

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- นฤมล เรืองฤทธินนท์. 2526. เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสของ *Aspergillus fumigatus* Fresenius (V1) ที่แยกได้จากกองขยะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พรทิพย์ ตัดท์เจริญรัตน์. 2528. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อแอสเพอร์จิลลัส รหัส24402. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พวงพร โชติโกกร. 2530. สรีระวิทยาของแบคทีเรีย (MI 442). กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- พิสุทธิ์ ศาลากิจ. 2528. บานศรณารายณ์. วารสารเคหการเกษตร 8(9): 11-12.
- วรารุณี ครุสง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. 2,000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- สุนทร วงศ์สวัสดิ์. 2516. การแยกเชื้อราและศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อรา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อัจฉราพร ไสละสุต. 2528. บานศรณารายณ์ (Sisal). วารสารฝ้ายและสิ่งทอ 8(30): 24-26.

ภาษาอังกฤษ

- Abdel-Hafez, S.I.T. 1982. Cellulose decomposing fungi of desert soil in Saudi Arabia. Micopathologia 76: 73-78.
- Abouzied, M.M., and Reddy, C.A. 1986. Direct fermentation of potato starch to ethanol by cocultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology 52(5): 1055-1059.

- Abrha, B., and Gashe, B.A. 1992. Cellulase production and activity in a species of Cladosporium. World Journal of Microbiology and Biotechnology 8: 164-166.
- Acebal, C., et al. 1986. Enhanced cellulase production from Trichoderma reesei QM 9414 on physically treated wheat straw. Applied Microbiology and Biotechnology 24: 218-223.
- Alberto, A., Ward Owen, P., and D' Souza, J. 1991. Use of mutation strategies applied to Aspergillus terreus ATCC 52430 to obtain mutants with improved cellulase productivity. Biotechnology Technique 5(4): 283-288.
- Alexander, M. 1976. Introduction to soil microbiology. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Ali, S., and Sayed, A. 1992. Regulation of cellulase biosynthesis in Aspergillus terreus. World Journal of Microbiology and Biotechnology 8: 73-75.
- _____, Sayed, A., Sarker, R.I., and Alam, R. 1991. Factors affecting cellulase production by Aspergillus terreus using water hyacinth. World Journal of Microbiology and Biotechnology 7: 62-66.
- Allen, A.L., and Roche, C.D. 1989. Effects of strain and fermentation conditions on production of cellulase by Trichoderma reesei. Biotechnology and Bioengineering 33: 650-656.
- Amin, G. 1992. Conversion of sugar-beet particles to ethanol by the bacterium Zymomonas mobilis in solid-state fermentation. Biotechnology Letters. 14(6): 499-504.

- Bahkali, A.H. 1992. In vitro production of pectolytic and cellulolytic enzymes by Colletotrichum lindemuthianum isolated from soybean grown in Saudi Arabia. World Journal of Microbiology and Biotechnology 8: 55-59.
- Barnett, H.L., and Hunter, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Minnesota: Burgess Publishing Co. 200 pp.
- Bastawde, K.B. 1992. Cellulolytic enzymes of a thermotolerant Aspergillus terreus strain and their action on cellulosic substrates. World Journal of Microbiology and Biotechnology 8: 45-49.
- Benoit, L., Cailliez, C., Petitdemange, E., and Gitton, J. 1992. Isolation of cellulolytic mesophilic Clostridia from a municipal solid waste digester. Microbial and Ecology 23: 117-125.
- Bland, S.M., and Douglas, E.E. 1985. Fungal carbohydrases: amylases and cellulases. In J.W. Bennett, and L.L. Linda (eds.), Gene Manipulations in Fungi, pp. 491-508. New York: Academic Press.
- Castanon, M., and Wilke, C.R. 1980. Adsorption and recovery of cellulases during hydrolysis of newspaper. Biotechnology and Bioengineering 22: 1037-1053.
- Chavanich, S., Hajime, Y., and Shinsaku, H. 1981. A comparative study of cellulase and xylanase produced by some thermophilic fungi. Microbial Utilization of Renewable Resources JSPS-NRCT. Seminar on Agro-Industry Including Microbial Technology 2: 72-76.

- Christakopoulos, P., Macris, B.J., and Kekos, D. 1990. On the mechanism of direct conversion of cellulose to ethanol by Fusarium oxysporum: effect of cellulase and β -glucosidase. Applied Microbiology and Biotechnology 33: 18-20.
- Cowling, E.B., and Kirk, T.K. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrate for enzymatic conversion process. Biotechnology and Bioengineering Symposium 6: 95-123.
- _____, and Merrill, W. 1966. Nitrogen in wood and its role in wood deterioration. Canadian Journal of Botany 44: 1539-1554.
- Desai, J.D., Ray, R.M., and Patel, N.P. 1983. Purification and properties of extracellular β -glucosidase from Scytalidium lignicola. Biotechnology and Bioengineering 25: 307-313.
- Deschamps, F., Giuliano, C., Asther, M., Huet, M.C., and Roussos, S. 1985. Cellulase production by Trichoderma harzianum in static and mixed solid state fermentation reactors under non-aseptic conditions. Biotechnology and Bioengineering 27: 1385-1388.
- Desrochers, M., Jurasek, L., Koller, E. 1980. Production of cellulase in shake flask culture of Schizophyllum commune : optimization of the medium. TAPPI Papermakers Conf Proc : 161-167.
- Domsch, K.H., and Gams, W. 1980. Compendium of soil fungi. Traute Heidi Anderson: Academic press.
- Duff, S.J.B. 1988. Use of surface-immobilized Trichoderma in batch and fed-batch fermentation. Biotechnology and Bioengineering 31: 345-351.
- _____, Cooper, D.G., and Fuller, O.M. 1987. Effect of media composition and growth condition on production of cellulase and β -glucosidase by a mixed fungal fermentation. Enzyme and Microbial Technology 9: 47-52.

