รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : ศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
2. **โครงการวิจัย** : การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

   กิจกรรมที่ 1 : การศึกษาพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์และการผลิตเอนไซม์เพื่อผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวล
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส
4. **ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) :** Production of Enzymes Degrading of Lignocellulose
5. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง

นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน

1. นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล
2. นางสาวภรณี สว่างศรี
3. นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ

ลิกโนเซลลูโลส เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีบทบาทสำคัญในการนำมาผลิตพลังงานทดแทน แต่ยังมีปัญหาด้านการย่อยสลายให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือกลูโคสและไซโลส ซึ่งการย่อยสลายนั้นนอกจากการใช้ปฏิกิริยาทางเคมีแล้ว การใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติก็นับว่ามีบทบาทสำคัญมากขึ้น เอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสได้ดีได้แก่เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส จากการทดลองผลิตเอนไซม์ดังกล่าวโดยการศึกษาหาสับสเตรทที่เหมาะสมพบว่าเมื่อใช้เห็ดแครงเป็นจุลินทรีย์สำหรับผลิตเอนไซม์นั้น เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่าง ๆ แล้วตรวจดูวงใสอันเกิดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์พบว่า สับสเตรทที่เหมาะสมได้แก่เปลือกข้าวโพด รองลงมาได้แก่หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 และต้นเลา ตามลำดับโดยมีขนาดของวงใส 8 , 7.0 และ 7.0 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ก็สอดคล้องกับผลของประสิทธิภาพของเอนไซม์คือมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 15.5 , 14.5 และ 14.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ *Aspergillus*

niger S068 เป็นจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส และนำไปทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ด้วยวิธี congored diffusion method พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตได้ มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ การใช้ไซแลนเป็นสับสเตรท รองลงมาได้แก่ หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 และเปลือกข้าวโพด โดยมีขนาดของวงใส 9 , 7.5 และ 7.3 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ก็สอดคล้องกับผลของประสิทธิภาพของเอนไซม์คือมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 16.5 , 15.0 และ 14.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าวัสดุที่เหมาะสมในการนำมาผลิตเอนไซม์ด้วยเชื้อรา *A. niger* ได้แก่ ไซแลน หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1และเปลือกข้าวโพด และจะนำผลการทดลองไปขยายผลสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็กต่อไป

6. คำนำ

พลังงานจัดเป็นปัจจัยสำคัญและมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ หลายๆประเทศทั่วโลกจึงแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่ เพื่อเป็นหลักประกันความมั่นคงด้านพลังงานในระยะยาว ทั้งยังเป็นการลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากการใช้พลังงานที่ได้จากฟอสซิล เช่น น้ำมัน และ ถ่านหิน อันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อนในภาวะของภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงอย่างมาก ณ ปัจจุบัน น้ำมันเชื้อเพลิงซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญของโลกกำลังจะหมดลง แหล่งอาหารของโลกก็ลดลงเช่นเดียวกันเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกแบบทวีคูณในขณะที่ผลิตอาหารเพิ่มขึ้นในอัตราที่ลดลงเนื่องจากความแห้งแล้ง การใช้พื้นที่เพื่อการอยู่อาศัยมากขึ้นและภัยธรรมชาติต่างๆ จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนที่จะพัฒนาแหล่งของพลังงานเชื้อเพลิงเหลวจากแหล่งใหม่ที่ได้จากแหล่งคาร์บอนธรรมชาติโดยไม่รบกวนพืชอาหาร ซึ่งแหล่งของพลังงานรุ่นแรกได้แก่ ข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง อ้อยและอื่นๆ มีปริมาณจำกัดทั้งยังเป็นพืชอาหารและใช้ในการผลิตอาหารของโลก พืชพลังงานสำหรับใช้ในการผลิตเอทานอลแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรก คือ พืชน้ำตาล เช่น อ้อย ข้าวฟ่างหวาน หัวผักกาดหวาน กลุ่มที่ 2 คือ พืชแป้งที่มีหัวใช้สะสมอาหารเช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ พืชแป้งที่สะสมอาหารในรูปเมล็ดเช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าว ข้าวบาร์เลย์ และกลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ต้นพืช ต้นข้าวโพด ฟางข้าว หญ้าswitch grass กากชานอ้อย กากมันสำปะหลัง เป็นต้น หากแต่ความต้องการของมนุษย์ยังมีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามจำนวนประชากรที่เพิ่มสูงขึ้นในแต่ละปี ดังนั้นหลายประเทศจึงมีความพยายามอย่างยิ่งที่จะหาพลังงานทางเลือกอื่นในรูปแบบต่างๆ เช่น ก๊าซธรรมชาติ ไบโอดีเซล พลังงานลม น้ำ แสงอาทิตย์ เพื่อที่จะนำมาทดแทนน้ำมันปิโตรเลียม

