การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในอาหารแข็ง

ดุษณี ธนะบริพัฒน์, อรไท สุขเจริญ และ วิบูลย์ศรี เรืองทวีสิน

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

Abstract: Optimization Conditions for Xylanase Production from *Fusarium moniliforme* TISTR3175 Using Solid State Fermentation

Dusanee Thanaboripat, Oratai Sukcharoen and Wiboonsir Ruangtweesin

Department of Applied Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520

In this study, it was found that *Fusarium moniliforme* TISTR3175 produced xylanase activity at 917 units/g substrate on rice straw. When rice straw was pretreated with 1% sodium hydroxide for 0.5 h before using as substrate, *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 produced xylanase at 1,480 units/g substrate. When ammonium sulphate and urea were used as the nitrogen source, it was found that *Fusarium moniliforme* TISTR3175 could produce higher amount of xylanase on ammonium sulphate than on urea.

Key words: *Fusarium moniliforme* TISTR3175, xylanase, rice straw, pretreatment of rice straw

บทนำ

เอนไซม์ไซลาเนสเป็นไซโลโนไลติกเอนไซม์สามารถย่อยไซแลน โดยย่อยสลายโซ่หลักและปล่อยโมเลกุลของไซโลสออกมานอกเซลล์ จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งเชื้อรา แบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทสร้างเอนไซม์ไซลาเนส เพื่อย่อยสลายไซแลนให้กลายเป็นน้ำตาลไซโลสและโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่างๆ ได้ เนื่องจากแหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งอาหารที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (Mayorga, 2002) ซึ่งประเทศไทยมีวัตถุดิบทางการเกษตรหลากหลายชนิดที่มีราคาถูก ดังนั้นจึงเลือกใช้ ฟางข้าว รำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวามาเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 โดยการศึกษาสภาวะการทำพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยการแช่แหล่งคาร์บอนด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และการต้ม ซึ่งเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีคุณภาพ และปริมาณสูงกว่าจากพืชและสัตว์ (Godfrey and West, 1992) โดยเอนไซม์ไซลาเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิต และเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรททำให้หลีกเลี่ยงปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการได้และสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่น เพราะว่าเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ที่สามารถนำมาใช้อุตสาหกรรมหลายประเภท จึงมีการนำเอนไซม์ไซลาเนสมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นจนถึงปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้เอนไซม์ไซลาเนสมีประโยชน์สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ แทนการฟอกสีเยื่อกระดาษโดยการใช้สารเคมีประเภทคลอรีน (Sunna and Antranikian, 1997) ดังนั้นการใช้เอนไซม์ไซลาเนส จะช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมี อีกทั้งการใช้ไซลาเนสยังช่วยเพิ่มความสว่างของเยื่อกระดาษ (Gerand et al., 1993)

วิธีการ

1. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ถึง 7 วัน เพื่อให้สปอร์เจริญเต็มที่และนับจำนวนสปอร์ที่ใช้ให้มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2. การเตรียมสับสเตรท

2.1 การอบแห้ง

นำฟางข้าว ฐูปฤาษี และผักตบชวา มาล้างน้ำให้สะอาด หั่นให้ละเอียด มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (A.O.A.C, 1990) แล้วมาบดด้วยเครื่องบดอาหารจนละเอียด แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาด 0.2 มิลลิเมตร หรือช่วงขนาด 40 ถึง 60 เมช (mesh) และเก็บในขวดป้องกันความชื้น

2.2 การทำพรีทรีทเมนต์ ผักตบชวา รำข้าว และฟางข้าว ด้วยการต้ม

นำผักตบชวาที่หั่นแล้ว รำข้าว และฟางข้าว 240 กรัม เติมน้ำประปา 1,500 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำผักตบชวา รำข้าว และฟางข้าวที่อบแล้วมาปั่นให้ละเอียด ร่อนด้วยตะแกรงให้มีขนาด 40 ถึง 60 เมช (mesh) และเก็บในขวดป้องกันความชื้น

2.3 การทำพรีทรีทเมนต์ ผักตบชวา รำข้าว และฟางข้าวด้วยสภาวะการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1%

