ชื่องานวิจัย การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส ที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้อราฆ่าแมลงในวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร

ผู้วิจัย วนิดา เพ็ชร์ลมุล และคณะ

คณะ วิทยาลัยนวัตกรรมและการจัดการ

ปี 2560

เลข Bib# 11 A 22963
วันที่ 18 ส.ค. 2561
เลขเรียกหนังสือ ว
ธ19.5
ว27

บทคัดย่อ

วัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เป็นส่วนเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อได้ เนื่องจากยังมีองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ที่จุลินทรีย์สามารถใช้เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโตรวมทั้งสร้างผลิตภัณฑ์อื่นได้ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการเจริญ และสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส ที่ใช้ในการย่อยสลายวัสดุเศษเหลือเพื่อการเจริญของเชื้อราฆ่าแมลง ซึ่งนอกจากเป็นการส่งเสริมการนำวัสดุเศษเหลือมาใช้ประโยชน์แล้ว ยังเป็นทางเลือกในการลดต้นทุนการเพิ่มขยายเชื้อราฆ่าแมลงสำหรับใช้ทำเกษตรที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย โดยหลังจากนำเชื้อราฆ่าแมลงจำนวน 10 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Metarhizium anisopliae* จำนวน 5 สายพันธุ์ (M8 M3 M6 M33 และ MNCBRC) และ *Beauveria bassiana* จำนวน 5 สายพันธุ์ (BPMC B14532 B14841 B16041 และ BNBCRC) มาทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อศึกษาหาสภาวะของค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิด ด้วยวิธีทางสถิติแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) โดยใช้วิธี Central Composite design (CCD) และศึกษาผลการเจริญและการสร้างโคนิเดียของเชื้อราที่คัดเลือกได้โดยเลี้ยงด้วยวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ DC: กากตะกอนดีแคนเตอร์ POME: น้ำทิ้งหลังสกัดน้ำมันปาล์ม EFB: ทะลายปาล์มเปล่า OPT: ลำต้นปาล์ม OPF: ทางปาล์ม OPM: กากปาล์ม ผลการทดลองพบว่า เชื้อรา *B. bassiana* B14532 ผลิตเอนไซม์เซลลูและไซลาเนสได้สูงที่สุด เท่ากับ 3.59 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 39.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้น *B. bassiana* B14532 จึงถูกคัดเลือกเพื่อศึกษาต่อ โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดที่ 3.89 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 และที่อุณหภูมิเท่ากับ 80 องศาเซลเซียส สำหรับสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดที่ 41.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 และที่อุณหภูมิเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส และค่าสัมประสิทธิ์ (R^2) เท่ากับ 0.96 ผลการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* B14532 ที่เลี้ยงบนวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทั้ง 6 ชนิด ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* B14532 สามารถเจริญได้สูงสุด (1.90-3.26 เซนติเมตรต่อวัน) และผลิตโคนิเดียได้สูงสุด (4.20×10^7 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร) เมื่อเลี้ยงด้วยกากตะกอนดีแคนเตอร์ ขณะที่พบการเจริญได้ต่ำสุด (1.12-1.20 เซนติเมตรต่อวัน) และผลิตโคนิเดียได้น้อยที่สุดเท่ากับ 1.20×10^7 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงด้วยทางปาล์ม

Research Title Optimization for Cellulase and Xylanase Enzyme Production Affecting to Entomopathogenic Fungi Production with Agricultural Waste

Researcher Wanida Petlamul

Faculty College of Innovation and Management

Year 2017

Abstract

Palm Oil Mill Waste (POMW) are discharged from palm oil extraction process that can be ahead utilization, because these wastes still contain elements of carbon and nitrogen that microbes can use as substrates to grow and produce any products. This study investigated the growth of entomopathogenic fungi and theirs optimum conditions for degradation enzyme production. In addition, this study was to promote by-product utilization and also to reduce cost for mass entomopathogenic fungal production for using in agriculture in environmentally friendly way. Ten strains of entomopathogenic fungi consisting of 5 strains each of *Metarhizium anisopliae* (M8, M3, M6, M33 and MNCBRC) and *Beauveria bassiana* (BPMC, B14532, B14841, B16041 and BNBCRC) were evaluated to select the most effective strain showing highest cellulase and xylanase activity. Then the selected strain was investigated pH and temperature optimization for cellulase and xylanase activity by response surface methodology (RSM) using a factorial central composite design (CCD). And it was studied on growth and conidia production from 6 types of palm oil mil wastes such as DC: decanter cake; POME: Palm oil mill effluent; EFB: Empty fruit brunch; OPT: Oil palm trunk: Oil; OPF: Oil palm fiber and OPM: Oil palm meal). The results showed that *B. bassiana* B14532 gave the highest cellulase and xylanase at 3.59 and 39.00 U mL^{-1}, respectively; therefore, it was selected to study on the pH and temperature optimization for both enzyme activities. The optimum conditions for higher cellulase activities (3.89 U mL^{-1}) were pH (6.5) and 80 degree Celsius. The optimum conditions for higher xylanase activities (41.01 U mL^{-1}) were pH (6.5) and 80 degree Celsius. The coefficient of determination (R^2) was 0.96 for the RSM model fit to data. In solid cultivation, after *B. bassiana* B14532 was cultured on 6 types for 15 days, 30±2 degree Celsius. It found that *B. bassiana* B14532 gave the highest radial growth (1.90-3.26 cm ml^{-1}) and highest conidia concentration (4.20 x 10^7 conidia ml^{-1}) in decanter cake (DC). While the lowest radial growth (1.12-1.20 cm ml^{-1}) and lowest conidia concentration (1.20 x 10^7 conidia ml^{-1}) in oil palm trunk (OPT).

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณคณะผู้วิจัยทุกท่าน ขอขอบคุณความร่วมมืออย่างดียิ่งของทีมวิจัย ครอบครัวและเพื่อน ๆ ผู้ร่วมงาน ที่คอยให้การสนับสนุนการวิจัยอยู่เสมอ ทำให้ผู้วิจัยดำเนินโครงการจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

วนิดา เพ็ชร์ลมุล และคณะ
วิทยาลัยนวัตกรรมและการจัดการ
23 กุมภาพันธ์ 2561

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.5 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย	3
1.6 กรอบแนวคิดการทำวิจัย	3
บทที่ 2 ทฤษฎี	4
2.1 เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส	4
2.1.1 เอนไซม์เซลลูเลส	4
2.1.2 เอนไซม์ไซลาเนส	6
2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส	7
2.2.1 แหล่งคาร์บอน	7
2.2.2. แหล่งไนโตรเจน	8
2.2.3 กระบวนการหมัก	8
2.2.4 อุณหภูมิ	9
2.2.5 pH	9
2.3 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ลิกโนเซลลูเลส	9
2.4 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส	10
2.5 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส	11
2.6 เชื้อราฆ่าแมลง	12
2.6.1 เชื้อราบิวเวอเรีย *B. bassiana*	12
2.6.2 เชื้อราเมตาไรเซียม *M. anisopliae*	12
2.7 ลิกโนเซลลูโลส	14
2.8 วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส	15

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

หน้า

2.8.1 ประเภทของวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร 16
2.8.2 วัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 17
บทที่ 3 วิธีการทดลอง 18
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 18
3.2 วิธีการทดลอง 18
3.2.1 กิจกรรมที่ 1 อาหารเลี้ยงเชื้อ 19
3.2.2 กิจกรรมที่ 2 เลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา 19
3.2.3 กิจกรรมที่ 3 เตรียมกล้าเชื้อ 19
3.2.4 กิจกรรมที่ 4 การวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส 19
3.2.5 กิจกรรมที่ 5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ pH และอุณหภูมิ ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส 20
3.2.6 กิจกรรมที่ 6 การศึกษาการเลี้ยงเชื้อราฆ่าแมลงบนวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร 20
3.2.7 กิจกรรมที่ 7 รวบรวมผลการทดลอง 21
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล 22
4.1 ลักษณะขององค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 22
4.2 การวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* 23
4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิ และ pH ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *B. bassiana* B14532 24
4.4 การเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* B14532 28
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 30
เอกสารอ้างอิง 31
ภาคผนวก 34
ประวัติผู้วิจัย 43

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้	11
ตารางที่ 2	สภาวะและรหัสที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส	20
ตารางที่ 3	แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย	21
ตารางที่ 4	องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	22
ตารางที่ 5	ผลการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง	25
ตารางที่ 6	ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติพื้นผิวตอบสนอง	26

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดโครงการวิจัย 3

ภาพที่ 2 ก: ลักษณะของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ก้านชูโคนิเดีย (A-E) และ โคนิเดีย (F) ข: ลักษณะของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae*, ก้านชูโคนิเดีย (A, C) และโคนิเดีย (B, D) 13

ภาพที่ 3 วงจรชีวิตของเชื้อราแมลง 13

ภาพที่ 4 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (BNBCRC, BPMC, B14841, B16041 and B14532) และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin M33, M8, M36, M6 and MNBCRC หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72-192 ชั่วโมง 22

ภาพที่ 5 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (BNBCRC, BPMC, B14841, B16041 and B14532) และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin M33, M8, M36, M6 and MNBCRC หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72-192 ชั่วโมง 23

ภาพที่ 6 ผลของค่า pH และอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* B14532 26

ภาพที่ 7 ผลของค่า pH และอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* B14532 27

ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* B15432 บนวัสดุเศษเหลือโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ได้แก่ DC: กากตะกอนดีแคนเตอร์ POME: น้ำทิ้งหลังสกัดน้ำมันปาล์ม EFB: ทะลายปาล์มเปล่า OPT: ลำต้นปาล์ม OPF: ทางปาล์ม OPM: กากปาล์ม 28

ภาพที่ 9 การสร้างโคนิเดียของเชื้อรา *Beauveria bassiana* B15432 บนวัสดุเศษเหลือโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ได้แก่ DC: กากตะกอนดีแคนเตอร์ POME: น้ำทิ้งหลังสกัดน้ำมันปาล์ม EFB: ทะลายปาล์มเปล่า OPT: ลำต้นปาล์ม OPF: ทางปาล์ม OPM: กากปาล์ม 29

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ด้วยบริบทของประเทศไทยที่เป็นประเทศเกษตรกรรม มีระดับการผลิตพืชผลทางการเกษตรตั้งแต่รายย่อยจนระดับที่สูงขึ้น ก่อให้เกิดผลพลอยได้ต่าง ๆ หลายชนิดและจำนวนมาก สำหรับอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันในภาคใต้ ได้เติบโตขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ซึ่งกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มส่งผลให้เกิดของเสียหรือวัสดุเศษเหลือในปริมาณมาก โดยวัตถุดิบทะลายปาล์มสด 1,000 กิโลกรัม จะให้น้ำมันประมาณ 200 กิโลกรัม ทะลายเปล่าประมาณ 220 กิโลกรัม เมล็ดในประมาณ 50 กิโลกรัม กะลาประมาณ 55 กิโลกรัม กากตะกอนและน้ำประมาณ 475 กิโลกรัม คิดเป็นปริมาณวัสดุเศษเหลือสูงถึงร้อยละ 80 (ธีระพงศ์ และอัจฉรา, 2557) และการใช้ประโยชน์ของวัสดุเศษเหลือเหล่านี้ได้แก่ การทำปุ๋ยหมัก การผลิตแก๊สชีวภาพ การผลิตเอทานอล ไฮโดรเจนและและกรด 5 แอมิโนลีวูลินิก จากเศษเหลือโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เป็นต้น อย่างไรก็ตาม วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่มีปริมาณมากถึง 43 ล้านตันต่อปีในประเทศไทย (สหุฤทธา และดาวัลย์, 2557) ซึ่งการนำวัสดุเศษเหลือเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ยังเกิดขึ้นเป็นส่วนน้อย เช่น การนำมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ และผลิตพลังงานในรูปแบบต่าง ๆ โดยมีบางส่วนถูกปล่อยทิ้งไว้ในพื้นที่เพาะปลูกหรือถูกเผาทิ้ง ดังนั้นการศึกษาการย่อยสลายวัสดุเศษเหลือเหล่านี้ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นลิกโนเซลลูโลส จะสามารถเพิ่มมูลค่าหรือแปรรูป ต่อยอดสู่การใช้ประโยชน์ที่หลากหลายมากขึ้น การย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสเพื่อนำวัสดุเศษเหลือมาใช้ให้เกิดประโยชน์นั้นสามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมี และชีวภาพ สำหรับวิธีทางเคมีมีความไม่ปลอดภัยเนื่องจากต้องใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงในสภาวะที่อุณหภูมิสูง และเกิดผลพลอยได้ที่ไม่ต้องการ ขณะที่วิธีทางชีวภาพมีความปลอดภัยมากกว่า โดยอาศัยเอนไซม์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อสับเสตรททำปฏิกิริยาย่อยสลายแล้วได้น้ำตาลกลูโคส เช่น กลุ่มเอนไซม์ลิกโนเซลลูเลส ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส (เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และไซแลน) ที่เป็นองค์ประกอบหลักในวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร น้ำเสีย และขยะต่าง ๆ ปัจจุบันเอนไซม์กลุ่มนี้ถูกนำไปใช้ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ โปรตีนเซลล์เดียว วิตามิน กรดอินทรีย์ สารปฏิชีวนะ และเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ รวมทั้งอุตสาหกรรมการผลิตยาง อาหาร และกระดาษ เป็นต้น สำหรับกระบวนการผลิตเอนไซม์ลิกโนเซลลูเลสสามารถเกิดขึ้นได้จากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มเชื้อราเนื่องจากมีการเจริญเป็นเส้นใยจึงสามารถดูดซึมสารอาหารจากแหล่งอาหารเพื่อการเจริญได้ดี และยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก (Li *et al.*, 1998) โดยตัวอย่างเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ลิกโนเซลลูเลส ได้แก่ *Cytophaga* sp. *Sporocytophaga* sp. *Pseudomonas* sp. *Clostridium* sp. *Thermophilum* sp. *Rumincocus albus* และเชื้อราที่สำคัญทางการเกษตร เช่น *Trichoderma harzianum* ซึ่งเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช และ *Paecilomyces inflatus* ซึ่งเป็นเชื้อราฆ่าแมลง (Kluczek-T *et al.*, 2007) สำหรับ *Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* เป็นเชื้อราฆ่าแมลงชนิดหนึ่งที่เจริญในดิน มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงได้หลายชนิด เช่น Lepidoptera

Hymenopterta Coleoptera และLeptinotarsa (Harris *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 2001; Mannion *et al.*, 2001) ซึ่งหลายหน่วยงานให้การสนับสนุนในการใช้เชื้อราชนิดนี้ทางการเกษตร แต่อย่างไรก็ตาม เชื้อราดังกล่าวยังมีต้นทุนการผลิตเนื่องจากใช้วัตถุดิบจำพวกข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ในการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส สำหรับใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักมาเป็นแหล่งอาหารเพื่อการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae*

โดยงานวิจัยชิ้นนี้มุ่งเน้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ pH และอุณหภูมิ ที่มีผลต่อการผลิตและเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส ในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสของเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* เพื่อเป็นการส่งเสริมการใช้ประโยชน์วัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมเกษตร เพิ่มมูลค่าวัสดุเศษเหลือ ลดปริมาณวัสดุเศษเหลือ และลดต้นทุนการผลิตเชื้อราฆ่าแมลง รวมทั้งเป็นการส่งเสริมและเผยแพร่การใช้เชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* ในการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี อันเป็นการส่งเสริมการทำเกษตรที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ที่จะรักษาระบบนิเวศน์ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* ในการย่อยสลายสารกลุ่มลิกโนเซลลูโลส

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ pH และ อุณหภูมิ ต่อเสถียรภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* โดยประยุกต์ใช้วิธีสถิติพื้นผิวตอบสนองในการทดลอง

1.2.3 เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อราฆ่าแมลงที่เลี้ยงด้วยวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 วิชาการ: ผลงานที่ได้สามารถนำเสนอในงานประชุมวิชาการ และหรือตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ เพื่อเป็นประโยชน์ทางวิชาการให้กับหน่วยงานอื่นที่สนใจ

1.3.2 ด้านสังคมและชุมชน: ผลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปต่อยอดสู่การผลิตเชื้อราฆ่าแมลงด้วยวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร และถ่ายทอดสู่ชุมชน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืชได้ต่อไป

1.3.3 ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์: ผลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปต่อยอดสู่การผลิตเชื้อราฆ่าแมลงด้วยวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรซึ่งเป็นวัตถุดิบต้นทุนต่ำ ช่วยลดต้นทุนการนำเข้าสารเคมีทางการเกษตร

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของ pH และ อุณหภูมิ ในการผลิตและเสถียรภาพของเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส ในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 10 สายพันธุ์ จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์สูงสุดไปทดสอบการเจริญ

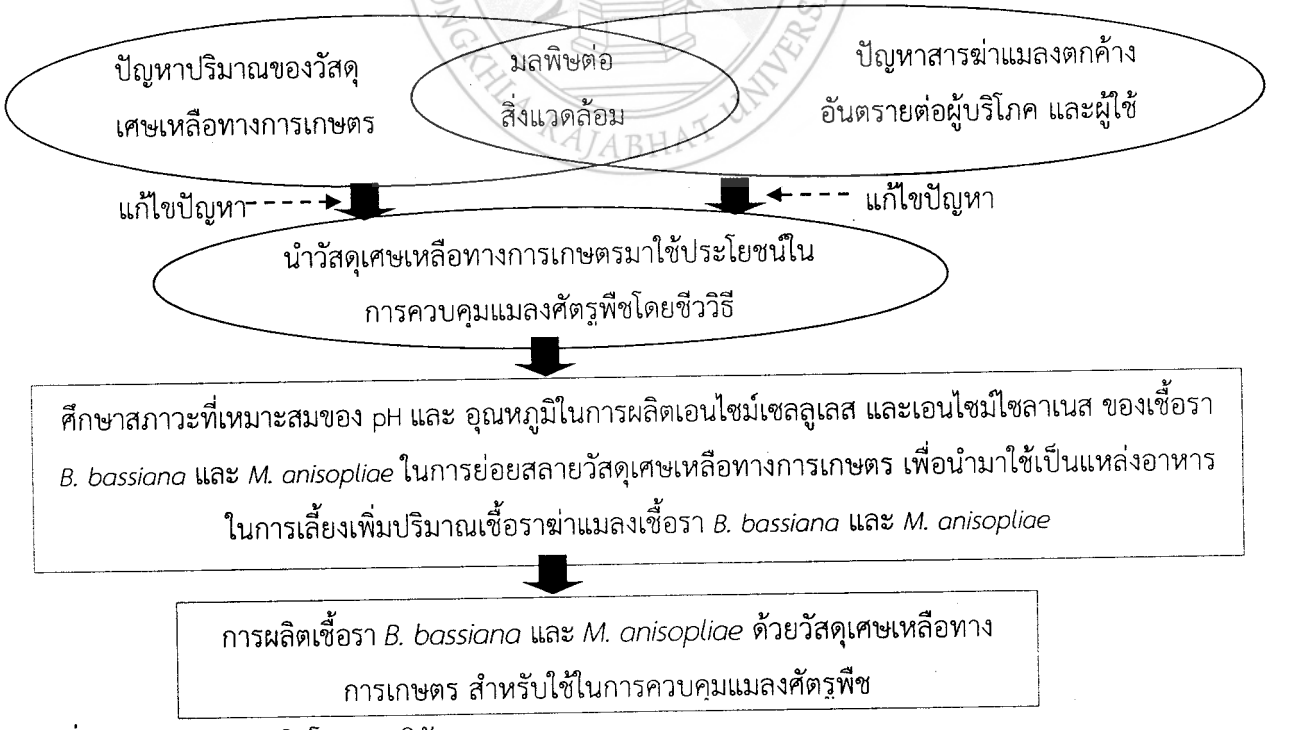
และการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่ได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยดำเนินการทดลองได้รับการอนุเคราะห์เครื่องมือและห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.5 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

