การใช้ประโยชน์จากซังข้าวโพดโดยจุลินทรีย์
Microbial Utilization of Corncob

วิเชียร กิจปรีชาวนิช[1] กรรณิการ์ ดวงมาลย์[1]
สุนีย์ โชตินีรนาท[1] และ นภา โล่ห์ทอง[1]
Vichien Kitpreechavanich, Kannika Duangmal,
Sunee Choteneeranat and Napha Lotong

ABSTRACT

In this study corncob were used both as raw material for B-xylanase production by *Humicola lanuginosa* using solid state cultivation and for substrate of xylan hydrolysis by fungal enzyme. It was found that corncob contained not sufficient nitrogen source required for growth and enzyme production. Alkaline treated corncob supplemented with nutrients-resulted in more enzyme production than that untreated. Addition of 0.4 g wood xylan to the alkaline treated corncob medium enhanced 2.7 times in xylanase production, compared to the medium without addition. Using wheat bran as a component of the medium could replace the addition of nitrogen source and xylan. The maximum enzyme production was obtained from the medium consisted of alkaline treated corncob and wheat bran in ratio of 5:5. Enzymatic extraction of corncob xylan by H.lanuginosa xylanases was a comparable method to that of alkaline extraction. Pretreatment of corncob with 1% NaOH at 70°C for 1 h could enhance the liberation ob xylan corncob to about 80% hydrolysis. The degradative products obtained were mainly xylooligosaccharides.

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการใช้ประโยชน์จากซังข้าวโพดทั้งในด้านที่เป็นวัสดุเลี้ยงเชื้อ *Humicola lanuginosa* ในลักษณะ solid state เพื่อผลิตเอนไซม์ B-xylanase และเป็นแหล่งไซแลนสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา ผลปรากฏว่าซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมักที่ขาดสารอาหารไนโตรเจนที่จำเป็นต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ ซังข้าวโพดที่แยกลิกนินออกด้วยสารละลายด่างและเติมสารอาหารให้ปริมาณเอนไซม์สูงกว่าซังข้าวโพดที่ไม่ได้แยกลิกนินการเติมไซแลนจากไม้ 0.4 กรัม ลงในอาหารซังข้าวโพดที่ผ่านการแยกลิกนินด้วยด่างทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น 2.7 เท่า เมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่ได้เติม การใช้รำข้าวสาลีเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทดแทนการเติมแหล่งไนโตรเจนและไซแลนได้ เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อเติมรำข้าวสาลีลงในซังข้าวโพดที่แยกลิกนินออกด้วยด่างในอัตราส่วนที่เท่ากับ 5:5 การแยกสกัดไซแลนจากซังข้าวโพดด้วยการย่อยสลายโดยเอนไซม์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับการแยกสกัดด้วยด่าง การแยกลิกนินออกด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1% ที่ 70°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถย่อยสลายไซแลนได้สูงถึงประมาณ 80% และผลผลิตที่ย่อยได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล xylooligosaccharides

---

[1] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10903
Dept. of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University Bangkok 10903

คำนำ

การเปลี่ยนวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมประเภทลิกโนเซลลูโลสโดยกระบวนการทางจุลชีววิทยา (microbial technology) ให้เป็นสารที่มีราคาเป็นแนวทางหนึ่งในการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งฯ เช่น การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ (Chahal, 1985) นอกจากนั้นการแยกสกัดสารคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบหลักในวัสดุเหลือทิ้งฯ ก็เป็นการใช้ประโยชน์อีกรูปแบบหนึ่ง โดยใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารที่มีราคา หรือทำการย่อยเป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับกระบวนการอื่นต่อไป (Chen and Anderson, 1980, Bisaria and Ghose, 1981, Rosenberg, S.L., 1980, Tsao *et.al.,* 1982, Saddler, *et.al.,* 1983, Magee and Kosaric, 1985) ซังข้าวโพดจัดเป็นวัสดุเหลือทิ้งฯ ที่มีปริมาณมากชนิดหนึ่ง ในปี พ.ศ. 2533/34 ประเทศไทยได้เพาะปลูกข้าวโพดได้ผลผลิตเป็นอันดับ 4 คือประมาณ 4.5 ล้านตัน ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณซังข้าวโพดในปริมาณมาก แต่มีรายงานการใช้ประโยชน์ในปริมาณที่จำกัด ไซแลนเป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบหลักชนิดหนึ่งในซังข้าวโพดประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยไซแลน (xylan degrading enzymes) เป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่ศักยภาพสูงในการนำไปใช้ประโยชน์เช่น การฟอกขาวในกระบวนผลิตเยื่อกระดาษ, การลดความหนืดของอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมอาหารรวมถึงการย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาล xylose และ xylooligosaccharides ที่มีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด (Wond and Saddler, 1991) จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยไซแลน (Dekker and Richards, 1976) *Humicola lanuginosa* เป็นเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูง และเป็นสายพันธุ์หนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ endo-ß-xylanase (Kitpreechavanich *et.al.,* 1984) ดังนั้นในรายงานนี้ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุสำหรับเพาะเลี้ยง *H.lanuginosa* ในลักษณะ solid state เพื่อผลิตเอนไซม์ดังกล่าว นอกจากนั้นยังได้ศึกษาแนวทางและความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากไซแลนในซังข้าวโพดโดยทำการสกัดและย่อยสลายด้วยเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลสำหรับนำไปใช้ในกระบวนการอื่นต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์

เชื้อรา *Humicola lanuginosa* เจริญบนอาหาร wheat bran slant (รำข้าวสาลี 10%) บ่มที่ 45°ซ เป็นเวลา 7 วัน และเก็บรักษาในอุณหภูมิ 10°ซ

วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรม

ซังข้าวโพดที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีขนาดประมาณ 5 mesh โดยทำการบดด้วยเครื่อง grinding mill และแยกลิกนินด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1% ที่อุณหภูมิห้องตามวิธีการของ Detroy *et.al.,* (1981). ส่วนรำสีที่ใช้มีขนาดละเอียด (< 5 mesh)

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *H.lanuginosa* ด้วยกระบวน solid state

การเตรียม spore suspension เติมสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้น 0.1% ที่ปราศจากเชื้อ 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดเชื้อที่มีอายุ 7 วัน ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยสปอร์ให้กระจายสม่ำเสมอ เจือจางสปอร์ด้วย Tween 80 ความเข้มข้น 0.1% ให้มีสปอร์อยู่ในช่วง 10^5-10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

การเพาะเลี้ยง อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบ วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรม (ซังข้าวโพด, ซังข้าวโพดที่แยกลิกนินด้วยด่าง, รำข้าวสาลี) ปริมาณ 10 กรัม บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

ปรับความชื้นด้วยน้ำหรือสารละลายอาหาร (Kim *et.al.,* 1983) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร [สารละลายอาหารที่ใช้มี pH เท่ากับ 6 โดยประกอบด้วย (กรัม/ลิตร) ไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble xylan); 25, urea; 0.2; $(NH_4)_2SO_4$; 3.0 ; peptone; 6.0 ; KH_2PO_4 ; 4.0 ; $CaCl_2$; $2H_2O$; 0.6; $MgSO_4$ $7H_2O$,0.6; Tween 80; 0.2, $FeSO_47H_2O$, $1.5x10^{-3}$, $MnSO_4$ $4H_2O$; $0.468x10^{-2}$, $ZnSO_47H_2O$; $0.42x10^{-3}$, $CoCl_2$; $0.6x10^{-3}$] หลังจากกำจัดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 20 นาที เติม spore suspension ที่เตรียมไว้ฟลาสก์ใน 2 มิลลิลิตรเขย่าให้ทั่ว นำไปบ่มในตู้บ่ม 45°ซ เป็นเวลา 5 วัน ทำการสกัดเอนไซม์จากวัสดุหมักโดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ คนให้เข้ากัน และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาวัสดุหมักออกนำส่วนน้ำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 7000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์เอนไซม์ย่อยสลายไซแลนและรายงานเป็นหน่วยต่อมิลลิลิตร

การแยกสกัดไซแลน (เฮมิเซลลูโลส) จากซังข้าวโพด

ทำการแยกสกัดไซแลนจากซังข้าวโพดด้วยสารละลาย NaOH โดยแช่ซังข้าวโพด 10 กรัม ในสารละลายด่างความเข้มข้นต่าง ๆ (0-12%) ปริมาตร 100 มล. ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองซังข้าวโพดออกด้วยผ้าขาวบาง ล้างซังข้าวโพดด้วยน้ำกลั่นจนหมดด่าง นำไปอบแห้งเพื่อหาน้ำหนักที่เหลือ นำส่วนที่กรองได้และน้ำล้างมารวมกันและปรับ pH ด้วย HCl จนได้ pH เท่ากับ 5.0 ตกตะกอนไซแลนด้วยแอลกอฮอล์ 95% ในอัตราส่วนแอลกอฮอล์และสารละลายเท่ากับ 1:1 กรองตะกอนที่ได้และล้างตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ 70% จนไม่พบอนุมูลคลอรีน อบตะกอนภายใต้สูญญากาศที่ 50°ซ และนำไปชั่งหาน้ำหนักตะกอน ตะกอนที่ได้คือส่วนของเฮมิเซลลูโลสซึ่งมีไซแลนเป็นองค์ประกอบ นำตะกอนที่ได้ไว้วัดปริมาณไซแลนตามวิธีที่ดัดแปลงจาก AOAC โดย Chen and Anderson (1980)

ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไซแลนในซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์

สับสเตรต สับสเตรตที่ใช้ได้แก่ ไซแลนที่สกัดจากซังข้าวโพดด้วยสารละลายด่างและบดละเอียดให้มีขนาดเล็กกว่า 125 ไมครอน และซังข้าวโพดที่แยกลิกนินด้วย NaOH ความเข้มข้น 1%, H_2O_2 ความเข้มข้น 1% ในสารละลาย NaOH และ $NaClO_2$ ตามรายละเอียดที่อธิบายโดยวิเชียร สีสุข (2532)

เอนไซม์ เอนไซม์ที่ใช้เป็นเอนไซม์ผงที่ผลิตจาก *Humicola lanuginosa* และ *Aspergillus fumigatus* โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งอาหาร (Kitpreechavanich, 1984) ซึ่งได้รับอนุเคราะห์การผลิตจาก Shin Nihon Kagaku ประเทศญี่ปุ่น ละลายเอนไซม์ด้วยสารละลาย acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M, pH 5.0 สารละลายเอนไซม์จาก *H.lanuginosa* มีกิจกรรมของเอนไซม์ ß-xylanase เท่ากับ 73 หน่วยต่อมิลลิลิตรและ ß-xylosidase 14 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วน *A.fumigatus* มีกิจกรรมเอนไซม์ ß-xylanase เท่ากับ 54 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ ß-xylosisase เท่ากับ 115 หน่วย/มิลลิลิตร

ปฏิกิริยาการย่อยสลาย ส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้งหมด 5 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดรูปตัว L ประกอบด้วยสับสเตรต 0.1 กรัม ใน acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M, pH 5.0, NaN_3 0.001 กรัม และสารละลายเอนไซม์ของ *H.lanugosa* และ/หรือ *A.fumigatus* ตามรายละเอียดที่บ่งในผลการทดลอง บ่มปฏิกิริยาที่ *50*°ซ ในเครื่องเขย่าแบบ reciprocal เป็นเวลานาน 24 ชม.

