



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์และการเปลี่ยนไซแลนเป็นไซโลสโดยใช้เอนไซม์จาก *Aureobasidium pullulans*

Extraction of xylan from *Mimosa pigra* Linn. and conversion of xylan to xylose by enzymes from *Aureobasidium pullulans*

ชื่อนิสิต นางสาวธนพร อนุเวช

เลขประจำตัว 5732078423

ภาควิชา พฤษศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของนิสิตงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์และการเปลี่ยนไซแลนเป็นไซโลสโดยใช้เอนไซม์จาก
Aureobasidium pullulans

นางสาวธนพร อนุเวช

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

Extraction of xylan from *Mimosa pigra* Linn. and conversion of xylan to xylose
by enzymes from *Aureobasidium pullulans*

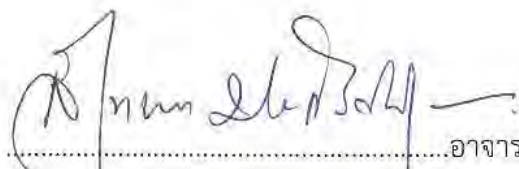
Miss Tanaporn Anuvech

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Bachelor of Science in Botany
Department of Botany
Faculty of Science, Chulalongkorn University
Academic Year 2018

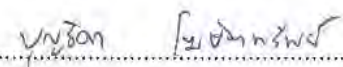
ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	การสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์และการเปลี่ยนไซแลนเป็นไซโลสโดยใช้ เอนไซม์จาก <i>Aureobasidium pullulans</i>
ชื่อนิสิต	นางสาวธนพร อนุเวช
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์อนุมัติให้โครงการวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงการวิทยาศาสตร์


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญธิดา โมจิตทรัพย์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	การสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์และการเปลี่ยนไซแลนเป็นไซโลสโดยใช้เอนไซม์จาก <i>Aureobasidium pullulans</i>
ชื่อนิสิต	นางสาวธนพร อนุเวช
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

ไมยราบยักษ์เป็นวัชพืชรุกรานต่างถิ่นที่มีความรุนแรง เนื่องจากสามารถเติบโตแพร่กระจายอย่างรวดเร็วจัดเป็นวัชพืชที่ไม่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ โดยไมยราบยักษ์มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักประมาณร้อยละ 17 จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำมาใช้ประโยชน์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดไซแลนจากลำต้นไมยราบยักษ์ด้วยไซเตียมไฮดรอกไซด์ จากการศึกษาปัจจัยที่สำคัญในการสกัดได้แก่สัดส่วนของไมยราบยักษ์ต่อสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ (0.5:10, 1:10 และ 1.5:10 โดยมวลต่อปริมาตร) ความเข้มข้นสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ (10, 30, และ 50) และเวลาในการสกัด (15, 50 และ 85 นาที) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส โดยออกแบบการทดลอง Box-Behnken Design แล้วนำมาวิเคราะห์ผลเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์ด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) ซึ่งภาวะที่เหมาะสมในการสกัดไซแลนได้สูงสุดคือสัดส่วนไมยราบยักษ์ต่อสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ 0.5:10 โดยมวลต่อปริมาตร ที่ความเข้มข้นของสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 50 เป็นเวลา 85 นาที จึงวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของไซแลนที่ได้ด้วยวิธี Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) เมื่อนำสารสกัดไซแลนที่ได้มาเข้าสู่กระบวนการหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยไซแลนให้เป็นน้ำตาลไซโลสด้วยเอนไซม์ไซแลเนสที่ผลิตจากรา *Aureobasidium pullulans* จากการศึกษาปัจจัยที่สำคัญในการย่อยได้แก่ปริมาณเอนไซม์เอนโดไซแลเนส (10, 20 และ 30 U/g xylan) และปีตา-ไซโลซิเตส (10, 20 และ 30 U/g xylan) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา (3, 9 และ 15 ชั่วโมง) และนำไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณน้ำตาลไซโลสด้วยวิธี 3,5 - dinitrosalicylic acid method (DNS method) พบว่าได้น้ำตาลไซโลสสูงสุด 4.6 มิลลิกรัมต่อกรัมไซแลนที่ภาวะมีปริมาณเอนโดไซแลเนส 28.90 ยูนิตต่อกรัมไซแลน และปีตา-ไซโลซิเตส 29.97 ยูนิตต่อกรัมไซแลน

คำสำคัญ: *Aureobasidium pullulans* ไซแลน น้ำตาลไซโลส ไมยราบยักษ์ เอนไซม์ไซแลเนส

Senior Project Title	Extraction of xylan from <i>Mimosa pigra</i> Linn. and conversion of xylan to xylose by enzymes from <i>Aureobasidium pullulans</i>
Student name	Miss Tanaporn Anuvech
Senior Project Advisor	Associate Professor Dr.Sehanat Prasongsuk
Department	Botany
Major	Botany
Academic Year	2018

Abstract

Mimosa pigra is an invasive weed that cause violently damage due to its rapid growth and dispersal and has no economic value. This plant contains 17 percentage of hemicellulose that mainly composed of xylan and is considered to utilize. The objective of this study was to study the suitable condition of xylan extraction from *M. pigra* stem using sodium hydroxide. The relative factors of xylan extraction were the proportions of *M. pigra* in the sodium hydroxide solvent (0.5:10, 1:10 and 1.5:10 weight by volume), the concentrations of sodium hydroxide (10, 30 and 50 percentage), and the extraction times (15, 50 and 85 minutes) at 15 psi and 121°C. The study was conducted using the Box-Behnken Design. Then, the results were analyzed to determine the optimal condition for xylan extraction using the Response Surface Methodology (RSM). The suitable conditions with the highest yield were the proportion of *M. pigra* in the solvent 0.5:10 weight by volume with 50 percent of sodium hydroxide and the extraction time 85 minutes. After that, the functional groups were analyzed using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). Another objective of this study was to study the suitable condition of the conversion of xylan to xylose by enzyme from *Aureobasidium pullulans*. The relative factors were the concentration of endoxylanase (10, 20 and 30 U/g xylan), beta-xylosidase (10, 20 and 30 U/g xylan) and the conversion time (3, 9 and 15 hours) at 60°C. Moreover, the 3,5-dinitrosalicylic acid method (DNS method) was used to determine the xylose content. The results showed the highest content was 4.6 mg/g xylan by using 28.90 U/g xylan of endoxylanase and 29.97 U/g xylan beta-xylosidase.

Keywords: *Aureobasidium pullulans*, mimosa, xylan, xylanase, xylose

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำการทำโครงการวิทยาศาสตร์ ให้ข้อมูลเพิ่มเติม ตลอดจนให้ความเห็นเพื่อปรับปรุงแก้ไขการทำโครงการวิทยาศาสตร์ให้มีความสมบูรณ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

โครงการวิทยาศาสตร์เรื่อง “การสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์และการเปลี่ยนไซแลนเป็นไซโลสโดยใช้เอนไซม์จาก *Aureobasidium pullulans*” สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีโดยได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ พี่นักวิจัยที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ที่ได้กรุณาอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการและช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ รวมถึงคำแนะนำและข้อมูลเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์ต่อการทำโครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวด้วยความเคารพยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาและคอยให้กำลังใจในการดำเนินชีวิตรวมทั้งคอยดูแลเอาใจใส่ข้าพเจ้าอย่างใกล้ชิดโดยตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือ ให้ความรู้เพิ่มเติม ให้กำลังใจและความอบอุ่นในการทำโครงการวิทยาศาสตร์เรื่อยมา ตลอดจนทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ธนพร อนุเวช

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญภาพ	ซ
สารบัญตาราง	ฅ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 การตรวจเอกสาร	3
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา	12
4 ผลการทดลอง	18
5 อภิปรายผลการศึกษา	26
6 สรุปผลการทดลอง	29
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	37

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะของไมยราบยักษ์	3
2 โครงสร้างของเซลลูโลส	5
3 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส	6
4 โครงสร้างของลิกนิน	7
5 สเปกตรัมจากการวิเคราะห์การส่งผ่านแสงอินฟราเรดในช่วงคลื่น 4000-400 cm^{-1} ของไซแลนที่สกัดได้จากไมยราบยักษ์ ที่เปรียบเทียบกับไซแลนมาตรฐานจาก beechwood xylan สกัดโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5% (w/v)	19
6 พื้นผิวสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสามปัจจัย ในกระบวนการสกัดไซแลน	22
7 พื้นผิวสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสามปัจจัย ในกระบวนการย่อยไซแลน	25

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสในพืชที่มีระบบท่อลำเลียง	4
2	ช่วงคลื่นอินฟราเรดย่านต่าง ๆ	10
3	ตารางออกแบบการทดลองโดย Box-Behnken design เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์	14
4	ตารางออกแบบการทดลองโดย Box-Behnken design เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ไซแลเนส	17
5	องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในผนังเซลล์ของลำต้นไมยราบยักษ์	18
6	ผลการทดลองแบบ Box-Behnken design และผลการตอบสนอง (ปริมาณไซแลน)	21
7	ผลการทดลองแบบ Box-Behnken design และผลการตอบสนอง (ปริมาณน้ำตาลไซโลส)	24

บทที่ 1 บทนำ

ไมยราบยักษ์ (*Mimosa pigra* Linn.) จัดเป็นวัชพืชที่แพร่กระจายได้ทั่วไปในประเทศไทยและเป็นพืชที่ไม่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ (Pramual, Khumkratok and Wongpakam, 2011) สามารถขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดได้ดี เนื่องจากมีการสร้างเมล็ดเป็นจำนวนมาก ประกอบกับเมล็ดของไมยราบยักษ์มีระยะพักตัวเป็นเวลาหลายปีเพื่อรอสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการงอก จึงทำให้วัชพืชชนิดนี้แพร่กระจายไปได้ในหลาย ๆ พื้นที่ อีกทั้งยังมีความทนต่อสภาวะน้ำท่วม และแห้งแล้งได้ดี เมื่อมีการกระจายพันธุ์ของไมยราบยักษ์เป็นจำนวนมากในพื้นที่นั้น ทำให้พืชที่มีอยู่ขาดปัจจัยการเจริญเติบโตและตายไป จึงส่งผลให้พื้นที่นั้นมีความหลากหลายของพืชชนิดอื่นลดลง ปัจจุบันมีการศึกษาไมยราบยักษ์หลายด้าน ทั้งด้านการขยายพันธุ์และด้านการเป็นยารักษาโรค (McIntyre, Grace and Schmidt, 2007) รวมทั้งยังมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาลำต้นของไมยราบยักษ์ในส่วนของผนังเซลล์ (cell wall) ซึ่งประกอบด้วย เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้สามารถนำไปผลิตสารที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจได้ต่อไป (Remón et al., 2017)

เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส โดยมีไซแลน (xylan) เป็นองค์ประกอบหลัก (Deutschmann and Dekker, 2012) ซึ่งไซแลนมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น การนำมาผลิตเป็นสารให้ความหนืด เจล และวัสดุห่อหุ้มยา รวมทั้งไซแลนสามารถนำมาผลิตเป็นน้ำตาลไซโลส (xylose) ที่สามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ (Silva et al., 2012) อย่างไรก็ตาม ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มักใช้ไซแลนบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากพืชผักที่เป็นแหล่งอาหาร และมีมูลค่าทางเศรษฐกิจซึ่งเป็นสารที่มีราคาสูง (Gomes et al., 1993; Paynter and Flanagan, 2004)

ไซแลนสามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์กลุ่มไซแลเนส ได้แก่ เอนโดไซแลเนส (endoxylanase) และ บีตา-ไซโลไซด์ส (beta-xylosidase) ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มไซแลเนสนั้นสามารถผลิตได้จากแบคทีเรีย และเชื้อราหลายชนิด โดยราที่มีการรายงานว่าเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ชนิดนี้คือ *Aureobasidium pullulans* (Allenza, Scherl, and Detroy, 1996) เป็นราที่มีลักษณะคล้ายยีสต์ สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย (เพ็ญญา มานิตยโชติพิสิฐ, 2551) ราชนิดนี้หลายสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้ในปริมาณมาก (Leathers, 1986) และมีลักษณะที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยาและอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นต้น (Leathers, 2003) โดยเอนไซม์กลุ่มนี้สามารถย่อยไซแลนให้อยู่ในรูปของไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylooligosaccharide) และไซโลส (xylose)

สำหรับไซโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ประเภทน้ำตาลแอลโดส (aldose) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายจากการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ไซแลเนส น้ำตาลไซโลสสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจอย่างน้ำตาลไซลิตอล (xylitol) ที่นำไปใช้ผลิตสารกำจัดแบคทีเรียในช่องปาก หรือผลิตเอทานอลที่เป็นส่วนผสมของน้ำมัน นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในด้านการแพทย์ เช่น ใช้ให้ความหวานแก่ผู้ป่วยเบาหวาน และใช้ทดสอบการทำงานของระบบย่อยอาหารได้อีกด้วย (Jansen, Flickinger and Tsao, 1983) ด้วยเหตุนี้ผู้

ทำการศึกษาลักษณะการสักรีดไซเลนจากลำต้นไมยราบยักษ์ให้มีปริมาณมากที่สุด และศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยไซเลนด้วยเอนไซม์ไซแลเนส จาก *A. pullulans* สำหรับผลิตน้ำตาลไซโลสให้ได้ปริมาณมากที่สุดเช่นกัน

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อสักรีดไซเลนจากลำต้นไมยราบยักษ์ด้วยเบสที่ภาวะต่างๆ
2. เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยไซเลนด้วยเอนไซม์ไซแลเนสจาก *A. pullulans* สำหรับผลิตน้ำตาลไซโลส

