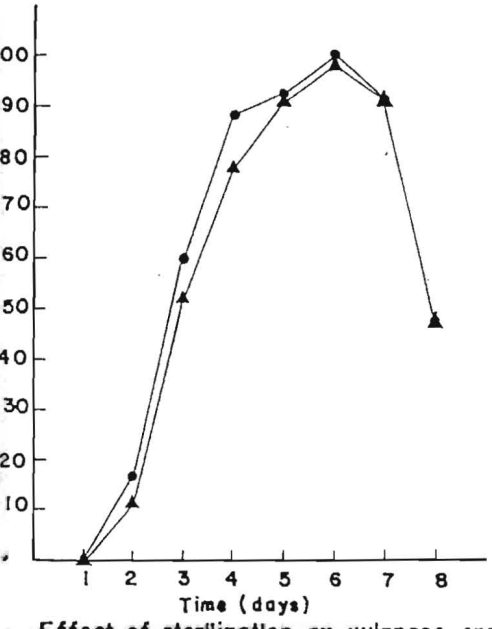


Fig 6 Effect of particle size of substrate on Xylanase production

- chopped rice straw (4 mm long)
- ground rice straw (5 meshes)
- ground rice straw (20 meshes)



7 Effect of sterilization on xylanase production

- steriled substrate
- unsteriled substrate

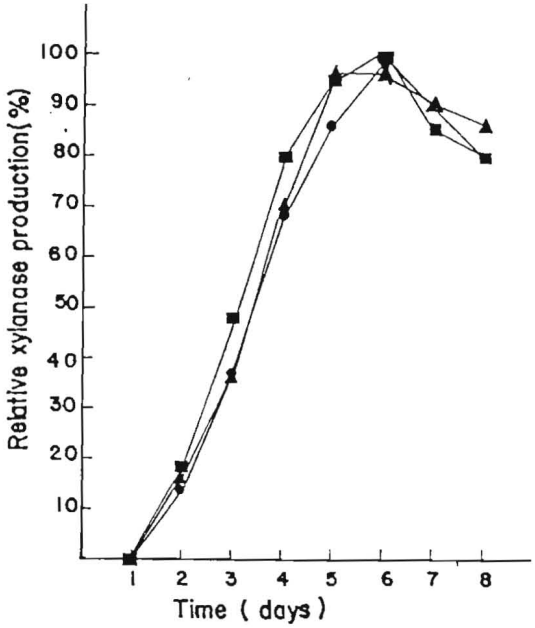


Fig 8 Effect of inoculum size on xylanase production

- 1.2 X 10^5 spores/gm
- 1.2 X 10^6 spores/gm
- 1.2 X 10^7 spores/gm