- Dunlap, C.E., and Lin-Chang, C. 1979. Cellulose degradation a common link. In M.L. Shuler (ed.), Utilization and recycle of agriculture wastes and residues, pp. 19-65. Florida: CRC Press, Inc.
- Durand, H., Soucaille, P., and Tiraby, G. 1984. Comparative study of cellulase and hemicellulases from four fungi. Enzyme and Microbial Technology 6: 175-180.
- Eggins, H.O.W., and Pugh, G.J.E. 1962. Isolation of cellulose decomposing fungi from the soil. Nature 193: 94-95.
- FAO. 1974. Hard Fiber Research Series No 14, June.
- Fennington, G., Neubauer, D., and Stutzenberger, F. 1984. Cellulase biosynthesis in a catabolite repression resistant mutant of Thermomonospora curvata. Applied and Environmental Microbiology 47: 201-204.
- Ferchak, J.D., and Pye, E.K. 1983. Effect of cellobiose, glucose, ethanol and metal ions on the cellulase enzyme complex of Thermomonospora fusca. Biotechnology and Bioengineering 25: 2865-2872.
- Gashe, B.A. 1992. Cellulase production and activity by Trichoderma sp. A-001. Journal of Applied Bacteriology 73: 79-82.
- Ghanem, K.M. 1992. Single cell protein production from beet pulp by mixed culture. Microbiologia (Madrid) 8(1): 39-43.
- Ghosh, B.S., and Kundu, A.B. 1980. Induction of cellulases and hemicellulases by Tamarind (Tamarindus indica) Kernel Polysaccharide. Journal of Fermentation Technology 58(2): 135-141.
- Goksoyr, J.C., and Eriksen, J. 1980. Cellulase. In Economic Microbiology 5, pp. 283-329. New York: Academic Press.

- Goldstein, I.S. 1981. Chemicals from cellulose. Organic Chemicals from Biomass, pp. 101-124. Florida: CRC Press.
- Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W., and Esterbauer, H. 1992. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of Trichoderma viride. Applied Microbiology and Biotechnology 36: 701-707.
- Gomes, J., Gomes, I., Esterbauer, H., Kreiner, W., and Steiner, W. 1989. Production of cellulases by a wild strain of Gliocladium virens: optimization of the fermentation medium and partial characterization of the enzyme. Applied Microbiology and Biotechnology 31: 601-608.
- Goto, M., Furukawa, K., and Hayashida, S. 1992. An avicel affinity site in an avicel digesting exocellulase from a Trichoderma viride mutant. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 56 (10): 1523-1528.
- Hagerdal, B.H., and Haggstrom, M. 1985. Production of ethanol from cellulose, solka floc BW 200, in a fedbatch mixed culture of Trichoderma reesei, C30, and Saccharomyces cerevisiae. Applied Microbiology and Biotechnology 22: 187-189.
- _____, Berner, S., and Skoog, K. 1986. Improved ethanol production from xylose with glucose isomerase and Saccharomyces cerevisiae using the respiration inhibitor azide. Applied Microbiology and Biotechnology 24: 287-293.
- Haggstrom, M.H., and Dostalek, M. 1981. Regulation of mixed culture of Streptococcus lactis and Saccharomycopsis fibuliger. European Journal of Microbiology and Biotechnology 12: 216-219.



- Hankin, L., and Anagnostakis, S.L. 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of microorganism. Journal of General Microbiology 98: 109-115.
- Hazra, A.K., Box, S.K., and Guha, B.C. 1958. A modified cellulosic medium for the isolation of cellulolytic fungi from infected material and soil. Science and Culture 24: 39.
- Helmi, S., Khalil, A.I., Tahoun, M.K., and Khairy, A.H. 1991. Induction of mutation in Aspergillus niger for conversion of cellulose into glucose. Applied Biochemistry and Biotechnology 28-29: 203-210.
- Hendy, N.A., Wilke, C.R., and Blanch, H.W. 1984. Enhanced cellulase production in fed-batch culture of Trichoderma reesei C-30. Enzyme and Microbial Technology 6: 73-77.
- Hidalgo, M., Steiner, J., and Eyzaguirre, J. 1992. β -glucosidase from Penicillium purpurogenum: purification and properties. Biotechnology and Applied Biochemistry 15: 185-191.
- Hu, P., Kahrs, S.K., Chase, T., and Eveleigh, D.E. 1992. Cloning of a Microbispora bispora cellobiohydrolase gene in Escherichia coli. Journal of Industrial Microbiology 10: 103-110.
- Hungate, R.E. 1947. Studies on cellulose fermentation III. The culture and isolation of cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle. Journal of Bacteriology 53: 631-645.
- Idogaki, H., and Kitamoto, Y. 1992. Purification and some properties of a carboxymethyl cellulase from Coriolus versicolor. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 56(6): 970-971.
- Jin, F., and Toda, K. 1989. Nutrient effects on cellulase production by the new species, Clostridium thermocopriae. Applied Microbiology and Biotechnology 31: 579-600.

- Kawai, S., Honda, H., Tanase, T., Taya, M., Iijima, S., and Kobayashi, T. 1987. Molecular cloning of Ruminococcus albus cellulase gene. Agricultural Biology and Chemistry 51: 59-63.
- Kawamori, M., Morikawa, Y., Ado, Y., and Takasawa, S. 1986. Production of cellulases from alkali-treated bagasse in Trichoderma reesei. Applied Microbiology and Biotechnology 24: 454-458.
- Keskar, S.S. 1992. Cellulase production by Penicillium janthinellum. World Journal of Microbiology and Biotechnology 8: 534-535.
- Kirk, T.K. 1983. Degradation and conversion of lignocellulose. In J.E. Smith, D.R. Berry, and B. Kristiansen (eds.), The filamentous fungi. Fungal Technology 4: pp. 226-295. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Kricke, J., Varma, A., Miller, D., and Mayer, F. 1994. Carboxymethyl cellulase from Bacillus sp.: isolation, macromolecular organization, and cellular location. Journal of General Applied Microbiology 40: 53-62.
- Kuhad, R.C., and Singh, A. 1993. Enhanced production of cellulases by Penicillium citrinum in solid state fermentation of cellulosic residue. World Journal of Microbiology and Biotechnology 9: 100-101.
- Kumakura, M., Kanno, S., and Nisizawa, K. 1989. Cellulase production in Trichoderma reesei immobilized with polymeric fibrous carriers. Canadian Journal of Microbiology 35: 968-971.
- Kume, S., and Fujio, Y. 1991. Production of two types of thermophilic cellulases in a mixture of thermophilic bacilli. Journal of General Applied Microbiology 37: 25-34.

- Lee, J.H., Pagan, R.J., and Rogers, P.L. 1983. Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using Zymomonas mobilis. Biotechnology and Bioengineering 25: 659-669.
- Lin, E., and Wilson, D.B. 1987. Regulation of β -1,4-endoglucanase synthesis in Thermomonospora fusca. Applied and Environmental Microbiology 53(6): 1352-1357.
- _____. , and Wilson, D.B. 1987. Regulation of β -1,4-endoglucanase synthesis in Thermomonospora fusca. Applied and Environmental Microbiology 53(6): 1352-1357.
- Lock, G.W. 1969. Sisal: thirty years sisal research in Tanzania. London: Longmans, Green and Co. Ltd., Great Britain.
- Lowry, O.H., Rosebrough, J.N., Farr, A.L., and Randall, J.R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Biology and Chemistry 193: 265-275.
- Lutzen, N.W., Nielsen, M.H., Oxenboell, K.M., Schulein, M., and Stentebjerg-Olesen, B. 1983. Cellulases their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars. Phil Trans R Soc Lond B 300: 283-291.
- Macris, B.J. 1984. Production and characterization of cellulase and β -glucosidase from a mutant of Alternaria alternata. Applied Environmental and Microbiology 47: 560-565.
- _____. , Kekos, D., and Evangelidou, X. 1989. A simple and inexpensive method for cellulase and β -glucosidase by Neurospora crassa. Applied Microbiology and Biotechnology 31: 150-151.



- Madamwar, D., and Patel, S. 1992. Formation of cellulases by co-culturing of Trichoderma reesei and Aspergillus niger on cellulosic waste. World Journal of Microbiology and Biotechnology 8: 183-186.
- Maheswari, D.K., Jahan, H., Paul, J., and Varma, A. 1993. Wheat straw, a potential substrate for cellulase production using Trichoderma reesei. World Journal of Microbiology and Biotechnology 9: 120-121.
- Mandels, M. 1985. Application of cellulases. Biochem Soc Trans 13: 414-416.
- _____. , and Sternberg, D. 1976. Recent advances in cellulase technology. Journal of Fermentation Technology 54(4): 267-286.
- Margaritis, A., and Merchant, R.F. 1983. Optimization of fermentation conditions for thermostable cellulase production by Thielavia terrestris. Journal of Industrial Microbiology 1: 149-156.
- Masaki, T., Tsuyochi, K., Ryuichi, M., and Tadashi, K. 1983. Continuous cellulase production by cell-holding culture. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 18: 218-224.
- Mcbeth, I.G. 1916. Studies on the decomposition of cellulose in soil. Soil Science 1: 437-487.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analysis of Chemistry 31: 426-428.
- Montenecourt, B. 1983. Trichoderma reesei cellulases. Trends in Biotechnology 1(5)



- Nisizawa, K. 1973. Mode of the action of cellulases. Journal of Fermentation Technology 51: 267-304.
- Norkrans, B. 1967. Cellulose and cellulolysis. Advance Applied Microbiology 9: 91-125.
- Okeke, B.C., and Obi, S.K.C. 1993. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an Arthrographis species. World Journal of Microbiology and Biotechnology 9: 345-349.
- Park, S.C., and Baratti, J.C. 1972. Continuous ethanol production from sugar beet molasses using an osmotolerant mutant strain of Zymomonas mobilis. Journal of Fermentation and Bioengineering 73(1): 16-21.
- Pirselova, K., Smogrovicova, D., and Balaz, S. 1993. Fermentation of starch to ethanol by a co-culture of Saccharomycopsis fibuligera and Saccharomyces cerevisiae. World Journal of Microbiology and Biotechnology 9: 338-341.
- Prasertsan, P., and Doelle, H.W. 1986. Separation and characterization of endoglucanase from culture filtrates of Cellulomonas sp.. Applied Microbiology and Biotechnology 24: 326-333.
- _____, and Oi, S. 1992. Production of cellulolytic enzymes from fungi and use in the saccharification of palm cake and palm fibre. World Journal of Microbiology and Biotechnology 8: 536-538.
- Punnapayak, H., and Emert, G.H. 1986. Use of Pachysolen tannophilus in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosic. Biotechnology Letters 8(1): 63-66.

- Rao, M.N.A., and Mithal, B.M. 1983. Productions of cellulase from Pestalotiopsis versicolor. Biotechnology and Bioengineering 25: 2395-2398.
- Reese, E.T. 1975. Summary statement on the enzyme system in cellulose as a chemical and energy resource. Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 5, pp. 77-80. Sydney: John Wiley & Sons, Inc.
- Ryu, D., Andreotti, R., Mandels, M., Gallo, B., and Reese, E.T. 1979. Studies on quantitative physiology of Trichoderma reesei with two-state continuous culture for cellulase production. Biotechnology and Bioengineering 21: 1887-1903.
- _____, and Mandels, M. 1980. Cellulases: biosynthesis and applications. Enzyme and Microbial Technology 2: 91-102.
- Saad, J., Taj, A., Jaffar, and Wedad, N. 1992. Cellulase activity of a thermotolerant Aspergillus niveus isolated from desert soil. Mycology Research 96(1): 14-18.
- Sandhu, D.K., and Arora, D.S. 1985. Cellulase production by species of Acrophialophora & Thielavia. Indian Phytopathology 38(2): 267-269.
- _____, D.K., Bagga, P.S., and Singh, S. 1985. Cellulolytic activity of thermophilous fungi isolated from soils. Kavaka 13(1): 21-31.
- Sasaki, I., and Nagayama, H. 1994. β -glucosidase from Botrytis cinerea: its relation to the pathogenicity of this fungus. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 58(4): 616-620.
- _____. 1982. Enzymatic saccharification of rice hull cellulose. JARQ 16(2): 144-150.



- Schafner, D.W., and Toledo, R.T. 1992. Cellulase production in continuous culture by Trichoderma reesei on xylose-based media. Biotechnology and Bioengineering 39: 865-869.
- Schell, M.A. 1987. Purification and characterization of an endoglucanase from Pseudomonas solonacearum. Applied and Environmental Microbiology 53(9): 2237-2241.
- Selby, K. 1969. The mechanism of cellulase action with particular reference to the C₁ component. Process of Bioconversion Symposium 95: 111-141.
- Sharma, N., Bhalla, T.C., and Bhatt, A.K. 1991. Partial purification and characterization of extracellular cellulase from a strain of Trichoderma viride isolated from forest soil. Folia Microbiology 36(4): 353-356.
- Shewale, J.G., and Sadana, J.C. 1978. Cellulase and β -glucosidase production by a basidiomycete species. Canadian Journal of Microbiology 24: 1204-1216.
- Singh, A., Agrawal, A.K., Abidi, A.B., and Darmwal, N.S. 1990a. Properties of cellobiase from Aspergillus niger. Applied Microbiology and Biotechnology 34: 356-358.
- _____. 1990b. Properties of exoglucanase from Aspergillus niger. Journal of General Applied Microbiology 36: 245-253.
- Sin, R.G.H., and Reese, E.T. 1953. Decomposition of cellulose by microorganisms. Botany Review 19: 377-416.
- Sonya, B. 1992. Improvement of cellulase activity in Trichoderma. Applied Biochemistry and Biotechnology 34-35: 175-183.

- Spindler, D.D., Wyman, C.E., and Grohmann, K. 1989. Evaluation of thermotolerant yeasts in controlled simultaneous saccharifications and fermentations of cellulose to ethanol. Biotechnology and Bioengineering 34: 189-195.
- Srivastava, S.K., Ali, A., and Khanna, S. 1991. Purification, characterization and cloning of an endo-1,4- β -glucanase from Ruminococcus sp.. Biotechnology Letters 13(2): 907-912.
- Steiner, W., Lafferty, R.W., Steinmuller, H., and Esterbauer, H. 1987. Lignocellulosic residues a source of fermentable sugars: availability and composition of raw materials, pretreatment and enzymatic saccharification. Biotechnology and Bioindustrial 6: 3-9.
- _____, Sattler, W., and Esterbauer, H. 1988. Adsorption of Trichoderma reesei cellulase on cellulose: experimental data and their analysis by different equations. Biotechnology and Bioengineering 32: 853-865.
- Tanaka, H., Kurosawa, H., and Murakami, H. 1986. Ethanol production from starch by a coimmobilized mixed culture system of Aspergillus awamori and Zymomonas mobilis. Biotechnology and Bioengineering 28: 1761-1768.
- Tangu, S.K. 1982. Process development for ethanol production based on enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. Process Biochemistry (May/June): 36-49.
- Tsao, G.T., and Chiang, L. 1983. Cellulose and hemicellulose technology. In J.E. Smith, D.R. Berry, and B. Kristiansen (eds.), The filamentous fungi. Fungal Technology 4: pp. 296-326. New York: John Wiley & Sons Inc.



- Tsuchiyoshi, F., and Kunio, O. 1991. Cloning of the celB gene encoding endo-1,4- β -glucanase-2 from Clostridium josui in Escherichia coli and the properties of the translated product. Journal of Fermentation and Bioengineering 72(6): 422-425.
- Waksman, S.A. 1932. Principle of soil microbiology, 897 pp. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Warzywoda, M., Ferre, V., and Pourquie, J. 1983. Development of a culture medium for large-scale production of cellulolytic enzymes by Trichoderma reesei. Biotechnology and Bioengineering 25: 3005-3010.
- Watanabe, Y., Moriyama, R., Matsuda, T., Shimizu, S., and Ohmiya, K. 1992. Purification and properties of the endo-1,4- β -glucanase III from Ruminococcus albus. Journal of Fermentation and Bioengineering 73(1): 54-57.
- Webb, C., Fukuda, F., and Atkinson, B. 1986. The production of cellulase in a spouted bed fermentor using cells immobilized in biomass support particles. Biotechnology and Bioengineering 28: 41-47.
- Wood, W.E., Neubauer, D.G., and Stutzenberger, F.J. 1984. Cyclic AMP levels during induction and repression of cellulase biosynthesis in Thermomonospora curvata. Journal of Bacteriology 160: 1047-1054.
- Wright, J.D., Power, A.J., and Douglas, L.J. 1986. Proc. 8th Symp. Biotechnology Fuels and Chemistry 17: 285.
- Zabriskie, D.W., Qutabuclidin, S.A.S.M., and Dowing, K.W. 1980. Production of ethanol from cellulose using a soluble cellulose derivative as an intermediate. Biotechnology and Bioengineering Symposium 10: 149-162.

Zhu, Y.S., et al. 1982. Induction and regulation of cellulase synthesis in Trichoderma pseudokominyi mutants EA₃-867 and N₂-78. Enzyme and Microbial Technology 4: 3-12.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. Czapex's dox medium (Mandels and Sternberg, 1976)

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4	กรัม
KH_2PO_4	2.0	"
Urea	0.3	"
CaCl_2	0.3	"
MgSO_4	0.3	"
FeSO_4	5.0	มิลลิกรัม
MnSO_4	1.6	"
ZnSO_4	1.4	"
CoCl_2	2.0	"
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ถ่ายใส่พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่กระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาด 2.0 x 10.0 เซนติเมตร นาไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. Potato dextrose agar (PDA)

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาล dextrose (glucose)	20	"
วุ้นผง	20	"
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีการเตรียม

ต้มมันฝรั่งที่หั่นเป็นชิ้นขนาดเท่าลูกเต๋าน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ให้เดือดประมาณ 15 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ใส่ส่วนผสมที่เหลือ คนจนละลายหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. Carboxymethyl cellulose agar (Hankin and Anagnostakis, 1977)

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0	กรัม
carboxymethyl cellulose	5.0	"
yeast extract	1.0	"
agar	10.0	"
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย carboxymethyl cellulose (CMC) ในน้ำอุ่น 500 มิลลิลิตร โดยใส่ CMC ที่ละน้อยๆ พร้อมกับการคนตลอดเวลา จนกระทั่ง CMC ละลายหมด ละลายส่วนผสมที่เหลือ แล้วเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

4. Production medium (Punnapayak and Emert, 1986)

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

MgSO ₄	1.0	กรัม
CaHPO ₄	5.0	"
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.0	"
cornsteep liquor	7.0	"
microcrystalline cellulose	30.0	"
Tween 80	2.0	มิลลิลิตร
FeSO ₄	5.0	มิลลิกรัม
ZnSO ₄	1.4	"
MnSO ₄	1.6	"
CoCl ₂	3.6	"
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับให้มี pH 5.0 ถ่ายใส่ลงพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อ

หมายเหตุ microcrystalline cellulose ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงต้องชั่งใส่พลาสติกก่อน แล้วจึงเติมสารอาหารลงไปให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ

5. Yeast malt broth (YMB)

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

yeast extract	3.0	กรัม
malt extract	3.0	"
bacto-peptone	5.0	"
glucose	20.0	"
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

6. F₂ medium (Punnapayak and Emert, 1986)

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0	กรัม
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2.2	"
CaCl ₂	1.2	"

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ภาคผนวก ข



วิธีการเตรียมสารเคมี

1. การวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส โดยการวิเคราะห์หา FPA ตามวิธีการของ Mandels และ Sternberg (1976)

- 1.1 นำ crude enzyme มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ
- 1.2 เติม 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) เชย่าให้เข้ากัน
- 1.3 นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 1 ชั่วโมง
- 1.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เชย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 1.5 เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 16 มิลลิลิตร เชย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุม (blank) ที่เตรียมจาก 0.05 M citrate buffer pH 4.8 จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน

2. การวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส โดยการวิเคราะห์หา CMC ตามวิธีการของ Acebal และคณะ (1986)

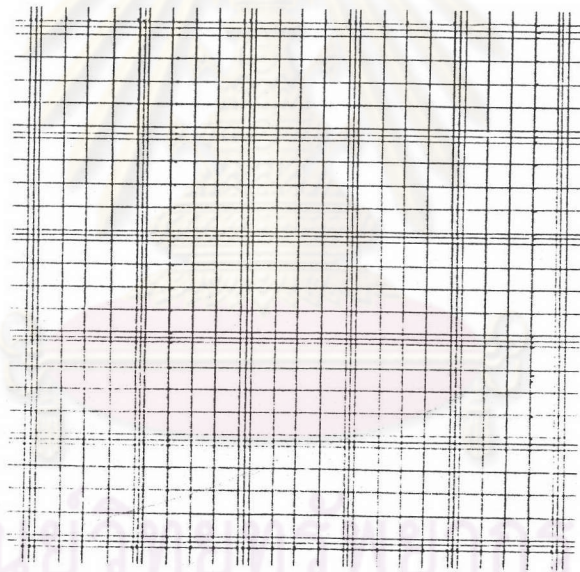
- 2.1 นำ crude enzyme มา 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ
- 2.2 เติม 0.1 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.95 มิลลิลิตร และเติม 2 เปอร์เซ็นต์ CMC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เชย่าให้เข้ากัน
- 2.3 นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 10 นาที
- 2.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เชย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4.2 เตรียมสารละลาย DNS 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 880 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย Rochell salt 255 กรัม ด้วยสารละลาย NaOH 4.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเทรวมกับสารละลาย DNS 1 เปอร์เซ็นต์ คนให้เข้ากัน

4.3 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1.1 และ 1.2 มาเทรวมกัน ก็จะได้สารละลาย DNS สารละลายนี้ต้องใส่ไว้ในขวดสีชา แล้วนำไปใส่ไว้ในตู้เย็นก่อนอย่างน้อย 1 คืน จึงจะนำไปใช้ได้

5. การนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Direct Microscopic Count โดยใช้ Counting chamber ของ Haemocytometer

เมื่อนำ Haemocytometer มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นดังภาพ



ประกอบด้วยช่องใหญ่จำนวน 25 ช่อง แต่ละช่องใหญ่อยังประกอบด้วยช่องเล็กอีก

25 ช่อง

วิธีการคำนวณ

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก) = 0.1 มม.³

สมมุติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องใหญ่ = X เซลล์

สมมุติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก = Y เซลล์

นั่นคือ X = 16Y เซลล์



เพราะฉะนั้น

ใน 0.1 มม ³	มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	Xx25 หรือ Yx16x25	เซลล์
ใน 1.0 มม ³	"	Xx25x10 หรือ Yx16x25x10	"
ใน 1.0 มล.	"	Xx25x10x1000 หรือ Yx16x25x10x1000	"
		= 25Xx10 ⁴ หรือ 4Yx10 ⁶	"

6. การทำกราฟน้ำตาลมาตรฐาน

6.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ใส่ในหลอดทดลอง

6.2 เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปตั้งในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

6.3 เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดๆละ 10 มล.

6.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ มาสร้างกราฟระหว่างค่า OD กับปริมาณน้ำตาลกลูโคส ดังรูปที่ ข.1

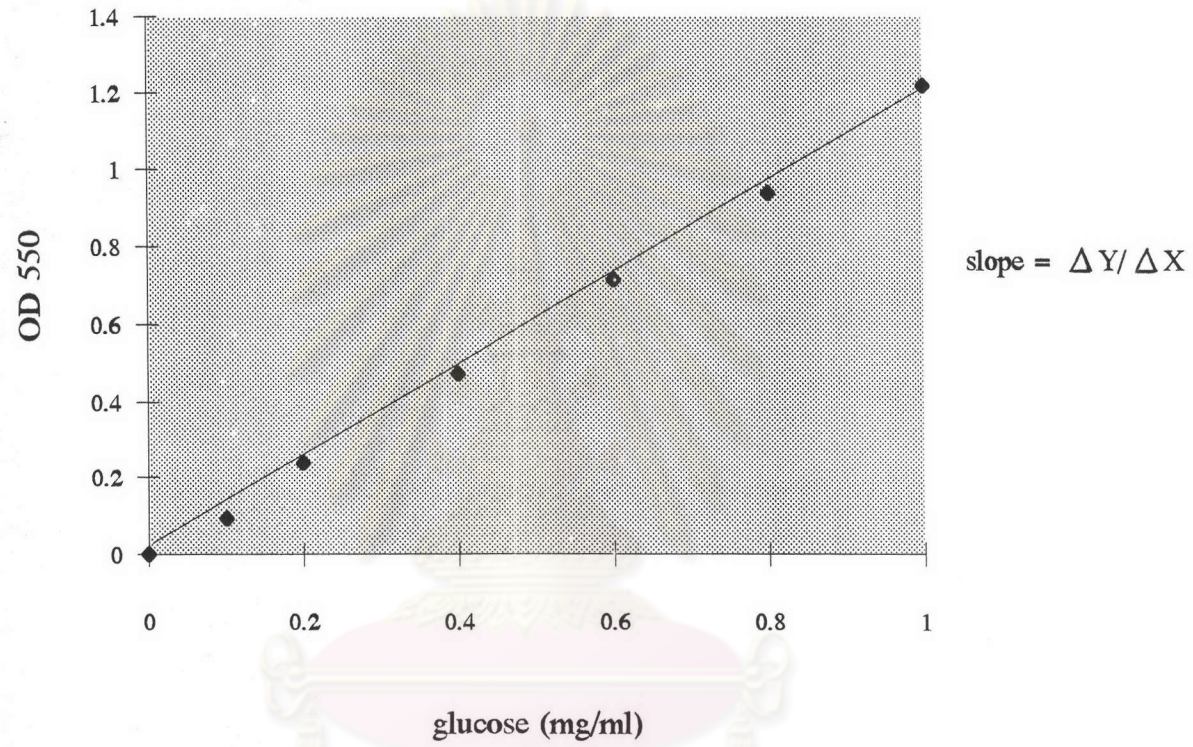
7. การทำกราฟโปรตีนมาตรฐาน

7.1 เตรียมสารละลาย BSA (Bovine Serum Albumin) ให้มีความเข้มข้น 0 0.02 0.04 0.06 0.08 0.10 0.12 0.14 0.16 0.18 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ใส่ในหลอดทดลอง

7.2 เติมสารละลาย Lowry C ลงไปหลอดๆละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

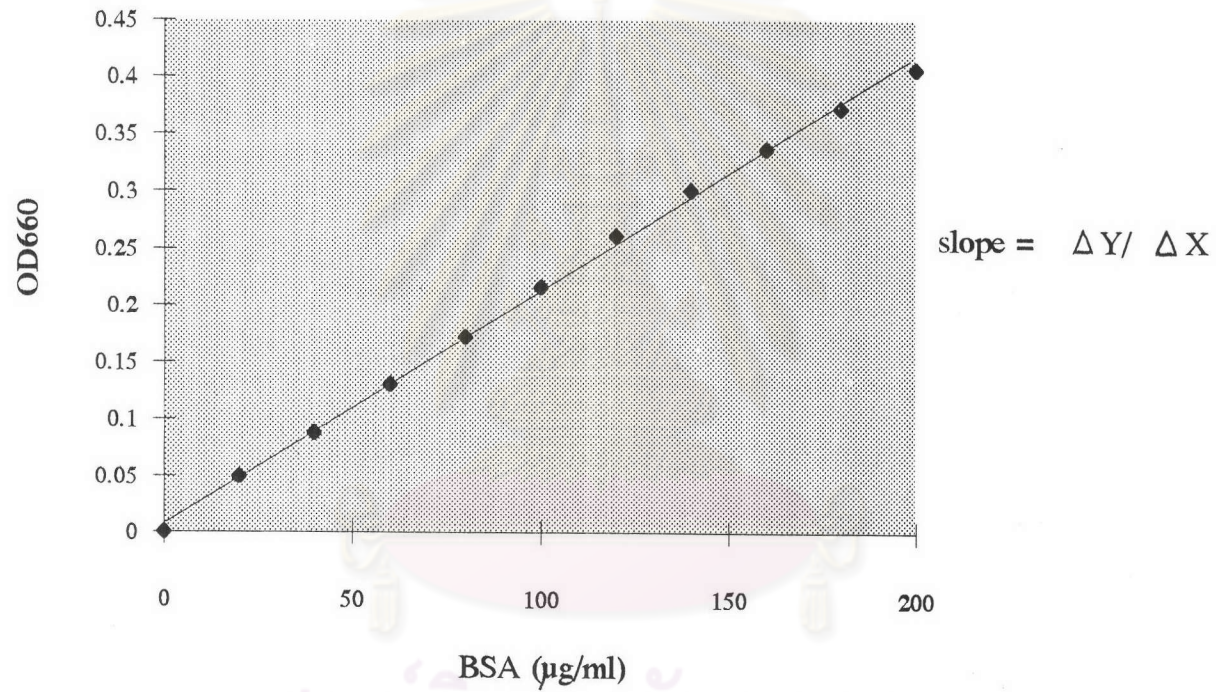
7.3 เติมสารละลาย Lowry D ลงไปหลอดๆละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

7.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ มาสร้างกราฟระหว่างค่า OD กับปริมาณของโปรตีน ดังรูปที่ ข.2



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ศูนย์วิจัยทางการแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของโปรตีน

8. การคำนวณหาค่า unit of enzyme ตามวิธีการของ The International Union of Biochemistry

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย
 ซับสเตรตให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ
 นั่นคือ

$$\begin{aligned} 1 \text{ หน่วยของเอนไซม์} &= 1 \text{ u mole ของซับสเตรตที่ถูกย่อยใน 1 นาที} \\ &= 1 \text{ u mole ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที} \\ &= 0.180 \text{ มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที} \end{aligned}$$

ในกรณีการคำนวณค่า FPA จะได้ว่า

$$\text{ถ้า } 0.180 \text{ มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า} = 1 \text{ หน่วย}$$

$$1.000 \text{ มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 60 นาที มีค่า} = \underline{1} \text{ หน่วย}$$

$$0.180 \times 60$$

$$\text{มีค่า} = 0.093$$

$$\text{สมมุติปลดปล่อยกลูโคส } X \text{ มิลลิกรัม ใน 60 นาที มีค่า} = (X) \times (0.093) \text{ หน่วย}$$

$$\text{จากการทดลองใช้เอนไซม์ } 0.5 \text{ มิลลิลิตร} = (X) \times (0.093) \text{ หน่วย}$$

$$\text{ถ้าใช้เอนไซม์ } 1.0 \text{ มิลลิลิตร} = \underline{(X) \times (0.093)} \text{ หน่วย}$$

$$0.5$$

$$\text{หรือ} = \frac{(\text{มิลลิกรัมกลูโคส}) \times (0.093)}{\text{มิลลิลิตรของเอนไซม์}} = \text{หน่วย/มล.}$$

มิลลิลิตรของเอนไซม์

ในกรณีการคำนวณค่า CMCase จะได้ว่า

$$\text{ถ้า } 0.180 \text{ มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า} = 1 \text{ หน่วย}$$

$$1.000 \text{ มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 10 นาที มีค่า} = \underline{1} \text{ หน่วย}$$

$$0.180 \times 10$$

$$\text{มีค่า} = 0.555$$

$$\text{สมมุติปลดปล่อยกลูโคส } X \text{ มิลลิกรัม ใน 10 นาที มีค่า} = (X) \times (0.555) \text{ หน่วย}$$

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.05 มิลลิลิตร = (X) x (0.555) หน่วย

ถ้าใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร = $\frac{(X) \times (0.555)}{0.05}$ หน่วย

0.05

หรือ = $\frac{(\text{มิลลิกรัมกลูโคส}) \times (0.555)}{\text{มิลลิลิตรของเอนไซม์}}$ = หน่วย/มล.

มิลลิลิตรของเอนไซม์

9. การคำนวณหาปริมาณของโปรตีน ตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951)

กำหนดให้

X = ปริมาณของโปรตีนที่เกิดขึ้น ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ (มก./มล.)

Y = ปริมาตรของสารละลายโปรตีนที่ใช้ทดสอบ (มล.)

นั่นคือ

$$\text{ปริมาณของโปรตีน} = \frac{X}{Y} = \text{มก./มล.}$$

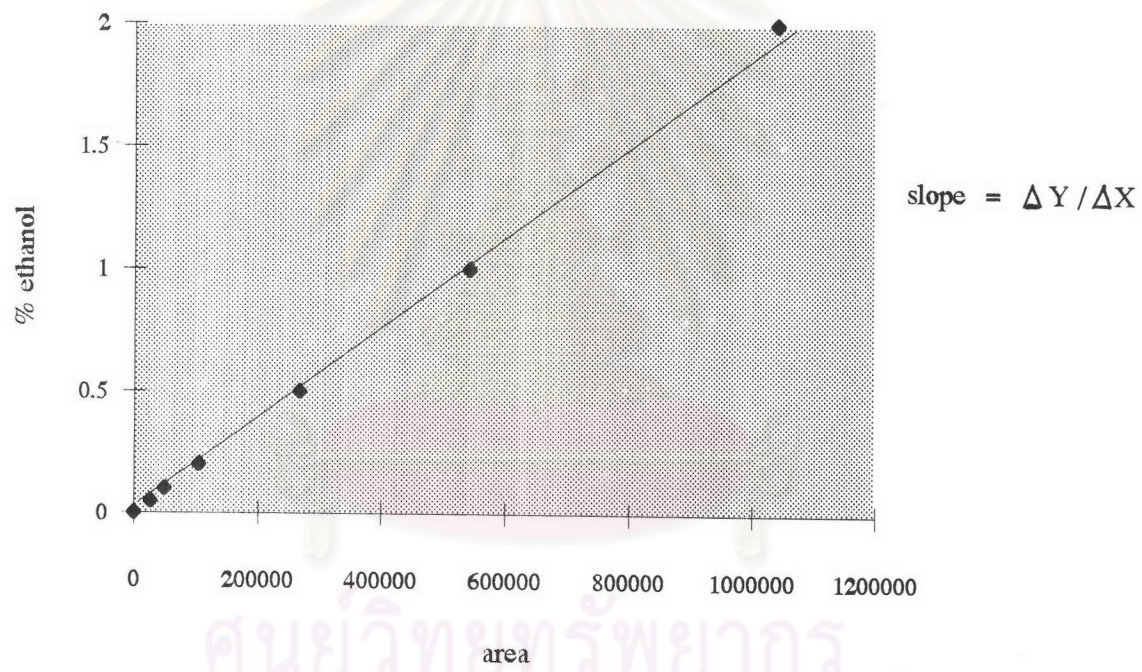
10. การคำนวณหาปริมาณแอลกอฮอล์

นำค่า area ที่ได้จากการวัดแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง gas liquid chromatograph ไปหาค่าปริมาณของแอลกอฮอล์ จากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ข.3) ผลที่ได้มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ นั่นคือ มีปริมาณแอลกอฮอล์ X กรัม ในสารละลาย 100 มล. หรือถ้าต้องการคิดให้มีหน่วย กรัม แอลกอฮอล์ต่อกรัมสับสเตรท (ก./ก.) จะได้ว่า

$$\frac{\text{ปริมาณแอลกอฮอล์ (ก./ 100 มล.)}}{\text{ปริมาณของสับสเตรทที่ใช้ (ก.)}} = \text{ก./ก.}$$

11. การเตรียม 0.04 M acetate buffer pH 5.0

ชั่ง sodium acetate มา 3.429 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร



รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของเอทานอล

แล้วเติม สารละลาย 1 M acetic acid ลงไป 14.8 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร
คนให้เข้ากัน

12. การเตรียม 1 M acetic acid

ตวงสารละลายกรดเข้มข้นของ acetic acid มา 60.22 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้
ครบ 1 ลิตร คนให้เข้ากัน

13. การเตรียม 1 M HCL

ตวง HCL เข้มข้น มา 97.33 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร คนให้เข้ากัน

14. การเตรียม 0.05 M citrate buffer pH 4.8

ชั่ง sodium citrate มา 14.71 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วเติม 1 M
HCL ลงไป 70 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร คนให้เข้ากัน
ถ้าเตรียม 0.1 M citrate buffer pH 4.8 ใช้ sodium citrate 29.42 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นายพรเทพ ถนนแก้ว เกิดวันที่ 4 สิงหาคม พ.ศ. 2512 ที่อำเภอสวี จังหวัดชุมพร
 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล คณะเกษตรศาสตร์บางพระ ในปีการศึกษา 2533 และเข้าศึกษาต่อ
 ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2534 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญา
 2537



ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย