รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

2. **โครงการวิจัย** : การผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

   กิจกรรม : การโคลนยีน พัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และการผลิตเอนไซม์เพื่อผลิตพลังงานทดแทน

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* ด้วยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยกระบวนการหมักแบบแห้ง

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Production of Xylanase from *Aspergillus niger* using Agricultural waste by semi-solid fermentation

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน นางสาวภรณี สว่างศรีสังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นายพินิจ จิรัคคกุลสังกัด ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น

นายวุฒิพล จันทร์สระคูสังกัด ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น

5. **บทคัดย่อ**

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยกระบวนการหมักแบบแห้งด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* S068 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ โดยศึกษาใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เปลือกข้าวโพด, ฟางข้าว, กากชานอ้อย , Xylan เป็นสับเสตรท พบว่า ฟางข้าว เป็นสับเสตรทที่ดีที่สุด สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 5.985 ยูนิต/มิลลิลิตร ทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิ 30, 50 ,80 °C และทดสอบที่ pH10, 7 และ 4 พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 °C มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด 6.158 ยูนิต/มิลลิลิตร และ ที่ pH10 มีกิจกรรมเอนไซม์ 8.090 ยูนิต/มิลลิลิตร ทำการเก็บรักษาเอนไซม์ด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) พบว่าหลังจากทำการเก็บรักษามีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงไปเพียงเล็กน้อย

6. คำนำ

การผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสนั้นจำเป็นต้องใช้เอ็นไซม์ในการย่อยสลายวัตถุดิบให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลโดยใช้เอ็นไซม์ 2 กลุ่มคือเอ็นไซม์เซลลูเลส และเอ็นไซม์ไซลาเนส

ไซลาเนสเป็นเอ็นไซม์ที่มีบทบาทสำคัญมากชนิดหนึ่ง ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิดเช่น อุตสาหกรรมฟอกสีเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมอาหาร การผลิตไวน์ และอาหารสัตว์ เป็นต้น แต่ที่กำลังมีบทบาทมากได้แก่การผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวล ในการผลิตเอ็นไซม์นี้ใช้ไซแลนเป็นวัสดุหลักแต่ไซแลนบริสุทธิ์มีราคาสูงมาก จำเป็นต้องหาวัสดุอื่นที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงมาทดแทนซึ่งไซแลนหรือเฮมิเซลลูโลสนั้นเป็นองค์ประกอบหลักของพืชอยู่แล้วการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ส่วนใหญ่เป็นเซลล์พืชจึงได้รับความสนใจนำมาเป็นวัสดุทดแทนกันมากในปัจจุบัน วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศไทย มักมีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินโดยมีอัตราส่วนประมาณ 4:3:3 ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ตัวอย่างเช่น ฟางข้าว เปลือกและซังข้าวโพด กากชานอ้อย ทะลายปาล์ม เปลือกยูคาลิปตัส การนำวัสดุเหล่านี้มาใช้ในการผลิตเอ็นไซม์จะช่วยลดต้นทุนการผลิตได้โดยจะต้องศึกษาชนิดและรูปแบบที่เหมาะสมในการย่อยสลายวัสดุนั้น ๆ ให้พร้อมสำหรับการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อราที่นำมาผลิตเอ็นไซม์ต่อไป

เอ็นไซม์ไซลาเนสเป็นเอ็นไซม์ที่พบได้ตามธรรมชาติในกลุ่มจุลินทรีย์หลายชนิดเช่นแบคทีเรีย รา ยีสต์บางชนิดและแอคทิโนมัยซิส โดยส่วนใหญ่มักผลิตออกนอกเซลล์ ในการผลิตเอ็นไซม์นี้มีต้นทุนสูงมากถ้าใช้ไซแลนเป็นสับสเตรท การลดต้นทุนการผลิตเอ็นไซม์นี้ทำได้โดยการผลิตจากวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรที่มีอยู่มากดังกล่าว ด้วยการใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ที่คัดแยกจากดินในประเทศไทยและผ่านการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนสเบื้องต้นแล้วในห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งการผลิตเอ็นไซม์นั้นมีหลายเทคนิค ที่นิยมมากได้แก่ submerged fermentation (SmF) และ solid state fermentation (SSF) ในการทดลองนี้ต้องการศึกษาแนวทางการผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *A. niger* ด้วยเทคนิค solid state fermentation ซึ่งมีรายงานว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงโดยเฉพาะเมื่อใช้เชื้อราในการผลิต ให้ผลผลิตสูง ในต้นทุนที่ต่ำ และลดขั้นตอนการจัดการลงเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค SmF

การผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนสจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เทคนิค solid state fermentation เพื่อลดต้นทุนการผลิตลงให้สามารถแข่งขันได้ เนื่องจากเอ็นไซม์นี้ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่มีความสำคัญ โดยเฉพาะการผลิตไบโอเอทานอลจากพืชต่าง ๆ ตลอดจนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร การผลิตเอ็นไซม์นี้หากทำให้มีความง่ายไม่ซับซ้อน มีความปลอดภัย จะทำให้ขยายผลสู่วิสาหกิจชุมชนได้โดยตรงเพื่อให้เกิดการสร้างงานกระจายตามภูมิภาคต่าง ๆ ระดับชุมชน ส่งเสริมให้เกิดวิสาหกิจชุมชนด้านการผลิตพลังงานหมุนเวียนในท้องถิ่น ใช้ทรัพยากรในท้องถิ่นอย่างมีคุณค่า ขนาดของการผลิตไม่มากจนเกินไป หาวัตถุดิบได้ง่าย ไม่มีต้นทุนการขนส่ง นอกจากการผลิตเอ็นไซม์แล้วยังสามารถขยายผลไปสู่การผลิตไบโอเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสระดับชุมชนได้อีกด้วย ในการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเทคนิคการ

ผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนสปริมาณมากจากเชื้อรา *A. niger* ภายใต้กระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งประกอบด้วยการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสม สภาวะที่เหมาะสม การตรวจสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์ที่ผลิตได้และการศึกษาความคงตัวของเอ็นไซม์ในสภาวะที่ต่างกันเพื่อหาแนวทางในการเก็บรักษาเอ็นไซม์ให้มีประสิทธิภาพสูงเป็นเวลานาน การสร้างถังหมักแบบแห้ง (solid state fermentation) และการผลิตผลิตภัณฑ์เอ็นไซม์สำเร็จรูปเพื่อใช้ในการเกษตรและการผลิตพลังงานหมุนเวียนจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ

:

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

-เชื้อรา *Aspergillus niger*

-สารเคมีสำหรับการผลิตเอนไซม์ระดับชุมชน

-สารเคมีสำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีน

-สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับกระบวนการหมักแบบแห้งขนาด 100 ลิตร

วิธีปฏิบัติการทดลอง

การเตรียมเชื้อราเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น

เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ 1 % , 0.2% NH4NO3, 0.2% KH2PO4, 0.02% MgSO4-7H2O, 0.02% yeast extract, 1.5% Bacto-agar, ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 บ่มทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จนเกิดสปอร์ นำสปอร์มาละลายน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีปริมาณสปอร์ 1.2 x 10 5 สปอร์/สับสเตรท 1 กรัม

การคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

นำสารละลายสปอร์ที่ได้มาเติมลงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม สับสเตรทที่บดละเอียด 5 % ได้แก่ เปลือกข้าวโพด, ฟางข้าว, รำข้าว, กากชานอ้อย , 0.2% NH4NO3, 0.02% yeast extract ปรับค่า pH 4.5 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 วัน แล้วกรองเอาสารละลาย crude enzyme ไปตรวจสอบประสิทธิภาพเพื่อคัดเลือกชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสม

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A.niger* ด้วยเทคนิค solid state fermentation

เตรียมส่วนผสมอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเอนไซม์ด้วยสับสเตรทที่คัดเลือกได้ ปริมาณ 2.5 กรัม , yeast extract 0.01 กรัม ปรับความชื้นโดยใช้ สับสเตรท 80 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH 4.5 เติมสปอร์ของเชื้อรา *A.niger* s068 ที่ละลายน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีปริมาณสปอร์ 1.2 x 10^5 สปอร์/ml นำไปบ่ม ที่ระยะเวลาต่างกัน และอุณหภูมิต่างกัน นำอาหารที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเชื้อรามาละลายด้วย 0.02 M citrate phosphate buffer pH 5.8 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายที่ได้ และนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

การผลิตและแยกเอนไซม์บริสุทธิ์

ขยายขนาดการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็นปริมาตรรวมของสับสเตรทจำนวน 10-100 กิโลกรัม ในฟลาสก์หรือภาชนะที่เหมาะสม ในสภาวะ solid state fermentation แล้วชะเอนไซม์ด้วย 0.02 M citrate phosphate buffer pH 5.8 ในปริมาตรที่เหมาะสม เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที กรองแยกกากออกแล้วนำสารละลายที่ได้ไปตกตะกอนอีกครั้งด้วยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที จากนั้นนำครูดเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Affinity chromatography หรือเทคนิคอื่นที่เหมาะสม ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยการทำ SDS PAGE และ Active PAGE ต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่ได้มาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสโดยการย่อยไซแลนชนิดต่าง ๆ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ ด้วยวิธี DNS เทียบกับกราฟมาตรฐานพร้อมวัดปริมาณโปรตีนและคำนวณค่ายูนิตของเอนไซม์ที่ได้ และค่า อื่น ๆ เช่น kinetic activity ต่อไป

การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ภายใต้สภาวะต่าง ๆ

ตรวจสอบผลของพีเอชต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของไซลาเนสที่พีเอช 4.0-10.0 และอุณหภูมิระหว่าง 30 – 80 องศาเซลเซียส

การผลิตผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปและศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์

นำเอนไซม์ที่ได้มาทดสอบการบรรจุภัณฑ์และการทดสอบอายุของผลิตภัณฑ์ที่การเก็บอุณหภูมิต่าง ๆ และระยะเวลาต่างกัน ตรวจวัดประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์

-สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

-ระยะเวลาการทดลอง ปี 2559-2560

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

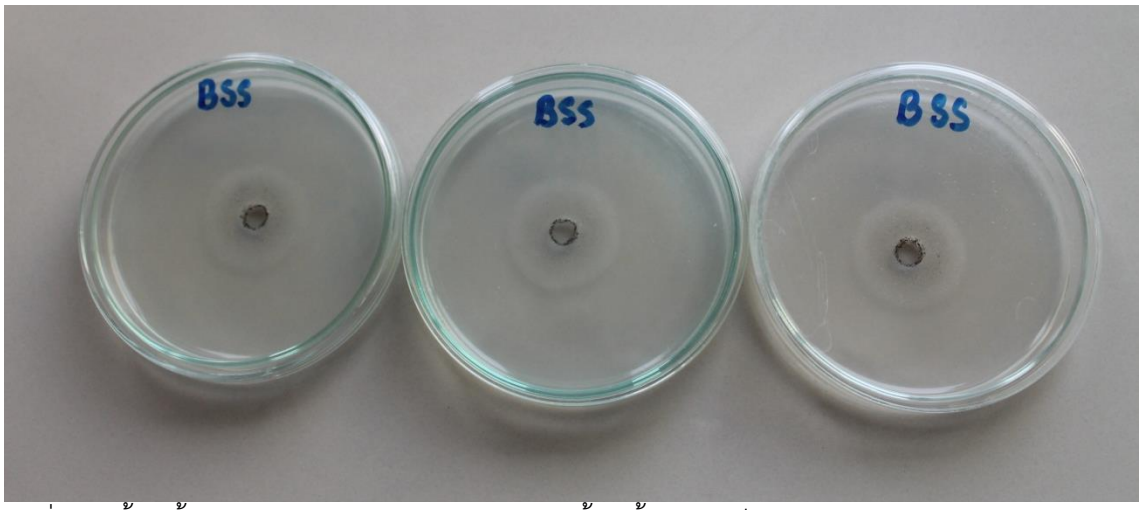
ผลการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารแข็ง

จากผลการทดลองการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารแข็ง โดยทำการย่อยสลายวัสดุด้วยเชื้อรา *A.niger* S068 ในอาหารแข็ง BSS และเติมสับสเตรทที่บดละเอียด 5 % ได้แก่ เปลือกข้าวโพด, ฟางข้าว, กากชานอ้อย , Xylan ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างวันที่ 3, 5 และ 7 ทำการย้อมคองโกเรด เพื่อดูลักษณะของวงใส ผลการทดลองพบว่า ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* S068 ในอาหาร BSS + เปลือกข้าวโพด มีวงใส มากที่สุด คือ 5.0 ซม. รองลงมาคือ ชานอ้อย, ไซแลน, ฟางข้าว และ BSS ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* 068ในอาหาร BSS + เปลือกข้าวโพด มีวงใส มากที่สุด คือ 8.5 ซม. รองลงมาคือ ไซแลน, ชานอ้อย, ฟางข้าว และ BSS ตามลำดับ และในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* S068 ในอาหาร BSS + เปลือกข้าวโพด, ไซแลน, ชานอ้อยมีวงใส มากที่สุด คือ 9.0 ซม. รองลงมาคือ, ฟางข้าว และ BSS ตามลำดับ

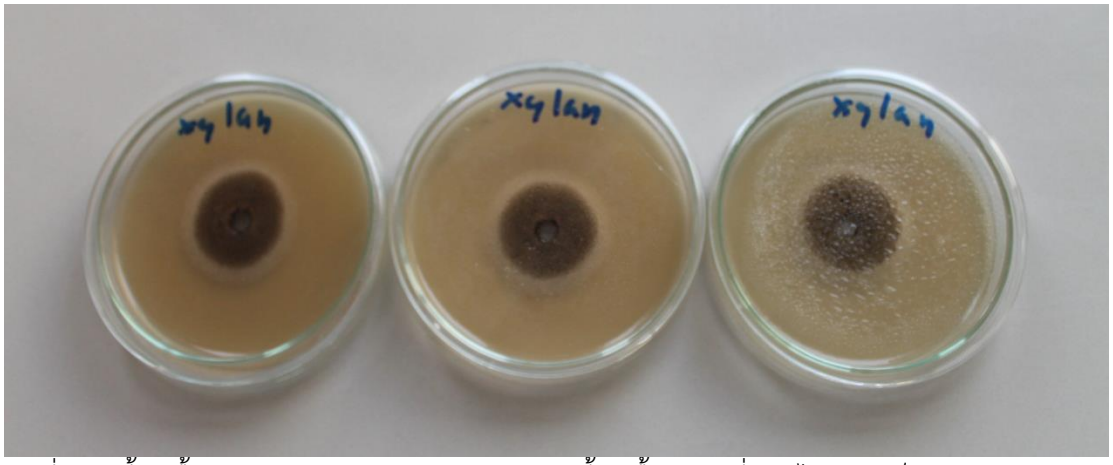
ผลการทดสอบการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในอาหารเหลว ในอาหารแข็ง BSS และเติมสับสเตรทที่บดละเอียด ได้แก่ เปลือกข้าวโพด, ฟางข้าว, กากชานอ้อย , Xylan ในอัตราส่วน 1:10 ผลการทดลองพบว่า การเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* S068 ในอาหาร BSS + ไซแลน มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ มากที่สุด คือ 4.268 mg/ml รองลงมาคือ ฟางข้าว, เปลือกข้าวโพด,ชานอ้อย, และ BSS ตามลำดับ

การทดลองพบว่าวัสดุที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดได้แก่ ไซแลน รองลงมาได้แก่ฟางข้าว แต่ฟางข้าวเป็นวัสดุที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น จึงเห็นสมควรว่าการใช้ฟางข้าวน่าจะเป็นวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

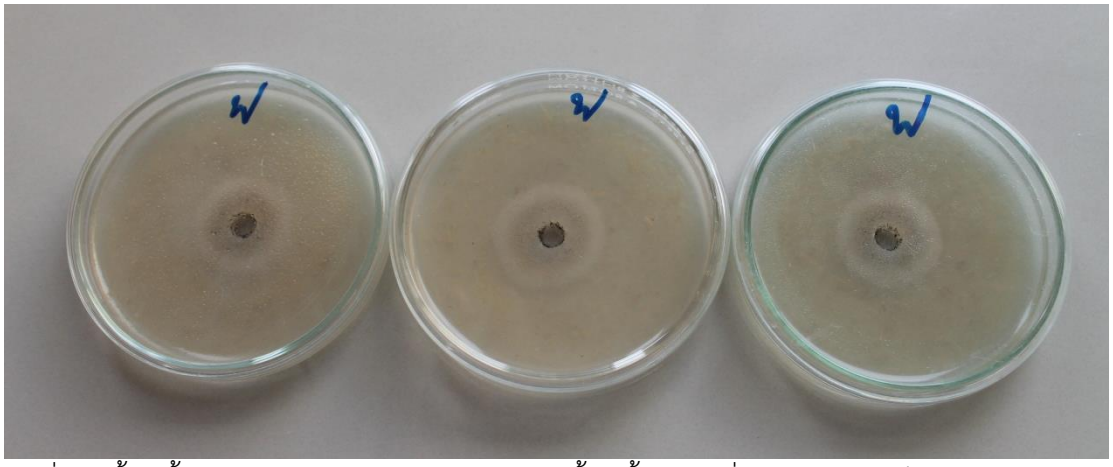
รูปภาพ ผล**การคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารแข็ง**



รูปที่ 1 เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BSS เป็นเวลา 3 วัน

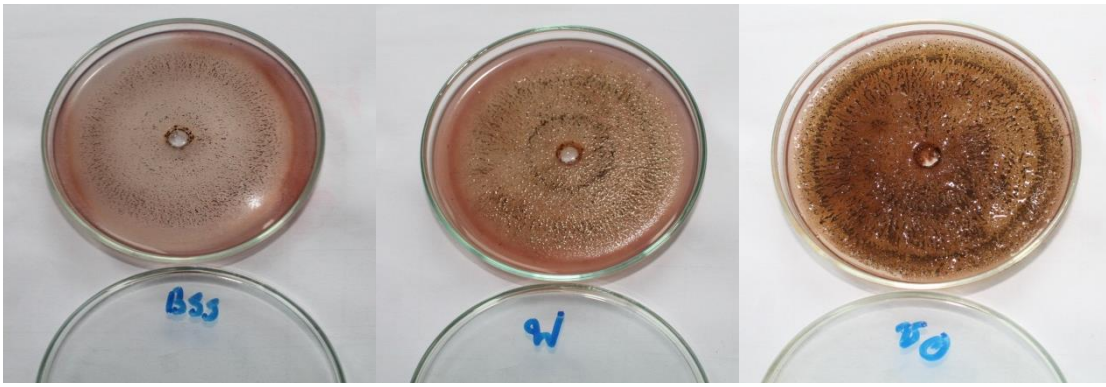


รูปที่ 2 เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BSS ที่เติม ไซแลน เป็นเวลา 3 วัน

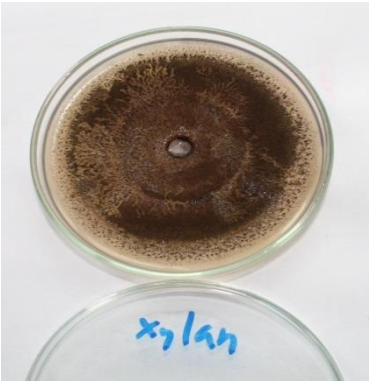


รูปที่ 2 เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BSS ที่เติม ฟางข้าว เป็นเวลา 3 วัน

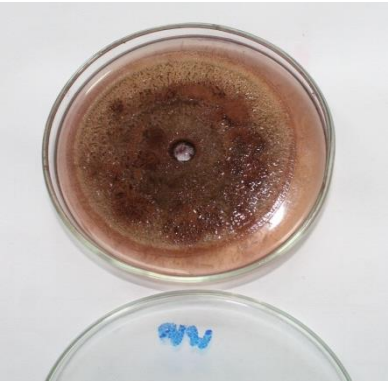
รูปภาพผลการย้อมคองโกเรด เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BSS ที่เติมสับเสตรทต่างๆเป็นเวลา 7 วัน



อาหาร BSS อาหาร BSS + ฟางข้าว อาหาร BSS + ชานอ้อย



อาหาร BSS + ไซแลน



อาหาร BSS + เปลือกข้าวโพด

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในอาหารแข็ง

วันที่	วัสดุ	ซ้ำ 1 (ซม.)	ซ้ำ 2 (ซม.)	ซ้ำ 3 (ซม.)	เฉลี่ย (ซม.)
3	BSS	2.9	3.0	2.9	2.93
	ฟางข้าว	2.9	3.3	2.9	3.03
	ไซแลน	3.9	3.9	4.0	3.93
	ชานอ้อย	4.8	5.0	5.0	4.93
	เปลือกข้าวโพด	5.0	5.0	5.0	5.00
วันที่	วัสดุ	ซ้ำ 1 (ซม.)	ซ้ำ 2 (ซม.)	ซ้ำ 3 (ซม.)	เฉลี่ย (ซม.)
5	BSS	5.7	5.5	5.6	5.60
	ฟางข้าว	6.0	5.7	6.0	5.90
	ไซแลน	9.0	7.0	7.4	7.80
	ชานอ้อย	8.0	7.5	7.7	7.63
	เปลือกข้าวโพด	8.5	8.5	8.5	8.50
วันที่	วัสดุ	ซ้ำ 1 (ซม.)	ซ้ำ 2 (ซม.)	ซ้ำ 3 (ซม.)	เฉลี่ย (ซม.)
7	BSS	8..5	8.5	8.3	8.43
	ฟางข้าว	8.4	8.5	8.4	8.43
	ไซแลน	9.0	9.0	9.0	9.00
	ชานอ้อย	9.0	9.0	9.0	9.00
	เปลือกข้าวโพด	9.0	9.0	9.0	9.00

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในอาหารเหลว

ชนิดวัสดุชีวมวล	ปริมาณวัสดุชีวมวล (กรัม)	อัตราส่วน	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)
ฟางข้าว	5	1:10	2.278
ชานอ้อย	5	1:10	1.269
ไซแลน	5	1:10	4.268
ข้าวโพด	5	1:10	2.247
BSS	0	0	0.012

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A.niger* ด้วยเทคนิค solid state fermentation

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเอนไซม์ด้วยสับสเตรทที่คัดเลือกได้ คือ ฟางข้าวบด ปรับความชื้นโดยใช้สับสเตรท 80 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH 4.5 เติมสปอร์ของเชื้อรา *A.niger* s068 ที่ละลายน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีปริมาณสปอร์ 1.2×10^5 สปอร์/ml นำไปบ่ม ที่ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า *A.niger* s068 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารฟางข้าวบด ที่ระยะเวลา 3 วัน มีปริมาณน้ำตาลไซโลส 19.411 mg/ml ได้ activity enzyme 4.310 U/ml ที่ระยะเวลา 5 วัน มีปริมาณน้ำตาลไซโลส 23.521 mg/ml ได้ activity enzyme 5.222 U/ml และ ที่ระยะเวลา 7 วัน มีปริมาณน้ำตาลไซโลส 26.954 mg/ml ได้ activity enzyme 5.985 U/ml

รูปภาพ ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A.niger* ด้วยเทคนิค solid state fermentation

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A.niger* ด้วยเทคนิค solid state fermentation

ตัวอย่าง (วันที่)	**xylose (mg/ml)**	**Act. (Unit/ml)**
3	19.411	4.310
5	23.521	5.222
7	26.954	5.985

การทดสอบประสิทธิภาพและความคงตัวของเอนไซม์

ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและความคงตัวโดยการย่อยไซแลน จาก birchwood ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ตรวจสอบผลของพีเอชต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของไซลาเนสที่พีเอช 4.0-10.0 และอุณหภูมิระหว่าง 30 – 80 องศาเซลเซียส วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ ด้วยวิธี DNS เทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณค่ายูนิตของเอนไซม์ที่ได้ ผลการทดลองประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 50 และ 80 °C พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดี ที่อุณหภูมิ 30 °C มีค่า activity enzyme เท่ากับ 6.158 U/ml และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทำให้ activity enzyme ลดลง ผลการทดลองประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่pH 10, 7 และ 4 พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดี ที่pH 10 มีค่า activity enzyme เท่ากับ 8.090 U/ml และเมื่อpH ลดลง และมีสภาพความเป็นกรดสูง คือ ที่ pH4 ทำให้ activity enzyme ลดลงเท่ากับ 0.324 U/ml

ดังนั้นเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จาก *A.niger* S068 ด้วยกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้ฟางข้าวบดเป็นสับเสตรท มีประสิทธิภาพในการทำงานที่ดีที่สุดที่ อุณหภูมิ 30 °C และ pH 10

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ตัวอย่าง	**xylose (mg/ml)**	**Act. (Unit/ml)**
Room Temp	19.122	4.246
80 °C	26.233	5.825
50 °C	26.843	5.960
30 °C	27.734	6.158

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ที่ pH ต่างๆ

ตัวอย่าง	xylose (mg/ml)	Act. (Unit/ml)
pH10	36.438	8.090
pH7	33.409	7.418
pH4	1.457	0.324

การผลิตผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปและศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์

นำเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จาก *A.niger* S068 ด้วยกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้ฟางข้าวบดเป็นสับเสตรทที่ได้มาทดสอบการบรรจุภัณฑ์ โดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dry) และตรวจวัดประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างเอนไซม์ก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง มี activity enzyme เท่ากับ 4.246 U/ml เมื่อทำการเก็บรักษาแล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ พบว่า activity enzyme ลดลง เท่ากับ 4.125 U/ml

ตัวอย่าง	xylose (mg/ml)	Act. (Unit/ml)
ก่อน	19.162	4.246
หลัง	18.579	4.125

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยกระบวนการหมักแบบแห้งด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* S068 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ โดยศึกษาใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เปลือกข้าวโพด, ฟางข้าว, กากชานอ้อย , Xylan การทดลองพบว่าวัสดุที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดได้แก่ ไซแลน รองลงมาได้แก่ฟางข้าว แต่ฟางข้าวเป็นวัสดุที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น จึงเห็นสมควรว่าการใช้ฟางข้าวน่าจะเป็นวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส สภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสด้วยกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้ฟางข้าวเป็นซับเสตรทบ่มที่อุณหภูมิ 37 C° เป็นเวลา 7 วัน สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 5.985 ยูนิต/มิลลิลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kavya และ Padmavathi (2009) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

ในการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ Aspergillus niger ในสภาวะการหมักแบบ solid state fermentation โดยทั้งสองต้องการผลิตเอนไซม์ด้วยวัสดุราคาถูก ได้แก่ รำข้าวสาลี กากถั่วเหลือง กากราจิ และ ขี้เลื่อย พบว่ารำข้าวสาลีได้เอนไซม์ปริมาณมากที่สุด ซึ่งสามารถนำมาทดแทนแหล่งคาร์บอนราคาสูงได้แก่ ไซแลนจากข้าวโอ๊ต และไซแลนจากเปลือกต้นเบิร์ช

การศึกษาการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ไซลาเนสที่อุณหภูมิ 30, 50 ,80 °C ที่อุณหภูมิ 30 °C มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด 6.158 ยูนิต/มิลลิลิตร และทดสอบที่ pH10, 7 และ 4 พบว่า และ ที่ pH10 มีกิจกรรมเอนไซม์ 8.090 ยูนิต/มิลลิลิตร ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pereira (2003) ซึ่งรายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *B.subtillis* จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 °C ขึ้นไป โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซลาเนสที่บ่มอุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่เพียง 20 % ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นอกจากนั้นยังมีไซลาเนสจากที่ผลิตได้จากแอคติโนมัยสีท ดังงานวิจัยของ Pearsai et al. (2014) ศึกษาไซลาเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces mexicanus* 901 โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่ง คาร์บอน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำไซลาเนสบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟฟี แบบเจลฟิวเทรชัน ซึ่งพบว่าไซลาเนสชนิดนี้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียสและที่พีเอช 3-6 งานวิจัยของ Liu et al. (2006) ศึกษาไซลาเนสจาก Aspergillus niger ซึ่งพบว่าทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 5 และสามารถย่อยเบิร์ชวู้ดไซแลน และรำข้าวได้ดี จากตัวอย่างงานวิจัยข้างต้นพบว่าไซลาเนสที่มีแหล่งที่มาต่างกัน มีสมบัติที่แตกต่างกัน จึงเป็นการเพิ่มทางเลือกในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้อย่างเหมาะสมและก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

การศึกษาเก็บรักษาทำการเก็บรักษาเอนไซม์ด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) พบว่าหลังจากทำการเก็บรักษามีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงไปเพียงเล็กน้อย ดังนั้นการเก็บรักษาด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์ไซลาเนส

10. เอกสารอ้างอิง

Alya Limayem , Steven C. Ricke , 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production : Current perspectives, potential issues and future prospects. Progress in Energy and Combustion Science. 38(4) : 449-467. http://www.Sciencedirect.com/science/article/pii/S0360128512000172.

Kavya, T. Padmavathi, Optimization of growth conditions for xylanase production by Aspergillus niger in solid state fermentation, Polish Journal of Microbiology 58 (2009) 125e130. [67]

Juturu, J.C. Wu, Microbial xylanases: engineering, production and applications, Biotechnology Advances 30 (2012) 1219e1227.

Zhu J.Y., Zhuang X.S., 2012. Conceptual net energy output for biofuel production from lignocellulosic biomass through biorefining. Progress in Energy and Combustion Science. 38(4) :583-598.

11. ภาคผนวก

การวิเคราะห์ ปริมาณกลูโคสโดยใช้ สาร Dinitrosalicylic acid (DNS)

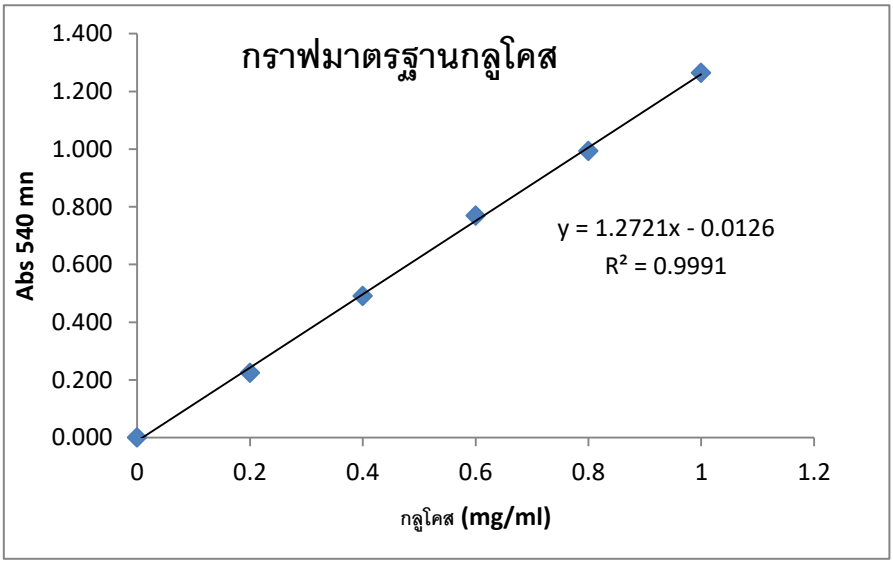
1 เตรียมสารละลายตัวอย่าง หรือ สารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยชั่งกลูโคส มา 0.1 กรัม ละลายน้ำกลั่นปรับริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml จะได้ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส 1.0 mg/ml จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-1.0 mg/ml

2 เติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml ในหลอด

3 เติม DNS reagent 0.5 ml ลงไปในหลอด

4 ต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อทำปฏิกิริยาแล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยการแช่น้ำแข็ง 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา

5 นำไปวัดค่า OD520 นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

6 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณจาก

$$\text{ความเข้มข้นกลูโคส} = \frac{(\text{ค่า OD520 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})}$$