นำผักตบชวาที่หั่นแล้ว รำข้าว และฟางข้าวชั่งน้ำหนัก 40 กรัม เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1% จำนวน 250 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Zaho et al., 2002) นำมาล้างด้วยน้ำประปาจนสะอาด แล้ววัดพีเอชให้ได้ค่าที่ได้เป็นกลาง จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำมาปั่นให้ละเอียด ร่อนด้วยตะแกรงให้มีขนาด 40 ถึง 60 เมช (mesh) และเก็บในขวดป้องกันความชื้น

2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำพรีทรีทเมนต์รำข้าวและฟางข้าวด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1 และ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วชั่งรำข้าวและฟางข้าว 40 กรัม เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตรจำนวน 250 มิลลิลิตร โดยแปรผันระยะเวลาที่ใช้คือ 0.5, 1 และ 1.5 ชั่วโมง จากนั้นทำการแปรผันความเข้มข้นที่ใช้คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 1.5 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยเปรียบเทียบระยะเวลาการแช่รำข้าวและฟางข้าวเหมือนกับการแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

3.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

ชั่งไซแลน ฟางข้าว รำข้าว ฐูปฤาษี และผักตบชวา ที่เตรียมไว้ดังข้อ 2.1 น้ำหนัก 2 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติม feed solution ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 ลงในฟลาสก์โดยใช้ปริมาณเชื้อร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วัน เพื่อวิเคราะห์เอนไซม์ไซลาเนส เซลลูเลส และวัดการเจริญของเชื้อรา

3.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (Saxena, 1994) จากนั้นนำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมเชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน และนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลส

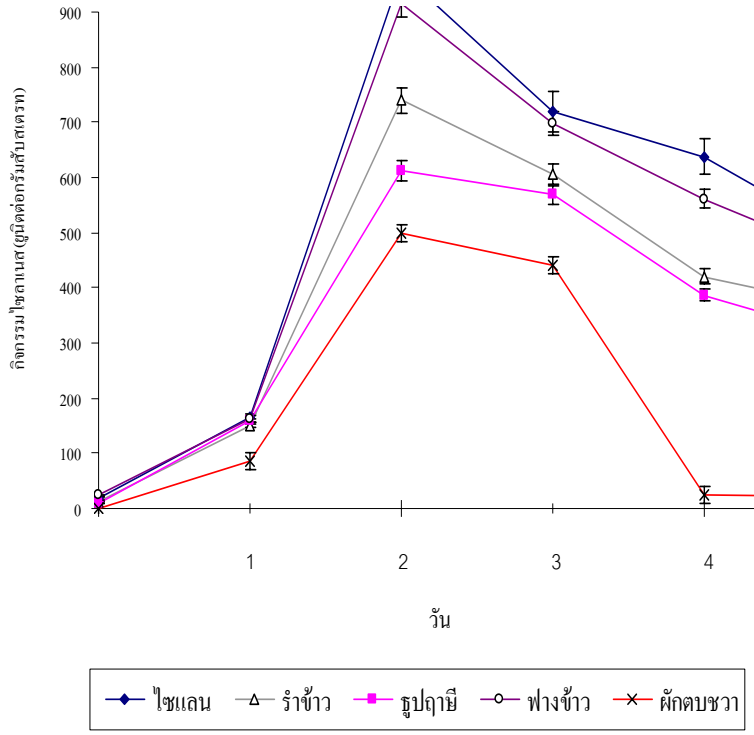
ผลการวิจัย

1. ผลการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Fusarium moniliforme TISTR 3175 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 โดยแหล่งคาร์บอนคือ ผักตบชวา ธูปฤาษี รำข้าว มีไซแลนเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่า เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุด รองลงมาคือการใช้ธูปฤาษี และผักตบชวา ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 917, 740, 611 และ 498 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ โดยเมื่อใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ค่ากิจกรรมไซลาเนสเฉลี่ยเท่ากับ 970 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ดังแสดงภาพที่ 1 จากผลการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยไซแลน ฟางข้าว รำข้าว และธูปฤาษี พบว่า ค่ากิจกรรมไซลาเนสจะสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 2 และลดลงตั้งแต่วันที่ 3 ถึง 5 โดยเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ส่วนผักตบชวาพบว่าค่ากิจกรรมไซลาเนส จะสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 3 และลดลงตั้งแต่วันที่ 4 ถึง 5 และผลิตเอนไซม์ไซลาเนสให้กิจกรรมสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 1)

จากผลการทดลองเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงสุดกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนจากรำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวา



ภาพที่ 1. กราฟแสดงกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR3175 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