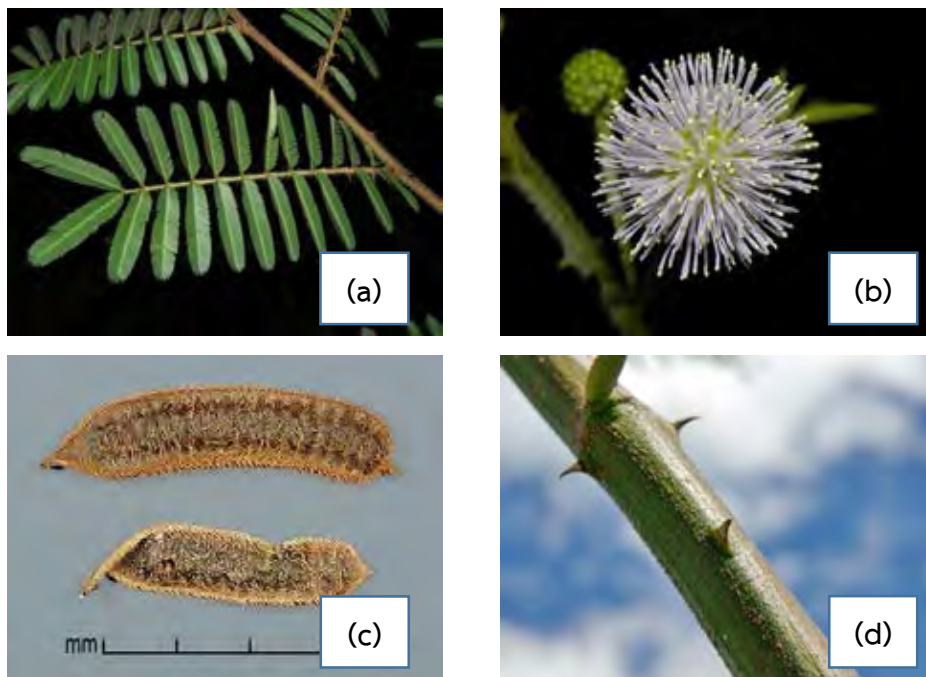
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการศึกษาที่ได้สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการผลิตไซเลนและผลิตน้ำตาลไซโลสจากลำต้นไมยราบยักษ์ในด้านอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร

2.1 ไมยราบยักษ์

ไมยราบยักษ์ (*Mimosa pigra* Linn.) มีชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า prickly wood weed, mimosa, giant sensitive plant, catclaw mimosa หรือ black mimosa เป็นพืชในวงศ์ *Fabaceae* วงศ์ย่อย *Mimosaceae* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบประเทศอเมริกากลางและทวีปอเมริกาใต้และแพร่กระจายสู่ทวีปแอฟริกา ทวีปเอเชีย และทวีปออสเตรเลีย (ลักษณะไมยราบยักษ์แสดงดังรูปที่ 1) ไมยราบยักษ์มีลักษณะเป็นไม้พุ่มยืนต้น ลำต้นมีหนามออกตามแนวลำต้น สูงประมาณ 2-4 เมตร ลำต้นอ่อนจะมีสีเขียว และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อมีอายุมากขึ้น เนื้อไม้ค่อนข้างแข็งและเหนียว ใบ เป็นใบประกอบแบบขนนก 2 ชั้น ใบย่อยชั้นแรก 10-15 คู่ ใบย่อยชั้นรอง 35-51 คู่ รูปขอบขนานแคบ ก้าน และแกนใบมีหนาม ท้องใบเรียบ หลังใบมีขนอ่อน ดอกมีสีม่วงอมชมพู ออกเป็นช่อกลมที่ซอกใบ ก้านดอกมีหนาม กลีบรองดอกเป็นแผ่นบางใส กลีบดอกคล้ายเป็นหลอด ปลายกลีบแยก เกสรผู้ 8 อัน รังไข่มีขนแน่น ผลเป็นฝักยาวแบนกว้าง 0.6-1 เซนติเมตร ยาว 4-6 เซนติเมตร มีขนหรือหนามแข็งคลุมติดกันแน่น เป็นกระจุกเมล็ดรูปไข่สีน้ำตาลขนาดเล็ก (Lonsdale and Segura, 1987)



รูปที่ 1 ลักษณะของไมยราบยักษ์ (a) ลักษณะใบ (b) ลักษณะดอก (c) ลักษณะผล และ (d) ลักษณะลำต้น
(จาก <https://wikipedia.org>)

ไมราบายักษ์สามารถทำลายความหลากหลายทางชีวภาพของพืชโดยการเข้าไปแทนที่พื้นที่ชุ่มน้ำ รุกล้ำพื้นที่ ปศุสัตว์และพื้นที่การเกษตร โดยเป็นวัชพืชที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็วแต่กำจัดได้ยาก จึงแย่งปัจจัยการเจริญเติบโตของพืชท้องถิ่น ทำให้พืชท้องถิ่นมีจำนวนลดน้อยลง เนื่องจากขยายพันธุ์และเจริญเติบโตเร็ว เมล็ดของไมราบายักษ์สามารถพักตัว (seed dormancy) ได้เป็นระยะเวลาหลายปีเพื่อรอโอกาสที่ปัจจัยแวดล้อมเหมาะสมต่อการงอกของเมล็ด เมล็ดที่ร่วงจะลอยไปกับน้ำ และเมล็ดจะงอกเมื่อน้ำแห้ง ส่งผลต่อการลดลงของพื้นที่ทำการเกษตร พื้นที่เลี้ยงสัตว์ พื้นที่เก็บกักน้ำ และทัศนียภาพ นอกจากนี้ต้นไมราบายักษ์ยังมีความทนต่อสภาพน้ำท่วมหรือแห้งแล้งได้ดี และมีหนามแหลมคมที่ยากต่อการทำลาย (Lonsdale and Farrell, 1998)

พืชชนิดนี้ถูกนำเข้ามาเมล็ดพันธุ์จากประเทศอินโดนีเซียมาปลูกในประเทศไทย ที่อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ ในปี พ.ศ.2495 โดยเกษตรกรชาวไร่ยาสูบทางภาคเหนือ โดยมีเมล็ดพันธุ์จำนวน 2 ชนิด คือ ชนิดต้นและชนิดเถา โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะใช้เป็นพืชบำรุงดินในไร่ยาสูบเป็นหลัก แต่เนื่องจากพืชชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดที่มีภูมิอากาศคล้ายกับประเทศไทย จึงเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย และมีการขยายพันธุ์โดยเมล็ดได้ดี สามารถปรับตัวดำรงชีวิตได้ในดินทุกชนิด เมื่อเข้ายึดครองพื้นที่แล้ว ยากที่พรรณไม้อื่นจะขึ้นผสมผสานได้ เนื่องจากพืชชนิดนี้จะขึ้นปกคลุมอยู่อย่างหนาแน่น ทำให้พรรณพืชดั้งเดิม เช่น กกและหญ้าหลายชนิด รวมทั้งไม้พุ่มที่ขึ้นตามริมน้ำหรือที่ขึ้นแฉะขาดแสงตายลง และค่อย ๆ สูญหายไปจากพื้นที่ ดังนั้นจึงพบไมราบายักษ์ได้ทั่วไป ตั้งแต่บนภูเขา ที่ลุ่ม และในไร่นาของเกษตรกรทั่วประเทศ (Pramual, Khumkratok and Wongpakam, 2011)

2.2 ผนังเซลล์พืช (cell wall)

ผนังเซลล์พืชมีลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน พอลิเมอร์แต่ละชนิดจะยึดกันด้วยแรงของพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาลส์ (van der waals) เป็นต้น ทำให้ผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรง ปริมาณของพอลิเมอร์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด อายุ และส่วนของพืช โดยทั่วไปในไม้เนื้ออ่อน (softwood) มีลิกนินเป็นองค์ประกอบมากกว่าไม้เนื้อแข็ง (hardwood) ดังแสดงดังตารางที่ 1 พืชวงศ์หญ้าพบเฮมิเซลลูโลสในปริมาณสูงที่สุด ไม้ยืนต้นลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยเซลลูโลสประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลสประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และลิกนินประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ (Glazer and Nikaido, 2007)

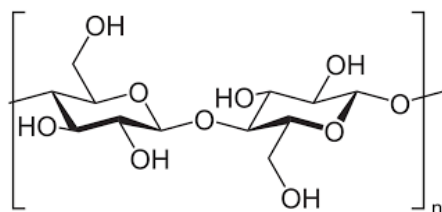
ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสในพืชที่มีระบบท่อลำเลียง

แหล่งลิกโนเซลลูโลส	Hemicellulose (%)	Cellulose (%)	Lignin (%)
หญ้า	5-50	25-40	10-30
ไม้เนื้ออ่อน	25-35	45-50	25-35
ไม้เนื้อแข็ง	24-40	45-55	18-25

ที่มา: ดัดแปลงจาก Glazer and Nikaido (2007)

2.2.1 เซลลูโลส (cellulose)

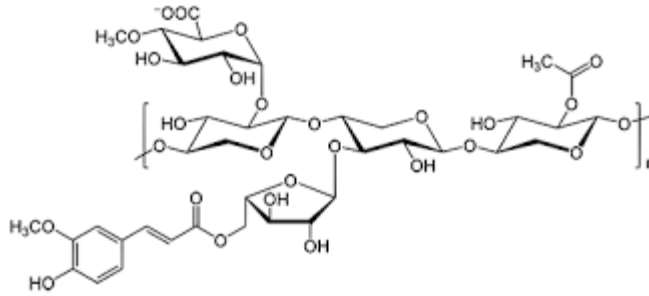
เซลลูโลส (โครงสร้างเซลลูโลสแสดงดังรูปที่ 2) เป็นพอลิเมอร์สายตรงของกลูโคส (β -D-glucopyranose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic มีสูตรโมเลกุล คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ หนึ่งโมเลกุลประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 25,000 หน่วย (Cheng, Catchmark and Demirci, 2009) และมีหน่วยซ้ำเป็น เซลโลไบโอส (D-glucopyranosyl- β -1,4-D-glucopyranose) เซลลูโลสสายยาวจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ ไฮโดรเจนและแวนเดอร์วาลส์ (vander waals bonds) ทำให้เซลลูโลสจัดเรียงตัวกันเป็นมัดเรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งมีทั้งส่วนที่เป็นระเบียบ (crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ไมโครไฟบริลยึดจับกับ เฮมิเซลลูโลสและห่อหุ้มด้วยลิกนินรวมกันเป็นแมโครไฟบริล เซลลูโลสเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบมากในผนังเซลล์พืช ช่วยทำให้ผนังเซลล์พืชแข็งแรงป้องกันการแตกของเซลล์ (Kumar et al., 2009; Pu et al., 2008)



รูปที่ 2 โครงสร้างของเซลลูโลส แบบ chain conformation (จาก <https://wikipedia.org>)

2.2.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลส (โครงสร้างเฮมิเซลลูโลสแสดงดังรูปที่ 3) เป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์แบบมีกิ่งของโมโนเมอร์หลายชนิด ประกอบด้วย น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม (อะราบิโนส และไซโลส) น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม (กลูโคส, กาแลกโทส, แมนโทส และแรมโนส) และอาจมีกรดยูโรนิก (กาแลกทูโรนิก, กลูคูโรนิก, และเมทิลกลูคูโรนิก) เป็นองค์ประกอบ โดยเฮมิเซลลูโลสเป็นโพลีเมอร์สายสั้นขนาด 150-200 หน่วย (Cheng, Catchmark and Demirci, 2009) ซึ่งมีโครงสร้างไม่เป็นระเบียบ เนื่องจากมีการแตกกิ่งเป็นจำนวนมาก เฮมิเซลลูโลสทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างเซลลูโลสกับลิกนิน ทำให้ผนังเซลล์แข็งแรงยิ่งขึ้น และยังช่วยสร้างความยืดหยุ่นให้ผนังเซลล์ โดยเฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีปริมาณมากเป็นอันดับสองโดยมีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก สามารถสกัดด้วยต่าง (Pérez et al., 2002; Pu et al., 2008)

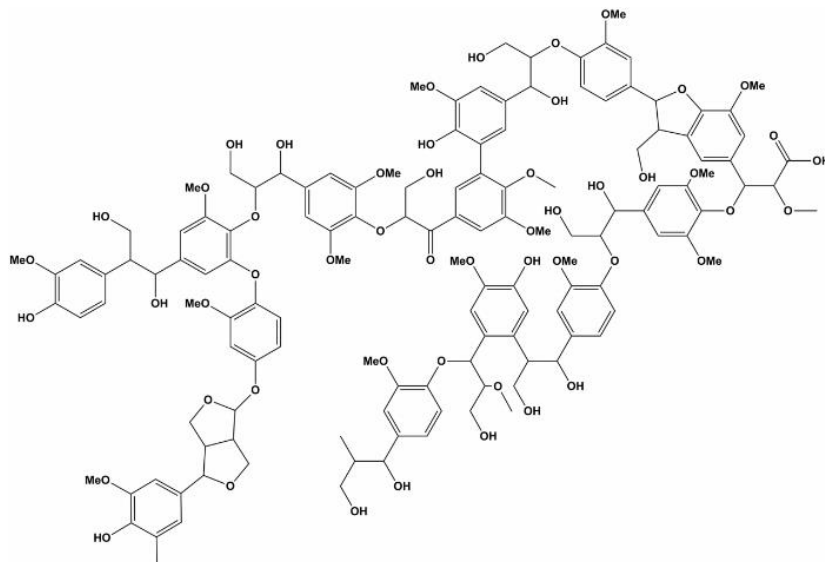


รูปที่ 3 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (จาก <https://wikipedia.org>)

ไซแลน (xylan) เป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส โดยไซแลนจะยึดเกาะกับเฮมิเซลลูโลอื่นและเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน โครงสร้างของไซแลนจะเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาล (D-xylose) ซึ่งมีน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic และจะมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นหรือโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นมาเชื่อมต่อเป็นกิ่ง การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลไซโลสสามารถย่อยสลายโดยเอนไซม์ และการใช้สารเคมี (Sjöström and Alén, 1999) ไซแลนพบได้ตามธรรมชาติมีปริมาณและโครงสร้างจะแตกต่างกันออกไป โดยพบในไม้เนื้อแข็งซึ่งมีปริมาณไซแลนมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ในไม้เนื้ออ่อนพบว่ามีปริมาณไซแลนประมาณ 7-12 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังพบไซแลนได้ในพืชล้มลุก และเศษวัสดุทางการเกษตร เช่น ฟ้าย รำข้าว ฟางข้าว ชังข้าวโพด และเปลือกเมล็ดธัญพืชซึ่งมีปริมาณไซแลนประมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Nair et al., 2008) น้ำตาลดี-ไซโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไซแลนมีสมบัติเป็นสารให้รสหวาน ดังนั้นจึงสามารถเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าน้ำตาลไม้ (wood sugar) (Lai, 1991)

2.2.3 ลิกนิน

ลิกนิน (โครงสร้างลิกนินแสดงดังรูปที่ 4) มีโมเลกุลซับซ้อนซึ่งสร้างจากหน่วยของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) หรือฟีนิลโพรพิโอนิกแอลกอฮอล์ (phenylpropionic alcohol) เชื่อมต่อกันเป็นโครงสร้าง 3 มิติ ลิกนินเป็นตัวเชื่อมเพื่อยึดเส้นใยเซลลูโลสรวมกัน ทำให้แยกลิกนินได้ยาก ลิกนินเป็นส่วนที่ทำให้เซลล์แข็งแรง (Glazer and Nikaido, 2007)



รูปที่ 4 โครงสร้างของลิกนิน (จาก <https://wikipedia.org>)

2.3 การย่อยสลายไซแลน

2.3.1 กระบวนการทางเคมี

การย่อยสลายไซแลนโดยใช้กรด

การย่อยสลายไซแลนด้วยกรดเพื่อให้ได้ไซโลสเป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรุนแรงและไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่สมบูรณ์ เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษเช่น เฟอฟูรัล (furfural) นอกจากนี้การย่อยสลายไซแลนด้วยกรดยังต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อภาวะที่เป็นกรดและอุณหภูมิสูงได้ (Woodward, 1987)

การย่อยสลายไซแลนโดยใช้ต่าง

การย่อยสลายไซแลนด้วยด่างนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการทำกระดาษ ในขั้นตอน Kraft cooking ซึ่งเป็นการนำชิ้นไม้ไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เพื่อให้เปลือกไม้ยุ่ยและเป็นการขจัดลิกนินที่มีอยู่ในเนื้อไม้บางส่วนด้วย ในขั้นตอนนี้เฮมิเซลลูโลสจะถูกละลายออกมาและปนอยู่ในน้ำทิ้ง ซึ่งน้ำทิ้งจากการย่อยสลายด้วยด่างจะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมเพราะมีสารเคมีเจือปนอยู่ (Visser and Dennis, 1992)

2.3.2 กระบวนการทางชีวภาพ

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงกับสารตั้งต้นมากกว่าการใช้สารเคมี จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง มีค่าใช้จ่ายน้อย และไม่เปื้อนพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยเอนไซม์จะทำการกระตุ้นปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ β -1,4 glycosidic ของสายหลักให้น้ำตาลไซโลสหรือไซโลโอลิโกแซคคาไรด์

(xylooligosaccharide) (Vázquez et al., 2000) เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสายหลักของไซแลนประกอบด้วย เอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่

เอนโดไซแลเนส (endoxylanase) หรือ β -1, 4-D-xylan-xylanohydrolase

เอนไซม์ชนิดนี้จะทำการสลายพันธะ β -1,4 glycosidic โดยใช้กลไกแบบเอนโด (endo-mechanism) ซึ่งจะเกิดการสลายพันธะในสายหลักของไซแลนแบบสุ่ม ผลของการย่อยจะได้ไซโลส และโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Gilbert and Hazlewood, 1993)

บีตา-ไซโลซิเดส (β -xylosidase) หรือ β -1, 4-D-xylan-xylohydrolase

เอนไซม์ชนิดนี้จะทำการสลายพันธะ β -1,4 glycosidic โดยใช้กลไกแบบเอกโซ (exo-mechanism) กล่าวคือ เอนไซม์จะทำการสลายพันธะจากปลายสายด้าน นอนรีดิวซ์ (non-reducing end) ของไซแลนได้เป็นน้ำตาลไซโลสที่ละ 1 โมเลกุล ผลของการย่อยจะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Gilbert and Hazlewood, 1993)

ในปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ อุตสาหกรรมการทำไวน์ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ และการแปรรูปเศษวัสดุทางการเกษตรมาเป็นเชื้อเพลิงและสารเคมี การย่อยสลายไซแลนเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลไซโลส และอะราบินอส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือ ซึ่งสามารถนำไปใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ และมีมูลค่าทางเศรษฐกิจ เช่น ไซโลสสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างไซโลสไอโซเมอเรส หรือกลูโคสไอโซเมอเรส เพื่อเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทสสำหรับการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทส สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตขนมหวานและลูกกวาด การใช้ไซโลสเป็นสารอาหารให้กับจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) (Deshpande et al., 1992) การใช้ไซโลสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไซลิทอล (Barbosa et al., 1988) เป็นสารให้ความหวานทดแทนน้ำตาลในทางการแพทย์ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน หรือใช้เป็นสารให้ความหวานในลูกอม และหมากฝรั่ง ซึ่งไม่ทำให้ฟันผุ (Parajo, Alonso and Moldes, 1997) นอกจากนี้ยังมีการใช้ประโยชน์จากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเฮมิเซลลูโลส ในการผลิตพลังงานทดแทน โดยเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีมูลค่าสูงขึ้นด้วยกระบวนการหมัก เช่น เอทานอล บิวทานอล และสารประกอบอื่น ๆ นอกจากนี้ เอนไซม์ย่อยสลายไซแลน (xylan-degrading enzyme) มีความสำคัญในการย่อยสลายเศษวัสดุทางการเกษตรให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสำหรับเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักให้ได้เอทานอลเพราะเป็นปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง และมีความจำเพาะสูง จึงไม่ก่อให้เกิดสารข้างเคียงที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ (Kotter and Ciriacy, 1993)

2.4 *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans เป็นเชื้อราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) เดิมมีการจัดจำแนกอยู่ใน Class *Deuteromycetes* (Fungi imperfecti) Order *Moniliales* Family *Dermatiaceae* (Cooke, 1959; Ramos และ Acha, 1975) *A. pullulans* มีชื่อสามัญว่า “ ยีสต์ดำ ” (black yeast) เนื่องจากสามารถผลิตเม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) ได้ในระหว่างการเจริญ ทำให้โคโลนีมีสีดำ *A. pullulans* มีรูปร่างได้หลายลักษณะ เช่น บลาสโตสปอร์ (blastospore) เซลล์พอง (swollen cell) คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) เส้นใยแท้ (hyphae) หรือเส้นใยเทียม (pseudohyphae) เป็นต้น (Ramos and Garcia-Acha, 1975) ปัจจุบันมีการจัดจำแนก *A. pullulans* ดังนี้ (Yurlova, De Hoog and Gerrits, 1999)

การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน (Yurlova, De Hoog and Gerrits, 1999)

Kingdom	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Class	<i>Dothideomycetes</i>
Order	<i>Dothideales</i>
Family	<i>Aureobasidiaceae</i>
Genus	<i>Aureobasidium</i>
Species	<i>Aureobasidium pullulans</i>

A. pullulans เป็นเชื้อราที่มีแหล่งที่อยู่หลากหลายในธรรมชาติ สามารถพบได้ทั่วไป บนผิวใบพืชและผลไม้ดิน (Ramos and Garcia-Acha, 1975) เศษฟาง หญ้าแห้ง (Cooke, 1959) หรือในสถานที่ที่มีความชื้นสูง เช่น ผนังห้องน้ำ (Prasongsuk et al., 2017) หรือในฟองน้ำทะเล (Shigemori et al., 1998) *A. pullulans* ยังสามารถพบได้ทั้งในแถบประเทศเขตร้อน เช่น บราซิล อินเดีย มาเลเซีย และจาไมกา แถบประเทศเขตอบอุ่น เช่น เยอรมนี แคนาดา เดนมาร์ก เนเธอร์แลนด์ ออสเตรเลีย อังกฤษ และสหรัฐอเมริกา หรือในเขตแห้งแล้ง เช่น อียิปต์ อิรัก ปากีสถาน และแอฟริกาใต้ (Deshpande et al., 1992) สำหรับในประเทศไทย มีรายงานว่าสามารถคัดแยก *A. pullulans* ได้จากเขตกรุงเทพมหานคร และป่าสนเขาในประเทศไทย (Punnapayak et al., 2003) *A. pullulans* มีความสำคัญอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมเพราะสามารถผลิตเอนไซม์ เช่น อะไมเลส เพคติเนส และไซแลนเนส และมีการใช้ประโยชน์จาก *A. pullulans* ในการผลิต โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) (Deshpande et al., 1992) นอกจากนี้ *A. pullulans* สามารถผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ ที่เรียกว่า พูลลูแลน (pullulan) ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกภายนอกเซลล์ขณะเพาะเลี้ยงเชื้อ พูลลูแลน ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตไตรออส หรือมอลโตเตตระออสต่อกันด้วยพันธะ α -1,6 linkages (Leather, 2003)

2.5 การวิเคราะห์ผล

2.5.1 การทดสอบหมู่ฟังก์ชันด้วยวิธี Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR Spectroscopy)

หลักการของเทคนิค FTIR spectroscopy

อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการดูดกลืนพลังงานในช่วงคลื่นอินฟราเรดโดยโมเลกุลของสาร แล้วทำให้พันธะภายในโมเลกุลเกิดการสั่น หรือเกิดการหมุน รังสีในช่วงคลื่นอินฟราเรดมีความยาวคลื่น ประมาณ 0.78-1000 μm หรือเลขคลื่นประมาณ 12800 - 10 cm^{-1} และสามารถแบ่งช่วงคลื่นอินฟราเรดออกเป็น 3 ช่วงดังตารางที่ 2.2 ช่วงคลื่นอินฟราเรดที่นำมาใช้ประโยชน์มากในการวิเคราะห์โครงสร้างของโมเลกุลเป็นช่วงคลื่นอินฟราเรดย่านกลางเป็นส่วนใหญ่ คืออยู่ในช่วงความยาวคลื่น 2.5 - 25 μm หรือช่วงเลขคลื่น 4000-400 cm^{-1} (Brault, 1996)

ตารางที่ 2 ช่วงคลื่นอินฟราเรดย่านต่าง ๆ (Galichet et al., 2001)

ช่วงคลื่น	ความยาวคลื่น (μm)	เลขคลื่น (cm^{-1})
อินฟราเรดย่านใกล้ (near IR, NIR)	0.78-2.5	12800-4000
อินฟราเรดย่านกลาง (middle IR)	2.5-50	4000-200
อินฟราเรดย่านไกล (far IR)	50- 1000	200-10

เนื่องจากเทคนิค FTIR spectroscopy เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ และไม่ทำลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ ซึ่งใช้ได้กับสารได้ทุกสถานะ และใช้สารในการวิเคราะห์ปริมาณน้อย (Galichet et al., 2001) ประกอบกับมีการศึกษาสเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด และหาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของสเปกตรัมของการดูดกลืนแสงกับโครงสร้างของสารอินทรีย์เพิ่มมากขึ้น จึงทำให้เทคนิคนี้ยังได้รับความสนใจและมีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในทางจุลชีววิทยาได้นำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อประโยชน์ต่าง ๆ เช่น บ่งชี้ และจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ยีสต์ (Sokalingum et al., 1997; Maquelin et al., 2002; Essendoubi et al., 2005; Garip Gozen and Severcan, 2009) ศึกษาโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ เช่น โพรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรตในเซลล์ยีสต์ และในแบคทีเรีย (Galichet et al., 2001; Marcotte et al., 2007) ติดตามการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์จุลินทรีย์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ เช่น การเปลี่ยนแปลงรูปร่างระหว่างการเจริญเติบโตยีสต์ และรา (Adt et al., 2006; Jilkin et al., 2007) และการย่อยสลายตัวเองของเซลล์ของยีสต์ (Burattini et al., 2008) วิเคราะห์อาจจะมี หมู่ hydroxyl (-OH), methyl (-CH₃) หรือ carbonyl (-CO) ซึ่ง

จะได้เป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) กับเลขคลื่น (Wave numbers) (Sockalingum et al.,1997)

2.5.2 วิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงสร้างพื้นผิว (Response Surface Methodology)

วิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงสร้างพื้นผิว หรือ Response Surface Methodology (RSM) คือวิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติ ที่ถูกนำมาใช้สร้างแบบจำลองโดยอาศัยการวิเคราะห์ผลของตัวแปรต่างๆ ต่อค่าตอบสนองหรือตัวแปรตามของการทดลอง เนื่องจากค่าตอบสนองนั้น ๆ มีอิทธิพลมาจากตัวแปรอิสระหลายตัวแปร การออกแบบการทดลองด้วยวิธีนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาจุดที่มีความเหมาะสมของตัวแปรแต่ละตัวแปรต่อค่าตอบสนองที่ต้องการ โดยเริ่มจากการค้นหาฟังก์ชันที่แท้จริงระหว่างค่าตอบสนอง ต่อตัวแปรอิสระต่าง ๆ ซึ่งโดยมากมักใช้ความสัมพันธ์แบบโพลีโนเมียล (Polynomial) เช่น สมการลำดับที่หนึ่ง (First order) หรือสมการลำดับที่สอง และเมื่อนำมาพล็อตกับระดับของตัวแปรอิสระจะได้กราฟแสดงผลตอบสนองแบบโครงสร้างพื้นผิว (Sen and Swaminathan, 1997)

Box-Behnken design เป็นรูปแบบการออกแบบการทดลองแบบหนึ่งของการออกแบบการทดลองแบบ RSM ซึ่งรูปแบบของ RSM มีหลายรูปแบบ ได้แก่ Factorial design (3 ระดับ), Central composite design (CCD) และ D-optimal design Box-Behnken design คือการออกแบบการทดลองที่สร้างขึ้นจากการรวมการออกแบบแบบแฟคทอเรียล 2^k และการออกแบบบล็อกไม่สมบูรณ์รูปร่างคล้ายกับลูกบาศก์ที่จุดทุกจุดของการทดลองวางอยู่บนจุดยอดของลูกบาศก์ ซึ่งสร้างขึ้นจากขีดจำกัดบนและล่างของแต่ละตัวแปรที่นำมาศึกษา สำหรับจุดที่อยู่ตรงกลางของลูกบาศก์เป็นจุดที่เชื่อมโยงทุก ๆ ปัจจัยเข้าด้วยกัน ที่สำคัญรูปแบบของมันสามารถหมุนได้หรือเกือบหมุนได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบการทดลองลักษณะอื่น ๆ ของ RSM พบว่าการออกแบบแบบ Box-Behnken design เป็นการออกแบบที่มีจำนวนชุดการทดลองน้อย (15 ชุด, จุดกึ่งกลางทำ 3 ซ้ำ) เมื่อการศึกษานั้นประกอบด้วยตัวแปรที่สนใจจำนวน 3 ตัวแปร การออกแบบด้วย Box-Behnken design จึงเป็นรูปแบบการออกแบบการทดลองที่ได้รับความนิยม (Sen and Swaminathan, 1997)

2.5.3 วิธี 3,5-dinitrosalicylic acid method (DNS method)

DNS method เป็นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยนำสารสกัดที่ได้มาเจือจางจากนั้นผสมกับสารละลาย DNS reagent แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร จากนั้นจึงคำนวณหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐาน (Miller, 1959)

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- กระจกบดวงแก้ว
- กระจกบดวงพลาสติก
- โกร่งบดสาร
- ขวดรูปชมพู่ ขนาด 100 ml
- ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml
- แท่งแก้วคนสาร
- น้ำกลั่น
- ปีกเกอร์
- ผ้าขาวบาง
- หลอดทดลอง
- 96 well plate
- Autopipette
- Centrifuge tube
- Eppendorf
- Plate
- เครื่อง Autoclave
- เครื่อง Centrifuge
- เครื่อง Water bath
- เครื่องบดไม้เนื้อแข็ง (ภาควิชาวัสดุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
- เครื่องปั่นผสมสาร
- ตู้ดูดควัน
- ตู้อบ

เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

- Microplate reader
- pH meter
- เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR Spectroscopy)
(ภาควิชาวัสดุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.1.2 สารเคมี

- 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)
- 70% (v/v) Ethyl alcohol
- 95% (v/v) Ethyl alcohol
- Acetic acid (CH₃COOH)
- Beechwood xylan
- *p*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside
- Phosphate buffer
- Potassium bromide (KBr)
- Sodium hydroxide (NaOH)
- Endoxylanase enzyme
- β-xylosidase enzyme

3.2 วิธีดำเนินการการศึกษา

3.2.1 การสกัดไซแลนจากลำต้นไมยราบยักษ์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

การเตรียมตัวอย่างไมยราบยักษ์

เก็บตัวอย่างลำต้นไมยราบยักษ์จากพื้นที่อำเภอวังน้อย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา นำมาล้างทำความสะอาดและตัดส่วนของลำต้นไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดไม้เนื้อแข็ง แล้วร่อนผ่านตะแกรงร่อน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร นำผงไมยราบยักษ์ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ตามวิธีของ Goering and Van Soest (1970)

การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดไซแลนจากลำต้นไมยราบยักษ์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

ซึ่งผงไมยราบยักษ์น้ำหนักใส่ใน flask ขนาด 250 ml แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้ ปริมาตรเท่ากับ 50 ml หลังจากนั้นนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 lb/in² ด้วย autoclave โดยวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design ที่ศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (X₁) เวลาในการบ่มด้วย autoclave (X₂) และสัดส่วนผงไมยราบยักษ์กับสารละลายเบส (X₃) ซึ่งประกอบด้วย 15 ชุดการทดลอง (แสดงดังตารางที่ 3) และใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์ โดยใช้โปรแกรม Design Expert เวอร์ชัน 7 (Stat-Ease Inc., US)

ตารางที่ 3 การออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken design เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์

ชุดการทดลอง	ปัจจัย			รหัสปัจจัย		
	ความเข้มข้น NaOH (% w/v)	เวลาการบ่มใน autoclave (mins)	สัดส่วนไมยราบและสารละลายเบส (g:ml)	X ₁	X ₂	X ₃
1	10	15	0.10	-1	-1	0
2	50	15	0.10	+1	-1	0
3	10	85	0.10	-1	+1	0
4	50	85	0.10	+1	+1	0
5	10	50	0.05	-1	0	-1
6	50	50	0.05	+1	0	-1
7	10	50	0.15	-1	0	+1
8	50	50	0.15	+1	0	+1
9	30	15	0.05	0	-1	-1
10	30	85	0.05	0	+1	-1
11	30	15	0.15	0	-1	+1
12	30	85	0.15	0	+1	+1
13	30	50	0.10	0	0	0
14	30	50	0.10	0	0	0
15	30	50	0.10	0	0	0

หลังจากขั้นตอนการ autoclave แล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วกรองแยกกากออกโดยใช้ผ้าขาวบาง นำส่วนใสที่ได้ไปปรับ pH ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้นและปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge จากนั้นนำส่วนใสไปตกตะกอนไซแลนด้วย 95% (v/v) ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายเบส (Pan et al., 2005) หลังจากนั้นแยกตะกอนไซแลนโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปชั่งน้ำหนักแห้งเพื่อวัดปริมาณไซแลนและคำนวณปริมาณไซแลน (%) ดังสมการ (ธัญญรัตน์ ศรีนรสิงห์, ญัญญา เลหากุลจิตต์ และอรพิน เกิดชูชื่น, 2558)

$$\text{ปริมาณไซแลน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของไซแลนที่สกัดได้ (g)} \times 100}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่างพืช (g)}}$$

$$\text{ปริมาณไซแลนสัมพัทธ์ (\%)} = \frac{\text{ปริมาณไซแลน (\%)} \times 100}{\text{ปริมาณเฮมิเซลลูโลส (\%)}}$$

จากนั้นนำตัวอย่างไซแลนที่สกัดได้ไปบด แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 mm และนำไปวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยวิธี FTIR โดยวิเคราะห์ในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 4,000 – 400 cm⁻¹ เปรียบเทียบกับไซแลนมาตรฐาน beechwood xylan

3.2.2 การผลิตเอนไซม์ไซแลเนส

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL Y2311-1 ซึ่งได้จาก Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, the United States Department of Agriculture โดยเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหาร yeast malt broth (YMB) ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเป็นหัวเชื้อและปรับให้ความหนาแน่นเซลล์ของหัวเชื้อเท่ากับ 2.5×10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหาร YMB จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 1% (v/v) ลงในอาหารสูตร xylanase production medium ที่มีซิงค์ข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เก็บเอนไซม์หยาบโดยปั่นเหวี่ยงด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยส่วนใสจะเป็นเอนโดไซแลเนส สำหรับเซลล์ที่แยกได้จะทำการบดเซลล์ด้วยไนโตรเจนเหลวกับน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว เพื่อแยกเอนไซม์ปีตา-ไซโลสิดีสออกมา (Bankeeree et al., 2014; Ohta et al., 2010)

การตรวจสอบแอกติวิตีของเอนโดไซแลเนสทำได้โดยบ่มเอนไซม์ 0.05 มิลลิลิตร ในสารละลาย 5% (w/v) beechwood xylan ปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร และ 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเติมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร

และต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Bailey et al., 19992; Miller, 1959) เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานซึ่งสร้างจากสารละลายไซโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณแอกติวิตีของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ 1 ยูนิตเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนให้ได้ไซโลสปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

การตรวจสอบแอกติวิตีของปีตา-ไซโลสิดีสทำได้โดยบ่มเอนไซม์ 0.025 มิลลิลิตร ในสารละลาย 2.5 mM *p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร และ 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 0.4 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเติม 0.1M sodium carbonate เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (Ohta et al., 2010) เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานซึ่งสร้างจากสารละลาย *p*-nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณแอกติวิตีของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ 1 ยูนิตเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย *p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside ให้ได้ *p*-nitrophenol ปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.2.3 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ไซแลเนส

เตรียมสารละลายไซแลนที่สกัดได้จากผงไมยราบยักษ์เข้มข้น 5% (w/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรและ 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 5) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมเอนไซม์เอนโดไซแลเนสและปีตา-ไซโลสิดีสที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สำหรับการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ไซแลเนส โดยวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design ที่ศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนโดไซแลเนส (X_1) ความเข้มข้นของปีตา-ไซโลสิดีส (X_2) และเวลาการบ่ม (X_3) ซึ่งประกอบด้วย 15 ชุดการทดลอง (แสดงดังตารางที่ 4) และใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยไซแลนเพื่อให้ได้น้ำไซโลส โดยใช้โปรแกรม Design Expert เวอร์ชัน 7 (Stat-Ease Inc., US)

ตารางที่ 4 การออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken design เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ไซแลเนส

ชุดการทดลอง	ปัจจัย			รหัสปัจจัย		
	ความเข้มข้น	ความเข้มข้น	เวลาการบ่ม (hours)	X ₁	X ₂	X ₃
	เอนโดไซแลเนส (U/g xylan)	ปีตา-ไซโลลิเตส (U/g xylan)				
1	10	10	9	-1	-1	0
2	30	10	9	+1	-1	0
3	10	30	9	-1	+1	0
4	30	30	9	+1	+1	0
5	10	20	3	-1	0	-1
6	30	20	3	+1	0	-1
7	10	20	15	-1	0	+1
8	30	20	15	+1	0	+1
9	20	10	3	0	-1	-1
10	20	30	3	0	+1	-1
11	20	10	15	0	-1	+1
12	20	30	15	0	+1	+1
13	20	20	9	0	0	0
14	20	20	9	0	0	0
15	20	20	9	0	0	0

หลังจากบ่มปฏิกิริยาในแต่ละชุดการทดลองแล้วนำสารละลายที่ได้ปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร และ 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 0.5 มิลลิลิตร แล้วตรวจสอบปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เกิดขึ้นโดยเติมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร และต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Miller, 1959) เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานซึ่งสร้างจากสารละลายไซโลสที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาปริมาณน้ำตาลไซโลส

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

จากการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ตามวิธีของ Goering and Van Soest (1970) ในไมยราบยักษ์ พบว่ามีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณสูงที่สุด ลิกโนเซลลูโลสของไมยราบยักษ์ ประกอบด้วยเซลลูโลสประมาณร้อยละ 47.31±0.84 เฮมิเซลลูโลสประมาณร้อยละ 16.95±0.51 ลิกนิน ประมาณร้อยละ 16.81±0.30 ใยประมาณร้อยละ 2.79±0.58 และองค์ประกอบอื่น ๆ ประมาณร้อยละ 16.11±1.01 (แสดงดังตารางที่ 5)

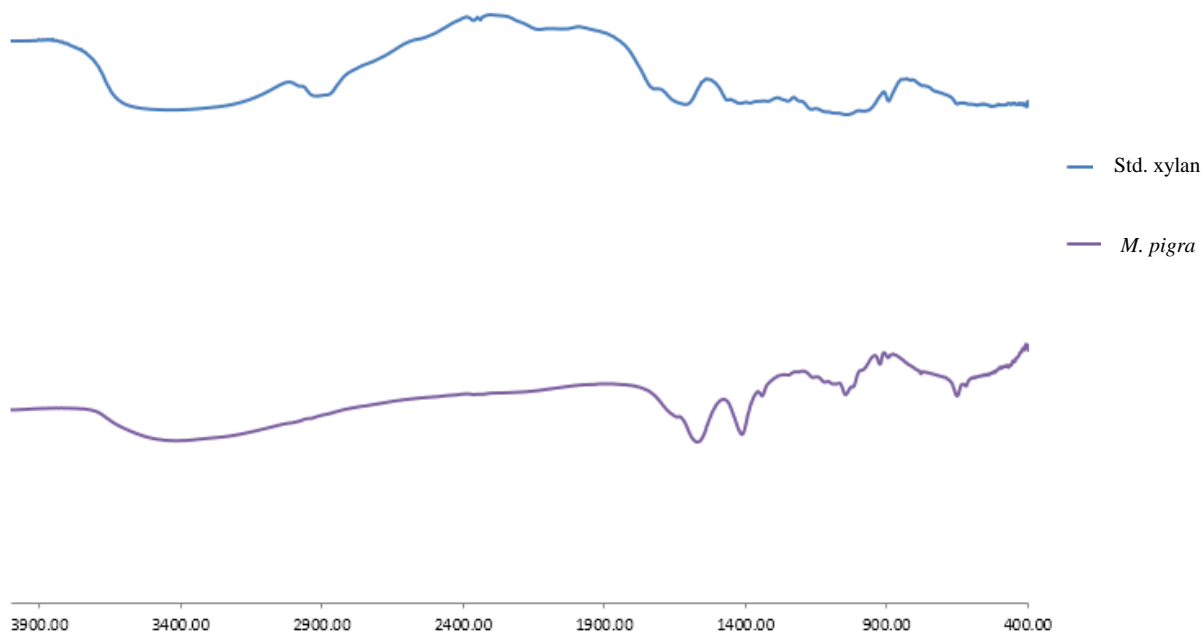
ตารางที่ 5 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในผนังเซลล์ของลำต้นไมยราบยักษ์

ชนิด	องค์ประกอบ				
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	ใย	อื่น ๆ
ไมยราบยักษ์	47.31±0.84	16.95 ±0.51	16.81±0.30	2.79±0.58	16.11±1.01

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยวิธี Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของไซแลนที่สกัดได้จากไมยราบยักษ์ โดยใช้สัดส่วนผงไมยราบยักษ์ต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0:10 (g:ml) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% (w/v) ที่ pH 7 เป็นเวลา 60 นาที เปรียบเทียบกับไซแลนมาตรฐานจาก beechwood xylan วิเคราะห์จากการดูดกลืนแสงอินฟราเรดในช่วงเลขคลื่น 4000-400 cm^{-1} ดังภาพที่ 4.1 จากสเปกตรัมพบว่าพีคในช่วงเลขคลื่นเท่ากับ 3,400 cm^{-1} แสดงถึงการดูดกลืนแสงของหมู่ฟังก์ชัน -OH สำหรับพีคที่มีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดสูงในช่วงใกล้กับเลขคลื่น 1,466 และ 1,044 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน C-H และ C-O ตามลำดับ และพีคที่มีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดสูงในช่วงใกล้กับเลขคลื่น 980 cm^{-1} เป็นผลมาจากการดูดกลืนแสงของ CH_3



ภาพที่ 5 สเปกตรัมจากการวิเคราะห์การส่งผ่านแสงอินฟราเรดในช่วงคลื่น 4000-400 cm^{-1} ของไซแลนที่สกัดได้จากไมยราบยักษ์ที่เปรียบเทียบกับไซแลนมาตรฐานจาก beechwood xylan สกัดโดยใช้สารละลายไซโตเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5% (w/v)

4.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์

การศึกษากภาวะที่เหมาะสมในการสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์ โดยจะศึกษาสัดส่วนสารตั้งต้นต่อสารละลายไซโตเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นของสารละลายไซโตเดียมไฮดรอกไซด์ และเวลาในบ่มใน autoclave ด้วยแผนการทดลองแบบ Box-Bechnken design โดยมีปริมาณร้อยละไซแลนเป็นค่าตอบสนอง (ตารางที่ 4.4) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 lb/in^2

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาสร้างสมการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนสารตั้งต้นต่อสารละลายไซโตเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นของสารละลายไซโตเดียมไฮดรอกไซด์ และเวลาในบ่มใน autoclave โดยใช้โปรแกรม Design Expert version 7 (Stat-Ease Inc., USA) จะได้ความสัมพันธ์ดังสมการ

$$Y = 21.76 + 11.46X_1 + 0.16X_2 - 13.95X_3 + 5.15X_1X_2 - 13.03X_1X_3 + 4.67X_2X_3$$

โดย Y คือ ปริมาณไซแลน (%)

X_1 คือ สัดส่วนสารตั้งต้นต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (g:ml)

X_2 คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (% w/v)

X_3 คือ เวลาการบ่มใน autoclave (mins)

และมี coefficient of determination หรือ R^2 เท่ากับ 0.8413 แสดงว่าสมการดังกล่าว อธิบายความแปรปรวนของตัวแปร X ได้ 84%

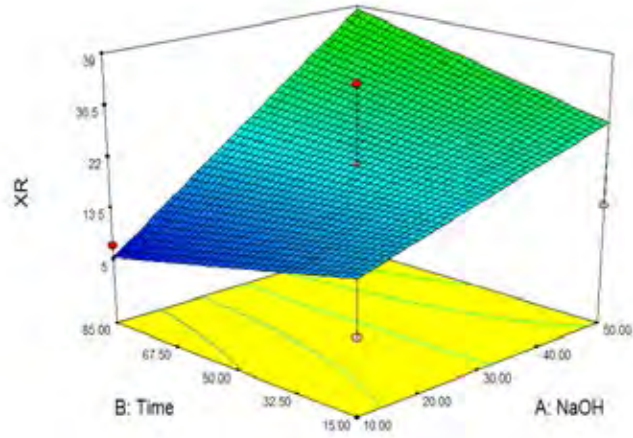
จากค่าตอบสนองสามารถสร้างแผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (Surface Plot) (ภาพที่ 4.2) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลให้ได้ปริมาณไซแลนสูงสุด และสามารถทำนายได้ว่าเมื่อปรับสัดส่วนของไมยราบยักษ์ต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 : 10 (g:ml) ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 50 และเวลาในการสกัด 85 นาที จะทำให้ได้ปริมาณไซแลนสูงสุดที่ร้อยละ 60.84 เมื่อทำการทดลองซ้ำที่ภาวะดังกล่าว พบว่าได้ปริมาณไซแลนร้อยละ 41.6 นอกจากนี้ regression model จากโปรแกรมแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0073) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ของ lack of fit (p-value = 0.46)

ตารางที่ 6 แผนการทดลองแบบ Box-Bechnken design และผลการตอบสนอง (ปริมาณไซแลน)

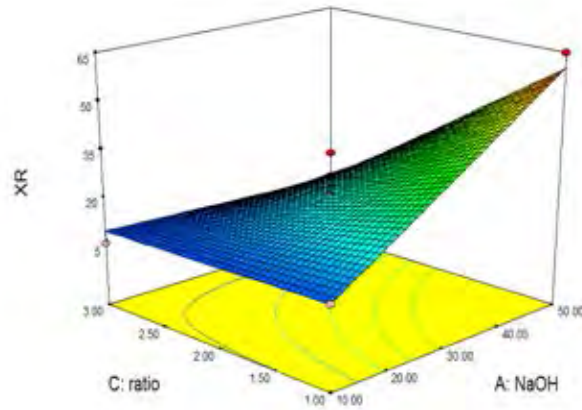
ชุดการทดลอง	ปัจจัย			รหัสปัจจัย			ปริมาณไซแลน (%)
	ความเข้มข้น NaOH (% w/v)	เวลาการบ่มใน autoclave (mins)	สัดส่วนไมยราบและสารละลายเบส (g:ml)	X ₁	X ₂	X ₃	
1	10	15	0.10	-1	-1	0	6.20+0.61
2	50	15	0.10	+1	-1	0	14.20+0.09
3	10	85	0.10	-1	+1	0	7.20+0.23
4	50	85	0.10	+1	+1	0	35.80+0.40
5	10	50	0.05	-1	0	-1	11.20+0.61
6	50	50	0.05	+1	0	-1	64.80+0.46
7	10	50	0.15	-1	0	+1	5.20+0.13
8	50	50	0.15	+1	0	+1	6.67+0.28
9	30	15	0.05	0	-1	-1	46.80+0.46
10	30	85	0.05	0	+1	-1	26.80+0.40
11	30	15	0.15	0	-1	+1	13.73+0.28
12	30	85	0.15	0	+1	+1	12.40+0.20
13	30	50	0.10	0	0	0	34.20+0.20
14	30	50	0.10	0	0	0	20.80+0.42
15	30	50	0.10	0	0	0	20.40+0.23

หมายเลข (-1, 0, +1) คือหมายเลขที่เป็นสัญลักษณ์แทนค่าปัจจัยในการสกัดไซแลนจากการออกแบบการทดลองแบบ Box-Bechnken design

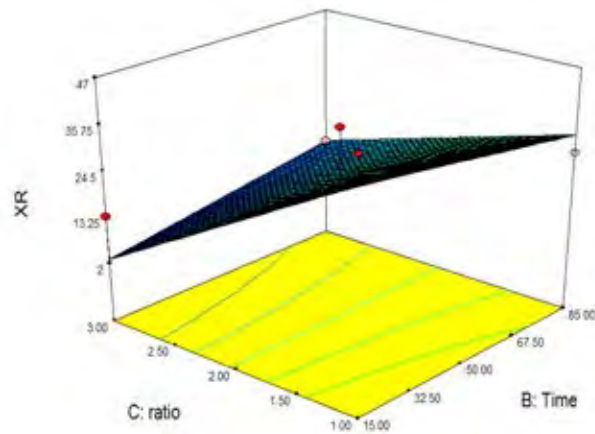
(a)



(b)



(c)



ภาพที่ 6 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (a) ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์และเวลาการบ่มใน autoclave (b) สัดส่วนไมยราบยักษ์ต่อสารละลายเบสและความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ และ (c) สัดส่วนไมยราบยักษ์ต่อสารละลายเบสและเวลาการบ่มใน autoclave

4.5 แอคติวิตีเอนไซม์ไซแลเนส

การตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนสที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL Y2311-1 พบว่า เอนโดไซแลเนสให้แอคติวิตีเท่ากับ 26.46 ± 0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และปีตา-ไซโลสิเดสให้แอคติวิตีเท่ากับ 15.74 ± 0.51 ยูนิตต่อกรัม

4.6 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเปลี่ยนไซแลนให้เป็นไซโลส

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยไซแลนให้เป็นน้ำตาลไซโลส โดยความเข้มข้นเอนโดไซแลเนส ความเข้มข้นปีตา-ไซโลสิเดส และเวลาในการย่อย ด้วยแผนการทดลองแบบ Box-Bechnken design โดยมีปริมาณร้อยละไซแลนเป็นค่าตอบสนอง (ตารางที่ 4.5) ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยควบคุมปริมาณไซแลนเริ่มต้นเท่ากับ 5% (w/v) ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาสร้างสมการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นไซแลเนส ความเข้มข้นปีตา-ไซโลสิเดส และเวลาในการย่อยโดยใช้โปรแกรม Design Expert version 7 (Stat-Ease Inc., USA) จะได้ความสัมพันธ์ดังสมการ

จากค่าตอบสนองสามารถสร้างแผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (Surface Plot) (ภาพที่ 4.3) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลให้ได้ปริมาณไซโลสสูงสุด และสามารถทำนายได้ว่าเมื่อปรับความเข้มข้นเอนโดไซแลเนส 28.90 ยูนิตต่อกรัมไซแลน ความเข้มข้นของปีตา-ไซโลสิเดส 29.97 ยูนิตต่อกรัมไซแลน และเวลาในการย่อย 13.61 ชั่วโมง จะทำให้ได้ปริมาณไซโลสสูงสุดที่ 4.6 มิลลิกรัมต่อกรัมไซแลน นอกจากนี้ regression model จากโปรแกรมแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} < 0.0001$) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ lack of fit ($p\text{-value} = 0.0696$)

$$Y = 0.14 + 0.015X_1 + 0.04X_2 + 0.029X_3 + 0.015X_1X_2 - 0.002X_1X_3 + 0.004X_2X_3$$

โดย Y คือ ปริมาณน้ำตาลไซโลส (มิลลิกรัมต่อกรัมไซแลน)

X_1 คือ ปริมาณไซแลเนส (ยูนิตต่อกรัมไซแลน)

X_2 คือ ปริมาณปีตา-ไซโลสิเดส (ยูนิตต่อกรัมไซแลน)

X_3 คือ เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)

และมี coefficient of determination หรือ R^2 เท่ากับ 0.9567 แสดงว่าสมการดังกล่าว อธิบายความแปรปรวนของตัวแปร X ได้ประมาณ 96%

จากค่าตอบสนองสามารถสร้างแผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (Surface Plot) (ภาพที่ 4.3) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลให้ได้ปริมาณไซโลสสูงสุด และสามารถทำนายได้ว่าเมื่อปรับความเข้มข้นเอนโดไซแลเนส 28.90 ยูนิตต่อกรัมไซแลน ความเข้มข้นของปีตา-ไซโลสิเดส 29.97 ยูนิตต่อกรัมไซแลน และเวลาในการย่อย 13.61 ชั่วโมง จะทำให้ได้ปริมาณไซโลสสูงสุดที่ 4.6 มิลลิกรัมต่อกรัมไซแลน เมื่อทำการทดลองซ้ำที่ภาวะ

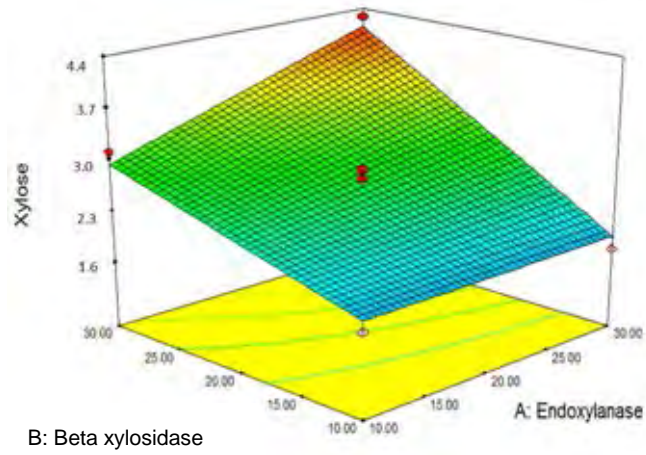
ดังกล่าว พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลไซโลส 4.2 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัมไซแลน ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ regression model จากโปรแกรมแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} < 0.0001$) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ของ lack of fit ($p\text{-value} = 0.0696$)

ตารางที่ 7 แผนการทดลองแบบ Box-Bechnken design และผลการตอบสนอง (ปริมาณน้ำตาลไซโลส)

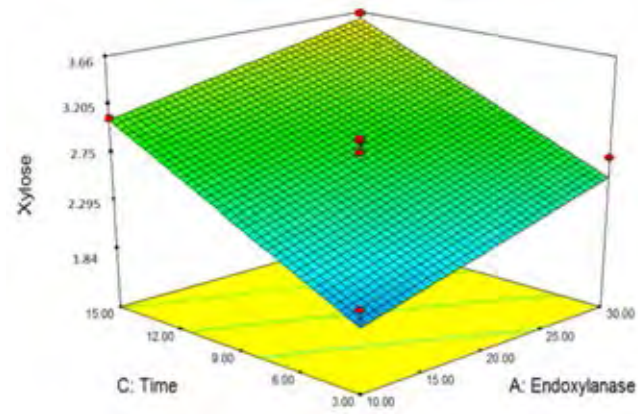
ชุดการทดลอง	ปัจจัย			รหัสปัจจัย			ปริมาณน้ำตาลไซโลส (mg/g xylan)
	ความเข้มข้นเอนโดไซแลนส (U/g xylan)	ความเข้มข้นปีตาไซโลลิตเดส (U/g xylan)	เวลาการบ่ม (hours)	X ₁	X ₂	X ₃	
1	10	10	9	-1	-1	0	1.80±0.01
2	30	10	9	+1	-1	0	1.80±0.01
3	10	30	9	-1	+1	0	3.20±0.00
4	30	30	9	+1	+1	0	4.20±0.01
5	10	20	3	-1	0	-1	2.20±0.00
6	30	20	3	+1	0	-1	2.80±0.01
7	10	20	15	-1	0	+1	3.00±0.01
8	30	20	15	+1	0	+1	3.60±0.01
9	20	10	3	0	-1	-1	1.40±0.00
10	20	30	3	0	+1	-1	2.60±0.01
11	20	10	15	0	-1	+1	2.60±0.00
12	20	30	15	0	+1	+1	3.80±0.01
13	20	20	9	0	0	0	2.80±0.00
14	20	20	9	0	0	0	2.80±0.01
15	20	20	9	0	0	0	2.80±0.00

หมายเลข (-1, 0, +1) คือหมายเลขที่เป็นสัญลักษณ์แทนค่าปัจจัยในการสกัดไซแลนจากการออกแบบการทดลองแบบ Box-Bechnken design

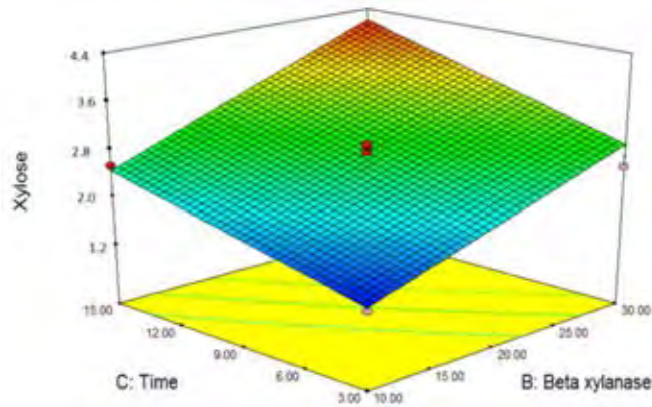
(a)



(b)



(c)



ภาพที่ 7 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (a) ความเข้มข้นเอนโดไซแลเนสและความเข้มข้นของบีตา-ไซโลสิดีส (b) ความเข้มข้นเอนโดไซแลเนสและเวลาในการย่อย และ (c) ความเข้มข้นของบีตา-ไซโลสิดีสและเวลาในการย่อย

บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา

5.1 การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

จากการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ตามวิธีของ Goering and Van Soest (1970) ในไมยราบยักษ์ พบว่ามีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณสูงที่สุด ลิกโนเซลลูโลสของไมยราบยักษ์ ประกอบด้วยเซลลูโลสร้อยละ 47.31 ± 0.84 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 16.95 ± 0.51 และลิกนินร้อยละ 16.81 ± 0.30 ซึ่งในส่วนของปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินมีปริมาณต่างกับการศึกษาของ Boonjan et al. (2014) ในไมยราบยักษ์พบว่าในผนังเซลล์ของไมยราบยักษ์ประกอบไปด้วยเซลลูโลสประมาณร้อยละ 47.56 เฮมิเซลลูโลสประมาณร้อยละ 20.90 และลิกนินประมาณร้อยละ 21.16 สาเหตุที่ผลการศึกษาดังกล่าวมีความแตกต่างกันอาจเป็นเพราะความผิดพลาดของการทำการศึกษา เนื่องจากได้ทำการวัดองค์ประกอบลิกโนเซลลูโลสเพียง 1 รอบ จึงอาจส่งผลให้ปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินที่ได้มีค่าคลาดเคลื่อน รวมทั้งถิ่นอาศัยที่ต่างกันอาจส่งผลให้ปริมาณลิกโนเซลลูโลสมีความแตกต่างกันได้ จากการศึกษาของ Benner, Moran and Hodson (1985) ที่พบว่าผลของ pH ในพื้นที่ต่างกันส่งผลให้ปริมาณลิกโนเซลลูโลสของพืชมีปริมาณต่างกันด้วย ซึ่งในการศึกษาวิจัยของ Boonjan et al. (2014) มีการเก็บตัวอย่างไมยราบยักษ์จากจังหวัดชัยนาท ส่วนในโครงการงานวิทยาศาสตร์นี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดพระนครศรีอยุธยา จึงอาจจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ปริมาณลิกโนเซลลูโลสที่ได้จากการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ หากมีการควบคุมปัจจัยดังกล่าวได้

5.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยวิธี Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของไซแลนที่สกัดได้จากไมยราบยักษ์ โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% (w/v) ที่ pH 7 เปรียบเทียบกับไซแลนมาตรฐานจาก beechwood xylan วิเคราะห์จากการดูดกลืนแสงอินฟราเรดในช่วงเลขคลื่น $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ จากสเปกตรัมพบว่า พีคที่ช่วงเลขคลื่นเท่ากับ $3,400 \text{ cm}^{-1}$ แสดงถึงการดูดกลืนแสงของหมู่ฟังก์ชัน -OH สำหรับพีคที่มีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดสูงในช่วงใกล้เคียงเลขคลื่น $1,466$ และ $1,044 \text{ cm}^{-1}$ แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน C-H และ C-O ตามลำดับ และพีคที่มีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดสูงในช่วงใกล้เคียงเลขคลื่น 980 cm^{-1} เป็นผลมาจากการดูดกลืนแสงของ CH_3 เมื่อเปรียบเทียบกับไซแลนมาตรฐานพบว่ามีพีคเกิดขึ้นมีความคล้ายคลึงในช่วง $1,100-600 \text{ cm}^{-1}$ และ $3,500-2,500 \text{ cm}^{-1}$ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในยูคาลิปตัส (Vena et al., 2013) แสดงถึงรูปแบบโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันของ xylan ในทั้งไซแลนมาตรฐาน และไซแลนจากไมยราบยักษ์และยูคาลิปตัส โดยความยาวคลื่นบางส่วนในช่วง $3,500-2,500 \text{ cm}^{-1}$ ที่ไม่เหมือนกับไซแลนมาตรฐานอาจมีสาเหตุมาจากการที่ยังมีลิกนินปนเปื้อนอยู่ แต่จากการศึกษานี้ยังไม่สามารถสรุปได้เช่นนั้น เนื่องจากไม่ได้มีการวัดปริมาณลิกนินในสารสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์ นอกจากนั้น ลักษณะโครงสร้างของไซแลนที่อาจมีความแตกต่างกันในส่วนโซ่ข้างเนื่องจากไซแลนที่ทำการศึกษาและสารมาตรฐานสกัดจากพืชคนละสายพันธุ์

5.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์ด้วยเบส

จากผลการทดลองการสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์ โดยจะศึกษาสัดส่วนสารตั้งต้นต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเวลาในบ่มใน autoclave ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken design แล้วนำมาวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย RSM สามารถทำนายได้ว่าเมื่อปรับสัดส่วนของไมยราบยักษ์ต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 : 10 (g:ml) ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 50 และเวลาในการสกัด 85 นาที จะทำให้ได้ปริมาณไซแลนสูงสุดที่ร้อยละ 60.84 เมื่อทำการทดลองซ้ำอีกครั้งพบว่าได้ปริมาณไซแลนร้อยละ 41.6 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สาเหตุเกิดจากข้อจำกัดของการทดลองในครั้งนี้เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้นในขณะเดียวกันก็ต้องใช้กรดในการปรับ pH ให้เป็นกลาง จึงส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาสะเทินได้ผลึกเกลือจำนวนมาก ซึ่งยากต่อการกำจัดออกไป ส่งผลให้ผลึกเกลือนี้ปนไปกับไซแลนทำให้การวิเคราะห์ปริมาณไซแลนเกิดความผิดพลาด รวมทั้งเมื่อใช้เมธานอลกำจัดเกลือออกไปก็อาจจะทำให้ไซแลนที่สกัดได้หายไปด้วย และในขั้นตอนของการวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองที่เลือกคำนวณปริมาณไซแลนที่ได้จากการเทียบกับน้ำหนักของสารตั้งต้น แต่ถ้าเลือกวิธีการคำนวณปริมาณไซแลนสัมพัทธ์ที่ได้จากการนำปริมาณไซแลนที่สกัดได้เทียบกับปริมาณเฮมิเซลลูโลสในไมยราบยักษ์ จะทำให้ทราบปริมาณไซแลนที่แม่นยำมากกว่า (Patipong, 2015) รวมทั้งขั้นตอนของการวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมการเลือกใช้ข้อมูลมีผลทำให้ค่าจากโปรแกรมที่ได้ มีค่าคลาดเคลื่อนจากการทดลองจริง

5.4 แอคติวิตีเอนไซม์ไซแลเนส

แอคติวิตีของไซแลเนสที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL Y2311-1 พบว่า เอนโดไซแลเนสให้แอคติวิตีเท่ากับ 26.46 ± 0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และปีตา-ไซโลซิเดสให้แอคติวิตีเท่ากับ 15.74 ± 0.51 ยูนิตต่อกรัม ทั้งนี้ *A. pullulans* NRRL Y2311-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีการรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์เอนโดไซแลเนสที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่สูง (Leather, 2003) ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกเอนไซม์ไซแลเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ดังกล่าวมาผลิตเอนโดไซแลเนสและปีตา-ไซโลซิเดส

5.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเปลี่ยนไซแลนให้เป็นไซโลส

จากผลการย่อยไซแลนให้เป็นไซโลสด้วยเอนไซม์ไซแลเนส โดยปรับปริมาณไซแลเนส ปริมาณปีตา-ไซโลซิเดส และเวลาในการย่อย ด้วยวิธี RSM ซึ่งออกแบบแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต โดยมีปริมาณน้ำตาลไซโลสเป็นค่าตอบสนอง ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยควบคุมปริมาณไซแลนเริ่มต้นเท่ากับ 5% (w/v) ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร พบว่า ปัจจัยความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดและเวลาที่ใช้ในการย่อยมีผลต่อการย่อยไซแลนให้เป็นไซโลส ซึ่งโปรแกรมสามารถทำนายได้ว่า เมื่อปรับความเข้มข้นเอนโดไซแลเนส 28.9 ยูนิตต่อกรัมไซแลน ความเข้มข้นของปีตา-ไซโลซิเดส 29.97 ยูนิตต่อกรัมไซแลน และเวลาในการย่อย 13.61 ชั่วโมง จะทำให้ได้ปริมาณไซโลสสูงสุดที่ 4.6 มิลลิกรัมต่อกรัมไซแลน เมื่อทำการทดลองซ้ำอีกครั้งตามภาวะการย่อยดังกล่าวพบว่าได้ปริมาณน้ำตาลไซโลส 4.6 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัมไซแลน ซึ่งปริมาณน้ำตาลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดของปริมาณเอนไซม์ที่มีอยู่นั้นมีปริมาณน้อย จึงทำให้ต้องลดขนาดการทดลองลง มีการจำกัดปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาน้อยลง ทำให้การทำปฏิกิริยาการย่อยไซแลนนั้นทำได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ จึงส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ได้มีปริมาณน้อย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

6.1 การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

ไมยราบยักษ์ประกอบด้วยเซลลูโลสร้อยละ 47.31±0.84 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 16.95 ±0.51 และลิกนิน ร้อยละ 16.81±0.30

6.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยวิธี Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

วิเคราะห์จากการดูดกลืนแสงอินฟราเรดในช่วงเลขคลื่น 4000-400 cm^{-1} จากสเปกตรัมพบว่า พีคในช่วงเลขคลื่นเท่ากับ 3,400 cm^{-1} แสดงถึงการดูดกลืนแสงของหมู่ฟังก์ชัน -OH สำหรับพีคที่มีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดสูง ในช่วงใกล้กับเลขคลื่น 1,466 และ 1,044 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน C-H และ C-O ตามลำดับ และพีคที่มีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดสูงในช่วงใกล้กับเลขคลื่น 980 cm^{-1} เป็นผลมาจากการดูดกลืนแสงของ CH_3

6.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดไซแลนจากไมยราบยักษ์

ปริมาณไซแลนสูงสุดที่โปรแกรมทำนายไว้ ได้แก่ สารตั้งต้นต่อสารละลายไซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 : 10 (w/v) ความเข้มข้นของสารละลายไซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 50 และเวลาในการสกัด 85 นาที จะทำให้ได้ปริมาณไซแลนสูงสุดที่ร้อยละ 60.84 เมื่อทำการทดลองซ้ำจากปัจจัยดังกล่าวพบว่าได้ปริมาณไซแลนร้อยละ 41.6

6.4 แอคติวิตีเอนไซม์ไซแลเนส

การตรวจสอบแอกติวิตีของไซแลเนสที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL Y2311-1 พบว่า เอนโดไซแลเนสให้แอกติวิตีเท่ากับ 26.46±0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และบีตา-ไซโลสิดเนสให้แอกติวิตีเท่ากับ 15.74±0.51 ยูนิตต่อกรัม

6.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเปลี่ยนไซแลนให้เป็นไซโลส

ปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงสุดที่โปรแกรมทำนายไว้ ได้แก่ ความเข้มข้นเอนโดไซแลเนส 28.90 ยูนิตต่อกรัมไซแลน ความเข้มข้นของปีตา-ไซโลสิดีส 29.97 ยูนิตต่อกรัมไซแลน และเวลาในการย่อย 13.61 ชั่วโมง จะทำให้ได้ปริมาณไซโลสสูงสุดที่ 4.6 มิลลิกรัมต่อกรัมไซแลน เมื่อทำการทดลองซ้ำจากปัจจัยดังกล่าวพบว่าได้ปริมาณน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 4.2 มิลลิกรัมต่อกรัมไซแลน ซึ่งปริมาณน้ำตาลไซโลสจากการทำนายและจากการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

- เพ็ญนภา มานิตย์โชติพิสิฐ, 2551. ลักษณะสมบัติของ *Aureobasidium pullulans* ไอโซเลต บนพื้นฐานของการวิเคราะห์ลำดับเบสหลายตำแหน่งและความสัมพันธ์ระหว่างแอลฟาอะไมเลสแอกติวิตีกับแบบแผนพอลูลูแลน. วิทยานิพนธ์ ดุษฎีบัณฑิต, วิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธัญญรัตน์ ศรีนรสิงห์ ญัฎฐา เลากุลจิตต์ และอรพิน เกิดชูชื่น. 2558. การสกัดน้ำตาลไซโลสจากเปลือกข้าว Extraction of Xylose from Rice Husk. ว. วิทย. กษ. 46: 309-312.
- สร้อยสวัสดิ์ โรจนกุล. 2552. การผลิตไซแลนสจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการประยุกต์ในการผลิตเอทานอลชีวภาพ. เทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Adt, I., Oust, A., Moretro, T., Naterstad, K., Sockalingum, G.D., Manfait, M. and Kohler, A. 2006. Fourier transform infrared and Raman Spectroscopy for Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 228-232.
- Adt, I., Toubas, D., Pinon, J.M. and Manfait, M. 2002. FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. *Archives of Microbiology* 185: 277-285.
- Ahmadi, M., Vahabzadeh, F., Bonakdarpour, B., Mofarrah, E., and Mehranian, M. 2005. Application of the central composite design and response surface methodology to the advanced treatment of olive oil processing wastewater using Fenton's peroxidation. *Journal of Hazardous Materials B123*: 187-195.
- Allenza, P., Scherl, D.S., and Detroy, R.W. 1996. Hydrolysis of xylan by an immobilized xylanase from *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 17: 425-433.
- Bailey, M.J., Biely, P., and Poutanen, K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* 23: 257-270.
- Bankeeree, W. et al. 2014. Effect of polyols on thermostability of xylanase from a tropical isolate of *Aureobasidium pullulans* and its application in prebleaching of rice straw pulp. *SpringerPlus* 3: 37.
- Bankeeree, W., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Chaiareekij, S., Eveleigh, D.E., Kim, S.W., and Punnapayak, H. 2014. Effect of polyols on thermostability of xylanase from a tropical isolate of *Aureobasidium pullulans* and its application in prebleaching of rice straw pulp. *SpringerPlus* 3: 37.

- Barbosa, M., Medeiros, M., Mancilha, I., Schneider, H. and Lee, H. 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-Xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 3: 241-251.
- Benner, R., Moran, M.A. and Hodson, R.E. 1985. Effects of pH and plant source on lignocellulose biodegradation rates in two wetland ecosystems, the Okefenokee Swamp and a Georgia salt marsh 1, 2, 3. *Limnology and Oceanography*, 30(3), 489-499.
- Biely, Michael J. and Poutanen, K. 1989. Production of xylanolytic enzyme by strains of *Aspergillus*. *Applied Microbiology Biotechnology* 30: 5-10.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology* 3: 286-290.
- Brault, J. 1996. New approach to high-precision Fourier transform spectrometer design. *Applied Optics* 35(16): 2891–2896.
- Boonjan, C., Prasongsuk, S., Tungasmita, D., Lotrakul, P., Eveleigh, D. and Punnapayak, H. 2014. *The 26th annual meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference* 59-64.
- Burattini, E., Cavagna, M., Dell'Anna, R., Malvezzi C., Monti, F., Rossi, F. and Torriani, S. 2008 FTIR microspectroscopy study of analysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Vibrational Spectroscopy* 47: 139-147.
- Cheng, K.C., Catchmark, J.M., and Demirci, A. 2009. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *Journal of Biological Engineering* 3(1): 12.
- Chosdu, R., Hilmy, N., Erizal, Erlinda, T. B., & Abbas, B. 1993. Radiation and chemical pretreatment of cellulosic waste. *Radiation Physics and Chemistry* 42(4-6): 695–698.
- Chosdu, R., Hilmy, N., Erizal, Erlinda, T.B. and Abbas, B. 1993. Radiation and chemical pretreatment of cellulosic waste. *Radiation Physics and Chemistry* 42(4-6): 695–698
- Christov, L.P., Myburgh, J., van Tonder, A. and Prior, B.A. 1997. Hydrolysis of extracted and fibre-bound xylan with *Aureobasidium pullulans* enzymes. *Journal of Biotechnology* 55: 21-29.
- Cooke, W.B. 1959. An ecological life history of *Aureobasidium pullulans*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 12(1): 1–45.
- Deutschmann, R., and Dekker, R.F.H., 2012. From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. *Biotechnology Advances* 30: 1627–1640.

- Essendoubi, M., Toubas, D., Bouzaggou, M., Pinon, J.-M., Manfait, M., and Sockalingum, G.D. 2005. Rapid identification of *Candida* species by FT-IR. microspectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1724(3): 239–247.
- Galichet, A, Sockalingum, G., Belarbi, A. and Manfait, M. 2001. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. *FEMS microbiology letters* 197: 179-86.
- Galichet, A., Sockaligum, G.D., Belarbi, A. and Manfait, M. 2001. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls : study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. *FEMS Microbiology Letters* 197: 179-186.
- Garip, S., Gozen, Cetin A. and Severcan, F. 2009. Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates. *Food Chemistry* 113: 1301-1307.
- Gilbert, J. and Hazlewood, P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *Microbiology*. 139: 187-194.
- Glazer, A.N. and Nikaido, H. 2007. *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. 2nd ed. Cambridge University Press.
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagent, producers and some applications). Washington DC: Agriculture Research Service USDA.
- Gomes, J. et al. 1993. Production of high level of cellulase-free and thermostable xylanase by a wild strain of *Thermomyces lanuginosus* using beechwood xylan. *Journal of Biotechnology* 30: 283-297.
- Iyer, P.V., Wu, Z.W., Kim, S.B. and Lee, Y.Y. 1996. Ammonia recycled percolation process for pretreatment of herbaceous biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57/58: 121-132.
- Jansen, N.B., Flickinger, M.C., and Tsao, T. 1983. Application of bioenergetics to modelling the microbial conversion of D-xylose to 2,3-butanediol. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 573-582.
- Jilkine, K., Gough, K., Julian, R. and Kaminskyj, S. 2008. A sensitive method for examining whole-cell biochemical composition in single cells of filamentous fungi using synchrotron FTIR spectromicroscopy. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102. 540-546.
- Kötter, P. and Ciriacy, M. 1993. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 776-783.

- Kumar, P., Barrett, C.M., Delwiche, M.J. and Stroeve, P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 48: 3713-3729.
- Lai, Y.Z. 1991. Chemical degradation. In: Hon, D N S and Shiraishi, N (Ed.): Wood and cellulosic chemistry. New York and Basel: Marcel Dekker, Inc., p. 466.
- Leathers, T.D. 1986. Color variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 1026-1030.
- Leathers, T.D. 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology Biotechnology* 62: 468-473.
- Li, Z., Yasen, A., He, P., and Zou, T. 2013. Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors. *Food Chemistry* 138: 1742-1748.
- Lonsdale, W.M. and Farrell, G. S. 1998. Testing the effects on *Mimosa pigra* of a biological control agent *Neurostrota gunniella* (Lepidoptera: Gracillariidae) *Plant Competition and Fungi Under Field Conditions. Biocontrol Science and Technology* 8(4): 485-500.
- Lonsdale, W.M., and Farrell, G.S., 1998. Testing the Effects on *Mimosa pigra* of a biological Control agent *Neurostrota gunniella* (Lepidoptera: Gracillariidae), *Plant Competition and Fungi Under Field Conditions. Biocontrol Science and Technology* 8: 485-500.
- Lonsdale, W.M., and Segura, R. 1987. A demographic study of native and introduced populations of *Mimosa pigra*. In *Proceedings of the Eighth Australian Weeds Conference, Sydney, New South Wales, Australia, 21-25 September, 1987* (pp. 163-166). Weed Society of New South Wales.
- Maquelin, K., Cool-Smith, L.P., Endtz, H.P., Bruining, H.A. and Puppels, G.J. 2002. Rapid Identification of *Candida* species by Confocal Raman Microspectroscopy. *Journal of Clinical Microbiology* 594-600.
- Marcotte, L. et al. 2007. Crystal structure of poliovirus 3CD protein: virally encoded protease and precursor to the RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology* 81(7): 3583-3596.
- McIntyre, V., Grace, B., and Schmidt, S. 2007. Impacts of the biocontrol agent *Malacorhinus irregularis* (Coleoptera, Chrysomelidae) on *Mimosa pigra* seedlings and the importance of root nodules. *Biocontrol Science and Technology* 17: 365-374.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.

- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
- Nair, P.K.R., Gordon, A.M., Mosquera-Losada, M.R. 2008. Agro-forestry, *in* Jorgensen, S.E., Fath, B.D. (eds): *Ecological Engineering. Encyclopedia of Ecology*, Vol. 1, Elsevier, Oxford, U.K., pp. 101–110.
- Ohta, K., Fujimoto, H., Fujii, S. and Wakiyama, M. 2010. Cell-associated beta-xylosidase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524: Purification, properties, and characterization of the encoding gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110: 152-157.
- Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabee, W., Pye, K., Xiao, Z., Zhang, X. and Saddler, J. 2005. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnology and Bioengineering* 90: 473-481.
- Parajó, J.C., Alonso, J.L. and Moldes, A.B. 1997. Production of lactic acid from lignocellulose in a single stage of hydrolysis and fermentation. *Food Biotechnology* 11: 45–58.
- Patipong, T. 2015. *Production of Xylooligosaccharides from weeds using a xylanase from Aureobasidium pullulans*. Master's Thesis. Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University
- Paynter, Q., and Flanagan, G.J. 2004. Integrating herbicide and mechanical control treatments with fire and biological control to manage an invasive wetland shrub, *Mimosa pigra*. *Journal of Applied Ecology* 41: 615-629.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., and Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* 5(2): 53–63.
- Pramual, P., Khumkratok, S., and Wongpakam, K. 2011. Population genetics of invasive weed *Mimosa pigra* L. (Mimosaceae) in Thailand. *Pakistan Journal of Botany* 43: 2721-2726.
- Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Ali, I., Bankeeree, W. and Punnapayak, H. 2017. The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. *Folia Microbiologica* 63(2): 129–140.
- Pu, Y., Zhang, D., Singh, P.M. and Ragauskas, J. 2008. The new forestry biofuels sector. *Biofuels Bioproducts and Biorefining* 2: 58-73.
- Punnapayak, H., Sudhadham, M., Prasongsuk, S. and Pichayangkura, S. 2003. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30: 89-94.

- Ramos, S. and Garcia-Acha, A. 1975. A vegetative cycle of *Pullaria pullulans*. *Transactions of the British Mycological Society* 64: 129-135.
- Remón, J., and others. 2017. Controllable production of liquid and solid biofuels by doping-free, microwave-assisted, pressurised pyrolysis of hemicellulose. *Energy Conversion and Management* 144: 104–113.
- Sanchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27: 185-194.
- Sen, R., and Swaminathan, T. 1997. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47(4): 358–363.
- Shigemori, K., Azechi, H., Nakai, M., Takabe, H. and Mima, K. 1998. *Shigemori et al. Reply: Physical Review Letters* 80(15): 3415–3415.
- Silva, A.E.D., Marcelino, H.R., Gomes, M.C.S., Oliveira, E.E., Nagashima, T. and Egito, E.S.T. 2012. Xylan, a promising hemicellulose for pharmaceutical use. *Products and Applications of Biopolymers* 61-84.
- Sjöström, E. and Alén, R. 1999. *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking. Springer Series in Wood Science.* doi:10.1007/978-3-662-03898-7.
- Sockalingum, G.D et al. 1997. ATR-FTIR spectroscopic investigation of imipenem-susceptible and-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isogenic strains. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 232: 240–246.
- Vázquez, M.J., Alonso, J.L., Domínguez, H. and Parajó, J.C. 2000. Xylooligosacchrides: manufacture and application. *Trends in Food Science and Technology* 11: 387–393.
- Vena, F., García-Aparicio, P., Brienza, M., Görgens, F. and Rypstra, T. 2013. Effect of Alkaline Hemicellulose Extraction on Kraft Pulp Fibers from *Eucalyptus Grandis*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 33. 157-173.
- Visser, S. and Parkinson, D. 1992. Soil biological criteria as indicators of soil quality: Soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture* 7. 33 - 37.
- Wong, Ken K.Y., Tan, Larry U. L., and Saddler, John N. 1988. Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. *Microbiological Reviews*: 301-317.
- Woodward, F.I. 1987 *Climate and plant distribution*. Cambridge University Press.
- Yurlova, N.A., Hoog de G.S., and Gerrits van den Ende, A.H.G. 1999. Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. *Studies in Mycology* 43: 63-69

Yurlova, N.A., Hoog, G.S., Gerrits, A.H.G. 1999. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology* 43: 63–69.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์องค์ประกอบเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

ภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมี

1. Sodium lauryl sulfate (APS)
2. Disodium ethylene diamine tetraacetate (EDTA) (APS)
3. Sodium borate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (APS)
4. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Merck)
5. 2-Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoethyl ether) (Merck)
6. Sodium Sulfite (NaSO_3) (Scharlau)
7. Decahydronaphthalene (Fluka)
8. Acetone (Merck)
9. Sulfuric acid (Merck)
10. Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) (SERVA)
11. Potassium permanganate (KMnO_4) (Carlo Erba)
12. Silver sulfate (Ag_2SO_4) (Carlo Erba)
13. Ferric nitrate nonahydrate ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (APS)
14. Silver nitrate (AgNO_3) (Merck)
15. Potassium acetate (Scharlau)
16. Acetic acid, glacial (Merck)
17. Tertiary butyl alcohol (Butanol) (APS)
18. Oxalic acid dehydrate (Carlo Erba)
19. 95% Ethanol
20. Hydrochloric acid (HCL) (Merck)

การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

1. สารละลาย Neutral Detergent

1.1 ชั่ง Disodium ethylene diamine tetraacetate (EDTA) 16.18 กรัม และ Sodium borate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 6.81 กรัม ใส่ในปิกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ นำไปต้มจนละลายหมด

1.2 ละลาย Sodium lauryl sulfate 30 กรัม ในน้ำ แล้วเติม 2-Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoethyl ether

1.3 นำสารละลายในข้อ 1.1 มาผสมกับสารละลายในข้อ 1.2

1.4 ชั่ง Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) 4.56 กรัม ใส่ในปิกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ แล้วนำไปต้มจนละลายหมด นำไปผสมกับสารละลายผสมที่ได้ในข้อ 1.3 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับ PH ให้อยู่ในช่วง 6.9-7.1

2. สารละลาย Acid Detergent

ละลาย Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) 20 กรัม ในกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดนี้ให้ได้ 1 ลิตร

3. สารละลาย Saturated potassium permanganate

ละลาย Potassium permanganate (KMnO_4) 50 กรัม และ Silver sulfate (Ag_2SO_4) 0.05 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ในขวดแก้วสีชา อย่าให้โดนแสง

4. สารละลาย Lignin buffer

สารละลาย Ferric nitrate nonahydrate ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 6 กรัม และ Silver nitrate (AgNO_3) 0.15 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม Acetic acid glacial 500 มิลลิลิตร เติม Potassium acetate 5 กรัม และเติม Tertiary butyl alcohol (Butanol) 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5. สารละลาย Combined permanganate

ผสมสารละลาย Saturated potassium permanganate กับสารละลาย Lignin buffer ในอัตราส่วน 2.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บสารละลายผสมนี้ในขวดสีชา แช่ในตู้เย็นไม่ให้ถูกแสง ถ้าสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีแดงแล้วจะไม่สามารถนำมาใช้ได้อีก

6. สารละลาย Demineralizing

ละลาย Oxalic acid dehydrate 50 กรัม ในปริมาตร 700 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร และ Hydrochloric acid (HCl) 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

7. สารละลาย 80% ethanol

ผสม 95% Ethanol มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 157 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

การหาปริมาณองค์ประกอบชีวมวลพืช

1. การวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช (Goering and Van Soest, 1970)

1.1 การสกัดด้วยสารละลาย Neutral detergent

1) นำ Sintered glass crucible เบอร์ 1 ขนาด 50 มิลลิลิตร ไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ใน desiccator ทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

2) ชั่งตัวอย่างที่แห้งและบดละเอียดขนาด 20-30 mesh หรือ 1 มิลลิเมตร ประมาณ 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร

3) เติมสารละลาย Neutral detergent 100 มิลลิลิตร Sodium sulfite 0.5 กรัม และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร นำไป reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนับตั้งแต่เวลาเริ่มเดือด

4) ถ่ายส่วนผสมที่ reflux เสร็จแล้วลงใน Sintered glass crucible ที่วางอยู่บนชุดกรอง ล้างตัวอย่างใน crucible ด้วยน้ำร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย Acetone 2 ครั้ง ดูดสารละลายออกด้วยเครื่อง vacuum pump จนแห้ง จากนั้นนำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

5) นำ crucible ออกมาทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือปริมาณ Neutral detergent fiber (NDF)

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ NDF} = \frac{[(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก NDF}) - \text{น้ำหนัก crucible}] * 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

1.2 การสกัดด้วยสารละลาย Acid detergent

1) นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดด้วย Neutral detergent มาถ่ายใส่บีกเกอร์เพื่อทำการ reflux ด้วย Acid detergent โดยเติม Acid detergent 100 มิลลิลิตร และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นับตั้งแต่เริ่มเดือด

2) กรองตัวอย่างพืชใน crucible ใบเดิม เพื่อลดการสูญเสียตัวอย่างให้น้อยที่สุด แล้วล้างด้วยน้ำร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย 80% Ethanol 2 ครั้ง

3) นำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้คือ น้ำหนักของ Acid detergent fiber (ADF) น้ำหนักของเฮมิเซลลูโลส

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ ADF} = \frac{[\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก ADF}] - \text{น้ำหนัก crucible}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}} * 100$$

$$\% \text{ Hemicellulose} = \% \text{ NDF} - \% \text{ ADF}$$

1.3 การวิเคราะห์หา permanganate lignin (PML)

1) เติมสารละลาย Combined permanganate 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible ที่มีตัวอย่างซึ่งผ่านการสกัดด้วย Acid detergent แล้วแช่ crucible ลงในภาชนะที่มีตัวอย่างซึ่งผ่านการสกัดด้วย Acid detergent แล้วแช่ crucible ลงในภาชนะที่มีน้ำเย็นสูงประมาณ 2 เซนติเมตร คนด้วยแท่งแก้วเพื่อไม่ให้ตัวอย่างจับเป็นก้อน ทิ้งไว้ 45 นาที โดยคนเป็นบางครั้ง จากนั้นดูดสารละลายออกด้วยเครื่อง vacuum pump

2) เติมสารละลาย Combined permanganate 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible อีกครั้ง ทิ้งไว้ 45 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมดโดยใช้ vacuum pump

3) เติมสารละลาย Determinizing 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible อีกครั้ง ทิ้งไว้ 45 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมดโดยใช้ vacuum pump ทำซ้ำจนตัวอย่างพืชเป็นสีขาวภายในเวลา 20 นาที จากนั้นล้างออกด้วย 80% Ethanol และ Acetone แล้วนำไปดูดออกให้หมดโดยใช้ vacuum pump

4) นำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง Acid detergent fiber (ADF) และน้ำหนักของตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก คือ น้ำหนักของลิกนิน

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ Lignin} = \frac{(A-B)}{C} * 100$$

C

A = น้ำหนัก crucible + น้ำหนัก ADF

B = น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก

C = น้ำหนักตัวอย่างพืช

1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสด้วยการเผาเถ้า

นำ crucible ที่มีตัวอย่างพืชซึ่งผ่านการสกัดลิกนินออกแล้วในข้อ 1.3 ไปเผาในเครื่องเผาเถ้า ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง น้ำหนักตัวอย่างพืชหลังการสกัดลิกนินออก และน้ำหนักหลังการเผาเถ้า คือ น้ำหนักเซลลูโลส ส่วนน้ำหนักเถ้าก็คือ ผลต่างระหว่างน้ำหนักหลังการเผาเถ้าและน้ำหนัก crucible

ภาคผนวก ข
สารละลายบัฟเฟอร์

ภาคผนวก ข
สารละลายบัฟเฟอร์

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ตามวิธีของ Gomori (1955 อ้างโดย Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย A : 0.05 M dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.80 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8.90 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

pH	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)
5.8	4.00	46.00
6.0	6.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.50	25.50
7.0	30.50	19.50
7.2	36.00	14.00
7.4	40.50	9.50
7.6	43.50	6.50
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

ภาคผนวก ค

การเตรียมสาร Dinitrosalicylic acid (DNS)

ภาคผนวก ค

การเตรียมสาร Dinitrosalicylic acid (DNS)

ละลาย DNS 5 กรัมใน 2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายโซเดียมโพตัสเซียมทาร์เตรต (จำนวน 150 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร) ลงไปในขณะที่ยังร้อนอยู่ คนให้เข้ากันแล้วเติมน้ำจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

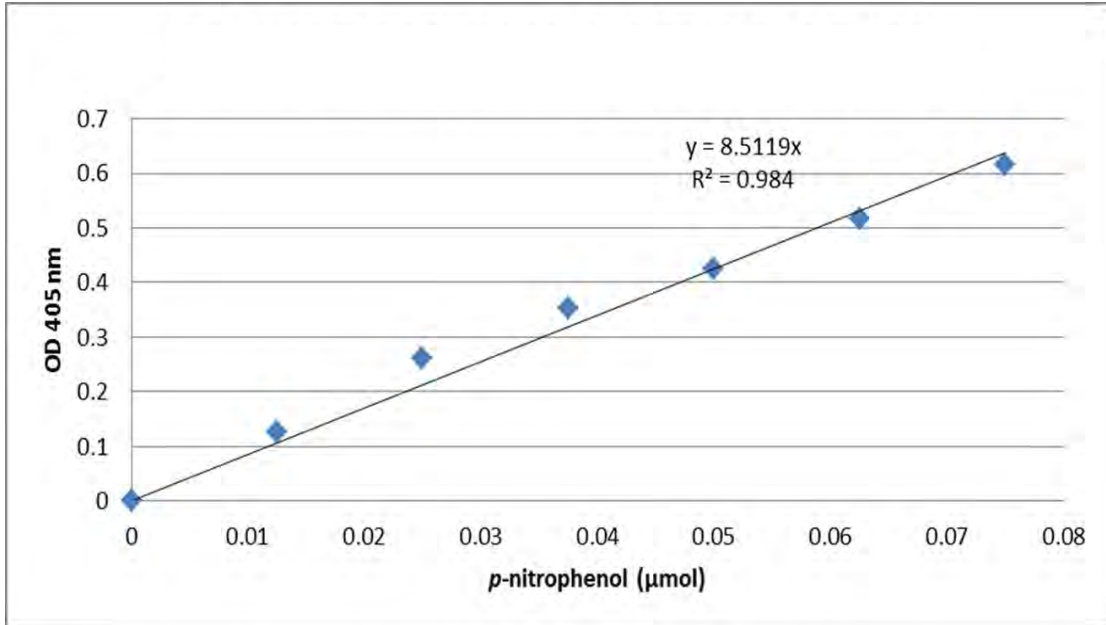
ชั่งกลูโคส 0.1 กรัมและละลายน้ำ จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรในขวดเชิงปริมาตร ใช้เป็นสารละลายมาตรฐานกลูโคส ที่มีปริมาณกลูโคส 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยใช้สาร Dinitrosalicylic acid (DNS) (Chaplin, 1986)

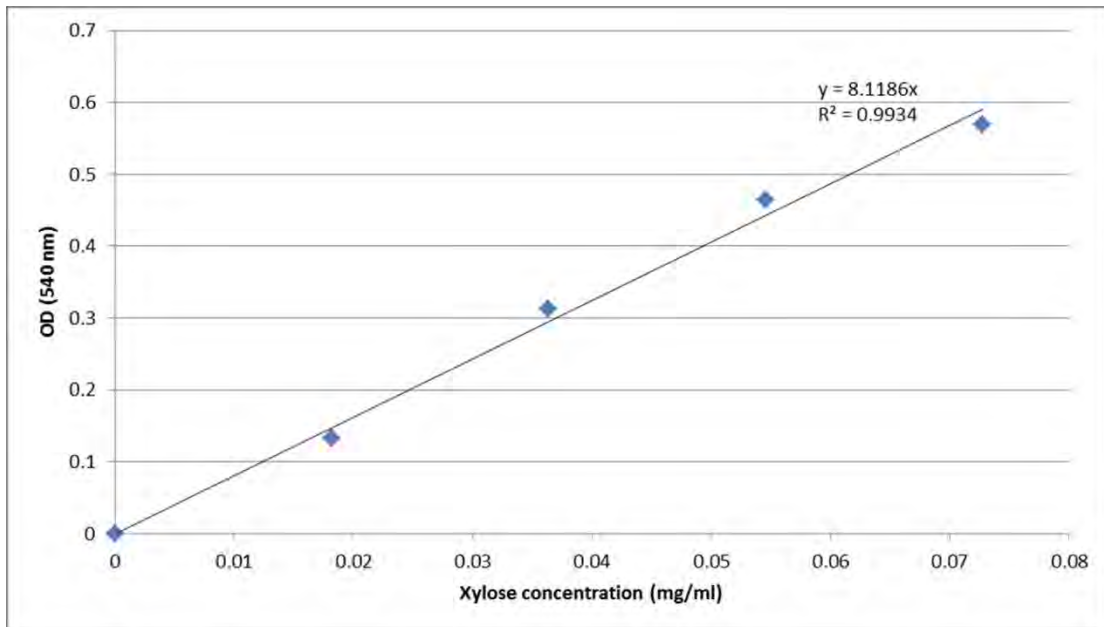
1.1 ดูดสารละลายมาตรฐานกลูโคสใส่หลอดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของกลูโคสในระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-1,000 ไมโครกรัม

1.2 เติมสาร DNS 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดกลูโคสมาตรฐานทุกหลอด และต้มในน้ำเดือด 10 นาที จะเกิดสีน้ำตาลตามระดับปริมาณกลูโคสในแต่ละหลอด จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นทันที

1.3 นำไปวัดค่า Absorbance ที่ 540 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มา plot เป็นกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ ค1 standard curve ของ p - nitrophenol มาตรฐาน โดยวัดที่ OD_{405nm}



ภาพที่ ค2 standard curve ของไซโลสมาตรฐาน โดยวัดที่ OD_{540nm}