18 สิงหาคม 2559 – 17 พฤศจิกายน 2560

1.6 กรอบแนวคิดการทำวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาต่อยอดจากงานวิจัยเดิม เรื่อง การประเมินศักยภาพของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *M. anisopliae* ต่อความรุนแรงในการก่อโรคกับแมลง *Spodoptera litura* ความสามารถในการเจริญ และการสร้างสปอร์ เพื่อส่งเสริมการใช้เชื้อราดังกล่าวสำหรับควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี (Petlamul and Prasertsan, 2012) โดยการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นเพื่อหาศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส และเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของ pH และ อุณหภูมิ ต่อเสถียรภาพการผลิตของเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส ในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสของเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* โดยค่า pH ที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 5-7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 30-50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญของเชื้อรากลุ่มนี้ และเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ด้วย สำหรับองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษา มุ่งเน้นเพื่อที่จะนำวัสดุเศษเหลือที่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่มลิกโนเซลลูโลสมาเป็นวัตถุดิบต้นทุนต่ำในการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา เพื่อส่งเสริมควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี ที่จะสามารถถ่ายทอดแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ในชุมชนได้ต่อไป โดยดำเนินงานกรอบแนวความคิดโครงการวิจัยดังนี้ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดโครงการวิจัย

บทที่ 2
ทฤษฎี

ปัจจุบันได้มีการค้นคว้าหาวิธีการเพื่อลดปัญหาอันตรายจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่เพิ่มขึ้น โดยให้เกษตรกรหันมาใช้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับว่าใช้ได้ผลดีสำหรับการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (Bt) เชื้อไวรัส Nuclearpolyhedrosid virus (NPV) และเชื้อราฆ่าแมลง เช่น เชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ยังคงได้รับความสนใจจากเกษตรกร เนื่องจากสามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ การส่งเสริมการผลิตเชื้อราฆ่าแมลงดังกล่าวเพื่อให้เกษตรกรสามารถใช้ได้อย่างแพร่หลาย และง่ายต่อการผลิต เป็นปัจจัยสำคัญที่จะสามารถส่งเสริมให้การใช้เชื้อราฆ่าแมลงมีการใช้กันอย่างกว้างได้โดยง่าย ซึ่งการลดต้นทุนการผลิตเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการส่งเสริมการใช้เชื้อราฆ่าแมลงในการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีมากขึ้น สำหรับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรนับว่าเป็นวัตถุดิบต้นทุนต่ำที่เป็นทางเลือกในการนำมาใช้ โดยส่วนใหญ่วัสดุเศษเหลือเหล่านี้มีองค์ประกอบสำคัญเป็นลิกโนเซลลูโลสที่จะถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์เซลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าในระดับห้องปฏิบัติเกี่ยวกับความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส รวมทั้งปัจจัยด้าน pH และ อุณหภูมิ ที่เกี่ยวข้องในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวของเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* จะนำไปสู่การพัฒนาต่อยอดงานวิจัยต่อไปได้ ในการใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่มีปริมาณมากในระบบการเกษตรเป็นวัตถุดิบต้นทุนต่ำในการผลิตเชื้อราทั้งสองชนิดนี้

2.1 เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส

2.1.1 เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสารประกอบอินทรีย์ประเภทเซลลูโลสซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Goulart *et al.*, 2005) และ ฮอโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (glucose) มาต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) ที่ตำแหน่งบีต้า-1,4 (b-1,4) เป็นสายยาวประมาณ 50,000 โมเลกุลมาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาว แต่ละสายของสายของเซลลูโลสเรียงขนานกันไป มีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างสาย ทำให้มีลักษณะเป็นเส้นใย สะสมไว้ในพืชประมาณ 35-50% ต่อน้ำหนักแห้ง (Lynd *et al.*, 2002) ในธรรมชาติการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส เกิดโดยอาศัยการย่อยสลายจุลินทรีย์หลายชนิดรวมกันในสภาพที่มีออกซิเจน โดยที่ปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นมาจากการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสในสภาพที่เหมาะสม มีการระบายอากาศ และอุณหภูมิที่เหมาะสม มีแหล่งอาหารเพียงพอกับการนาไปสร้างพลังงานเพื่อใช้ในระบบเมตาบอลิซึม และการเพิ่มจานวนเซลล์ ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน การย่อยสลายเซลลูโลส จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน เอทธานอล กรดฟอร์มิก กรดซัคซินิก กรดบิวทีริก และกรดแลกติก เป็นต้น การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสสามารถทำได้ 2 วิธีคือ วิธีทางเคมี

โดยการย่อยด้วยกรด และวิธีทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์ ได้เป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เช่น กลูโคส เซลโลไบโอส สำหรับการย่อยด้วยกรดนั้นเครื่องมือที่ใช้จะต้องทนทานต่อการกัดกร่อน เนื่องจากปฏิกิริยาของกรดไม่เจาะจง ประกอบกับโมเลกุลของเซลลูโลสเรียงตัวเป็นระเบียบ (crystalline) ทำให้ต้องใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงและอุณหภูมิสูงทำให้เกิดผลพลอยได้ที่ไม่ต้องการ ส่วนการใช้วิธีทางชีวภาพโดยเอนไซม์ที่มีความเฉพาะเจาะจง ก็จะทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์

สำหรับเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส (1,4-β-D-glucan glucanohydrolase (EC 3.2.1.4)) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ (multiple enzyme) ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด (งานวิจัยการผลิตเอทานอลจากกากของเสียการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร, 2548) ได้แก่ (1) Endo-1,4-β-D-glucanase ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในรูปที่เป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ (amorphous) รวมทั้งโมเลกุลของเซลโลโอลิโกเมอร์ (cellooligomer) ที่ตำแหน่ง β-1,4 แบบสุ่มจากทางด้านปลายรีดิวซ์ (Reducing End) ของสายโซ่เซลลูโลสได้เป็นเซลโลไบโอส และโอลิโกเมอร์ (oligomer) (2) Exo-1,4-β-D-glucanase หรือ Endo-1,4-β-D-glucancellobiohydrolase (CMCase (CBH)) ทำหน้าที่ย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์และเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส ตำแหน่งที่ทำงานเป็นแบบสุ่ม (random) โดยจะทำงานร่วมกันกับ endo-1,4-β-D-glucanase (3) β-D-glucoside glucanohydrolase ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligosaccharide) ให้เปลี่ยนเป็นกลูโคส (งานวิจัยการผลิตเอทานอลจากกากของเสียการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร, 2548)

ในธรรมชาติมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ เช่น สัตว์ทะเลในกลุ่มเพรียงหัวหอม (tunicate) หอยทากยักษ์ (Achatinafulica) และจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งที่เป็นโปรโตซัว แบคทีเรีย แอคติโนมัยสิท และเชื้อรา จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สร้างเอนไซม์ เซลลูเลสที่มีความสามารถในการย่อยลสายแตกต่างกันขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์เหล่านั้นเจริญอยู่ พบว่าเชื้อรา (celllulolytic fungi) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เอนไซม์เซลลูเลสส่วนใหญ่เป็นเอกซ์ตร้าเซลลูลาร์เอนไซม์ (extracellular enzyme) คือ เซลล์ปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ทาให้สะดวกต่อการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายเซลลูโลส และสะดวกต่อการนามาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ในการศึกษา หรือใช้ในอุตสาหกรรม (พิจิตรา, 2548)

2.1.2 เอนไซม์ไซลาเนส

เอนไซม์ไซลาเนสเป็นเอนไซม์หลักในกลุ่มไซลาโนไลติกเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยไซแลน ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสประมาณร้อยละ 15-30 และ 7-12 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับซึ่งพบมากในผนังเซลล์พืช มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลไซโลส องค์ประกอบหลักของไซโลส คือ ไซแลน ซึ่งเป็น xylopyranose unit เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-D-1,4-linkage ไซแลนจะมีโครงสร้างเหมือนกันจะต่างกันที่หมู่ฟังก์ชั่น ที่ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด เช่น ไซโลส กลูโคส แมนโนส กาแลคโตส และอะราบิโนส (Tsao *et al.*, 1993 อ้างโดยเบญจวรรณ ชิตมณี, 2534) และมีกิ่งก้านเป็นน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำตาลอะราบิโนส และกรดกลูคลูโรนิก เป็นต้น (Sunna and Antranikian, 1997) การย่อยไซแลนอย่างมีประสิทธิภาพต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มไซลาเนส (xylanolytic enzyme system) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มที่ย่อยโครงสร้างหลักของไซแลน ได้แก่ เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส (β-xylosidase; EC 3.2.1.37) และไซลาเนส (xylanase; EC 3.2.1.8) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในการย่อยไซแลน และ (2) กลุ่มที่ย่อยสลายกิ่งก้านของไซแลน ได้แก่ เอนไซม์อะราบิโนฟูราโนซิเดส (arabinofuranosidase; EC 3.2.1.55) อัลฟากลูคูโรนิเดส (a-glucuronosidase; EC 3.2.1.99) และอะเซทิลเอสเตอเรส (acetyl esterase; EC 3.1.1.72)

สำหรับรายงานการนำเอนไซม์ไซลาเนสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ช่วยลดปริมาณคลอรีนในการฟอกสีเยื่อกระดาษ ใช้ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสและเพคตินในการทำให้น้ำผลไม้และไวน์ใส (Biely, 1985) ปรับปรุงคุณภาพอาหารสัตว์สำหรับวัว กระบือ หมู เป็ด และไก่ (Diebold *et al.*, 2005) ปรับปรุงคุณภาพ ของแป้งจากธัญพืชเพื่อให้ขนมปังมีคุณลักษณะ ปริมาณ ลักษณะสัมผัส และ staling ดีขึ้น (Sunna and Antranikian, 1997) และเปลี่ยนไซแลนในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง เช่น เอทานอล ไซลิทอล และน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Coughlan and Hazlewood, 1993) เป็นต้น จึงทำให้มีความน่าสนใจที่จะนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ ซึ่งปัจจุบันมีการนำวัสดุเหล่านี้มาใช้เป็นสับสเตรตสำหรับเอนไซม์ กลุ่มที่ย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในลิกโนเซลลูเลส โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ (Basal *et al.*, 2011; Mussatto *et al.*, 2011)

ทั้งนี้งานวิจัยที่ศึกษาศักยภาพการผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในการย่อยสลายวัสดุการเกษตรที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ การศึกษาการผลิตก๊าซชีวภาพ โดยใช้เนื้อไม้สนที่ปรับสภาพด้วยไอน้ำ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45 องสาเซลเซียส จากนั้นใช้เอนไซม์เซลลูเลส และเบต้ากลูโคลซิเดส เปรียบเทียบกับการแปรสภาพที่อุณหภูมิช่วง 190-220 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที และ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ 0-10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่า การย่อยสลายด้วยเอนไซม์สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบโมเลกุลเดี่ยวของคาร์โบไฮเดรตได้ถึง 55 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเพิ่มปริมาณก๊าซชีวภาพได้ถึง 304 mL/gODM (Janzon *et al*,. 2013) นอกจากนี้ การแปรสภาพเนื้อหัวบีทบดและฮ็อพที่ผ่านการใช้แล้วก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการผลิตก๊าซมีเทน โดยย่อยสลายด้วย Celu-star XL และ Agropect pomace (3:1, v/v) endoglucanase xylanase และ pectinase เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด โดยสามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้สูงกว่าที่ไม่ทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เท่ากับร้อย

ละ 88.9 และ 59.4 ตามลำดับ และเมื่อเข้าสู่กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพพบว่า การหมักด้วยน้ำตาลเยื่อกระดาษสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพได้เท่ากับ 183.39 มิลลิลิตร/กรัมซีโอดี-วัน โดยมีสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้าสู่ระบบเท่ากับ 5.43 กรัมซีโอดี/ลิตร-วัน มีปริมาณผลผลิตก๊าซมีเทนเท่ากับ 121.47 มิลลิลิตร/กรัมซีโอดี-วัน (Zieminski *et al.*, 2012)

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส

ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ ปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น ชนิดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง รวมไปถึงสภาพแวดล้อมการผลิต ซึ่งได้แก่ อายุและปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) อุณหภูมิ การให้อากาศ และอัตราการเขย่า

2.2.1 แหล่งคาร์บอน

เอนไซม์ไซลาเนสเป็นไซโลโนไลติกเอนไซม์สามารถย่อยไซแลน โดยย่อยสลายโซ่หลักและปล่อยโมเลกุลของไซโลสออกมานอกเซลล์ จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งเชื้อรา แบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทสร้างเอนไซม์ไซลาเนส เพื่อย่อยสลายไซแลนให้กลายเป็นน้ำตาลไซโลสและโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่างๆ ได้ เนื่องจากแหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งอาหารที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส เชื้อราฆ่าแมลงที่พบว่าสามารถย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส เช่นพวกธัญพืช ฟางข้าว และไม้เนื้อแข็ง (Kluczek, 2007). ซึ่งเชื้อราฆ่าแมลงเหล่านี้ได้แก่ *M. anisopliae* และ *B. bassiana* จึงเป็นไปได้ว่า เชื้อราเหล่านี้ (Kaur *et al.*, 2007). โดยเฉพาะเชื้อรา *B. bassiana* ที่สามารถปลดปล่อยเอนไซม์เซลลูเลสได้ปริมาณสูงในสับสเตรทหลังจากเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้ไปได้ 4-5 วัน (Leopold and Samšiňáková, 1970) นอกจากนี้ Juhasz และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อรากำจัดโรคพืช *Trichoderma reesei* RUT C30 โดยทำการหาแหล่งชนิดของคาร์บอน (carbon source) ที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เชื้อ T. *reesei* RUT C30 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ ต้นสนใบสั้น, ต้นหลิว, ซังข้าวโพด และ Solka Floc ซึ่งเกิดนำวัตถุดิบเหล่านั้นมาใช้เป็นสับสเตรทนั้นต้องนามาผ่านการแปรรูปทางเคมีที่เหมาะสมก่อน จากการศึกษาพบว่า ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ *T. reesei* RUT C30 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส มากที่สุด ส่วน Solka Floc, ต้นหลิว และต้นสนใบสั้นให้กิจกรรมเอนไซม์รองลงมาตามลำดับ

2.2.2. แหล่งไนโตรเจน

การศึกษากิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลสจากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเป็น 252.82 และ 4.15 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ และเมื่อใช้ยูเรียกิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลส เท่ากับ 161.53 และ 8.75 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ (ปรางประไพ, 2546) นอกจากนี้ การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยการเพาะเลี้ยง *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง เมื่อใช้ฟางข้าวแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เวลา 0.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ และมีแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษา พบว่า การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนให้กิจกรรมไซลาเนสสูงกว่าการใช้ยูเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *F. moniliforme* เป็นเวลา 3 วัน พบว่า เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้กิจกรรมไซลาเนส เท่ากับ 920 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ได้ค่ากิจกรรมไซลาเนส มีค่าเท่ากับ 602 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท (ดุษณี และคณะ, 2546)

2.2.3 กระบวนการหมัก

กระบวนการหมักแบบอาหารแข็งมีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในหัวอาหารสัตว์ โดยเอนไซม์ที่ผลิตจากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง เช่น เอนไซม์ อะไมเลส, เซลลูเลส, โปรติเอส, ไซแลนเนส และ เพคตินเนส เป็นต้น (Graminha และคณะ, 2008) การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสามารถใช้จุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรียและราในการผลิต โดยจุลินทรีย์ประเภทราที่สามารถนามาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ เช่น *Trichoderma, Aspergillus, Penicillium* และ *Fusarium* โดยงานวิจัยของ Shah และคณะ (2005) ได้ทาการหมัก *Aspergillus* spp. MPS-002 ด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่ากระบวนการหมักแบบอาหารแข็งมีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และมีงานวิจัยพบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากรา *Trichoderma reesei* QMY-1 ด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็งจะสามารถผลิตเอนไซม์ ได้มากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว 72% (Chahal และคณะ, 1984)

2.2.4 อุณหภูมิ

จากการวิจัยของ Singh และ คณะ พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (Singh และ คณะ 2000) การศึกษาการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งโดยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Carnimal, 1984) รวมไปถึงงานวิจัยของ Coral และคณะ (2003) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. ressi* จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส

2.2.5 pH

ค่า pH มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดอาจมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญที่แตกต่างกัน โดย Mawadza และคณะ (2000) รายงานว่า เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. CH43 และ HR68 มีการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่ pH 6-8 ขณะที่ *Bacillus* sp. NCIM59 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีที่ pH 5-10 (Nath and Rao, 2001) สำหรับเอนไซม์เซลลูเลส สามารถทำงานได้ในค่า pH ช่วงกว้างประมาณ 4.8-8 และค่า pH อาจเปลี่ยนแปลงไประหว่างการเลี้ยงเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ สำหรับเชื้อรา พบว่า ค่า pH ที่ต่ำมีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Mandels and Weber, 1969)

2.3 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ลิกโนเซลลูเลส

การศึกษาเปรียบเทียบการใช้วัสดุชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ที่เพาะเลี้ยงด้วยฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ 917 ยูนิตต่อสับสเตรท สูงกว่าเมื่อใช้รำข้าว ธูปฤาษีและ ผักตบชวา ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากฟางข้าวมีเฮมิเซลลูโลสสูงกว่ารำข้าว ธูปฤาษีและผักตบชวา ส่วนผลการเปรียบ เทียบแหล่งไนโตรเจน แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อรา พบว่า *F. moniliforme* TISTR 3175 แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อราสามารถผลิตไซลาเนสได้ 1,480 ยูนิตต่อสับสเตรท สูงกว่าเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ทั้งนี้เพราะว่ามีธาตุไนโตรเจนและกำมะถันเป็นองค์ประกอบในแอมโมเนียมซัลเฟตสูงกว่ายูเรีย ส่วนการเปรียบเทียบการใช้ฟางข้าว รำข้าว ที่พรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์พบว่า เชื้อราสามารถผลิตไซลาเนสด์ค่า กิจกรรมสูงกว่าการพรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอนด้วยการต้มและการไม่พรีทรีทเมนต์แหล่งคาร์บอน ซึ่งรำข้าวและฟางข้าวที่พรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมงเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อรา *F. moniliforme* TISTR 3175 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ค่ากิจกรรมสูงกว่าการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เวลา 1 และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ (ดุษณี และ คณะ, 2549)

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซมีไซลาเนสของเชื้อ *Bacillus subtilis* AH73 ด้วยน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ไม่มีการเจือจาง ไม่เติมไนโตรเจน แต่เติมเฉพาะแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปปะไฮเดรต โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และซีเอ็มซี ปริมาณ 0.3 0.3 1.0 1.0 และ 15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปรับค่า pH ที่ 5.0 บ่มที่เครื่องเขย่าอุรหภูมิ 45 องศาเซลเซียสที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า เชื้อ *B. subtilis* AH73 ให้เอนไซม์เซลลูเลส 1.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์ไซลาเนส 0.99 ยูนิตต่อมิลลิลิตรขณะที่เมื่อเลี้ยงในปริมาตร 2 ลิตร เพิ่มการให้อากาศ 3 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที พบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 1.72 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์ไซลาเนส 1.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (สันทัศน์, 2554)

2.4 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส

ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์เซลลูเลส หรือจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ในอุตสาหกรรม และเกษตรกรรม เช่น การใช้ในการสลายพืชผัก และกากเหลือจากเกษตรกรรม การย่อยขยะเป็นปุ๋ยหมัก เป็นต้น ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ได้แก่

1. อุตสาหกรรมกระดาษ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสบางชนิดที่เหมาะสมมีส่วนช่วยลดเวลาในการตี (beating time) และช่วยต้านไข (grease resistancc) ทาให้กระดาษมีคุณภาพดี
2. ในกระบวนการน้าผักกระป๋อง
3. ใช้ในการสกัดน้าผลไม้เปรี้ยว และทำให้ใส (extraction and clarification of juice) แล้วยังทาให้น้าผลไม้ที่ได้เป็นเนื้อเดียวกัน
4. เอนไซม์เซลลูเลสนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในส้วมถังเกรอะ (septic tank)
5. เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* ช่วยสลายผนังเซลล์พืช ทาให้มีการเชื่อม โปรโตพลาสต์ (protoplast) ของเซลล์พืชสองชนิดซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์ที่มีค่าต่อวงการเกษตรแผนใหม่
6. ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม
7. ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์
8. ใช้ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากเมล็ดธัญพืช
9. ใช้จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ยหมัก
10. นอกจากนี้ยังมีการนาเอนไซม์เซลลูเลสมาผลิตเป็นยาอีกด้วย โดยใช้เอนไซม์ เซลลูเลสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นช่วยเป็นยาขับลมในกระเพาะ และช่วยลดอาการแน่นท้อง เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสไปย่อยเส้นใยได้

2.5 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส

เนื่องจากเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีสายยาว จุลินทรีย์ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง ดังนั้นจุลินทรีย์ต้องสร้าง extracellular enzyme ออกมาย่อยเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ และสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกว่า เอนไซม์เซลลูเลส มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสร้างเอนไซม์นี้ได้ (พรเทพ, 2528) จุลินทรีย์นับว่ามีความสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสมาก จุลินทรีย์หลายชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสมักอยู่ในกลุ่มเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสิท ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

เชื้อรา	เชื้อแบคทีเรีย	เชื้อแอคติโนมัยสิท
Alternaria sp.	*Bacillus sp.*	*Micrormonospora sp.*
Aspergillus sp.	*Cellulomonas sp.*	*Nocardia sp.*
Chaetomium sp.	*Clostridium sp.*	*Streptomyces sp.*
Corprinus sp.	*Corynebacterium sp.*	*Streotosporangium sp.*
Foames sp.	*Cytophaga sp.*	
Fusarium sp.	*Polyangium sp.*	
Myrothecium sp.	*Pseudomonas sp.*	
Penicillium sp.	*Sporocytophaga sp.*	
Polyporus sp.	*Vibrio sp.*	
Rhizoctonia sp.		
Sporotrichum sp.		
Thielavia sp.		
Trametes sp.		
Trichothecium sp.		
Trichoderma sp.		
Verticillium sp.		
Zygorhynchus sp.		

ที่มา: พรเทพ (2538)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

2.6 เชื้อราฆ่าแมลง

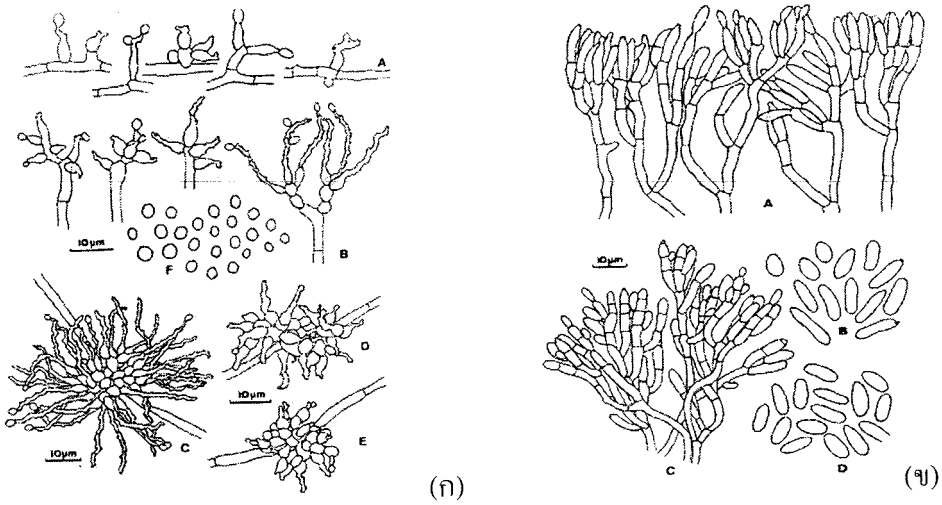
เชื้อราฆ่าแมลงเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีความเฉพาะเจาะจงกับแมลง เช่น แมงมุม ไร เห็บ ตั๊กแตน เป็นต้น โดยเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแมลงนี้ สามารถเข้าสู่ร่างกายของแมลงได้ โดยแทงทะลุผ่านเข้าไปทางผิวหนังและไปเจริญเติบโตภายในตัวแมลงโดยจะสร้างสารพิษ (Toxin) ทำลายเนื้อเยื่อและระบบต่างๆ ทำให้แมลงตาย การเกิดโรคของแมลงจะเกิดได้ดีและรวดเร็ว เมื่อแมลงอ่อนแอ และได้สัมผัสเชื้อราโดยตรง โดยเฉพาะเมื่อเชื้อราอยู่ในสภาพแวดล้อมที่พอเหมาะแก่การเจริญจะมีความรุนแรงมากขึ้น สำหรับเชื้อราแมลงที่นิยมนำมาควบคุมแมลงศัตรูพืชมีดังนี้

2.6.1 เชื้อราบิวเวอเรีย *B. bassiana*

เชื้อรา *B. bassiana* ถูกเรียกอีกอย่างว่าเชื้อราขาว เป็นเชื้อราที่โดดเด่นในการทำลายแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ เชื้อราชนิดนี้เจริญได้ในดิน มีลักษณะการเจริญของเส้นใยเป็นสีขาว หรือสีเหลืองอ่อน มีลักษณะสปอร์หรือโคนิเดีย เป็นแบบเดี่ยว มีก้านชูโคนิเดีย และองค์ประกอบอื่น ๆ (ภาพที่ 2ก) ซึ่งเชื้อราชนิดนี้สามารถทำลายแมลงได้หลายระยะการเจริญของแมลง และทำลายแมลงหลายชนิด ได้แก่ Lepidoptera, Hymenopterta, Coleoptera และLeptinotarsa (Harris *et al.*, 2000, Fernandez *et al.*, 2001, Mannion *et al.*, 2001, Phoofolo *et al.*, 2001) มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูผัก เช่น หนอนกระทู้ผัก (cutworm, *Spodoptera litura*) ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (Petlamul and Poonsuk, 2012) จึงเห็นได้ว่า ในปัจจุบันการใช้เชื้อรา *B. bassiana* ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในช่วงสมัยที่เป็นกระแสเกษตรปลอดสารพิษ หรือเกษตรอินทรีย์ ทั้งนี้เชื้อรา *B. bassiana* ได้ถูกนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยกากตะกอนดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจนซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ผลการทดลองพบว่า เชื้อราบิวเวอเรียสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสปอร์ได้ 4.80×10^{8} สปอร์ต่อกรัม ในกากตะกอนดีแคนเตอร์ที่เติมยูเรีย เปปโตน และแมกนีเซียมซัลเฟต ในปริมาณ 0.80 2.10 และ 0.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Petlamul and Prasertsan, 2014a) และได้ปริมาณการผลิตสปอร์เพิ่มขึ้น 4.46×10^{8} สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งสกัดปาล์มน้ำมันหลังใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจน ที่เติมโพแทสเซียมไนเตรต ยีสต์สกัดและแคลเซียมคลอไรด์ ในปริมาณ 3.60 4.55 และ 0.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Petlamul and Prasertsan, 2014b)

2.6.2 เชื้อราเมตาไรเซียม *M. anisopliae*

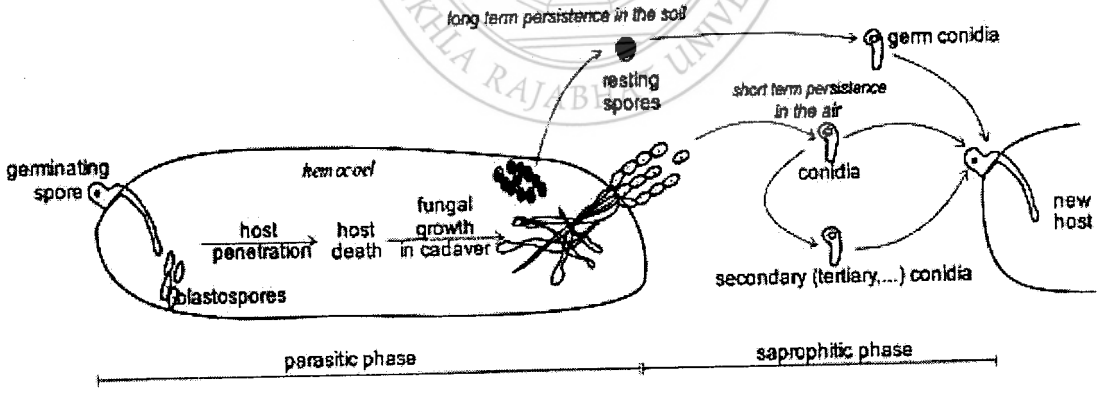
เชื้อรา *M. anisopliae* ถูกเรียกอีกอย่างว่าเชื้อราเขียว เป็นเชื้อราที่สามารถทำลายแมลงได้หลายชนิด อีกทั้งเป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ง่าย และพบทั่วไปในดิน ในช่วงของการเจริญระยะเริ่มต้น พบว่า ลักษณะโคนิเดียของเชื้อราชนิดนี้ มีสีขาว และเมื่อเจริญเติบโต ขยายปริมาณมากขึ้น จะมีลักษณะโคนิเดียเป็นสีเขียวเข้ม โดยโคนิเดียมีลักษณะเป็นวงรี ที่เรียงต่อกันเป็นสาย เจริญจากก้านชูโคนิเดีย (Augustyniuk-Kram, 2002) (ภาพที่ 2ข) เชื้อราเขียว จึงเป็นเชื้อราฆ่าแมลงอีกชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ และได้รับความนิยมนำไปใช้ในรูปแบบของสารชีวินทรีย์ฆ่าแมลง สำหรับใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจด้วยชีววิธี โดยแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางการเกษตรที่สามารถควบคุมได้ เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจั๊กจั่น เพลี้ยแป้ง หนอนม้วนใบ หนอนกอ



ภาพที่ 2 ก: ลักษณะของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ก้านชูโคนิเดีย (A-E) และ โคนิเดีย (F) ข: ลักษณะของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae*, ก้านชูโคนิเดีย (A, C) และโคนิเดีย (B, D)

ที่มา: Tzean และคณะ (1997)

สำหรับกลไกการทำลายแมลงของเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* เกิดหลังจากที่สปอร์ของเชื้อราดังกล่าวตกที่ผนังลำตัวแมลง สปอร์จะงอกแทงทะลุผ่านลำตัวแมลงเข้าไปภายในลำตัวและเจริญเติบโตเป็นเส้นใย ทำลายเซลล์เม็ดเลือดในตัวของแมลง ทำให้แมลงเป็นอัมพาตและตายไปในที่สุด หลังจากแมลงตายแล้วเชื้อราจะสร้างสปอร์แพร่กระจายได้ตามธรรมชาติ (ภาพที่ 3) เป็นการสร้างความสมดุลให้แก่ระบบนิเวศวิทยาเกษตรได้ต่อไป



ภาพที่ 3 วงจรชีวิตของเชื้อราแมลง

ที่มา: Augustyniuk-Kram และ Kram (2012)

2.7 ลิกโนเซลลูโลส

วัสดุทางการเกษตรประกอบด้วยเซลลูโลสเป็นใหญ่ และมีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักใน เฮมิเซลลูโลส โดยส่วนประกอบต่าง ๆ อยู่รวมกันอย่างซับซ้อน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติจึงต้องผลิตเอ็นไซม์ทั้งกลุ่มที่เป็นไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกออกมาย่อยสลายวัสดุทางการเกษตร เพื่อนำไปใช้ในการเจริญ ดังนั้นแม้ว่าจะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นเซลลูโลสหรือไซแลน เอ็นไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาจะมีทั้งสองกลุ่ม มีรายงานว่า crude enzyme จากจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้สามารถย่อยสลายไซแลนได้เช่นกัน เนื่องจากไซแลนเป็นสารประกอบประเภท heteropolysaccharide ที่ประกอบด้วยพอลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 linkage และมีความซับซ้อนเพราะมีหมู่แทนที่หลายชนิด เช่น acetyl, arabinosyl และ glucuronosyl residues ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ขึ้นกับแหล่งที่มาของไซแลนนั้นๆ ในการย่อยสลายสารประกอบไซแลนให้สมบูรณ์นั้น จุลินทรีย์ต่างๆ มักผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนสออกมามากกว่า 1 ชนิด เช่น Pseudomonas fluorescens ผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนส A, B, C และ D (Tomme และคณะ, 1995) Thermoanaerobacterium saccharolyticum B6A-RI ผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนสอย่างน้อย 6 ชนิด (Lee และคณะ, 1993) สาเหตุที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดผลิตไซลาเนสออกมามากกว่า 1 ชนิดนั้นเนื่องจากไซลาเนสต่างๆ ที่ จุลินทรีย์แต่ละชนิดผลิตขึ้นสามารถย่อยสลายสารประกอบไซแลนในตำแหน่งที่แตกต่างกัน (Wong และคณะ, 1998) ดังนั้นเมื่อใช้ xylanase multiplicity isoenzyme การย่อยสลายวัตถุดิบทางการเกษตรจึงเกิดง่ายขึ้น นอกจากนี้การย่อยสลายจะเกิดสมบูรณ์ยิ่งขึ้นเมื่อเอ็นไซม์สามารถยึดเกาะกับพอลีแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ (Irwin และคณะ, 1994; Ratanakhanokchai และคณะ, 1999) โดยส่วนที่ช่วยในการยึดเกาะจะเพิ่มความใกล้ชิด ระหว่างเอ็นไซม์กับสับเสตรตให้มากขึ้น มีศักยภาพในการย่อยสลายสูง สามารถพัฒนาไปใช้งานด้านเทคโนโลยี ชีวภาพได้หลายประเภท (Bajpai, 1997; Biely, 1985; Kulkani และคณะ, 1999) โดยการนำไปใช้งานเป็นการปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้สูงขึ้น เพิ่มคุณค่าทางอาหาร หรือลดปริมาณของน้ำเสียที่ปล่อยออกจากโรงงาน ซึ่งได้รับความสนใจมาก เนื่องจากเป็นสิ่งที่ได้จากธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม และไม่มีปฏิกิริยารุนแรง จึงมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้จริงในอุตสาหกรรมและให้ประโยชน์สูงสุด สำหรับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรของประเทศไทยที่มีศักยภาพสูงเป็นชีวมวลที่ได้จากกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมการเกษตร ซึ่งส่วนใหญ่มีองค์ประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลส เช่น อ้อย ข้าว น้ำมันปาล์ม มะพร้าว มันสำปะหลัง ข้าวโพด ถั่วลิสง ฝ้าย ถั่วเหลืองและข้าวฟ่าง โดยปริมาณวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรยังมีปริมาณมากที่ควรเพิ่มช่องทางในการนำไปใช้

2.8 วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส

วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรคือ ผลพลอยได้ที่สำคัญนอกเหนือจากผลผลิตการเกษตร วัสดุทางการเกษตรประกอบด้วยลิกโนเซลลูโลส ซึ่งหมายถึง ชีวมวลอินทรีย์ที่ประกอบด้วยเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสที่ประกอบด้วยไซแลน รวมทั้งมีองค์ประกอบของลิกนิน ลิกโนเซลลูโลสถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลุ่มลิกโนเซลลูเลส ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลสที่ประกอบด้วยเอนไซม์หลัก 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส (endo-1,4-β-D-

glucanase; EC 3.2.1.4) ไซลาเนส (endo-1,4-β-D-xylanase; EC 3.2.1.8) และแมนนาเนส (mannan endo-1,4- β-D-mannosidase; EC 3.2.1.78) (Gubitz *et al.*, 1997) การทำงานของเอนไซม์ทั้งสามชนิดจะย่อยสลายแบบสุ่มภายในสายโมเลกุลของโครงสร้างหลักของสารประกอบลิกโนเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น (Zakaria *et al.*, 1998)

เนื่องจากลิกโนเซลลูโลสมีส่วนประกอบที่อยู่รวมกันอย่างซับซ้อน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติจึงต้องผลิตเอ็นไซม์ทั้งกลุ่มที่เป็นไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกออกมาย่อยสลายวัสดุทางการเกษตร เพื่อนำไปใช้ในการเจริญ ดังนั้นแม้ว่าจะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นเซลลูโลสหรือไซแลน เอ็นไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาจะมีทั้งสองกลุ่ม ซึ่งในระดับอุตสาหกรรมที่ใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรจะให้ความสนใจในการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส ในกระบวนการผลิต (Kheng and Omar, 2005) เนื่องจากไซแลนเป็นสารประกอบประเภท heteropolysaccharide ที่ประกอบด้วยพอลีเมอร์ ของน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 linkage และมีความซับซ้อนเพราะมีหมู่แทนที่หลายชนิด เช่น acetyl, arabinosyl และ glucuronosyl residues ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ขึ้นกับแหล่งที่มาของไซแลนนั้นๆ

ในการย่อยสลายสารประกอบไซแลนให้สมบูรณ์นั้น จุลินทรีย์ต่างๆ มักผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนสออกมามากกว่า 1 ชนิด เช่น *Pseudomonas fluorescens* ผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนส A, B, C และ D (Tomme และคณะ, 1995) *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI ผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนสอย่างน้อย 6 ชนิด (Lee และคณะ, 1993) สาเหตุที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดผลิตไซลาเนสออกมามากกว่า 1 ชนิดนั้นเนื่องจากไซลาเนสต่างๆ ที่ จุลินทรีย์แต่ละชนิดผลิตขึ้นสามารถย่อยสลายสารประกอบไซแลนในตำแหน่งที่แตกต่างกัน (Wong และคณะ, 1998) ดังนั้นเมื่อใช้ xylanase multiplicity isoenzyme การย่อยสลายวัตถุดิบทางการเกษตรจึงเกิดง่ายขึ้น นอกจากนี้การย่อยสลายจะเกิดสมบูรณ์ยิ่งขึ้นเมื่อเอ็นไซม์สามารถยึดเกาะกับพอลีแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ (Irwin และคณะ, 1994; Ratanakhanokchai และคณะ, 1999) โดยส่วนที่ช่วยในการยึดเกาะจะเพิ่มความใกล้ชิด ระหว่างเอ็นไซม์กับสับเสตรตให้มากขึ้น มีศักยภาพในการย่อยสลายสูง สามารถพัฒนาไปใช้งานด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้หลายประเภท (Bajpai, 1997; Biely, 1985; Kulkani และคณะ, 1999) โดยการนำไปใช้งานเป็นการปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้สูงขึ้น เพิ่มคุณค่าทางอาหาร หรือลดปริมาณของน้ำเสียที่ปล่อยออกจากโรงงาน ซึ่งได้รับความสนใจมาก เนื่องจากเป็นสิ่งที่ได้จากธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม และไม่มีปฏิกิริยารุนแรง จึงมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้จริงในอุตสาหกรรม และให้ประโยชน์สูงสุด

สำหรับประเทศเกษตรกรรมอย่างประเทศไทย มีประชาชนมากกว่าร้อยละ 50 ที่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผลิตภายในประเทศ เช่น ฟางข้าว แกลบ กากอ้อย กาก ใย และทะลายปาล์ม เป็นต้น จะมีปริมาณที่แปรผันขึ้นอยู่กับปริมาณผลผลิตทางการเกษตรของประเทศ มีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นส่วนน้อย ซึ่งได้ถูกปล่อยทิ้งไว้ในพื้นที่เพาะปลูกหรือถูกเผาทิ้ง ปัจจุบันวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรภายในประเทศกระจัดกระจายอยู่ทั่วประเทศ ขึ้นอยู่กับปริมาณผลผลิตทางการเกษตรของแต่ละพื้นที่ โดยที่ผ่านมาพบว่ามีปริมาณวัสดุเหลือใช้ทางการ เกษตรมากถึง 43 ล้านตันต่อปี เทียบเท่ากับปริมาณน้ำมันดิบ 3 พันล้าน

ตัน ซึ่งมีการนำมาใช้ ประโยชน์ค่อนข้างต่ำ โดยพลังงานที่ได้จากวัสดุเหลือใช้เหล่านี้เป็นแหล่งพลังงานที่ใช้ได้ไม่มีหมด และสร้างมลพิษให้กับสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด ส่วนใหญ่เป็นวัสดุเหลือใช้ต่าง ๆ จากเกษตรกรรมและวัชพืช จากอุตสาหกรรม รวมกันแล้วมากกว่าปีละ 80 ล้าน โดยแยกออกได้ ตามประเภทของวัสดุคือ วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและวัชพืช ส่วนใหญ่ได้ต้นพืชต่างๆที่เก็บเกี่ยวผลผลิตไปแล้ว ทั้งพืชไร่ พืชสวน และนาข้าว ร่วมกันประมาณมากกว่า 36 ล้านตัน ดังนั้นจำเป็นมากที่จะต้องมีการนำผลพลอยได้และของเหลือมาใช้ประโยชน์ซึ่งจะเพิ่มมูลค่าได้มากและยังช่วยรักษา สิ่งแวดล้อมเพราะถ้าไม่นำไปใช้ประโยชน์จะเกิดขยะขึ้นจำนวนมาก วัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรม เป็นวัสดุที่ได้จากระบบอุตสาหกรรมเกษตร ได้แก่ โรงงานน้ำตาล โรงงานผลิตน้ำมันพืช โรงงานแป้งมัน โรงสีข้าว โรงงานผลไม้กระป๋อง โรงงานอาหารสัตว์ รวมทั้งอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์ ปีละประมาณ 24 ล้านตัน

2.8.1 ประเภทของวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร

วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรอาจแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ วัสดุที่ย่อยสลายง่าย กับวัสดุที่ย่อยสลายยาก โดยใช้ค่าสัดส่วนที่เป็นองค์ประกอบหลักในวัสดุเป็นเกณฑ์ คือสัดส่วนของคาร์บอนกับไนโตรเจน หรือ C/N ratio ถ้าเป็นวัสดุที่ย่อยสลายง่าย เป็นวัสดุประเภทที่มี สัดส่วนต่ำกว่า 100:1 และวัสดุที่ย่อยสลายยาก เป็นวัสดุประเภทที่มี สัดส่วนสูงกว่า 100:1 ความแตกต่างกันของวัสดุทั้งสองประเภท คือค่าเฉลี่ยไนโตรเจนและคาร์บอน วัสดุที่ย่อยสลายง่าย นอกจากมีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบเฉลี่ยน้อยกว่าวัสดุที่ย่อยสลายมาก แล้วยังมีค่าเฉลี่ยของไนโตรเจนมากกว่าอีกด้วย การที่วัสดุย่อยสลายยากมีปริมาณคาร์บอนอยู่สูง อาจเป็นเพราะมีส่วนที่เป็นเยื่อใยแข็งเป็นองค์ประกอบในเนื้อเยื่อพืชมากกว่า ผลที่ตามมาคือ ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้ช้าลง เพราะโครงสร้างสารประกอบเหล่านี้ซับซ้อนมาก การสลายตัวให้เป็นชิ้นเล็กลง จำเป็นต้องใช้พลังงานจากจุลินทรีย์ในการเพิ่มการใช้ไนโตรเจนสำหรับเพิ่มจำนวนประชากรให้มีกิจกรรมมากขึ้น

โดยเฉพาะภาคใต้ของไทยที่มีแนวโน้มของการขยายตัวของพื้นที่ปลูกน้ำมันปาล์ม มีพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องจาก 1.5 ล้านไร่ในปี พ.ศ. 2541 เป็น 4.1 ล้านไร่ ในปี พ.ศ.2553 โดยเพิ่มความต้องการน้ำมันปาล์มเพื่อประกอบอาหารทั้งในประเทศและในตลาดโลกก็ยังเติบโตอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากปาล์มให้ผลผลิตน้ำมันมากกว่าพืชน้ำมันอื่นๆ เช่น ถั่วเหลือง มะพร้าว ละหุ่งงา และดอกทานตะวัน เมื่อใช้พื้นที่ปลูกเท่ากันจึงมีต้นทุนต่ำกว่า สามารถแข่งขันกับน้ำมันชนิดอื่นได้ในตลาดโลก ประกอบกับรัฐมีนโยบายสนับสนุนให้มีการใช้น้ำมันปาล์มส่วนเกินจากความต้องการของตลาดอาหารในประเทศไปผลิตเป็นไบโอดีเซลผสมในน้ำมันดีเซล เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับยานพาหนะอีกด้วย ดังนั้นความต้องการน้ำมันปาล์มในประเทศจึงอยู่ในระดับสูงอย่างต่อเนื่อง

2.8.2 วัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ปาล์มน้ำมัน เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เติบโตได้ดีในภาคใต้ของประเทศ ปลูกมากที่สุดที่จังหวัดกระบี่ 537,637 ไร่ สุราษฎร์ธานี 405,213 ไร่ ชุมพร 216,798 ไร่ (มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 2550) เนื่องจากผลตอบแทนของปาล์มให้มากกว่ายางพารา จึงเป็นแรงจูงใจให้เกษตรกรขยายพื้นที่ปลูก และเมื่อมีปริมาณปาล์มดิบส่งเข้าโรงงานเพื่อสกัดเป็นน้ำมันปาล์มมากขึ้น ส่งผลให้มีวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มออกมามาก เช่น น้ำทิ้ ง กากตะกอน เส้นใย ทะลายปาลม์ เปล่า และขี้เถ้าอุตสาหกรรมปาลม์ น้ำมันมีวัสดุเศษดุเศษเหลือที่เป็นมวล ชีวภาพประเภทลิกโนเซลลูโลสจำนวนมากเช่น เส้นใยปาล์ม กะลาปาล์ม ทะลายปาล์ม เปล่าคิดเป็นปริมาณ 9.66 5.20และ 17.08 ล้านตันต่อปีตามลำดับ จากการศึกษาองค์ประกอบของชีวมวลจากส่วนต่างๆ พบว่า มีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส ร้อยละ 40-50 เฮมิเซลลูโลส ร้อยละ 20-35 และลิกนินร้อยละ 16-29 ซึ่ง อุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันมีมวลชีวภาพที่ไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์สูงถึงร้อยละ 80 และมีองค์ประกอบที่มีศักยภาพใน การผลิตก๊าซชีวภาพ (Gutierrez *et al.*, 2009) นอกจากนี้ วัสดุส่วนอื่นของปาล์มน้ำมันที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อีก มีดังนี้ 1. ทางใบ นำมาใช้ในการลดการไหลบ่าของน้ำ 2. ทะลายเปล่า ใช้เป็นวัสดุเพาะเห็ดต่าง และ คลุมดินรักษาความชื้นใน ดินให้เหมาะสม 3. ขี้เถ้าจากการเผาทะลายเปล่าปาล์ม มีธาตุ อาหารเช่น โพแทสเซียมไดออกไซด์ 4. ของเสียกากโรงงานที่ผ่านการกำจัดแล้ว มี ธาตุอาหารเช่น ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม เหล็ก และโบรอน เป็นต้น 5. เส้นใย นำไปเลี้ยงสัตว์ ทำเชื้อเพลง 6. กะลา นำส่วนที่ไม่มีเมล็ดไปเผาทำเชื้อเพลิงได้ 7. ใบและลำต้น นำมาใช้ทำเฟอร์นิเจอร์ได้ 8. สกัดวิตามินอี

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมี

- สูตรอาหารสำเร็จ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato dextrose agar (PDA) และสูตร Cezapex Dox Broth (CDB)

- สับสเตรททดแทนแหล่งคาร์บอนได้แก่ carboxymethyl cellulose (CMC) และ oat spelt xylan

- สารเคมีสำหรับเตรียม Basal salts medium ได้แก่ $(NH_4)_2$ SO_4 KH_2PO_4 (anhydrous) $K_2HPO_4.3H_2O$ $MgSO_4.7H_2O$ น้ำกลั่น และผงวุ้น Agar (Difco)

- สารเคมีสำหรับทดสอบเอนไซม์ ได้แก่ Tris-HCl

3.1.2 เครื่องมือ

- เครื่องมือสำหรับเลี้ยงเชื้อ และตรวจนับสปอร์เชื้อรา ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ เข็มเขี่ย แท่งแก้วสามเหลี่ยม Hemocytometer บิกเกอร์ cork borer ขวดรูปชมพู่ หม้อนึ่งความดัน แอลกอฮอล์ 70% Tween 80® จานแก้ว (petri dish) เครื่องเขย่า อ่างควบคุมอุณหภูมิ

3.1.3 เชื้อราฆ่าแมลง

เชื้อราฆ่าแมลงจำนวน 10 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Metarhizium anisopliae* จำนวน 5 สายพันธุ์ (M8 M3 M6 M33 และ MNCBRC) และ *Beauveria bassiana* จำนวน 5 สายพันธุ์ (BPMC B14532 B14841 B16041 และ BNBCRC) โดย *M. anisopliae* M6 และ *B. bassiana* BPMC ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์บริหารศัตรูพืช จังหวัดสงขลา *B. bassiana* B14532 B14841 และ B16041 ได้รับซื้อจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำหรับเชื้อ *M. anisopliae* MNCBRC และ *B. bassiana* BNBCRC ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ กรุงเทพมหานคร และสำหรับเชื้อ *M. anisopliae* MNCBRC M8 M3 และ M6 ได้รับความอนุเคราะห์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นริศ ท้าวจันทร์ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เก็บรักษาเชื้อราที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในอาหารวุ้นเอียง PDA slant โดยมีการถ่ายเชื้อใหม่ทุกครั้งก่อนนำไปทดลอง (Pham *et al.*, 2009; Soundarapandian and Chandra, 2007)

3.2 วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ในการดำเนินการทดลองโดยการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับรายละเอียดการวิจัยแบ่งเป็นกิจกรรมดังต่อไปนี้

3.2.1 กิจกรรมที่ 1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

กิจกรรมที่ 1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ ดังนี้ สูตรอาหาร Potato dextrose agar (PDA) สูตรอาหาร Cezapex Dox Broth (CDB) ที่ผสมด้วย carboxymethyl cellulose (CMC) หรือ oat spelt xylan ที่ความเข้มข้น 1% (w/v) สำหรับใช้เป็นอาหารเตรียมกล้าเชื้อ และสูตรอาหาร Basal salts medium ที่ผสมด้วย CMC หรือ oat spelt xylan ที่ความเข้มข้น 1% (w/v) สำหรับใช้ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส โดยสูตรอาหารต่าง ๆ จะต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที และรอจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นถึงระดับอุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.2.2 กิจกรรมที่ 2 การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการทดสอบการเจริญบนวัสดุเศษเหลือ

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* จำนวน 10 สายพันธุ์ บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 7 วัน สำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น (Petlamul and Prasertsan, 2012) ซึ่งสภาวะดังกล่าวมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรากลุ่มนี้ โดยเชื้อราสามารถสร้างเส้นใย และสปอร์

3.2.3 กิจกรรมที่ 3 การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ ไซลาเนส

จากกิจกรรมที่ 2 มาเจาะบริเวณปลายเส้นใยด้วย cork borer ที่มี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร จากนั้นเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CDB (สูตรอาหารนี้มีองค์ประกอบของแร่ธาตุที่เชื้อราสามารถใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโตได้ เชื้อสามารถเจริญเป็นเส้นใยและมีการสร้างสปอร์ในสภาวะอาหารเหลว ทำให้สามารถเก็บเกี่ยวสปอร์ของเชื้อราดังกล่าวได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อราสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CDB ได้ อาจเนื่องมาจาก อาหารสูตรนี้) โดยเลี้ยงในปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จนกระทั่งได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์

3.2.4 กิจกรรมที่ 4 การวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ ไซลาเนส

การวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* โดยเตรียมอาหาร Basal salts medium ที่มีค่า pH 7.2 (กิจกรรมที่ 1) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร มาเติมกล้าเชื้อ (กิจกรรมที่ 3) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 0-192 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที นำ crude เอนไซม์ที่ได้ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร บ่มกับ CMC 1% (w/v) ที่ละลายใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 8.0) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาในอ่างน้ำร้อน 10 นาที และแช่ในน้ำเย็นทันที จากนั้นทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส โดยตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ตามวิธีของ Nelson (1944) ซึ่งใช้กลูโคสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน

สำหรับการทดสอบหากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ดำเนินการภายใต้สภาวะเดียวกับการตรวจสอบกิจกรรมของเซลลูโลส แต่ใช้ oat spelt xylan เป็นสับสเตรทแทน CMC และใช้ไซโลสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน สำหรับ 1 ยูนิตของเซลลูเลสหรือไซลาเนส หมายถึง ปริมาณเอ็นไซม์ที่ย่อยสลาย CMC หรือ oat spelt xylan ให้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการ เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดจะถูกคัดเลือกไปศึกษาต่อเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในกิจกรรมที่ 5

3.2.5 กิจกรรมที่ 5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ pH และอุณหภูมิ ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ pH และอุณหภูมิ ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *M. anisopliae* ที่คัดเลือกได้จากกิจกรรมที่ 4 และที่ระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด โดยประยุกต์ใช้วิธีทางสถิติพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) ในการวางแผนการทดลอง เนื่องจากสามารถใช้หาระดับของปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด จากการสร้างของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (ระดับของปัจจัย) กับตัวแปรตอบสนอง (response) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบถดถอย (regression) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมของระดับในแต่ละปัจจัยที่สนใจ จากพื้นฐานของ 2^k แฟกทอเรียล โดยนำ Central composite rotatable design (CCD) มาใช้ในการเพิ่มการทดลองในแนวแกนและที่จุดศูนย์กลาง เพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสสูงสุด ดังนั้นตัวแปรตามในการทดลองในแต่สภาวะการศึกษาเอนไซม์ ใช้การทดลองทั้งสิ้น 11 การทดลอง โดยศึกษาค่าต่ำสุดและสูงสุดของแต่ละปัจจัย (ตารางที่ 2) ที่เป็นตัวเป็นตัวแปรต้นจำนวน 2 ตัวแปร ได้แก่ pH อยู่ในช่วง 4 – 9 และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 30 – 80 องศาเซลเซียส โดยความสัมพันธ์ระหว่าง ตัวแปรเดิมกับตัวแปรเข้ารหัส (สมการที่ 1) หลังจากทำการทดลองตามที่ออกแบบไว้ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ (Design Expert Version 5.0 version)

$$\text{ตัวแปรเข้ารหัส} = \frac{\text{ตัวแปรเดิม} - (\text{ระดับสูง} + \text{ระดับต่ำ})/2}{(\text{ระดับสูง} - \text{ระดับต่ำ})/2} \quad (1)$$

ตารางที่ 2 สภาวะและรหัสที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส

ตัวแปรอิสระ	สัญลักษณ์	ค่ารหัส		
		-1	0	+1
ค่า pH	X_1	4.00	6.50	9.00
อุณหภูมิ ($^{\circ}$C)	X_2	30.00	55.00	80.00

3.2.6 กิจกรรมที่ 6 การศึกษาการเลี้ยงเชื้อราฆ่าแมลงบนวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร

การศึกษาการเลี้ยงเชื้อราฆ่าแมลงบนวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร โดยการนำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากกิจกรรมที่ 5 ที่พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดมาทดสอบการเจริญและการการสร้างสปอร์บนอาหาร selective media ที่ใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาเป็นแหล่งคาร์บอน โดยวัสดุเศษเหลือที่ได้จากโรงงาน

สกัดน้ำมันปาล์มได้แก่ กากตะกอนดีแคนเตอร์ กากตะกอนหลังผลิตก๊าซชีวภาพ ต้นปาล์ม ทะลายปาล์มเปล่า และกากปาล์ม หลังจากเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรต่าง ๆ และนึ่งฆ่าเชื้ออาหารแล้ว รอจนกระทั่งอาหารเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อราที่คัดเลือกได้และเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จนมีอายุ 7 วัน จากกิจกรรมที่ 2 มาเจาะบริเวณปลายเส้นใยด้วย cork borer ที่มี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วยวัสดุเศษเหลือแต่ละชนิด วัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราทุกวันที่ 3 5 7 9 11 13 และ 15 จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นของสปอร์ในวันที่ 15 หลังจากบ่มเชื้อ

3.2.7 กิจกรรมที่ 7 รวบรวมผลการทดลอง

บันทึกผล และข้อมูลต่าง ๆ ในการดำเนินงานตลอดระยะเวลาที่ศึกษา โดยนักวิจัย นำผลการศึกษาไปวิเคราะห์ สรุปผล และทำรายงานฉบับสมบูรณ์

สรุประยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (ระบุอย่างละเอียด)

ตารางที่ 3 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

รายการ	เดือนที่											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
กิจกรรมที่ 1 เตรียมวัสดุอุปกรณ์ สารเคมีในการทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ												
กิจกรรมที่ 2 เตรียมกล้าเชื้อ และเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* ในห้องปฏิบัติการ												
กิจกรรมที่ 3 วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส ของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *M. anisopliae*												
กิจกรรมที่ 4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ pH และอุณหภูมิ ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *M. anisopliae* โดยประยุกต์ใช้วิธีทางสถิติพื้นผิวตอบสนอง												
กิจกรรมที่ 5 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อราฆ่าแมลงบนวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรจากเชื้อราที่คัดเลือกได้ในกิจกรรมที่ 3												
กิจกรรมที่ 6 บันทึกผล รายละเอียด ในการดำเนินงานตลอดระยะเวลาที่ศึกษา นำผลการศึกษาไปวิเคราะห์ สรุปผล และทำรายงานฉบับสมบูรณ์												

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล/ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ลักษณะขององค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

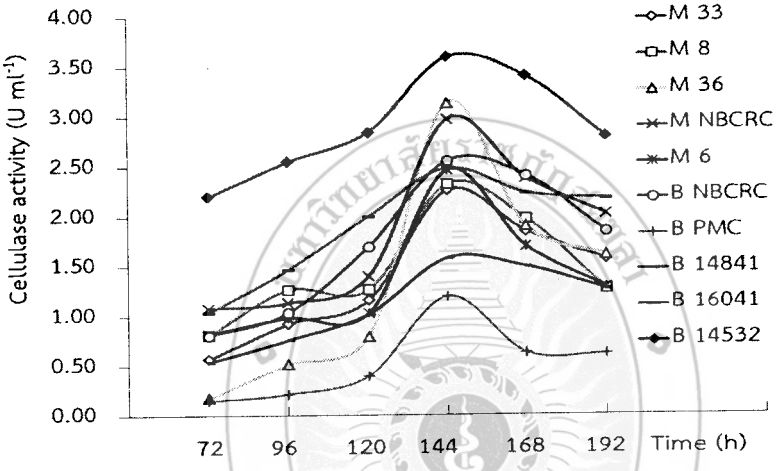
จากผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มประกอบด้วย กากตะกอนดีแคนเตอร์ (DC) น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (POME) ทะลายปาล์มเปล่า (EFB) ทางปาล์ม (OPF) ลำต้นปาล์ม (OPT) และกากปาล์ม (OPM) พบว่า วัสดุทั้งหมดมีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบในปริมาณ 5.80 - 47.00% ปริมาณเส้นใยอยู่ในช่วง 10.5 – 70.10% ลิกนินอยู่ในช่วง 0.34 – 20.50% ไนโตรเจนอยู่ในช่วง 0.05 – 3.61% ฟอสฟอรัสอยู่ในช่วง 0.02 – 0.41% โพแทสเซียมอยู่ในช่วง 0.36 – 1.73% โซเดียมอยู่ในช่วง 0.01 – 0.04% แมกนีเซียมอยู่ในช่วง 0.05 – 0.79% กลูโคสอยู่ในช่วง 1.01 – 12.06 g/L และไซโลสอยู่ในช่วง 0.11 – 6.80 g/L ดังนั้นจากผลการศึกษาองค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือ ชี้ให้เห็นว่า วัสดุเศษเหลือดังกล่าวมีศักยภาพในการใช้เป็นซับสเตรทในการเจริญของเชื้อราบิวเวอเรีย และเชื้อราเมตาไรเซียมเนื่องจากมีองค์ประกอบของคาร์บอน ไนโตรเจน กลูโคส และไซโลสซึ่งเป็นสารอาหารสำคัญต่อการเจริญ รวมทั้งสารอาหารรองได้แก่ โซเดียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โพแทสเซียม โดยองค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	กากตะกอนดีแคนเตอร์	น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	ทะลายปาล์มเปล่า	ทางปาล์ม	ลำต้นปาล์ม	กากปาล์ม
คาร์บอน (%)	47.00	46.76±0.40	45.00±0.00	5.8±0.13	6.9±0.13	36.06±0.04
เส้นใย (%)	14.08±0.21	10.5±0.28	70.10±0.08	70.02±0.01	70.00±0.1	35.09±0.06
ลิกนิน (%)	12.24±0.00	13.58±0.10	20.5±1.29	16.0 ±1.26	15.32±2.2	0.34±0.00
ไนโตรเจน (%)	2.27±0.00	2.17±0.00	1.1±0.02	0.05±0.00	0.25±0.01	3.61±0.13
ฟอสฟอรัส (%)	0.33±0.03	0.41±0.00	0.37±0.03	0.02±0.00	0.06±0.01	1.58±0.09
โพแทสเซียม (%)	0.85±0.10	1.72±0.10	1.73±0.04	0.36±0.05	0.40±0.01	1.72±0.10
โซเดียม (%)	0.02±0.00	0.04±0.00	0.02±0.00	0.04±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00
แมกนีเซียม (%)	0.48±0.00	0.52±0.00	0.07±0.00	0.27±0.00	0.05±0.00	0.79±0.00
กลูโคส (g/L)	1.01±1.40	2.07±1.40	1.95±0.11	5.31±0.96	12.06±1.2	1.79±0.09
ไซโลส (g/L)	0.26±0.00	0.64±0.00	6.80±0.03	6.50±0.34	1.15±0.8	0.11±0.00

4.2 การวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae*

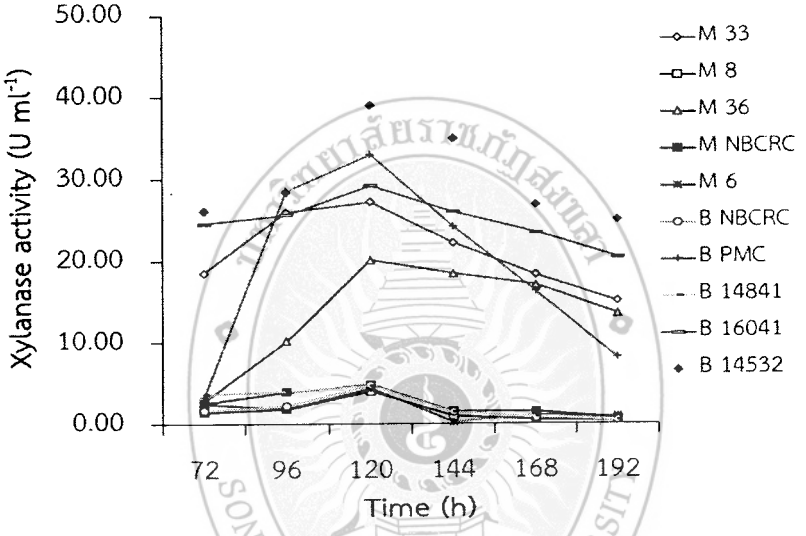
จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* ทั้ง 10 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อราทั้งหมดสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสได้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อราทั้ง 2 ชนิด เพิ่มสูงสุดเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา144 ชั่วโมง (ภาพที่ 4) ขณะที่เอนไซม์ไซลาเนส ให้เอนไซม์เพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และเพิ่มสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง (ภาพที่ 5) นอกจากนี้ ปริมาณเอนไซม์ทั้งสองชนิดพบสูงสุดจากเชื้อรา *B. bassiana*



ภาพที่ 4 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (BNBCRC, BPMC, B14841, B16041 and B14532) และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin M33, M8, M36, M6 and MNBCRC หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72-192 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่า เชื้อรา *B. bassiana* ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในช่วง 0.22-3.59 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ขณะที่เชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในช่วง 0.52-3.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อรา *B. bassiana* B14532 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 3.59 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดหลังจากบ่มเชื้อราเป็นเวลา 144 ชั่วโมง จากนั้นการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราทุกสายพันธุ์ลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าเชื้อรา *B. bassiana* ใช้ระยะเวลา 144 ชั่วโมง ในการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด ขณะที่ตามรายงานของ Leopold and Samšiňáková (1970) พบว่า เชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดเมื่อเชื้อเจริญและมีอายุ 4-5 วัน หรือ 96-120 ชั่วโมง ทั้งนี้

เมื่อพิจารณาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (ภาพที่ 5) พบว่า โดยส่วนใหญ่เชื้อรา *B. bassiana* สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (0.45-39.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ได้สูงกว่า เชื้อรา *M. anisopliae* (0.23-27.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) โดยเฉพาะเชื้อรา *B. bassiana* B14532 พบว่า สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดถึง 39.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ เชื้อรา *B. bassiana* BPMC สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ 33.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เชื้อราโดยส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดหลังจากบ่มเชื้อราเป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นการผลิตเอนไซม์ลดลงอย่างต่อเนื่อง จากผลการทดลองข้างต้น ชี้ให้เห็นว่าเชื้อรา *B. bassiana* B14532 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุด ดังนั้นเชื้อราชนิดนี้จึงถูกคัดเลือกเพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส ตามลำดับ



ภาพที่ 5 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (BNBCRC, BPMC, B14841, B16041 and B14532) และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin M33, M8, M36, M6 and MNBCRC หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72-192 ชั่วโมง

จากผลการทดลอง เป็นไปตามผลการวิจัยของ Kluczek (2007) ที่รายงานว่า เชื้อราฆ่าแมลงมีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุที่มีองค์ประกอบของลิกนิน เช่น เนื้อไม้ ฟางข้าว เป็นต้น และสำหรับเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* พบว่า สามารถเจริญได้ในฟางข้าว ข้าว ข้าวฟ่าง ขี้เลื่อย เนื่องจากวัสดุดังกล่าวถือเป็นแหล่งคาร์บอนที่เป็นแหล่งชับเสตรทในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส (Kaur *et al.*, 2007)

4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิ และ pH ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *B. bassiana* B14532

นำเชื้อราจากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิ และ pH ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *B. bassiana* B14532 พบว่า ที่อุณหภูมิ 43.37 - 56.50 องศา

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

เซลเซียส และค่า pH ที่ 6.20 - 6.88 เชื้อราทั้ง 2 กลุ่ม สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในช่วง 2.84 - 5.01 ยูนิตต่อมิลิลิตร ขณะที่อุณหภูมิ 38.65 - 46.50 องศาเซลเซียส และค่า pH ที่ 4.8 – 5.0 เชื้อราทั้ง 2 กลุ่ม สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในช่วง 33.95 - 41.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส ในอาหาร basal salt ที่เติม xylan และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการประยุกต์ใช้วิธีทางสถิติพื้นผิวตอบสนองแล้วให้ค่า พารามิเตอร์ ที่ส่งผลต่อการทดลอง ดังตารางที่ 5 สำหรับสมการทางคณิตศาสตร์ที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (สมการที่ 2) และเอนไซม์ไซลาเนส (สมการที่ 3)

$$Y = 38.66 - 10.36X1 - 2.63X2 - 0.51X1X2 - 9.11X\frac{2}{1} - 2.30X\frac{2}{2} \quad (2)$$

$$Y = 2.95 - 0.16X1 + 0.47X2 + 0.19X1X2 - 0.91X\frac{2}{1} + 0.56X\frac{2}{2} \quad (3)$$

ตารางที่ 5 ผลการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง

Run	Code levels		Cellulase activity (U ml^{-1})		Xylanase activity (U ml^{-1})	
	X1	X2	Actual value	Predicted value	Actual value	Predicted value
1	9.0	80.00	3.19	3.10	15.31	13.75
2	6.5	55.00	2.79	2.95	39.21	38.65
3	9.0	55.00	1.66	1.88	17.97	19.19
4	4.0	55.00	2.17	2.19	37.45	39.90
5	6.5	30.00	2.89	3.04	39.05	38.98
6	6.5	80.00	3.89	3.98	29.98	33.72
7	4.0	30.00	2.49	2.47	39.99	39.72
8	6.5	55.00	3.37	2.95	39.41	38.65
9	6.5	55.00	2.93	2.95	41.01	38.65
10	4.0	80.00	3.03	3.03	37.66	35.48
11	9.0	30.00	1.89	1.77	19.69	20.03

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่า ผลการประมวลผลของโปรแกรมจากการเปลี่ยนแปลงตัวแปรอิสระทั้ง 2 ตัวแปร ได้ค่าเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสที่แตกต่างกัน โดยที่ค่า pH 6.5 และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* B14532 ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด เท่ากับ 3.89 มิลลิยูนิตต่อมิลิลิตร เมื่อนำข้อมูลจากแผนการทดลองที่ได้ มาใช้ในการสร้างสมการถดถอยกำลังสอง

ว
579.5
ก27

18 ส.ค. 2561

(second order regression analysis) ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอุณหภูมิ และค่า pH ที่มีผลต่อค่าเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $p < 0.01$

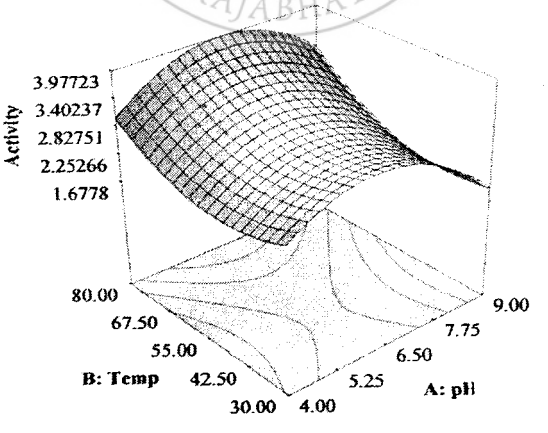
ตารางที่ 6 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติพื้นผิวตอบสนอง

Coefficient	Cellulase		Xylanase	
	Coefficient	*p*-value	Coefficient	*p*-value
Intercept	2.95	0.0066	38.66	0.0012
pH	-0.16	0.1792	-10.36	0.0002*
pH^2	-0.91	0.0020*	-9.11	0.0028*
T	0.47	0.0054*	-2.63	0.0599
T^2	0.56	0.0158**	-2.30	0.2266
TpH	0.19	0.1758	-0.51	0.7158
R^2	0.96		0.93	

* แสดงค่าความเชื่อมั่นที่ระดับ 95%

** แสดงค่าความเชื่อมั่นที่ระดับ 95%

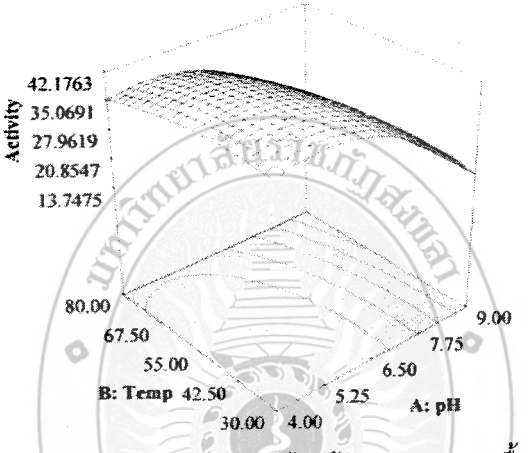
จากตารางที่ 6 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า โดยส่วนใหญ่ผลการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสของเชื้อราขึ้นอยู่กับปัจจัยด้าน pH โดยสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.01$ เท่ากับ 0.96 และ 0.93 สำหรับเอนไซม์ไซลาเนส และเอนไซม์เซลลูเลส ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และอุณหภูมิต่อการผลิตผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แสดงได้ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ผลของค่า pH และอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Beauveria bassiana* B14532

จากภาพที่ 6 แสดงรูปกราฟสามมิติ ที่ได้จากโปรแกรมการสร้างสมการถดถอยกำลังสอง และทำการประมวลผลหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยจากรูปชี้ให้เห็นว่า เชื้อราจะสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงเมื่อมีค่า pH ที่ระดับเหมาะสมในช่วง 5-7 แต่การผลิตเอนไซม์ชนิดนี้จะลดลงเมื่อบ่มเชื้อในสภาวะที่มีอุณหภูมิลดลง ซึ่งจากการรายงานของ Mandels และ Weber (1969) พบว่า เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้ดีได้ในช่วง pH 4.8-8.0 และจากการทดลองนี้ พบว่า pH 6.5 ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ของเชื้อรา *B. bassiana* B14532 อยู่ในช่วงกล่าว

สำหรับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส แสดงได้ดังภาพที่ 7



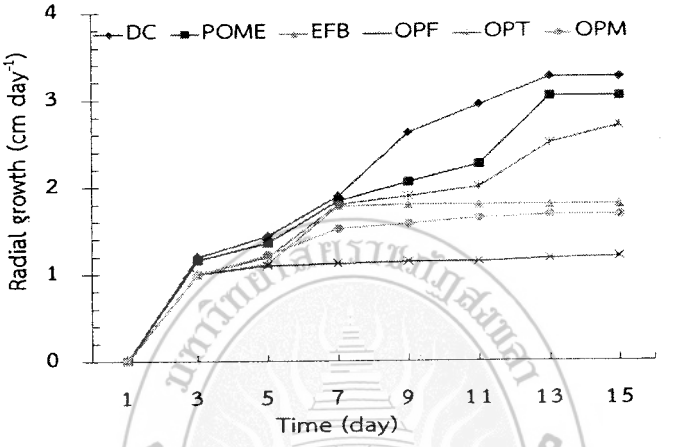
ภาพที่ 7 ผลของค่า pH และอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* B14532

จากภาพที่ 7 แสดงรูปกราฟสามมิติ ที่ได้จากโปรแกรมการสร้างสมการถดถอยกำลังสอง และทำการประมวลผลหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า เชื้อราจะสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงสุดเท่ากับ 41.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีค่า pH เท่ากับ 6.5 และระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส แต่การผลิตเอนไซม์ชนิดนี้จะลดลงเมื่อบ่มเชื้อในสภาวะที่มีค่า pH สูงขึ้น ซึ่งจากการรายงานของ Mawadza และคณะ (2000) ที่รายงานว่า เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในช่วง pH กว้าง และผลิตได้ดีในช่วง pH 5-10 (Nath and Rao, 2001) และจากการทดลองนี้ พบว่า pH 6.5 ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเลส ของเชื้อรา *B. bassiana* B14532 อยู่ในช่วง 5-10

4.4 การเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* B14532

4.4.1 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *B. bassiana* B14532

การทดสอบการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* B14532 บนวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้แก่ กากตะกอนดีแคนเตอร์ น้ำทิ้งหลังสกัดน้ำมันปาล์ม ทะลายปาล์มเปล่า ลำต้นปาล์ม ทางปาล์ม และกากปาล์ม พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* B14532 สามารถเจริญได้บนวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทุกชนิด แต่สามารถเจริญได้แตกต่างกัน (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อรา *Beauveria bassiana* B15432 บนวัสดุเศษเหลือโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ได้แก่ DC: กากตะกอนดีแคนเตอร์ POME: น้ำทิ้งหลังสกัดน้ำมันปาล์ม EFB: ทะลายปาล์มเปล่า OPT: ลำต้นปาล์ม OPF: ทางปาล์ม OPM: กากปาล์ม

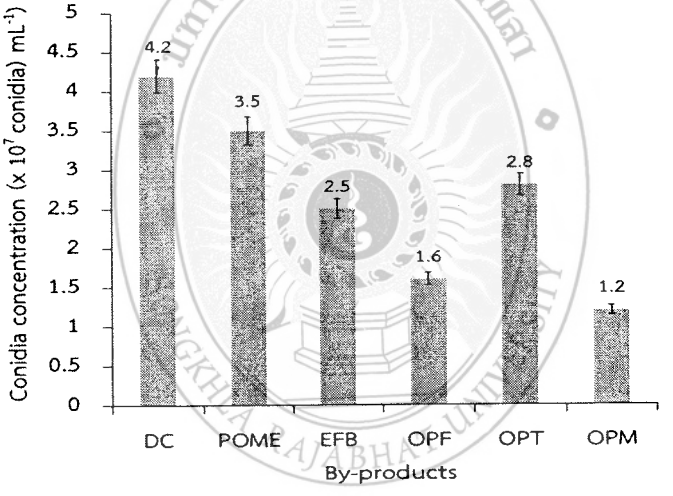
จากภาพที่ 8 พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* B14532 และ B16041 สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนกากตะกอนดีแคนเตอร์หลังบ่มเชื้อเป็นเวลา 7-15 วัน ซึ่งจากการวัดการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* B14532 พบว่าอยู่ในช่วง 1.90-3.26 เซนติเมตรต่อวัน รองลงมาคือ น้ำทิ้งหลังสกัดน้ำมันปาล์ม (1.84-3.04 เซนติเมตรต่อวัน) ลำต้นปาล์ม (1.80-2.70 เซนติเมตรต่อวัน) ทะลายปาล์มเปล่า (1.78-1.80 เซนติเมตรต่อวัน) กากปาล์ม (1.52-1.68 เซนติเมตรต่อวัน) และทางปาล์ม (1.12-1.20 เซนติเมตรต่อวัน) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์ของเชื้อ และความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเศษเหลือแต่ละชนิด (ตารางที่ 4)

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* B14532 ในช่วง 7-15 วัน พบการเจริญในระดับที่ใกล้เคียงกันค่อนข้างชัดเจน โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือกลุ่มที่เลี้ยงด้วยกากตะกอนดีแคนเตอร์ น้ำทิ้งหลังสกัดน้ำมันปาล์ม และลำต้นปาล์ม และอีกกลุ่มคือกลุ่มที่เลี้ยงด้วยทะลายปาล์มเปล่า กากปาล์ม และทางปาล์ม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวัสดุเศษเหลือในกลุ่มแรกมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรามากกว่า กลุ่มที่สอง โดยเมื่อพิจารณาความสมดุลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) มีค่าเท่ากับ

20.70 21.55 และ 27.6 ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มที่สองมีค่าเท่ากับ 40.79 9.98 และ 116 ตามลำดับ ซึ่งค่า C/N ขึ้นอยู่กับปริมาณไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบในสารอาหารนั้น ๆ ซึ่งหากมีปริมาณไนโตรเจนสูง ค่า C/N จะมีค่าต่ำ และจากผลการทดลองเป็นที่น่าสังเกตว่า เชื้อรา *B. bassiana* B14532 สามารถเจริญได้น้อยในสารอาหารที่มี C/N ต่ำหรือสูงมากเกินไปดังเช่นกากปาล์ม และทางปาล์ม ที่มีค่า C/N 9.98 และ 116 ตามลำดับ ขณะที่ค่า C/N ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* B14532 มีค่าอยู่ในช่วง 20.00-28.00

4.4.2 การสร้างโคนิเดียของเชื้อรา *B. bassiana* B14532

หลังจากวัดการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* B14532 เป็นเวลา 15 วัน และดำเนินการวัดความเข้มข้นของโคนิเดีย พบว่า *B. bassiana* B14532 ผลิตโคนิเดียได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงบนกากตะกอนดีแคนเตอร์เท่ากับ 4.2 x 10^7 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ตามลำดับขณะที่ทางปาล์มพบความเข้มข้นของโคนิเดียน้อยที่สุดเท่ากับ 1.20 x 10^7 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 การสร้างโคนิเดียของเชื้อรา *Beauveria bassiana* B15432 บนวัสดุเศษเหลือโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ได้แก่ DC: กากตะกอนดีแคนเตอร์ POME: น้ำทิ้งหลังสกัดน้ำมันปาล์ม EFB: ทะลายปาล์มเปล่า OPT: ลำต้นปาล์ม OPF: ทางปาล์ม OPM: กากปาล์ม

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า เชื้อรา *B. bassiana* สามารถเจริญและสร้างโคนิเดียบนวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรได้ โดยวัสดุเศษเหลือที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไนโตรเจน และธาตุอาหารรองอื่น ๆ โดยเฉพาะเซลลูโลส และไซแลน ที่การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า เชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส เพื่อใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลส และไซแลน อย่างไรก็ตาม ลักษณะการเจริญและการสร้างโคนิเดียของเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเชื้อ และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญทั้งทางกายภาพ และชีวภาพ

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า เชื้อราฆ่าแมลงที่มีประโยชน์ในทางการเกษตร ในด้านการจัดการศัตรูพืชแบบชีววิธี สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณโดยนำวัสดุเศษเหลือทางทางการเกษตรมาเป็นทางเลือกหนึ่งในการเป็นวัตถุดิบในการผลิต โดยจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า เชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส และไซลาเนส ที่ช่วยย่อยสลายวัตถุดิบที่มีเซลลูโลส และลิกนิน โดยความสามารถในการผลิตเอนไซม์ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน ซึ่งจากการทดลองนี้เห็นได้ว่า เชื้อรา *B. bassiana* สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าเชื้อรา *M. anisopliae* นอกจากนี้เมื่อทดสอบเลี้ยงเชื้อราบนวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร พบว่า เชื้อราทั้งสองชนิดสามารถเจริญและสร้างโคนิเดียได้ อย่างไรก็ตาม สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ การเจริญ และการสร้างสปอร์ของเชื้อรา ควรมีการศึกษาการเตรียมวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรในการเตรียมเป็นซับเสตรทสำหรับการทดสอบหากิจกรรมเอนไซม์ แทนการใช้อาหารสังเคราะห์ เพื่อผลการวิเคราะห์เอนไซม์จากการเลี้ยงบนวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

เอกสารอ้างอิง

งานวิจัยการผลิตเอทานอลจากกากของเสียการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร. 2548. เอนไซม์เซลลูเลส(ออนไลน์). สืบค้นจาก : https://www.google.co.th/#sclient=psy-ab&q. (20 มกราคม 2559).

ดุษณี ธนะบริพัฒน์ อรไท สุขเจริญ และวิบูลย์ศรี เรืองทวีสิน. 2549. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ในอาหารแข็ง รายงานการวิจัยโครงการ BPT (2549) 64-73.

ธีระพงศ์ จันทรนิยม และ อัจฉรา เพ็งหนู. 2557. การผลิตปุ๋ยหมักจากวัสดุเศษเหลือในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เบญจวรรณ ชิตมณี. 2534. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยเชื้อราที่แยกได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปรางประไพ รอดบำเรอ. 2546. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขแลน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

มหาวิทยาลัยรามคำแหง. (2550). การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันในประเทศไทย. สืบค้น เมื่อ 22 พฤศจิกายน 2555, จาก http://www.trang.ru.ac.th/LO/lo.1html

สุหฤทธา เต่งแก้ว และดาวัลย์ วิวรรธนะเดช. 2557. การศึกษาแหล่งผลิตและศักยภาพผลผลิตชีวมวลจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย. วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์. 6: 102-111.

สันทัศน์ สินจรูญศักดิ์. 2554. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนสโดยดเชื้อ *Bacillus subtilis* และการใช้ประโยชน์ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรยามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Augustyniuk-Kram, A. and Kram, K. J. 2012. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (Review) forest ecosystems - more than just trees, Dr Juan A. Blanco (Ed.), ISBN: 978-953-51-0202-1.

Basal, N., Tewari, R., Gupta, J. K., Soni, R., and Soni, S. K., 2011. A Novel Strain of *Aspergillus niger* Producing a Cocktail of Hydrolytic Depolymerising Enzymes for the Production of Second Generation Biofuels. Bioresources. 6: 552-569.

Carnimal, G. 1985. Kinetic modeling of the enzymatic hydrolysis of pretreated cellulose. Biotechnol Bioeng. 27: 1282-1290.

Chahal, S. D. 1984. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. Apply Environ Microbiol. 49: 205-210.

Coral, G., Burhan, A. and Hatice, G. 2002. Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 Wild-Type Strain. Turkish J. of Biol. 26: 209-213.

Coughlan, M. and Hazlewood, G. P. 1993. β-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry,

molecular biology and applications. Biotechnol Appl Bioc. 17 : 259-289.

Fernandez, S., Groden, E., Vandenberg, J. D. and Furlong, M. J. 2001. The effect of mode of exposure to *Beauveria bassiana* on conidia acquisition and host mortality of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. J Invertebr Pathol. 77: 217-226.

Goulart, A. J., Carmona, E. C. and Monti, R. 2005. Partial purification and properties of cellulase-free alkaline xylanase produced by *Rhizopus stolonifer* in solid-state fermentation. Braz Arch Biol Techn. 48: 327-333.

Graminha, E. B. N., Goncalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Silva, R. and Gomes, E., 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. Anim Feed Sci Tech. 14: 1-22.

Gubitz, G. M., Lischnig, T., Stebbing, D., and Saddler, J. N. 1997. Enzymatic Removal of Hemicelluloses from Dissolving Pulps. Biotechnol Lett. 19: 491-495.

Gutierrez, L.F., Sanchez, O.J., Cardon, C.A. 2009. Process integration possibilities for biodiesel production palm oil using ethanol obtained from lignocellulosic residues of oil palm industry. Bioresource Technol. 100: 1227-1237.

Harris, R. S., Harcourt, S. J., Glare, T. R., Rose, E. A. and Nelson, T. J. 2000. Susceptibility of *Vespula vulgaris* (Hymenoptera: Vespidae) to generalist entomopathogenic fungi and their potential for wasp control. J Invertebr Pathol. 75: 251-258.

Janzon, R., Schutt, F., Oldenburg, S., Fischer, E. and Korner, I. 2014. Steam pretreatment of spruce Forest residues: Optimal conditions for biogas production and enzymatic hydrolysis. Carbohyd Polym. 100: 202-210.

Juhasz, T., Szengyel, Z., Reczey, K., Suka-Aho, M. and Viikari, L. 2005. Characterizayion of Cellulose and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. Process Biochem. 3519-3525.

Kaur, J., Chadha, B. S. and Saini, H. S. 2007. Regulation of cellulase production in two thermophilic fungi *Melanocarpus* sp. MTCC 3922 and *Scytalidium thermophilum* MTCC 4520. Enzyme Microb Tech. 38: 931-936.

Kheng, P. P.; Omar, I. C. 2005. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. Songklanakarin J. Sci and Tech. 27: 325-336.

Kluczek-T, B. 2007. Lignocellulose degradation and humus modification by the fungus *Paecilomyces inflatus*. Academic Dissertation in Microbiology. 84 pp.

Kluczek-T, B., Pekka Maijalaa, P., Hofrichterb, M. and Hatakkaa, A. 2007. Degradation and enzymatic activities of three *Paecilomyces inflatus* strains grown on diverse lignocellulosic substrates. Int Biodeter Biodegr. 59: 283–291.

Leopold, J. and Samši**ň**áková, A. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. J Invertebr Pathol. 15: 34-42.

Li, D. M., Horie, Y., Wang, Y. and Li. R. 1998. Three new *Aspergillus* species isolated from clinical sources as a causal agent of human aspergillosis. Mycoscience. 39: 299-305.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. and Pretorius, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol Mol Biol R. 66: 506-577.

Mandels, M. and Weber, J. 1969. The production of cellulose. *In.* Cellulase and their applications (Gould, R. E. ed.). p. 391-398. Adv. Chem. Ser. 95, American Chemistry Society, Washington D.C.

Mannion, C. M., McLane, W., Klein, M. G., Moyseenko, J., Oliver, J. B. and Cowan, D. 2001. Management of early-instar Japanese beetle (Coleoptera: Searabaeidae) in field-grown nursery crops. J Econ Entomol. 94: 1151-1161.

Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R. and Mattiasson, B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. J Biotechnol. 83: 177-187.

Mussatto, I., Ercília, M. S., Machado, M., Martins, S., and Teixeira, J. A., 2011. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. Food Bioprocess Tech. 4: 661-672.

Nath, D. aand Rao, M. 2001. pH dependent conformational aand structural changes of xylanase from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. (NCIM 59). Enzyme Microb Tech. 28: 397-403.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol Chem. 153: 375-380.

Petlamul, W. and Prasertsan, P. 2012. Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, spores production, radial growth and enzyme activity. Mycobiology. 40: 111-116.

Petlamul, W. and Prasertsan, P. 2014b. Spore production of an entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* BNBCRC for biocontrol: response surface optimization of medium using decanter cake from palm oil mill. J Korean Soc Appl Bi. 57: 201-208.

ภาคผนวก ก

Proceeding Full Paper

7th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (ICBBB 2017)" ระหว่างวันที่ 21 -23 มกราคม 2560

และรางวัลสืบเนื่องจากงานประชุม

ICPS
Published by ACM

PROCEEDINGS OF
2017 7th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics
ICBBB 2017

Bangkok, Thailand
January 21-23, 2017

Table of Contents

Proceedings of 2017 7th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics

Preface.....V

Conference Committees.....VI

- ***Session 1- Biomedical Informatics and Health Informatics***

A Sensorless Pusher Plate Position Detection Method for a Pulsatile Left Ventricular Assist Device 1

Xiaoqi Zhuang, Ming Yang, Fan Meng, Zhaopeng Dong, Dawei An

Comparative Study of Linear and Nonlinear Features Used in Imagined Vowels Classification Using A Backpropagation Neural Network Classifier 7

Aguila Miguel J., Basilio Harlee Dane V., Suarez Paul Vincent C., Dueñas Juan Paolo E., Engr. Seigfred V. Prado M.Sc. ELEG

Analysis on Semi-Automated Knee Cartilage Segmentation Model using Inter-Observer Reproducibility: Data from the Osteoarthritis Initiative 12

Hong Seng Gan, Khairil Amir Sayuti, Ahmad Helmy Abdul Karim, Rasyiqah Annani Mohd Rosidi, Aida Syafiqah Ahmad Khaizi

Identification of Gene Expression Linked to Malignancy of Human Colorectal Carcinoma using Restricted Boltzmann Machines 17

Arida F. Syafiandini, Ito Wasito, Aries Fitriawan, Mukhlis Amien, Setiadi Yazid

An SSVEP-Based Brain-Computer Interface to Navigate in a Virtual Home 22

Zahra Rezazadeh, Ali Sheikhani

The Risk Evaluation of Contaminants in Animal Products in Tianjin China 28

WANG Junping,CHENG Jiaqian, WEN Wenjun, WANG Peng, WEI Jieqi

The Purpose for the HER2 Positive Breast Cancer Treatment Research 34

Na Li, Chuanwei Yang, Le Zhang

Safe Drug Delivery System Design and Research 38

Xian Zhou, Wangping Xiong

- ***Session 2- Molecular Structural Biology***

Hydrogen Bonding Analysis of α, α-Trehalose Aqueous Solutions: a Molecular Dynamics Simulation 43

Study

Jing Liu, Cong Chen,Weizhong Li

- ***Session 3- Microorganism Technology and Biochemical Analysis***

Studies on Antibacterial Activity of Gardenia Yellow Pigment 50

Shang-Ling Fang, Jian Guan, Jing-Bo Zhou,Yu-Qun Xie, Xin Meng

Antibacterial Activity of Some Plants of Traditional Herbal Medicine in Vitro against Escherichia Coli Originated from Liquid Pig Manure 56

Anda Valdovska, Daiga Gāliņa, Inta Krasnova, Dalija Segliņa

The Capability of Beauveria Bassiana for Cellulase Enzyme Production 62

Wanida Petlamul, Thawatchai Sripornngam, Narawadee Buakwan, Sawai Buakaew, Kuntapon Mahamad

Author Index 67

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

The Capability of *Beauveria Bassiana* for Cellulase Enzyme Production

Wanida Petlamul
Collage of Innovation and Management, Songkhla Rajabhat University, Tambon Khoa-Roobchang, Muang District, Songkhla 90000. Thailand
wanidax53@gmail.com

Thawatchai Sripomngam
Collage of Innovation and Management, Songkhla Rajabhat University, Tambon Khoa-Roobchang, Muang District, Songkhla 90000. Thailand
kaonida@gmail.com

Narawadee Buakwan
Collage of Innovation and Management, Songkhla Rajabhat University, Tambon Khoa-Roobchang, Muang District, Songkhla 90000. Thailand
bnarawadee@gmail.com

Sawai Buakaew
Collage of Innovation and Management, Songkhla Rajabhat University, Tambon Khoa-Roobchang, Muang District, Songkhla 90000. Thailand
sbkluay@gmail.com

Kuntapon Mahamad
Faculty of Industrial Technology Songkhla Rajabhat University, Tambon Khoa-Roobchang, Muang District, Songkhla 9000. Thailand
Kuntapon64@gmail.com

ABSTRACT

The objective of this study is to investigate the ability of cellulase enzyme production from *Beauveria bassiana* comparing Trichoderma *viride* (positive control) in the cellulose-agar medium using carboxymethylcellulose (CMC). The formation of clear zone by chromogenic reaction around the margin of the fungal colony demonstrated in CMC agar using agar diffusion method modified by congo – red test. Both fungi were performed on cellulose-agar medium for 7 days at room temperature (30±2 °C). The result showed that clear zone number of *B. bassiana* was 5.0 mm higher than that of *T. viride* (4.7 mm). It revealed that *B bassiana* had ability to release cellulase enzyme for cellulose degradation. Growth assessment of *B. bassiana* on CMC agar and potato dextrose agar (PDA) was carried out from radial growth and spore concentration after 3 - 15 days post inoculation. The growth of *B. bassiana* revealed that its radial growth collected from PDA (14.7-31.6 mm d^{-1}) was higher than that of CMC agar (11.5-27.5 mm d^{-1}). Its spore concentration on PDA was 2.4×10^{8} spores mL^{-1} higher than that CMC (0.9×10^{8} spores mL^{-1}). Overall, the results of this study showed that *B. bassiana* had ability to produce cellulolytic enzymes on CMC agar. And its ability of cellulose degradation to be carbon source led to their growth.

CCS Concepts

Information systems→Chemical and biochemical retrieval

Permission to make digital or hard copies of all or part of this work for personal or classroom use is granted without fee provided that copies are not made or distributed for profit or commercial advantage and that copies bear this notice and the full citation on the first page. Copyrights for components of this work owned by others than ACM must be honored. Abstracting with credit is permitted. To copy otherwise, or republish, to post on servers or to redistribute to lists, requires prior specific permission and/or a fee. Request permissions from Permissions@acm.org.
ICBBB '17, January 21-23, 2017, Bangkok, Thailand.
© 2017 ACM ISBN 978-1-4503-4832-4/17/01 ...$15.00
DOI: http://dx.doi.org/10.1145/3051166.3051167

Keywords

Beauveria bassiana, Cellulase, Enzyme, Cellulose

1. INTRODUCTION

The harmful effect of chemical insecticides to the environment, plants and human health, has led to prominent role of entomopathogenic fungi (ENPF). Thailand is the one country with a rich biodiversity of ENPF which is important in biological strategy. ENPF species, such as *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), *Verticillium lecanii* (Zimmerman), *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, *Paecilomyces farinosus* (Holm ex S. F. Gray) Brown and Smith, and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin have been reported for the control of various insect/pests [1]. Because, their application causes to infect insects by growing through the body of insect and releasing extracellular enzymes (protease, chitinases and lipases) to hydrolyze insect's cuticle as substrates [2]. Moreover, these fungi release toxins (*M. anisopliae*: destruxin and *B. bassiana*: beauvericin and bassianolide). Recently, the full potential and the many advantages of this practice reached application on a commercial scale using *M. anisopliae* and *B. bassiana* as mycoinsecticides [3]. However, the market share of mycoinsecticides is very low compared to chemical insecticides, mainly due to lack of suitable mass multiplication techniques [4]. And the high cost of culture medium is an obstacle in the commercial application. To find the cheap raw materials for being alternative substrate sources supports for mycoinsecticide production. Cellulose is the most common abundant, renewable biopolymer on earth and domestic waste materials from agriculture. Cellulose degradation and its subsequent utilizations are important for global carbon sources that have researched intensively in industry. Thailand is the one country with a rich biodiversity and abundant lignocellulosic biomass in natural environment and agriculture system. Most agro-industrial wastes presence hemicellulose as carbon source and other nutrient sources provides suitable conditions for the development of microorganisms [5]. Wide variety of palm oil mill wastes are the alternative cheap raw materials. In addition, this research could be benefit to further fermentation process that needs more cellulase enzyme from solid or submerged downstream. Fungi are the main

cellulase-producing microorganisms that can consume glucose from degrading cellulose chain. *B. bassiana* belonging to Ascomycota is one of the fungal strains that utilize non-structural components in wood such as lipids, proteins and soluble carbohydrates by excreting a large number of other different hydrolases [6]. The production of cellulases by Ascomycota fungi was reported from *Trichoderma resii*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. *P. farinosus* but a few researches have been reported the detection of extracellular cellulase activity from *B. bassiana*. This is due to the ability of these microorganisms to form enzyme systems which degrade all major plant biopolymer: cellulose hemi-cellulose and xylan are the major constituent of hemicelluloses. Considering relevant to design strategies with a view in microbial control of insects, the aim of this study was to investigate the production of cellulase enzymes of the entomopathogenic fungi *B. bassiana* when grown on different substrates in the presence of glucose on the media looking for the possibility to use these strains in insect control.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Microorganisms

The fungal strains of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma viride* using for positive control were obtained from Pest Management Center, Songkhla Province. They were cultured on potato dextrose agar (PDA) at room temperature for 14 days and used as an inocula [7, 8]. Each stock culture was stored at 4°C until use.

2.2 Inoculum Preparation

One piece (10.0 mm diameter cork borer) of each fungal strain was placed in the center on PDA plates. These inoculated plates were incubated at room temperature for 7 days. Sterile distilled water (10.0 ml) was added on the fungal colonies and suspensions were made by gently probing the surface with the tip of a pasture pipette [9]. The spore suspension were mixed throughly using vortex mixer and diluted to obtain a suspension of 10^8 spores mL^{-1}. This was considered as the standard inocula for further analysis.

2.3 Cellulose-agar Medium

Cellulose-agar medium was consisted of KH_2PO_4 0.5 g, $MgSO_4$ 0.25 g, cellulose 2.0 g, agar 15.0 g and carboxymethylcellulose (CMC) 2.0 g in distilled water 1 L and pH value was adjusted to 5 before sterilization at 121°C for 15 min [10]. The sterilized medium were poured into petri dish and spotted by using 6.0 sterilized cock borer to perform with 10 µL of *B. bassiana* spore suspension (10^8 spores mL^{-1}) [11].

2.4 Assay for Cellulase

This test was applied for cellulose activity using the modified agar diffusion method [11]. The sterilized 0.02% Tween 80 was used as negative control enzyme. And 10^8 spores mL^{-1} of *Trichoderma viride* was used as positive control enzyme The inoculated plates were incubated at room temperature (30±2 °C) for 7 days then they were flooded with 1 % congo red solution for 15 min then they were discarded, and the plates were destained with 1N NaCl solution, allowed to stand for 15-20 minutes The clear zone was observed around the colony when the enzyme had utilized the cellulose. cellulolytic fungi were screened on the basis of their ability to hydrolyze cellulose by forming diameter zone of clearance around the fungal colony [12]. Each experiment was done in 15 replications.

2.5 Radial Growth and Spore Determination

Inoculated agar medium were incubated 30°C and determined the radial growth after 3 days intervals for 15 days. The colonies were measured by using two diameters (mm) of fungus and calculate radial growth (mm/day). After 15 days incubation, the conidia from each plate were harvested to determine their concentration by scrapping with 0.02% Tween 80. Then they were counted the spore number by using haemacytometer and light microscope at 400x magnification [13].

3. RESULT AND DISCUSSION

3.1 Cellulase Assay

Efficient cellulase producing from *B. bassiana* based on the appearance of the clear zone around the fungal colony on CMC agar plates illustrated in Figure 1. [14-15]. *B. bassiana* presented clear zone in CMC agar as presence from *T. viride* (positive control) after the congo red solution was added while they were contrast with 0.02% Tween 80 (negative control). This supported to claim that *B. bassiana* coud also release cellulase enzyme for cellulose degradation. Since CMC was used as a sole carbon source, our results suggest that *B. bassiana* has the ability of using cellulose.

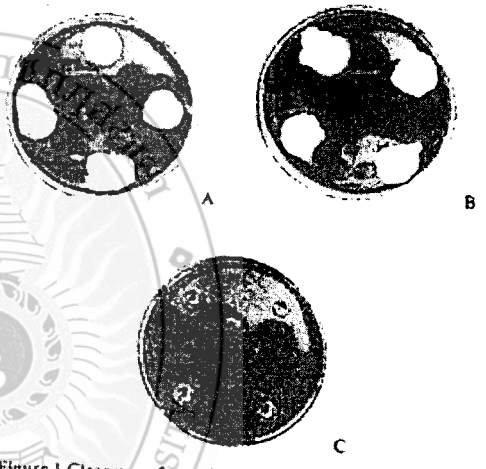


Figure 1 Clear zone formed containing congo red by cellulase enzyme releasing from fungi examined in carboxymethylcellulose (CMC). A: cellulase enzyme releasing from *Beauveria bassiana*, B: cellulase enzyme releasing from *Trichoderma viride* (positive control), C: 0.02% Tween 80% (negative control).

The diameter of clear zone was given in Table 1. This result showed that *B. bassiana* gave slightly higher clear zone number than *T. viride* as it like the well known cellulose-production.

The cellulase production is greatly influenced by fungal type, media components, especially carbon and nitrogen sources, minerals and physical factors such as pH, temperature and moisture [16]. The pH of the medium is one of the most critical environmental parameter affecting to enzyme production and the transport of various components across the cell membrane [17]. The fungus produced maximum CMCase (72.696 IU/g), FPase

(3.307 IU/g) and b-glucosidase (50.951 IU/g) at initial medium pH 5.5 [18] that nearly with the adjusted pH in this present research at pH 5.0. The optimization of incubation temperature for production of cellulases from *Fomitopsis* sp. RCK2010 under SSF conditions revealed that the enzyme production gradually increased from 25 to 30 °C. This result indicated that nutrient sources were found to be the important factor for the cellulase production. Since carbon is considered as the primary nutrient for the bacteria, carbon sources of CMC and cellulose were utilized for the cellulase production.

Table 1 Zone of clearance around *Beauveria bassiana* examined on Carboxymethylcellulose (CMC) agar by Congo red assay comparing with *Trichoderma viride* (positive control) and 0.02% Tween 80 (negative control) and incubated at room temperature (30±2 °C) for 7 days. Each data represents the average from 15 replications.

Fungal strain	Zone of clearance(mm)
Beauveria bassiana	5.0± 0.4
Trichoderma viride (positive control)	4.7 ± 0.3
0.02% Tween 80 (Negative control)	0.0

3.2 Radial Growth and Its Morphological Features in Cmc Agar

Radial growth of *B. bassiana* under solid state fermentation were checked with different substrates of CMC and PDA. The result showed that *B. bassiana* revealed the higher radial growth collected from PDA (14.7-31.6 mm d^{-1}) than in CMC agar (11.5-27.5 mm d^{-1}) from 3-15 days (Figure 2). Except for 5 days post inoculation, the result showed that *B. bassiana* gave higher radial growth cultured in CMA (15.89 mm d^{-1}) which was slightly higher than radial growth cultured in PDA (15.44 mm d^{-1}).

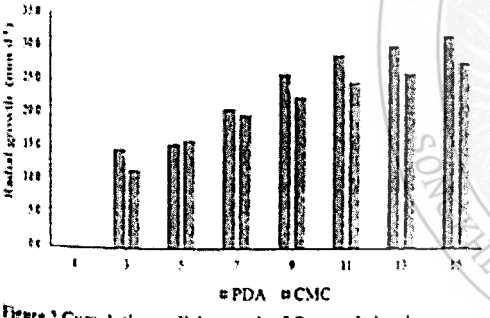


Figure 2 Cumulative radial growth of *Beauveria bassiana* were measured after 3 days interval until 15 days post inoculation at room temperature (30±2 °C). Each point represents the mean of 15 replications.

The mycelial growth of *B. bassiana* grown on PDA and CDA was presented in Figure 3 (A-B). They gave yellow-white color colony as cotton powder. The spore illustrated in ovoid shape as spore ball Figure 3 (C). These fungal characters in colony morphology were in line with the result of the previous research by [19]. In culture, *B. bassiana* grows as a white mould on most common cultural media, it produces many dry, powdery spore in white spore balls. Each spore of *B. bassiana* is short and ovoid [20]. The colony characteristic of *B. bassiana* is round or ovoid shape, intact-edged, raised or flat on the surface, and yellowish white. The hypha shaped like floss in cotton where it characterized *B. bassiana* which is categorised in class of Hyphomycetes. The shape of colony *B. bassiana* was round which was correlated with the apical growth of colony where the colony grew in all direction. [21].

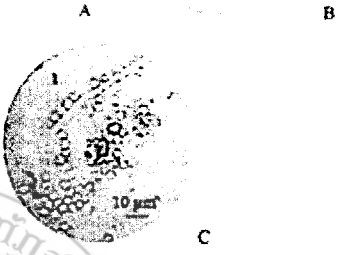


Figure 3 Mycelial growth of *Beauveria bassiana* cultured in A: potato dextrose agar (PDA) and B: Carboxymethylcellulose (CMC) agar and C: morphological feature of spores incubated at room temperature (30±2 °C) for 15 days.

3.3 Spore Concentration of *B. bassiana*

Spore concentration of *B. bassiana* under were checked with different substrates of CMC and PDA after 15 days inoculation. *B. bassiana* gave the higher spore concentration from growing in PDA (2.4×10^{8} spores mL^{-1}) than in CMC (0.9×10^{8} spores mL^{-1}) (Table 2). It related to environmental factor, nutrient source and fungal strains. Mass production and spore production of a mycopesticide require optimum conditions such as nutrient source, temperature for incubation and fungal strains [22]. Concentration of the media such as carbon sources, nitrogen sources and carbon: nitrogen ratio are affected to spore yield morphological spore and other physical characteristics [23-24].

Table 2 The spore concentration of *Beauveria bassiana* cultured in potato dextrose agar (PDA) and Carboxymethylcellulose (CMC) agar and incubated at room temperature (30±2 °C) for 15 days. Each data represents the average from 15 replications.

Culture medium	Spore concentration (spores mL^{-1})
potato dextrose agar (PDA)	2.4×10^{8} ±0.22
Carboxymethylcellulose (CMC) agar	0.9×10^{8} ±0.19

The fungi grown on the CMC agar supported the growth of the fungi by using cellulose as the carbon source. In this present work, *B. bassiana* cultured in PDA gave the higher radial growth and spore concentration than cultured in CMC agar. It may be due to *B. bassiana* could hydrolyze dextrose in PDA easily than cellulose in CMC as carbon source. Because, dextrose is one of

monosaccharide as glucose that could be up taken by microorganism than cellulose. While the conversion of cellulose into glucose is now known to consist of two steps in the enzyme system of *T. viride*. In the first step, beta-1, 4 glucanase breaks the glucosidic linkage to cellobiose, which is a glucose dimer with a beta-1, 4 bond as opposed to maltose, a counterpart with an alpha-1, 4 bond. Subsequently, this beta-1, 4 glucosidic linkage is broken by beta-glucosidase [25].

This result found that CMC also supported to *B. bassiana* growth and it could be cultured using agriculture waste composing of most cellulose source. The result obtained in this study were supported other literature reports, where agricultural waste was used as substrate for production. Rice grain was found to be the most suitable media for mass culture of *B. bassiana* [26-27] reported rice (11.2×10^6 spore g^{-1}) and wheat grain (11.8×10^6 spore g^{-1}) as the most suitable substrate for *B. bassiana* spore production. However, various carbon sources had been similar responses to fungal growth but different responses to various nitrogen sources [28-29]. Different component in medium such as sucrose, sodium nitrate, and minerals may be differently needed for growth of fungi [30]. In addition, pH of the medium is also affected to the most critical environmental parameter for the mycelial growth and spore production [17]. The morphology and components of fungi are important during the spore germination and outgrow to mycelia.

4. CONCLUSION

Beauveria bassiana can be used as a biological insecticide to control a number of pests such as termites, whiteflies, and many other insects. Its mass production to control insect pest is utilized for agricultural part. Thailand is the agricultural country that discharged wide varieties of agro-industrial residues containing hemicellulose. This research is indicated that the possibility of using agro-industrial residues for the production of the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana. The result reveals that B. bassiana has ability to release cellulase enzyme for cellulose degradation. It could grow and produce their spores on the medium containing CMC. This refers to its ability of cellulose degradation to be carbon source by agro-industrial residue utilization.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Songkhla Rajabhat University and National Research Council of Thailand for their financial supports.

6. REFERENCES

[1] Shah, P. A., and Pell, J. K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol*. 61: 413-423.

[2] Mustafa, U., and Kaur, G. 2009. Extracellular enzyme production in *Metarhizium anisopliae* isolates. *Folia Microbiol*. 54: 499-504.

[3] Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Tech*. 17: 553-596.

[4] Prakash, B., Padmaja, G. V. S., Siva, V., and Kiran, R. R. 2008. Statistical optimization of process variables for the large scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresour Technol*. 99:1530-1537.

[5] Torkashvand, F., Vazin, B., Maleknia, S., Heydari, A., Vossoughi, M., Davami, F., and Mahboudi, F. 2015. Designed amino acid feed in improvement of production and quality targets of a therapeutic monoclonal antibody. PLOS one. 1-21. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0140597

[6] Abraham, L. D., Hoffman, B., Gao, Y., and Breuil, C. 1998. Action of *Ophiostoma piceae* proteinase and lipase on wood nutrients. *Can J Microbiol* 44:698-701.

[7] Soundarapandian, P., and Chandra, R. 2007. Mass production of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomucetes) in the laboratory. *Res. J. Microbiol.* 2: 690-695.

[8] Pham, T. A., Kim, J. J., Kim, S. G., and Kim, K. 2009. Production of blastospore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture. *J. Mycobiol*. 37: 218-224.

[9] Santos, D. A., and Hamdan, J. S. 2005. Evaluation of Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing Conditions for *Trichophyton rubrum*. *J. Clinic. Microbiol*. 43: 1917-1920.

[10] Gao, L., and Lui, XZ. 2010. Sporulation of several biological fungi as affected by carbon sources and nitrogen sources in a two-stage cultivation system. *J. Micro*. 48: 767-770.

[11] Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., and Rensburg,. P. V. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. *J. Appl. Microbiol*. 91: 182-90.

[12] Ram, L., Kaur, K., and Sharma, S. 2014. Screening isolation and characterization of cellulase producing micro-organisms from soil. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*. 3: 12-18

[13] Petlamul, W., and Prasertsan, P. 2012. Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, spores production, radial growth and enzyme activity. *Mycobiology*. 40: 111-116.

[14] Bakare, M. K., Adewale, I. O., Ajayi, A., and Shonukan, O.O. 2005. purification and characterization of a thermostable endoglucanase from *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology* 9, 898 pp.

[15] Immanuel, G., Dhanusa, Prema, P., and Palavesam, A. 2006 Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *International Journal Environment Science Technology*. 1: 25-34.

[16] Lynd, L. R., Weimer, P. J., Zyl, W. H., and Pretorius, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Rev.* 66: 506–577.

[17] Kapoor, M., Nair, L. M., and Kuhad, R. C. 2008. Cost effective Xylanase production from free and immobilized Bacillus pumilus strain MK001 and its application in saccharification of Prosopis juliflora. *Biochem. Eng. J.* 38: 88-97.

[18] Deswal, D., Yogender Pal Khasa, Y. P., and Kuhad, R. C. 2011. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus Fomitopsis sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technology* 102: 6065-6072.

[19] Suhanto, E., Trisusilowati, B., and Purnomo, H. 1998. Kajian aspek fisiologik *B. bassiana* dan virulensinya terhadap *H. armigera*. *Jurnal Perlindungan Tanam-an Indonesia* 4: 112-119.

[20] Barnett, H. L., and Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. APS Press: St. Paul, MN.

[21] Afandhi, A., Syamsidi, S. R. C., Mimbar, S. M. and Wiroatmodjo, B. 2012. Isolation and phenotypic characterization of morphology in fungus *Beauveria*

bassiana (Balsamo) Vuillemin colony naturally from leaf surface, soil, and insect as host in tomato plantation. *Agrivita* 34: 303-310.

[22] Leite, L. G., Alves, S. B., Batista Filho, A., Roberts, D. W. 2003. Effect of salts, vitamins, sugars and nitrogen sources on the growth of three genera of *Entomophthorales*: *Batkoa*, *Furia*, and *Neozygites*. *Mycol. Res.* 107: 872-878

[23] Leland, J. E., Mullins, D. E., Vaughan, L. J., and Warren, H. L. 2005. Effects of media composition on submerged culture spores of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Part2: effects of media osmolality on cell wall characteristics, carbohydrate concentrations, drying stability, and pathogenicity. *Biocontrol Sci Technol.* 15: 393-409

[24] Shah, F. A., Wang, C. S., and Butt, T. M. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett.* 251: 259-266.

[25] Wang, N. S. ND. *Cellulose degradation*. Department of Chemical & Biomolecular Engineering. University of Maryland. Accessed from http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench 485/lab4.htm [15 September, 2016]

[26] Sharma, S. P., Gupta, R. B. L., and Yadava, C. P. S. 2002. Selection of a suitable medium for mass multiplication of entomofungal pathogens. *Indian J Entomol* 14:255–261.

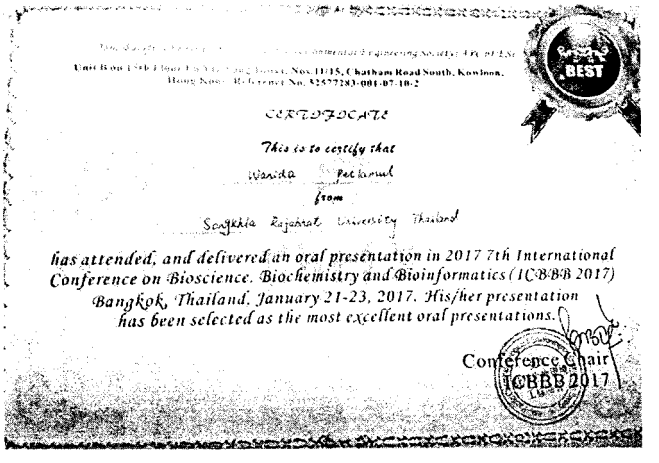
[27] Sahayaraj, K., and Namasivayam, S. K. R. 2008. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. *African J Biotechnol* 7:1907–1910.

[28] Liu, X. Z., and Chen, S. Y. 2002. Nutritional requirement of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *Biocontrol Sci Techn* 12: 381-393.

[29] Liu, X. Z., and Chen, S. Y. 2003. Nutritional requirements of *Pochonia chlamydosporia* and ARF18, fungi parasites of nematode eggs. *J. Invertebr. Pathol.*. 83, 10-15.

[30] Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T., Harman, G. E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2926-2933.

ภาพที่ 1 ก การเข้ารับรางวัลการนำเสนอผลงานวิจัย ระดับดีเยี่ยม



CERTIFICATE

This is to certify that

Wanida Pachanual

from

Songkla Rajanat University Thailand

has attended, and delivered an oral presentation in 2017 7th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (ICBBB 2017) Bangkok, Thailand, January 21-23, 2017. His/her presentation has been selected as the most excellent oral presentations.

Conference Chair
ICBBB 2017

ภาพที่ 2 ก ใบประกาศเกียรติคุณการนำเสนอผลงานวิจัย ระดับดีเยี่ยม

ประวัตินักวิจัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร.วนิดา เพ็ชร์ลมุล

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Wanida Petlamul

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3900900413332

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)

4. หน่วยงานและที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ต.เขารูปช้าง อ.เมือง จ.สงขลา 90000 โทรศัพท์ 0835146907, e-mail: wanipet@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

   5.1 ระดับปริญญาเอก ปรด. เทคโนโลยีชีวภาพ

   5.2 ระดับปริญญาโท วทม. กีฏวิทยา

   5.3 ระดับปริญญาตรี วทบ.เกษตรศาสตร์ (กีฏวิทยา)

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลืออุตสาหกรรมเกษตร การควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรด้วยวิธีการบูรณาการ

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย –

   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย ความหลากหลายทางชีวภาพของแมลงศัตรูพืชและแนวทางการจัดการระบบนิเวศวิศวกรรมโดยการมีส่วนร่วมของชุมชน กรณีศึกษา แปลงนาข้าวอัลฮัม ตำบลควนโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดสตูล (แหล่งทุน สกอ. ปีงบประมาณ 59)

   7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

วนิดา เพ็ชร์ลมุล อรัญ งามผ่องใส และจิราพร เพชรรัตน์ 2552. ความชอบในการวางไข่ของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera papayae* drew & Hancock (Diptera : Tephritidae) ในพริกบางสายพันธุ์. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 12: 69-75.

วนิดา เพ็ชร์ลมุล และพูนสุข ประเสริฐสรรพ์. 2555. การเพิ่มปริมาณเชื้อรา *Beauveria bassiana*โดยใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. รายงานการวิจัย: ลองแลงานวิจัยใน มอ. 4: 101-103.

วนิดา เพ็ชร์ลมุล พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ อมรรัตน์ ชุมทอง และภวิกา บุณยพิพัฒน์. 2558 . ผลของสังกะสี และทองแดงต่อการเจริญ การสร้างสปอร์และการงอกของสปอร์ของเชื้อราบิววาเรีย. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 3: 6-13.

วนิดา เพ็ชร์ลมุล. 2559. การประเมินความมีชีวิตรอดของเชื้อราบิวเวอเรีย ที่ผลิตได้จากกากตะกอนดีแคนเตอร์และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 1: 14-25.

Petlamul, W., Ngampongsai, A. and Petcharat, J. 2008. Oviposition preference of papaya fruit fly, *Bactrocera papayae* Drew& Hancock (Diptera: Tephritidae) on some chili varieties. (6th IMT-GT), Malaysia, 4th-5th August 2008. (Oral presentation)

Petlamul, W. and Prasertsan, P. 2012. Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, spores production, radial growth and enzyme activity. Mycobiology. 40: 111-116.

Petlamul, W. and Prasertsan, P. 2012. Utilization of decanter cake from palm oil mill as a potential raw material for antagonistic fungus *Beauveria bassiana* International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology, Khon Kaen, Thailand. 4th-6th October 2012. (Oral presentation)

Petlamul, W. and Prasertsan, P. 2012. Screening and optimization for spore production of *Beauveria bassiana* BNBCRC in decanter cake from palm oil mill. Commission on Higher Education Congress III University Staff Development Consortium (CHE – USDC Congress III). Royal Cliff Grand Hotel and Spa, Chonburi, Thailand. 15th September 2012. (Oral presentation)

Petlamul, W. and Prasertsan, P. 2014. Spore production of an entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* BNBCRC for biocontrol: response surface optimization of medium using decanter cake from palm oil mill. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 57: 201-208.

Petlamul, W. and Prasertsan, P. 2014. Medium optimization for production *Beauveria bassiana* BNBCRC spores from biohydrogen effluent of palm oil mill using taguchi design. International Journal of Bioscience Biochemistry and Bioinformatics. 4: 105-110.

Petlamul, W. and Prasertsan, P. 2015. Application of Response Surface Methodology for Spore Production Optimization of *Beauveria bassiana* Using Biohydrogen Effluent-Based Medium from Palm Oil Mill. Proceeding full paper (53rd KU conference, 3-6th Feb 2015) Kasatesart University. Bangkok, Thailand 59-66. (Oral presentation)

Petlamul, W., Prasertsan, P. and Boukwan, N. 2015. Optimization of Shaking Speed and Aeration Rate for Spore Production of *Beauveria bassiana* BNBCRC from Biohydrogen Effluent of Palm Oil Mill. Proceeding of Ramkhamhaeng University International Research Conference "Navigating ASEAN in a Changing World. Ramkhamhaeng University. 2-3 September 2015. 135-141. (Oral presentation)

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด:

7.4.1 ชื่อโครงการวิจัย ความหลากหลายทางชีวภาพของแมลงศัตรูพืชและแนวทางการจัดการระบบนิเวศวิศวกรรมโดยการมีส่วนร่วมของชุมชน กรณีศึกษา แปลงนาข้าวอัลฮัม ตำบลควนโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดสตูล (แหล่งทุน สกอ. ปีงบประมาณ 59) การวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 20

7.4.2 ชื่อโครงการวิจัย ขีดความสามารถในการรองรับของการท่องเที่ยวโดยชุมชนในพื้นที่ 5 จังหวัด ชายแดนภาคใต้ (สงขลา สตูล ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส) และ 4 รัฐ (กลันตัน เปรัค เคดาห์ และเปอร์ลิส) ประเทศมาเลเซีย (แหล่งทุน วช.มุ่งเป้า 58) การวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 80

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 1

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร.ไสว บัวแก้ว

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Sawai Boukaew

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 1930800009801

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (พนักงานประจำตามสัญญา)

4. หน่วยงานและที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ต.เขารูปช้าง อ.เมือง จ.สงขลา 90000โทรศัพท์ 0887912019, e-mail: sbkluay@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

5.1 ระดับปริญญาเอก ปรด. เทคโนโลยีชีวภาพ

5.2 ระดับปริญญาโท วทม. โรคพืชวิทยา

5.3 ระดับปริญญาตรี วทบ. จุลชีววิทยา

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี การผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากเชื้อจุลินทรีย์

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัยหัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย –

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย -

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

Boukaew, S., Chuenchit, S. and Petcharat, V. 2011. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biological control of *Sclerotium* root and stem rot and *Ralstonia* wilt of chili. BioControl 56:365-347.

Boukaew, S., Plubrukarn, A. and Prasertsan, P. 2013. Effect of volatile substances from *Streptomyces philanthi* RM-1-138 on growth of *Rhizoctonia solani* on rice leaf. BioControl 58:471-482.

Boukaew, S., Klinmanee, C. and Prasertsan, P. 2013. Potential for the integration of biological and chemical control of sheath blight disease caused by *Rhizoctonia solani* on rice. World J. Microbiol. Biotechno. 29:1885–1893.

Boukaew, S. and Prasertsan, P. 2014. Suppression of rice sheath blight disease using heat stable culture filtrate of *Streptomyces philanthi* RM-1-138. Crop protect. 61:1-10.

Boukaew, S. and Prasertsan, P. 2014. Factors affecting antifungal activity of *Streptomyces philanthi* RM-1-138 against *Rhizoctonia solani.* World J. Microbiol. Biotechnol. 30:323–329.

Boukaew, S., Chuenchit, S. and Petcharat, V. 2009. Screening of antagonistic *Streptomyces* spp. for controlling Sclerotium rofsii and Ralstonia solanacearum on chili pepper. 4th Annul Meeting of Thai Mycological Association (TMA) and Mycological Conference in Thailand. 24 October 2009. Maejo University. (Oral presentation)

Boukaew, S. and Prasertsan, P. 2012. Effect of volatile Substances of *Streptomyces philanthi* RM-1-138 against rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani.* International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology. October 4-6'2012 at Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. (Oral presentation)

Boukaew, S., Plubrukarn, A. and Prasertsan, P. 2012. Ultrastucture of *Rhizoctonia solani* PTRRC-9 Affected by Volatile Substance of *Streptomyces philanthi* RM-1-138. Commission on higher Education Congress V University Staff Development Consortium. November 14-16'2012 at The Ambassandor City Jomtien. (Oral presentation)

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด: -

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. นราวดี บัวขวัญ
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Narawadee Buakwan
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3909800327301
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา วิทยาเขตสตูล ที่อยู่ ต.บ่อยาง อ.เมือง จ.สงขลา โทรศัพท์มือถือ 089-6599449 e-mail: bnarawadee@gmail.com
5. ประวัติการศึกษา
   5.1 ปริญญาตรี บธ.บ (การจัดการบุคคล) สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล
   5.2 ปริญญาโท ศศ.ม. (นโยบายและการวางแผนสังคม) มหาวิทยาลัยทักษิณ
   5.3 ปริญญาเอก ปร.ด. (การจัดการสิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ การจัดการท่องเที่ยว

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ *(โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือ ผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)*

7.1 ประสบการณ์ด้านการวิจัย

พ.ศ. 2553-2555

- นักวิจัย โครงการจัดตั้งศูนย์วิจัยเพื่อส่งเสริมและบริหารจัดการแหล่งท่องเที่ยวในพื้นที่ลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา

พ.ศ. 2556

- ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย โครงการแนวทางการพัฒนามาตรฐานที่เหมาะสมกับการท่องเที่ยวโดยชุมชนใน 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้สู่อาเซียน
- หัวหน้าโครงการมาตรฐานด้านการตลาดการท่องเที่ยวโดยชุมชน: กรณีศึกษาชุมชนวิถีพุทธคลองแดน อ.ระโนด จ.สงขลา

7.2 การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Narawadee Buakwan, Parichart Visuthismajarn. 2012. "Activities Guideline of Cultural Tourims: A case study of Klonghae Floating Market, Hatyai, Songkhla. *In Proceeding of 4th International Conference on Humanities and Social Sciences*. Songkhla, Thailand. April 21, 2012

Parichart Visuthismajarn, **Narawadee Buakwan,**. 2011. "The Business Process Model of Sufficiency -Theory-based Resort Management and Development : A case study of Chumporn Cabana Resort, Pathew District, Chumporn Province, Thailand." *In Proceeding of 3rd International Conference on Humanities and Social Sciences*. Songkhla, Thailand. April 21, 2011

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 3

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร.ธวัชชัย ศรีพรงาม
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Thawatchai Sripornngam
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3101100368306
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)
4. หน่วยงานและที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ต.เขารูปช้าง อ.เมือง จ.สงขลา 90000โทรศัพท์ 087-0588877, e-mail: kaonida@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา
   5.1 ระดับปริญญาเอก การวิจัยและสถิติทางวิทยาการปัญญา มหาวิทยาลัยบูรพา
   5.2 ระดับปริญญาโท การวิจัยพฤติกรรมศาสตร์เพื่อการพัฒนา สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์
   5.3 ระดับปริญญาตรี การประชาสัมพันธ์ (เกียรตินิยมอันดับ 1) มหาวิทยาลัยเกษมบัณฑิต

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ การวิจัยและสถิติ

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัยหัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย -

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

ธวัชชัย ศรีพรงาม. 2547. ปัจจัยทางจิตสังคมที่เกี่ยวกับพฤติกรรมการทำงานอย่างปลอดภัยของพนักงานโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอและปั่นด้าย. (วิทยานิพนธ์ฉบับเต็ม) คณะพัฒนาสังคมและสิ่งแวดล้อม สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์.

ธวัชชัย ศรีพรงาม. 2550. สภาพการทำงานและจิตลักษณะที่เกี่ยวกับพฤติกรรมการทำงานอย่างปลอดภัยของพนักงานโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอและปั่นด้าย. วารสารจิตพฤติกรรมศาสตร์. 4: 83-115.

อัมพล ชูสนุก ปิยธิดา รัตนคุณ และ **ธวัชชัย ศรีพรงาม**. 2553. อิทธิพลของภาวะผู้นำแบบเปลี่ยนสภาพของซีอีโอต่อความพึงพอใจในงานและความผูกพันต่อองค์การของพนักงานบริษัทโรงกลั่นน้ำมันในประเทศไทย. วารสารวิทยาการวิจัยและวิทยาการปัญญา. 8: 52-66.

ธวัชชัย ศรีพรงาม เสรี ชัดแช้ม และ **ม.ร.ว. สมพร สุทัศนีย์**. (In press). การพัฒนาระบบคลังรูปภาพที่สื่อความหมายทางด้านอารมณ์ความรู้สึกในบริบทของคนไทย. วิทยาการวิจัยและวิทยาการปัญญา มหาวิทยาลัยบูรพา.

ธวัชชัย ศรีพรงาม เสรี ชัดแช้ม และม.ร.ว. สมพร สุทัศนีย์. (In press). การตอบสนองทางอารมณ์ความรู้สึกของผู้ที่มีภาวะอารมณ์ซึมเศร้าในประเทศไทย. มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี.

ธงชัย จินาพันธ์ **ดุสิต โพธิพันธุ์ ธวัชชัย ศรีพรงาม** และณัฐพร พวงเกตุ. (In press). เทคนิคการวิเคราะห์และการสกัดลักษณะเด่นสัญญาณคลื่นไฟฟ้าสมองในย่านความถี่ Mu และ Beta Rhythm ด้วยโปรแกรม BCI2000. มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด: -

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 4

1.ชื่อ-สกุล: (ภาษาไทย)	ดร.กันตภณ มะหาหมัด
(ภาษาอังกฤษ)	Dr. Kuntapon Mahamad
2. เลขบัตรประจำตัวประชาชน:	3901101332537
3. ตำแหน่งปัจจุบัน:	อาจารย์ โปรแกรมวิชาอุตสาหกรรมและเทคโนโลยี
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก	คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา 160 ถ.กาญจนวนิช ต.เขารูปช้าง อ.เมือง จ.สงขลา 90000

โทรศัพท์/โทรสาร 0-7431-2726, 0-7432-5007 ต่อ 283

E-mail : Kuntapon64@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

5.1 ปริญญาตรี ค.อ.บ. (วิศวกรรมไฟฟ้า) สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตภาคใต้

5.2 ปริญญาโท ค.อ.ม (ไฟฟ้า) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

5.3 ปริญญาเอก ปร.ด. (วิศวกรรมไฟฟ้าศึกษา) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ การวิจัยพัฒนาหลักสูตร, การพัฒนาโปรแกรมจำลอง (Simulation)

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ *(โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือ ผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)*

7.1 ประสบการณ์ด้านการวิจัย

7.1.1 การพัฒนาชุดทดลองการอินเตอร์เฟสโปรแกรมแลบวิวด้วยไมโครคอนโทรลเลอร์ : งบประมาณกองทุนสนับสนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ปี 2554

7.1.2 การศึกษาและพัฒนาเครื่องกวาดเก็บมูลแพะตามโครงการส่งเสริมการเลี้ยงแพะเนื้อเชิงพาณิชย์เขตพื้นที่ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ :งบประมาณ งบประมาณแผ่นดิน ปี 2553

7.1.3 โครงการวิจัย การพัฒนาชุดทดลองการอินเตอร์เฟสโปรแกรม LabVIEW ด้วยไมโครคอนโทรลเลอร์ แหล่งทุน : งบประมาณ กองทุนสนับสนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ปี 2554 (หัวหน้าโครงการ)

7.1.4 การศึกษาและพัฒนาเครื่องกวาดเก็บมูลแพะตามโครงการส่งเสริมการเลี้ยงแพะเนื้อเชิงพาณิชย์เขตพื้นที่ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ แหล่งทุน : งบประมาณ งบประมาณแผ่นดิน ปี 2553 (หัวหน้าโครงการ)

7.2 การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

M, Kuntapon and K, Poolsak. Development of Integrated Learning Management Model for Bridging the Gap between Professional Competence and Technical Education Literacy: Maintenance of Electrical Systems, 2nd International Conference on Innovation in Education. Thailand: Institute for Innovative Learning, Mahidol University. 2015.

M, Kuntapon and K, Poolsak. Learning Achievement Using Competence-Based Learning Model for Instruction of Device Checking in Electrical System : A Case Study of Department of Electrical Power, Petchaburi Technical College. Ramkhamhaeng University International Research Conference 2015. 2-3 September 2015.

M, Kuntapon, T, Surapan, S, Manit, B, Ekkamol and K, Poolsak. Development of Student-Centered SCOGPA Learning Model for Electrical Engineering and Technological Learning. The 1st International Conference on Technical Education, November 28-29, 2013. King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangkok. 96-100.

Weerachai, S., Weerachai, **M., Kuntapon**, and Aurasa, N. 2012. The physical properties and photocatalytic activity of Cu/TEA-doped TiO_2 nanoparticles prepared by the sol-gel process. Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 6, 744-747.

กันตภณ มะหาหมัด. การประยุกต์ใช้โปรแกรม LabWIEW สำหรับงานวัดและควบคุมด้านวิศวกรรม. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ปีที่ 2 ฉบับที่ 2 (กรกฎาคม-ธันวาคม 2552). มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

กันตภณ มะหาหมัด. การสร้างและหาประสิทธิภาพชุดสาธิตการควบคุมระดับของเหลว. การประชุมวิชาการครุศาสตร์อุตสาหกรรมระดับชาติ ครั้งที่ 2, 9-11 กรกฎาคม 2552. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

กันตภณ มะหาหมัด. การศึกษาผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนวิชาการวัดและควบคุมทางอุตสาหกรรม เรื่องการควบคุมอุณหภูมิ ที่เรียนด้วยชุดสาธิต ของนักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา .วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ฉบับ กรกฎาคม-ธันวาคม 2551. มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

กันตภณ มะหาหมัด, ฤทธิศักดิ์ จริตงาม, สมศักดิ์ ภควัตชัย, พิเชษฐ์ จันทวี, ไพศาล คงเรือง และวิชาญ เพชรทอง. การประยุกต์ใช้งาน PLC เพื่อใช้ในการประหยัดพลังงานไฟฟ้าในระบบปรับอากาศ. วารสารดวงแก้ว. ฉบับ กรกฎาคม-ธันวาคม 2548. มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ :

7.4.1 ความหลากหลายทางชีวภาพของแมลงศัตรูพืช และแนวทางการจัดการระบบนิเวศวิศวกรรมโดยการมีส่วนร่วมของชุมชน กรณีศึกษา แปลงนาข้าวอัลฮัม ต.ควนโพธิ์ อ.เมือง จ.สตูล แหล่งทุน : สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (ผู้ร่วมวิจัย) ดำเนินการไปแล้ว ร้อยละ 20

ภาคผนวก ค
หนังสือแต่งตั้งผู้เชี่ยวชาญ

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา วิทยาลัยนวัตกรรมและการจัดการ โทร ๑๐๗๙
ที่ วันที่ ๑๗ มกราคม ๒๕๖๐
เรื่อง ขอให้ลงนามในหนังสือเชิญผู้เชี่ยวชาญงานวิจัย

เรียน ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
สิ่งที่ส่งมาด้วย ๑.หนังสือเชิญผู้เชี่ยวชาญประเมินเครื่องมือการวิจัย จำนวน ๒ ฉบับ
๒.สัญญารับทุนอุดหนุนการวิจัย โครงการวิจัย จำนวน ๑ ฉบับ

ตามที่ข้าพเจ้า ดร.วนิดา เพ็ชร์สมุล และคณะผู้วิจัย ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย เรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส ที่มีผลต่อการเสี้ยงเชื้อราฆ่าแมลงในวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร นั้น เนื่องจากในขั้นตอนการวิจัยมีการใช้เครื่องมือเกี่ยวกับการทดลองเอนไซม์ ที่มีความจำเป็นต้องให้ผู้เชี่ยวชาญควบคุมตรวจสอบก่อน เพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปตามแผนการดำเนินงาน ข้าพเจ้าจึงขอส่งหนังสือเชิญผู้เชี่ยวชาญงานวิจัย เพื่อให้ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา พิจารณาลงนาม และใช้ประกอบการดำเนินการวิจัยต่อไป ทั้งนี้ได้แนบรายละเอียดมาด้วยแล้ว

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

(ดร.วนิดา เพ็ชร์สมุล)
หัวหน้าโครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ที่ [illegible] ๐๑๖๗

สถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ๙๐๐๐๐

๒๕ มกราคม ๒๕๖๐

เรื่อง ขอเชิญเป็นผู้เชี่ยวชาญพิจารณาวิจัย
เรียน ศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์

ด้วย วิทยาลัยนวัตกรรมและการจัดการ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ได้รับอนุมัติจัดสรรทุนวิจัย จากคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ให้ดำเนินงานวิจัย เรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มคุณไฟโตเคมีคอลและไขมันจากรำข้าว ที่มีผลต่อการเลี้ยงเพื่อรวบรวมในวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร โดยมี ดร.วนิดา เพ็ชร์อนุ่ม เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

ในการนี้ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ได้พิจารณาเห็นว่า ท่านมีความรู้ความสามารถในงานวิจัย อีกทั้งมีประสบการณ์งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเรื่องดังกล่าวข้างต้น จึงขอเรียนเชิญท่านเป็นผู้เชี่ยวชาญ ให้คำปรึกษา ตรวจสอบการดำเนินงานวิจัย เพื่อให้เกิดประโยชน์กับงานวิชาการของโครงการวิจัยนี้ต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อพิจารณา และขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอแสดงความนับถือ

(นายบรรจง ทองสร้าง)
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

สถาบันวิจัยและพัฒนา
โทร ๐๗๔- [illegible]
โทรสาร ๐๗๔- [illegible]