

การใช้ประโยชน์จากฟางข้าวเหลือทิ้งเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสโดย เชื้อราไอโซเลท KUMR1

Utilization of Rice Straw Waste for Xylanase and Cellulase Production by Fungal Isolate KUMR1

ธัญชนก เอมอิม¹, ณัฐฐิธิดา นามนุช¹, อานนท์ ธรรมสิทธินรงค์^{1,2}, สุตติชา ณ ระนอง ธรรมสิทธินรงค์^{1,2*}
Thanchanok Emim¹, Nattida Namnuch¹, Anon Thammasittirong^{1,2},
Sutticha Na-Ranong Thammasittirong^{1,2*}

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ, คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

¹Department of Science and Bioinnovation, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University
Kamphaeng Saen campus

²หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพจุลินทรีย์, คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

²Microbial Biotechnology Unit, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University
Kamphaeng Saen campus

บทคัดย่อ

ฟางข้าวเป็นหนึ่งในวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่มีมากในประเทศไทย ฟางข้าวเป็นวัสดุราคาถูกที่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นทางเลือกที่คุ้มค่าสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง การศึกษานี้ได้ศึกษาการใช้ฟางข้าวเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราไอโซเลท KUMR1 ที่แยกได้จากดิน จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบโครงสร้างแคลมป์คอนเนกชัน (Clamp connection) แสดงว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 เป็นเชื้อราในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา (Phylum Basidiomycota) เมื่อนำเชื้อราไอโซเลท KUMR1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งฟางข้าวและทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โดยใช้วิธีการย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน จากผลการทดลองที่พบโซนใสบนอาหารแข็งฟางข้าวจึงทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารฟางข้าวโดยการหมักแบบอาหารเหลวและการหมักแบบอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าได้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดเท่ากับ 978.24 ยูนิตต่อมิลลิกรัมและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 1.10 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ในวันที่ 14 ของการหมักฟางข้าวแบบอาหารเหลว โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าการใช้ไซเลนและคาร์บอกซิลเมทิล-เซลลูโลสทางการค้าเป็นสารตั้งต้นเท่ากับ 5.19 เท่า และ 1.75 เท่า ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสต้นทุนต่ำและเชื้อราไอโซเลท KUMR1 เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลส

คำสำคัญ: ฟางข้าว ไซลานเนส เซลลูเลส การหมักแบบอาหารเหลว การหมักแบบอาหารแข็ง

Abstract

Rice straw is one of the abundant lignocellulosic waste materials in Thailand. This cheap material could be used as a cost-effective alternative substrate for high value-added product productions. In this study, an investigation was performed using rice straw as substrate for xylanase and cellulase production from fungal isolate KUMR1 isolated from soil. Morphological characterization by microscopic observation of fungal hyphae showed the clamp connection formation, this feature suggested that fungal isolate KUMR1 belonged to phylum Basidiomycota. Fungal isolate KUMR1 was cultivated on rice straw agar and enzyme activities were detected using Gram's iodine staining assay. Regarding to the formation of clear zone on the rice straw agar, this fungus was further confirmed for xylanase and cellulase production in medium containing rice straw with submerged fermentation and solid state fermentation at 30°C. The highest xylanase activity (978.24 U/ml) and cellulase activity (1.10 U/ml) were detected at 14 days of submerged fermentation of rice straw, which were 5.19 times and 1.75 times higher than those of the commercial substrates, xylan and carboxymethylcellulose, respectively. The current study suggests that rice straw is a good source for a low-cost xylanase and cellulase production and fungal isolate KUMR1 is an efficient fungus for xylanase and cellulase producer.

Keywords: Rice straw, Xylanase, Cellulase, Submerged fermentation, Solid state fermentation

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีการเพาะปลูกข้าวมากเป็นอันดับ 6 ของโลก โดยในปี พ.ศ. 2563-2564 มีรายงานว่าการผลิตข้าวได้ประมาณ 25.31 ล้านตัน (Arunrat et al., 2022) หลังการเก็บเกี่ยวข้าวจะมีฟางข้าวเป็นวัสดุเหลือทิ้งจำนวนมาก ฟางข้าวถูกนำไปใช้ประโยชน์ค่อนข้างน้อย เช่น ทำปุ๋ยหมัก วัสดุคลุมดิน ใช้ในการเพาะเห็ดฟาง เป็นต้น (Abraham et al., 2016) ฟางข้าวที่เหลือจะถูกกำจัดโดยการเผา (Baramée et al., 2020) นำไปสู่การเพิ่มมลพิษทางอากาศเกิดฝุ่นเขม่ากระจายปริมาณมากและยังปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากพื้นดินสู่บรรยากาศซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดภาวะโลกร้อน (Engling et al., 2013)

ฟางข้าวเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่มีองค์ประกอบของลิกนิน (ร้อยละ 5-24) เฮมิเซลลูโลส (ร้อยละ 19-27) และเซลลูโลส (ร้อยละ 32-47) (Youssef et al., 2016) โดยองค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในฟางข้าวเมื่อนำมาย่อยจะได้น้ำตาลที่สามารถนำมาผลิตเอทานอล กรดอินทรีย์ และสารมูลค่าสูงอื่น ๆ และมีรายงานว่ามีการใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น เอนไซม์แลคเคส เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส เอนไซม์ไฮโดรเลส และเอนไซม์เซลลูเลส เป็นต้น (Andlar et al., 2018) Namnuch et al. (2021) ได้รายงานการ

ใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Aspergillus flavus* KUB2 โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 118.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Ketsakhon et al. (2022) ได้รายงานถึงการใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไลลาเนสจาก *Bacillus altitudinis* RS3025

เอนไซม์ไลลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสมีประโยชน์ทางอุตสาหกรรมหลายด้าน เช่น อุตสาหกรรมการแปรรูปน้ำผลไม้ อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษในขั้นตอนก่อนการฟอกสีเยื่อกระดาษ รวมถึงอุตสาหกรรมผลิตอาหารเสริมสุขภาพ เป็นต้น (Kantharaj et al., 2017) เนื่องจากการผลิตเอนไซม์ไลลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้อาหารบริสุทธิ์ทางการค้าที่มีราคาสูง เช่น ไซแลน เซลลูโลส และคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส เป็นแหล่งคาร์บอนส่งผลให้ต้นทุนการผลิตเอนไซม์สูง การใช้วัสดุเหลือทิ้งที่มีราคาถูก เช่น ฟางข้าว เมื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์ไลลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลส จะช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ และช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการเผากำจัดฟางข้าว เชื้อราไอโซเลท KUMR1 เป็นเชื้อราเส้นใยที่แยกได้จากดินพบว่าสามารถเจริญบนอาหารแข็งที่มีชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (ผลงานที่ไม่ได้เผยแพร่) จากคุณสมบัติของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 ที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้ จึงมีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสจากฟางข้าว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการใช้ฟางข้าวซึ่งเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกในการผลิตเอนไซม์ไลลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราไอโซเลท KUMR1 ภายใต้กระบวนการหมักแบบอาหารเหลวและการหมักแบบอาหารแข็งเปรียบเทียบกับการผลิตเอนไซม์โดยใช้แหล่งคาร์บอนบริสุทธิ์ทางการค้า

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาการใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตเอนไซม์ไลลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราไอโซเลท KUMR1

3. วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท KUMR1

นำเชื้อราไอโซเลท KUMR1 ที่แยกได้จากดินที่เก็บรักษาสายพันธุ์โดยหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ จุลินทรีย์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน มาเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทางมหภาค (Macroscopic) ได้แก่ ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA สำหรับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทางจุลภาค (Microscopic) ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์เตรียมเชื้อราโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนกระจกสไลด์ (Slide culture technique) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ทำการย้อมเชื้อราด้วยน้ำยา Lactophenol cotton blue และส่องดูลักษณะโครงสร้างเส้นใย สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การศึกษาเบื้องต้นถึงอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อราไอโซเลท KUMR1

นำเชื้อราไอโซเลท KUMR1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้อุปกรณ์เจาะขึ้นรู้น (Cork borer) เบอร์ 3 เจาะบริเวณปลายเส้นใยโคโลนีของเชื้อรา และนำไปวางบนอาหารแข็ง PDA ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุกวันจนครบ 5 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การศึกษาการสร้างเอนไซม์ไคลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 บนอาหารแข็ง

นำเชื้อราไอโซเลท KUMR1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ Cork borer เบอร์ 3 เจาะบริเวณปลายเส้นใยโคโลนีของเชื้อราและนำไปวางบนอาหารแข็งไคแลนและอาหารแข็งคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส (5 g/L ไคแลนหรือคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสทางการค้า, 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L KCl, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L Yeast extract, 15 g/L agar) และอาหารแข็งฟางข้าว (20 g/L ฟางข้าว, 1 g/L NaNO_3 , 1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L KCl, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L Yeast extract, 15 g/L agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี จากนั้นราดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมโคโลนีเชื้อราและผิวหน้าอาหาร บ่มนาน 5 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสและคำนวณค่า Enzymatic index (EI) ดังสูตรด้านล่าง (Dantas et al., 2021) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

$$\text{EI} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (เซนติเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร)}}$$

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 จากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ โดยการหมักแบบอาหารเหลว (Submerged fermentation)

นำเชื้อราไอโซเลท KUMR1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเจาะบริเวณปลายเส้นใยโคโลนีของเชื้อราด้วย Cork borer เบอร์ 2 จำนวน 5 ชิ้น นำมาเพาะในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวไคแลนและอาหารเหลวคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส (10 g/L ไคแลนหรือคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสทางการค้า, 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L Yeast extract, 5 g/L Peptone) และอาหารเหลวฟางข้าว (20 g/L ฟางข้าว, 1 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L Peptone, 5 g/L Yeast extract) ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างอาหารเท่ากับ 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บเอนไซม์หยาบที่เวลาเพาะเลี้ยง 5, 7, 10 และ 14 วัน โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไคลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลส (Namnuch et al., 2021) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 จากฟางข้าวโดยการหมักแบบอาหารแข็ง (Solid state fermentation)

นำเชื้อราไอโซเลท KUMR1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเจาะบริเวณปลายเส้นใยโคโคนีของเชื้อราด้วย Cork borer เบอร์ 2 จำนวน 5 ชิ้น นำมาเพาะในขวดรูปชมพู่ที่มีฟางข้าว (ร้อยละ 5) เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการปรับความชื้นให้ได้ร้อยละ 70 ด้วยอาหารเหลว Mendel weber (Gautam et al., 2018) ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างอาหารเท่ากับ 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บเอนไซม์หยาบที่เวลาเพาะเลี้ยง 5, 10, 15 และ 20 วัน โดยทำการสกัดเอนไซม์หยาบด้วยโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 โดยเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลส (Bharti et al., 2018) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนส

นำเอนไซม์หยาบปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายไซแลนจากปืชูด ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ที่ละลายในโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.3 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (GENESYS™ 10S UV-vis, Thermo Scientific, USA) (Bailey et al., 1992)

1 ยูนิตของเอนไซม์ไลลาเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยไซแลนโดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

นำเอนไซม์หยาบปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ละลายในโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.8 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Ghose, 1987)

1 ยูนิตของเอนไซม์เซลลูเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

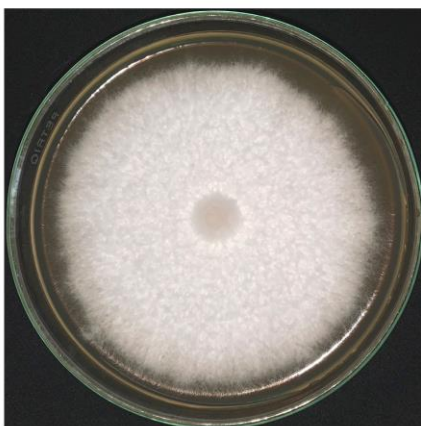
ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่า Enzymatic index ของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละแหล่งคาร์บอนด้วยวิธี Duncan multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SPSS v.16.0

4. ผลการวิจัย

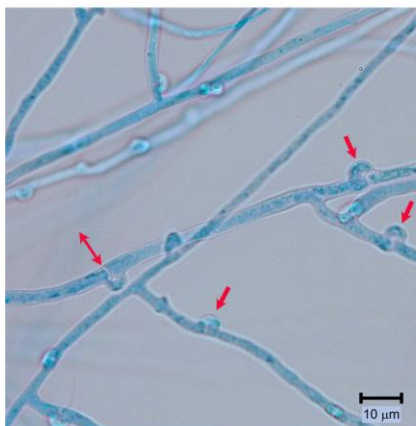
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท KUMR1

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทางมหภาคและจุลภาคของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 มีโคโลนีฟูเล็กน้อย มีเส้นใยใสไม่มีสี (Hyaline) (ภาพที่ 1 ก) เส้นใยมีผนังกัน (Septate hypha) และมีการสร้างแคลมป์คอนเนกชัน (Clamp connection) ที่ผนังกันเส้นใย ไม่พบสปอร์ (ภาพที่ 1 ข) จากผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 แสดงว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 เป็นเชื้อราที่อยู่ในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา (Phylum Basidiomycota)

(ก)



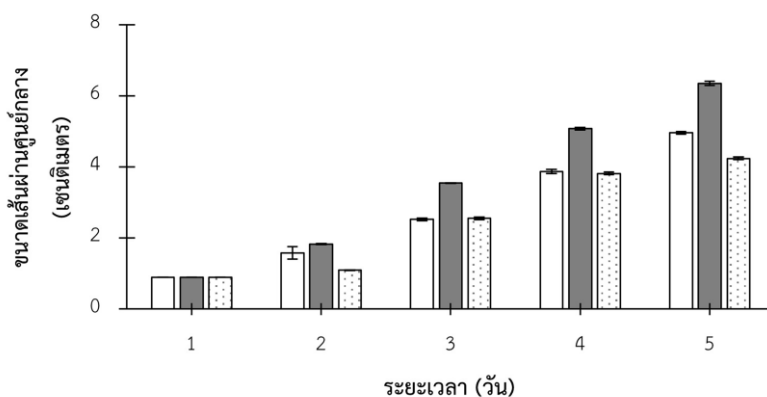
(ข)



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA (ก) และลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยลูกศรแสดงแคลมป์คอนเนกชัน และลูกศรสองหัวแสดงผนังกันเส้นใย (ข)

การศึกษาเบื้องต้นถึงอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อราไอโซเลท KUMR1

การศึกษาเบื้องต้นถึงอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง PDA ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการเจริญของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงโดยอุณหภูมิที่เชื้อราไอโซเลท KUMR1 เจริญได้ดีที่สุดคืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการบ่ม 5 วัน โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6.35 เซนติเมตร (ภาพที่ 2) จึงได้เลือกใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท KUMR1 ในการศึกษาต่อไป

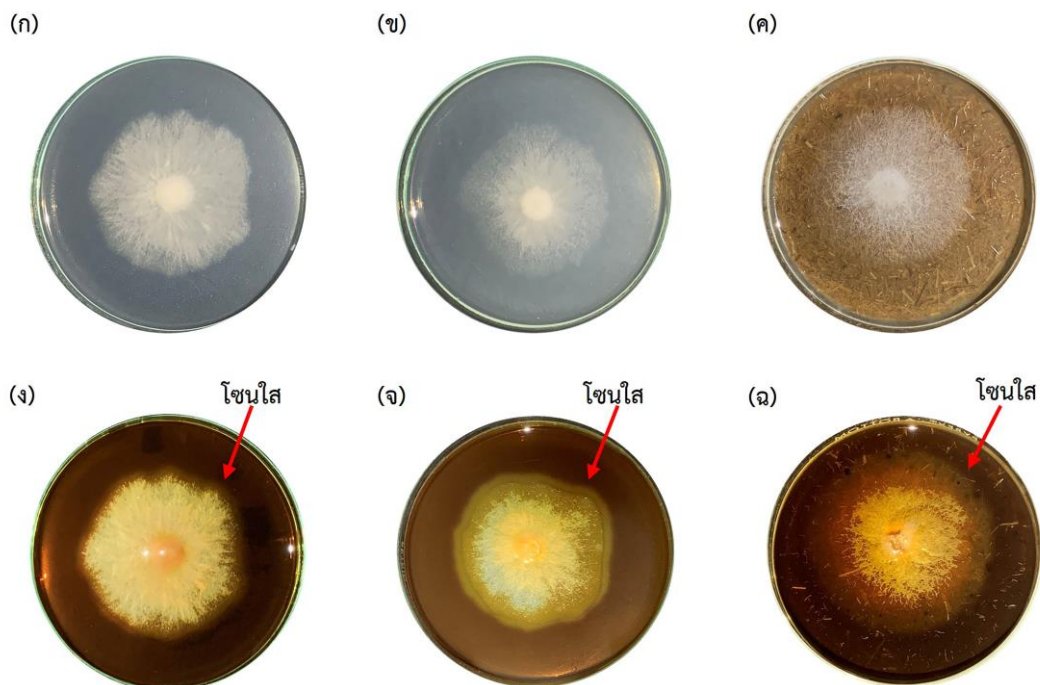


ภาพที่ 2 การเจริญของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (□), 30 องศาเซลเซียส (■) และ 37 องศาเซลเซียส (■)

การศึกษาการสร้างเอนไซม์ไลลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 บนอาหารแข็ง

การศึกษาการสร้างเอนไซม์ไลลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 ได้ศึกษาโดยเพาะเชื้อราบนอาหารแข็งไซแลนทางการค้าและอาหารแข็งคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสทางการค้าตามลำดับ พบว่าเชื้อราสามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้ (ภาพที่ 3 (ก) และ (ข)) หลังจากรดด้วยสารละลายไอโอดีนพบโซนใสรอบโคโลนี (ภาพที่ 3 (ง) และ (จ)) แสดงให้เห็นว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 สามารถสร้างเอนไซม์ไลลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสได้ เมื่อนำค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสหลังจากการรดด้วยสารละลายไอโอดีน มาคำนวณค่า Enzymatic index (EI) พบว่าได้ค่า EI เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งไซแลนและอาหารแข็งคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสเท่ากับ 1.07 และ 1.10 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท KUMR1 บนอาหารแข็งฟางข้าวพบว่าเชื้อราสามารถเจริญบนอาหารที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (ภาพที่ 3 (ค)) หลังจากรดด้วยสารละลายไอโอดีนพบโซนใสรอบโคโลนี (ภาพที่ 3 (ฉ)) จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 สามารถสร้างเอนไซม์ไลลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสมาย่อย

องค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในฟางข้าวได้ โดยมีค่า EI เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งฟางข้าวเท่ากับ 1.19 (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 3 การเจริญของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 บนอาหารแข็งไซแลน (ก) อาหารแข็งคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส (ข) อาหารแข็งฟางข้าว (ค) และโซนใสหลังจากการทดสอบการละลายไอโอดีนบนอาหารแข็งไซแลน (ง) อาหารแข็งคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส (จ) และอาหารแข็งฟางข้าว (ฉ)

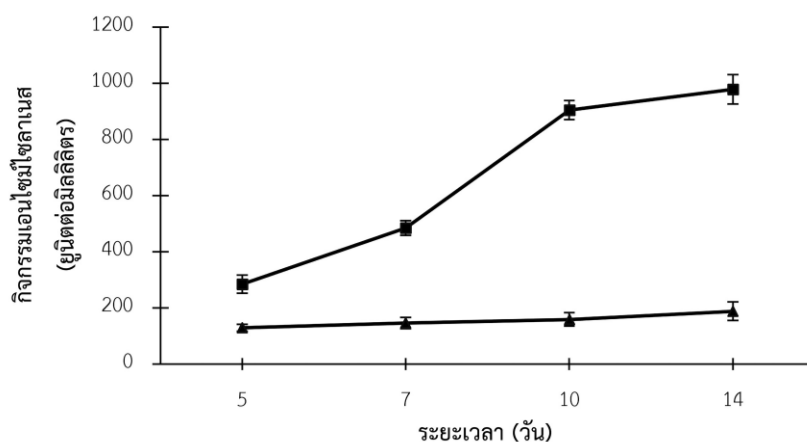
ตารางที่ 1 ค่า Enzymatic index ของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอน	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลาง โซนใส (เซนติเมตร)	Enzymatic index (EI)
ไซแลนทางการค้า	5.27±0.27	5.61±0.30	1.07±0.01 ^c
คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสทางการค้า	4.80±0.37	5.30±0.39	1.10±0.03 ^b
ฟางข้าว	5.18±0.11	6.13±0.10	1.19±0.01 ^a

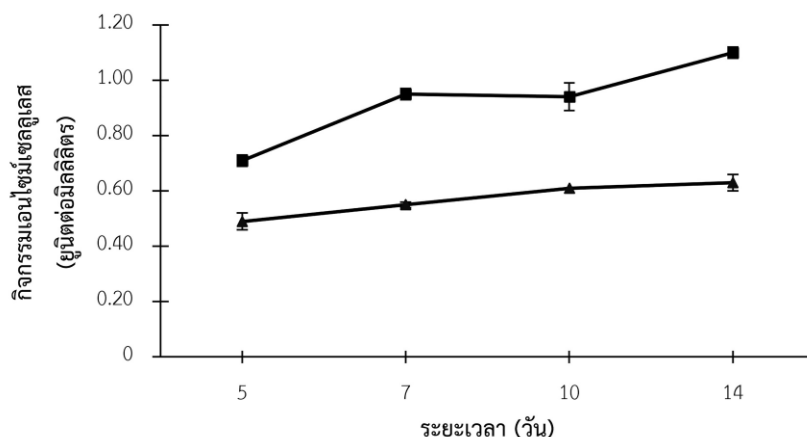
หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan multiple range test ($p < 0.05$)

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 จากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ โดยการหมักแบบอาหารเหลว (Submerged fermentation)

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 โดยการหมักแบบอาหารเหลวที่มีไซแลนหรือฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการหมักพบว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงขึ้น โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดในอาหารเหลวฟางข้าวเท่ากับ 978.24 หน่วยต่อมิลลิเมตร ที่ระยะเวลากการหมัก 14 วัน (ภาพที่ 4) การศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 โดยการหมักแบบอาหารเหลวที่มีคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสหรือฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการหมักพบว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงขึ้น โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในอาหารเหลวฟางข้าวเท่ากับ 1.10 หน่วยต่อมิลลิเมตร ที่ระยะเวลากการหมัก 14 วัน (ภาพที่ 5) จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราไอโซเลท KUMR1 จึงได้ใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสในการหมักแบบอาหารแข็งต่อไป



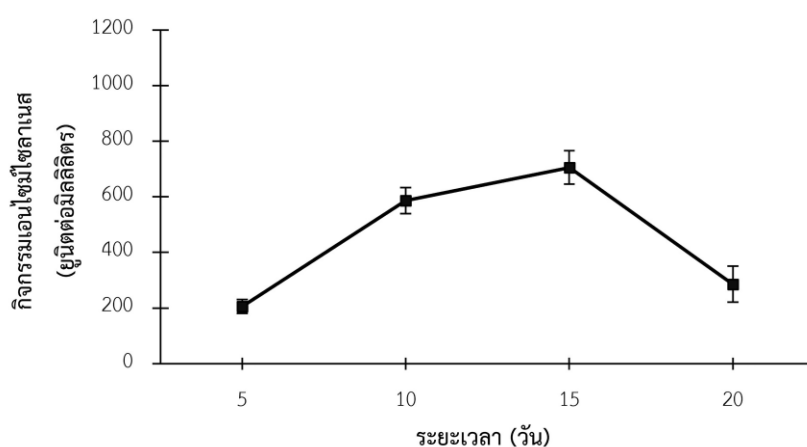
ภาพที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวฟางข้าว (■) และอาหารเหลวไชแลน (▲)



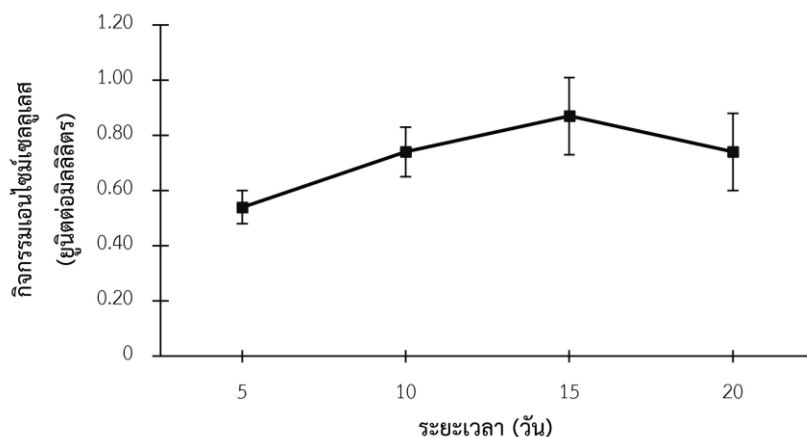
ภาพที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวฟางข้าว (■) และอาหารเหลวคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส (▲)

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 จากฟางข้าวโดยการหมักแบบอาหารแข็ง (Solid state fermentation)

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 โดยการหมักแบบอาหารแข็งที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 705.70 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 6) และ 0.87 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 7) ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการหมัก 15 วัน



ภาพที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารฟางข้าวโดยการหมักแบบอาหารแข็ง



ภาพที่ 7 การเจริญของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารฟางข้าวโดยการหมักแบบอาหารแข็ง

5. อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้สนใจนำฟางข้าวเหลือทิ้งมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตเอนไซม์ไคลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราไอโซเลท KUMR1 โดยเชื้อราไอโซเลท KUMR1 พบว่าสามารถเจริญบนอาหารแข็งที่มีขาน้อยเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (ผลงานที่ไม่ได้เผยแพร่) จากคุณสมบัติของเชื้อราที่สามารถเจริญบนอาหารมีวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้ จึงคาดว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 สามารถผลิตเอนไซม์ไคลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสจากฟางข้าวซึ่งเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสเหลือทิ้งได้ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 มีการสร้างแคลมป์คอนเนกชัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 เป็นเชื้อราในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา ทั้งนี้ควรทำการจัดจำแนกเชื้อราด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาต่อไป โดยมีรายงานถึงเชื้อราในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตาที่ผลิตเอนไซม์ไคลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสได้ เช่น *Schizophyllum commune*, *Trametes hirsuta*, *Pycnoporus coccineus*, *Irpex lacteus* (Metreveli et al., 2017) และ *Pleurotus dryinus* (Elisashvili et al., 2006)

เมื่อทำการศึกษาเบื้องต้นถึงความสามารถของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 ในการผลิตเอนไซม์ไคลาเนสบนอาหารแข็งไชนะทางการค้าและเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสทางการค้า จากการทดลองพบว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 สามารถผลิตเอนไซม์ไคลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสได้เนื่องจากพบโซนไฮรอกโคโลนีหลังจากการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน โดยโซนไฮเกิดจากเชื้อราไอโซเลท KUMR1 มีการผลิตเอนไซม์ไคลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสปล่อยออกนอกเซลล์เพื่อย่อยไชนะและคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ได้ จึงทำให้ไม่มีโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ที่จับกับสารละลายไอโอดีนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำตาล (Florencio et al., 2012) นอกจากนี้เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท KUMR1 บนอาหารแข็งฟางข้าว พบว่ามีโซนไฮหลังจากการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 สามารถผลิตเอนไซม์ไคลาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสมาย่อยองค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสใน

ฟางข้าวได้ และเชื้อราไอโซเลท KUMR1 สามารถใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสได้

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 โดยการหมักแบบอาหารเหลว พบว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสสูงในอาหารเหลวฟางข้าวเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารไสแลนบริสุทธ์ทางการค้าและอาหารคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสบริสุทธ์ทางการค้า โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 14 เท่ากับ 978.24 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และ 1.10 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าอาหารไสแลนบริสุทธ์และอาหารคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสบริสุทธ์เท่ากับ 5.19 เท่า และ 1.75 เท่าตามลำดับ การใช้อาหารเหลวฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเชื้อรา *Aspergillus flavus* KUB2 ตามรายงานของ Namnuch et al. (2021) พบว่าให้กิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 118.56 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และ 0.18 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารไสแลนบริสุทธ์และอาหารคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสบริสุทธ์เท่ากับ 2.65 เท่า และ 1.08 เท่า ตามลำดับ Elisashvili et al. (2006) รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Pleurotus dryinus* IBB 903 โดยใช้เปลือกส้ม (ร้อยละ 8) เป็นแหล่งคาร์บอนพบกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 48.9 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และ 33.7 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อใช้ไสแลนทางการค้าและคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตเอนไซม์พบว่กิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 18 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และ 2.2 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ทั้งนี้จากผลการทดลองที่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวฟางข้าวมีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารไสแลนบริสุทธ์ทางการค้าและอาหารคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลสบริสุทธ์ทางการค้า อาจเนื่องจากคุณสมบัติของสารตั้งต้นที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น องค์ประกอบและโครงสร้างทางกายภาพและเคมีของฟางข้าวที่สามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 ได้ดีกว่า (Dutt & Kumar, 2014; Kogo et al., 2017) นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนและสภาวะในการเพาะเลี้ยงแล้ว สายพันธุ์จุลินทรีย์นับเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อผลิตได้ โดยเชื้อราไอโซเลท KUMR1 นับเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราไอโซเลท KUMR1 โดยการหมักแบบอาหารแข็งพบว่าเชื้อราไอโซเลท KUMR1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 15 เท่ากับ 705.70 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และ 0.87 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าการหมักแบบอาหารเหลวให้กิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าการหมักแบบอาหารแข็ง ทั้งนี้อาจเพราะการหมักแบบอาหารเหลวมีการเขย่าจึงช่วยเพิ่มออกซิเจนในอาหารทำให้เชื้อราเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่า (Bakratsas et al., 2021; Ibrahim et al., 2015) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสด้วยการหมักแบบอาหารแข็งมีข้อดี เช่น ให้ผลผลิตสูง ไม่ต้องก่ำน้ำที่ใช้ใน

กระบวนการผลิต ใช้พลังงานน้อยและมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการหมักแบบอาหารเหลว (Arora et al., 2018) จากข้อดีข้างต้นปัจจุบันจึงมีงานวิจัยที่สนใจศึกษาการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสโดยการหมักแบบอาหารแข็งเพิ่มขึ้น (Arora et al., 2018; Garbin et al., 2021; Razali et al., 2020) Razali et al. (2020) ได้รายงานว่ายภายใต้การหมักแบบอาหารแข็งโดยมีแกลบเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อรา *Aspergillus niger* ผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสโดยมีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร Garbin et al. (2021) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักแบบอาหารแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Thermoascus crustaceus* โดยมีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อรา *T. crustaceus* มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 41.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ภายใต้สภาวะการหมักที่มีความชื้นร้อยละ 70 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง Grujic et al. (2015) ได้รายงานถึงการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Trichoderma atroviride* T42 โดยใช้ขี้เลื่อยเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ดเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าเชื้อรามีกิจกรรมของเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสสูงเท่ากับ 2.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.76 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากผลการศึกษาพบว่าฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราไอโซเลท KUMR1 และเชื้อราไอโซเลท KUMR1 นับเป็นสายพันธุ์เชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลส ทั้งนี้ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไโซลานเนสและเอนไซม์เซลลูเลสโดยเฉพาะสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิต ลดต้นทุนด้านพลังงานและลดต้นทุนการผลิต และควรทำการศึกษาค้นคว้าเชิงลึกด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา รวมทั้งศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ด้านการทนต่ออุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาต่อยอดเพื่อนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้

6. กิตติกรรมประกาศ

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563

7. เอกสารอ้างอิง

- Abraham, A., Mathew, A. K., Sindhu, R., Pandey, A., & Binod, P. (2016). Potential of rice straw for bio-refining: an overview. *Bioresource Technology*, 215, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.011>
- Andlar, M., Rezić, T., Mardetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: an overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 768-778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>

- Arora, S., Rani, R., & Ghosh, S. (2018). Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, 269, 16-34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.010>
- Arunrat, N., Sereenonchai, S., Chaowiwat, W., Wang, C., & Hatano, R. (2022). Carbon, nitrogen and water footprints of organic rice and conventional rice production over 4 years of cultivation: a case study in the lower north of Thailand. *Agronomy*, 12(2), 380-399. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020380>
- Bailey, M. J., Biely, P., & Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23(3), 257-270. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J)
- Bakratsas, G., Polydera, A., Katapodis, P., & Stamatis, H. (2021). Recent trends in submerged cultivation of mushrooms and their application as a source of nutraceuticals and food additives. *Future Foods*, 4, 100086. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100086>
- Baramee, S., Siriatcharanon, A. K., Ketbot, P., Teeravivattanakit, T., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Ratanakhanokchai, K. & Phitsuwan, P. (2020). Biological pretreatment of rice straw with cellulase-free xylanolytic enzyme-producing *Bacillus firmus* K-1: Structural modification and biomass digestibility. *Renewable Energy*, 160, 555-563. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.06.061>
- Bharti, A. K., Kumar, A., Kumar, A., & Dutt, D. (2018). Exploitation of *Parthenium hysterophorous* biomass as low-cost substrate for cellulase and xylanase production under solid-state fermentation using *Talaromyces stipitatus* MTCC 12687. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 11(4), 271-280. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2018.01.003>
- Dantas, C. P., Pinchemel, J. P. D., Jesus, G. M., Pimentel, M. B., Oliveria, O., Maria, C., Queiroz, A.F.S. & Lima, D. F. (2021). Bioprospection of ligninolytic enzymes from marine origin filamentous fungi. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93, 1-15. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120210296>
- Dutt, D & Kumar, A. (2014). Optimization of cellulase production under solid-state fermentation by *Aspergillus flavus* (AT-2) and *Aspergillus niger* (AT-3) and its impact on stickies and ink particle size of sorted office paper. *Cellulose Chemistry and Technology*, 48, 285-298.
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Asatiani, M., & Kvesitadze, G. (2006). Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(7), 998-1004. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.033>

- Engling, G., Lee, J. J., Sie, H. J., Wu, Y. C., & Yet-Pole, I. (2013). Anhydrosugar characteristics in biomass smoke aerosol-case study of environmental influence on particle-size of rice straw burning aerosol. *Journal of Aerosol Science*, 56, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2012.10.001>
- Florencio, C., Couri, S., & Farinas, C.S. (2012) . Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Research*. 2012, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2012/793708>
- Garbin, A. P., Garcia, N. F., Cavalheiro, G. F., Silvestre, M. A., Rodrigues, A., PAZ, M. F., Fonseca, G. G. & Leite, R. S. (2021). β -glucosidase from thermophilic fungus *Thermoascus crustaceus*: production and Industrial potential. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93, 1-11. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191349>
- Gautam, A., Kumar, A., Bharti, A. K., & Dutt, D. (2018). Rice straw fermentation by *Schizophyllum commune* ARC-11 to produce high level of xylanase for its application in pre-bleaching. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 693-701. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.02.006>
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 59(2), 257-268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Grujić, M., Dojnov, B., Potočnik, I., Duduk, B., & Vujčić, Z. (2015). Spent mushroom compost as substrate for the production of industrially important hydrolytic enzymes by fungi *Trichoderma* spp. and *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 290-298. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.029>
- Ibrahim, D., Weloosamy, H., & Lim, S. H. (2015). Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(3), 265. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.265>
- Kantharaj, P., Boobalan, B., Sooriamuthu, S., & Mani, R. (2017). Lignocellulose degrading enzymes from fungi and their industrial applications. *International Journal of Current Research and Review*, 9(21), 1-12. <https://doi.org/10.7324/IJCRR.2017.9211>
- Ketsakhon, P., Thammasittirong, A. & Thammasittirong, S.N-R. (2022). Adding value to rice straw waste for high-level xylanase production using a new isolate of *Bacillus altitudinis* RS3025. *Folia Microbiologica*. <https://doi.org/10.1007/s12223-022-00998-x>

- Kogo, T., Yoshida, Y., Koganei, K., Matsumoto, H., Watanabe, T., Ogihara, J., & Kasumi, T. (2017). Production of rice straw hydrolysis enzymes by the fungi *Trichoderma reesei* and *Humicola insolens* using rice straw as a carbon source. *Bioresource Technology*, 233, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.075>
- Metreveli, E., Kachlishvili, E., Singer, S. W., & Elisashvili, V. (2017). Alteration of white-rot basidiomycetes cellulase and xylanase activities in the submerged co-cultivation and optimization of enzyme production by *Irpex lacteus* and *Schizophyllum commune*. *Bioresource technology*, 241, 652-660. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.148>
- Namnuch, N., Thammasittirong, A., & Thammasittirong, S. N. R. (2021). Lignocellulose hydrolytic enzymes production by *Aspergillus flavus* KUB2 using submerged fermentation of sugarcane bagasse waste. *Mycology*, 12(2), 119-127. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1806938>
- Razali, S. A., Rasit, N., & Ooi, C. K. (2021). Statistical analysis of xylanase production from solid state fermentation of rice husk associated fungus *Aspergillus niger*. *Materials Today: Proceedings*, 39, 1082-1087. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.366>
- Youssef, M. I., Saber, W. I., El-Taher, E. M., & El daiem Sherief, A. (2016). Isolation and identification of the highly cellulolytic and P-solubilizing fungi. *Journal of Environmental Sciences*, 45(1), 75-84.