ในปี ค.ศ. ๒๐๑๐ ทุกประเทศทั่วโลกหันมาให้ความสนใจกับการใช้ประโยชน์จากชีวมวลซึ่งจะเน้นการผลิตด้วยวัตถุดิบที่เป็นลิกโนเซลลูโลสเป็นหลัก แม้ว่าการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จะยังผลิตจากวัตถุดิบแป้งและน้ำตาล แต่เนื่องจากแป้งและน้ำตาลเป็นพืชอาหารอาจผลิตได้ไม่เพียงพอสำหรับการบริโภค จึงต้องใช้วัสดุ

อื่นทดแทน (พิสมัย, ๒๕๔๘) เช่นเดียวกับประเทศไทยซึ่งปัจจุบันกำลังประสบปัญหาแนวโน้มการใช้พลังงานที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และแหล่งพลังงานในประเทศมีอัตราการผลิตได้ไม่เพียงพอกับความต้องการในการใช้อุปโภคและบริโภคของประชากร ประกอบราคาน้ำมันซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญในตลาดโลกมีราคาแพง และมีอยู่อย่างจำกัด จึงจำเป็นต้องมีมาตรการเร่งรัด และสนับสนุนให้มีการศึกษา ค้นคว้า หาแหล่งพลังงานทดแทนซึ่งจะนำมาซึ่งพลังงานทางเลือกใหม่มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด การนำชีวมวลมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตเอทานอลเพื่อทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงอย่างน้ำมันปิโตรเลียม อาทิเช่น วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร และอุตสาหกรรม อาทิเช่น เปลือกหรือแกนสับปะรด ทลายปาล์ม น้ำกากส่าจากโรงงานสุรา เศษไม้ขี้เลื่อยจากโรงงานทำไม้ ของเสียจากโรงงานทำกระดาษ ของเหลือใช้หลังจากการเก็บเกี่ยว เช่น กากถั่วเหลือง ฟางข้าว รำข้าว ชานอ้อย ซังและเปลือกข้าวโพด ขี้เลื่อยเป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรภายในประเทศ ซึ่งมีการรายงานประมาณการของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของประเทศไทย ดังตารางที่๑

ตารางที่ ๑ ปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	**ปริมาณ (ล้านตัน/ปี)**
๑. ฟางข้าว	๔๐
๒. ใบ ลำต้น เปลือกและซังข้าวโพด	๖.๔
๓. ลำต้นและใบสับปะรด	๔
๔. ปาล์ม : ทะลายเปล่า กากเนื้อ เส้นใย กาก เมล็ดในและกะลา	๒.๗
๕. ลำต้นและใบมันสำปะหลัง	๑.๗
๖. กาบมะพร้าว กะลาเปล่า และกากมะพร้าว	๑.๑
รวม	**๕๕.๙**

