

การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ xylanase ที่อุณหภูมิสูง

Selection of Thermophilic Xylanase Producing Mold

อัญชริดา สวารชร,¹ วิเชียร กิจปรีชาวนิช² และนภา โล่ห์ทอง³

Ancharida Svarachorn, Vichien Kitprechavanich, Napha Lotong

ABSTRACT

A total of 238 mold cultures capable in utilizing xylan as sole source of carbon were isolated from decomposed lignocellulosic materials. Based on the ability to produce high xylanase activity at 45°C, 65 isolates were selected. All cultures produced enzymes which hydrolyzed xylan to xylose and xylo-oligosaccharides. The most efficient strain, designated No. 4-45-1F produced as high as enzyme 36.6 units/ml. Regarding to the screening procedures, it was found that activity of the enzyme produced by the cultures was not quantitatively related to size of the clear zones which was developed by flooding the xylan agar plate with iodine solution. All the selected cultures belong to the genus *Aspergillus*. The best strain was identified as *Aspergillus fumigatus* Fresenius.

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้แยกเชื้อจากแหล่งต่าง ๆ ที่มีการ
สลายของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส โดยได้
เชื้อที่เจริญดีในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน
รวมทั้งสิ้น 238 เชื้อ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิ-
ภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ xylanase ที่อุณหภูมิ 45° ซ
ได้ 65 สายพันธุ์ เอนไซม์ที่เชื้อเหล่านี้ผลิตได้สามารถ
ย่อยสลายไซแลนให้ได้ไซโลสและไซโลโอลิโกแซคคาไร
หลายชนิด สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์
สูงที่สุด ได้แก่ รหัส 4-45-1F ซึ่งผลิตเอนไซม์ได้

36.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการ
คัดเลือกเชื้อโดยการวัดขนาดบริเวณใสรอบโคโลนีบน
อาหารเลี้ยงเชื้อไซแลนเมื่อรดด้วยน้ำยาไอโอดีนกับ
การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อผลิต พบว่าวิธีการทั้ง
สองไม่มีความสัมพันธ์ต่อกันในเชิงปริมาณ ได้ทำการ
จำแนกชนิดของเชื้อพบว่าทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้อยู่
ในยีส *Aspergillus* สำหรับสายพันธุ์ซึ่งมีประสิทธิภาพ
สูงที่สุดนี้จำแนกได้เป็น *Aspergillus fumigatus* Fre-
senius

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Dept. of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University Bangkok 10500, Thailand.

² ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University Bangkok 10900, Thailand.

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสปริมาณมาก เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด และชานอ้อย เป็นต้น วัสดุประเภทนี้นอกจากจะมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักยังประกอบด้วยไซแลนประมาณ 20–30% (Jayasuriya, 1983) ปัจจุบันได้มีการเล็งเห็นถึงความสำคัญที่จะใช้ประโยชน์จากวัสดุเหล่านี้ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น การทำปุ๋ยหมัก แก๊สชีวภาพ และสารเคมีที่มีราคาโดยเริ่มจากการย่อยสลายสารที่เป็นองค์ประกอบหลักดังกล่าวเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ในเรื่องการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ได้มีการรายงานการศึกษาที่บรรลุเป้าหมายในระดับอุตสาหกรรมแล้ว (Mandels and Weber, 1969; Ryu, 1980; Enari, 1983) สำหรับการย่อยสลายไซแลนนั้นได้มีการรายงานพอสมควร (Simpson, 1959; Tsujisaka *et al.*, 1971; John *et al.*, 1979) แต่ผลการศึกษายังไม่อยู่ในขั้นที่ปรับใช้ได้ จึงทำให้การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสเหล่านี้ยังไม่ได้ประสิทธิภาพเท่าที่ควร

ไซแลนเป็นสารโพลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมด้วยพันธะโมเลกุลแบบ β -1, 4 linkage (Haworth *et al.*, 1935), เอนไซม์ xylanase ที่ย่อยสลายพันธะโมเลกุลนี้แบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ β -xylosidase ซึ่งจะย่อยสลายเฉพาะพันธะที่ปลายโพลิเมอร์ของไซแลน และ endo β -xylanase ซึ่งจะย่อยสลายพันธะอย่างไม่จำเพาะ (Dekker and Richards, 1976) ดังนั้นผลจากการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เหล่านี้จึงอาจจะได้ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดต่าง ๆ และ/หรือไซโลสโดยขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์

จากรายงานพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย แอคโนไมซีตและเชื้อรา สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนได้ (Okada *et al.*, 1980; Kusakabe, *et al.*, 1969; Dekker and Richards, 1976) ประเทศไทย

ไทยเป็นแหล่งที่มีภูมิอากาศร้อนและชื้น การผสมผสานของพืชต่าง ๆ ดำเนินไปอย่างรวดเร็ว จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าในแหล่งต่าง ๆ เหล่านั้นจะมีจุลินทรีย์ที่ชอบหรือทนความร้อนและมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ xylanase การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่มีคุณสมบัติดังกล่าว เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายไซแลน โดยตัดปัญหาเรื่องการลดอุณหภูมิในขณะเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ นอกจากนั้นสำหรับเป็นแนวทางในการคัดเลือกเชื้อ รายงานนี้ยังได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างของบริเวณไฮรอสโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ กิจกรรมการย่อยสลายไซแลน (xylanase activity) ของเอนไซม์ที่สายพันธุ์นั้น ๆ ผลิตขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกสายพันธุ์เชื้อรา

เก็บตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อราจากวัสดุต่าง ๆ ที่ผสมผสาน เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด และดินบริเวณที่มีการผสมผสานวัสดุอย่างในหลอดซึ่งบรรจุอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบ ดังนี้ ไซแลนจากฟางข้าว 1%, KH_2PO_4 0.2%, NH_4NO_3 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02% และ yeast extract 0.02% โดยปรับ pH ให้ได้ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 45°C บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อที่เจริญลงสู่หลอดอาหารชนิดเดิมและบ่มในลักษณะเดียวกันเป็นเวลา 4 วัน ทำซ้ำเช่นนี้สองครั้ง แยกเชื้อที่เจริญในหลอดอาหารด้วยวิธี spread plate ลงบนอาหารวุ้นซึ่งมีอาหารเช่นเดียวกับอาหารเหลว แยกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างเพื่อนำไปทำให้เชื้อบริสุทธิ์อีกครั้ง

2. การคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ xylanase

เตรียมกล้าเชื้อ (inoculum) โดยปลูกเชื้อบริสุทธิ์

ให้ได้โคโลนีเดี่ยวบนอาหารวุ้นที่ประกอบด้วย ไซแลน (larchwood, Sigma chemicals, Co.Ltd.,) 1%, NH_4NO_3 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02% และ yeast extract 0.02% ใน potassium phosphate buffer pH 5.5 เข้มข้น 0.05 M เดิมวุ้น 1.5% ซึ่งบรรจุในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. จานละ 10 มิลลิลิตร ปั่นที่อุณหภูมิ 45° ซ เป็นเวลา 2 วัน ดัดชิ้นวุ้นบริเวณที่มี peripheral hypha ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.35 ซม. ใส่ในหลอดอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับที่ใช้เตรียมกล้าเชื้อ โดยบรรจุในหลอดทดสอบขนาด 25 x 200 มิลลิเมตร ปริมาณหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปั่นที่อุณหภูมิ 45° ซ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อปั่นครบ 5 วัน กรองแยกเส้นใยและสปอร์ออกด้วยกระดาษกรอง ก่อนนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง ที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 10° ซ นำส่วนใสไปหา กิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ xylanase

3. การทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ xylanase โดยวัดการเกิดบริเวณใส

ปลูกเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวลงบนอาหารวุ้นไซแลน (องค์ประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2) ที่บรรจุในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม.) ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ปั่นจานอาหารที่อุณหภูมิ 45° ซ หลังจากปั่นเป็นเวลา 3 วัน ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไซแลนโดยวัดความกว้างของบริเวณใสรอบโคโลนี หลังจากรดด้วยสารละลายไอโอดีน

4. การวิเคราะห์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ xylanase

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ xylanase โดยอาศัยหลักการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยสลายไซแลน (Takahashi and Kutsumi, 1979) ซึ่งส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายไซแลน (larchwood, Sigma chemical Co. Ltd) ความเข้มข้น

1% ใน acetate buffer 0.02 M, pH 5.5 ปริมาณ 0.9 มิลลิลิตร และเอนไซม์ในระดับความเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร ปั่นที่ 45° ซ เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันที หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952) โดยใช้ไซโลสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไซแลนให้น้ำตาลรีดิวซ์ (เทียบเท่าน้ำตาลไซโลส) ปริมาณ 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่กำหนด

วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายไซแลน

ส่วนผสมของปฏิกิริยาการย่อยสลายประกอบด้วยสารละลายไซแลน (larchwood, Sigma Chemical Co. Ltd) ความเข้มข้น 1% ใน acetate buffer pH 5.5 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร และเอนไซม์ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ปั่นที่ 45° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารที่เกิดจากการย่อยสลายเข้มข้นขึ้น วิเคราะห์ชนิดของสารที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนด้วยวิธี paper chromatography แบบ multiascending ตามวิธีการของปราโมทย์ (2521) โดยใช้ น้ำตาลไซโลสเป็นตัวเทียบ (authentic) ตรวจหาน้ำตาล โดยจุ่มกระดาษลงในสารละลาย diphenylamine-aniline phosphoric acid ทำให้แห้งสนิทและอบในตู้อบอุณหภูมิ 95-105° ซ เป็นเวลา 5-10 นาที

5. การจำแนกชนิดของเชื้อรา

เตรียมสไลด์กึ่งถาวรของเชื้อราที่คัดเลือกไว้ตามวิธีของ Flegel (1980) ศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาแต่ละเชื้อแล้วนำไปเทียบกับลักษณะสำหรับการจำแนกเชื้อราในระดับยีนส์ (Barnett, 1965; Raper and Fennell, 1977)

จำแนกชนิดในระดับสปีชีส์ของเชื้อรา *Aspergillus* sp รหัส 4-45-IF ตามหลักการจำแนกชนิดของ Raper and Fennell (1977) นำสปอร์ของ *Aspergillus* sp รหัส 4-45-IF มาปลูกให้ได้โคโลนีเดี่ยว 3 โคโลนีในจานเพาะเชื้อ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร) บนอาหาร Czapek's medium และ Malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 27° ซ เป็นเวลา 10 วัน ตรวจสอบลักษณะผิวโคโลนีและรูปร่างของ conidial head ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอเตรียมสไลด์ก็งดาว ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างอย่างละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า นำไปเทียบกับลักษณะ สำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อราในยีส *Aspergillus*

6. สารเคมี

ไซเลนซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสำหรับแยกเชื้อราเตรียมจากฟางข้าวตามวิธีของ Toh (1978) ส่วนไซเลนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ xylanase และที่ใช้เป็นสับสเตรดในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Sigma Chemicals Co. Ltd. ซึ่งเตรียมจาก larchwood สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความบริสุทธิ์ระดับ analytical grade

ผลและวิจารณ์

การคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ xylanase ที่อุณหภูมิสูง

ได้แยกเชื้อราที่สามารถเจริญโดยใช้ไซเลนจากฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนได้ 238 เชื้อ เมื่อศึกษาการเจริญของเชื้อเหล่านี้ที่อุณหภูมิ 45° ซ พบว่ามีเพียง 65 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดี และจากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ xylanase ในอาหารเหลวที่มี xylan เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีเพียง 8 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่า 10 หน่วย ต่อมิลลิลิตร สายพันธุ์ 4-45-IF เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดคือผลิตได้ 36.6 หน่วยต่อมิลลิเมตร ดังแสดงใน Figure 1

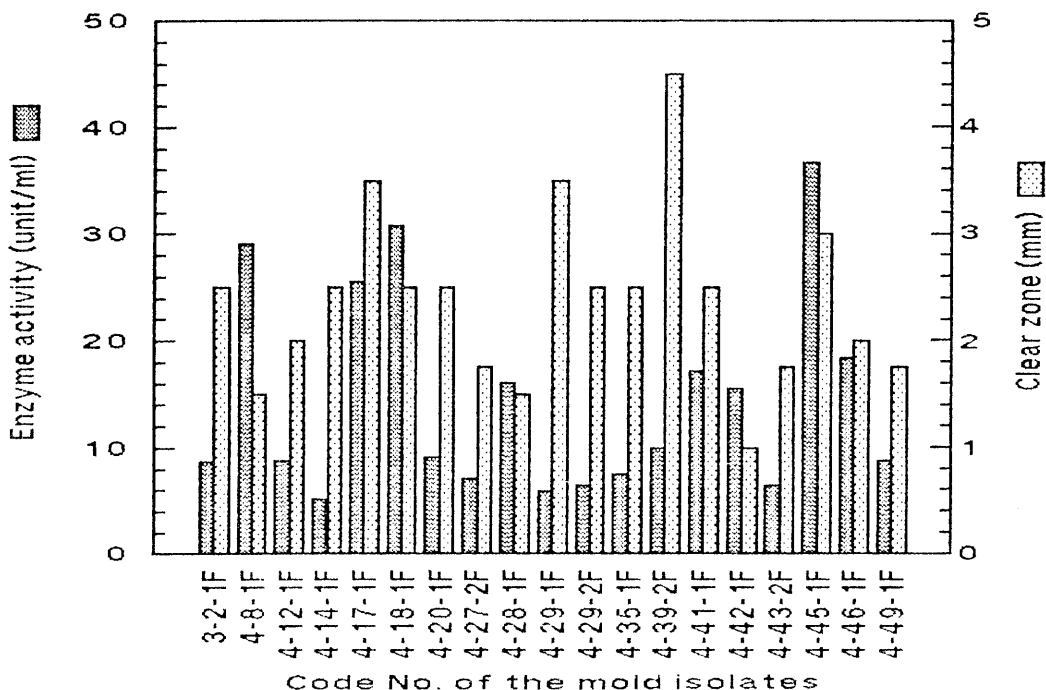


Figure 1 Relationship between enzyme activity and clear zones surrounding the colonies.

ความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอนไซม์ xylanase กับการเกิดบริเวณไฮรอปโคโลนี

การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดนั้นจำเป็นต้องคัดเลือกจากสายพันธุ์ในธรรมชาติจำนวนมาก ดังนั้น จึงควรมีวิธีการคัดเลือกรวดเร็ว (primary screening) ที่รวดเร็วและให้ผลถูกต้อง สำหรับการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ประเภทย่อยสลาย (hydrolytic enzyme) เช่น กลุ่มเอนไซม์ amylase หรือ proteinase มักนิยมใช้การเปรียบเทียบบริเวณไฮรอปโคโลนีที่เกิดจากการย่อยสลายสับสเตรดเป็นวิธีการคัดเลือกรวดเร็ว และได้มีรายงานการใช้วิธีการในการคัดเลือกเชื้อที่ย่อยสลายไซแลนเช่นเดียวกัน (Okada *et al.*, 1980) จากการศึกษาเบื้องต้นกับเชื้อราที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิห้องบนอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนจำนวน 173 สายพันธุ์ พบว่ามีถึง 49 สายพันธุ์ที่สามารถให้บริเวณไฮรอปโคโลนีกว้างกว่า 4 มิลลิเมตร แต่จาก 49 สายพันธุ์ดังกล่าวเมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ xylanase ที่ผลิตในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีเพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่ผลิตเอนไซม์ xylanase ได้มากกว่า 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเป็นที่น่าสนใจว่าการวัดบริเวณไฮรอปโคโลนีจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมพอที่จะใช้เป็นวิธีคัดเลือกเบื้องต้นหรือไม่ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างของบริเวณไฮรอปโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายไซแลนของเอนไซม์จากสายพันธุ์ซึ่งสามารถเจริญได้ที่ 45° ซ ที่คัดเลือกไว้ จากการทดลองพบว่าประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ xylanase ในอาหารเหลวไม่มีความสัมพันธ์เชิงปริมาณ (quantitative) กับบริเวณไฮรอปโคโลนีแต่อย่างใด ดังจะเห็นได้จากการที่เชื้อรบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้างบริเวณไฮรอปโคโลนีได้เท่ากับหรือกว้างกว่าอีกหลาย ๆ สายพันธุ์กลับมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ xylanase

ได้น้อยกว่าสายพันธุ์นั้น (Figure 1) การศึกษานี้ทำให้เห็นว่าการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ xylanase ในอาหารเหลวไม่สามารถใช้วิธีเปรียบเทียบการเกิดบริเวณไฮรอปโคโลนีได้ถึงแม้จะเป็นวิธีที่รวดเร็วก็ตาม ซึ่งทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อบางสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งต่างจากเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว นอกจากนี้บริเวณไฮรอปโคโลนีอาจจะเกิดจากบทบาทของเอนไซม์ endo- β -xylanase เป็นส่วนใหญ่ ขณะที่ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อาจเกิดจากเอนไซม์ xylanase หลายชนิดร่วมกัน

เมื่อย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ของเชื้อราที่คัดเลือกไว้เป็นเวลานาน 1 ชม. ที่ 45° ซ ผลจากการวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้ด้วยวิธี paper chromatography พบว่า ประกอบด้วยไซโลอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิดและไซโลส (Figure 2) ทั้งนี้อาจจะเป็นไปได้ว่าเชื้อเหล่านั้นผลิตเอนไซม์ endo- β -xylanase และ β -xylosidase ซึ่งจะได้มีการศึกษารายละเอียดต่อไป

การจำแนกเชื้อรา

จากการจำแนกชนิดของเชื้อราที่คัดเลือกไว้พบว่าทุกสายพันธุ์จัดอยู่ในยีสต์ *Aspergillus* สำหรับสายพันธุ์ *Aspergillus* sp รหัส 4-45-IF ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ xylanase สูงสุดนั้น ได้มีการศึกษาในรายละเอียดเพื่อจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์ พบว่า *Aspergillus* sp รหัส 4-45-IF เมื่อเจริญบนอาหาร Czapek's agar ที่อุณหภูมิ 27° ซ เป็นเวลา 10 วัน เส้นใยสีขาวฝังอยู่ในอาหารมีลักษณะเหนียว หนา และเรียบ มีเฉพาะ conidial head และ conidiophore เท่านั้นที่โผล่ขึ้นเหนืออาหาร ทำให้โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่แบบไม่มีแถบ (velvety azonate colony) ดังแสดงใน Figure 3A เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร malt extract agar (Figure 3 B) จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับที่เจริญในอาหาร Czapek's agar แต่จะมีเส้นใยแผ่คลุม conidial head

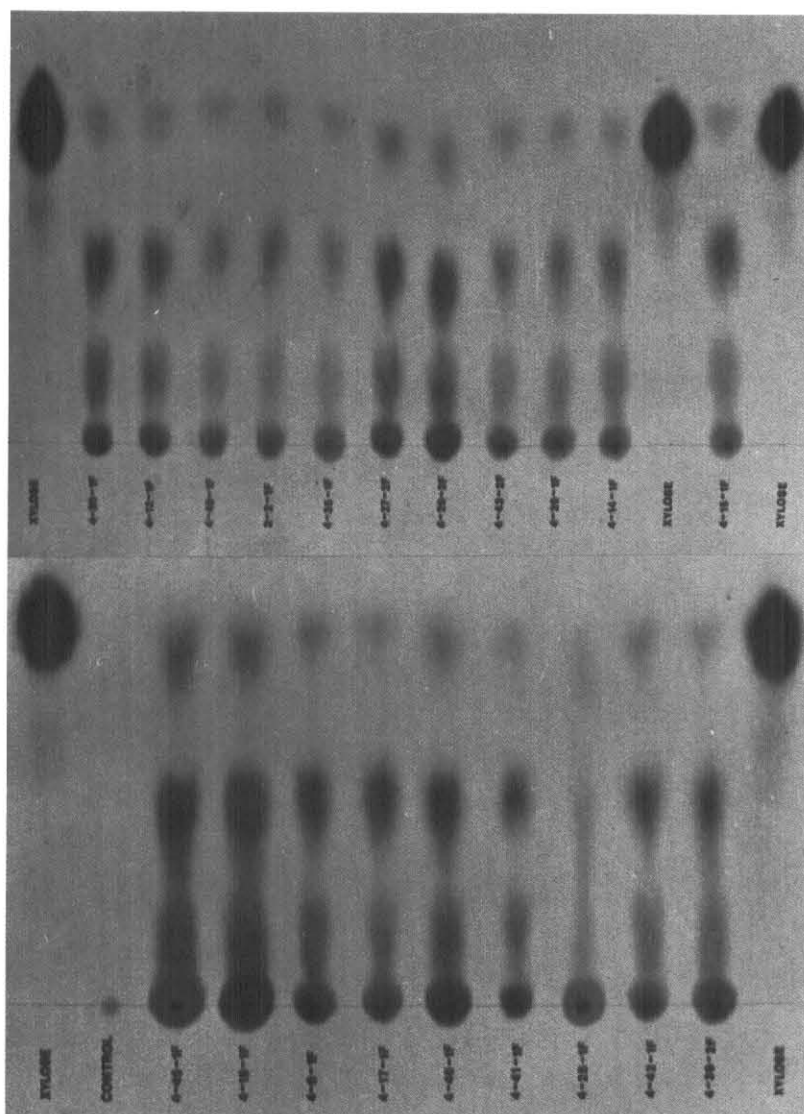


Figure 2 Paper chromatogram of xylan hydrolysate by crude enzyme of the selected strains.
(control = the reaction mixture without enzyme).

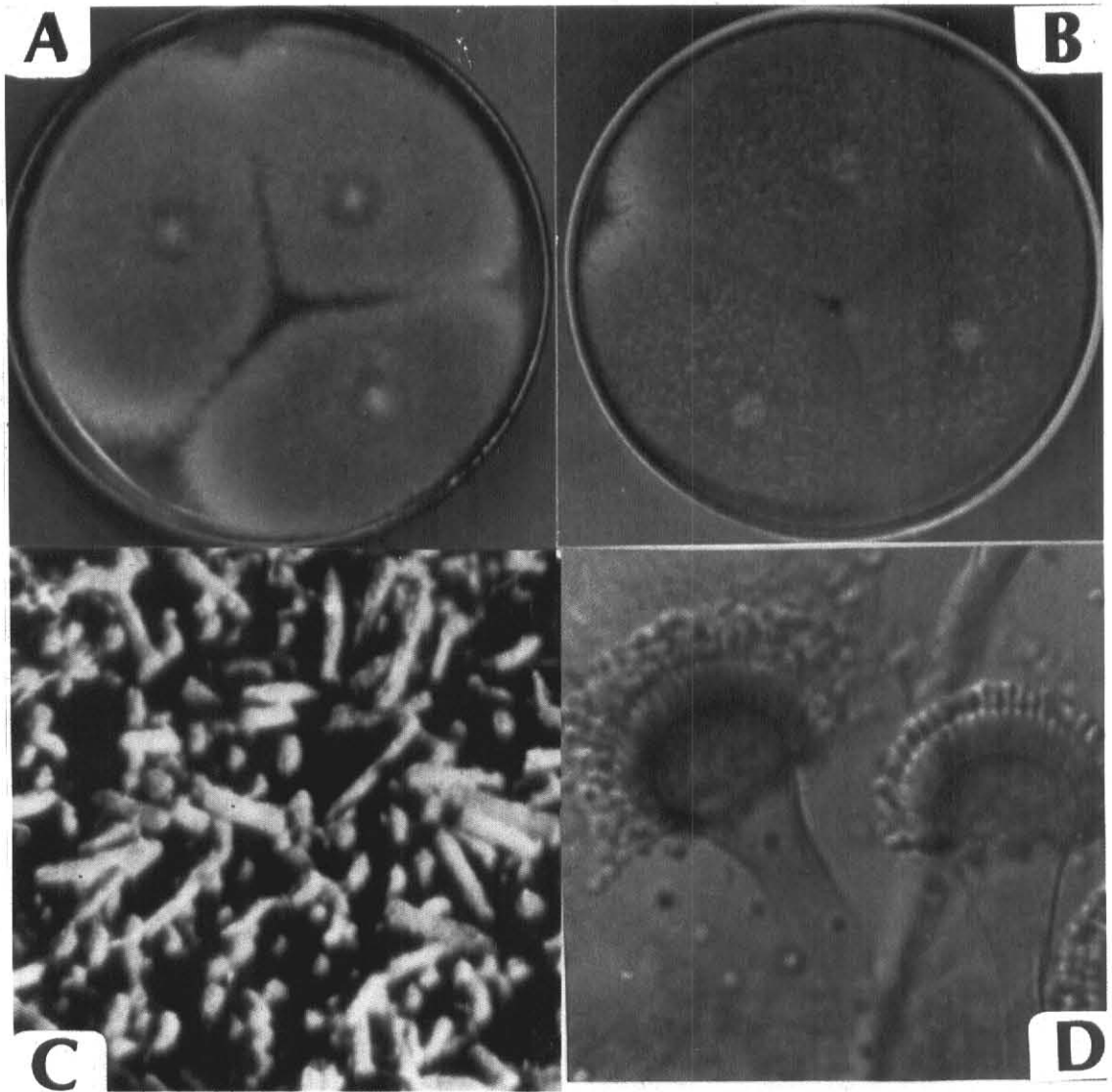


Figure 3 Cultural and morphological characteristics of *Aspergillus fumigatus* Fresenius (A) colonies on Czapek's agar ; (B) colonies on malt extract agar ; (C) Conidial heads on Czapek's agar ; (D) photomicrograph showing conidial heads.

และ conidiophore ที่โผล่ขึ้นมาเหนืออาหารทำให้โคโลนีมีลักษณะคล้ายสัณฐานแบบไม่มีแถบ (floccose-azotate colony) ได้โคโลนีบนอาหารทั้งสองชนิดมีสีเขียวปนเหลือง

เมื่อแรกเกิด conidial head จะมีลักษณะกลม (globose) แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะเป็นรูปแท่ง (columnar) ขนาดประมาณ 50×50 ไมครอน ลักษณะดังกล่าว (Figure 3 C) conidiophore เกิดขึ้นโดยตรงจากเส้นใยที่อยู่ในอาหารมีขนาดประมาณ 6×315 ไมครอน ผนังเรียบและขนาดสม่ำเสมอตลอดเส้นใย vesicle มีรูปร่างคล้ายพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 17 ไมครอน ไม่มีผนังกันแยกจาก conidiophore เฉพาะส่วนบนของ vesicle เท่านั้นที่สามารถสร้าง conidia ได้ sterigma มีรูปร่างคล้ายกระบองขนาดประมาณ 2×8 ไมครอน เรียงตัวชั้นเดียว (uniserate) บน vesicle conidia รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 ไมครอน ผนังขรุขระ (Figure 3 D)

จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงจำแนกเชื้อรารหัส 4-45-IF เป็น *Aspergillus fumigatus* Fresenius (Raper and Fennell, 1977)

แม้ว่า *A. fumigatus* บางสายพันธุ์อาจก่อโรคเกี่ยวกับระบบหายใจ (Aspergillosis) ของคนและสัตว์ (Lacey, 1968) แต่ก็ได้มีการรายงานการใช้ประโยชน์จาก *A. fumigatus* ในการเพิ่มปริมาณโปรตีนในฟางข้าวเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ (Reade and Gregory, 1975) สำหรับ *A. fumigatus* รหัส 4-45-IF นี้ถึงแม้จะยังไม่ได้ทดสอบว่าก่อโรคกับสัตว์ทดลอง แต่เชื่อว่ามีลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาแตกต่างจากสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค (Raper and Fennell, 1977)

สายพันธุ์ *A. fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-IF เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ xylanase ได้สูงสุดและสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (15°C) ซึ่งจะเป็นข้อได้เปรียบในการผลิตเอนไซม์ทั้งการ

เพาะเลี้ยงในสภาวะ submerged culture คือ สามารถลดต้นทุนที่ใช้ในระบบหล่อเย็น และการเพาะเลี้ยงในสภาวะ solid state fermentation ที่สามารถลดปัญหาความร้อนที่สะสมระหว่างกระบวนการผลิต นอกจากนี้เอนไซม์ที่ผลิตได้น่าจะเป็นเอนไซม์ที่เสถียรที่อุณหภูมิสูงซึ่งจะสะดวกต่อการนำไปใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้คัดเลือกสายพันธุ์ *A. fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-IF เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณอาจารย์ Dr. T.W. Flegel ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านการจำแนกชนิดของเชื้อรา

เอกสารอ้างอิง

- ปราวโมทย์ ศิริโรจน์. 2521. การคัดเลือกสายพันธุ์และการเลี้ยงยีสต์ที่มีโปรตีนสูงในน้ำทิ้งจากขบวนการแปรรูปอาหารถั่วเหลือง วิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- Barnett, H.L. 1965. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 2nd ed. : Burgess Publishing Co., Minneapolis 225 p.
- Dekker, R.F.H. and G.N. Richards. 1976. Hemicellulases : Their occurrence, purification properties, and mode of action. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32 : 277-352.
- Enari, T.M. 1983. Microbial Cellulases. pp. 183-223 In W.M. Fogarty (ed) Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science Publishers Ltd. Essex.
- Flegel T.W. 1980. Semipermanent microscope slides of micro fungi using a sticky tape technique. Can. J. Microbiol. 26 : 551-553.
- Harworth, W.N., F.L. Hirst, and E. Oliver. 1935. Polysaccharides Part XVIII The constitution of xylan. J. Chem. Sci. : 1917-1923.

- Jayasuriya, M.C.N. 1983. The use of fibrous residues in South Asia, pp 40-51 *In* C.A. Shacklady (ed.) The use of organic residues in rural communities. The United Nations University, Tokyo.
- John, M., B. Schmidt, and J. Schmidt. 1979. Purification and some properties of five endo-1, 4- β -D-xylanase and β D xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*. Can. J. Biochem 57 : 125-134.
- Kusakabe, I., T. Yasui, T. Kobayashi, 1969. Studies on Xylanase system of *Streptomyces* Part I. Some properties of extracellular Xylanase from *Streptomyces*. Agr. Biol. Chem : 43 : 145-153.
- Lacey, J. 1968. The microflora of fodders associated with bovine respiratory disease. J. Gen. Microbiol. 51 : 173-177.
- Mandels, M. and J. Weber, 1969. The production of cellulases. Adv. Chem Seri 93 : 391-414.
- Okada, H.S. Kinoshita and W. Panbangrad 1980. Xylanase produced by *Bacillus pumilus* isolated from soil of Thailand. Proceeding of JSPS-NRCT. Seminar on Agro-Industry Including Microbial Technology. Microbial Utilization of Renewable Resources. Osaka, Japan. 1 : 54-65.
- Raper, K.B. and D.J. Fennell, 1977. The Genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Co., New York.
- Reade, A.E.; and K.F. Gregory. 1975. High-Temperature production of protein-enriched feed from cassava by fungi. Appl. Microbiol. 30 : 897-904.
- Ryu, D. 1980. Economic assessment of cellulase technology for Production of fuel from biomass. Proceeding of JSPS-NRCT Seminar on Agro Industry Including Microbiol Technology : Microbial Utilization of Renewable Resources. Osaka, Japan. 1 : 211-215.
- Simpson, F.F. 1959. Microbial pentosanases III. Some factor affecting the production of pentosanases by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. Can. J. Microbiol. 5 : 97-107.
- Somogyi, M. 1952. Notes in sugar determination. J. Bio. Chem. 195 : 19-23.
- Toh, S.E. 1978. Xylanase produced by xylan-utilizing microorganism. International Post-Graduate University Course in Microbiology. Osaka University.
- Takahashi, M. and S. Kutsumi. 1979. Purification and properties of xylanase from *Gliocladium vireus*. J. Ferment. Technol. 57, 434-439.
- Tsujisaka, Y.S. Takenishi ; and J. Fukomota. 1971. Studies on the hemicellulase. Part II. The mode of action of three hemicellulases produced from *Aspergillus niger* van Tieghem sp (I). Nippon Nogei Kogaku Kaishi 45 : 253-259.