รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

----

1. **ชุดโครงการวิจัย** : ศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
2. **โครงการวิจัย** : การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลโดย ใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

   กิจกรรมที่1 : การศึกษาพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์และ การผลิตเอนไซม์เพื่อผลิตไบโอเอทานอล จากชีวมวล
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** **:** การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายชีวมวล ระดับอุตสาหกรรมขนาดย่อม
4. **ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) :** ระบุชื่อการทดลองตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

5. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง

   นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ

   สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

   ผู้ร่วมงาน

   1. นายพินิจ จิรัคคกุล ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น

   2. นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล

   3. นางสาวภรณี สว่างศรี

   4. นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์

   สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ

การผลิตเอนไซม์ ลงในถังหมักขนาดย่อม เป็นงานวิจัยที่ได้นำเทคโนโลยีทางด้านการผลิตเอนไซม์มาศึกษาการพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และการผลิตเอนไซม์เพื่อผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวล โดยใช้เชื้อเห็ดแครง และเชื้อ *Aspergillus niger* เป็นกล้าเชื้อในการทดลอง ซึ่งการทดลองของเชื้อเห็ดแครง ได้ใช้เปลือกข้าวโพดบดเป็นวัสดุหลักในการหมักเชื้อ ส่วนการทดลองของเชื้อ *Aspergillus niger* ใช้หญ้าเนเปียบดเป็นวัสดุหลักในการหมัก เลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลว PDA เพื่อเป็นซับเตรทปริมาณ 30 ลิตร ใช้อาหาร Basal media 270 ลิตร และวัสดุหลักคือเปลือกข้าวโพด และหญ้าเนเปียอย่างละ 9 กิโลกรัม ต่อการทดลอง จะได้

ปริมาณ 300 ลิตร ต่อการทดสอบเชื้อหนึ่งตัวอย่าง จากนั้นเดินเครื่องการทำงานของถังหมัก โดยการกวนของใบพัด และเก็บตัวอย่างส่วนน้ำใส เพื่อนำไปวัดค่า ทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Congored diffusion assay เตรียมอาหารแข็งที่มีซับเสรตต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ ใช้โคนทิปขนาด 1000 ไมโครลิตร เจาะวุ้นให้เป็นหลุม แล้วดูดเอนไซม์ที่ผลิตได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เจาะไว้ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นล้าง congored แล้ววัดขนาดวงใสที่ได้ เก็บข้อมูลบันทึกผล จากผลที่ได้เชื้อทั้ง 2 ชนิด ได้แก่เชื้อเห็ดแครง และเชื้อรา *Aspergillus* ในการทดสอบในถังหมักขนาดย่อม โดยเชื้อเห็ดแครง การทดสอบการเกิด clear zone จะเกิดการย่อยของอาหาร CMC และ ข้าวโพดได้ดีที่สุด ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* จากการทดสอบการเกิด clear zone จะเกิดการย่อยทั้งของอาหาร CMC, Xylan และหญ้าเนเปียได้ดี จะพบว่าอาหาร BSS ที่ใช้เป็นตัว control บางวันของการทดลองได้เกิดวง clear zone ซึ่งทำให้ไม่สอดคล้องกับผลการทดลอง อาจเนื่องมาจากผลของการทดลองนอกสถานที่ ไม่ใช่ห้องปฏิบัติการของการทดลองจึงไม่เหมาะสม ทำให้ได้ผลของค่า clear zone ไม่สม่ำเสมอและคลาดเคลื่อนได้ ซึ่งการทดลองการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายชีวมวลระดับอุตสาหกรรมขนาดย่อม นอกจากวัสดุและเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้นั้น เราจะเพิ่มศักยภาพในการผลิตน้ำตาลให้สูงขึ้นต่อไปในอนาคต

6. คำนำ

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต ปัจจุบันเอนไซม์มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิด เนื่องจากสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง และมีความปลอดภัยสูง จึงมีการใช้เอนไซม์กันอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารและยา รวมทั้งอุตสาหกรรมการผลิตสารบางชนิด อุตสาหกรรมผงซักฟอก และอื่นๆ เช่น Amylase จาก *Aspergillus niger* ใช้ปรับปรุงรสชาติ สี และคุณภาพขนมปัง (สมใจ , 2555) Glucose oxidase ใช้เป็น antioxidant ป้องกันการเปลี่ยนแปลงสี กลิ่น และรส ของผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม ใช้กำจัดกลูโคสจากไข่ในการผลิตไข่ผง เพื่อป้องกันการเกิดสีและกลิ่นที่ไม่ดี หรือใช้วิเคราะห์น้ำตาลในเลือด เป็นต้น ซึ่งแหล่งของเอนไซม์ในอุตสาหกรรมได้มาจากสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ แต่แหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมในปัจจุบันได้แก่ จุลินทรีย์ เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ ดังนี้ คือจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ปริมาณมากๆได้ในระยะเวลาสั้น โดยใช้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าใช้การผลิตจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และมีขนาดเล็กจึงใช้พื้นที่น้อย นอกจากนี้ยังสามารถเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก และผลิตได้ตลอดเวลาโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่คิดการทำได้ดดยวิธีการง่ายๆ และใช้เวลาไม่นานนัก ซึ่งจุลินทรีย์หลายชนิดผลิตเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาชนิดเดียวกันได้ แต่มีสมบัติบางอย่างต่างกัน จึงสามารถเลือกใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมในสภาวะที่

แตกต่างกันได้ตามต้องการ นอกจากนี้ในการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์โดยการปรับปรุงพันธุกรรม หรือโดยการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม สามารถทำได้ง่ายกว่าสิ่งมีชีวิตอื่น

จุลินทรีย์ที่ในการผลิตเอนไซม์มีหลายชนิดที่สำคัญ และนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆปริมาณที่สุด ได้แก่ จุลินทรีย์ในจีนัส *Bacillus* และ *Aspergillus* โดยเฉพาะ *B.amyloliguefacieus* (เดิมเรียก *B.subtilis*) , *A.oryzae* และ *A.niger* ซึ่งมีความสำคัญในการผลิตเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (extra alular enzyme) และได้รับการยอมรับว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ปลอดภัย (GRAS , qenerally recognized as safe) นอกจากนี้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Kluyveromyces fragilis* ก็ได้รับการยอมรับว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ปลอดภัยเช่นกัน

อย่างไรก็ตามพืช และสัตว์ ก็ยังคงมีความสำคัญในการผลิตเอนไซม์บางชนิด เพื่อใช้ในงานเฉพาะบางอย่าง เช่น อะไมเลส (amylases) จากมอล์ล ใช้ในการผลิตเบียร์ เรนนิน (rennin) จากกระเพาะลูกวัว ใช้ในการผลิตเนยแข็ง และในกรณีที่เอนไซม์จากพืชและสัตว์มีกิจกรรมสูงมาก การสกัดเอนไซม์จากพืชและสัตว์โดยตรงจะใช้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการหมักจากจุลินทรีย์ เช่น ปาเปน (papain) จากมะละกอ และโบรมิแลน (bromelain) จากสับปะรด เป็นต้น เอนไซม์เซลลูเลส Cellulase ในต่างประเทศนิยมผลิตจาก *Trichodermareesei*

เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส และอินเทอร์มีเดียต แบ่งออกได้ดังนี้

- เอนโดกลูคาเนส (Endoglucanases) หรือ 1,4 (1,3: 1,4)-β -D-glucan4-hlucanohydrolases, EC 3.2.1.4 เอนไซม์นี้ไม่สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสส่วนที่เป็นผลึกของฝ้ายได้ แต่สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสส่วนที่ไม่เป็นผลึก (amorphous) ของฝ้าย กระดาษและอนุพันธ์เซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไฮดรอกซีเมทิลเซลลูโลสได้ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจะสลายพันธะบีตา-ไกลโคไซด์ โดย random hydrolysis ทำให้ความหนืดลดลงอย่างรวดเร็วและมีหมู่รีดิวซิงเพิ่มขึ้น ผลิตผลจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะได้เป็น น้ำตาลกลูโคส เซลโลไบโอส และเซลโลเดกซ์ทรินที่มีขนาดโมเลกุลต่าง ๆ กัน

- เซลโลไบโอไฮโดรเลส (cellobiohydrolases) 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolases,EC 3.2.1.91 ซึ่งเป็น exo-splitting enzyme จะไฮโดรไลซ์เซลลูโลสส่วนที่ไม่เป็นผลึก โดยจะตัดพันธะได้เป็นเซลโลไบโอสจากปลายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซิง (nonreducing) ของโมเลกุลเซลลูโลส เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเซลโลไบโอ-ไฮโดรเลส จะเสริมฤทธิ์ กันในการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสที่อยู่ในรูปผลึก แต่ยังไม่มีคำอธิบายกลไกที่เกิดขึ้น

- เอกโซกลูโคไฮโดรเลส (exoglucohydrolases) 1,4-β -D-glucan glucobiohydrolase,EC 3.2.1.74 เอนไซม์นี้จะไฮโดรไลซ์จากปลายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซิงของเซลโลเดกซ์ทรินได้เป็นน้ำตาลกลูโคส อัตราการไฮโดรไลซิสจะลดลงเมื่อความยาวของสายสับสเตรตสั้นลง

- บีตา-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) หรือ (β -D-glucoside glucohydrolase EC 3.2.1.21) จะไฮโดรไลซ์โมเลกุลของเซลโลไบโอสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และไฮโดรไลซ์พันธะจากปลายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซิงของเซลโลเดกซ์ทรินที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก อัตราการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสจะเพิ่มขึ้นเมื่อความยาวของสายสับสเตรตสั้นลง และไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสได้รวดเร็วที่สุด

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) คือ คาร์โบไฮเดรตที่มากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส และมีลักษณะคล้ายกันยกเว้นการสลายตัวในสารละลายเคมีได้ง่ายกว่าจึงย่อยได้ง่ายกว่าเซลลูโลส เฮไมเซลลูโลสเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่อยู่ในรูป simple sugar (มี 5 คาร์บอน และ uronic acid) เพคติน (pectin) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งของผนังเซลล์พืช บางทีอาจรวมอยู่กับเฮไมเซลลูโลส เพคตินจะย่อยได้ง่าย เช่น กากส้มจะมีเพคตินอยู่มาก ส่วนลิกนิน (lignin) เป็นส่วนคาร์โบไฮเดรตที่แข็งแรงมากสุดของพืช หากมีลิกนินประกอบอยู่มากจะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เอนไซม์ xylanase ในขบวนการผลิตเยื่อจะช่วยในการย่อย xylan ซึ่งจับอยู่กับลิกนินทำให้การกำจัดลิกนินในขบวนการ bleaching ง่ายขึ้น (Viikari et al., 1994; Buchert et al., 1994) จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายทางชีวภาพจะมีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง โดยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมักจะมีความจำเพาะในการย่อยสลายสับสเตรท ดังนั้นการย่อยสลายเศษซากพืชซากสัตว์ในธรรมชาติจึงเป็นผลรวมมาจากการทำงานของจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งอาจมีการสร้างเอนไซม์ที่มีหน้าที่เหมือนหรือต่างกันและสร้างในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับความสามารถของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโครงสร้างพืชที่มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ พบว่าเซลลูโลสสามารถต้านทานน้ำย่อยของสัตว์ชั้นสูงหรือสารเคมีธรรมดา แต่ถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วโดยจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส เช่น เชื้อรา แอคติโนมัยซีส โปรโตซัว และแบคทีเรีย อาทิเช่น Geobacillus pallidus G. debilis (Lynd et al., 2002). Pseudomonas sp. (Wolff et al., 1986) Clostridium thermocellum (Cornet et al., 1983) Cellulomonas fimi (Whittle et al., 1982) Thermomonospora sp. (Collmer and Wilson, 1983) Bacillus subtilis (Koide et al., 1986) นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบที่เป็นไซแลน ได้แก่แบคทีเรียในกลุ่ม Aeromonas, Bacillus, Bacteroides, Cellulomonas, Microbacterium, Paenibacillus, Ruminococcus และ Streptomyces (Rapp and Wagner, 1986) เป็นต้น

การผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลในสหรัฐอเมริกาได้เริ่มขึ้นโดยรัฐบาลให้เงินสนับสนุนโรงงาน 6 โรงงานที่อยู่ในระหว่างการก่อสร้างโดยได้รับทุนสนับสนุนจากกระทรวงพลังงานสหรัฐอเมริกาและยังไม่มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ในกระบวนการผลิต ต้องแยกเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสออกจากลิกนิน ย่อยโพลีเมอร์ออกเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวซึ่งเมื่อย่อย เซลลูโลสจะได้น้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม และเฮมิเซลลูโลสจะได้น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม ซึ่งยีสต์ปกติจะไม่สามารถย่อยน้ำตาลชนิดที่มีคาร์บอน 5 อะตอมได้จึงใช้การตัดต่อยีนสำหรับเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิด 5 อะตอม ซึ่งได้แก่ ไซโลส เข้าสู่จุลินทรีย์ *E. coli* และผลิตเอทา

นอลได้ 6.4 % ในขณะที่ Zymomonas mobilis สามารถผลิตได้ถึง 10 % ขณะนี้กำลังอยู่ในขั้นตอนการปรับปรุงการผลิตในเชิงพาณิชย์ นอกจากนี้นักวิจัยยังพยายามตัดต่อพันธุกรรมให้ยีสต์มีคุณสมบัติสามารถแปรรูปเซลลูโลสิกเอทานอลได้ ได้ปรับปรุงกระบวนการ pre-treatment เพื่อเร่งปฏิกิริยาและลดต้นทุนการผลิต ซึ่งต้นทุนการผลิตที่ได้จากการวิจัยอยู่ที่ 3-4 เหรียญต่อแกลลอน หรือ 30-35 บาทต่อลิตร เมื่อขยายขนาดการผลิตขึ้น คาดว่าจะเหลือ 2 เหรียญต่อแกลลอนแต่ถ้าต้องการให้แข่งขันได้ต้องเหลือเพียง 1.07 เหรียญต่อแกลลอนเท่านั้น

ในประเทศญี่ปุ่น บริษัทฮอนดามอเตอร์จำกัดได้พัฒนาระบบการผลิตเอทานอลจากซอฟท์ไบโอแมสจากใบและต้นพืชเช่นยูคาลิปตัส คาดว่าจะนำออกใช้ใน 2-3 ปีนี้ นอกจากเอทานอลแล้วบริษัทยังผลิตวัสดุทางอุตสาหกรรมหลายชนิดจากมวลชีวภาพ

Alves –Prado และคณะ (2010) ได้คัดเลือกและศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ ในแถบ บราซิลเลี่ยนเซอราโด ในกรุงเซลวิเรีย ประเทศบราซิล โดยได้แยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจำนวน 50 ไอโซเลท และราอีก 15 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ดี ได้แก่ Lysinibacillus sp. ซึ่งเป็นการพบครั้งแรกของแบคทีเรียชนิดนี้และเป็นสปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานการนำไปผลิตเอนไซม์ไซลาเนสมาก่อน และราที่ผลิตเอนไซม์ได้ดีได้แก่ Neosartoya spinosa ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการผลิตเอนไซม์
ไซลาเนสจากรานี้เช่นเดียวกัน เมื่อนำแบคทีเรียไปทดสอบการย่อยสลายสับสเตรท ต่าง ๆ แบบ submerged fermentation ได้แก่ ไซแลน รำข้าวสาลี ต้นข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และ กากบากาสจากโรงงานน้ำตาล พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดเมื่อใช้ต้นข้าวโพดและรำข้าวสาลีเมื่อหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ส่วนเชื้อรานำไปหมักแบบ solid - state fermentation กับสับสเตรท ต่างๆ ได้แก่ รำข้าวสาลี รำข้าวสาลีผสมขี้เลื่อย ต้นข้าวโพด เปลือกข้าวโพด กากมันสำปะหลัง และบากาส พบว่า รำข้าวสาลี และเปลือกข้าวโพด ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของ crude enzyme พบว่าเอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากแบคทีเรียมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่ pH 6.0 ในขณะที่รามีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 5.0-5.5 เมื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมแบคทีเรียและราอยู่ที่ 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Kavya และ Padmavathi (2009) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *Aspergillus niger* ในสภาวะการหมักแบบ solid state fermentation โดยทั้งสองต้องการผลิตเอนไซม์ด้วยวัสดุราคาถูก ได้แก่ รำข้าวสาลี กากถั่วเหลือง กากราจิ และ ขี้เลื่อย พบว่ารำข้าวสาลีได้เอนไซม์ปริมาณมากที่สุด ซึ่งสามารถนำมาทดแทนแหล่งคาร์บอนราคาสูงได้แก่ ไซแลนจากข้าวโอ๊ต และไซแลนจากเปลือกต้นเบิร์ช

Isil และ Nilufer (2005) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก Trichoderma harzianum 1073 D3 โดยใช้แหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนหลายชนิด ที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยใช้แหล่งของ

คาร์บอนเช่น เปลือกแอบเปิล กากส้ม เปลือกส้ม กากมะนาว เปลือกมะนาว เปลือกลูกแพร์ เปลือกกล้วย เปลือกแตงเมลอน และเปลือกฮาเซลนัท ในกระบวนการผลิตเอนไซม์ พบว่าเปลือกเมลอน ผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่เปลือกแอบเปิล และเปลือกฮาเซลนัท ตามลำดับ โดยมีการเติม โมลาสร่วมด้วย 50 % และแหล่งของไนโตรเจนได้แก่ ใบฝ้ายและกากถั่วเหลืองสามารถนำมาทดแทนเปบโตนได้

ในประเทศไทยมีการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ไซลาเนสหลายโครงการ วราศิรินทร์และคณะ (2009) ได้ศึกษาคุณสมบัติและการแยกเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา Trichoderma koningii (BCC4555) ที่แยกได้จากประเทศไทย ซึ่งเป็นราที่เก็บรวบรวมไว้ในห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์ของ BIOTEC พบว่าเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ในปริมาณสูง และเมื่อเพาะเลี้ยงราดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกันพบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้คนละชนิด โดยเอนไซม์ชนิดแรกมีค่า optimal pH ที่ 5 และ optimal temperature ที่ 60 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ชนิดที่ 2 มีค่า optimal pH ที่ 5 และ optimal temperature ที่ 50 องศาเซลเซียส

ดุษฎีพรรณ และ สายสมร ได้ทำการคัดกรองหาแอคติโนมัยซิสที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส โดยทำการศึกษาคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซิสจำนวน 47 ไอโซเลท โดยใช้ไซแลนเป็นสับสเตรท ทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารที่มี CMC ตรวจสอบเอนไซม์โดยวิธี congo red diffusion assay แล้วคัดเลือกเชื้อที่ให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 1 เซนติเมตร พบว่า มีเชื้อ 24ไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและ 7 ไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยได้ค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์เมื่อเลี้ยงนานเป็นเวลา 6 วันในอาหารที่มีรำข้าวสาลีเป็นองค์ประกอบและคัดเลือกเชื้อได้ 1 ไอโซเลทที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ ไอโซเลท T306

Nancy และคณะ (2004) ได้พัฒนาสายพันธุ์ยีสต์สำหรับผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส โดยยีสต์นี้จะผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยกลูโคสและ ไซโลส โดยได้ตัดต่อยีน 3 ชนิดเข้าสู่โครโมโซมของยีสต์โดยใช้หลักการ high copy number

7. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ถังหมักขนาด 600 ลิตร
2. tube
3. หญ้าเนเปียบด และเปลือกข้าวโพดบด
4. เชื้อ *A. niger* และเห็ดแครง
5. อาหาร PDA broth
5. อาหาร BSS

6. เครื่อง spectrophotometer

วิธีดำเนินการวิจัย

การผลิตเอนไซม์

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

2. การศึกษาซับเสรตที่เหมาะสม สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

- ชั่งมันฝรั่ง 6,000 กรัม ต้มในน้ำ 15 ลิตร จนมันฝรั่งอ่อนตัว
- กรองน้ำฝรั่ง ใส่น้ำตาล 600 กรัม คนจนกว่าละลาย
- เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตร 30 ลิตร แล้วนำไป clave
- นำเชื้อ *Aspergillus* บริสุทธิ์ ใส่ขนาดชิ้นวุ้น 0.5 ซม. ลงในฟลาสอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้นานประมาณ 7 วัน

สูตรอาหารพื้นฐาน Basal media ต่อปริมาณอาหาร 270 ลิตร

$(NH_4)_2SO_4$	135 กรัม
K_2HPO_4	270 กรัม
$MgSo_2\ 7H_2O$	54 กรัม
KCl	135 กรัม
$CaCl_2$	27 กรัม
Yeast Extrat	135 กรัม
เปลือกข้าวโพดบด	9 กิโลกรัม

การเตรียมอาหารที่มีองค์ประกอบดังกล่าว ในถังหมักขนาด 600 ลิตร โดยใส่อาหาร BSS 270 ลิตร เติมเชื้ออาหารเหลวปริมาตร 30 ลิตร จากนั้นเดินเครื่องการทำงานของถังหมัก โดยการกวนของใบพัด และเก็บตัวอย่างส่วนน้ำใส เพื่อนำไปวัดค่าขั้นต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Congored diffusion assay

ทำการเตรียมอาหารแข็งที่มีซับเสรตต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบโดยเตรียมอาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเติมวุ้น แล้วเทในจานเพาะเชื้อขนาด 9 เซนติเมตร ใช้โคนทิปขนาด 1000 ไมโครลิตรเจาะวุ้นให้เป็นหลุม แล้วดูดเอนไซม์ที่ผลิตได้จากอาหารเหลวที่ผ่านการตกตะกอน ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เจาะไว้นั้น บ่มไว้ที่

อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 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

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลอง

รายงานผลการทดลอง

การเลี้ยงเห็ดแครงในอาหาร BSS ลงถังหมักขนาด 600 ลิตร

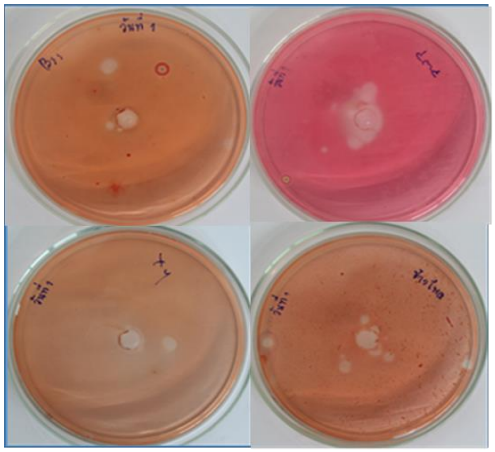
โดยใช้สูตรอาหาร

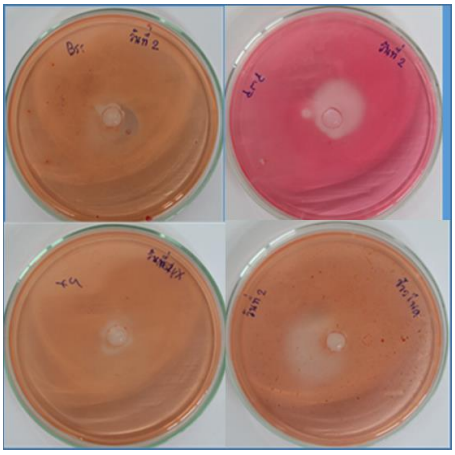
อาหาร BSS	270 ลิตร
เชื้อเห็ดแครง	30 ลิตร
เปลือกข้าวโพดบด	9 กิโลกรัม

การทดสอบการย่อย ของเชื้อจากถังหมัก โดยใช้อาหาร BSS Agar ในการทดสอบ

1. BSS control
2. BSS + CMC
3. BSS + Xylan
4. BSS + เปลือกข้าวโพดบด

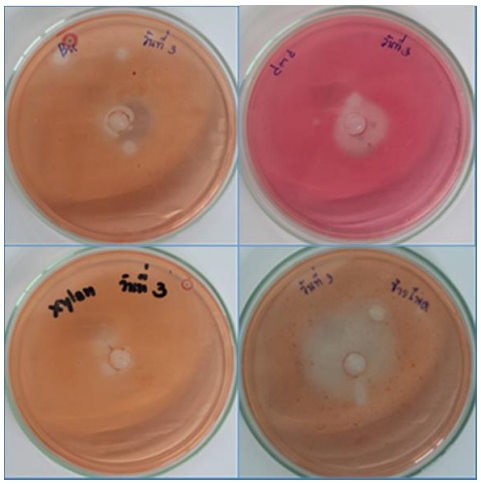
วันที่ 1 ก่อนเติมเชื้อ **วันที่ 2** เก็บเชื้อ 24 ชม.



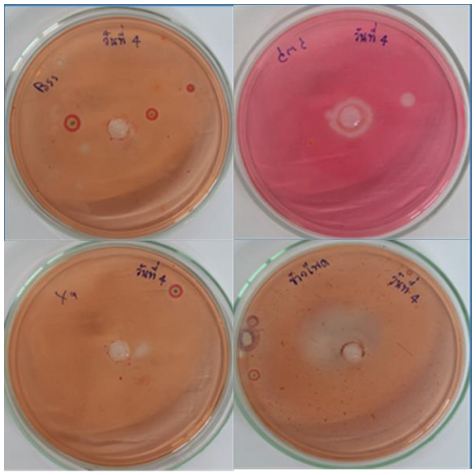


ภาพที่ 1 ผลการย่อยสลายซับเทรตชนิดต่างๆ ของเห็ดแครงบนอาหารที่มีซับเสรตชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ

วันที่ 3 เก็บเชื้อ 24 ชม.



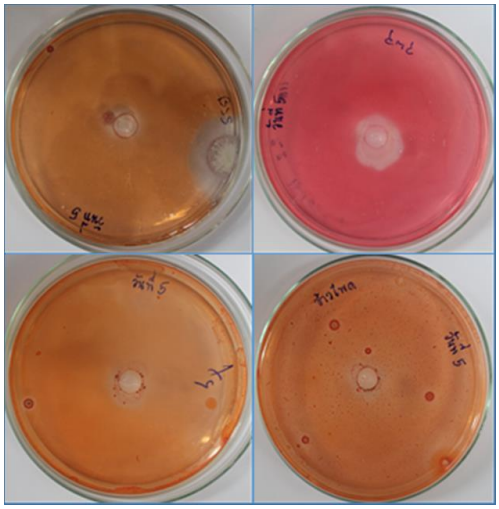
วันที่ 4 เก็บเชื้อ 24 ชม.

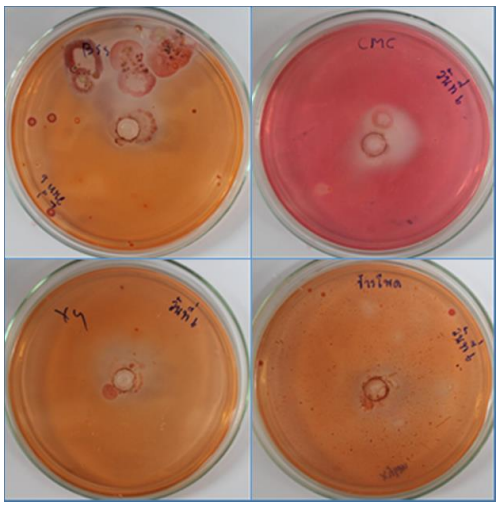


ภาพที่ 2 ผลการย่อยสลายซับเทรตชนิดต่างๆ ของเห็ดแครงบนอาหารที่มีซับเสรตชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ

วันที่ 5 เก็บเชื้อ 24 ชม.

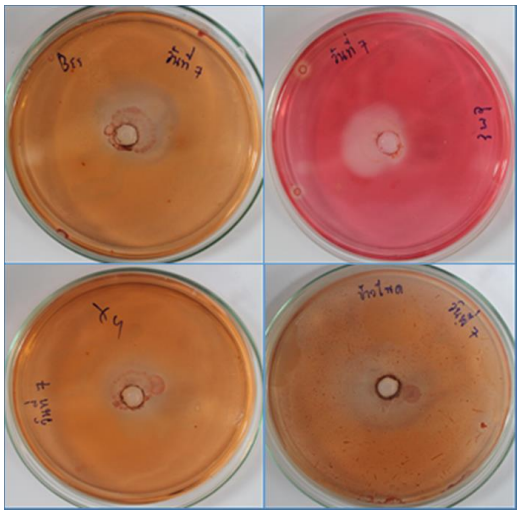
วันที่ 6 เก็บเชื้อ 24 ชม.



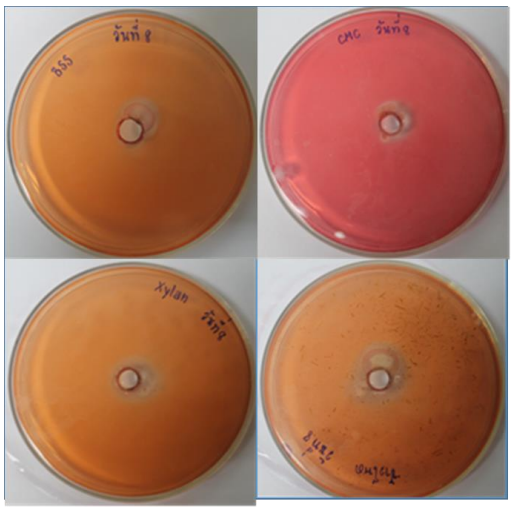


ภาพที่ 3 ผลการย่อยสลายซับเทรตชนิดต่างๆ ของเห็ดแครงบนอาหารที่มีซับเสรตชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ

วันที่ 7 เก็บเชื้อ 24 ชม.



วันที่ 8 เก็บเชื้อ 24 ชม.



ภาพที่ 4 ผลการย่อยสลายซับเทรตชนิดต่าง ๆ ของ เห็ดแครง บนอาหารที่มีซับเสรตชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 1 ผลการย่อยสลายซับเสรตบนอาหารชนิดต่าง ๆ ของเห็ดแครงในอาหารแข็งสูตรพื้นฐานร่วมกับซับเสรตชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน

วันที่เก็บเชื้อ	สูตรอาหาร	ขนาดวงใส(cm)	หมายเหตุ

1	BSS (Control)	-	ก่อนเติมเชื้อ
	BSS + CMC	1.8	ก่อนเติมเชื้อ
	BSS + Xylan	-	ก่อนเติมเชื้อ
	BSS + เปลือกข้าวโพด	-	ก่อนเติมเชื้อ
2	BSS (Control)	-	
	BSS + CMC	2.2	
	BSS + Xylan	-	
	BSS + เปลือกข้าวโพด	2.4	
3	BSS (Control)	-	
	BSS + CMC	1.9	
	BSS + Xylan	-	
	BSS + เปลือกข้าวโพด	3.5	

ตารางที่ 1 ผลการย่อยสลายซับเสรตบนอาหารชนิดต่าง ๆ ของเห็ดแครงในอาหารแข็งสูตรพื้นฐานร่วมกับซับเสรตชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน (ต่อ)

วันที่เก็บเชื้อ	**สูตรอาหาร**	**ขนาดวงใส(cm)**	**หมายเหตุ**
4	BSS (Control)	-	
	BSS + CMC	1.6	
	BSS + Xylan	-	

	BSS + เปลือกข้าวโพด	2.7	
5	BSS (Control)	1	
	BSS + CMC	2.1	
	BSS + Xylan	1.3	
	BSS + เปลือกข้าวโพด	1.5	
6	BSS (Control)	2	
	BSS + CMC	2.5	
	BSS + Xylan	2.4	
	BSS + เปลือกข้าวโพด	1.7	

ตารางที่ 1 ผลการย่อยสลายซับเสรตบนอาหารชนิดต่าง ๆ ของเห็ดแครงในอาหารแข็งสูตรพื้นฐานร่วมกับซับเสรตชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน (ต่อ)

วันที่เก็บเชื้อ	**สูตรอาหาร**	**ขนาดวงใส(cm)**	**หมายเหตุ**
7	BSS (Control)	3	
	BSS + CMC	2.8	
	BSS + Xylan	2.3	
	BSS + เปลือกข้าวโพด	2.6	
8	BSS (Control)	2.1	
	BSS + CMC	3	
	BSS + Xylan	1.3	

	BSS + เปลือกข้าวโพด	2.3	

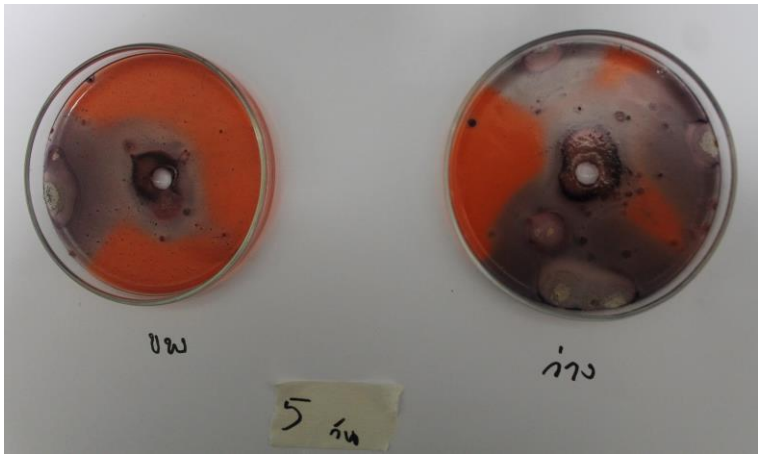
การเลี้ยง *Aspergillus* บริสุทธิ์ ในอาหาร BSS ลงถังหมักขนาด 600 ลิตร

โดยใช้สูตรอาหาร

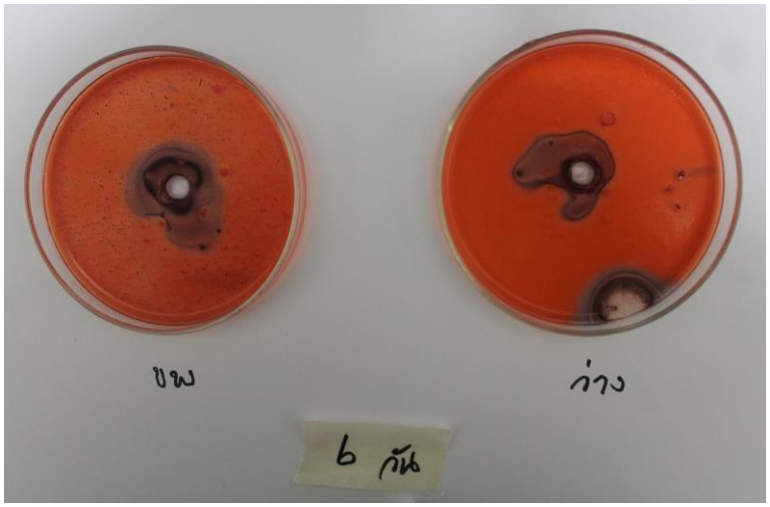
อาหาร BSS	270 ลิตร
เชื้อ *Aspergillus*	30 ลิตร
หญ้าเนเปียบด	9 กิโลกรัม

การทดสอบการย่อย ของเชื้อจากถังหมัก โดยใช้อาหาร BSS Agar ในการทดสอบ

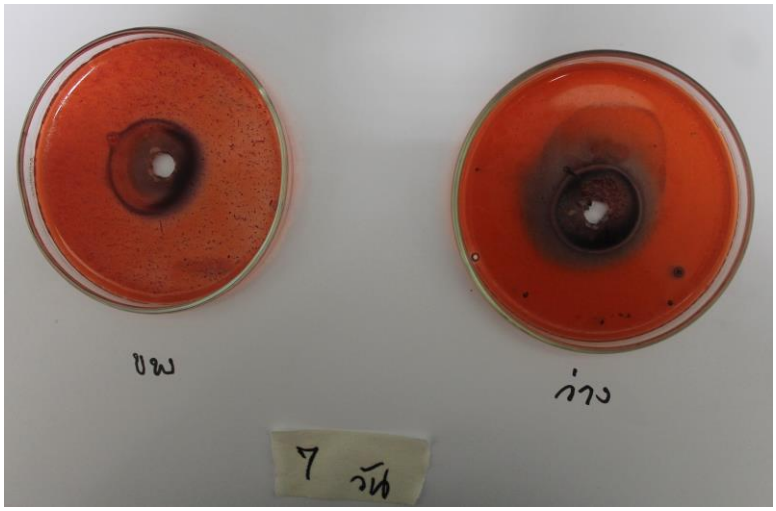
1. BSS control
2. BSS + CMC
3. BSS + Xylan
4. BSS + หญ้าเนเปียบด



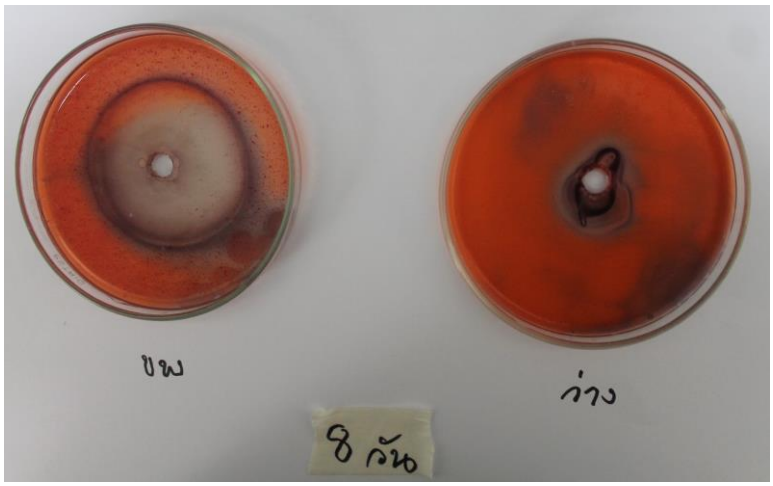
ภาพที่ 1 ผลการย่อยสลายซับเทรตชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Aspergillus* บนอาหารที่มีซับเสรตชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ



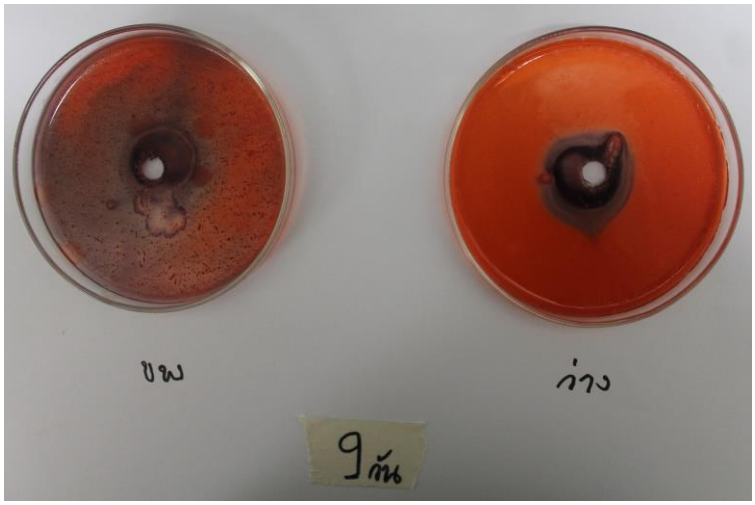
ภาพที่ 2 ผลการย่อยสลายซับเทรตชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Aspergillus* บนอาหารที่มีซับเสรตชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ



ภาพที่ 3 ผลการย่อยสลายซับเทรตชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Aspergillus* บนอาหารที่มีซับเสรตชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ



ภาพที่ 4 ผลการย่อยสลายซับเทรตชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Aspergillus* บนอาหารที่มีซับเสรตชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ



ภาพที่ 5 ผลการย่อยสลายซับเทรตชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Aspergillus* บนอาหารที่มีซับเสรตชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 2 ผลการย่อยสลายซับเสรตบนอาหารชนิดต่าง ๆ ของเชื้อ *Aspergillus* ในอาหารแข็งสูตรพื้นฐานร่วมกับซับเสรตชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

วันที่เก็บเชื้อ	สูตรอาหาร	ขนาดวงใส(cm)	หมายเหตุ
1	BSS (Control)	-	ก่อนเติมเชื้อ
	BSS + CMC	-	ก่อนเติมเชื้อ
	BSS + Xylan	-	ก่อนเติมเชื้อ
	BSS + เนเปีย	-	ก่อนเติมเชื้อ
2	BSS (Control)	-	
	BSS + CMC	3.7	
	BSS + Xylan	6.5	
	BSS + เนเปีย	3.8	
3	BSS (Control)	-	
	BSS + CMC	2.2	
	BSS + Xylan	4	
	BSS + เนเปีย	3.9	

ตารางที่ 2 ผลการย่อยสลายซับเสรตบนอาหารชนิดต่าง ๆ ของเชื้อ *Aspergillus* ในอาหารแข็งสูตรพื้นฐานร่วมกับซับเสรตชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (ต่อ)

วันที่เก็บเชื้อ	สูตรอาหาร	ขนาดวงใส(cm)	หมายเหตุ
4	BSS (Control)	-	
	BSS + CMC	2	
	BSS + Xylan	1.8	

	BSS + เนเปีย	2	
5	BSS (Control)	-	
	BSS + CMC	2.4	
	BSS + Xylan	7.1	
	BSS + เนเปีย	1.3	

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองเชื้อทั้ง 2 ชนิด ได้แก่เชื้อเห็ดแครง และเชื้อรา *Aspergillus* ในการทดสอบในถังหมักขนาดใหญ่ โดยเชื้อเห็ดแครงใช้เปลือกข้าวโพดบดเป็นวัสดุหลักในการหมัก ผลที่ได้จากการทดสอบการเกิด clear zone จะเกิดการย่อยของอาหาร CMC และ ข้าวโพดได้ดีที่สุด ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* ใช้หญ้าเนเปียบดเป็นวัสดุหลักในการหมัก ผลที่ได้จากการทดสอบการเกิด clear zone จะเกิดการย่อยทั้งของอาหาร CMC, Xylan และหญ้าเนเปียได้ดี จะพบว่าอาหาร BSS ที่ใช้เป็นตัว control บางวันของการทดลองได้เกิดวง clear zone ซึ่งทำให้ไม่สอดคล้องกับผลการทดลอง อาจเนื่องมาจากผลของการทดลองนอกสถานที่ ไม่ใช่ห้องปฏิบัติการของการทดลองจึงไม่เหมาะสม ทำให้ได้ผลของค่า clear zone ไม่สม่ำเสมอและคลาดเคลื่อนได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายชีวมวลระดับอุตสาหกรรมนั้น เอนไซม์มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิด และมีความปลอดภัยสูง จึงมีการใช้เอนไซม์กันอย่างกว้างขวาง ทำให้ในอนาคตเราอาจสามารถผลิตเอนไซม์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา รวมทั้งอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ช่วยเหลือให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมปฏิบัติงานด้วย

12. เอกสารอ้างอิง

ดุษฎีพรรณ พงษ์สุวรรณ และ สายสมร ลำยอง. 2550. การคัดกรองหา แอคติโนมัยซิสที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส.

วราศิรินทร์ สอนเล็ก, อุกฤษฎ์ รัตนโฉมศรี, เบญจพร บัวบาน, รัชดา ภรณ์ ศรีปรางค์, สุทิพา ธนพงษ์พิพัฒน์ และลิลี่ เอื้อวิไลจิตร. 2009. การศึกษาสมบัติและการแยกเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อ รา Trichoderma koningii (BCC4555) ที่แยกได้จากประเทศ ไทย. http://www.thaiscience.info/Article for ThaiScience/Article/5

สมใจ สิริโภค รศ. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม-กรุงเทพมหานคร

ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพมหานคร, 2555 352.

หน้า ISBN 978-974-213-177-7

Alves –Prado HF, Pavezzi FC, Leitwe RS, de Oliveira VM, Sette LD, Dasilva R. 2010. Screening and Production of Microbial Xylanase Producers from Brazillian Cerrado. Appl Biochem Biotechnol. 161(1-8):333-46. Bacillus subtilis and its expression in Escherichia coli. Agric. Biol. Chem. 50: 233-237.Biotechnol. Am. Soc. Microbial, 66: 506-577. DOI: 10.1128/MMBR.66.3.506–577.2002

Collmer, A., and D. B. Wilson. 1983. Cloning and expression of a Thermomonospora YX endocellulase gene in E.coli. Bio/Technology 1:594-601.

Cornet, P., J. Millet, P. Beguin, and J. P. Aubert. 1983.Characterization of two cel (cellulose degradation) genes of Clostridium thermocellum coding for endoglucanases. Bio/Technology 1:589-594. Enzymology. Newyork : Academic Press.

Isil Seyis and Nilufer Aksoz. 2005. Xylanase Production from Trichoderma harzianum 1073 D3 with Alternative Carbon and Nitrogen Sources. Food Technol. Biotechnol. 43(1) 37-40.

Kavya V, Padmavathi T. 2009. Optimization of Growth Conditions for Xylanase Production by Aspergillus niger in Solid State Fermentation. Pol J Microbiol. 58(2):125-30.

Koide, Y., A. Nakamura, T. Uozumi, and T. Beppu. 1986. Molecular cloning of a cellulase gene from

Lynd, R. J. Lee, Paul Weimer, H. Willem and S. Pretorius, 2002. Microbial cellulose utilization. Fundament.

Rapp, P and Wagner, F. 1986. Production and Properties of xylan-degrading enzymes from Cellulomonas uda. Appl. Environ. Microbiol., 51,746-752.

Viikari, L., Kantelinen, Al, Sundquist, J. and Linko, M. 1994. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. FEMS Microbiology Reviews 13: 335-350.

Whittle, D. J., D. G. Kilburn, R. A. J. Warren, and R. C. Miller, Jr. 1982. Molecular cloning of a Cellulomonas fimi cellulose gene in Escherichia coli. Gene 17:139-145.

Wolff, B. R., T. A. Mudry, B. R. Glick, and J. J. Pasternak.1986. Isolation of endoglucanase genes from Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa and a Pseudomonas sp. Appl.Environ. Microbiol. 51:1367-1369.

13. ภาคผนวก

สูตรอาหารพื้นฐาน Basal media ต่อปริมาณอาหาร 270 ลิตร

$(NH_4)_2SO_4$	135 กรัม
K_2HPO_4	270 กรัม
$MgSo_2\ 7H_2O$	54 กรัม
KCl	135 กรัม
$CaCl_2$	27 กรัม
Yeast Extrat	135 กรัม
เปลือกข้าวโพดบด	9 กิโลกรัม

การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Congored diffusion assay

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

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

การเลี้ยงเห็ดแครงในอาหาร BSS ลงถังหมักขนาด 600 ลิตร

โดยใช้สูตรอาหาร

อาหาร BSS	270 ลิตร
เชื้อเห็ดแครง	30 ลิตร
เปลือกข้าวโพดบด	9 กิโลกรัม

การเลี้ยง *Aspergillus* บริสุทธิ์ ในอาหาร BSS ลงถังหมักขนาด 600 ลิตร

โดยใช้สูตรอาหาร

อาหาร BSS	270 ลิตร
เชื้อ *Aspergillus*	30 ลิตร
หญ้าเนเปียบด	9 กิโลกรัม