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก มักมีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยเฉพาะเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส จัดเป็นโพลิเซคคาไรด์ที่มีมากในผนังเซลล์ของพืชทุกชนิด เซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลซึ่งต่อกันเป็นสายยาว การตัดเซลลูโลสอาจตัดด้วยกรดหรือเอนไซม์ พืชแต่ละชนิดก็มีสัดส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินแตกต่างกัน ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากชีวมวลจำเป็นต้องเปลี่ยนโครงสร้างของพืชให้ย่อยง่ายขึ้น แยกเอาเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ออกด้วยปฏิกิริยาของกรดหรือเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรา แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส เป็นต้น เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลแล้วหมักด้วยยีสต์จนได้แอลกอฮอล์ แต่ข้อดีของการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารเหล่านี้เมื่อเทียบกับวิธีทางเคมี คือ การเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์มีความจำเพาะกับสับสเตรทมากกว่า เอนไซม์ทำงานในสภาวะแวดล้อมที่ไม่รุนแรง และไม่มีการสูญเสียสับสเตรทในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ดังนั้นในด้านอุตสาหกรรมจึงได้มีการนำเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) และไซแลนเนส (Xylanase) มาใช้อย่างกว้างขวาง เอนไซม์เซลลูเลส ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ น้ำตาลกลูโคส และอาหารสัตว์บาง

ชนิดเป็นต้น ส่วนเอนไซม์ไซแลนเนส สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมฟอกสีเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมอาหาร และอาหารสัตว์ เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวล เป็นการใช้ประโยชน์จากความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสารประกอบเหล่านี้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ให้สามารถกลับมาใช้ประโยชน์ได้คุ้มค่ามากยิ่งขึ้น ทั้งยังมีข้อดีหลายประการ เช่น เป็นการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในท้องถิ่นนั้น ๆ ก่อให้เกิดการจ้างงานในท้องถิ่น ลดภาระการพึ่งพาแหล่งพลังงานจากต่างประเทศ ทำให้เกษตรกรมีรายได้ ลดการสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศ มีความมั่นคงทางพลังงานเพิ่มขึ้น ใช้เทคโนโลยีที่ไม่ซับซ้อนในกระบวนการผลิตจึงพึ่งพาตนเองได้ พลังงานที่ได้ในรูปของเหลวสามารถนำไปใช้กับเทคโนโลยียานยนต์ในยุคปัจจุบัน ดังนั้นการวิจัยเพื่อศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซแลนเนส จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลจากชีวมวลให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ในการทดลองนี้จะได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลุ่มที่ช่วยย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสซึ่งมีหลายชนิดด้วยกัน

7. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1. วัสดุสำหรับใช้เป็นซับเตรท ได้แก่

1. เปลือกข้าวโพดป่น
2. อากาเว่ป่น
3. เปลือกมันสำปะหลังบด
4. ฟางข้าวป่น
5. หญ้าเนเปียร์ป่น
6. เลาป่น

2. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. CMC-Na
2. $(NH_4)_2SO_4$
3. K_2HPO_4
4. $MgSO_2\ 7H_2O$
5. KCl
6. $CaCl_2$

3.อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

1. ตู้บ่มเชื้อ
2. ตู้เขย่า
3. flask
4. ไมโครปิเปตขนาด P1000, P200, P100, P2 ไมโครลิตร

5. หลอดทดลอง (tube)

6. เครื่อง spectrophotometer สำหรับใช้วัดค่าดูดกลืนแสง (O.D.)

วิธีดำเนินการ

การผลิตเอนไซม์

1. การเตรียมกล้าเชื้อ นำ *Aspergillus niger* และเห็ดแครงจากเชื้อที่เก็บรวบรวมไว้มาทำให้เจริญเติบโตในอาหาร PDA (potato dextrose agar) เป็นเวลา 3 วัน แล้วตัดเฉพาะปลายเส้นใยขนาด 5 มิลลิเมตรไปวางบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PDA เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำไปใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์ต่อไป

2. การศึกษาซับเสรตที่เหมาะสม สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

จัดเตรียมซับเสรต โดยการเก็บตัวอย่างพืช 6 ชนิด ได้แก่ เปลือกข้าวโพด อากาเว่ เปลือกมันสำปะหลัง ฟางข้าว หญ้าเนเปียร์ปากช่อง1 และเลา นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วอบให้แห้งด้วยเตาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 1 สัปดาห์แล้วนำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดพืชให้มีขนาดเล็กเก็บไว้ใช้ต่อไป

จากนั้นทำการวางทรีตเมนต์ตาม กรรมวิธีดังนี้

1. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรต CMC-Na 5 กรัม/ลิตร
2. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรต เปลือกข้าวโพดป่น 5 กรัม/ลิตร
3.สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรตอากาเว่ป่น 5 กรัม/ลิตร
4. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรตเปลือกมันสำปะหลังบด 5 กรัม/ลิตร
5. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรตฟางข้าวบด 5 กรัม/ลิตร

สูตรอาหารพื้นฐาน Basal media ต่อปริมาณอาหาร 1 ลิตร

(NH4)2SO4	0.5 กรัม
K2HPO4	1 กรัม
MgSo2 7H2O	0.2 กรัม
KCL	0.5 กรัม
CaCl2	0.1 กรัม

โดยการเตรียมอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าว ในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมอาหารเหลวปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อหน่วยทดลอง จากนั้นใช้ส่วนโคนของทิปขนาด 1000 มิลลิลิตรกดลงบนกล้าเชื้อเพื่อให้มีขนาดเท่า ๆ กัน ใส่ลงฟลาสก์ละ 3 ชิ้น นำไปเขย่าที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 rpm . เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาตกตะกอนที่ 10000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เอาเฉพาะส่วนใสมาใช้งานต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Congored diffusion assay

ทำการเตรียมอาหารแข็งที่มีซับเสรตต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบโดยเตรียมอาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเติมวุ้น แล้วเทในจานเพาะเชื้อขนาด 9 เซนติเมตร ใช้โคนทิปขนาด 1000 ไมโครลิตรเจาะวุ้นให้เป็นหลุม แล้วดูดเอนไซม์ที่ผลิตได้จากอาหารเหลวที่ผ่านการตกตะกอน ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เจาะไว้นั้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นราดด้วยสารละลายคองโกเรด ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้ววัดขนาดวงใสที่ได้ ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เก็บข้อมูลบันทึกผลต่อไป

การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS method

นำสารละลายที่ได้จากการผลิตเอนไซม์มาทดสอบการผลิตน้ำตาลกลูโคสดังนี้

1. ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย DNS ลงไป 2 ml ผสมให้เข้ากัน
3. ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยการแช่น้ำแข็ง
4. เติมน้ำกลั่น 10 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่า OD520 แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าจากค่ากราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส หาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง

ระยะเวลาดำเนินการ ปีที่เริ่มต้น 2557 ปีที่สิ้นสุด 2558

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ตำบลรังสิต อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลอง

เมื่อทำการเลี้ยงเห็ดแครงในอาหาร 5 ชนิดตามกรรมวิธีต่าง ๆ จำนวน 3 ซ้ำ ตามกรรมวิธีดังนี้