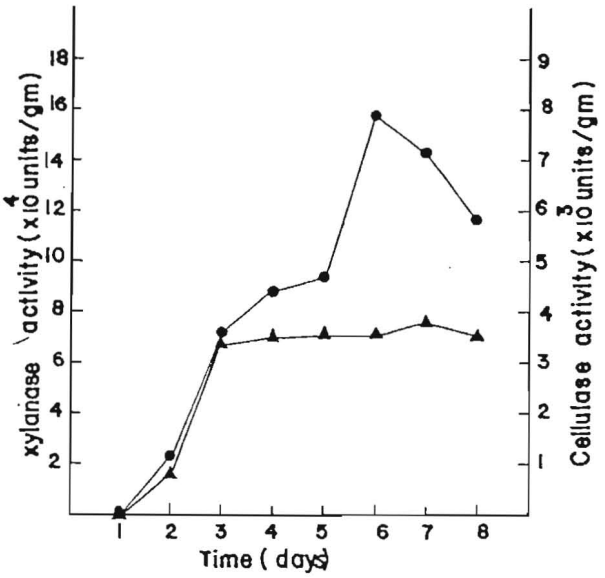


Fig 9 Xylanase and cellulase activity of Aspergillus No. 4-45-1F

—●— xylanase activity

—▲— cellulase activity

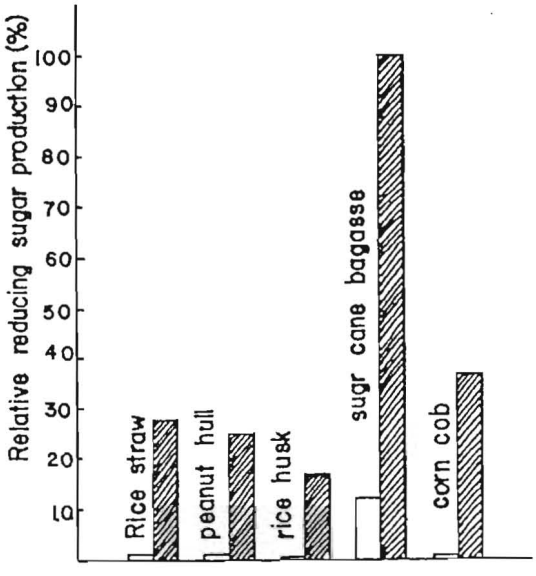


Fig 10 Effect of substrate on reducing sugar production

□ control

▨ with enzyme

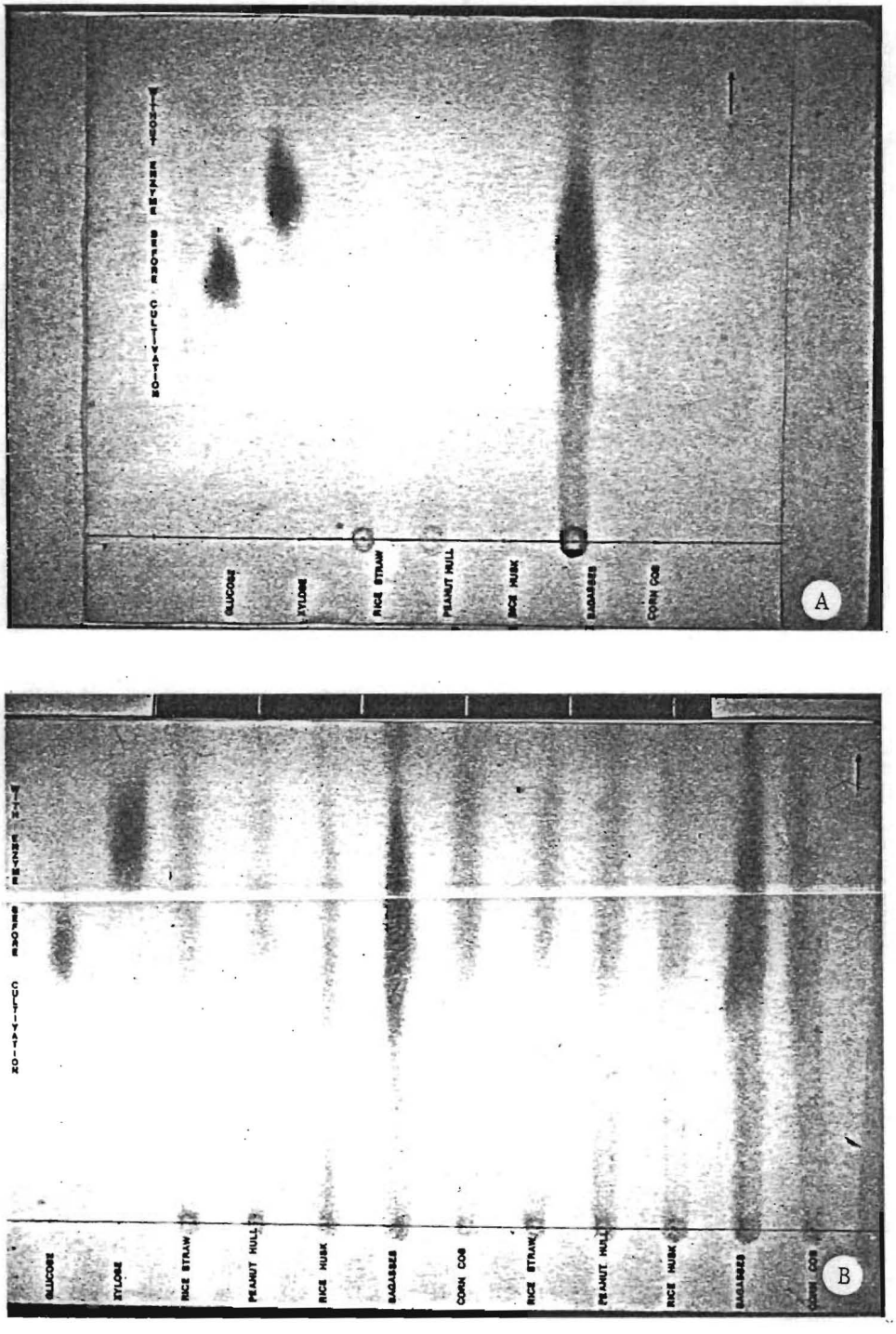


Fig 11. Paper Chromatogram of Agricultural-waste Hydrolyzate.

A. control

B. incubate with crude enzyme for 3 hrs. at 50°C