โดยเก็บสารละลายผสมเป็นช่วง ๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลเพนโตสและน้ำตาลรีดิวส์

การวิเคราะห์

กิจกรรมของเอนไซม์ เอนไซม์ ß-xylanase วิเคราะห์ตามวิธีการได้อธิบายโดย (Kitpreechavanich *et.al.,* 1984) โดยใช้ Oat spelts xylan เป็นสับสเตรตโดยกำหนด 1 หน่วยของเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยไซแลนให้ได้น้ำตาลรีดิวส์ (โดยเทียบเป็นน้ำตาลไซโลส) เกิดขึ้น 1 ไมโครโมลภายใน 1 นาที ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ ß-xylosidase วิเคราะห์ด้วยวิธีของ John *et.al.,* (1977) โดยใช้ *p*-nitrophenyl-ß-xyloside ความเข้มข้น 2 mM เป็นสับเตรท วิเคราะห์ปริมาณ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้นด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโมเนตร กำหนด 1 หน่วยของเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายสับสเตรตและเกิด *p*-nitrophenol 1 ไมโครโมลภายใน 1 นาที

ความชื้น อบวัสดุหมักที่อุณหภูมิ 105° ซ ข้ามคืน คำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากน้ำหนักที่หายไป

การเจริญ วัดการเจริญในรูปของปริมาณ glucosamine เป็นมิลลิกรัมต่อวัสดุหมักแห้ง 1 กรัม โดยสกัด glucosamine จากวัสดุหมักที่อบแห้งตามวิธีของ Nishio *et.al.,* (1976) และวิเคราะห์ปริมาณ glucosamine โดยวิธีของ Morgan และ Elson ที่ดัดแปลงโดย Van de Loo (1976)

การวิเคราะห์น้ำตาล น้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยไซแลนซังข้าวโพดวิเคราะห์โดยวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol sulfuric (Dobois *et.al.,* 1956) น้ำตาลเพนโตสด้วยวิธี orcinol *(Herbert et.al.,* 1971) และน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952).

ผลการทดลองและวิจารณ์

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจาก *H.lanuginosa*

การใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก การผลิตเอนไซม์ด้วยการเพาะเลี้ยงในสภาพ solid state โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมเป็นแหล่งอาหารสามารถเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนการผลิตได้ (Chahal, 1985) การทดลองศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งอาหารสำหรับการผลิตเอนไซม์ ß-xylanase โดยเชื้อราที่ชอบร้อน *H.lanuginosoa* เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรานี้ในอาหารที่ใช้ซังข้าวโพดและซังข้าวโพดที่ผ่านการแยกลิกนินด้วยสารละลายด่างที่ปรับความชื้นให้ได้ 80% ด้วยน้ำ พบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อเลี้ยงในอาหารซังข้าวโพดที่เติมสารละลายหรือน้ำที่สกัดจากรำข้าวสาลี (ในอัตราส่วนน้ำ : รำข้าวสาลี 5:1) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เชื้อนี้สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ ß-xylanqse และมี ß-xylosidase เล็กน้อย ดังแสดงใน Fig. 1 จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าซังข้าวโพดไม่มีแหล่งอาหารที่เพียงพอที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของจุลินทรีย์ได้ การเติมสารอาหารทำให้เชื้อเจริญและผลิตเอนไซม์ โดยซังข้าวโพดที่แยกลิกนินออกด้วยด่างให้ปริมาณเอนไซม์ที่สูงกว่าซังข้าวโพดที่ไม่แยกลิกนินออก ซังข้าวโพดที่แยกลิกนินอกด้วยด่างไม่เพียงแต่ทำให้ปริมาณลิกนินลดลงเท่านั้น แต่ทำให้โครงสร้างของเซลูโลสและเฮมิเซลลูโลสพองตัว สามารถนำไปใช้ได้ง่ายขึ้น ดังนั้นจึงใช้ซังข้าวโพดที่แยกลิกนินด้วยด่างเป็นวัสดุหมักสำหรับการผลิตเอนไซม์ ß-xylanase ต่อไป

ผลของสารอาหาร แหล่งธาตุไนโตรเจนในสารละลายอาหารที่เติมลงในซังข้าวโพด ได้แก่

$(NH_4)_2SO_4$, peptone และ urea ซึ่งเมื่อคิดเป็นปริมาณสารที่เติมลงไปต่อซังข้าวโพด 10 กรัมเท่ากับ 0.12, 0.24 และ 0.008 กรัมตามลำดับ สารอาหารเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อย่างมาก $(NH_4)_2SO_4$ ผลการเจริญและการผลิตเอนไซม์ลดอย่างมากดังแสดงใน Table 1 รองลงมาได้แก่ peptone และ urea ซึ่งถึงแม้มีปริมาณเล็กน้อยก็ตาม จากการทดลองชี้ให้เห็นได้ชัดเจนว่าแหล่งธาตุไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่เติมในซังข้าวโพดที่แยกลิกนินจำเป็นต้องศึกษาปริมาณที่เหมาะสมต่อไป

เนื่องจากเอนไซม์ xylanase เป็น inducible enzyme ซึ่งการสังเคราะห์เกิดขึ้นได้ดีเมื่อมีสารชักนำเช่นไซแลน เมื่อใช้สารละลาย nutrient solution ที่ขาดไซแลนเติมลงในซังข้าวโพดที่ผ่านการแยกลิกนิน พบว่าเชื้อราเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ลดลง (Table 1) กล่าวคือ การเจริญที่วัดในรูปปริมาณ glucosamine ต่อวัสดุหมักลดลงจาก 57.2 เป็น 40 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมัก และปริมาณเอนไซม์ลดลงจาก 59 เป็น 22.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร ถึงแม้ว่าในซังข้าวโพดมีไซแลนเป็นองค์ประกอบ แต่การนำไปใช้โดยเชื้อรามีข้อจำกัดในเบื้องต้น ดังนั้นการเติมไซแลนจากภายนอกมีผลทำให้เกิดการชักนำในการสังเคราะห์เอนไซม์ได้เร็วขึ้นและเอนไซม์ที่สร้างขึ้นจะย่อยสลายไซแลนที่อยู่ในซังข้าวโพดเพื่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ต่อไป เมื่อศึกษาการเติมไซแลนที่อยู่ในสารละลายอาหารพบว่าปริมาณไซแลน 0.4 กรัมต่อซังข้าวโพด 10 กรัม ให้ผลผลิตของเอนไซม์สูงสุด ดังแสดงใน Fig. 2 การเพิ่มปริมาณไซแลนในระดับที่สูงกว่านี้ไม่ได้ทำให้สังเคราะห์เอนไซม์เพิ่มขึ้น

Table 1 Effect of addition nutrient solution to alkaline treated corncob on growth and ß-xylanase production by *H.lanuginosa* after 5 day cultivation.

nutrient solution	glucosamine (mg/g drysolid)	ß-xylanase (units/ml.)
complete	57.3	59.3
without $(NH_4)_2SO_4$	41.4	15.4
without peptone	42.9	33.9
without ureor	41.6	46.5
without xylan	40.9	22.6

ผลการเติมรำข้าวสาลี การเติมสารอาหารทั้งในรูปของสารไนโตรเจนและไซแลนในซังข้าวโพดที่แยกลิกนินด้วยด่างมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *H.lanuginosa* ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตจึงได้ใช้รำข้าวสาลีซึ่งมีแหล่งธาตุอาหารหลายชนิดมาเป็นส่วนผสมของวัสดุหมัก โดยทำการศึกษาอัตราผสมในอัตราส่วน ๆ ต่าง และปรับความชื้นด้วยน้ำที่ระดับความชื้นประมาณ 75-80 เปอร์เซ็นต์พบว่าอัตราส่วนของซังข้าวโพดที่แยกลิกนินต่อรำข้าวสาลีมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ß-xylanase ดังแสดงใน Table 2 อัตราส่วนระหว่างซังข้าวโพดกับรำข้าวสาลีที่ 5:5 เป็นอัตราส่วนที่เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดโดยเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 58.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร การลดปริมาณข้าวสาลีทำให้สารอาหารมีในระดับที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ ส่วนการเพิ่มปริมาณข้าวสาลีมีผลทำให้วัสดุเป็นก้อนและรูพรุนของวัสดุหมักลดลง มีผลทำให้การถ่ายเทอากาศลดลงและทำให้การเจริญและการผลิตเอนไซม์ลดลงด้วย

Table 2 *β*-xylanase production by *H.lanuginosa* after 5 day cultivation on 10 g. of medium in varioue. ratio between alkaline treated corncob (AC) and wheat bran (WB) using deionized water to adjust the initial moisture content.

AC:WB (g:g)	initial moisture content (%)	ß-xylanase (unit/ml)
10:0	81:2	no growth
8:2	79.7	6.3
6:4	78.3	43.1
5:5	76.1	58.4
4:6	76.4	40.6
2:8	71.8	27.0

อย่างไรก็ตามเมื่อใช้สารละลายอาหาร ที่ประกอบด้วยสารอาหารครบถ้วนและสารละลายอาหารที่ขาดสารต่อไปนี้อย่างใดอย่างหนึ่งคือ $(NH_4)_2SO_4$, peptone, ไซแลน เติมลงในวัสดุผสมระหว่างซังข้าวโพดที่แยกลิกนินและรำข้าวสาลี (5:5) พบว่าการเติมสารละลายอาหารที่ขาดสารดังกล่าวไม่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ เชื้อราสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ใกล้เคียงกับที่เติมสารละลายอาหารครบถ้วนได้ปริมาณ glucosamine ประมาณ 0.1 กรัมต่อกรัม วัสดุหมักและเอนไซม์ประมาณ 160 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงใน Fig. 3 ผลการทดลองชี้ให้เห็นการใช้รำข้าวสาลีเป็นส่วนผสมสามารถทดแทนการเติมไซแลนและแหล่งธาตุไนโตรเจนได้ อย่างไรก็ตามการเติมสารละลายอาหารให้ผลดีกว่าการใช้น้ำ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าในสารละลายอาหารอาจมีสารอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากสารดังกล่าวข้างต้น เช่นอนุมูลฟอสเฟตที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์

การแยกสกัดไซแลนจากซังข้าวโพดด้วยสารละลายด่าง

การแยกสกัดเฮมิเซลลูโลสรวมถึงไซแลนเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญในการใช้ประโยชน์จากสารคาร์โบไฮเดรทที่เป็นองค์ประกอบในซังข้าวโพด เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์และแยกออกจากสารอื่นซึ่งจะมีผลต่อการสลายด้วยเอนไซม์ตลอดจนความบริสุทธิ์ของผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสสามารถแยกสกัดด้วยสารละลาย NaOH และตกตะกอนแยกออกจากลิกนินด้วยแอลกอฮอล์ เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของ NaOH ต่อการแยกสกัดเฮมิเซลลูโลสจากซังข้าวโพดที่อุณหภูมิห้องพบว่าการแช่ซังข้าวโพดด้วยสารละลายในช่วงความเข้มข้น 8-10% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง สามารถสกัดเฮมิเซลลูโลสได้สูงสุดกล่าวคือประมาณ 2.2 กรัมต่อซังข้าวโพด 10กรัม (Fig. 4) เมื่อศึกษาระยะเวลาของการแช่สกัดซังข้าวโพดด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 8% พบว่าการแช่สกัดภายใน 8-10 ชั่วโมง ก็เพียงพอที่สกัดเฮมิเซลลูโลสได้สูงสุด

ตะกอนเฮมิเซลลูโลสที่ได้เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณ pentosan พบว่ามีประมาณ 67-70% ของน้ำหนัก เมื่อเทียบกับปริมาณ pentosan จากตะกอนของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดจากฟางข้าวไรน์พบว่ามีปริมาณใกล้เคียงหรือน้อยกว่ากล่าวคือจากฟางข้าวไรน์มีปริมาณ pentosan เท่ากับ 72-80% ของตะกอนที่ได้ (Chen and Anderson, 1980)

การย่อยสลายไซแลนที่สกัดจากซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (น้ำตาลไซโลส) จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิดคือ endo-ß-xylanase และ ß-xylosidase (Kitpreechavanich *et.al.,* 1986) เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A.fumigatus* มีเอนไซม์ดังกล่าว แต่เมื่อย่อยสลายไซแลนที่แยกสกัดจากซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์จาก *A.fumigatus* ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่าการใช้เอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร สามารถย่อยสลายไซแลนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การย่อย *(saccharification)* เท่ากับ 38 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์การย่อยเพิ่มเพียงเล็กน้อยเป็น 47 และ 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงใน Fig. 5 การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไม่ได้ทำให้การย่อยสลายเพิ่มขึ้น ทั้งนี้สาเหตุเนื่องจากเอนไซม์ *ß-xylanase* เป็นเอนไซม์ที่ไม่คงที่ที่อุณหภูมิสูง (อัญชริดา สวาชร, 2524) ดังนั้นจึงได้เติมเอนไซม์ *ß-xylanase* จาก *H.lanuginosa* ซึ่งคงทนที่อุณหภูมิสูง พบว่าการเติมเอนไซม์ดังกล่าวสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเป็น 1.8 เท่า ดังแสดงใน Table 3 การใช้เอนไซม์ผสมระหว่าง *A.fumigatus* และ *H.lanuginosa* สามารถเพิ่มการย่อยสลายของไซแลนที่สกัดจากซังข้าวโพด

Table 3 Effect of addition *H.lanuginosa* enzyme to the enzyme of *A.fumigatus* on the hydrolysis of xylan extracted from corncob.

amount of enzyme (ml)		Reducing sugars formed after incubation for (h)	
A.fumigatus	*H.lanuginosa*	12	24
0.5	—	ND	10.5
0.5	0.5	11.5	17.5
0.5	1.0	11.3	18.0

Condition : 2% substrate, 0.1 M acetate buffer (pH 5.0), 50°C.

การย่อยไซแลนในซังข้าวโพด

เมื่อพิจารณาถึงขั้นตอน ระยะเวลา ตลอดจนค่าใช้จ่ายในการแยกสกัดไซแลน (เฮมิเซลลูโลส) เพื่อนำมาเป็นสับสเตรตสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์นั้น เป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและเวลา การแยกสกัดไซแลนจากซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่น่าสนใจเนื่องจากความจำเพาะของการทำงานเอนไซม์ซึ่งไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้ชนิดอื่น (Magee and Kosaric, 1985) แต่การย่อยสลายไซแลนโดยในซังข้าวโพดโดยตรงด้วยเอนไซม์จำเป็นต้องหาวิธีแยกลิกนินและให้ไซแลนเหลืออยู่ในซังข้าวโพด นอกจากนั้นเอนไซม์ใช้ที่ย่อยสลายถ้าประกอบเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนจะให้ผลผลิตเป็นน้ำตาลผสมระหว่าง pentose และ hexose ซึ่งทำให้การนำไปใช้ประโยชน์อาจมีข้อจำกัด

H.lanuginosa ที่ศึกษาเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเฉพาะเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลน ดังนั้นการใช้เอนไซม์จากสายพันธุ์นี้ย่อยสลายซังข้าวโพดจึงเป็นการแยกสกัดและย่อยสลายเฉพาะไซแลนที่อยู่ในซังข้าวโพดเท่านั้น จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าการใช้สารเคมี สามารถแยกสกัดลิกนินได้และคงเหลือไซแลนในซังข้าวโพดในปริมาณที่สูงและอยู่ในรูปที่สามารถย่อยสลายได้ง่าย (วิเชียร สีสุข, 2532) ดังนั้นจึงใช้ซังข้าวโพดที่แยกลิกนินด้วยสารเคมีวิธีการต่าง ๆ เป็นสับสเตรต พบว่าซังข้าวโพด

ที่ไม่ได้ผ่านการแยกลิกนินนั้น ประสิทธิภาพการย่อยสลายค่อนข้างต่ำ ส่วนซังข้าวโพดที่ผ่านการแยกลิกนินด้วยวิธีการต่าง ๆ นั้น ประสิทธิภาพการย่อยสลายเพิ่มขึ้น ดังแสดงใน Table 4 เมื่อคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นเทียบกับปริมาณเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในซังข้าวโพด จะเห็นว่าปริมาณเฮมิเซลลูโลสถูกย่อยสลายอยู่ในรูปของน้ำตาลที่ละลายน้ำได้ระหว่าง 50-80% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีแยกลิกนิน ซังข้าวโพดที่ผ่านการแยกลิกนินด้วย NaOH ความเข้มข้น 1% ที่ 70° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง น่าจะเป็นสับสเตรตที่เหมาะสมสำหรับการย่อยไซแลนที่เหลือยู่ในซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์ของ *H.lanunginosa* เมื่อพิจารณาอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลรีดิวส์และน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลที่ได้ส่วนใหญ่เป็น oligosaccharides ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจาก *H.lanuginosa* เป็นแบบ endo type น้ำตาลที่ย่อยได้คิดเป็นน้ำตาล pentose ปริมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ การทดลองชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์จาก *H.lanuginosa* นี้สามารถแยกสกัดไซแลนจากซังข้าวโพดที่แยกลิกนินด้วยด่างได้ และให้น้ำตาล xylooligosaccharides ที่สามารถนำไปใช้เป็นสับสเตรตสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ß-xylosidase จาก *A.fumigatus* เพื่อผลิตน้ำตาลไซโลส หรือสามารถนำไปใช้เพื่อเป็นส่วนประกอบของอาหารและเครื่องดื่ม

การศึกษาในเบื้องต้นนี้ชี้ให้เห็นความเป็นไปได้ในการย่อยสลายไซแลนที่มีอยู่ในซังข้าวโพดที่ผ่านการแยกลิกนินให้เป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์จาก *H.lanuginosa* การย่อยสลายไซแลนในซังข้าวโพดที่แยกลิกนินด้วย NaOH ที่ 70°C โดยเอนไซม์จะได้มีการศึกษาโดยใช้ตัวปฏิกรณ์เอนไซม์ (enzyme reactor) เพื่อหาสภาพและปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาล xylooligosaccharides ต่อไป

Table 4. Effect of chamical pretreatment on hydrolysis of Xylan corncob by *H. lanuginosa xylanases.*

pretreatment	%hemi-cellulose	Sugar liberated (mg/ml)		% Extent of hemicellulose hydrolysis
		Total sugar	Reducing sugar	
none	39.7	0.56	0.4	4.9
1% NaOH 35·C,1h	33.4	6.9	3.4	50.8
1% NaOH 70·C,1h	29.2	10.3	4.6	78.8
1% H_2O_2, pH 11.5 70·C, 1h	25.0	9.6	4.0	80.0
$NaC10_2$ 70·C, 2h	28.9	9.3	2.9	50.1

* Source : W.Srisuk 1989, Master's Thesis, kasetsart University.
Condition : The reaction mixture (5ml) contained 2% of substrate in 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) and 1 ml of *H.lanuginosa* xylanases. The reaction was incubated at 50·C for 24 h.

เอกสารอ้างอิง

วิเชียร สีสุข, 2532. การย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรมด้วย เอนไซม์ จาก *Aspergillus fumigatus* fresenius รหัส 4-45-1F. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อัญชริดา สวารชร, 2524. การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ xylanase และศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Bisaria, V.S. and T.Ghose. 1981. Biodegradation of cellulosic meterials : substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme Microb. Technol. 3 : 90-103.

Chahal, D.S. 1985. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. Appl. Environ. Micro. 49(1) : 205-210.

Chen, W.P. 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 fead. Biotechnology and Bioengineering. 22 : 519-531.

Dekker, R.F.H. and G.N. Richards. 1976. Hemicellulases : Their occurence, pufification, properties and mode of action. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32 : 276-352.

Detroy, R.W., L.A. Lindenfelser, S.Sommer and W.L. Orton. 1981. Bioconversion of wheat straw to ethanol : Chemical modification, enzymatic hydrolysis and fermentation. Biotech. Bioeng. 23 : 2527-1535.

Dubois, M.1956. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28 : 350-356.

Herbert, D., P.J. Phipps and R-E. Strange. 1971. Chemical Analysis of Microbial cell. In Methods in Microbiology Vol. 5B eds by Norris, J.R. and D.W. Ribbons : 285-290.

John, M., B.Schmidt, and J.Schmidt. 1979. Purification and some properties of five endo-1, 4-ß-D-xylanase and ß-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger.* Can.J.Biochem 57 : 125-134.

Kim, J.H.,M. Hosobuchi, M.Kishimoto, T.Seki, T.Yoshida, H. Taguchi and D.D.Y. Ryu. 1985. Cellulase production by a solid-state culture system. Biotech. Bioeng. 27 : 1445-1450.

Kirk, T.K. 1983. Degradation and conversion of lignocellulose, pp. 226-295. In J.E. Smith, D.R.Berry and B.Kristiansen (eds). The Filamentous Fungi Fungal Technology. John Wiley & Sons Inc. New York.

Kitpreechavanich, V.M. Hayashi and S.Nagai : 1984. Production of xylan degrading enzymes by Thermophilic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Humicola lanuginosa.* J.Ferment Technol. 6201 : 63-69.

Kitpreechavanich, V., T.Yano, N.Nishio, M.Hayashi and S.Nagai. 1986. Enzymatic saccharification of xylan to xylose. Microbial Utilization of Renewable Resources 5 : 142-149.

Magee, R.J. and Kosaric, N. 1985. Bioconversion of hemicellulosic Adv. in Biochemical Eng./Bio eng. 32 : 61-93.

Nishio, N., K. Tai, and S.Nagai. 1979. Hydrolase Production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. J.Appl. Micobiol. biotechnol 8, 263-270.

Rosenberg, S.L. 1980. Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral product by microorganisms. Enzyme. Microb. Technol. 2 : 185-193.

Saddler, J.N., E.K.C. Yu, M.Mes-Hartree, N.Levitin and H.H.Bronell. 1983. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicelluloses by microorganisms for production of liquid fules. Appl. Environ. Microbiol. 45 : 153-160.

Somogyi, M.J. 1952. Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry 195 : 19-23.

Tsao, G.T., MR. Ladisch, M.Voloch and P.Bienkowski. 1982. Production of ethanol

and chemicals from cellulosic materials. Process Biochem. september-october : 34-38.

Van de Loo. H.M. 1976. An improved method for the quantilative determination of hexosamine according to Elson and Morgan. Anal. Biochem. 76 : 556-560.

Wong. K.K.Y. and J.N. Saddler. 1991. *Trichoderma* xylanases, their properties and application in Progress in Biotechnol. Vol. 7 (eds. by Visser, *et.al.,* Elsevier Science Publishers. B.V.) : 171-186.

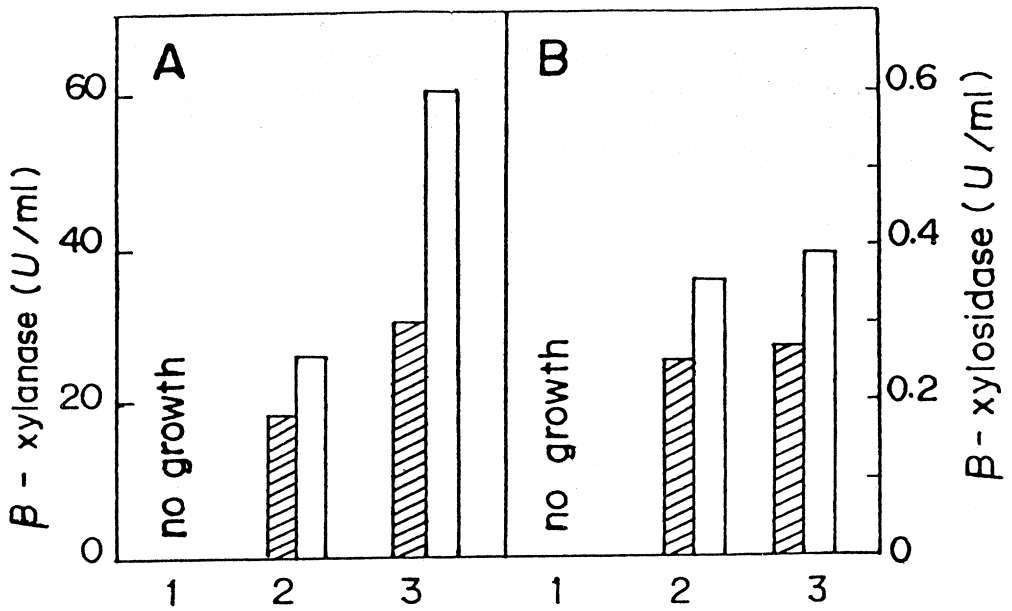

Figure 1. ß-Xylanase (A) and ß-xylosidase production (B) by *H.lanuginosa* after 5 day cultivation using solid state culture on corncob ( ) or alkaline treated corncob ( ) supplemented with deionized water (1), solution extracted from wheat bran (2), or nutrient solution (3).

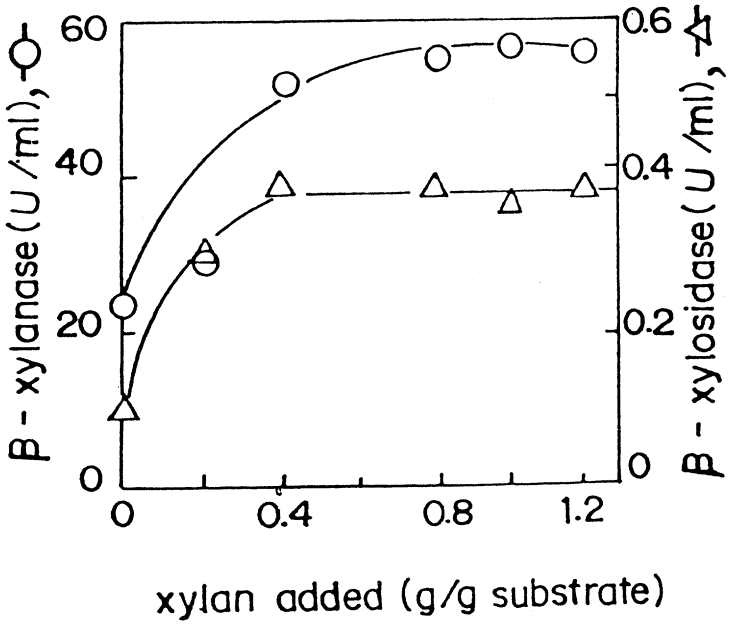

Figure 2. Effect of addition wood xylan to the alkaline treated corncob medium on ß-xylanase production by *H.lanuginosa* using solid state culture.

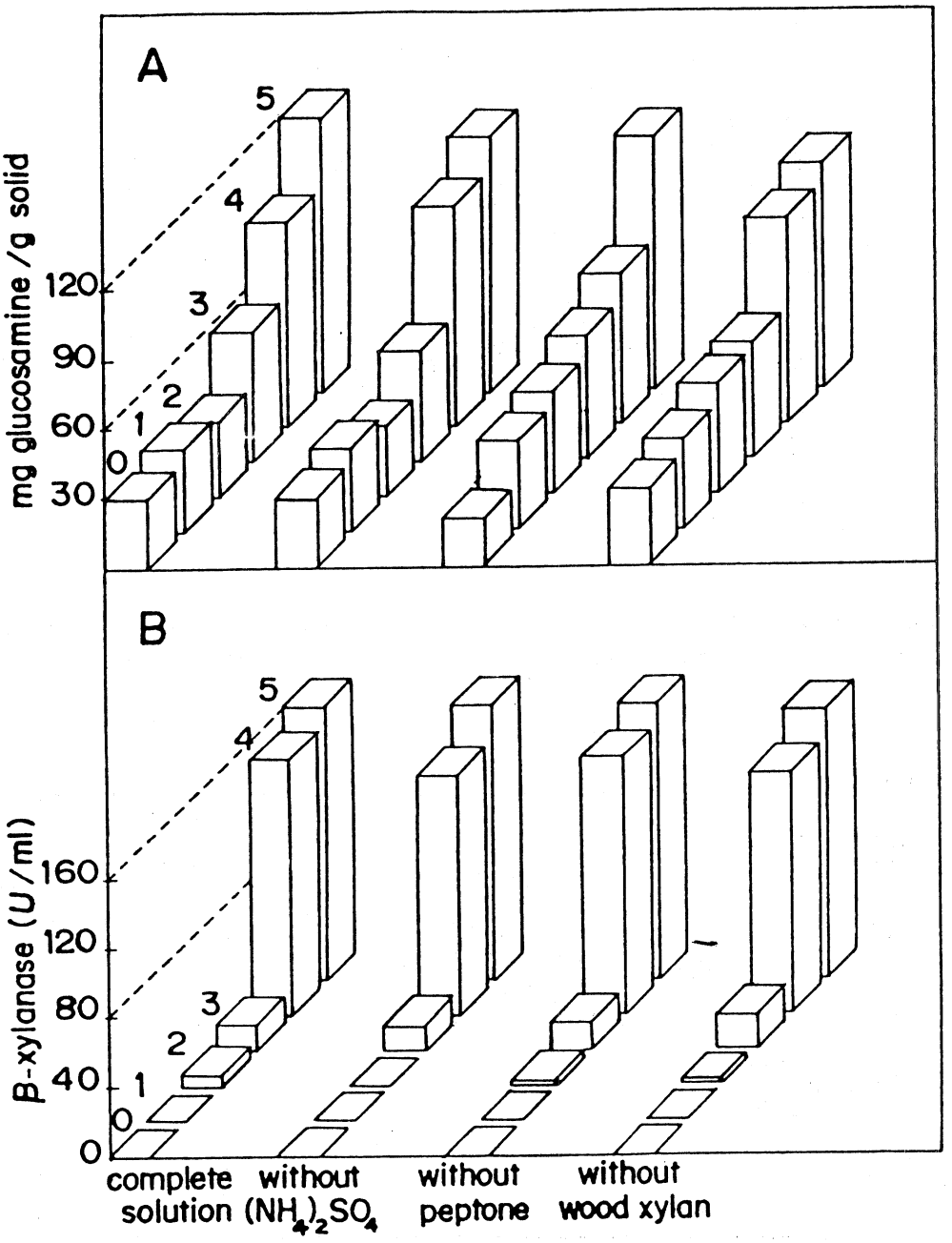

Figure 3. Growth (A) and ß-xylanase production (B) of *H.lanuginosa* using solid state culture on the mixture of alkaline treated corncob and wheat bran in ratio of 5:5 supplemented with various nutrient solutions.

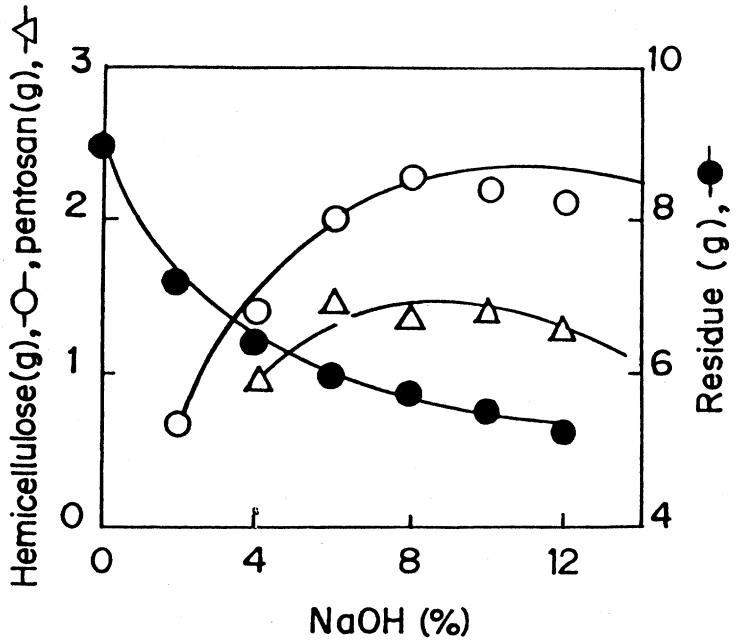

Figure 4. Effect of NaOH concentration on the extraction of hemicellulose from corncob. Ten g. of corncbo was extracted with 100 ml of NaOh at room temperature for 24 h.

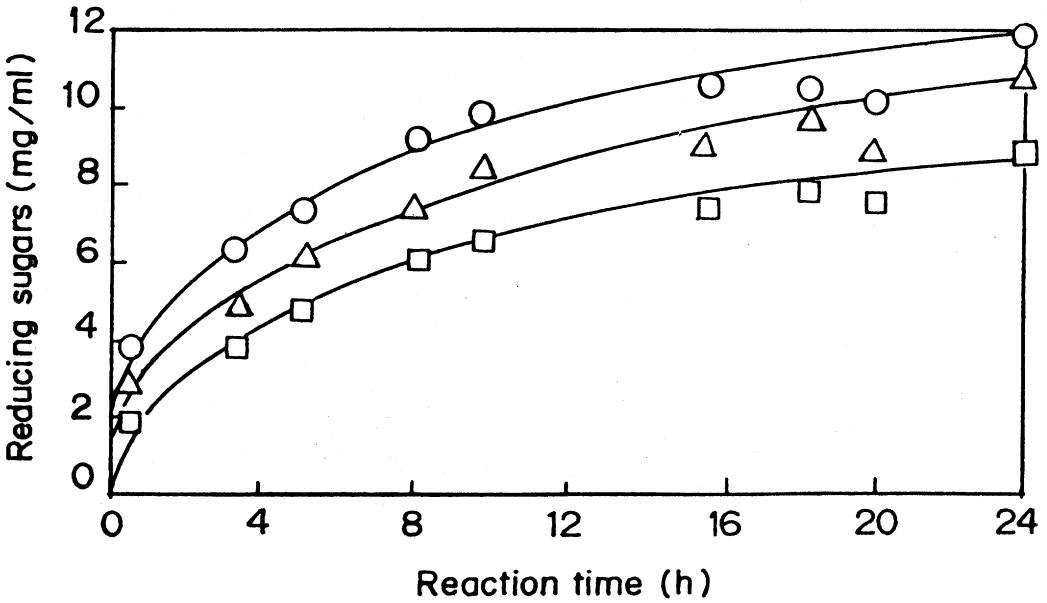

Figure 5. Time course of enzymatic hydrolysis of xylan corncob by crude enzyme of *A. fumigatus.*

The reaction mixture (5 ml) containing hemicellulose extracted from corncob 0.1 g(0.1 M acetate buffer pH 5.0), 1 mg NaN_3 was incunated at 50 C under shaking condition.

: 0.25 ml, : 0.5 ml, : 1.0 ml