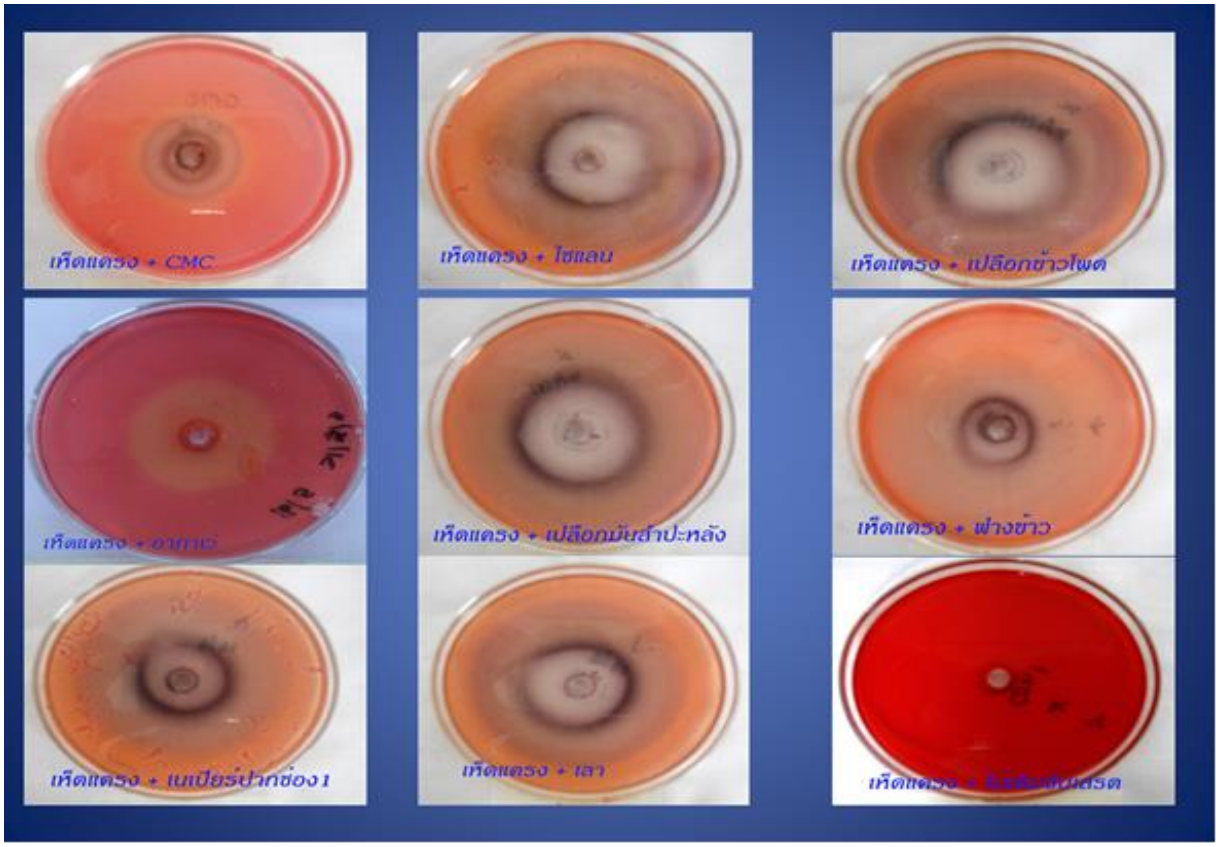
1. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรต CMC-Na 5 กรัม/ลิตร
2. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรต ไซแลน 5 กรัม/ลิตร
3. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรต เปลือกข้าวโพดป่น 5 กรัม/ลิตร
4. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรตอากาเว่ป่น 5 กรัม
5. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรตเปลือกมันสำปะหลังบด 5 กรัม/ลิตร
6. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรตฟางข้าวบด 5 กรัม/ลิตร
7. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรตหญ้าเนเปียร์ปากช่อง1 5 กรัม/ลิตร
8. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรตเลา 5 กรัม/ลิตร

9. สูตรอาหารพื้นฐาน + ไม่เติมซับเสรต (ควบคุม)

โดยเลี้ยงให้เจริญเติบโตจนเข้าสู่ช่วงที่มีการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ได้แล้ว ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำของเหลวในฟลาสก์ที่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ นั้น ไปทดสอบการย่อยสับสเตรทชนิดต่าง ๆ พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตได้ มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ การใช้เปลือกข้าวโพดเป็นสับสเตรท รองลงมาได้แก่ หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 และต้นเลาโดยมีขนาดของวงใส 8 , 7.0 และ 7.0 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ก็สอดคล้องกับผลของประสิทธิภาพของเอนไซม์คือมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 15.5 , 14.5 และ 14.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าวัสดุที่เหมาะสมในการนำมาผลิตเอนไซม์ได้แก่ เปลือกข้าวโพด หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 และต้นเลา โดยนำผลการทดลองไปขยายผลสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็กต่อไป