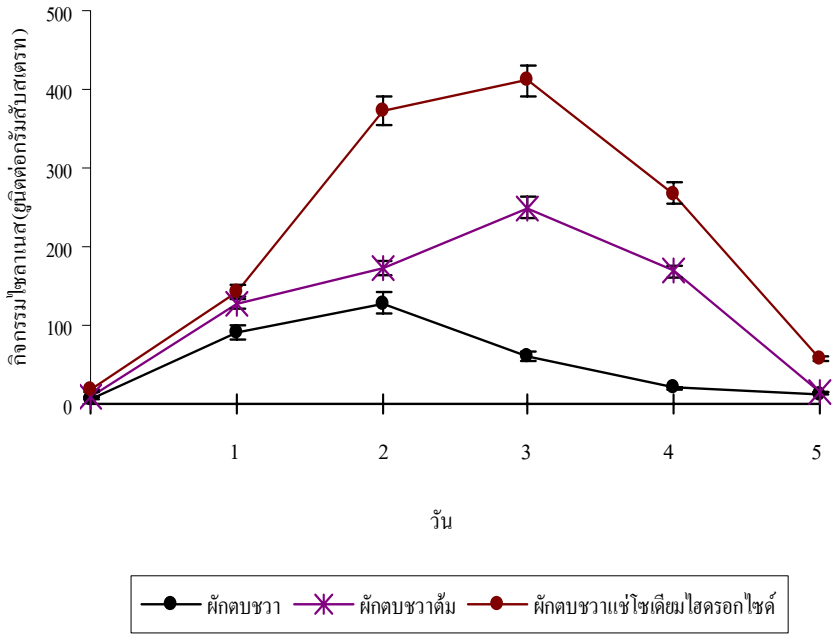
2. ผลค่ากิจกรรมไซลาเนสจากการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน ผักตบชวา รำข้าว และฟางข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ โดยการหมักด้วยเชื้อรา Fusarium moniliforme TISTR 3175

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์และพีเอชเท่ากับ 7.0 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ ผักตบชวาทำ พรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และผักตบชวาที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์

จากการศึกษาการใช้ผักตบชวาเป็นสับสเตรทในการพรีทรีทเมนต์ พบว่า เชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้ผักตบชวาแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือ ผักตบชวาต้ม

และ ผักตบชวา ตามลำดับ ซึ่งเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 410, 250 และ 130 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน คือ รำข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และรำข้าวที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือ รำข้าวต้ม และรำข้าว ตามลำดับ ซึ่งเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 1,100, 900 และ 800 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทตามลำดับ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2. ผลกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นผักตบชวาที่พรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับผักตบชวาที่ไม่พรีทรีทเมนต์

เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน คือ ฟางข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และฟางข้าวที่ไม่ทำพรีทรีทเมนต์ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือ ฟางข้าวต้ม และฟางข้าว ตามลำดับ ซึ่งเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 2,200, 1600 และ 1400 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ (ภาพที่ 4)

จากการเปรียบเทียบการพรีทรีทเมนต์ฟางข้าวด้วยการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 2 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 มีค่ากิจกรรมไซลาเนสได้สูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนอื่น

3. ผลค่ากิจกรรมไซลาเนสจากการเปรียบเทียบรำข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์ ด้วยเชื้อรา Fusarium moniliforme TISTR 3175

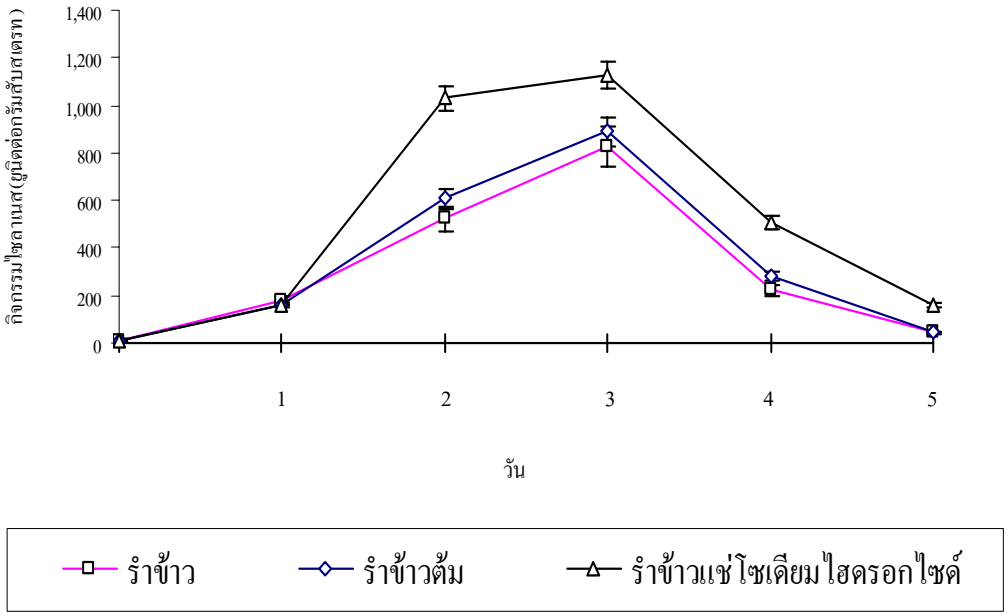
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์และพีเอชเท่ากับ 7.0 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ รำข้าวทำพรีทรีทเมนต์ด้วยการแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลอง พบว่า เชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 605 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนเมื่อใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็น

แหล่งคาร์บอน โดยแปรผันระยะเวลาในการแช่รำข้าวในโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่า ที่ระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 740, 689 และ 230 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ (ภาพที่ 5)

จากผลการทดลองโดยการแช่รำข้าวที่ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปรผันระยะเวลาแล้วพบว่าที่ระยะเวลาการแช่ 0.5, 1 และ 1.5 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดวันที่ 3 หลังการเพาะเลี้ยง และได้ค่ากิจกรรมสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 608, 629 และ 485 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ

จากผลการทดลองแปรผันความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้แช่รำข้าว พบว่า ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาการแช่ 0.5, 1 และ 1.5 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมสูงสุดวันที่ 2 หลังการเพาะเลี้ยง และได้ค่ากิจกรรมสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 403, 37 และ 212 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ

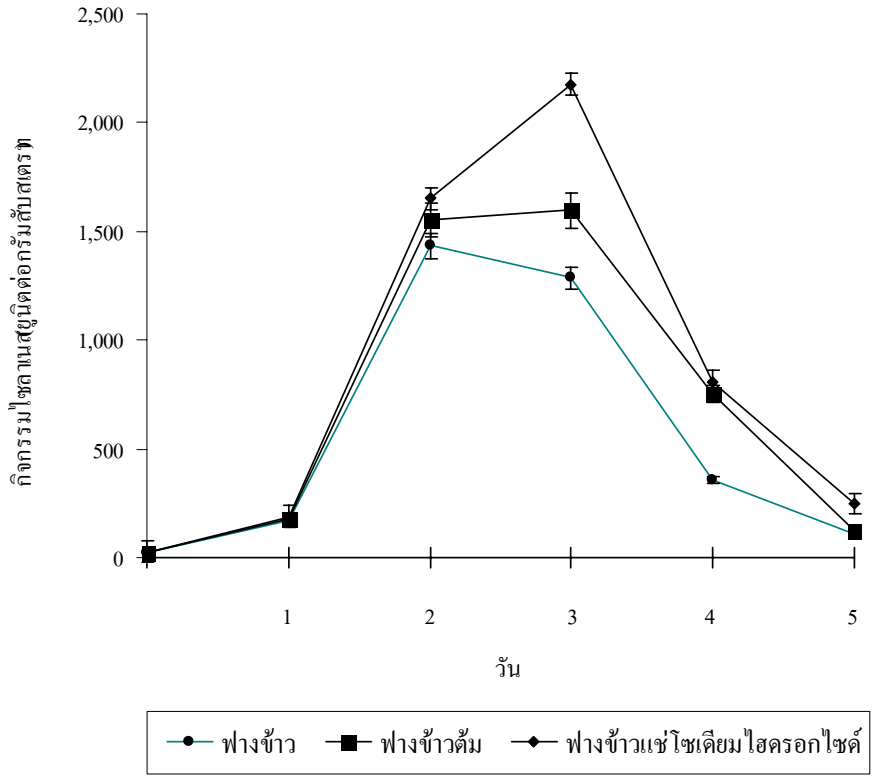


ภาพที่ 3. ผลกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นผักตบชวาที่พรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับผักตบชวาที่ไม่พรีทรีทเมนต์

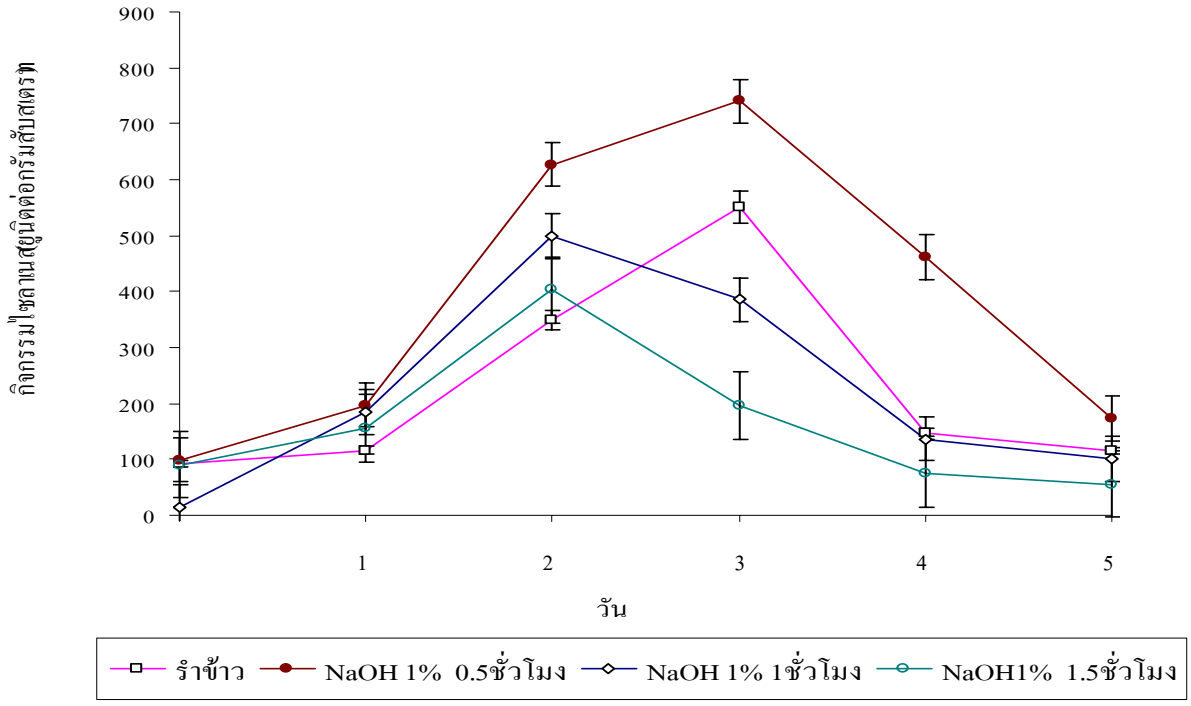
4. ผลค่ากิจกรรมไซลาเนสจากการเปรียบเทียบฟางข้าวที่ทำพรีทรีทเมนต์โดยการหมักด้วยเชื้อรา Fusarium moniliforme TISTR 3175

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์และพีเอชเท่ากับ 7.0 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ ฟางข้าวทำพรีทรีทเมนต์ด้วยการแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลอง พบว่า เชื้อรา *Fusarium moniliform* TISTR 3175 สามารถให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้ฟางข้าวเพาะเลี้ยงเชื้อราได้ค่ากิจกรรมเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 820 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนเมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันระยะเวลาในการแช่ฟางข้าวในโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่า ที่ระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์

ไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมีค่ากิจกรรมเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1,480, 1,373 และ 1,192 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 4. ผลกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์ด้วยการต้ม การแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ เปรียบเทียบกับฟางข้าวที่ไม่พรีทรีทเมนต์

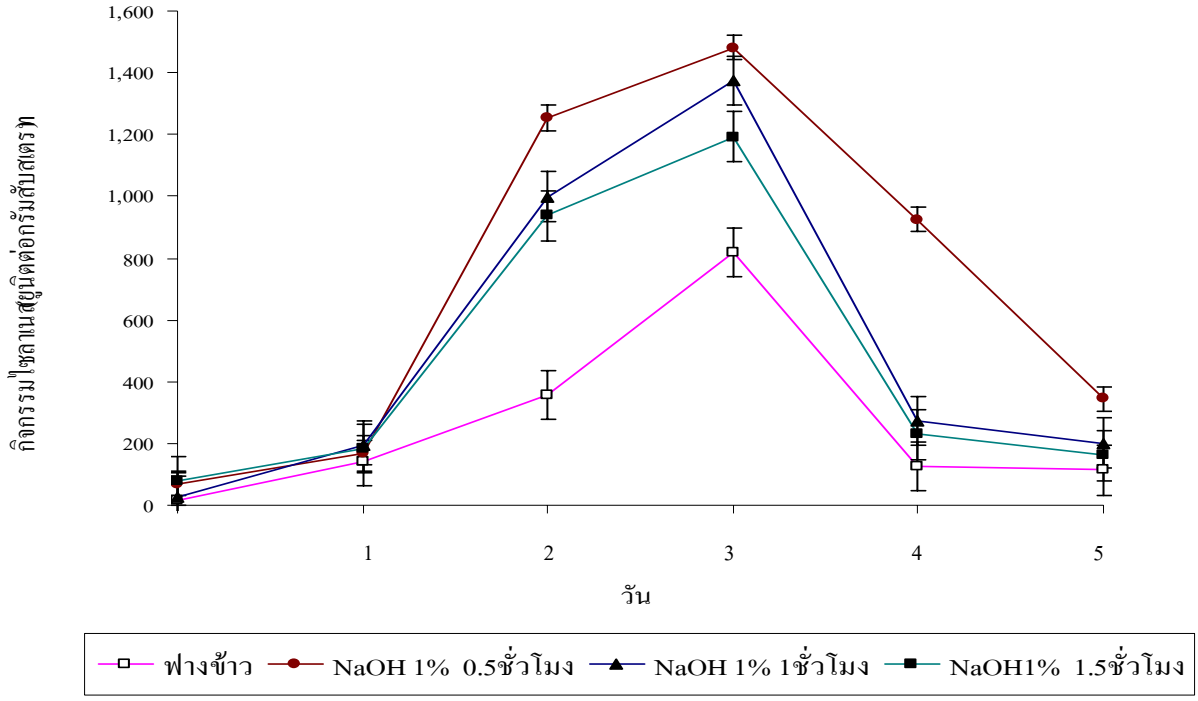


ภาพที่ 5. ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้รำข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลองเมื่อใช้ฟางข้าวที่แช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่แปรผันระยะเวลาการแช่ 0.5, 1 และ 1.5 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดหลังเพาะเลี้ยง 3 วัน และได้ค่ากิจกรรมสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 1,217, 1,134 และ 817 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ

เมื่อใช้ฟางข้าวที่แช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่แปรผันระยะเวลาการแช่ 0.5, 1 และ 1.5 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรา สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดหลังเพาะเลี้ยง 3 วัน และได้ค่ากิจกรรมสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 518, 485 และ 424 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ

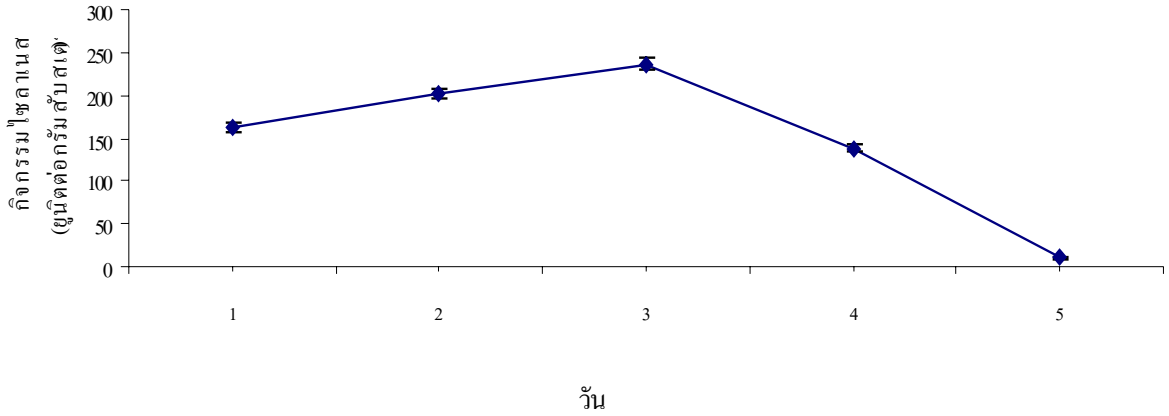
จากผลการทดลองแปรผันความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้แช่ฟางข้าว พบว่า ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาการแช่ 0.5 ชั่วโมง เมื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด รองมาคือที่ระยะเวลาการแช่ 1 ชั่วโมง และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสให้ค่ากิจกรรมไซลาเนสสูงกว่าการใช้ฟางข้าวที่มีการแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 6. ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

5. ผลการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Fusarium moniliforme TISTR 3175 โดยการประยุกต์ใช้แหล่งคาร์บอนคือ ฟางข้าว

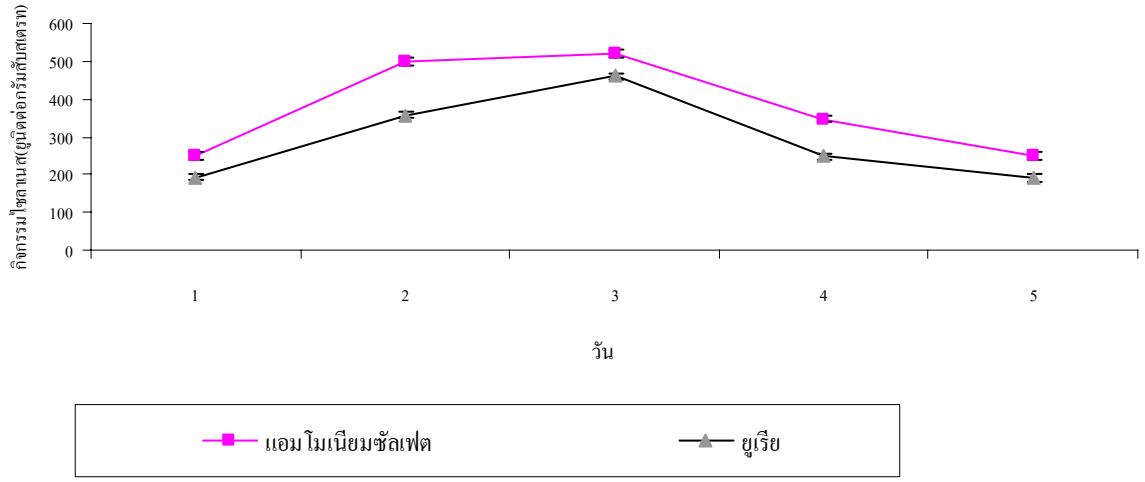
จากผลการทดลองใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 จะได้กิจกรรมไซลาเนสมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 162, 201, 236, 138 และ 102 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในวันที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ (ภาพที่ 7) จากงานวิจัยของ San et al. (2003) พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *Streptomyces actuosus* A-151 โดยใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมงได้ค่ากิจกรรมไซลาเนส 10.3 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนรำข้าวได้กิจกรรมไซลาเนส 6.6 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท หลังการเพาะเลี้ยง 4 วัน



ภาพที่ 7. ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR3175 จากการประยุกต์ใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

6. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยเพาะเลี้ยง *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เมื่อใช้รำข้าวเป็นสับสเตรท โดยมีความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ และมีแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตให้กิจกรรมไซลาเนสสูงกว่ายูเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 2 วัน โดยเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ได้กิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 520 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมไซลาเนส มีค่าเท่ากับ 460 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท (ภาพที่ 8) โดยเมื่อวัดกิจกรรมไซลาเนสของรำข้าวได้เท่ากับ 10 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และกิจกรรมเซลลูเลสของรำข้าวได้เท่ากับ 1 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท และผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 8. ผลของกิจกรรมไซลาเนส เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย โดยใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR3175

ตารางที่ 1. การเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

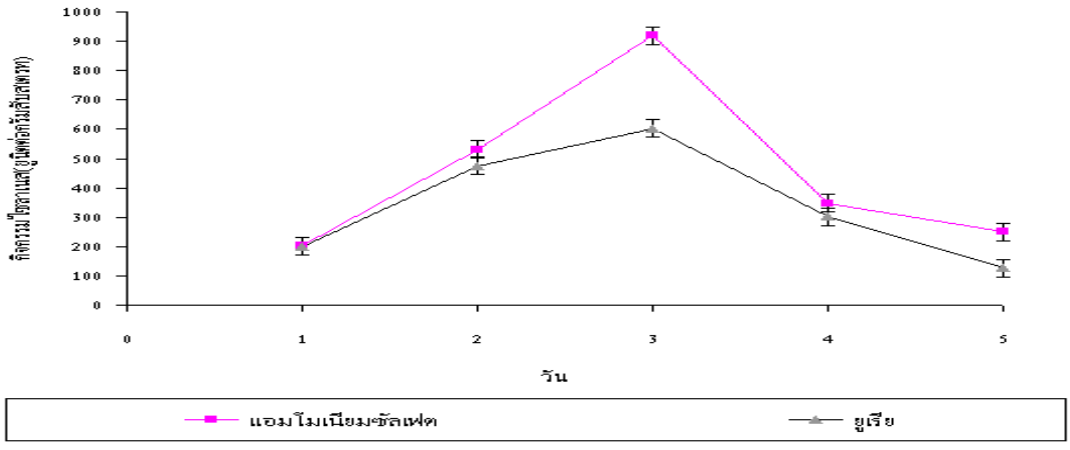
แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
แอมโมเนียมซัลเฟต	520[a]
ยูเรีย	460[b]

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสแตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย เมื่อใช้รำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อราสามารถผลิตไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมสูงกว่าเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (ภาพที่ 9) ทั้งนี้เพราะว่าในสารแอมโมเนียมซัลเฟตมีธาตุไนโตรเจนและกำมะถันสูงกว่ายูเรีย จึงทำให้เชื้อราใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีกว่าการใช้ยูเรีย

ปรางประไพ (2546) รายงานว่ากิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลสจากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเป็น 252.82 และ 4.15 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ และเมื่อใช้ยูเรียกิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลส เท่ากับ 161.53 และ 8.75 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ซึ่งการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงเช่นกัน

จากผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยเพาะเลี้ยง *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เมื่อใช้ฟางข้าวแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เวลา 0.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ และมีแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตให้กิจกรรมไซลาเนสสูงกว่ายูเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 3 วัน โดยเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้กิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 920 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ส่วนเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ได้ค่ากิจกรรมไซลาเนส มีค่าเท่ากับ 602 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 9. ผลของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสด้วยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย โดยใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 2. การเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนเมื่อใช้ฟางข้าวแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทางสถิติโดยวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท)
แอมโมเนียมซัลเฟต	920[a]
ยูเรีย	602[b]

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสไม่แตกต่างกัน
ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสแตกต่างกัน

บทสรุป

จากการเปรียบเทียบการใช้วัสดุชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงเชื้อ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงกว่าเมื่อใช้รำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวา ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากฟางข้าวมีเฮมิเซลลูโลสสูงกว่ารำข้าว ธูปฤาษี และผักตบชวา ส่วนผลการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจน แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อราสามารถผลิตไซลาเนสให้ค่ากิจกรรมสูงกว่าเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ทั้งนี้เพราะว่ามีธาตุไนโตรเจนและกำมะถันเป็นองค์ประกอบในแอมโมเนียมซัลเฟตสูงกว่ายูเรีย ส่วนการเปรียบเทียบการใช้ฟางข้าว รำข้าว ที่พรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่า เชื้อราสามารถผลิตไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมสูงกว่าการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนด้วยการต้มและการไม่พรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอน ซึ่งรำข้าวและฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมสูงกว่าการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เวลา 1 และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_648001 ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์อรไท สุขเจริญ ไว้ ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

ปรางประไพ รอดบำเรอ. 2546. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไซแลน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

A.O.A.C. 1990. Offical Methods of Analysis by the Association of official Analytical Chemists.15th ed. Washington D.C.

Gerand, A.W., F.P. Ronar and R.H. Denis. 1993. Enzyme in the animal-feed industry. *Trends Biotech.* 11: 424-430.

Godfrey, T. and S. West. 1992. The application of enzymes in industry. New York. *Indust. Enzymol.* 2: 132-141.

Mayorga, L. 2002. *Cellulomonas flavigena* characterization of an endo-1,4-xylanase activity tightly induced by sugar-cane-bagase. *Fems Lett.* 214: 250-290.

San, L. W., Y. Changc, A.Chingzu and D.C. Yue. 2003. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enz. Microb. Technol.* 33: 917-925.

Saxena, A. 1994. Production and characterization of a xylanase from *Cyathus stercoreus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 293-295.

Sunna, A. and T. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17: 39-67.

Zaho, J., X. Li., Y. Qu and P. Gao. 2002. Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw. *Enz. Microb. Technol.* 30: 734-740.