ตารางที่ 1 ผลการย่อยสลายซับสเตรทบนอาหารชนิดต่าง ๆ ของเห็ดแครงในอาหารเหลวสูตรพื้นฐานร่วมกับซับสเตรทชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

สูตรอาหาร	**ขนาดวงใส(cm)**	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)**	**หมายเหตุ**
1. สูตรอาหารพื้นฐาน+CMC-Na	3.0	6.5	
2.สูตรอาหารพื้นฐาน+ไซแลน	4.0	8.2	
3. สูตรอาหารพื้นฐาน+เปลือกข้าวโพด	8.0	15.5	
4.สูตรอาหารพื้นฐาน+อากาเว่	4.0	8.5	
5. สูตรอาหารพื้นฐาน+เปลือกมันสำปะหลัง	4.8	9.6	
6. สูตรอาหารพื้นฐาน+ฟางข้าว	2.2	5.6	
7. สูตรอาหารพื้นฐาน+หญ้าเนเปียร์ปากช่อง1	7.0	14.5	
8. สูตรอาหารพื้นฐาน+เลา	7.0	14.0	
9.สูตรอาหารพื้นฐาน+ ไม่เติมซับเทรต	0	0	



ภาพที่ 1 ผลการย่อยสลายซับเทรตชนิดต่าง ๆ ของ เห็ดแครง บนอาหารที่มีซับเสรตชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ CMC – Na, ไซแลน, เปลือกข้าวโพด, อากาเว่, เปลือกมันสำปะหลัง, ฟางข้าว , หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1, ต้นเลา และควบคุมโดยไม่เติมสับสเตรท

การเลี้ยง ***Aspergillus niger***

โดยการเลี้ยงราในอาหาร 5 ชนิดตามกรรมวิธีต่าง ๆ จำนวน 3 ซ้ำ ได้แก่

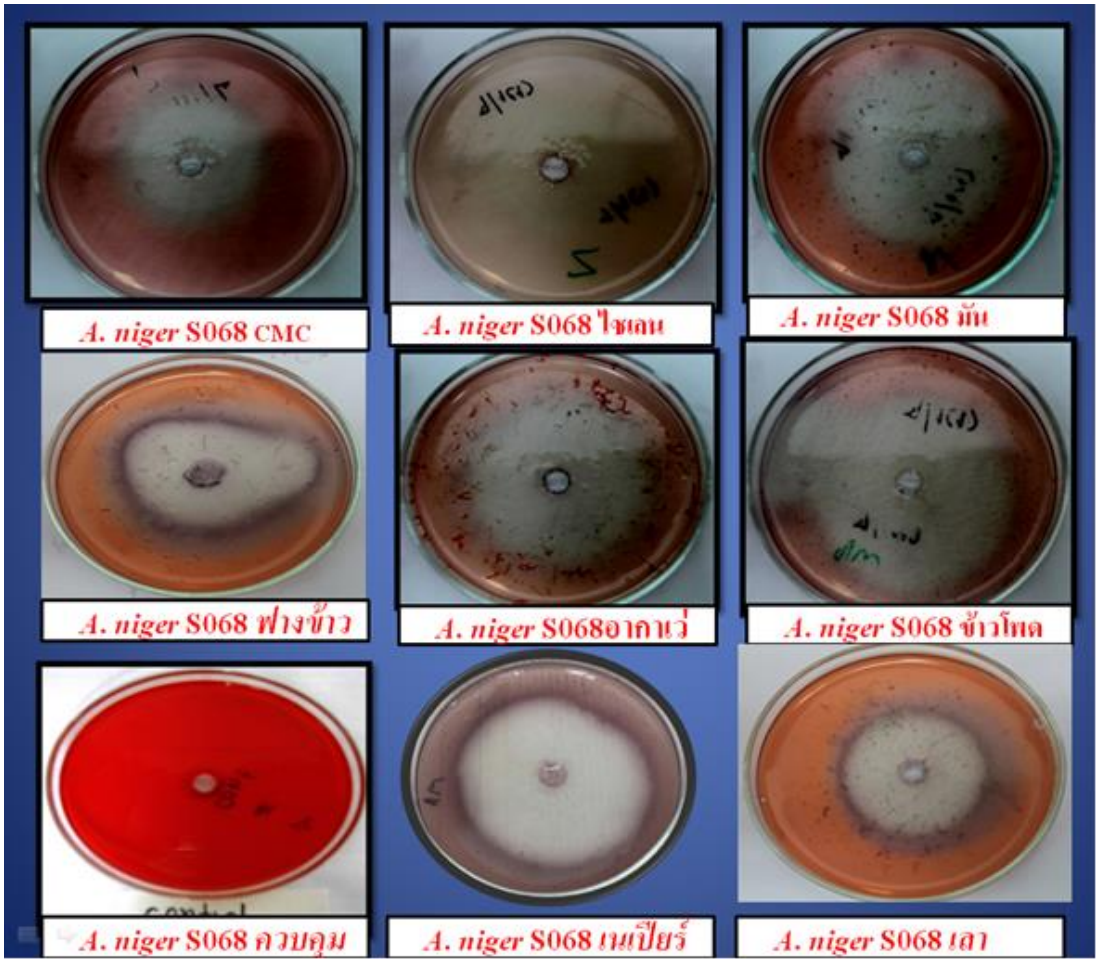
1. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรต CMC-Na 5 กรัม/ลิตร
2. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรต ไซแลน 5 กรัม/ลิตร
3. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรต เปลือกข้าวโพดป่น 5 กรัม/ลิตร
4. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรตอากาเว่ป่น 5 กรัม
5. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรตเปลือกมันสำปะหลังบด 5 กรัม/ลิตร
6. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรตฟางข้าวบด 5 กรัม/ลิตร
7. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรตหญ้าเนเปียร์ปากช่อง1 5 กรัม/ลิตร
8. สูตรอาหารพื้นฐาน + ซับเสรตเลา 5 กรัม/ลิตร
9. สูตรอาหารพื้นฐาน + ไม่เติมซับเสรต (ควบคุม)

โดยเลี้ยงให้เจริญเติบโตจนเข้าสู่ช่วงที่มีการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ได้แล้ว ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำของเหลวในฟลาสก์ที่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ นั้น ไปทดสอบการย่อยสับสเตรทชนิดต่าง ๆ พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตได้ มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ การใช้ไซแลนเป็นสับสเตรท

รองลงมาได้แก่ หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 และเปลือกข้าวโพด โดยมีขนาดของวงใส 9 , 7.5 และ 7.3 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ก็สอดคล้องกับผลของประสิทธิภาพของเอนไซม์คือมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 16.5 , 15.0 และ 14.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าวัสดุที่เหมาะสมในการนำมาผลิตเอนไซม์ด้วยเชื้อรา *A. niger* ได้แก่ ไซแลน หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1และเปลือกข้าวโพด โดยนำผลการทดลองไปขยายผลสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็กต่อไป

ตารางที่ 2 ผลการย่อยสลายซับเสรตบนอาหารชนิดต่าง ๆ ของ Aspergillus niger ในอาหารเหลวสูตรพื้นฐานร่วมกับซับเสรตชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

สูตรอาหาร	**ขนาดวงใส(cm)**	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)**	**หมายเหตุ**
1. สูตรอาหารพื้นฐาน+CMC-Na	3	6.5	
2. สูตรอาหารพื้นฐาน+ไซแลน	9.0	16.5	
3. สูตรอาหารพื้นฐาน+เปลือกข้าวโพด	7.3	14.0	
4. สูตรอาหารพื้นฐาน+อากาเว่	7.2	14.0	
5. สูตรอาหารพื้นฐาน+เปลือกมันสำปะหลัง	6.5	11.0	
6. สูตรอาหารพื้นฐาน+ฟางข้าว	6.0	10.5	
7. สูตรอาหารพื้นฐาน+หญ้าเนเปียร์ปากช่อง1	7.5	15.0	
8. สูตรอาหารพื้นฐาน+เลา	4.0	7.5	
9. สูตรอาหารพื้นฐาน+ ไม่เติมซับเทรต	0	0	



ภาพที่ 2 ผลการย่อยสลายซับเทรตชนิดต่าง ๆ ของ *Aspergillus niger* บนอาหารที่มีซับเสรตชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ CMC – Na, ไซแลน, เปลือกข้าวโพด, อากาเว่, เปลือกมันสำปะหลัง, ฟางข้าว , หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1, ต้นเลา และควบคุมโดยไม่เติมสับสเตรท

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากการทดลองผลิตเอนไซม์ดังกล่าวโดยการศึกษาหาสับสเตรทที่เหมาะสมพบว่าเมื่อใช้เห็ดแครงเป็นจุลินทรีย์สำหรับผลิตเอนไซม์นั้น เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่าง ๆ แล้วตรวจดูวงใสอันเกิดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์พบว่า สับสเตรทที่เหมาะสมได้แก่เปลือกข้าวโพด รองลงมาได้แก่หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 และต้นเลา ตามลำดับโดยมีขนาดของวงใส 8 , 7.0 และ 7.0 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ก็สอดคล้องกับผลของประสิทธิภาพของเอนไซม์คือมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 15.5 , 14.5 และ 14.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ *Aspergillus niger* S068 เป็นจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส และนำไปทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ด้วยวิธี congored diffusion method พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ การใช้ไซแลนเป็นสับสเตรท รองลงมาได้แก่ หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 และเปลือกข้าวโพด โดยมีขนาดของวงใส 9 , 7.5 และ 7.3 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าปริมาณ

น้ำตาลรีดิวซ์ ก็สอดคล้องกับผลของประสิทธิภาพของเอนไซม์คือมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 16.5 , 15.0 และ 14.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าวัสดุที่เหมาะสมในการนำมาผลิตเอนไซม์ด้วยเชื้อรา *A. niger* ได้แก่ ไซแลน หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1และเปลือกข้าวโพด และจะนำผลการทดลองไปขยายผลสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็กต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

นำผลการวิจัยไปใช้ในการต่อยอดงานวิจัยการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

11. คำขอบคุณ

12. เอกสารอ้างอิง

พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล. 2548. Biofuel Roadmap, APEC Symposium on Foresighting Future Fuel Technology. ณ อาคารสำนักงานใหญ่ บริษัทปตท. จำกัด (มหาชน) วันที่ 28 พฤศจิกายน 2548.

13. ภาคผนวก

สูตรอาหารพื้นฐาน Basal media ต่อปริมาณอาหาร 1 ลิตร

(NH4)2SO4	0.5 กรัม
K2HPO4	1 กรัม
MgSo2 7H2O	0.2 กรัม
KCL	0.5 กรัม
CaCl2	0.1 กรัม

การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Congored diffusion assay

ทำการเตรียมอาหารแข็งที่มีซับเสรตต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบโดยเตรียมอาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเติมวุ้น แล้วเทในจานเพาะเชื้อขนาด 9 เซนติเมตร ใช้โคนทิปขนาด 1000 ไมโครลิตรเจาะวุ้นให้เป็นหลุม แล้วดูดเอนไซม์ที่ผลิตได้จากอาหารเหลวที่ผ่านการตกตะกอน ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เจาะไว้นั้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นราดด้วยสารละลายคองโกเรด ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้ววัดขนาดวงใสที่ได้ ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เก็บข้อมูลบันทึกผล

การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS method

นำสารละลายที่ได้จากการผลิตเอนไซม์มาทดสอบการผลิตน้ำตาลกลูโคสดังนี้

1. ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย DNS ลงไป 2 ml ผสมให้เข้ากัน
3. ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยการแช่น้ำแข็ง
4. เติมน้ำกลั่น 10 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่า OD520 แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าจากค่ากราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส หาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง