การย่อยสลายหญ้าแฝกหอม Vetiveria zizanioides Nash โดยใช้เชื้อราที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้

นางสาว อรุณวรรณ นุชพ่วง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6604-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SIMULTANEOUS DECOMPOSITION OF VETIVER GRASS Vetiveria zizanioides Nash USING CELLULOSE - DEGRADING FUNGI

Miss Aroonwan Nuchpoung

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Botany

Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Acadeic Year 2004
ISBN 974-17-6604-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การย่อยสลายหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* Nash โดยใช้เชื้อราที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้
โดย	นางสาวอรุณวรรณ นุชพ่วง
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อรุณวรรณ นุชพ่วง: การย่อยสลายหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* Nash โดยใช้เชื้อราที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ (SIMULTANEOUS DECOMPOSITION OF VETIVER GRASS *Vetiveria zizanioides* Nash USING CELLULOSE – DEGRADING FUNGI) อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. จิราภรณ์ ธนียวัน; 97 หน้า. ISBN 974-17-6604-1

การเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ 6 ตัวอย่าง จากใบแห้งของหญ้าแฝกหอม และตัวอย่างดินบริเวณผิวดินใต้กอหญ้าแฝกหอมแต่ละอีโคไทป์ 3 อีโคไทป์ คือ อีโคไทป์ศรีลังกา อีโคไทป์สงขลา 3 และอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี ในจังหวัด พิษณุโลก จากการศึกษาพบเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 113 สายพันธุ์ และเชื้อราที่สามารถหลั่งเซลลูเลสออกมาย่อยสลายเซลลูโลสได้ในอาหารสูตร Carboxymethyl Cellulose Agar ภายในระยะเวลา 3 วัน มีทั้งหมด 39 สายพันธุ์ โดยเชื้อราที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดทั้ง 3 ค่า คือ exoglucanase เท่ากับ 0.245 U/mg protein endoglucanase เท่ากับ 0.779 U/mg protein และ β-glucosidase เท่ากับ 0.125 U/mg protein เมื่อจัดจำแนกพบว่าเชื้อรานี้คือ *Aspergillus* sp. และเชื้อราที่มีค่าแอคติวิตีเจาะเพาะสูงรองลงมา คือเชื้อรา *Phoma* sp. ซึ่งมีค่า exoglucanase เท่ากับ 0.097 U/mg protein endoglucanase เท่ากับ 0.655 U/mg protein และ β-glucosidase เท่ากับ 0.108 U/mg protein เมื่อศึกษาการผลิตเอทานอลในกระบวนการย่อยสลายและหมักแบบต่อเนื่อง โดยใช้ใบแห้งของหญ้าแฝกอีโคไทป์ศรีลังกาปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. และยีสต์ทนร้อน *Kluveromyces thermotolerans* ภายใต้สภาวะเขย่า 125 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5.0 ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด คือ 6.07 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับ 0.20 กรัมต่อกรัมสับสเตรท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา ....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....อรุณวรรณ นุชพ่วง.....

สาขาวิชา ....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา .....2547..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา (ร่วม).....

4472496023: MAJOR BOTANY

KEY WORD: DRY LEAVES, SOIL, CELLULOLYTIC SPECIFIC ACTIVITY, SSF

AROONWAN NUCHPOUNG: SIMULTANEOUS DECOMPOSITION OF VETIVER GRASS *Vetiveria zizanioides* Nash USING CELLULOSE – DEGRADING FUNGI. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, PH.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSIST. PROF. JIRAPORN THANIYAVARN; 97 pp. ISBN 974-17-6604-1

Dry leaves and soil samples from 3 ecotypes of *Vetiveria zizanioides* Nash: Srilangka, Songkla 3 and Surathanee in Phitsanulok province were collected for isolation and screening of fungi that produced cellulase enzymes. Among the 113 isolates obtained, 39 isolates showed clear zone on the CMC agar within 3 days. A fungal isolate with the highest specific activities of exoglucanase (0.245 U/mg protein) endoglucanase (0.779 U/mg protein) and β-glucosidase (0.125 U/mg protein) was identified as *Aspergillus* sp., followed by *Phoma* sp. with the cellulolytic specific activities of exoglucanase (0.097 U/mg protein) endoglucanase (0.655 U/mg protein) and β-glucosidase (0.108 U/mg protein). Ethanol production from dry leaves of *Vetiveria zizanioides* Nash Srilangka ecotype using simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with cellulase from *Aspergillus* sp. and the thermotolerant yeast, *Kluyveromyces thermotolerans*, was performed under shaking condition (125 rpm), 40 °C and pH 5.0. The maximum ethanol yield was found to be 6.07 g/L or 0.20 g/g substrate.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department .....Botany..... Student's signature....Aroonwan Nuchpoung

Field of Study .....Botany..... Advisor's signature.....

Academic year .....2004..... Co-advisor's signature....Jiraporn Thaniyavarn

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความเมตตาและอนุเคราะห์จากหลายๆ ฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.จิราภรณ์ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนมากยิ่งขึ้นจนเสร็จสมบูรณ์ลงได้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.นันทนา อังกินันทน์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.มุกดา คูหิรัญ เป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Rodney J. Bothast (USDA) ที่กรุณามอบเชื้อยีสต์สำหรับใช้ในงานวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Douglas E. Eveleigh (Rutgers University) สำหรับคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ เมื่อท่านมาเยี่ยมห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สุมาลี พิชญางกูร อาจารย์ ดร.พันธ์พิมพ์ วอนขอพร อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี และอาจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว ที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนให้ความกรุณาในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์บางชนิด

ขอขอบคุณ คุณทิพย์วรรณ หลวงวงศ์ เจ้าหน้าที่สถานีพัฒนาที่ดิน อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

ขอขอบคุณ คุณอาทิตย์ ศุขเกษม เจ้าหน้าที่กลุ่มวิจัยและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากหญ้าแฝกหอมในการจัดการดิน สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการดิน กรมพัฒนาที่ดิน สำหรับข้อมูลบางส่วนของลักษณะอีโคไทป์และการเจริญเติบโตของหญ้าแฝกหอม

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยและภาควิชาพฤกษศาสตร์สำหรับทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน และขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในภาควิชาพฤกษศาสตร์ และภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่เอื้อเฟื้อช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีให้แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา คุณป้า ขอบคุณน้องชาย และทุกคนภายในครอบครัว สำหรับความรัก ความอบอุ่น ความห่วงใย เอาใจใส่ดูแล คอยช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีให้แก่ข้าพเจ้าเสมอมา ซึ่งช่วยเกื้อหนุนให้ข้าพเจ้าสามารถศึกษาจนสำเร็จและตลอดไป

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่

1 บทนำ 1

2 ตรวจเอกสาร 3

3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย 17

4 ผลการทดลอง 28

5 วิจารณ์ผลการทดลอง 51

6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 60

รายการอ้างอิง 65

ภาคผนวก 71

ภาคผนวก ก 72

ภาคผนวก ข 75

ภาคผนวก ค 79

ภาคผนวก ง 82

ภาคผนวก จ 88

ภาคผนวก ฉ 91

ภาคผนวก ช 93

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 97

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสต่อโคโลนีของเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูเลสได้..... 31

2 ค่าแอคติวิตี (U/ml) และปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) (mg protein/ml) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อรา 6 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร Production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 5 เป็นเวลา 7 วัน..... 34

3 ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา 6 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 5 เป็นเวลา 7 วัน..... 35

4 ค่าแอคติวิตี (U/ml) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) (mg protein/ml) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส pH 5 เป็นเวลา 7 วัน..... 39

5 ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส pH 5 เป็นเวลา 7 วัน..... 40

6 ค่าแอคติวิตี (U/ml) และปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) (mg protein/ml) ขององค์ประกอบของเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่ pH 4 5 6 และ 7 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 42

7 ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่ pH 4 5 6 และ 7 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 42

8 ค่าแอคติวิตี (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่ 3 5 7 9 11 และ 13 วัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5..... 44

9 ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. ที่ 3 5 7 9 11 และ 13 วัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5..... 45

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

10 ค่าแอคติวิตี (U/ml) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) (mg protein/ml) และแอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ของเอนไซม์เซลลูเลสจาก Seed ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่ผลิตในระยะเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5..... 48

11 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา ก่อนปรับสภาพ หลังปรับสภาพ และการเปลี่ยนแปลง..... 48

12 สรุปจำนวนสายพันธุ์เชื้อราที่คัดแยกได้จากใบแห้งและดินบริเวณผิวดิน ใต้กอหญ้าแฝกหอม 3 อีโคไทป์..... 60

13 สรุปจำนวนสายพันธุ์เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ภายในระยะเวลา 3 วัน..... 61

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 โครงสร้างผนังเซลล์ของพืชที่ประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่อยู่ในโครงสร้างคล้ายมัดเส้นใย (bundle-like structure) และมีลิกนินที่ทำหน้าที่คล้ายกับกาวเชื่อมเส้นใยให้อยู่ด้วยกัน..... 3

2 โครงข่ายพันธะไฮโดรเจนภายในและระหว่างโมเลกุลของสายกลูแคน..... 4

3 เซลโลไบโอสและพันธะ β-1,4–glucosidic ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลกลูโคสในสายเซลลูโลส..... 5

4 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส..... 5

5 แบบจำลองโครงสร้างของลิกนินในไม้เนื้ออ่อน..... 6

6 แบบจำลองการย่อยสลายด้วยเซลลูเลสของเซลลูโลสในส่วนที่เป็น crystalline และ amorphous 10

7 ขั้นตอนโดยย่อในการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช..... 24

8 ตัวอย่างใบแห้งของหญ้าแฝกหอม..... 28

9 ตัวอย่างดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอม..... 28

10 ตัวอย่างหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* Nash..... 29

11 ตัวอย่างลักษณะของเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ในอาหารสูตร Czapex's dox medium ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สงขลา 3..... 30

12 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในอาหารสูตร Carboxymethyl Cellulose (CMC) Agar ของเชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1..... 33

13 แอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของเชื้อรา 6 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาจากแต่ละตัวอย่าง..... 35

14 ลักษณะเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย x 40..... 36

15 ลักษณะเชื้อรา *Phoma* sp. S-SR-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย x 100..... 37

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

16 ลักษณะเชื้อราสายพันธุ์ L-SR-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย x 40..... 37
17 ลักษณะเชื้อราสายพันธุ์ L-SK-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย x 40..... 37
18 ลักษณะเชื้อราสายพันธุ์ L-ST-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย x 40..... 38
19 ลักษณะเชื้อราสายพันธุ์ S-ST-18 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย x 40..... 38
20 แอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 40
21 แอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ pH 4 5 6 และ 7 ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 43
22 แอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ระยะเวลา 3 5 7 9 11 และ 13 วัน ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 45
23 น้ำหนักแห้งของ *Aspergillus* sp. S-SK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PDB 46
24 น้ำหนักแห้งของยีสต์ *Kluyveromyces thermotolerans* เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร YMB ที่ 30 องศาเซลเซียส 47
25 ปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ จำนวนเซลล์ยีสต์ น้ำหนักกากที่เหลือ และค่าความเป็นกรดด่าง ในระยะเวลา 7 วัน ของกระบวนการหมักแบบ SSF 50
26 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก ในระยะเวลา 7 วัน ของกระบวนการหมักแบบ SSF..... 50

บทที่ 1

บทนำ

พืชโดยทั่วไปมีองค์ประกอบหลักของชีวมวล (biomass) คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ซึ่งรวมเรียกว่า ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) โดยมีปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด ประมาณ 40-80% (เปอร์เซ็นต์) รองลงมา คือ เฮมิเซลลูโลส มีอยู่ประมาณ 10-40% และลิกนินมีอยู่ประมาณ 5-25% โดยน้ำหนักแห้ง (Eriksson, Blanchette, and Ander, 1990) และมีองค์ประกอบอื่น ๆ อีก ประกอบด้วยสารที่สามารถสกัดได้ (extractives) ได้แก่ ไขมัน (fats) น้ำมัน (oils) โปรตีน (protein) และเถ้า (ash) (Himmel, Baker, and Overend, 1994)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สำคัญของโลก ซึ่งอยู่ในผนังเซลล์พืชและเป็นส่วนประกอบสำคัญของไม้ (wood) ใยฝ้าย และพืชที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว เช่น หญ้า เซลลูโลสเป็นวัตถุดิบที่สามารถหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ได้ (renewable resource) เพราะพืชเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สามารถปลูกทดแทนได้ เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตกระดาษ สิ่งทอ และผลิตภัณฑ์สังเคราะห์ อีกทั้งเซลลูโลสยังเป็นวัตถุดิบที่สามารถใช้ในกระบวนการหมัก เพื่อผลิตอาหารและเชื้อเพลิงด้วย (Uhlig, and Linsmaier-Bednar, 1998 ; Aldridge, 2000)

หญ้าแฝกหอม (*Vetiveria zizanioides* Nash) เป็นพืชที่ปลูกอย่างแพร่หลายและมีการส่งเสริมให้ปลูกเพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์ดินและน้ำเป็นสำคัญ (ราเชนทร์ ถิรพร, 2537) และหากมีการตัดใบหญ้าแฝกหอมในช่วงของการเจริญเติบโตทางลำต้น จะทำให้ต้นหญ้าแฝกหอมเจริญเติบโตดีขึ้น ใบหญ้าแฝกหอมที่ถูกตัดทิ้งจึงเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งเป็นแหล่งเซลลูโลสที่น่าสนใจที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลได้

เอทานอล (ethanol) หรือ ไบโอเอทานอล (bioethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นเชื้อเพลิงสะอาด (Varma, and Behera, 2003) ที่สามารถใช้แทนน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงที่ก่อให้เกิดมลภาวะทางอากาศ และมีปริมาณลดน้อยลงทุกขณะตามการนำมาใช้ เพื่อแก้ปัญหาของวิกฤติราคาน้ำมันที่สูงขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากเอทานอลมีราคาที่ต่ำกว่า (Bothast, Nichols, and Dien, 1999) ซึ่งเทคโนโลยีการหมักเอทานอลนั้น จะใช้วัตถุดิบตั้งต้นที่สำคัญ คือ เซลลูโลส น้ำตาล หรือ แป้ง (Varma, and Behera, 2003)

เชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้มีทั้งที่อยู่ในดินและอยู่กับพืช จึงมีแนวทางในการคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้จากผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอม และจากใบแห้งของหญ้าแฝกหอม ซึ่งในประเทศไทยเคยมีรายงานถึงการคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้

จากป่านศรนารายณ์ ใน 3 จังหวัด พบเชื้อรา 52 สายพันธุ์ และเมื่อตรวจระบุพบว่าเชื้อราที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด คือเชื้อรา *Acrophialophora* sp. (Punnapayak, Kuhirun, and Thanonkeo, 1999) และสำหรับการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นเอทานอลโดยใช้เชื้อราร่วมกับยีสต์ที่เหมาะสมนั้น คือกระบวนการย่อยสลายพร้อมกับการหมัก ซึ่งเรียกว่า กระบวนการ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) (Punnapayak, and Emert, 1986) และเพื่อเพิ่มมูลค่าของทรัพยากรที่มีอยู่ จึงใช้ใบแห้งหญ้าแฝกหอมเป็นแหล่งวัตถุดิบด้วย

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการคัดแยกเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส และแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดจากผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมและใบแห้งของหญ้าแฝกหอม แล้วนำมาใช้ร่วมกับยีสต์ในกระบวนการย่อยสลายพร้อมกับการหมักเพื่อผลิตเอทานอล โดยใช้วัตถุดิบเป็นใบแห้งของหญ้าแฝกหอม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงภาวะและวิธีการหมักที่ใช้ใบหญ้าแฝกหอมเป็นวัตถุดิบ โดยใช้เชื้อราที่คัดแยกได้และยีสต์เพื่อผลิตเอทานอลแบบ SSF ซึ่งอาจนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมต่อไป

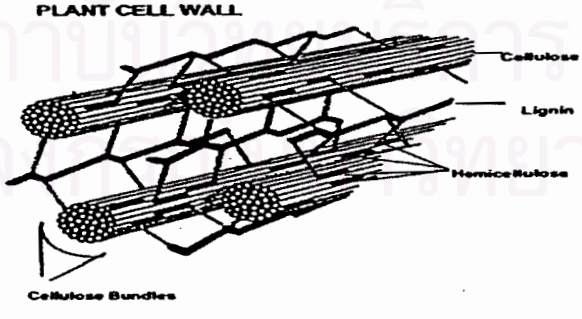
ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อราที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด จากผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมและใบแห้งของหญ้าแฝกหอม และตรวจระบุเชื้อราที่คัดแยกได้นี้ในระดับจีนัส (genus) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา แล้วผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อยสลายใบแห้งของหญ้าแฝกหอมซึ่งเป็นแหล่งเซลลูโลส เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสที่สามารถถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้โดยใช้ยีสต์ในกระบวนการหมักแบบ SSF อีกทั้งยังศึกษาถึงปริมาณองค์ประกอบสำคัญของชีวมวลของหญ้าแฝกหอม คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน อีกด้วย

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

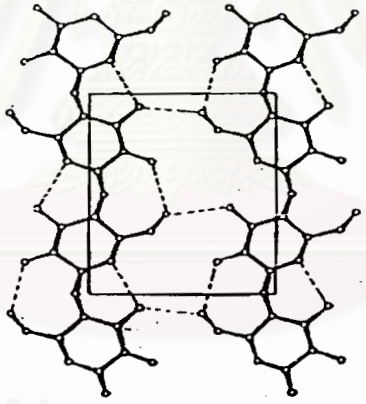
พืชเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สามารถปลูกทดแทนได้ (Aldridge, 2000) จึงเป็นทรัพยากรประเภทที่สามารถหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ได้ และมีปริมาณมากที่สุดในโลก (Eveleigh, 1987: cited in Philippidis, 1996) พืชมีองค์ประกอบหลักที่เป็นสารอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ในผนังเซลล์ของส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ ชีวมวล ที่มีองค์ประกอบสำคัญ คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน รวมเรียกว่า ลิกโนเซลลูโลส (Blackburn et al., 1999; Himmel, Baker, and Overend, 1994) พวกไม้เนื้อแข็งประกอบด้วยเซลลูโลสประมาณ 43% เฮมิเซลลูโลส 35% และลิกนิน 22% ส่วนชิ้นส่วนของพืชลำต้นอ่อน (herbaceous) และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ประกอบด้วยเซลลูโลสประมาณ 38-45% เฮมิเซลลูโลสประมาณ 30-33% และลิกนินประมาณ 10-17% (Linsmaier-Bednar, and Uhlig, 1998) นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบนอกเหนือ (extraneous component) ได้แก่ สารแทรก (extractive) ทั้งที่ละลายน้ำได้และละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งสารแทรกได้จากชีวมวลของไม้ ได้แก่ terpenes (isoprene alcohol และ ketones) resins (fat fatty acids alcohols resin acids และ phytosterols) และ phenol (primarily tannins) และสารแทรกที่ไม่สามารถสกัดได้ (nonextractives) ได้แก่ สารประกอบอนินทรีย์ เช่น alkali carbonate, oxalate และ silica crystalline รวมทั้งองค์ประกอบภายนอกผนังเซลล์พืช เช่น แป้ง เพคติน โปรตีน ไขมัน และเถ้า (Himmel, Baker, and Overend, 1994)



ภาพที่ 1 โครงสร้างผนังเซลล์ของพืชที่ประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่อยู่ในโครงสร้างคล้ายมัดเส้นใย (bundle – like structure) และมีลิกนินที่ทำหน้าที่คล้ายกับกาวเชื่อมเส้นใยให้อยู่ด้วยกัน (Blackburn et al., 1999)

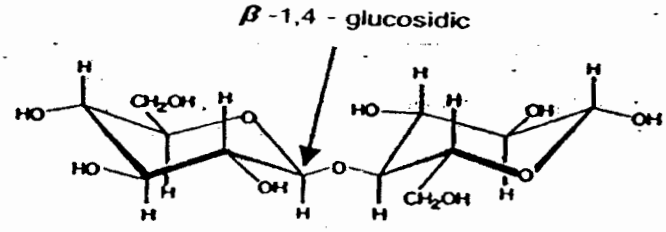
โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นขนาดใหญ่ (macromolecule) และเป็นพอลิเมอร์ (polymer) สายตรงของ β-D-glucopyranose ที่เชื่อมต่อกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 4 โมเลกุลของเซลลูโลสเป็นเส้นตรง โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมภายในและระหว่างโมเลกุล สายของ กลูแคนมีแกนเป็นเกลียวพับสองทบซึ่งสมมาตรกัน ที่มีความคงตัวและแข็งแรงเนื่องจากพันธะภายในและระหว่างโมเลกุล ดังภาพที่ 2 โมเลกุลเซลลูโลสโดยปกติมักอยู่ในรูปของ Degree of polymerization (DP) คือ จำนวนของกลูโคสในเซลลูโลส 1 โมเลกุล (สาย) โดยทั่วไปสายของเซลลูโลสจะประกอบด้วยกลูโคส 8,000-12,000 หน่วย (Saha, and Bothast, 1997) และเซลลูโลส 1 สาย ในพืชชั้นสูงสามารถมีค่า DP ได้สูงถึง 14,000 หน่วย องค์ประกอบของเซลลูโลสมี 2 รูปแบบ คือ crystalline cellulose เป็นบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนหนาแน่นทำให้มีความต้านทานอย่างมากต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์และเอนไซม์ จึงถูกย่อยสลายได้ยาก และส่วน amorphous cellulose เป็นบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนหนาแน่นน้อยทำให้ถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่า (Eriksson et al., 1990)



ภาพที่ 2 โครงข่ายพันธะไฮโดรเจนภายในและระหว่างโมเลกุลของสายกลูแคน (Eriksson et al., 1990)

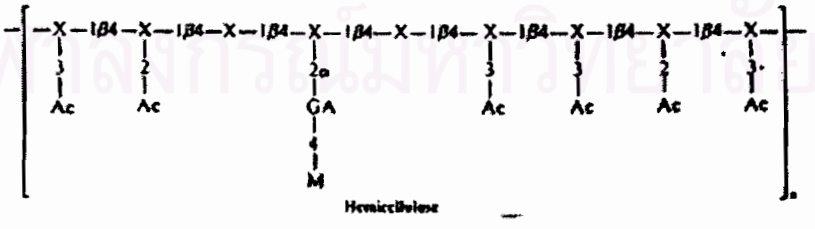
เซลโลไบโอส (cellobiose) คือ กลูโคส 2 โมเลกุล **ที่ถือเป็นหน่วยโครงสร้างพื้นฐานของเซลลูโลสมากกว่ากลูโคส ซึ่งจุดเริ่มต้นในการยอมรับว่าเซลโลไบโอสคือ หน่วยพื้นฐานของเซลลูโลสนั้นมาจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียและเชื้อรา และได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นเซลโลไบโอส และยังมีเหตุผลอีกประการหนึ่งคือ พันธะ β-1,4-glucosidic ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลกลูโคสทำให้สายพอลิเมอร์ของเซลลูโลสเหมือนต่อเชื่อมกันด้วยหน่วยของเซลโลไบโอสที่ซ้ำ ๆ กัน** (Eriksson et al., 1990; Klass, 1998)



ภาพที่ 3 เซลโลไบโอสและพันธะ β-1,4 – glucosidic ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลกลูโคสในสายเซลลูโลส (Lamed, and Bayer, 1994)

โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์สายตรงที่มีกิ่งก้านสาขาของ D-xylose L-arabinose D-mannose D-glucose D-galactose D-glucoronic acid และ น้ำตาลเพนโตส (pentose) ชนิดอื่น โดยส่วนที่เป็นสายตรงของเฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่จะเป็นหน่วยของไซโลสที่เชื่อมต่อกันที่ตำแหน่ง β-1,4 ส่วนกิ่งก้านสาขาจะเป็นหน่วยของ อะราบิโนส แมนโนส กลูโคส กรดกลูคูโรนิค และน้ำตาลเพนโตสชนิดอื่น ซึ่งเชื่อมต่อกันที่ตำแหน่ง β-1,4 ยกเว้น กาแลคโตส เท่านั้นที่มีลักษณะเฉพาะที่เชื่อมต่อกันที่ตำแหน่ง β-1,3 เฮมิเซลลูโลสส่วนมากมีน้ำตาลที่กล่าวถึงมานี้ 2 ถึง 6 ชนิด และเฮมิเซลลูโลสคือ พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่เรียงตัวอยู่ระหว่างกลางในสายเซลลูโลส และพบว่าประสานกันอย่างหนาแน่นกับเซลลูโลสในผนังเซลล์ ซึ่งได้รับมาจากการสกัดส่วนของพืชโดยสารละลายเบส และเฮมิเซลลูโลสไม่ได้เป็นหน่วยพื้นฐานของเซลลูโลส อีกทั้งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่การสังเคราะห์เกิดขึ้นแยกจากการสังเคราะห์เซลลูโลส สำหรับเฮมิเซลลูโลสของไม้เนื้อแข็ง (hard wood) มีอยู่ระหว่าง 20-30% และมีค่า DP ประมาณ 150-200 หน่วย ซึ่งองค์ประกอบและโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน (Bungay, 1981; Eriksson et al., 1990)



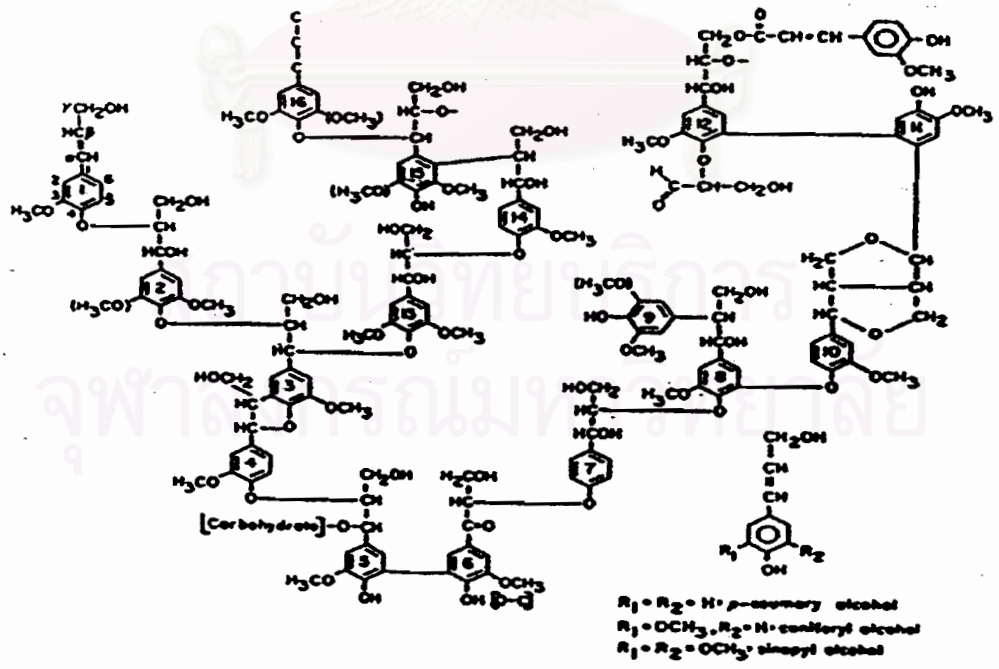
ภาพที่ 4 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (Bungay, 1981)

โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน

ลิกนิน คือ พอลิเมอร์ของสารประกอบอะโรมาติกที่มีโครงสร้างซับซ้อน หน่วยย่อยของโครงสร้างนี้คือ phenyl propane ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ (monomer) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ C-O-C หรือ C-C ประสานต่อกันเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ ดังภาพที่ 5

ลิกนินพบได้ในพืชที่มีท่อลำเลียงโดยทำหน้าที่เสริมสร้างความแข็งแรงและเชื่อมจับเส้นใยของผนังเซลล์เข้าไว้ด้วยกัน ลิกนินยังช่วยลดการผ่านเข้าออกของน้ำผ่านผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อไซเลม (xylem) และทำให้เนื้อไม้มีความต้านทานต่อการโจมตีของจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้ลิกนินยังเป็นอุปสรรคสำคัญ ในการจะใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อการผลิตน้ำตาลและเอทานอล (Eriksson et al., 1990) เนื่องจากลิกนินจะทำหน้าที่เชื่อมต่อกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะโควาเลนต์ เกิดเป็นสารประกอบลิกโนเซลลูโลสที่มีกิ่งก้านสาขามากมาย มีโมเลกุลขนาดใหญ่ตั้งแต่ 600,000-1,000,000 ดาลตัน (Kirk, and Farrell, 1987)

ในไม้เนื้ออ่อนทั่วไป (พวกจิมโนสเปิร์ม) ลิกนินมีองค์ประกอบคือ coniferyl alcohol และมี p-coumaryl alcohol บ้าง แต่จะไม่มี sinapyl alcohol ส่วนพืชกลุ่มแองจิโอสเปิร์ม ลิกนินจะมีองค์ประกอบของ coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol ในปริมาณที่เท่ากัน (46%) และจะมี p-coumaryl alcohol อยู่เล็กน้อย (8%) สำหรับลิกนินในพวกหญ้าและไผ่จะประกอบด้วยแอลกอฮอล์ทั้งสามชนิดนี้ อยู่เล็กน้อยประมาณ 8% (Eriksson et al, 1990)



ภาพที่ 5 แบบจำลองโครงสร้างของลิกนินในไม้เนื้ออ่อน (Adler, 1977: cited in Kirk and Farrell, 1987)

การผลิตเอทานอล

เอทานอล มีสูตรโมเลกุล คือ C_2H_5OH สามารถผลิตได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีและการหมักด้วยวิธีทางชีวภาพ ดังนี้

1. <u>การสังเคราะห์ทางเคมี</u> ทำได้โดยนำเอทีลีน (ethylene) มาทำปฏิกิริยากับน้ำ (hydrogenation) ที่อุณหภูมิสูง ความดันสูง และใช้ทังสเตนออกไซด์ (P_2O_5) เป็น catalyst ดังสมการ (Wade, 1995)

$$H_2C{=}CH_2 + H_2O \xrightarrow[P_2O_5]{100-300\ atm,\ 300\ ^\circ C} CH_3\text{-}CH_2\text{-}OH$$

ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ที่ใช้ในงานอุตสาหกรรมตัวทำละลายสำหรับสี เครื่องสำอาง และเป็นวัตถุดิบสำหรับสารประกอบทางเคมี อีกทั้งใช้ในด้านการค้าและอุตสาหกรรมเชื้อเพลิง

2. <u>การหมักด้วยวิธีทางชีวภาพ</u> ทำได้โดยการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้กลายเป็นเอทานอลด้วยการหมักที่ใช้ยีสต์ร่วมกับแบคทีเรียหรือเชื้อรา และแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถย่อยสลายและหมักเอทานอลได้โดยตรง (Philippidis, 1996)

สมการการเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลด้วยยีสต์

$$\underset{\text{Glucose}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{Ethanol}}{2C_2H_5OH} + 2CO_2 + \text{heat}$$

โดยทั่วไปการหมักชีวมวลถือเอาศักยภาพของจุลินทรีย์เป็นสำคัญที่จะมีอิทธิพลต่อปริมาณผลผลิตเอทานอลที่ได้

วัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอลที่สำคัญ คือ น้ำตาล (แหล่งของน้ำตาลอาจจะได้จากอ้อย กากน้ำตาล และหัวบีท) แป้ง (แหล่งของแป้งได้จาก มันสัมปะหลัง ธัญพืช เมล็ดพืช ข้าวฟ่าง และหัวมันฝรั่ง เป็นต้น) และเซลลูโลส (เปลือกไม้ ฟางข้าว และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอื่น) (Varma, and Behera, 2003) สำหรับแป้งและเซลลูโลสนั้น ต้องได้รับการเปลี่ยนให้กลายเป็นน้ำตาลซึ่งเป็นสับสเตรทในการหมักเสียก่อนนอกจากนี้เฮมิเซลลูโลส ซึ่งพบว่ามีอยู่ในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร พืชลำต้นอ่อน (herbaceous) และไม้เนื้อแข็งที่มีวงปีน้อย สามารถใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ด้วย โดยได้รับการย่อยสลายให้กลายเป็น

น้ำตาลไซโลส และกลูโคสบางส่วน ซึ่งเป็นสับสเตรทในการหมักด้วยยีสต์ได้เช่นกัน (Himmel, Baker, and Overend, 1994)

การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสในชีวมวลพืชประกอบด้วยเทคนิคสำคัญ 3 ขั้นตอน คือ การปรับสภาพพืช การย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคส และการหมัก

1. การปรับสภาพพืช

จุดมุ่งหมายสำคัญในการปรับสภาพพืชก็คือ เพื่อแยกคาร์โบไฮเดรตออกจากการยึดจับของลิกนิน และขณะเดียวกันจะต้องมีการทำลายโครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลให้น้อยที่สุดด้วย (Mielenz, 2001) นอกจากนี้การปรับสภาพพืชยังต้องเพิ่มความสามารถในการเข้าย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เช่นเพิ่มพื้นที่ผิวและรูพรุนของสับสเตรท ลดความเป็น crystalline ของเซลลูโลสลง เป็นต้น

โดยทั่วไปการปรับสภาพพืชมี 3 วิธี คือ

1. ทางกายภาพ หรือ เคมีกายภาพ ได้แก่ การตัด การบด การฉีก การใช้รังสี การใช้ไอน้ำ การใช้น้ำร้อน เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวต่อหน่วยปริมาตรและเพิ่มพื้นที่เปิดสู่การเข้าทำปฏิกิริยา

2. ทางเคมี ได้แก่ การใช้สารละลายกรดเจือจาง สารละลายด่างเจือจาง การใช้ตัวทำละลาย เช่น เมทานอล เอทานอล หรืออะซีโตน การใช้แอมโมเนีย ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และสารเคมีอื่น ๆ เช่น EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต โอโซน และยูเรีย เป็นต้น

3. ทางชีวภาพ ได้แก่ การตัดวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และแช่กรดมะนาวเจือจางจากผลไม้ประเภทมะนาวผสมน้ำแอมโมเนียจากการขับถ่าย โดยใช้เวลาไม่นานจะทำให้ wax ที่ปกคลุมพืชแตกออก และเซลลูโลสจะอ่อนลง และจับกันอย่างหลวม ๆ ซึ่งเป็นการเพิ่มความสามารถในการเปียกให้แก่วัตถุดิบ เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ อีกทั้งยังช่วยให้วัตถุดิบไม่ลอยและไม่สร้างเยื่อเมือกเมื่อนำไปต้มกับเอนไซม์ที่อุณหภูมิเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ (Varma, and Behera, 2003)

2. การย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคส

การย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคสสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์เซลลูเลส

2.1 <u>การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธีทางเคมี</u> สามารถทำได้โดยใช้กรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง ซึ่งเป็นวิธีที่ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคสโดยตรง แต่ได้ผลผลิตปริมาณน้อย เพราะมีการทำลายน้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยกรด โดยน้ำตาลจะทำปฏิกิริยาต่อไปกับกรดทำให้ได้ผลิตภัณฑ์พลอยได้ชนิดอื่น เช่น furfural และกรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลสทำให้

ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ สำหรับกรดที่ใช้ในวิธีการนี้ได้แก่ กรดซัลฟูริกเข้มข้น 70% ขึ้นไป กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40% ขึ้นไป กรดซัลฟูริกเจือจาง 1% (w/v) (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นต้น และในการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 140-160 องศาเซลเซียส ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดแบบรุนแรง และไม่เฉพาะเจาะจง (Mcmillan, 1994) โดยภาชนะที่ใช้ต้องทนทานต่อการกัดกร่อนด้วยกรดสูงจึงมีราคาแพง นอกจากนี้น้ำทิ้งจากการย่อยสลายจะก่อให้เกิดผลพิษต่อสิ่งแวดล้อมเพราะมี กรดเจือปนอยู่

2.2 <u>การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธีทางชีวภาพ</u> สามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสซึ่งจะทำปฏิกิริยาแบบไฮโดรไลซีสกับเซลลูโลส ซึ่งชีวมวลพืชควรผ่านการปรับสภาพก่อนนำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่สูงขึ้น การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเป็นแบบเฉพาะเจาะจง และไม่รุนแรง แต่ใช้เวลานานกว่าวิธีทางเคมี แต่อย่างไรก็ตามหากคำนึงถึงสิ่งแวดล้อมแล้วการย่อยสลายด้วยวิธีนี้ดีกว่าวิธีทางเคมี นอกจากนี้สำหรับกระบวนการย่อยสลายและหมักแบบต่อเนื่องสามารถนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ร่วมกับยีสต์ได้ ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมาก

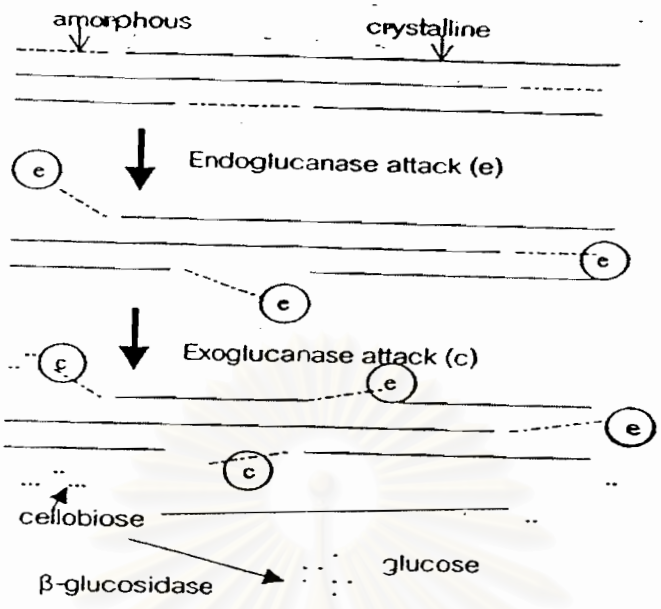
2.2.1 <u>การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส</u> เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีองค์ประกอบซับซ้อน ประกอบด้วยเอนไซม์หลักสามชนิดที่ทำงานร่วมกันในการย่อยสลายเซลลูโลส (Smith, and Aidoo, 1988; Radfort et al., 1996) ได้แก่

(1) exoglucanase (1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase, [EC 3.2.1.91]) ทำหน้าที่ตัดปลายสายส่วนที่เป็น non-reducing ของเซลลูโลส ทำให้ได้เซลโลไบโอสเป็นส่วนใหญ่ และได้กลูโคสด้วย

(2) endoglucanase (1,4-β-D-glucan 4–glucohydrohydrolase [EC 3.2.1.4]) ทำหน้าที่ตัดพันธะ β-glucosidic โดยการตัดแบบสุ่ม ทำให้ได้กลูโคสและเซลโลไบโอส

(3) β-glucosidase (β-D-glucoside [EC 3.2.1.21]) ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสกับเซลโลไบโอส และสายสั้น ๆ ของ cellooligosaccharides ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคส

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเริ่มต้นโดยการเข้าทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสซึ่งเป็นสับเสตรท ซึ่งเอนไซม์ endoglucanase จะสลายโครงสร้างเซลลูโลสส่วนที่เป็น amorphous แต่จะทำปฏิกิริยาได้น้อยในส่วนของเซลลูโลสที่เป็น crystalline จากนั้นเอนไซม์ exoglucanase จะช่วยสลายโครงสร้างเซลลูโลสให้กลายเป็นเซลโลไบโอส ซึ่งเป็นน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล และเอนไซม์ β-glucosidase จะย่อยเซลโลไบโอส กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แบบจำลองการย่อยสลายด้วยเซลลูเลสของเซลลูโลสในส่วนที่เป็น crystalline และ amorphous (Radfort et al., 1996)

เชื้อราหลายชนิดที่ผลิตเซลลูเลสและได้มีการศึกษามาแล้ว เช่น *Trichoderma viride* *Trichoderma reesei* *Fusarium solani* *Fusarium oxysporum* *Aspergillus niger* (Eriksson et al.,1990) *Trichoderma reesei* Rut C 30 (Xiao-Bin, Yun, and Koo, 1998) เป็นต้น

3. **การหมัก**

การหมักเกิดขึ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทานอล ในทางทฤษฎี จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอลได้ 51.1% โดยน้ำหนักของน้ำตาล แต่ในทางปฏิบัติน้ำตาลประมาณ 95% เท่านั้นที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล น้ำตาลที่เหลือจะถูกใช้ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (วราวุฒ ครูส่ง, 2529: อ้างถึงใน สันทนา เสถียรไพศาล, 2539) จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมัก คือ ยีสต์ และแบคทีเรีย ยีสต์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอทานอลจากกลูโคสได้ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomyces uvarum* *Kluyveromyces fragilis* *Kluyveromyces marxianus* *Candida brassicae* *Candida pseudotropicalis* เป็นต้น แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอทานอลจากกลูโคสได้ เช่น *Escherichia coli* B (pLOI297) *Zymomonas mobilis* *Clostridium thermocellum* เป็นต้น (Philippidis, 1996)

กระบวนการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นเอทานอล

Philippidis (1996) รายงานถึงกระบวนการที่ใช้ในการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นเอทานอล ประกอบด้วย 3 กระบวนการ คือ

1. <u>การย่อยสลายและการหมักแบบแยกส่วน</u> (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF) เป็นกระบวนการที่แยกขั้นตอนระหว่างการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ให้ได้กลูโคสก่อน แล้วจึงนำไปหมักต่อเพื่อให้ได้เอทานอล ข้อดีของกระบวนการนี้คือ สามารถแยกขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน 40 – 60 องศาเซลเซียส และการหมักที่มีอุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีข้อจำกัดในการเจริญของยีสต์ แต่กระบวนการนี้มีข้อเสียที่สำคัญคือ กลูโคสที่เกิดขึ้นที่มีปริมาณมากถึงจุดหนึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β–glucosidase ในระหว่างการย่อยสลาย จึงทำให้ต้องใช้สับสเตรทปริมาณไม่มากแต่ใช้เอนไซม์ปริมาณมากเพื่อที่จะให้ได้ผลผลิตเอทานอลที่ยอมรับได้

2. <u>การเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยจุลินทรีย์โดยตรง</u> (Direct Microbial Conversion, DMC) เป็นวิธีการที่รวมเอาการผลิตเซลลูเลส การย่อยสลาย และการหมักอยู่ในขั้นตอนเดียวกัน ซึ่งเป็นการประหยัดต้นทุนได้ เพราะลดจำนวนถังปฏิกิริยาและท่อส่งได้ อย่างไรก็ตาม ผลผลิตเอทานอลที่ได้ค่อนข้างต่ำมีผลิตภัณฑ์พลอยได้หลายชนิด และจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการนี้ได้มีความทนทานต่อเอทานอลต่ำจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นเอทานอลได้โดยตรง เช่น *Candida thermocellum Candida thermohydrosulfuricum Toruopsis ethanolicus* และ *Fusarium oxysporum* เป็นต้น

3. <u>กระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง</u> (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) เป็นกระบวนการที่รวมเอาการย่อยสลายเซลลูโลสและการหมักไว้ในขั้นตอนเดียวกัน กลูโคสที่เกิดขึ้นในระบบจะถูกใช้ไปการหมักโดยจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่อง จึงพบว่ามีเซลโลไบโอสและกลูโคสอยู่ในระบบต่ำมาก ด้วยเหตุผลนี้จึงช่วยลดปัญหาของการยับยั้งการทำงานของเซลลูเลสโดยน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นได้ และช่วยลดปริมาณเอนไซม์ที่ต้องใช้ได้อีกด้วยอย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการนี้อยู่ที่ประมาณ 37 – 38 องศาเซลเซียส และจะดีที่สุดในช่วงประมาณ 40 – 60 องศาเซลเซียส เพราะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเซลลูเลส ดังนั้นในการหมักด้วยยีสต์ สายพันธุ์ที่ใช้จะต้องมีความทนร้อนจึงจะได้ผลิตภัณฑ์เอทานอลที่ดีเมื่อใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 40 องศาเซลเซียสขึ้นไป

มีรายงานว่ายีสต์ *Kluyveromyces marxianus* สามารถเจริญเติบโตได้แม้อุณหภูมิสูงถึง 49 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส Banat, Nigam และ Marchant (1992) ได้ทำการคัดแยกยีสต์ 5 ชนิดจากประเทศอินเดีย สองชนิดที่คัดแยกได้เป็น *Kluyveromyces marxianus* ในการศึกษาการเจริญเติบโตพบว่า

ยีสต์ทั้ง 5 ชนิดที่คัดแยกได้สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารกึ่งแข็ง ในจานเลี้ยงเชื้อแม้อุณหภูมิจะสูงถึง 52 องศาเซลเซียส และมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากการทดลองเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีกลูโคส 14% (w/v) และอาหารที่มีกากน้ำตาล พบว่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด รองลงมาคือที่ 45 องศาเซลเซียส โดยสายพันธุ์ที่ให้ผลิตภัณฑ์เอทานอลสูงสุด คือ *Kluyveromyces marxianus* IBM3 สายพันธุ์นี้จึงได้มีการศึกษาต่อไปเพื่อนำมาใช้ในกระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง

แหล่งทรัพยากรประเภทหญ้าและวัสดุทางการเกษตรที่ใช้ผลิตพลังงาน

Boyle, Barron และ McHale (1997) ทำการทดลองหมักและการย่อยสลายแบบต่อเนื่องของฟางข้าวบาร์เลย์ ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เข้มข้น 10% (w/v) โดยใช้เซลลูเลสตั้งต้น 2% (w/v) และใช้ *Kluyveromyces marxianus* IMB3 ผลการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณฟางข้าวที่เป็นสับสเตรทผลิตภัณฑ์เอทานอลจะเพิ่มขึ้น โดยได้ผลิตภัณฑ์ 3.9 8 และ 12 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ฟางข้าว 2 4 และ 6% (w/v)

Belkacemi และคณะ (1998) ทำการทดลองผลิตเอทานอลจากหญ้าและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยใช้การปรับสภาพด้วยวิธี ammonia fiber explosion (AFEX) ในถังแสตนเลสที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ความดัน 3.45 MPa จากนั้นนำของเหลวที่ได้จากการปรับสภาพพืชแต่ละชนิดมาหมักด้วยยีสต์ *Pachysolen tannophillus* ผลการทดลองพบว่าผลผลิตที่ได้จากอัลฟาฟา reed canary grass หญ้า timothy และฟางข้าวบาร์เลย์ มีค่าใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 6 กรัมต่อลิตร ผลิตภัณฑ์เอทานอลที่ได้จากต้นข้าวโพดประมาณ 4 กรัมต่อลิตร

Krishna, Reddy และ Chowdary (2001) ทำการทดลองผลิตเอทานอลจากใบอ้อยซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในประเทศอินเดีย ที่จะถูกเผาทิ้งหลังการเก็บเกี่ยว และศึกษาการผลิตเอทานอลจากใบ *Antigonum leptopus* ซึ่งเป็นวัชพืชในอินเดีย ในการทดลองได้ทำการปรับสภาพพืชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และใช้เซลลูเลสทางการค้าที่ผลิตจาก *Trichoderma reesei* QM-9414 ร่วมกับ β-glucosidase ของ Novozym ใช้ยีสต์ทนร้อน *Kluveromyces fragilis* NCIM 3358 ผลการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการ SSF ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส พบว่า *A. Leptopus* ให้ผลผลิตเอทานอล 1.6-2.7% (w/v) โดยขึ้นอยู่กับการเติม β-glucosidase เสริม และใบอ้อยให้ผลผลิตเอทานอล 0.8-2.8% (w/v)

Chang และคณะ (2001) ทำการทดลองผลิตเอทานอลจาก switchgrass และต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (lime) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และใช้กระบวนการ SSF ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากผลการทดลองพบว่า switchgrass และต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพให้ผลผลิตเอทานอล 72% และ 62% ตามลำดับ ซึ่งผลผลิตเอทานอลจาก swithgrass นั้นใกล้เคียงกับผลผลิตเอทานอลจากต้นสน poplar ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีเดียวกัน คือ 73% และในการผลิตเอทานอลจาก swithgrass ด้วยกระบวนการ SSF นั้นพบว่า เซลโลไบโอสที่สะสมอยู่ในช่วง 3 วันแรกของการหมักลดลงเมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่า เซลโลไบโอสเปลี่ยนเป็นกลูโคสได้เกือบทั้งหมด เนื่องจากเหลือเซลโลไบโอสต่ำมาก (น้อยกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และกลูโคสก็เหลือปริมาณต่ำเช่นกัน คือ น้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่ากลูโคสส่วนใหญ่ถูกใช้ไปอย่างต่อเนื่องโดยยีสต์

ในหลาย ๆ ประเทศมีการทดลองผลิตเอทานอลจากพืชทางการเกษตร และนำเอทานอลมาใช้ทดแทนน้ำมันเบนซินอย่างจริงจัง เช่น ประเทศบราซิลมีการผลิตเอทานอลจากอ้อย ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ และมีการใช้เอทานอล 95.5% (ซึ่งยังมีน้ำผสมอยู่) ผสมกับน้ำมันเบนซิน (gasoline) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์คือแก๊สโซฮอล โดยมีอัตราส่วนเอทานอล 24% โดยปริมาตร ในทวีปอเมริกาเหนือมีการใช้ E85 และ E10 (gasohol) โดยมีอัตราส่วนผสมของเอทานอลในน้ำมันเบนซิน 85% และ 10% โดยปริมาตร ตามลำดับ ประเทศสำคัญที่เป็นผู้ผลิตเอทานอลสำหรับเป็นเชื้อเพลิง คือ บราซิล ผลิตจากน้ำอ้อยและกากน้ำตาล ในปี 1999 ได้ผลิตภัณฑ์ 10.5×10^9 ลิตร (มีน้ำผสมอยู่) และ 6.5×10^9 ลิตร (ไม่มีน้ำผสมอยู่) สหรัฐอเมริกา ผลิตจากข้าวโพดเป็นหลักถึง 95% และใช้ข้าวสาลีและข้าวบาร์เลย์เป็นวัตถุดิบเสริม ในปี 1998 ได้ผลผลิต 5.3×10^9 ลิตร (ไม่มีน้ำผสมอยู่) และแคนาดา ผลิตจากข้าวโพดและข้าวสาลี ในปี 1998 ได้ผลผลิต 0.24×10^9 ลิตร (ไม่มีน้ำผสมอยู่) (Wheals et al., 1999)

สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกานอกจากจะผลิตเอทานอลจากพืชทางการเกษตรแล้ว ยังมีโครงการเสริมให้ผลิตโดยใช้ switchgrass ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะยังไม่มีการผลิตในระดับโรงงานอุตสาหกรรม แต่กระทรวงพลังงานของสหรัฐอเมริกาเชื่อมั่นเป็นอย่างยิ่งว่าเทคโนโลยีการผลิตจะพร้อมและทำได้จริงประมาณปี 2010 เนื่องจากมีการทดลองอย่างจริงจังถึงการนำ switchgrass มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล และมีการประมาณการว่าจะผลิตเอทานอลจาก switchgrass ได้ประมาณ 80 แกลอนต่อ switchgrass 1 ตัน ดังนั้นถ้าได้ผลผลิตชีวมวล switchgrass 6 ตัน ดังนั้นถ้าได้ผลผลิตชีวมวล switchgrass 6 ตันต่อเอเคอร์ จะได้เอทานอลประมาณ 480 แกลอน (Norby, 2000)

สำหรับประเทศไทยเริ่มมีการผลิตเอทานอลอย่างจริงจังและนำมาใช้ผสมกับน้ำมันเบนซิน เพื่อเป็นเชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์เมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา เนื่องจากในปี 2000 ทั่วโลกประสบปัญหาวิกฤตการณ์น้ำมันอีกครั้ง จนถึงปัจจุบันราคาน้ำมันก็ยังคงสูงอยู่ การผลิตเอทานอลในประเทศไทยจะเน้นที่วัตถุดิบทางการเกษตรคือ อ้อย กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง โดยที่วัตถุดิบ 1 ตัน เมื่อใช้อ้อยจะได้เอทานอล 70 ลิตร เมื่อใช้กากน้ำตาลจะได้เอทานอล 260 ลิตร เมื่อใช้มันสำปะหลังสดจะได้เอทานอล 180 ลิตร ในโครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา มีการผลิตเอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ 95% จากกากน้ำตาล และเอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ 91% โดยมีกำลังการผลิต 25 ลิตรต่อชั่วโมง และในอนาคตอันใกล้นี้ประเทศไทยจะมีการประกาศเลิกใช้สาร Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE) ซึ่งเป็นค่าออกเทนที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และต้องนำเข้าจากต่างประเทศ แล้วเปลี่ยนมาใช้เอทานอลแทนสารนี้ (คณะกรรมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2546)

การศึกษาถึงการผลิตเอทานอลจากชีวมวลมีในประเทศไทยเช่นกัน พรเทพ ถนนแก้ว (2538) และ Punnapayak และคณะ (1999) รายงานถึงเชื้อราที่คัดแยกได้จากบริเวณที่ปลูกต้นป่านศรนารายณ์ *(Agave sisalina)* คือ เชื้อรา *Acrophialophora* sp. เป็นเชื้อราทนร้อนที่เจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ได้มีการนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ในการหมักเส้นใยป่านศรนารายณ์ด้วยกระบวนการ SSF ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่าให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 0.11 กรัมต่อกรัมสับสเตรท สุภาภรณ์ โสภณพัฒนะโภคา (2546) รายงานถึงการใช้เชื้อรา *Acrophialophora* sp. UV 10-2 ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อใช้ในกระบวนการ SSF และใช้ยีสต์ *Klyveromyces marxianus* NRRL Y-1109 ในการผลิตเอทานอลจากวัชพืชต่าง ๆ และวัชพืชที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดคือ 0.18 กรัมต่อกรัมสับสเตรท สันทนา เสถียรไพศาล (2539) รายงานถึงการผลิตเอทานอลจากเส้นใยป่านศรนารายณ์โดยใช้เชื้อรานี้เช่นกัน พบว่าเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 0.304 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ระวีวรรณ แกล้วกล้า (2538) รายงานถึงการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว โดยหมักที่อุณหภูมิห้องแบบไม่ใช้ออกซิเจนเป็นเวลา 4 วัน ได้เอทานอลเข้มข้น 1.3% โดยปริมาตร Pumtong และคณะ (1999) รายงานถึงการใช้ฝักจามจุรีมาผลิตแอลกอฮอล์โดยวิธีการตรึงเซลล์ยีสต์ และสามารถทำไวน์จากฝักจามจุรีได้ Phowchinda (1999) รายงานถึงการใช้เปลือกสับปะรดมาผลิตเอทานอล ได้ผลผลิตสูงถึง 0.48 กรัมต่อกรัมสับสเตรท

ลักษณะอีโคไทป์และการเจริญเติบโตของหญ้าแฝกหอม

1. **อีโคไทป์ศรีลังกา**

เจริญเติบโตดีในสภาพพื้นที่เป็นดินลูกรังอากาศหนาวเย็น ร่มเงา แตกกอ 10 ต้นต่อกอ เส้นผ่านศูนย์กลางกอ 11 เซนติเมตร สูง 101 เซนติเมตร แตกกอค่อนข้างหลวม หน่อกลม ยืดปล้องเร็ว โคนกอเล็ก ใบแก่ค่อนข้างเล็ก ท้องใบสีขาวน้อยใกล้เคียงไปทางด้านใบหญ้าแฝกดอน ดอกมีสีม่วง เริ่มออกดอกเมื่ออายุประมาณ 1 เดือน หลังจากปลูก ขยายพันธุ์ง่ายในสภาพที่มีความชื้นสูงแสงน้อย จะไม่ต้านทานโรคโคนเน่า

2. **อีโคไทป์สงขลา** 3

เจริญเติบโตดีในสภาพพื้นที่เป็นดินร่วนเหนียวทรายถึงลูกรัง แตกกอ 24 ต้นต่อกอ เส้นผ่านศูนย์กลางกอประมาณ 13 เซนติเมตร สูง 112 เซนติเมตร แตกกอหลวม หน่อกลมอวบอืดปล้องเร็ว ใบสีเขียวอ่อน ท้องใบสีขาว ดอกสีม่วงแดง ออกดอกเมื่ออายุประมาณ 1 เดือนครึ่งหลังจากปลูก

3. **อีโคไทป์สุราษฎร์ธานี**

เจริญเติบไตในสภาพพื้นที่เป็นดินร่วนเหนียวและดินลูกรัง แตกกอ 22 ต้นต่อกอ เส้นผ่านศูนย์กลางกอ 13 เซนติเมตร สูง 108 เซนติเมตร แตกกอหลวมหน่อกลมอวบ ยืดปล้องเร็ว ทรงพุ่มกางมาก ใบสีเขียวอ่อน ท้องใบขาว ดอกสีม่วงแดง ออกดอกเมื่ออายุประมาณ 1 เดือน หลังจากปลูก (วิทูร ชินพันธุ์, 2541)

เชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้

เชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ มีทั้งที่อยู่ในดินและอยู่กับพืช

1. **เชื้อราในดิน**

เชื้อราในดินที่มีบทบาทสำคัญมีลักษณะดังนี้

1.1 <u>แซพโพรโทรปส์ (saprotrophs)</u> คือ เชื้อราที่สามารถย่อยและสลายหญ้าแห้ง (litter) เศษหิน เศษดิน

1.2 <u>ผู้ล่า (predator) และปรสิต (parasite)</u> คือ เชื้อราที่เข้าทำลายและเบียดเบียนสิ่งมีชีวิตในดิน

1.3 <u>ซิมไบโอซีส (symbiosis)</u> คือ เชื้อราที่อยู่ร่วมกับพืชและเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน เช่น ไมคอไรซา (mycorhizae) หรือ ไลเคน (lichen) และเชื้อราที่อยู่ร่วมกับแมลงและเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน

ราชนิดที่เป็นแซพโพรโทรปส์ จะเก็บเอนไซม์ไว้ที่ถุงเวสซิเคิล (vesicle) เมื่อจะมีการหลั่งเอนไซม์ เอนไซม์ก็จะย่อยเยื่อหุ้มเซลล์ และเอนไซม์จะถูกปล่อยออกมา โดยทั่วไปมักมีอยู่หลากหลาย ประกอบด้วย proteases cellulose (cellobiohydrolase) xylanases pectine–

degrading enzyme (lyase esterase pectate lyase และ polygalactunase) ligninases (lignin peroxidases และ manganese peroxidase) และเอนไซม์ที่หลั่งออกมานอกเซลล์อื่น ๆ อีก (Adl, 2003)

2. **เชื้อราที่อยู่กับพืช**

เชื้อราที่อยู่ร่วมกับพืชส่วนใหญ่ก่อโรคในพืช (pathogen) ซึ่งสามารถเข้าจู่โจมทุกส่วนของพืชได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโต และได้ประโยชน์จากพืช แต่ก็มีเชื้อราแซพโพรโทรปิก (saprotrophic) มากมายอาศัยอยู่ทั้งบนผิวพืชและในพืช ซึ่งอาจจะไม่มีอันตรายแต่กลับมีประโยชน์ และการย่อยสลายเศษพืช (plant litter หรือ plant remains) โดยส่วนใหญ่เกิดขึ้นโดยเชื้อราแซพโพรโทรปิกและแบคทีเรีย สำหรับใบซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่สามารถเห็นได้ง่ายและชัดเจนมากของพืช มีทั้งเชื้อราประเภทแซพโพรไฟท์ (saprophyte) และโรคพืช (pathogens) ที่เจริญอยู่ได้ทั้งผิวใบ (epiphyte) และในใบ (endrophyte) (Campbell, 1985)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Model BL610, Sartorius, Germany)
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Model TC-205, Denver Instrument Company)
3. กล้องจุลทรรศน์ (Model CH30RF200, Olympus, Japan)
4. Vortex (Model Genie 2, Scientific Industries)
5. Hot plate (Cimarec 3)
6. Hot plate (Model 210T, Thermix, Fisher Scientific, USA)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) แบบควบคุมอุณหภูมิ (Model Universal 32R, Hettich, Germany)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) แบบควบคุมอุณหภูมิ (Model B-22M, Thermo IEC, International Equipment Company, USA)
9. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Model NovaSpec 4049, LKB Biochrom, England)
10. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Model PP–50, Sartorius, Germany)
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Heto, Heto–Holten, Den Mark)
12. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker, Model G25, New Brunswick Scientific Co. Inc., USA)
13. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker, Lab – Line)
14. ตู้อบความร้อนสูง (Hot Air Oven) (model U50 790, 387, Memmert)
15. ตู้อบความร้อนสูง (Hot Air Oven) (Binder)
16. ตู้อบความร้อนสูง (Hot Air Oven) (Fisher Scienctific)
17. เตาเผาเถ้า (Muffle Furnace) (Fisher Scienctific)
18. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) (Ta Chang, Taichang, Taiwan)
19. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) (TC-459, Gemmy Industrail Corp, Taiwan)

20. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) (Model B∀T123, Issco)
21. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) (Model, Clean)
22. เครื่อง Gas liquid Chromatography (Model 7AG, Shimadzu) แบบ ionization detector โดยใช้ Parapak Q column

เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

1. Sodium lauryl sulfate (APS)
2. Disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA) (APS)
3. Sodium borate decarhydrate ($Na_2B_40_7.10H_2O$) (APS)
4. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Merck)
5. 2–Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoehyl ether) (Merck)
6. Sodium Sulfite ($NaSO_3$) (Scharlau)
7. Decahydronaphtalene (Fluka)
8. Acetone (Merck)
9. Sulfuric acid (Merck)
10. Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) (SERVA)
11. Potassium permanganate ($KmnO_4$) (Carlo Erba)
12. Silver sulfate (Ag_2SO_4) (Carlo Erba)
13. Ferric nitrate nanohydrate ($Fe(NO_3)_3.9H_2O$) (APS)
14. Silver nitrate ($AgNO_3$) (Merck)
15. Potassium acetate (Scharlau)
16. Acetic acid, glacial (Merck)
17. Tertiary butyl alcohol (Butanol) (APS)
18. Oxalic acid dehydrate (Carlo Erba)
19. 95% Ethanol
20. Hydrochloric acid (HCl) (Merck)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เคมีภัณฑ์สำหรับการเลี้ยงเชื้อราและยีสต์และการผลิตเอนไซม์

1. วุ้นผง
2. Yeast extract (Difco)
3. Malt extract (Difco)
4. Bacto peptone (Difco)
5. D–glucose (Merck)
6. Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$) (Carlo Erba)
7. Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$) (Merck)
8. Calcium hydrogenphosphate dehydrate ($CaHPO_4.2H_2O$) (Scharlau)
9. Corn steep liquor
10. α-cellulose (sigma)
11. Tween 80 (Fluka)
12. Ferrous sulfate ($FeSO_4$) (M&B)
13. Zinc sulfate ($ZnSO_4$) (M&B)
14. Manganese sulfate ($MnSO_4$) (Carlo Erba)
15. Cobalt chloride ($CoCl_2$) (M&B)
16. calcium chloride (Scharlau)

เคมีภัณฑ์สำหรับการวัดปริมาณเอนไซม์และโปรตีน

1. 3,5–dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$) (Sigma)
2. Sodium bisulfite ($NaHSO_3$) (M&B)
3. Sodium potassium tartrate (Carlo Erba)
4. D–salicin (Fluka)
5. D–glucose monohydrate (Merck)
6. Phenol (C_6H_6O) (Merck)
7. Sodium hydroxide (Mallinckrodt)
8. Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$) (APS)
9. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1)
10. D–xylose (Fluka)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. Ammonium molybdate
12. $Na_2HaSO_4.7H_2O$
13. $NaH_2PO_4.2H_2O$
14. $Na_2HPO_4.2H_2O$

เคมีภัณฑ์สำหรับการเตรียมบัฟเฟอร์

1. Citric acid ($C_3H_4(OH)(COOH)_3$) (APS)
2. Trisodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7.H_2O$) (APS)
3. Acetic acid, glacial (Merck)
4. Sodium acetate (Merck)
5. Sodium hydroxide (Mallinckrodt)
6. Hydrochloric acid (Merck)
7. Sodium sulfate
8. Sodium carbonate (M&B)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างหญ้าแฝกหอม

เก็บตัวอย่างใบแห้งของหญ้าแฝกหอม 3 อีโคไทป์ คือ อีโคไทป์สุราษฎ์ธานี อีโคไทป์สงขลา 3 อีโคไทป์ศรีลังกา พร้อมด้วยตัวอย่างดินบริเวณผิวดินใต้กอหญ้าแฝกหอมแต่ละอีโคไทป์

2. การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

2.1 <u>การคัดแยกขั้นที่ 1</u>

นำตัวอย่างมาตัวอย่างละ 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเขย่าให้เข้ากัน 2 นาที หลังจากนั้นดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารสูตร Czapex's dox medium (ภาคผนวก ก) 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน แล้วใส่แหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 2.0 x 10.0 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยการนึ่งด้วยไอน้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) ตามวิธีของ Mandel และ Sternberg (1976)

2.2 การคัดแยกขั้นที่ 2

ถ่ายเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร Carboxymethyl Cellulose (CMC) Agar (ภาคผนวก ก) ตามวิธีของ Hankin และ Anagnostakis (1977) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาราดทับด้วย Congo red ที่มีความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) แล้วล้างด้วย โซเดียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) หลังจากนั้นเก็บเชื้อราที่ให้บริเวณใสที่ดีที่สุดของแต่ละตัวอย่างไว้เพื่อทำการคัดแยกขั้นที่ 3 ต่อไป

2.3 การคัดแยกขั้นที่ 3

นำเชื้อราที่มีบริเวณใสที่ดีที่สุดของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการคัดแยกขั้นที่ 2 มาผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ตามวิธีของ Punnapayak และ Emert (1986) ในอาหารสูตร production medium (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน ที่สภาวะเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที (rpm) การเตรียมหัวเชื้อใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะปลายเส้นใย จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลง และเก็บน้ำใสของเอนไซม์เซลลูเลสที่อยู่ในอาหาร (crude enzyme) โดยวิธี centrifuge ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส โดยวัดแอคติวิตี (activity) ของเอนไซม์ exoglucanase และเอนไซม์ endoglucanase ตามวิธีของ Ghose (1987) และวัดแอคติวิตี (activity) ของเอนไซม์ β - glucosidase ตามวิธีของ Sternberg Vijayakumar และ Reese (1977) (ภาคผนวก ง) และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Bradford assay (ภาคผนวก ง) คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดไว้เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

3. การจัดจำแนกเชื้อรา

นำเชื้อราที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด มาทำการจัดจำแนกในระดับจีนัส โดยทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารสูตร PDA ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงด้วยเทคนิคการทำสไลด์แบบ Slide culture technique ตามวิธีของ Barnett และ Hunter (1972) Klich และ Pitt (1988) และ Sutton (1964)

4. การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

4.1 หาอุณหภูมิที่เหมาะสม

นำเชื้อราที่มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจำเพาะสูงที่สุดจากข้อ 2.3 มาเลี้ยงในอาหารสูตร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ค่าความเป็น

กรดด่างเท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาถ่ายเชื้อลงในอาหารสูตร Production medium ที่มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อผลิตเอนไซม์ โดยเจาะชิ้นวุ้นบริเวณที่มีปลายเส้นใยอยู่ ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น จากนั้นนำไปบ่มในตู้เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และทำการแปรผันอุณหภูมิการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน

เก็บผลการทดลองและวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจำเพาะสูงที่สุด และทำการเปรียบเทียบกันของอุณหภูมิที่ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เพื่อเลือกอุณหภูมิที่ให้ผลดีที่สุดไว้ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

4.2 <u>หาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม</u>

ทำการเลี้ยงเชื้อราจากข้อ 2.3 ในอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด และทำการ แปรผันค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4 5 6 และ 7 เป็นเวลา 7 วัน ในตู้เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

เก็บผลการทดลองและวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจำเพาะสูงที่สุด ที่ได้จากการเปรียบเทียบกันของค่าความเป็นกรดด่างที่ 4 5 6 และ 7 เพื่อเลือกค่าความเป็นกรดด่างที่ให้ผลดีที่สุดไว้ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

4.3 <u>หาระยะเวลาเหมาะสม</u>

ทำการเลี้ยงเชื้อราจากข้อ 2.3 ในอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง pH 5 ที่ทำให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด และแปรผันจำนวนวันที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อดังนี้คือ 3 5 9 11 และ 13 วัน ตามลำดับ ในตู้เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

เก็บผลการทดลองและวิเคราะห์หาค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด ที่ได้จากการเปรียบเทียบกันของจำนวนวันที่ 3 5 7 9 11 และ 13 วัน เพื่อเลือกระยะเวลาที่ให้ผลดีที่สุดไว้ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

5. ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราเพื่อใช้ผลิตหัวเชื้อในอาหารเหลว

โดยทำการเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้จากข้อ 2.3 ในอาหารสูตร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมาถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสูตร Potato Dextrose Broth (PDB) โดยเจาะชิ้นวุ้นบริเวณที่มีปลายเส้นใยเจริญอยู่บน PDA ด้วย cork

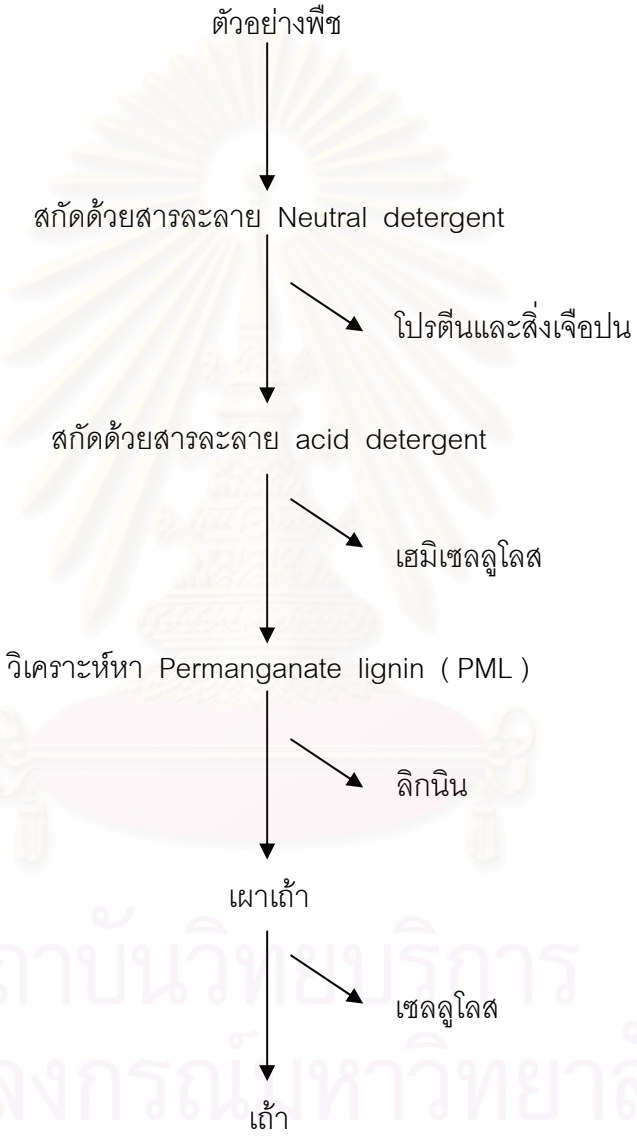
borer เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น ใส่ในอาหารสูตร PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่มีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 วัน

เก็บผลทุก 2 วัน นำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 เอาแต่เส้นใยและล้างเส้นใยด้วย normal saline เข้มข้น 0.85% (w/v) แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยที่ได้มาสร้างกราฟแสดงการเจริญเติบโตเทียบกับเวลา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวล ได้แก่ ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา ทั้งก่อนทำการ pretreatment และหลังทำการ pretreatment ตามวิธีของ Goering และ Van Soest (1970) (ภาคผนวก ค) ซึ่งมีขั้นตอนโดยย่อดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ขั้นตอนโดยย่อในการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

7. ศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ในการทดลองคือ *Kluyveromyces thermotolerans* ซึ่งได้รับจาก ห้องปฏิบัติการ Plant Biomass Utilization ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศึกษาการเจริญของยีสต์ในอาหารสูตร Yeast Malt Broth (YMB) (ภาคผนวก ก) โดยเขี่ยเชื้อ ถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร YMB ปริมาณ 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเมื่อยีสต์เจริญจนมีความเข้มข้นของเซลล์ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงถ่ายเชื้อลงในอาหารสูตรเดียวกันโดยใช้หัวเชื้อปริมาตร 5% (v/v) จากนั้นนำไปเลี้ยงในภาวะเดียวกัน

เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำมา centrifuge เพื่อเอาน้ำใสส่วนบน (supernatant) ทิ้ง และกรองเอาแต่เซลล์โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1 ล้างเซลล์ด้วย normal saline เข้มข้น 0.85% (w/v) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ เพื่อหาน้ำหนักแห้ง แล้วนำค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่ได้มาสร้างกราฟการเจริญเติบโตเทียบกับเวลา (ภาคผนวก จ)

8. การหมักและการย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

8.1 <u>การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส</u>

ทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร (1 ลิตร) โดยใช้สปอร์ของเชื้อราเป็น seed แทนการใช้ชิ้นวุ้นที่มีปลายเส้นใยเจริญอยู่ เนื่องจากต้องใช้หัวเชื้อปริมาณมาก และ seed ที่ใช้จะมีช่วงการเจริญอยู่ในช่วงกลางถึงปลาย log phase (ผลการทดลองจากข้อ 5) ปริมาตร 10% (v/v) บ่มเชื้อในอาหารสูตร Production medium ที่ 150 รอบต่อนาที และใช้ภาวะต่าง ๆ ตามผลการทดลองข้อ 4

8.2 <u>การปรับสภาพพืช</u>

ทำการปรับสภาพพืชด้วยวิธีทางกายภาพและทางเคมี การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพทำได้โดยนำตัวอย่างหญ้าแฝกแต่ละอีโคไทป์มาตัดให้เป็นชิ้น ๆ ขนาดยาวประมาณ 1 นิ้ว แล้วนำไปปั่นตัดด้วยเครื่องปั่นตัดพอลิเมอร์ จากนั้นนำมาปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีตามวิธีของ Punnapayak และ Hoffmann (1994) โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์ 10% (w/v) ในอัตราส่วน 2 : 1 (สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์ : ตัวอย่างพืช) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านจนกระทั่งมีค่า pH เท่ากับ 7.0 หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้วใน 0.04 M sodium acetate buffer pH 5.0 แล้วแช่ในตู้เย็นอย่างน้อย 1 คืนก่อนมาใช้ในการหมักตัวอย่างพืชที่ผ่านการปรับสภาพแล้วให้นำมาวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบชีวมวล ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

8.3 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

เลี้ยงยีสต์ *Kluyveromyces thermotolerans* ในอาหารสูตร YMB โดยเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลวสูตร YMB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น เมื่อยีสต์เจริญจนเข้าสู่ภาวะที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง (ผลการทดลองจากข้อ 7) ให้ถ่ายเชื้อลงในอาหารสูตรเดิมแต่ขยายขนาดการผลิตเป็นระดับ ฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ 400 ml แล้วเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เขย่าที่ 150 rpm โดยใช้เชื้อปริมาตร 5% (v/v) นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เพื่อแยกเอาแต่เซลล์ ล้างเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง 2 ครั้ง ด้วย 0.04 M sodium acetate buffer pH 5.0 หรือ normal saline เข้มข้น 0.85% (w/v) เมื่อได้เซลล์ยีสต์แล้วให้นำมาเจือจางด้วยอาหารสูตร PDB นับจำนวนเซลล์จนได้ความเข้มข้น 1×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการหมักแบบ SSF ตามวิธีของ Punnapayak Kuhirun และ Thanonkeo (1999)

8.4 การหมักในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

ชั่งหญ้าแฝกหอมแต่ละอีโคไทป์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว 3 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 0.04 M sodium acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม F2 medium (Punnapayak et al., 1999) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที เมื่อเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วนำมาเติมเอนไซม์เซลลูเลส 75 มิลลิลิตร และเติมยีสต์ *Kluyveromyces thermotolerans* ที่อยู่ในอาหารสูตร PDB และมีความเข้มข้นของจำนวนเซลล์ 1×10^9 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดปากฟลาสก์ด้วยอะลูมินัมฟอยด์และรัดยาง เพื่อป้องกันไม่ให้อากาศเข้าได้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสที่เอนไซม์เซลลูเลสมีแอคติวิตีจำเพาะดีที่สุด (ผลการทดลองจากข้อ 4) และยีสต์สามารถทนได้ ความเร็วรอบในการเขย่า 125 รอบต่อนาที (เพื่อให้ส่วนประกอบต่าง ๆ เข้ากันได้ดี)

เก็บผลการทดลองในวันที่ 0 1 2 3 4 5 6 และ 7 แล้วนำมาวัดค่า pH และนับจำนวนเซลล์ จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซลเซียส เพื่อนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาปริมาตรเอทานอลด้วยเครื่อง Gas liquid chromatography (GC) โดยใช้ Parapak Q column แบบ ionization detector แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเอทานอล และวัดปริมาณ reducing sugar โดยวิธี DNS Assay

9. การวิเคราะห์หาผลทางสถิติ

ทุกการทดลองถูกออกแบบการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองซึ่งทำ 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์หาผลด้วยโปรแกรม SPSS เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้ค่านัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 พร้อมทั้งเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยค่า LSD (Least Significant Difference) Homogeneous subsets (Duncan)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบแห้งของหญ้าแฝกหอม 3 อีโคไทป์ คือ อีโคไทป์ศรีลังกา อีโคไทป์สงขลา 3 และอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี (ภาพที่ 8) พร้อมด้วยตัวอย่างดินบริเวณผิวดินใต้กอหญ้าแฝกหอมแต่ละอีโคไทป์ (ภาพที่ 9) ในช่วงเดือนพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2546 จากสถานีพัฒนาที่ดิน อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก พร้อมทั้งตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของหญ้าแฝกหอม คือ *Vetiveria zizaniondes* Nash (ภาพที่ 10)

ภาพที่ 8 ตัวอย่างใบแห้งของหญ้าแฝกหอม

ภาพที่ 9 ตัวอย่างดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอม

ภาพที่ 10 ตัวอย่างหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* Nash

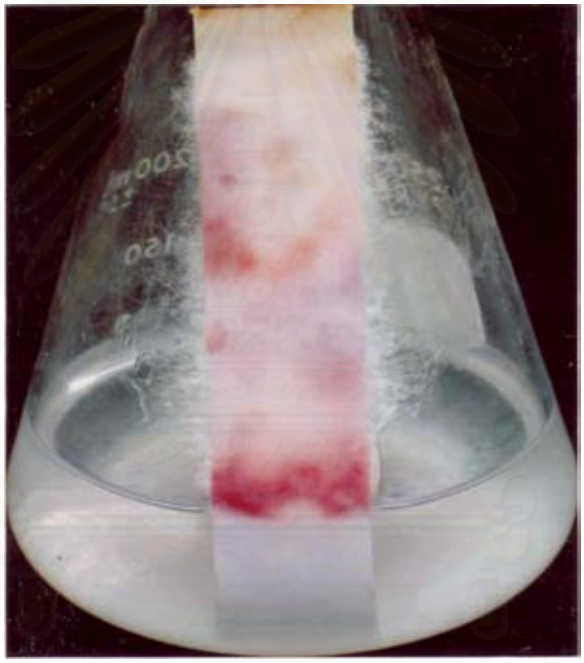
2. การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

2.1 <u>การคัดแยกขั้นที่ 1</u>

เมื่อแยกเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex's dox medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีเชื้อราเจริญขึ้นบนกระดาษกรองนำเชื้อราขึ้นบนกระดาษกรองมาทำการคัดแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ต่อไปในอาหาร Potato Dextrose Agar โดยบ่มเชื้อที่ เป็นเวลา 7 วัน สามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งสิ้น 113 สายพันธุ์ จากตัวอย่างใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา 12 สายพันธุ์ จากผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา 5 สายพันธุ์ จากใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สงขลา 3 13 สายพันธุ์ และจากผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สงขลา 3 20 สายพันธุ์ ใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี 30 สายพันธุ์ จากผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี 33 สายพันธุ์ ดังภาพตัวอย่างที่ 11

โดยเชื้อราที่คัดแยกได้จากใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา เรียกชื่อโดยใช้ตัวย่อว่า (L-SR-) และลำดับของสายพันธุ์ให้เรียงลำดับตั้งแต่ 1-12 เช่นเชื้อราสายพันธุ์ที่ 1 ให้เรียกชื่อว่า L-SR-1 เชื้อราที่คัดแยกได้จากผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกาเรียกชื่อโดยใช้ตัวย่อว่า (S-SR-) และลำดับของสายพันธุ์ให้เรียงลำดับตั้งแต่ 1-5 เช่นเชื้อราสายพันธุ์ที่ 1 ให้เรียกชื่อว่า S-SR-1 เชื้อราที่คัดแยกได้จากใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สงขลา 3 เรียกชื่อโดยใช้ตัวย่อ

ว่า (L-SK-) และลำดับของสายพันธุ์ให้เรียงลำดับตั้งแต่ 1-13 เช่นเชื้อราสายพันธุ์ที่ 1 ให้เรียกชื่อว่า L-SK-1 เชื้อราที่คัดแยกได้จากผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สงขลา 3 เรียกชื่อโดยใช้ตัวย่อว่า (S-SK-) และลำดับของสายพันธุ์ให้เรียงลำดับตั้งแต่ 1-20 เช่น เชื้อราสายพันธุ์ที่ 1 ให้เรียกชื่อว่า S-SK-1 เชื้อราที่คัดแยกได้จากใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี เรียกชื่อโดยใช้ตัวย่อว่า (L-ST-) และลำดับของสายพันธุ์ให้เรียงลำดับตั้งแต่ 1-30 เช่น เชื้อราสายพันธุ์ที่ 1 ให้เรียกชื่อว่า S-SK-1 เชื้อราที่คัดแยกได้จากผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี เรียกชื่อโดยใช้ตัวย่อว่า (S-ST-) และลำดับของสายพันธุ์ให้เรียงลำดับตั้งแต่ 1-33 เช่น เชื้อราสายพันธุ์ที่ 1 ให้เรียกชื่อว่า S-ST-1



ภาพที่ 11 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ในอาหารสูตร Czapex's dox medium ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สงขลา 3

2.2 **<u>การคัดแยกขั้นที่ 2</u>**

นำเชื้อราที่คัดแยกได้ทั้งหมด 113 สายพันธุ์ มาทำการเพาะเลี้ยง ในอาหาร Carboxymethyl Cellulose Agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาราดทับด้วย Congo red ที่มีความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ พบเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ภายในระยะเวลา 3 วัน มีทั้งหมด 39 สายพันธุ์ จากตัวอย่างใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ ศรีลังกา (L-SR-) 5 สายพันธุ์ จากผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา (S-SR-) 4 สายพันธุ์ จากใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สงขลา 3 (L-SK-) 1 สายพันธุ์ จากผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สงขลา 3 (S-SK-) 3 สายพันธุ์ จากใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี (L-ST-) 4 สายพันธุ์ และจากผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี (S-ST-) 22 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 12

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสต่อโคโลนีของเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูเลสได้

ตัวอย่าง	สายพันธุ์	อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลาง ของบริเวณใสต่อโคโลนี (cm)
ใบแห้ง-ศรีลังกา	L-SR-2	1.67
	L-SR-3	1.12
	L-SR-8	1.13
	L-SR-10	1.97 *
	L-SR-12	1.13
ดิน-ศรีลังกา	S-SR-1	2.12 *
	S-SR-3	1.30
	S-SR-4	1.45
	S-SR-5	1.31
ใบแห้ง-สงขลา 3	L-SK-1	1.05 *
ดิน-สงขลา 3	S-SK-1	1.48 *
	S-SK-7	1.03
	S-SK-11	1.02
ใบแห้ง-สุราษฎ์ธานี	L-ST-8	1.10

ตัวอย่าง	สายพันธุ์	อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลาง ของบริเวณใสต่อโคโลนี (cm)
	L-ST-14	1.03 *
	L-ST-16	1.03
	L-ST-24	1.18
ดิน-สุราษฎ์ธานี	S-ST-1	1.30
	S-ST-3	1.29
	S-ST-5	1.06
	S-ST-6	1.27
	S-ST-8	1.04
	S-ST-10	1.04
	S-ST-11	1.04
	S-ST-13	1.31
	S-ST-14	1.09
	S-ST-15	1.61
	S-ST-16	1.38
	S-ST-18	2.42 *
	S-ST-19	1.04
	S-ST-20	1.32
	S-ST-21	1.87
	S-ST-23	2.12
	S-ST-24	1.38
	S-ST-25	1.47
	S-ST-26	1.29
	S-ST-30	1.38
	S-ST-32	1.79
	S-ST-33	1.06

* อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสต่อโคโลนี (cm) ที่สูงสุดของแต่ละอีโคไทป์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 12 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ในอาหารสูตร Carboxymethyl Cellulose (CMC) Agar ของเชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1

2.3 **<u>การคัดแยกขั้นที่ 3</u>**

นำเชื้อราที่มีบริเวณใสที่กว้างที่สุดมา 1 สายพันธุ์ จากแต่ละตัวอย่างรวม 6 สายพันธุ์ มาผลิตเอนไซม์เซลล์เลสในอาหาร Production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน และวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ โดยวัดค่าแอคติวิตีจำเพาะ พบว่าเชื้อทั้งหมดมีค่า ของ endoglucanase สูงที่สุด โดยมีค่าระหว่าง 0.213–1.324 U/mg protein (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) (0.094–0.613 U/ml) (หน่วยต่อมิลลิลิตร) สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase และ β-glucosidase มีค่าใกล้เคียงกัน คือ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.03–0.245 U/mg protein (0.013–0.147 U/ml) และ 0–0.134 U/mg protein (0–0.124 U/ml) ตามลำดับ (ตารางที่ 3–4) (ภาพที่ 13)

สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะ ของ exoglucanase นั้นพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 มีค่าสูงที่สุดคือ 0.245 U/mg protein และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะ ของเชื้อราอีก 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3–4) (ภาพที่ 13)

สำหรับค่าของแอคติวิตีจำเพาะ endoglucanase พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ L-SR-10 มีค่าสูงที่สุดคือ 1.324 U/mg protein และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะ ของเชื้อราอีก 5 โดยที่เชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะรองลงมาคือ 0.779 U/mg protein ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น

0.05 กับเชื้อราสายพันธุ์ S-SR-1 สายพันธุ์ S-ST-18 และสายพันธุ์ L-SK-1 (ตารางที่ 3-4) (ภาพที่ 13)

สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ β–glucosidase พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ L-ST-14 มีค่าสูงสุด คือ 0.134 U/mg protein ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับเชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ รองลงมาคือ 0.125 U/ mg protein และเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับเชื้อราสายพันธุ์ S-SR-1 สายพันธุ์ L-SR-10 สายพันธุ์ L-SK-1 และ สายพันธุ์ S-ST-18 (ตารางที่ 3-4) (ภาพที่ 13)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงทั้ง 3 ค่า จึงเป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกมาใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

ตารางที่ 2 ค่าแอคติวิตี (U/ml) และปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) (mg protein/ml) (มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อรา 6 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร Production medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 5 เป็นเวลา 7 วัน

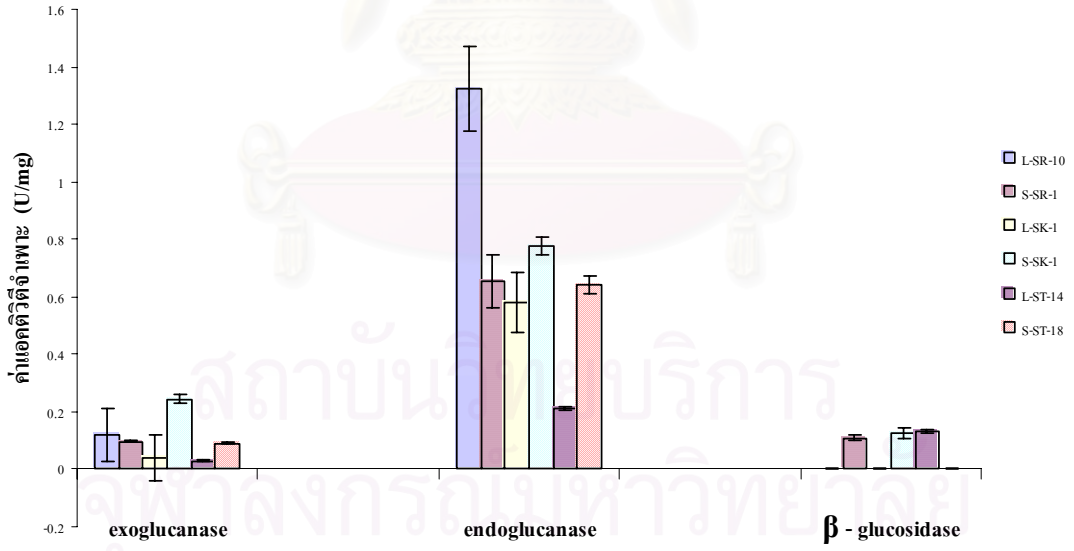
สายพันธุ์	Exoglucanase (U/ml)	endoglucanase (U/ml)	β–glucosidase (U/ml)	Total protein (mg protein/ml)
L-SR-10	0.034	0.376	0.002	0.294
S-SR-1	0.139	0.613	0.056	0.780
L-SK-1	0.013	0.191	0.000	0.342
S-SK-1	0.147	0.471	0.124	0.607
L-ST-14	0.013	0.094	0.058	0.446
S-ST-18	0.090	0.640	0.000	0.995

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา 6 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 5 เป็นเวลา 7 วัน

สายพันธุ์	exoglucanase (U/mg protein)	endoglucanase (U/mg protein)	β–glucosidase (U/mg protein)
L-SR-10	0.119[b]	1.324[a]	0.003[c]
S-SR-1	0.097[c]	0.655[b]	0.108[b]
L-SK-1	0.040[d]	0.580[b]	0.000[c]
S-SK-1	0.245[a]	0.779[b]	0.125[a]
L-ST-14	0.030[d]	0.213[c]	0.134[a]
S-ST-18	0.091[c]	0.643[b]	0.000[c]

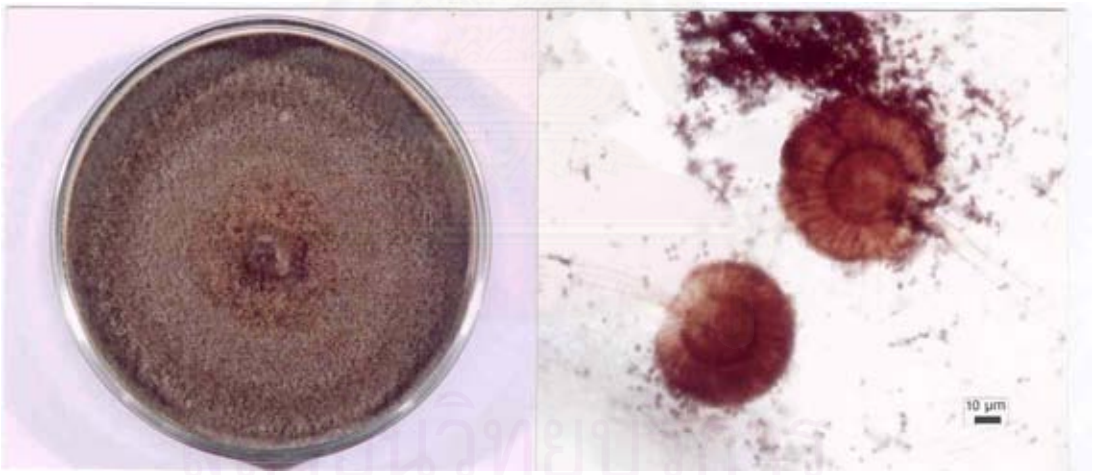
a b c d หมายถึง ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 เรียงลำดับจากค่ามากไปหาน้อย โดยเปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อราแต่สายพันธุ์ของเอนไซม์ชนิดเดียวกัน



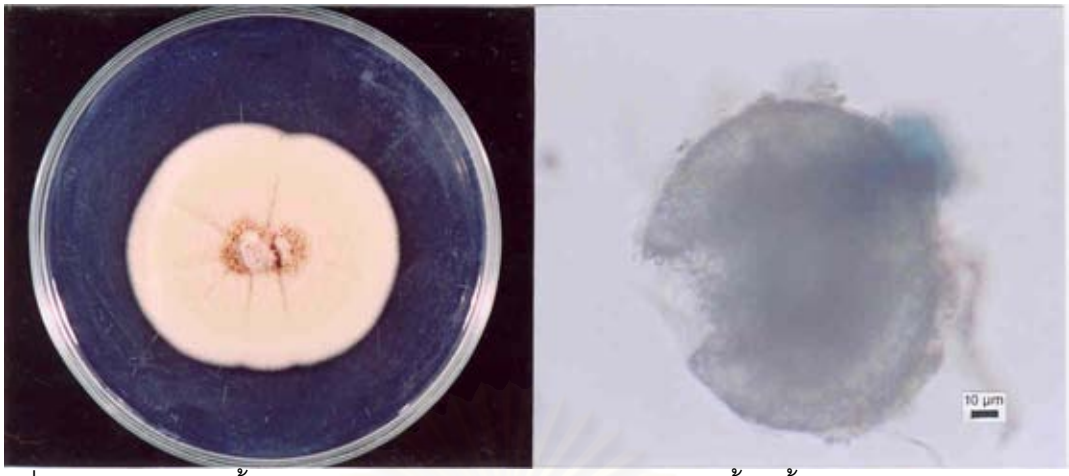
ภาพที่ 13 แอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของเชื้อรา 6 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกมาจากแต่ละตัวอย่าง (แถบความผิดพลาด = ค่า Standard Deviation ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05)

3. การจัดจำแนกเชื้อรา

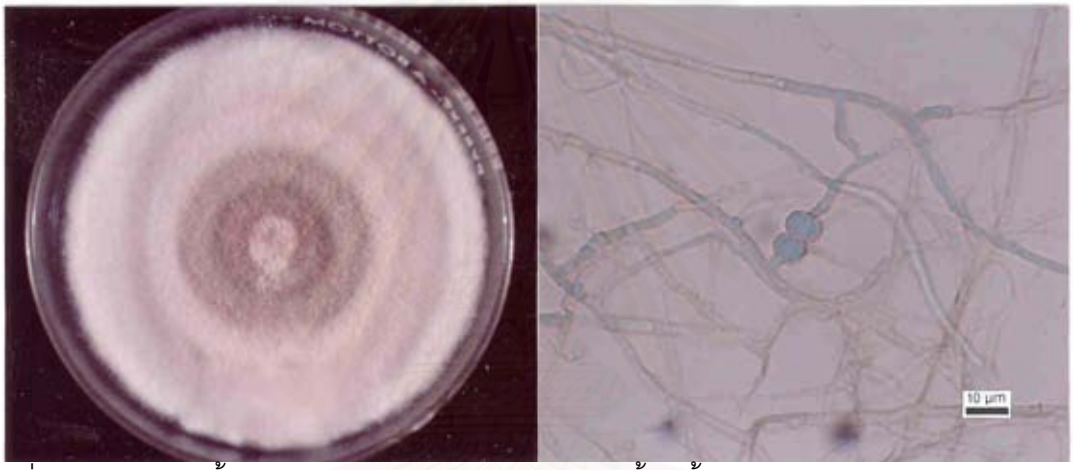
นำเชื้อราที่คัดแยกได้และมีค่าแอคติวิตีสูงที่สุด มาทำการจัดจำแนกในระดับจีนัส สำหรับงานวิจัยนี้พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงทั้ง 3 ค่า และเชื้อราสายพันธุ์ S-SR-1 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะทั้ง 3 ค่า สูงรองลงมา ค่อนข้างใกล้เคียงกับเชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 จึงเลือกนำมาจัดจำแนกทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยศึกษาตามลักษณะสัณฐานวิทยาโดยทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA และศึกษาตามลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง ด้วยเทคนิคการทำสไลด์แบบ slide culture technique ตามวิธีของ Barnet และ Hunter (1972) Klich และ Pitt (1988) และ Sutton (1964) พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 คือ เชื้อรา *Aspergillus* sp. เพราะเส้นใยไม่มีสี แตกกิ่งก้าน และมีผนังกั้นแบ่งเส้นใยออกเป็นเซลล์ๆ มี Conidiophores ตั้งตรงและยาว กว้าง 20 µm (ไมโครเมตร) ส่วนปลายพองออกเป็น vesicle รูปร่างกลมเป็น uniseriate aspergillum มีเฉพาะ phialides และ conidia มีสีดำ รูปร่างกลมผิวขรุขระ และ เชื้อราสายพันธุ์ S-SR-1 คือ เชื้อรา *Phoma* sp. เพราะเส้นใยไม่มีสี แตกกิ่งก้าน มีผนังกั้นแบ่งเส้นใยออกเป็นเซลล์ มี phialide สั้นมาก (หรืออาจไม่มี) และ conidia ทรงกลมไม่มีสี pycnidia รูปทรงกลม ปากเปิด ผนังของ pycnidia มีเซลล์หนา



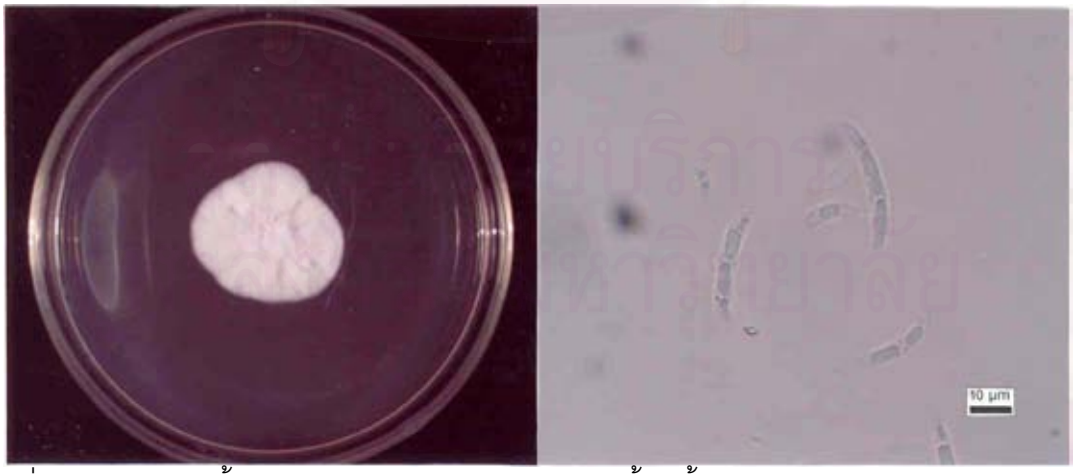
ภาพที่ 14 ลักษณะเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย x 320



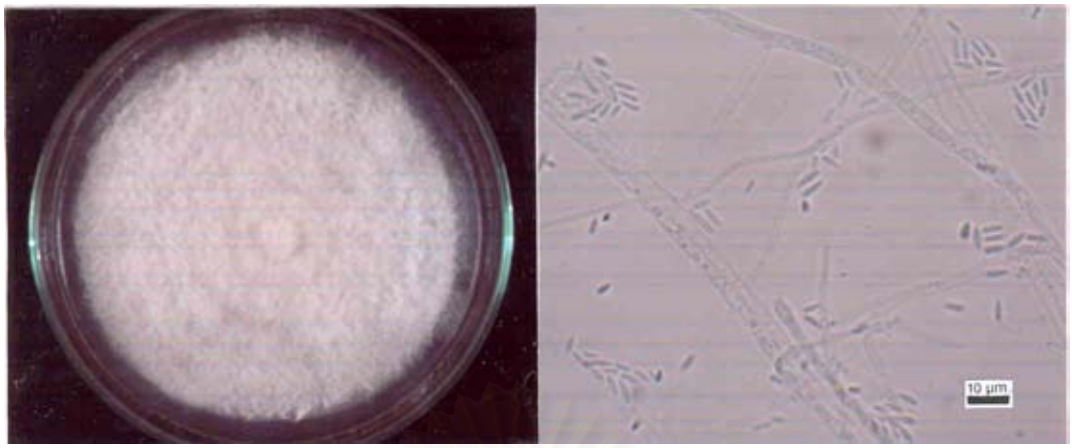
ภาพที่ 15 ลักษณะเชื้อรา *Phoma* sp. S-SR-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย x 900



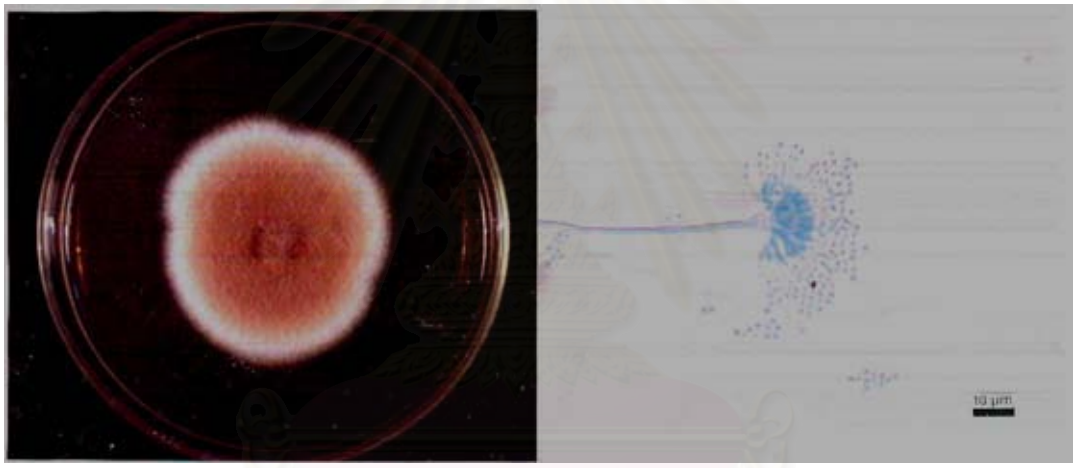
ภาพที่ 16 ลักษณะเชื้อราสายพันธุ์ L-SR-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย x 2200



ภาพที่ 17 ลักษณะเชื้อราสายพันธุ์ L-SK-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย x 2200



ภาพที่ 18 ลักษณะเชื้อราสายพันธุ์ L-ST-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x 2200



ภาพที่ 19 ลักษณะเชื้อราสายพันธุ์ S-ST-18 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x 2200

4. การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

4.1 **<u>หาอุณหภูมิที่เหมาะสม</u>**

เมื่อทำการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์แล้ววิเคราะห์หาค่าแอคติวิตีจำเพาะ โดยทำการเปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เพื่อเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดไว้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไปพบว่า *Aspergillu* sp. S-SK-1 ผลิตเอนไซม์ exoglucanase ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะ ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ทั้ง 3 ภาวะอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะดีที่สุดคือ 0.245 U/mg protein (0.147 U/ml) รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ค่าแอ

คติวิตีจำเพาะ 0.110 U/mg protein (0.024 U/ml) และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำที่สุดคือ 0.046 U/mg protein (0.075 U/ml) (ตารางที่ 5-6) (ภาพที่ 20)

สำหรับเอนไซม์ endoglucanase มีค่าแอคติวิตีจำเพาะดีที่สุดทั้ง 3 อุณหภูมิ เมื่อเปรียบเทียบกับ exoglucanase และ β–glucosidase โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะดีที่สุด คือ 1.658 U/mg protein (0.367 U/ml) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะของอุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะ ใกล้เคียงกันโดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 คือ 0.779 U/mg protein (0.471 U/ml) และ 0.760 U/mg protein (0.936 U/ml) ตามลำดับ (ตารางที่ 5-6) (ภาพที่ 20)

สำหรับ β–glucosidase พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะ สูงที่สุด คือ 0.298 U/mg protein (0.402 U/ml) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะของอุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส มีค่าแอคติวิตีจำเพาะใกล้เคียงกัน ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 คือ 0.125 U/mg protein (0.124 U/ml) และ 0.198 U/mg protein (0.044 U/ml) ตามลำดับ (ตารางที่ 5-6) (ภาพที่ 20)

จากผลการทดลองที่ได้นี้จะเห็นได้ว่าที่ภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสโดยรวมดีที่สุด จึงเลือกอุณหภูมินี้ไว้ใช้สำหรับผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ในกระบวนการ SSF ต่อไป

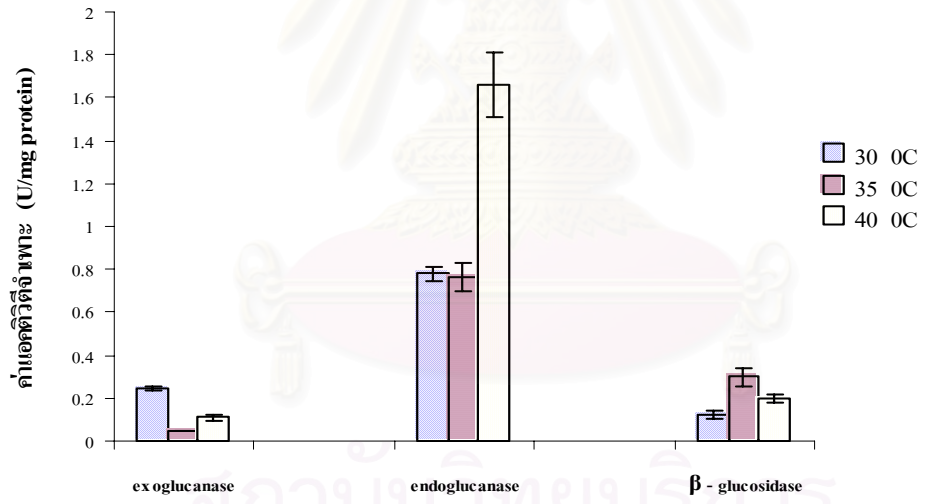
ตารางที่ 4 ค่าแอคติวิตี (U/ml) และปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) (mg protein/ml) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส pH 5 เป็นเวลา 7 วัน

อุณหภูมิ (^{o}C)	Exoglucanase (U/ml)	Endoglucanase (U/ml)	β – glucosidase (U/ml)	Total protein (mg protein/ml)
30	0.147	0.471	0.124	0.607
35	0.075	0.936	0.402	1.300
40	0.024	0.367	0.044	0.225

ตารางที่ 5 ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส pH 5 เป็นเวลา 7 วัน

อุณหภูมิ(^{o}C)	exoglucanase (U/mg protein)	endoglucanase (U/mg protein)	β – glucosidase (U/mg protein)
30	0.245^{a}	0.779^{b}	0.125^{b}
35	0.046^{c}	0.760^{b}	0.298^{a}
40	0.110^{b}	1.658^{a}	0.198^{b}

a b c หมายถึง ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญทางถสิติเท่ากับ 0.05 เรียงลำดับจากค่ามากไปหาน้อย โดยเปรียบเทียบเอนไซม์ชนิดเดียวกันระว่างเชื้อราแต่ละสายพันธุ์



ภาพที่ 20 แอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 (แถบความผิดพลาด = ค่า Standard Deviation ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05)

4.2 <u>หาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม</u>

เมื่อทำการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 เพื่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแล้ววิเคราะห์หาค่าแอคติวิตีจำเพาะ โดยทำการเปรียบเทียบกันของค่าความเป็นกรดด่างที่ 4 5 6 และ 7 เพื่อเลือกค่าความเป็นกรดด่างที่

เหมาะสมที่สุด ไว้ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไปพบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase ที่ pH 5 สูงที่สุด คือ 0.110 U/mg protein (0.024 U/ml) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะของภาวะ pH 4 6 และ 7 ซึ่งทั้ง 3 ภาวะนี้มีค่าแอคติวิตีจำเพาะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 คือ 0.051 U/mg protein (0.030 U/ml) 0.062 U/mg protein (0.033 U/ml) และ 0.056 U/ mg protein (0.030 U/ml) (ตารางที่ 7-8) (ภาพที่ 21)

สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ endoglucanase ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 พบว่ามีค่าสูงกว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase และ β–glucosidase อย่างเห็นได้ชัด และที่ pH 5 ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ endoglucanase ดีที่สุดคือ 1.658 U/mg protein (0.367 U/ml) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะ ของภาวะ pH 4 6 และ 7 ซึ่งทั้ง 3 ภาวะนี้มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 คือ 1.256 U/mg protein (0.733 U/ml) 1.167 U/mg protein (0.629 U/ml) และ 1.197 U/mg protein (0.647 U/ml) (ตารางที่ 7-8) (ภาพที่ 21)

สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ β–glucosidase ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 นั้น พบว่าที่ pH 4 ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะดีที่สุดคือ 0.205 U/mg protein (0.120 U/ml) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะของภาวะ pH 5 และ 6 ซึ่งมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.198 U/mg protein (0.44 U/ml) และ 0.198 U/mg protein (0.107 U/ml) ตามลำดับ แต่ทั้ง 3 ภาวะให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะ ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะของภาวะ pH 7 ที่มีค่า แอคติวิตีจำเพาะต่ำที่สุดคือ 0.144 U/mg protein (0.077 U/ml) (ตารางที่ 7-8) (ภาพที่ 21)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าที่ภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซียลเซียส และ pH 5 เชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 สามารถผลิตเซลลูเลสที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะดีทั้ง 3 องค์ประกอบ จึงเลือกภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH 5 ไว้สำหรับใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อไว้ใช้ในกระบวนการ SSF ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ค่าแอคติวิตี (U/ml) และปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) (mg protein/ml) ขององค์ประกอบของเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่ pH 4 5 6 และ 7 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

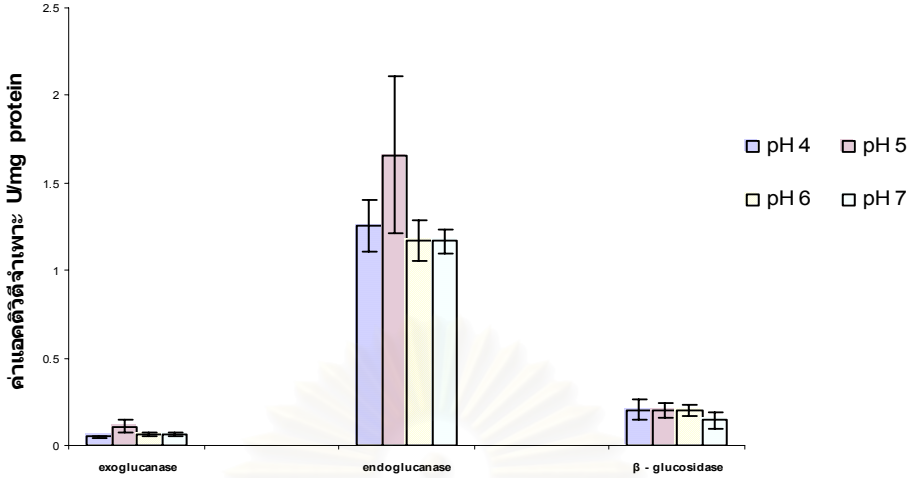
ค่า pH	exoglucanase (U/ml)	endoglucanase (U/ml)	β – glucosidase (U/ml)	Total protein (mg protein/ml)
4	0.030	0.733	0.120	0.588
5	0.024	0.367	0.044	0.607
6	0.033	0.629	0.107	0.541
7	0.030	0.647	0.077	0.542

ตารางที่ 7 ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่ pH 4 5 6 และ 7 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ค่า pH	Exoglucanase (U/mg protein)	Endoglucanase (U/mg protein)	β–glucosidase (U/mg protein)
4	0.051[b]	1.256[b]	0.205[a]
5	0.110[a]	1.658[a]	0.198[a]
6	0.062[b]	1.167[b]	0.198[a]
7	0.056[b]	1.197[b]	0.144[b]

a b หมายถึง ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 เรียงลำดับจากค่ามากไปหาน้อย โดยเปรียบเทียบเอนไซม์ชนิดเดียวกันระหว่างเชื้อราแต่สายพันธุ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 21 แอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ pH 4 5 6 และ 7 ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 (แถบความผิดพลาด = ค่า Standard Deviation ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05)

4.3 <u>หาระยะเวลาที่เหมาะสม</u>

เมื่อทำการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 เพื่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแล้ววิเคราะห์หาค่าแอคติวิตีจำเพาะ โดยทำการเปรียบเทียบกันของจำนวนวันที่ 3 5 7 9 11 และ 13 วัน เพื่อเลือกจำนวนวันที่เหมาะสมที่สุดไว้ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแอคติวิตีจำเพาะ ของ endoglucanase และ β–glucosidase และค่าแอคติวิตีจำเพาะ ที่บ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน มีค่าสูงที่สุด คือ 0.110 U/mg protein (0.024 U/ml) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะของเชื้อที่บ่มเป็นเวลา 3 และ 9 วัน ซึ่งมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับที่ 0.102 U/mg protein (0.041 U/ml) และ 0.095 U/mg protein (0.036 U/ml) ตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะของเชื่อที่บ่มเป็นเวลา 11 และ 13 วัน ซึ่งมีค่าแอคติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 0.083 U/mg protein (0.033 U/ml) และ 0.081 U/mg protein (0.039 U/ml) ตามลำดับ ซึ่งระยะเวลาบ่มเชื้อ 5 วัน ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำที่สุดคือ 0.069 U/mg protein (0.026 U/ml) (ตารางที่ 9-10) (ภาพที่ 22)

สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ endoglucanase ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase และ β–glucosidase แล้วพบว่ามีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด และค่าแอคติวิตีจำเพาะ เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 11 วัน มีค่าสูงสุดคือ 1.892

U/mg protein (0.739 U/ml) และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 รองลงมาคือระยะเวลาบ่มเชื้อที่ 9 วัน มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1 .859 U/mg protein (0.698 U/ml) และที่การบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน มีค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำสุดคือ 0.779 U/mg protein (0.314 U/ml) (ตารางที่ 9-10) (ภาพที่ 22)

สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ β–glucosidase เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucosidase และ endoglucosidase แล้วพบว่ามีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงรองลงมาจาก endoglucosidase และที่ระยะเวลาบ่มเชื้อเป็นเวลา 11 วัน เชื้อรามีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดคือ 0.789 U/mg protein (0.310 U/ml) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับอันดับรองลงมาคือที่ระยะเวลาบ่มเชื้อนาน 13 วัน ที่มีค่า แอคติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 0.660 U/mg protein (0.313 U/ml) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับที่ระยะเวลาบ่มเชื้อนาน 9 วัน ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 0.653 U/mg protein (0.246 U/ml) และระยะเวลาบ่มเชื้อ 3 วัน มีค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำที่สุดคือ 0.157 U/mg protein (0.065 U/ml) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับระยะเวลาบ่มเชื้อ 7 วัน ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ เท่ากับ 0.198 U/mg protein (0.044 U/ml) (ตารางที่ 9-10) (ภาพที่ 22)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าที่ระยะเวลา 9 และ 13 วัน เชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 มีค่าแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นเวลาที่ได้ผลดีที่สุดและใช้เวลาสั้นที่สุด

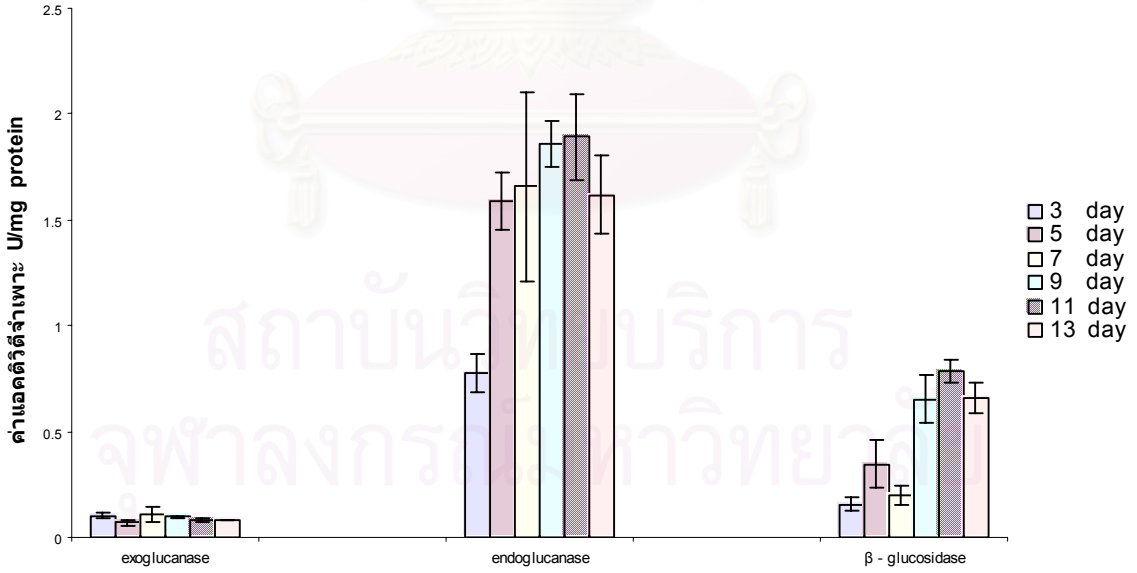
ตารางที่ 8 ค่าแอคติวิตี (U/ml) และปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) (mg protein/ml) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่ 3 5 7 9 11 และ 13 วัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5

ระยะเวลา (วัน)	Exoglucanase (U /ml)	Endoglucanase (U/ml)	β–glucosidase (U/ml)	Total protein (mg protein/ml)
3	0.041	0.314	0.065	0.407
5	0.026	0.578	0.136	0.366
7	0.024	0.367	0.044	0.225
9	0.036	0.698	0.246	0.376
11	0.033	0.739	0.310	0.397
13	0.039	0.770	0.313	0.483

ตารางที่ 9 ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่ 3 5 7 9 11 และ 13 วัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5

ระยะเวลา (วัน)	exoglucanase (U/mg protein)	endoglucanase (U/mg protein)	β – glucosidase (U/mg protein)
3	0.102[a]	0.779[d]	0.157[d]
5	0.069[c]	1.592[c]	0.347[c]
7	0.110[a]	1.658[b]	0.198[d]
9	0.095[a]	1.859[a]	0.653[b]
11	0.083[b]	1.892[a]	0.789[a]
13	0.081[b]	1.620[c]	0.660[b]

a b c d หมายถึง ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 เรียงลำดับจากมากไปหาน้อย โดยเปรียบเทียบเอนไซม์ชนิดเดียวกันระหว่างเชื้อราแต่ละสายพันธุ์

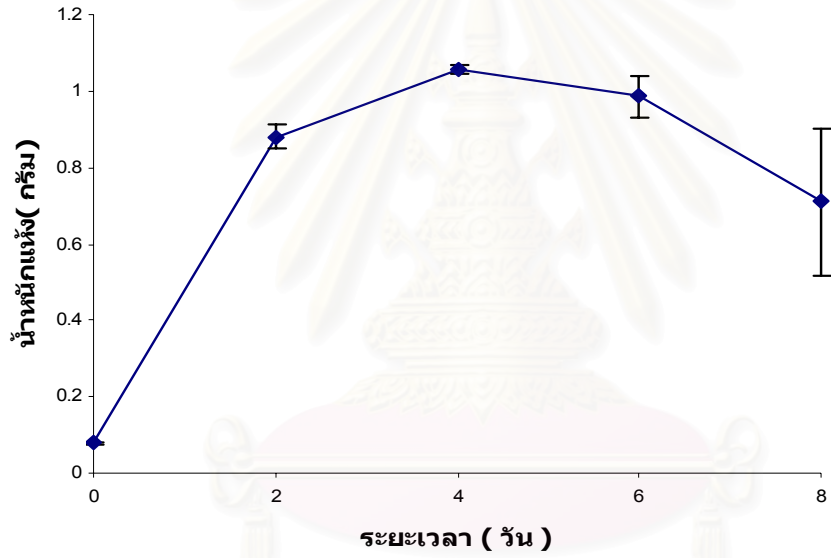


ภาพที่ 22 ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ระยะเวลา 3 5 7 9 11 และ 13 วัน ของ เชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 (แถบความผิดพลาด = ค่า Standard Deviation ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05)

5. **การหมักและการย่อยสลายแบบต่อเนื่อง** (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)

5.1 **<u>ศึกษาการเจริญของเชื้อราเพื่อใช้ผลิตหัวเชื้อในอาหารเหลว</u>**

ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ในอาหารสูตร Potato Dextrose Broth เพื่อใช้ผลิตหัวเชื้อที่เรียกว่า seed culture สำหรับใช้ผลิตเอนไซม์ปริมาณมากไว้สำหรับการหมัก ซึ่งนำข้อมูลจากผลการเจริญเติบโต มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเส้นใย ณ วันต่าง ๆ (ภาพที่ 23) พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 มีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรก ของการบ่มเชื้อ จากนั้นค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 4 และค่อย ๆ ลดลงในวันที่ 6 จนถึงวันที่ 8 ค่า maximum specific growth rate เท่ากับ 0.0207 ต่อวัน (ภาพที่ 23)



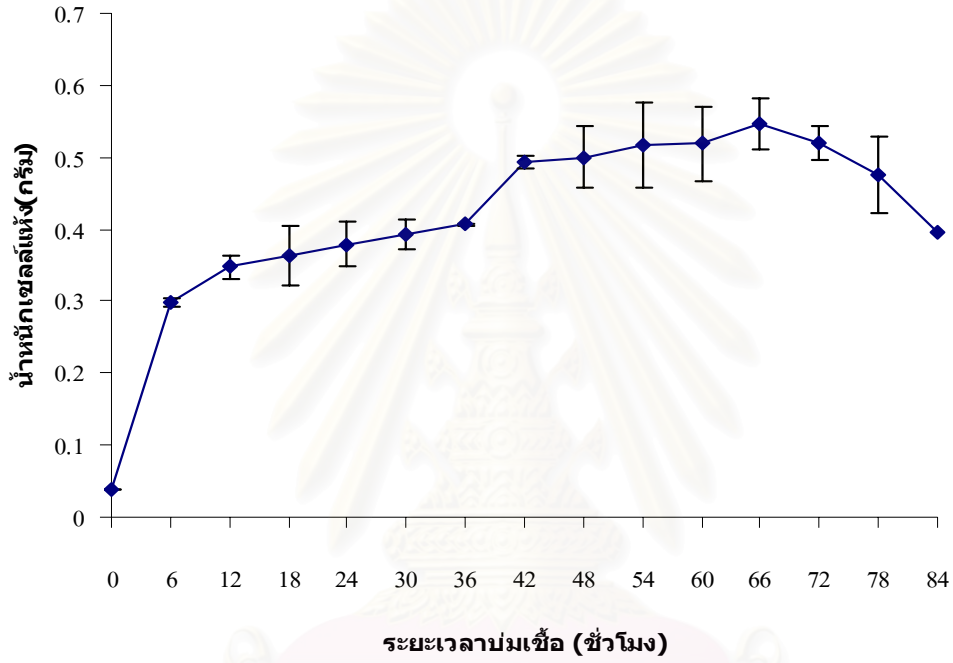
ภาพที่ 23 น้ำหนักแห้งของ *Aspergillus* sp. S-SK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PDB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

5.2 **<u>การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช</u>**

จากการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช ได้แก่ ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา พบว่า ก่อนปรับสภาพมีปริมาณเซลลูโลส 34.41% ปริมาณเฮมิเซลลูโลส 34.04% และปริมาณลิกนิน 15.95% เมื่อปรับสภาพแล้วมีปริมาณเซลลูโลส 55.45% ปริมาณเฮมิเซลลูโลส 15.20% และปริมาณลิกนิน 11.64%

5.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์

จากผลการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Kluyveromyces thermotolerans* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร Yeast Malt Broth พบว่า *K. thermotolerans* พบว่ามีการเจริญเติบโตสูงสุดภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมงหลังการบ่มเชื้อ จากนั้นค่อย ๆ เพิ่มขึ้น จากชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 66 ค่า maximum specific growth rate เท่ากับ 0.3388 ต่อชั่วโมง (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 น้ำหนักแห้งของยีสต์ *Kluyveromyces thermotolerans* เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร YMB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 84 ชั่วโมง

5.4 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร สำหรับในการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่องในระดับฟลาสก์ โดยเลือกเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ในการผลิตเซลลูเลสในลักษณะ seed เนื่องจากมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจำเพาะที่ดีที่สุดของ exoglucanase endoglucanase และ β–glucosidase seed culture ที่ใช้เป็นหัวเชื้อมีอายุ 2 วัน ระยะเวลาผลิตคือ 9 วัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5 แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่าแอคติวิตี (U/ml) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) (mg protein/ml) และ แอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein) ของเอนไซม์เซลลูเลสจาก Seed ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่ผลิตในระยะเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5

เอนไซม์	แอคติวิตี (U/ml)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg protein/ml)	แอคติวิตีจำเพาะ (U/mg protein)
Exoglucanase	0.096	0.510	0.067
Endoglucanase	0.618	0.510	0.431
β – glucosidase	0.351	0.510	0.245

5.5 <u>การปรับสภาพพืช</u>

การปรับสภาพพืชด้วยวิธีทางกายภาพและทางเคมี ด้วยการตัด บด และแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์เข้มข้น 10% (w/v) มีผลให้ปริมาณองค์ประกอบชีวมวลของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา เปลี่ยนแปลงไปหลังการปรับสภาพ ซึ่งได้แก่ ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งมีความแตกต่างจากปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ก่อนปรับสภาพ ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน หญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา ก่อนปรับสภาพ หลังปรับสภาพ และการเปลี่ยนแปลง

องค์ประกอบชีวมวลพืช	ก่อนปรับสภาพ (%)	หลังปรับสภาพ (%)	การเปลี่ยนแปลง (%)
เซลลูโลส	34.41	55.45	เพิ่มขึ้น 61.51
เฮมิเซลลูโลส	34.04	15.20	ลดลง 55.35
ลิกนิน	15.95	11.64	ลดลง 27.02

5.6 <u>การเตรียมหัวเชื้อยีสต์</u>

จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *K. thermotolerans* ในอาหารสูตร YMB ที่ 6 ชั่วโมง นำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก หัวเชื้อที่ใช้ในการหมักหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา มีความเข้มข้นประมาณ 1.045×10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5.7 **<u>การหมักในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร</u>**

ผลการหมักใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แสดงอยู่ในค่าของผลผลิตเอทานอลที่ได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก โดยผลผลิตเอทานอลค่อย ๆ เพิ่มขึ้น ในช่วง 2 วันแรกและวันที่ 2 ให้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดในวันที่ 2 มีค่าเท่ากับ 6.07 กรัมต่อลิตร (0.20 กรัมต่อกรัมสับสเตรท) จากนั้นมีปริมาณลดลงและค่อนข้างคงที่ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 เมื่อสิ้นสุดการหมักจะมีปริมาณผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 2.34 กรัมต่อลิตร (0.078 กรัมต่อกรัมสับสเตรท)

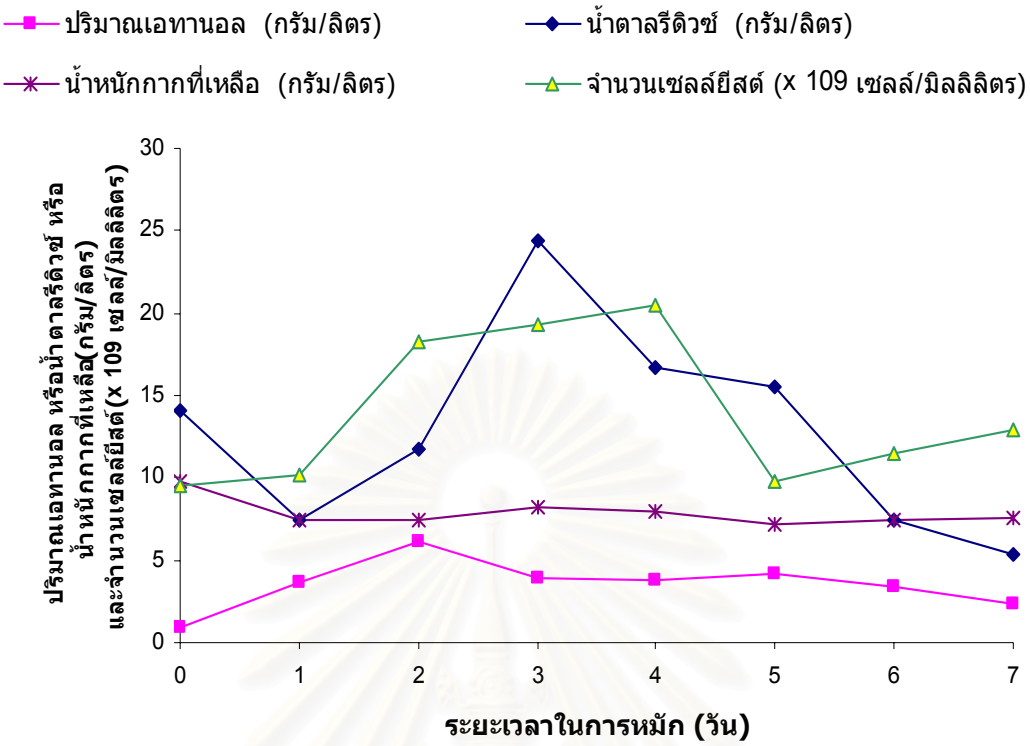
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักของใบแห้งหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา ค่อย ๆ ลดลงในวันแรกของการหมัก มีค่าเท่ากับ 7.376 กรัมต่อลิตร จากนั้นเริ่มเพิ่มขึ้นและเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 มีค่า 24.433 กรัมต่อลิตร แล้วเริ่มลดลงอีกในวันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 ซึ่งมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 6.328 กรัมต่อลิตร

สำหรับกากที่เหลือพบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้อย่างชัดเจน กล่าวคือ กากที่เหลือลดลงเพราะเซลลูโลสถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสและสุดท้ายยีสต์เปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอล

จำนวนเซลล์ที่นับได้ในน้ำหมักโดยใช้ haemacytometer พบว่า จากจำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้นในการหมัก 1.045×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เริ่มเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 แล้วค่อย ๆ เพิ่มขึ้น จนถึงวันที่ 4 ซึ่งเพิ่มขึ้นสูงที่สุดถึง 2.045×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในวันที่ 4 จากนั้นลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 5 แล้วค่อย ๆ ลดลงจนถึงวันที่ 7 ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.285×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 25)

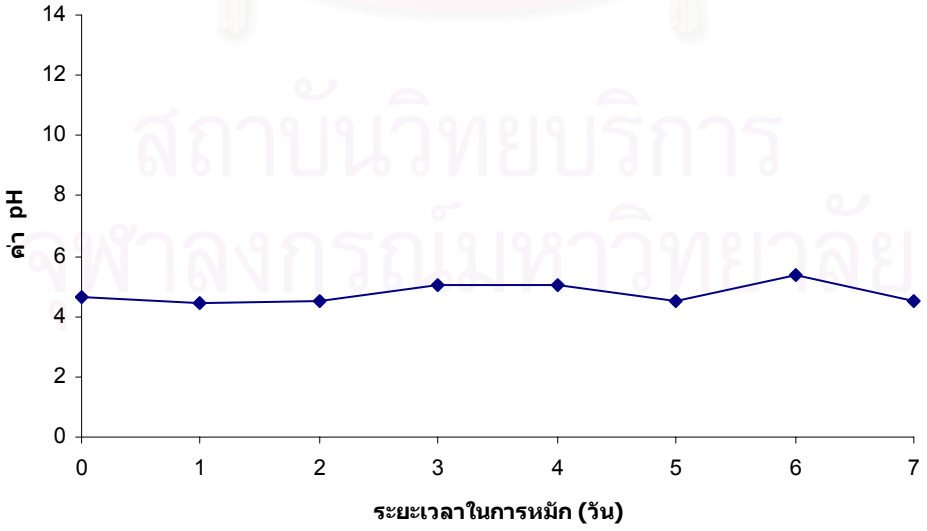
สำหรับค่า pH ของน้ำหมักพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 4.43– 5.4 โดยในวันที่ 0 ของการหมักมีค่า 4.67 แล้วลดลงในวันที่ 1 ซึ่งมีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 4.43 และเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 2 และ 3 และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 4 มีซึ่งค่าเท่ากับ 4.52 5.06 และ 5.03 ตามลำดับ แล้วลดลงอีกในวันที่ 5 มีค่า 4.48 จากนั้นเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 6 มีค่าเท่ากับ 5.4 และลดลงอีกในวันที่ 7 มีค่าเท่ากับ 4.5 (ภาพที่ 26)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 25 ปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ จำนวนเซลล์ยีสต์ น้ำหนักกากที่เหลือ ในระยะเวลา 7 วัน ของกระบวนการหมักแบบ SSF

(g/L) = (กรัมต่อลิตร) (x 10^9 cells/ml) = (x 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)



ภาพที่ 26 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก ในระยะเวลา 7 วัน ของกระบวนการหมักแบบ SSF

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างใบแห้งของหญ้าแฝกหอม 3 อีโคไทป์ คือ อีโคไทป์ศรีลังกา อีโคไทป์สงขลา 3 และอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี พร้อมด้วยตัวอย่างดินบริเวณผิวดินใต้กอหญ้าแฝกหอมแต่ละอีโคไทป์ เพื่อรวบรวมสายพันธุ์ของเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ ในช่วงเดือนพฤษภาคม ซึ่งเป็นระยะแรกของฤดูฝนมีความเหมาะสมในการเก็บตัวอย่าง และประกอบกับเป็นช่วงที่หญ้าแฝกหอมเจริญเติบโตเต็มที่ สามารถพบเชื้อราได้หลากหลาย

2. การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาคัดแยกเชื้อรา ตามวิธีการของ Mandels และ Sternberg (1976) ด้วยอาหารเหลวสูตร Czapex's dox สามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งสิ้น 113 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งหมด แต่เชื้อราแต่ละสายพันธุ์สามารถหลั่งเอนไซม์ออกมาย่อยเซลลูโลสได้ในระยะเวลาที่ต่างกันและมีความสามารถในการย่อยสลายที่ต่างกันด้วย ดังนั้นจึงต้องมีการคัดแยกในขั้นต่อไปเพื่อให้ได้เชื้อราที่หลั่งเอนไซม์ได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพการย่อยสลายที่ดี

จึงเลือกใช้การคัดแยกตามวิธีของ Hankin และ Anagnostakis (1977) เป็นการคัดแยกโดยใช้อาหารแข็งสูตร CMC agar และเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วใช้สี congo red เป็นตัวตรวจสอบการเกิดบริเวณวงใสรอบโคโลนี เนื่องจากใน CMC agar มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจะให้สีแดงเมื่อทำปฏิกิริยากับสี Congo red เชื้อที่สามารถใช้ CMC ได้จะหลั่งเซลลูเลสออกมาย่อยสลาย ดังนั้นเมื่อตรวจสอบด้วยสี Congo red จึงไม่ติดสี หรือเกิดเป็นบริเวณวงใสรอบโคโลนี โดยที่อัตราส่วนระหว่างบริเวณวงใสรอบโคโลนีกับโคโลนีของเชื้อรา ขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ถ้ามีอัตราส่วนสูง แสดงว่าภายในเวลา 3 วัน เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าเชื้อราที่ให้อัตราส่วนต่ำ (Punnapayak et. al., 1998) ซึ่งขั้นตอนนี้ทำให้คัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 39 สายพันธุ์

หลังจากนั้นนำเชื้อราที่ให้บริเวณใสดีที่สุดมา 1 สายพันธุ์จากแต่ละตัวอย่างรวม 6 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ L-SR-10 S-SR-1 L-SK-1 S-SK-1 L-ST-14 และ S-ST-18 แล้วนำมาศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ โดยวัดค่าแอคติวิตีจำเพาะ พบเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด เนื่องมาจากแหล่ง

คาร์บอนในอาหารสูตร Production คือ α-cellulose ซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น amorphous cellulose จึงสามารถชักนำให้เชื้อราผลิต endoglucanase ออกมาได้มาก (Amano, 2002) และทำการคัดเลือกเชื้อรา S-SK-1 ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะโดยรวมสูงทั้ง 3 ค่าไว้ แต่ไม่เลือกเชื้อราสายพันธุ์ L-SR-10 ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของ endoglucanase สูงที่สุด แต่มีแอคติวิตีจำเพาะของ β-glucosidase ต่ำมาก เพียง 0.003 U/mg protein ต่างจาก S-SK-1 ซึ่งมีถึง 0.125 U/mg protein ซึ่ง β-glucosidase มีความสำคัญมากในการย่อยสลายเซลโลไบโอสให้กลายเป็นกลูโคส ซึ่งเซลโลไบโอสจะได้มาจากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยตัดปลายส่วนที่เป็น non-reducing sugar ด้วย exoglucanase ทำให้ได้เซลโลไบโอสเป็นส่วนใหญ่และได้กลูโคสด้วย และเซลโลไบโอสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลส โดยตัดพันธะ β-glucosidic แบบสุ่ม ด้วย endoglucanase ทำให้ได้กลูโคสและเซลโลไบโอส (Smith and Aidoo, 1988; Radfort et al., 1996) ดังนั้นจึงนำเชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 ไปศึกษาต่อโดยมีการจัดจำแนกจีนัสของเชื้อรา และศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูโลสได้สูงสุดในขั้นต่อไป

3. การจัดจำแนกเชื้อรา

ในการศึกษาถึงการจัดจำแนกจีนัสของเชื้อรา ตามแนวของ Maren และ John (1988) และ Sutton (1964) โดยจากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อรา S-SK-1 มีโคโลนีสีดำคล้ายปุยฝ้าย และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงและโดยใช้วิธี Slide culture technique พบว่า เส้นใย กว้าง 5 μm ไม่มีสี แตกกิ่งก้าน มี septate แบ่งเส้นใยออกเป็นเซลล์ๆ มี Conidiophores ตั้งตรงและยาว กว้าง 20 μm ส่วนปลายพองออกเป็น vesicle รูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 μm เป็น uniseriate aspergillum มีเฉพาะ phialides ยาว 10 μm connidia รูปร่างกลมผิวขรุขระ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm จึงทำให้บ่งชี้ได้ชัดเจนว่าคือเชื้อรา *Aspergillus* sp.

Aspergillus sp. S-SK-1 เป็นเชื้อราที่อยู่ใน Class Deuteromycetes (Imperfect Fungi) Order Moniliales Family Moniliaceae Genus *Aspergillus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถพบได้ในดิน สอดคล้องกับการทดลองของ Razak และคณะ (1999) ที่ทำการคัดแยกเชื้อราจากดินพบเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้จากพื้นที่ต่ำ El-Sharkia และดินจากพื้นที่สูง Aswan พบเชื้อราจีนัส Aspergillus มากที่สุด ซึ่งพื้นที่ El-Sharkia และพื้นที่ Aswan อยู่ในประเทศอียิปต์ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Kader และคณะ (1999) ที่คัดแยกเชื้อราจากดินบริเวณที่สูง Bario ซึ่งเป็นพื้นที่ป่าฝนในประเทศมาเลเซีย พบเชื้อรา *Aspergillus sp.* มีจำนวนสายพันธุ์มากที่สุด

และมีแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราชนิดอื่น ๆ ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้เช่นกัน

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา S-SR-1 พบว่าโคโลนีมีสีเหลืองคล้ายกำมะหยี่ และเมื่อศึกษาภายใต้กลองจุลทรรศน์ พบว่า เส้นใย กว้าง 2.5 μm ไม่มีสีแตกกิ่งก้าน มี septate แบ่งเส้นใยออกเป็นเซลล์ๆ มี phialide สั้นมาก(หรืออาจไม่มี)และไม่มีสี conidia ทรงกลมไม่มีสี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 μm pycnidia รูปทรงกลม ปากเปิด มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 65 μm ผนังของ pycnidia มีเซลล์หนา จึงทำให้บ่งชี้ได้ชัดเจนว่าคือเชื้อรา *Phoma sp.* ซึ่งเป็นเชื้อราที่อยู่ใน Class Deuteromycetes (Imperfect Fungi) Order Sphaeropsidales Family Sphaeropsidaceae Genus *Phoma* เป็นเชื้อราที่สามารถพบได้ที่ผิวดินเช่นกัน ซึ่งอาจเป็นแซโพรไฟท์หรือปรสิตของพืช ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Campbell, 1985; Donnison et al., 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Tokumasu และคณะ (1997) ที่ทำการคัดแยกเชื้อราจากใบสนที่ผุสลายในพื้นที่ 5 จังหวัดของประเทศไทย คือ จังหวัดสุราษฎ์ธานี พื้นที่น้ำหนาว จังหวัดเลย พื้นที่แคว้นอย จังหวัดเชียงใหม่ พื้นที่อ่างขาง จังหวัดเชียงใหม่ พื้นที่แม่จันทร์ จังหวัดเชียงราย พบเชื้อรา *Phoma sp.* ในส่วนของใบสนที่ไม่มีสีแล้ว จากพื้นที่แคว้นอย จังหวัดเชียงใหม่

4. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

4.1 <u>การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม</u>

เชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่นำมาศึกษาภาวะการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase มีค่าสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีแอคติวิตี เท่ากับ 0.147 U/ml เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับแอคติวิตีของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณที่สูง Bario ซึ่งเป็นพื้นที่ป่าฝนในประเทศมาเลเซีย จากการทดลองของ Kader และคณะ (1999) โดยทำการทดลองผลิตเอนไซม์ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ในสภาวะเขย่า 150 rpm และทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่า มีแอคติวิตีของ exoglucanase สูงที่สุดคือ 0.13 U/ml ซึ่งมีค่าน้อยกว่า *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่ทำการคัดแยกได้จากผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สงขลา 3

สำหรับ endoglucanase มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Coral และคณะ (2002) ที่ทำการผลิตเอนไซม์ endoglucanase ที่อุณหภูมิระหว่าง 30-90 องศาเซลเซียส จากเชื้อรา *Aspergillus niger* Z10 สายพันธุ์ธรรมชาติ พบอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ endoglucanase คือประมาณ 40 องศาเซลเซียส

สำหรับค่า β-glucosidase พบว่า มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อาจเป็นเพราะมีเซลโลไบโอส เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเซลลูโลสของ exoglucanase และ endoglucanase ในปริมาณมากทำให้เชื้อราผลิต β-glucosidase ออกมามากเพื่อย่อยสลายให้ได้กลูโคส แสดงว่าปริมาณเซลโลไบโอสที่เกิดขึ้นจากการทำงานของทั้งสองเอนไซม์นี้เหมาะสมในการกระตุ้นการทำงานของ β-glucosidase นอกจากนี้ปริมาณเซลโลไบโอสและกลูโคสยังไม่มากพอที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ เพราะเอนไซม์ β-glucosidase สามารถถูกยับยั้งได้โดยเซลโลไบโอสซึ่งเป็นสับสเตรทได้ดีเท่า ๆ กับกลูโคสที่เป็นผลิตภัณฑ์ (Saha et al.,1998)

สำหรับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าแอคติวิตีจำเพาะมีค่ารองลงมา ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าเซลโลไบโอสที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสของ exoglucanase และ endoglucanase มีปริมาณไม่เหมาะสมในการกระตุ้นการทำงานของ β-glucosidase อย่างเช่นที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอาจเพราะมีปริมาณกลูโคสที่เป็นผลิตภัณฑ์มากเกินไป สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ได้ (Saha et al., 1998)

เอนไซม์ β-glucosidase มีค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อาจเป็นเพราะเซลโลไบโอสที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเซลลูโลสของ exoglucanase และ endoglucanase มีปริมาณมากเกินไป สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ได้ (Saha et al., 1998) ซึ่งจะสังเกตเห็นได้จากค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase ที่มีค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส และเป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่า exoglucanase สามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่คือ เซลโลไบโอสและได้กลูโคสด้วย (Smith and Aidoo, 1988; Eriksson et al., 1990) แต่ปริมาณกลูโคสอาจไม่มากพอที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ได้ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีจำเพาะของ endoglucanase ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ประกอบด้วย

นอกจากนี้ผลที่ได้จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase มีความแตกต่างกันในแต่ละอุณหภูมิ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Garcia และคณะ (2002) ซึ่งศึกษากระบวนการ saccharification วัตถุดิบ lignocellulose โดยใช้เชื้อรา *Aureobasidium* sp. CHTE-18 *Penicillium* sp. CH-001 และ *Aspergillus terreus* CH-TE-013 พบว่า exoglucanse endoglucanase β-glucosidase และ xylanase มีแอคติวิตีที่แตกต่างกัน แต่ถึงอย่างไรก็ตามเอนไซม์เหล่านี้ก็ทำงานร่วมกันในการเปลี่ยน lignocellulose เป็นน้ำตาล และเมื่อพิจารณาค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase ของทั้ง 3 อุณหภูมิ พบว่าอุณหภูมิ 40

องศาเซลเซียส มีค่าแอคติวิตีจำเพาะโดยรวมที่ดี จึงเลือกใช้อุณหภูมินี้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

4.2 <u>การหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม</u>

เชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่นำมาทำการศึกษาเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างที่ 4 5 6 และ 7 เพื่อเลือกค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมที่สุด ไว้ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase สูงที่สุดที่ pH 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ El-Hawary และคณะ (2001) ที่ทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* S-SK-1 พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมที่สุด สำหรับผลิตเอนไซม์ exoglucanase และ β-glucosidase คือ pH 5 สอดคล้องกับรายงานของ Teugborg และคณะ (2001) ที่ได้รายงานไว้ว่าเชื้อราส่วนมากสามารถผลิตเซลลูเลสให้มีแอคติวิตีสูงที่สุดในช่วง pH 4.0–5.0 นอกจากนี้ยังทำการทดลองพบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. ที่นำมาทำการทดลอง 6 สายพันธุ์ มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ pH 4.8 ซึ่งใกล้เคียงกับ pH 5 มาก สอดคล้องกับรายงานของ Sharma และคณะ (2002) ที่ศึกษา *Trichoderma reesei* Rut–C 30 ซึ่งเป็นเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าสามารถเปลี่ยนก้านต้นทานตะวันที่ผ่านการปรับสภาพแล้วให้กลายเป็น reducing sugar ได้สูงที่สุดที่ pH 5 และสอดคล้องกับรายงานของ Lu-Kwang และ Afolabi (1999) ที่รายงานว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเซลลูเลสจากเซลลูโลสโดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. คือ pH 5

ดังนั้น จึงเลือกใช้ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อสามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้กลูโคสมากที่สุดมาใช้ในกระบวนการหมกและย่อยสลายแบบต่อเนื่องต่อไป (Philippidis, 1996)

4.3 <u>การหาระยะเวลาที่เหมาะสม</u>

เมื่อทำการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. S-SK-1 ในอาหาร Production medium ที่ภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 โดยแปรผันระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตเอนไซม์เป็น 3 5 7 9 11 และ 13 วัน พบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase ต่ำมากและมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ เมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าการใช้อัลฟาเซลลูโลสเข้มข้น 3% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน มีความเข้มข้นของสับสเตรทที่ไม่เหมาะสมต่อการชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์ exoglucanase เข้มข้นของสับสเตรทที่ไม่เหมาะสมต่อการชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์ exoglucanase

สำหรับเอนไซม์ endoglucanase มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 11 แล้วลดลงในวันที่ 13 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แสดงว่า อัลฟาเซลลูโลสความเข้มข้น 3% (w/v) มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์ endoglucanase ที่ทำหน้าที่ตัดพันธะ β-glucosidic โดยตัดแบบสุ่มทำให้ได้กลูโคสและเซลโลไบโอส (Smith and Aidoo, 1988; Eriksson et al., 1990) ตั้งแต่เริ่มผลิตจนถึงวันที่ 11 แล้วลดลงในวันที่ 13 เนื่องจากว่า endoglucanase จะถูกยับยั้งได้โดยเซลโลไบโอสที่เป็นผลิตภัณฑ์ (Saha et al., 1998)

สำหรับเอนไซม์ β-glucosidase มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงรองลงมาจาก endoglucanase และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 11 แสดงว่ามีเซลโลไบโอสที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอัลฟาเซลลูโลสของ exoglucanase และ endoglucanase ในปริมาณที่เหมาะสมในการชักนำให้เชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ผลิตเอนไซม์ β-glucosidase ออกมา ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้ได้กลูโคสเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโต β-glucosidase มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในวันที่ 13 แสดงว่าปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นมีมากเกินไปสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ได้ (Saha et al., 1998)

สำหรับการเลือกระยะเวลาวันที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง ทำการเลือกที่ระยะ 9 วัน เนื่องจากที่กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจำเพาะของ exoglucanase และ endoglucanase ในวันที่ 9 และวันที่ 11 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถึงแม้ว่าค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจำเพาะของ β-glucosidase ในวันที่ 11 จะสูงกว่าวันที่ 9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม เนื่องจากว่าการผลิตทางอุตสาหกรรมต้องการความรวดเร็ว

5. การหมักและการย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)

5.1 <u>ศึกษาการเจริญของเชื้อราเพื่อให้ผลิตหัวเชื้อ</u>

จากผลการเจริญเติบโตของ *Aspergillus* sp. S-SK-1 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร PDB จะพบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จากเริ่มต้นการบ่มเชื้อจนถึงระยะ log phase ใช้เวลา 2 วัน ซึ่งนับว่าเร็วมากเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้เวลาถึง 7 วัน ตามการทดลองของพิสุทธิ์ พวงนาค (2542) ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. S-SK-1 ในอาหารสูตร PDB เป็นเวลา 2 วัน จึงเหมาะที่จะใช้เป็น seed เพื่อเป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตเซลลูเลสต่อไป เนื่องจากจะได้หัวเชื้อปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว และยังช่วยประหยัดอาหาร

เลี้ยงเชื้อและพลังงานที่ใช้ในการบ่มเชื้อได้ สำหรับการเลือกเวลาที่เหมาะสมในการผลิต seed สามารถเลือกเชื้อที่เจริญอยู่ในระยะ log phase คือ 1-2 วัน

5.2 **<u>การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช</u>**

ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลซึ่งได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน สามารถใช้เป็นปัจจัยเบื้องต้นเพื่อเลือกพืชมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์ ซึ่งพืชที่มีปริมาณเซลลูโลสควรให้ผลผลิตที่ดี (Samson and Omielan, 1992) แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นด้วย ที่สำคัญคือ การปรับสภาพ เพื่อเพิ่มความสามารถในการเข้าย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลส ให้ได้น้ำตาลกลูโคสที่สามารถหมักเพื่อผลิตเอทานอลได้ (McMillan, 1994; Hsu, 1996)

5.3 **<u>ศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์</u>**

การศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์ *K. thermotolerans* ในอาหารสูตร YMB ที่เก็บผลการทดลองทุก 6 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จากเริ่มต้นการบ่มเชื้อจนถึงปลายระยะ log phase ใช้เวลา 6 ชั่วโมง การที่ยีสต์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเพราะว่ายีสต์ที่เจริญในภาวะเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch culture) ระดับของการสะสมคาร์โบไฮเดรตในเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการเจริญเติบโต เพราะในอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีน้ำตาลอยู่สูงและมีปริมาณไนโตรเจนอยู่จำกัด (Berry, 1989) สำหรับการเลือกเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักสามารถเลือกที่กึ่งกลางระยะ log phase คือ 6 ชั่วโมง เซลล์มีความเข้มข้น 1×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5.4 **<u>การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส</u>**

กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจำเพาะที่ได้จาก seed ของ *Aspergillus* sp. S-SK-1 มีค่าสูงที่สุดคือ endoglucanase รองลงมาคือ β-glucosidase และค่าต่ำที่สุดคือ exoglucanase

5.5 **<u>การปรับสภาพ</u>**

การปรับสภาพพืชก่อนนำมาใช้ในกระบวนการหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่องมีจุดประสงค์เพื่อกำจัดสิ่งที่ป้องกันการเข้าย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเพิ่มความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากันระหว่างเซลลูเลสกับเซลลูโลส ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการเข้าย่อยสลายของเอนไซม์ หรือความสามารถในการหมักของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิด คือ การปกป้องเซลลูโลสด้วยลิกนิน เฮมิเซลลูโลสที่อยู่ล้อมรอบชั้นของมัดสายเซลลูโลส พื้นที่ผิวของเซลลูโลสที่เอนไซม์สามารถเข้าไปจับเพื่อย่อยสลาย และความเป็น crystallinity ของเซลลูโลส (Hsu, 1996)

จากผลการทดลองพบว่าใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสและลิกนินหลังการปรับสภาพโดยการตัดและบด และแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงปริมาณขององค์ประกอบหลักของชีวมวลทั้ง 3 ชนิดนี้ จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ปริมาณองค์ประกอบแต่ละองค์ประกอบลักษณะสมบัติของแต่ละองค์ประกอบนั้น ๆ และการตอบสนองที่ต่างกันต่อวิธีการปรับสภาพที่หลากหลาย (McMillan, 1994; Hsu, 1996)

การตัดและบดเป็นการลดขนาดและความยาวของเส้นใยลิกโนเซลลูโลส ส่วนการปรับสภาพด้วยสารเคมี เช่น สารละลายด่าง ซึ่งใช้ในการทดลองนี้ เป็นสารที่ทำให้วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสบวมพอง นิ่มขึ้น ทำให้ย่อยสลายได้มากขึ้น เพราะมีการกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกไปบางส่วน เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสและลิกนินประเภท alkali lignins สามารถละลายได้ในสารละลายด่างเจือจาง (Bungay, 1981) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเมื่อเทียบต่อน้ำหนักแห้งของใบแห้งหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกาลดลง และทำให้ปริมาณเซลลูโลสต่อหน่วยน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น

5.6 <u>การเตรียมหัวเชื้อยีสต์</u>

ทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *K. thermotolerans* ในอาหารสูตร YMB ที่ 6 ชั่วโมง แล้วทำการ centifuge เก็บเซลล์ยีสต์ไว้ใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา โดยทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นประมาณ 1×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย Normal saline เข้มข้น 0.85 % (w/v)

5.7 <u>การหมักในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิเมตร</u>

จากผลการทดลองพบว่า ช่วงแรกใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกาถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลได้อย่างรวดเร็ว แต่ยีสต์ยังมีการเจริญเติบโตไม่ดี จึงสามารถเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลได้ในปริมาณไม่สูงมาก ทำให้เหลือน้ำตาล reducing sugar ปริมาณมากในน้ำหมัก ในวันแรกของการหมักน้ำตาล reducing sugar ลดลง และปริมาณเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ยีสต์มีอัตราการเพิ่มของจำนวนเซลล์ค่อนข้างคงที่ นั่นอาจเป็นเพราะว่ายีสต์มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี มีความแข็งแรง จึงสามารถเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลได้ปริมาณมากขึ้น สำหรับวันที่ 2 มีปริมาณเท่ากับ 6.07 กรัมต่อลิตร (0.2 กรัมต่อสับเสตรท) อัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นสูงสุด ประกอบกับน้ำตาล reducing sugar ที่เหลือมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องมาจากว่าเซลลูโลสถูกย่อยสลายกลายเป็นกลูโคสได้ปริมาณเพิ่มขึ้น ยีสต์จึงสามารถนำน้ำตาลที่เกิดขึ้นมาเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ปริมาณที่สูงขึ้นด้วย ในวันที่ 3 ยีสต์มีอัตราการเจริญค่อนข้างคงที่ และมีปริมาณเอทานอลลดลง และน้ำตาล reducing sugar ที่เหลือมีปริมาณสูงขึ้นและสูงที่สุดเท่ากับ 24.43 กรัมต่อลิตร

อาจเนื่องมาจากว่าการมีน้ำตาลมากเกินไป สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ และทำให้การหมักได้ปริมาณเอทานอลที่ลดต่ำลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sreenath และคณะ (2001) ที่ทำการผลิตเอทานอลจากเส้นใย alfalfa ในกระบวนการ SSF โดยใช้ยีสต์ *Candida shehatae* พบว่าปริมาณน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป สามารถยับยั้งการหมักได้ ในวันที่ 4 ยีสต์มีอัตราการเจริญค่อนข้างคงที่ จึงได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอลค่อนข้างคงที่เช่นกัน ในวันที่ 5 ยีสต์มีอัตราการเจริญค่อนข้างลดลง และมีแนวโน้มลดลงจนถึงวันที่ 7 สำหรับปริมาณเอทานอลและปริมาณ reducing sugar มีแนวโน้มลดลงเช่นกัน

จะเห็นได้ว่าผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดในวันที่ 2 ของการหมักมีปริมาณเท่ากับ 6.07 กรัมต่อลิตร (0.2 กรัมต่อสับสเตรท) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Punnapayak และคณะ (1999) ที่ทำการผลิตเอทานอลจากเส้นใยป่านศรนารายณ์ในกระบวนการ SSF โดยใช้เชื้อรา *Acrophialophora* sp. และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ให้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดในวันที่ 2 ของการหมัก มีปริมาณเท่ากับ 0.11 กรัมต่อกรัมสับสเตรท

สำหรับกากที่เหลือจากการหมักพบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้อย่างชัดเจน ซึ่งถ้ามีปริมาณกากมากปริมาณเอทานอลจะน้อย กล่าวคือกากที่เหลือเกิดจากการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคสได้เพียงบางส่วนและสุดท้ายยีสต์เปลี่ยนกลูโคสที่ได้เป็นเอทานอล

สำหรับค่า pH ของน้ำหมักค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาในการหมัก มีค่าอยู่ในช่วง 4.43-5.40

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบแห้งของหญ้าแฝกหอมและดินบริเวณผิวดินใต้กอหญ้าแฝกหอม 3 อีโคไทป์ คือ อีโคไทป์ศรีลังกา อีโคไทป์สงขลา 3 และอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี เพื่อรวบรวมสายพันธุ์ของเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้

2. การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาคัดแยกเชื้อรา ด้วยอาหารเหลวสูตร Czapex's dox สามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งสิ้น 113 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 สรุปจำนวนสายพันธุ์เชื้อราที่คัดแยกได้จากใบแห้งและดินบริเวณผิวดินใต้กอหญ้าแฝกหอม 3 อีโคไทป์

ตัวอย่าง	จำนวนสายพันธุ์
ใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา (L-SR-)	12
ผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา (S-SR-)	5
ใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สงขลา 3 (L-SK-)	13
ผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สงขลา 3 (S-SK-)	20
ใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี (L-ST-)	30
ผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี (S-ST-)	33

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา 113 สายพันธุ์ ในอาหาร Carboxymethyl Cellulose Agar พบเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ภายในระยะเวลา 3 วัน มีทั้งหมด 39 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 สรุปจำนวนสายพันธุ์เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ภายในระยะเวลา 3 วัน

ตัวอย่าง	จำนวนสายพันธุ์
ใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา (L-SR-)	5
ผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา (S-SR-)	4
ใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สงขลา 3 (L-SK-)	1
ผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สงขลา 3 (S-SK-)	3
ใบแห้งของหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี (L-ST-)	4
ผิวดินบริเวณใต้กอหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์สุราษฎ์ธานี (S-ST-)	22

สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase นั้นพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 มีค่าสูงที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะของเชื้อราอีก 5 สายพันธุ์

สำหรับค่าของแอคติวิตีจำเพาะ endoglucanase พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ L-SR-10 มีค่าสูงที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะของเชื้อราอีก 5 สายพันธุ์

สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ β–glucosidase พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ L-ST-14 มีค่าสูงสุด ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับเชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะรองลงมา

โดยสรุปเชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงทั้ง 3 ค่า จึงเลือกมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ต่อไป

3. การจัดจำแนกเชื้อรา

เชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงทั้ง 3 ค่า และเชื้อราสายพันธุ์ S-SR-1 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะทั้ง 3 ค่า สูงรองลงมา ค่อนข้างใกล้เคียงกับเชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 จึงเลือกนำมาจัดจำแนกทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ S-SK-1 คือเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 และสายพันธุ์ S-SR-1 คือเชื้อรา *Phoma* sp. S-SR-1

4. การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

4.1 <u>หาอุณหภูมิที่เหมาะสม</u>

Aspergillus sp. S-SK-1 ผลิตเอนไซม์ exoglucanase ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะ ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ทั้ง 3 ภาวะอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดีที่สุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และต่ำที่สดคืออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

สำหรับเอนไซม์ endoglucanase มีค่าค่าแอคติวิตีจำเพาะดีที่สุดทั้ง 3 อุณหภูมิ เมื่อเปรียบเทียบกับ exoglucanase และ β–glucosidase โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสดีที่สุด

สำหรับ β–glucosidase พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด โดยที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส มีค่าแอคติวิตีจำเพาะใกล้เคียงกัน และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

สรุปได้ว่าที่ภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* sp. S-SK-1 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเซลลูเลสโดยรวมดีที่สุด จึงเลือกอุณหภูมินี้ไว้ใช้สำหรับผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในกระบวนการ SSF ต่อไป

4.2 <u>หาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม</u>

เชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase ที่ pH 5 สูงที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะของภาวะ pH 4 6 และ 7

สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ endoglucanase ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 พบว่ามีค่าสูงกว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase และ β–glucosidase อย่างเห็นได้ชัด และที่ pH 5 ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ endoglucanase ดีที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะ ของภาวะ pH 4 6 และ 7

สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ β–glucosidase ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 นั้นพบว่าที่ pH 4 ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะดีที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะของภาวะ pH 5 และ 6

สรุปได้ว่าที่ภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซียลเซียส และ pH 5 เชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 สามารถผลิตเซลลูเลสที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะดีทั้ง 3 องค์ประกอบ จึงเลือกภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH 5 ไว้สำหรับใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อไว้ใช้ในกระบวนการ SSF ต่อไป

4.3 **<u>การหาระยะเวลาที่เหมาะสม</u>**

เชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแอคติวิตีจำเพาะ ของ endoglucanase และ β–glucosidase และค่าแอคติวิตีจำเพาะ ที่บ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน มีค่าสูงที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับค่าแอคติวิตีจำเพาะของเชื้อที่บ่มเป็นเวลา 3 และ 9 วัน ตามลำดับ

สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ endoglucanase ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. S-SK-1 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase และ β–glucosidase และค่าแอคติวิตีจำเพาะ เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 11 วัน มีค่าสูงสุด และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับระยะเวลาบ่มเชื้อที่ 9 วัน ซึ่งมีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงรองลงมา

สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ β–glucosidase เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase และ endoglucanase แล้วพบว่ามีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงรองลงมาจาก endoglucanase และที่ระยะเวลาบ่มเชื้อเป็นเวลา 11 วัน เชื้อรามีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับอันดับรองลงมาคือที่ระยะเวลาบ่มเชื้อนาน 13 วัน ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 กับที่ระยะเวลาบ่มเชื้อนาน 9 วัน

โดยสรุประยะเวลาที่เลือกไว้ในการบ่มเชื้อคือ 9 วัน เพื่อการผลิตเซลลูเลสเนื่องจากในอุตสาหกรรมต้องการความรวดเร็วในการผลิต

5. การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช ได้แก่ ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน พบว่า ก่อนปรับสภาพและลังปรับสภาพมีความแตกต่างกัน โดยก่อนปรับสภาพมีปริมาณเซลลูโลส 34.41% หลังปรับสภาพมีปริมาณ 55.45% (เพิ่มขึ้น 61.15%) ปริมาณเฮมิเซลลูโลสก่อนปรับสภาพมี 34.04% หลังปรับสภาพมีปริมาณ 15.20% (ลดลง 55.35%) และปริมาณลิกนินก่อนปรับสภาพมี 15.95% และหลังปรับสภาพมีปริมาณ 11.64% (ลดลง 27.02%)

6. **การหมักและการย่อยสลายแบบต่อเนื่อง** (Simultaneous sacchrification and fermentation, SSF)

ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดในวันที่ 2 มีค่าเท่ากับ 6.07 กรัมต่อลิตร (0.20 กรัมต่อกรัมสับสเตรท)

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักของใบแห้งหญ้าแฝกหอมอีโคไทป์ศรีลังกา สูงสุดในวันที่ 3 มีค่า 24.43 กรัมต่อลิตร

สำหรับกากที่เหลือพบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้อย่างชัดเจน กล่าวคือกากที่เหลือลดลงเพราะเซลลูโลสถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสและสุดท้ายยีสต์เปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอล

จำนวนเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 จากนั้นลดลงต่ำที่สุดในวันที่ 3 แล้วเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและสูงที่สุดถึง 2.045×10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4

สำหรับค่า pH ของน้ำหมักพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 4.43– 5.4

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราเพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นได้
2. ควรจะมีการประยุกต์ใช้วิธีการปรับสภาพพืชจากวิธีทางชีวภาพ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ซึ่งจะช่วยเพิ่มผลผลิตเอทานอลให้สูงขึ้นได้
3. ควรหาภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักพร้อมกับการย่อยสลายเพื่อสามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คณะกรรมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล. กรุงเทพฯ: แปลน พริ้นติ้ง.

พรเทพ ถนนแก้ว. 2538. ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* Perrine. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิสุทธิ์ พวงนาค. 2542. การกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Acrophialophora* sp. ที่ย่อยสลายเซลลูโลส. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ระวีวรรณ แกล้วกล้า. 2538. การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเคมีเทคนิค บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ราเชนทร์ ถิรพร. 2537. ประโยชน์ของหญ้าแฝกในด้านอื่น ๆ หญ้าแฝก (Vetiver grass) การใช้ประโยชน์เพื่อการพัฒนาอาชีพและพิทักษ์สภาพแวดล้อม. ในรายงานการสัมมนาเรื่องการพัฒนาและการรณรงค์การใช้หญ้าแฝก, หน้า 39-59. ตุลาคม โดยสำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ.

วิทูร ชินพันธุ์. 2541. ความรู้เรื่องหญ้าแฝก. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 115 หน้า.

สันทนา เสถียรไพศาล. 2539. การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของลิกโนเซลลูโลสเป็นเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องโดย *Acrophialophora* sp. และ *Candida brassicae*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุภาภรณ์ โสภณพัฒนะโภคา. 2546. วัชพืชที่มีศักยภาพเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์เชื้อเพลิง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Adl, S. M. 2003. The Ecology of Soil Decomposition. The U.K. : Cromwell Press.

Aldridge, S. 2000. The Agbiotech Revolution In J. Sterling (ed.). Genetic Engineering News. USA: Mary Ann Liebert.

Amano, Y., and Kanda, T. 2002. New Insights into Cellulose Degradation by Cellulases and Related Enzymes. Trends in Glycoscience and Glycotechnology. 14(75): 27-34.

Banat, I.M., Nigam, P., and Marchant, R. 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52 °C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8: 259-263.

Barnett, H. L., and Hunter, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Minnesota: Burgess Publishing Co. 200 pp.

Belkacemi. K., Turcotte, G., De Halleux, D., and Savoie, P. 1998. Ethanol production from AFEX-treated forages and agricultural residues. Applied Biochemistry and Biotechnology vol. 70-72. In M. Finkelstein and B. H. Davison (eds.), Biotechnology for Fuels and Chemicals, pp. 441-462. New Jersey: Humana Press.

Berry, D. R. 1989. Growth of Yeast. In J.O. Newang (ed.), Fermentation process development of industrial organisms (Bioprocess Technology. V. 4), pp. 277-311. New York: Marcel Dekker.

Blackburn, B., MacDonald, T., McCormack, M., Perez, P., and Tiengco, V. 1999. Evaluation of biomass-to-ethanol fuel potential in California. California Energy Xommission Docket 1999-12-22-500-99-022.

Boyle, M., Barron, N., and McItale, A. P. 1997. Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. Biotechnology Letters. 19(1): 49-51.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the contitation of microorganism quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

Bungay, H. R. 1981. Fractionation and Pretreatment. In Energy, The Biomass Options, pp. 185-201. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Campbell, R. 1985. Plant Microbiology. East Kilbride, Scotland: Thomson Litho Ltd.

Chang, V. S., Kaar, W. E., Burr, B., and Holtzapple, M. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lime-treated biomass. Biotechnology Letters. 23: 1327-1333.

Coral, G., Arikan, B., Unaldi, M. N., and Güvenmez, H. 2002. Some Properties of Crude Carboxymethyl Cellulase of *Aspergillus niger* z10 Wild-Type Strain. Turkey Journal of Biology. 26: 209-213.

Donnison, L. M., Griffith, G.S., Hedger, J., Hobbs, P. J., and Bardgett R. D. 2000. Management influences on soil microbial communities and their function in botanically diverse haymeadows of northern England and Wales. Soil biology and Biochemistry. 32: 253-263.

El-Hawary, F., Mostafa, Y. S., and Laszlo, E. 2001. Cellulase production and conversion of rice straw to lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. Acta Alimentaria. 30(3): 281-295.

Eriksson, K. -E. L., Blanchette, R. A., and Ander, P. 1990. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood Component. Germany: Springer - Verlag.

Garcia-Kirchner, O., Muoz-Aguilar, M., Perez-Villalva, R., and Huitron – Vargas, C. 2002. Mixed Submerged Fermentation with Two Filamentous Fungi for Cellulolytic and Xylanolytic Enzyme Production. Applied Biochemistry and Biotechnology. 98: 1-3.

Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. International Union of Pure and Applied Chemistry. 59: 257-268.

Goering, H. K., and Van Soest, P.J. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagent, Producers, and Some Application). In Agriculture Handbook No. 379, p. 20. United Stated States of Agriculture, Washington, DC.

Hankin, L., and Anagnostakis, S. L. 1977. Solid media containing carboxymethylcellulase to detect Cx cellulase activity of microorganism. Journal of General and Applied Microbiology. 98: 109-115.

Himmel, M. E., Baker, J. O., and Overend, R.P. 1994. Enzymatic Conversion of Biomass for fuels Production. Washington, DC: American Chemical Society.

Hsu, T. 1996. Pretreatment of Biomass. In C. E. Wyman (ed.), Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, pp. 179-212. Washington, DC: Taylor & Francis.

Kader, A. J., Omar, O., and Feng, L. S. 1999. Isolation of Cellulolytic Fungi from the Bario Highlands, Sarawak. ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC).

Kirk, T. K., and Farrell, R. L. 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. Annual Review of Microbiology. 41: 465-505.

Klass, D. L., 1998. Biomass for Renewable Energy, Fuels, and Chemicals. California: Academic Press.

Klich, M. A., and Pitt, J. I. 1988. A laboratory guide to the common aspergillus species and their teleomorphs. Australia: Facsimile.

Krishna, S. H., Reddy, T. J., and Chowdary, G. V. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. Bioresource Technology. 77: 193 -196.

Lu-Kwang, J., and Afolabi, O. A. 1999. Wastepaper Hydrolysate as Soluble Inducing Substrate for Cellulase Production in Continuous Culture of *Trichoderma reesei*. Biotechnology Progress. 15: 91-97.

Mandels, M., and Stenberg, D. 1976. Recent advances in cellulase technology. Journal of Fermentation Technology. 54: 267-286.

McMillan, J. D. 1994. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In M. E. Himmel, J. O. Baker, and R. P. Overend (eds.), Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, ACS Symposium Series 566, pp. 292-324. Washington, DC: American Chemical Society.

Mielenz, J. R. 2001. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. Current Opinion in Microbiology. 4(3): 432-329.

Norby, M. 2000. It's a grass, grass for biofuel. Research of University of Nebraska-Lincoln, Agricultural Research Division. Available from: http://ard. unl. Edu/rn/0900/grass.html

Philippidis, G. P. 1996. Cellulose Bioconversion Technology. In C. E. Wyman (ed.), Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, pp. 253-285. Washington, DC: Taybr & Francis.

Phowchinda, O. 1999. Ethanol fermentation from pineapple waste by *Saccharomyces cerevisiae*. Programme and Abstracts, 25th Congress on Science on Science and Technology of Thailand, Pitsanuloke. pp. 824-825.

Pumtong, P., Dangkau, P., and T. Eksittikul. 1999. Carbohydrate and alcohol production from saman in immobilized cell system. Programme and Abstracts. 25th Congress on Science and Technology of Thailand., Pitsanuloke, pp. 782-783.

Punnapayak, H., and Emert, G. H. 1986. Use of *Pachysolen tannophilus* in simultaneous sacchrification and fermentation (SSF) of lignocellulosics. Biotechnology Letters. 8(1): 63-66.

Punnapayak, H., and Hoffmann, J. J. 1994. *Amsonia* spp. As potential fuel crops for arid lands. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 10: 290-292.

Punnapayak, H., Kuhirun, M., and Thanonkeo, P. 1999. Cellulolytic Fungi and the Bioconversion of Fiber from *agave sisalana*. Science Asia. 25: 133-136.

Radfort, A., Stone, P. J., and Taleb, F. 1996. Cellulase and Amylase Complex. In Brambl and Marzluf (eds.), The Mycota III Biochemistry and Molecular Biology, pp. 269-294. Germany: Springer-Verlag.

Razak, A. A., Bachmann, G., Ali, Th. M., and Farrag, R. 1999. Activities of microflora in soils of upper and lower egypt. The African Journal of Mycology and Biotechnology. 7(1): 1-19.

Saha, B. C., Dien, B. S., and Bothast, R. J. 1998. Fuel ethanol production from corn fiber current status and technical prospects. Applied Biochemistry and Biotechnology vol. 70-72. In M. Finkelstein and B. H. Davison (eds.), Biotechnology for Fuels and Chemicals, pp. 115-124. New Jersey: Humana Press.

Samson, R. A., and Omielan, J. A. 1992. Switchgrass: A potential biomass energy crop. For ethanol production. Thirteenth North American Prairie Conference Proceedings. Windsor. Ontario. pp. 253. August 6-9.

Sharma, S. K., Kalra, K. L., and Grewal, H. S. 2002. Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks. Biomass and Bioenergy. 23: 237-243.

Smith, J. E., and Aidoo, K. E. 1988. Growth of fungi on solid substrates. In D. R. Berry (ed.), Physiology of Industrial Fungi, pp. 249-269. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Sreenath, H. K., Koegel, R. G., Moldes, A. B., Jeffries, T. W., and Straub, R. J. 2001. Ethanol production from alfalfa fiber fractions by saccharification and fermentation. Process Biochemistry. 36: 1199-1204.

Sternberg, D., Vijayakumar, P., and Reese, E. T. 1977. β-glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. Canadian Journal of Microbiology. 23: 139-147.

Sutton, B. C. 1964. Phoma and Related Genera. Transactions of British Mycological Society. 47(4): 497-509.

Tengborg, C., Galbe, M., and Zacchi, G. 2001. Influence of Enzyme Loading and Physical Parameters on the Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Solfwood. Biotechnology Progress. 17:110-117.

Tokumasu, S., Tubaki, K., and Manoch, L. 1997. Microfungal communities on decaying pine needles in Thailand. In Janardhanan, K. K., Rajendran, C., Natarajan, C., Natarajan, K., Hawksworth, D. L. (eds.), Tropical Mycology, pp.93-106. Science Publishers.

Uhlig, H., and Linsmaier-Bednar, E. M. 1998. Industrial Enzyme and Their Application. p. 454. New York: Wiley.

Varma, A., and Behera, B. 2003. Green energy: Biomass Processing and Technology. New Delhi Kolkata Bangalore: Capital Publishing Company.

Wade, Jr., L. G. 1995. Structure and synthesis of alcohols. In Organic Chemistry. 3 rd ed. p. 400. New Jersey: Prentice – Hall.

Wheals, A. E., Basso, L. C., Alves, D. M. G., and Amorim, H. V. 1999. Fuel ethanol after 25 years. Trends in Biotechnology. 17(2): 482-487.

Xiao-Bin, Y., Yun, H. S., and Koo, Y. M. 1998. Production of Cellulase by *Trichoderma reesei* Rut C 30 in Wheat Bran-containing Media. Journal of Microbiology and Biotechnology. 8(3): 208-213.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

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

$(NH_4)_2SO_4$	1.4	กรัม
KH_2PO_4	2.0	กรัม
Urea	0.3	กรัม
$CaCl_2$	0.3	กรัม
$MgSO_4$	0.3	กรัม
$FeSO_4$	5.0	มิลลิกรัม
$MnSO_4$	1.6	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	1.4	มิลลิกรัม
$CoCl_2$	2.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ถ่ายใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 2.0 x 10.0 เซนติเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน ใส่ไว้ในอาหาร

2. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
วุ้น	16	กรัม
น้ำกลั่น		

หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นลูกเต๋าประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร ต้มกับน้ำกลั่น เมื่อสุกแล้วกรองเอาแต่น้ำ จากนั้นเติมน้ำตาลน้ำตาลกลูโคสแล้วปรับปริมาตรให้ใกล้ 1 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 5.5 เติมวุ้นแล้วต้มจนวุ้นละลายหมด สุดท้ายปรับให้เป็น 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสูตร PDA แต่ใส่วุ้น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

4. Yeast Malt Agar (YMA)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
วุ้น	16	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นวุ้นด้วยน้ำกลั่น แล้วเติมวุ้น จากนั้นนำไปต้มจนวุ้นละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

5. Yeast Malt Agar (YMB)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสูตร YMA แต่ไม่ใส่วุ้น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

6. Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC agar)

$(NH_4)SO_4$	1	กรัม
Carboxymethyl cellulos	5	กรัม
Yeast extrat	1	กรัม
Agar	10	กรัม
น้ำกลั่น	10	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบ่งละลาย CMC และ gar แล้วนำไปต้มจนละลาย จากนั้นนำมารวมกัน แล้วใส่ yeast extract และ $(NH_4)_2SO_4$ ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

7. Production medium (Punnapayak and Emert, 1986)

$MgSO_4.7H_2O$	1	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	4	กรัม
$CaHPO_4.2H_2O$	5	กรัม
Corn steep liquor	7	กรัม
α-cellulose	30	กรัม
Tween 80	2	มล.
$FeSO_4$	5	มก.
$ZnSO_4$	1.4	มก.
$MnSO_4$	1.6	มก.
$CoCl_2$	3.6	มก.
น้ำกลั่น		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้น α–cellulose Tween 80 และ $CaHPO_4.2H_2O$ ปรับปริมาตรให้ใกล้เคียง 1 ลิตร แล้วปรับ pH เท่ากับ 5.0 เติม Tween 80 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร สำหรับ α-cellulose และ $CaHPO_4.2H_2O$ ให้ชั่งแยกแต่ละฟลาส์ก

8. F2 medium (Punnapayak, Kuhirun, and Thanonkeo, 1999)

$(NH_4)_2SO_4$	30	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	2.2	กรัม
$CaCl_2$	1.2	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลายส่วนผสมแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น โดยละลายแยกจากกัน แล้วนำมาผสมกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

1. สารละลาย Neutral Detergent

1.1 ชั่ง Disodium ethylene diamine tetraacetate (EDTA) 16.18 กรัม และ Sodiumborate decahydrate ($Na_2B4O_7.10H_2O$) 6.81 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ นำไปต้มจนละลายหมด

1.2 ละลาย Sodium lauryl sulphate 30 กรัม ในน้ำ แล้วเติม 2–Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoethyl ether) 10 มิลลิลิตร

1.3 นำสารละลายในข้อ 1.1 มาผสมกับสารละลายในข้อ 1.2

1.4 ชั่ง Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) 4.56 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ แล้วนำไปต้มจนละลายหมด นำไปต้มกับสารละลายผสมที่ได้ในข้อ 1.3 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.9 - 7.1

2. สารละลาย Acid Detergent

ละลาย Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) 20 กรัม ในกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 N แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดนี้ให้ได้ 1 ลิตร

3. สารละลาย Saturated potassium permanganate

ละลาย Potassium permanganate ($KMnO_4$) 50 กรัม และ Silver sulphate (Ag_2SO_4) 0.05 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ในขวดแก้วสีชา อย่าให้โดนแสงแดด

4. สารละลาย Lignin buffer

ละลาย Ferric nitrate nanohydrate [$Fe(NO_3)_3.9H_2O$] 6 กรัม และ Silver nitrate ($AgNO_3$) 0.15 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม Acetic acid glacial 500 มิลลิลิตร เติม Potassium acetate 5 กรัม และเติม Tertiary butyl alcohol 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5. **สารละลาย** Combined permanganate

ผสมสารละลาย Saturated potassium permanganate กับ สารละลาย Lignin buffer ในอัตราส่วน 2:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บสารละลายนี้ในขวดสีชา แช่ในตู้เย็นไม่ให้ถูกแสงแดด ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงแล้วจะไม่สามารถนำมาใช้ได้อีก

6. **สารละลาย** Demineralizing

ละลาย Oxalic acid dihydrate 50 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร และ Hydrochloric acid (HCl) 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

7. **สารละลาย 80 % ethanol**

ผสม 95 % Ethanol 843 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 157 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

การเตรียมสารเคมีสำหรับใช้ในการคัดแยกเชื้อ

1. สารละลาย 0.01% Congo red

   ละลาย Congo red 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิเมตร แล้วผสมให้เข้ากัน

2. สาระละลาย 1 M Sodium Chloride

   ละลาย Sodium chloride 58.44 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิเมตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

การเตรียมสารเคมีสำหรับการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส

1. DNS reagent

1.1 เตรียมสารละลาย NaOH 10 % ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ใส่ phenol 10 กรัม จากนั้นเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เทแบ่งออกมา 96 มิลลิลิตร เติม $NaOSO_3$ 9.6 กรัม คนให้เข้ากัน

1.2 เตรียมสารละลาย DNS 1 % ปริมาตร 880 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย Rochelle salt 255 กรัม ด้วยสารละลาย NaOH 4.5 % ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเทรวมกับสารละลาย DNS 1 % คนให้เข้ากัน

1.3 นำสารละลายจากข้อ 1.1 และ 1.2 เทรวมกัน จะได้ DNS reagent เก็บไว้ในขวดสีชา แล้วแช่ตู้เย็นอย่างน้อย 1 คืน จึงนำไปใช้

2. 0.05 M Citrate buffer pH 4.8

ละลาย Sodium citrate (MW = 210.14 g/mol) (กรัมต่อโมล) 7.6466 กรัม ในน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร แล้วเติม Citric acid 5.0434 กรัม ปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้ได้ 4.8 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. 0.025 M Citrate buffer pH 4.5

ละลาย Sodium citrate (MW = 210.14 g/mol) 1.2940 กรัม ในน้ำกลั่น 490 มิลลิลิตร

4. สารละลาย Carboxymethyl cellulose (CMC) ความเข้มข้น 2%

ละลาย CMC 2 กรัม ด้วย 0.05 M citrate buffer แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วเติม Citric acid 1.6958 กรัม ปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้ได้ 4.5 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. สารละลาย Salicin ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลาย D-salicin 0.4 กรัม ด้วย 0.025 M citrate buffer ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีสำหรับการวัดปริมาณโปรตีน

สารละลาย Biuret reagent

ถ้าต้องการเตรียมสารละลาย Biuret reagent ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ให้ละลาย CuSO4.5H2O 0.75 กรัม และ Rochelle salt (Potassium sodium tartrate) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 % ปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ SSF

1. 0.04 M Sodium acetate buffer pH 5.0

ชั่ง Sodium acetate 0.3456 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 990 มิลลิลิตร เติม Acetic acid (conc.) ปริมาตร 0.83 มิลลิลิตร นำไปวัด pH แล้วปรับ pH ให้ได้ 5.0 โดยใช้ 1 N Sodium hydroxide

2. **Normal saline 0.85%**

ละลาย Nacl 8.5 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

การเตรียม DNS reagent สำหรับวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในกระบวนการ SSF

1. **สารละลาย Dinitrosalicylic Acid Reagent Solution 1% ประกอบด้วย**

Dinitrosalicylic acid 10 กรัม

Phenol 2 กรัม

Sodium sulfite 0.5 กรัม

Sodium hydroxide 10 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. **สารละลาย Potassium sodium tartrate solution 40%**

ละลาย Potassium sodium tartrate 40 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

1. **การวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช** (Goering and Van Soest, 1970)

1.1 <u>การสกัดด้วยสารละลาย Neutral detergent</u>

(1) นำ Sintered glass crucible เบอร์ 1 ขนาด 50 มิลลิลิตร ไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ใน desiccator ทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

(2) ชั่งตัวอย่างที่แห้งและบดละเอียดขนาด 20-30 mesh หรือ 1 มิลลิลิตร ประมาณ 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร

(3) เติมสารละลาย Neutral detergent 100 มิลลิลิตร Sodium sulfite 0.5 กรัม และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร นำไป reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนับตั้งแต่เริ่มเดือด

(4) ถ่ายส่วนผสมที่ reflex เสร็จแล้วลงใน Sintered glass crucible ที่วางอยู่บนชุดกรอง ล้างตัวอย่างใน crucible ด้วยน้ำร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย Acetone 2 ครั้ง ดูดสารละลายออกด้วยเครื่อง vacuum pump จนแห้ง จากนั้นนำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

(5) นำ crucible ออกมาทิ้งให้เย็นใน desicator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือปริมาณ Neutral detergent fiber (NDF)

<u>วิธีคำนวณ</u>

$$\% \text{ NDF} = \frac{[(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก NDF}) - \text{น้ำหนัก crucible}]}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}} \times 100$$

1.2 <u>การสกัดด้วยสารละลาย Acid detergent</u>

(1) นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดด้วย Neutral detergent มาถ่ายใส่ในบีกเกอร์เพื่อทำการ Reflux ด้วย acid detergent โดยเติม Acid detergent 10 มิลลิลิตร และ Decahydronaphtalene 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2) กรองตัวอย่างพืชใน crucible ใบเดิม เพื่อลดการสูญเสียตัวอย่างให้น้อยที่สุด แล้วล้างด้วยน้ำร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย 80% Ethanol 2 ครั้ง

(3) นำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้คือ น้ำหนักของ Acid detergent fiber (ADF) น้ำหนักที่แตกต่างระหว่าง NDF และ ADF คือ น้ำหนักของเฮมิเซลลูโลส

<u>วิธีคำนวณ</u>

$$\% \text{ ADF} = \frac{[(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก ADF}) - \text{น้ำหนัก crucible}] \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

$$\% \text{ Hemicellulose} = \% \text{ NDF} - \% \text{ ADF}$$

1.3 <u>การวิเคราะห์หา Permanganate lignin (PML)</u>

(1) เติมสารละลาย Combined permanganate 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible ที่มีตัวอย่างซึ่งผ่านการสกัดด้วย Acid detergent แล้ว แช่ crucible ลงในถาดที่มีน้ำเย็นสูง ประมาณ 2 เซนติเมตร คนด้วยแท่งแก้วเพื่อไม่ให้ตัวอย่างจับเป็นก้อน ทิ้งไว้ 45 นาที โดยคนเป็นบางครั้ง จากนั้นดูดสารละลายออกให้หมดโดยใช้ vacuum pump

(2) เติมสารละลาย Combined permanganate 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible อีกครั้ง ทิ้งไว้อีก 45 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมดโดยใช้ vacuum pump

(3) เติมสารละลาย Demineralizing ลงใน crucible แต่ละถ้วย แช่ไว้ 5 นาที แล้วดูดสารละลายออกโดยใช้ vacuum pump ทำซ้ำจนตัวอย่างพืชเป็นสีขาวภายในเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วย 80 % Ethanol และ acetone แล้วดูดให้แห้งโดยใช้ vacuum pump

(4) นำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง Acid detergent fiber (ADF) และน้ำหนักตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก คือ น้ำหนักของลิกนิน

<u>วิธีคำนวณ</u>

$$\% \text{ Lignin} = \frac{(A - B) \times 100}{C}$$

โดยที่ A = น้ำหนัก crucible + น้ำหนัก ADF

B = น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก

C = น้ำหนักตัวอย่างพืช

1.4 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสด้วยการเผาเถ้า</u>

นำ crucible ที่มีตัวอย่างพืชซึ่งผ่านการสกัดลิกนินออกแล้วในข้อ 1.3 ไปเผาในเครื่องเผาเถ้า ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง น้ำหนักพืชหลังการสกัดลิกนินออก และน้ำหนักหลังการเผาเถ้า คือ น้ำหนักเซลลูโลส ส่วนน้ำหนักเถ้าก็คือ ผลต่างระหว่างน้ำหนักหลังการเผาเถ้าและน้ำหนัก crucible

<u>วิธีคำนวณ</u>

$$\% \text{ Cellulose} = \frac{(B - D) \times 100}{C}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

1. การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ exoglucanase (1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase, [EC 3.2.1.91]) **ด้วยวิธี** FPU Assay (Ghose, 1987)

วิธีทำ

(1) เติม 0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตรอย่างน้อย 25 มิลลิลิตร

(2) เติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร (บางตัวอย่างอาจต้องเจือจางด้วย citrate buffer ก่อน) แล้วใส่กระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาด 1.0 x 6.0 เซนติเมตร (น้ำหนักประมาณ 50 มิลลิกรัม) 1 ชิ้น

(3) นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

(4) เติมสารละลาย DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น

(5) เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex

(6) เมื่อกระดาษกรองนอนก้นดีแล้ว (หลังจากตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที) นำส่วนน้ำใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมารน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตราฐาน แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าแอคติวิตีจากสูตรตามหลักของ International Unit (IU)

2. การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ endoglucanase (1,4-β-D-glucan 4-glucohydrolase [EC 3.2.1.4]) **ด้วยวิธี** Carboxymethyl Cellulase Assay (Ghose, 1987)

วิธีทำ

(1) เติม 2% Carboxymethyl cellulose (CMC) ที่ละลายใน 0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตรอย่างน้อย 25 มิลลิลิตร

(2) เติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร (เจือจางด้วย citrate buffer ก่อน) เขย่าให้เข้ากัน

(3) นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(4) เติมสารละลาย DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น

(5) เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าแอคติวิตีจากสูตรตามหลักของ International Unit (IU)

3. การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ β-glucosidase (β-D-glucosidase glucohydrolase [EC 3.2.1.21]) (Sternberg, Vijaykumar, and Reese, 1977)

วิธีทำ

(1) เติมสารละลาย salicin ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน 0.025 M sodium citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตรอย่างน้อย 25 มิลลิลิตร

(2) เติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

(3) นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(4) เติมสารละลาย DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น

(5) เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตราฐาน แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีจากสูตรตามหลักของ International Unit (IU)

4. การคำนวณหาค่า unit of enzyme ตามวิธีการของ The International Union of Biochemistry (Lehninger, 1982)

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้น ให้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ นั่นคือ

1 หน่วยของเอนไซม์ = 1 ไมโครโมลของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1 ไมโครโมลของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

= 0.180 มิลลิกรัม ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

5.1 การคำนวณแอคติวิตีของเซลลูเลส

ค่าแอคติวิตีของ exoglucanase จะได้ว่า

ถ้ากลูโคส 0.180 มิลลิกรัม ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า 1 หน่วย

ถ้ากลูโคส 1.00 มิลลิกรัม ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 60 นาที มีค่า $\frac{1}{(0.180 \times 60)} = 0.093$ หน่วย

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร สามารถปลดปล่อยกลูโคส X มิลลิกรัม ใน 60 นาที มีค่าเท่ากับ x X 0.093 หน่วย

ดังนั้น เมื่อใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ในสภาวะเดียวกันจะมีค่า เท่ากับ $\frac{(x \times 0.093)}{0.5}$ หน่วย

หรือ = $\frac{\text{มิลลิกรัมกลูโคส X 0.093}}{\text{ปริมาตรของเอนไซม์}}$ หน่วย/มล. (U/ml)

ดังนั้น ค่าแอคติวิตีของ endoglucanase จะได้ว่า

ถ้ากลูโคส 0.180 มิลลิกรัม ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า 1 หน่วย

ถ้ากลูโคส 1.00 มิลลิกรัม ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 30 นาที มีค่า $\frac{1}{(0.180 \times 30)} = 0.185$ หน่วย

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร สามารถปลดปล่อยกลูโคส X มิลลิกรัม ใน 30 นาที มีค่า เท่ากับ X x 0.185 หน่วย

ดังนั้น เมื่อใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ในสภาวะเดียวกัน จะมีค่า เท่ากับ $\frac{(X \times 0.185)}{0.5}$ หน่วย

หรือ = $\frac{\text{มิลลิกรัมกลูโคส X 0.185}}{\text{ปริมาตรของเอนไซม์}}$ หน่วย/มล. (U/ml)

สำหรับค่าแอคติวิตีของ β-glucosidase คำนวณเช่นเดียวกันกับค่าแอคติวิตีของ endoglucanase

6. **การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี** Biuret Method (Bradford, 1976)

วิธีทำ

(1) เติมเอนไซม์ 1.0 มิลลิเมตรลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลาย Biuret reagent 4 มิลลิลิตร (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง) เขย่าให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง Vortex ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

(2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยเขย่าให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง Vortex ก่อนนำไปวัดทันที จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาค่าปริมาณโปรตีน

7. **การหาค่า** Specific activity

นำค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่คำนวณได้ในหน่วย หน่วยต่อมิลลิลิตร มาหารด้วยค่าปริมาณโปรตีนของเอนไซม์นั้นค่า specific activity ของเอนไซม์จะมีหน่วยเป็น หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

8. **การหาค่า** maximum specific growth rate **สำหรับเชื้อราที่เจริญเป็น** pellet (Prosser,1995)

จากกราฟแสดงการเจริญเติบโตทียบกับเวลา สามารถหาค่าคงที่ k ได้จากสมการ

$$M^{1/3} = M_0^{1/3} + kt \quad .....(1)$$

โดยที่ M = น้ำหนักแห้งของเส้นใยที่เวลา t (เวลาที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดในช่วง log phase)

M_0 = น้ำหนักแห้งของเส้นใยที่เวลาเริ่มต้นบ่มเชื้อ

เมื่อทราบค่าคงที่ k แล้ว คำนวณหาค่า w (ความกว้างของชั้นนอกของ pellet ที่เป็นชั้นของ active hyphae) จากสมการ

$$M = M_0 + (4/3\ \P pn)^{1/3} w\mu t \quad .....(2)$$

โดยที่ p = ค่าคงที่ของความหนาแน่นของ pellet

N = จำนวน pellet

μ = specific growth rate

แทนค่าคงที่ k = $(4/3\ \P pn)^{1/3}\ \mu t$ ลงในสมการที่ 2

เมื่อทราบค่า w แล้ว คำนวณหาค่า μ สมการ

$$r = r_0 + w\mu t \quad .....(3)$$

โดยที่ r = รัศมีของ pellet ณ เวลา t

r_0 = รัศมีของ pellet ณ เวลาเริ่มบ่มเชื้อ

9. **การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลและโปรตีนสำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์**

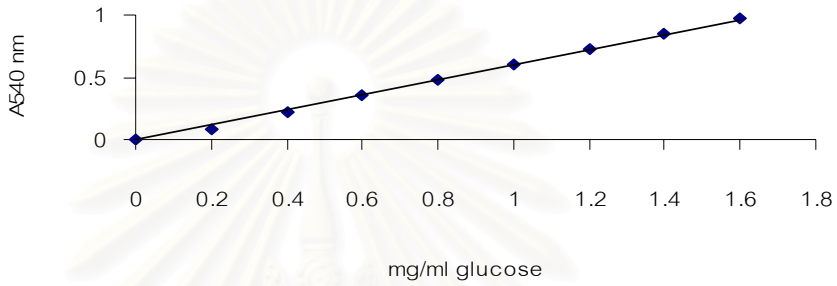
10.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

วิธีทำ

(1) เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย citrate buffer

(2) เติมสารละลาย DNS reagent หลอดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดบน water bath นาน 5 วินาที

(3) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำเย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟน้ำตาลมาตรฐานดังภาพที่ 25



ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ได้จาก DNS assay เพื่อใช้ในการคำนวณแอคติวิตีของเซลลูเลส

nm = นาโนเมตร

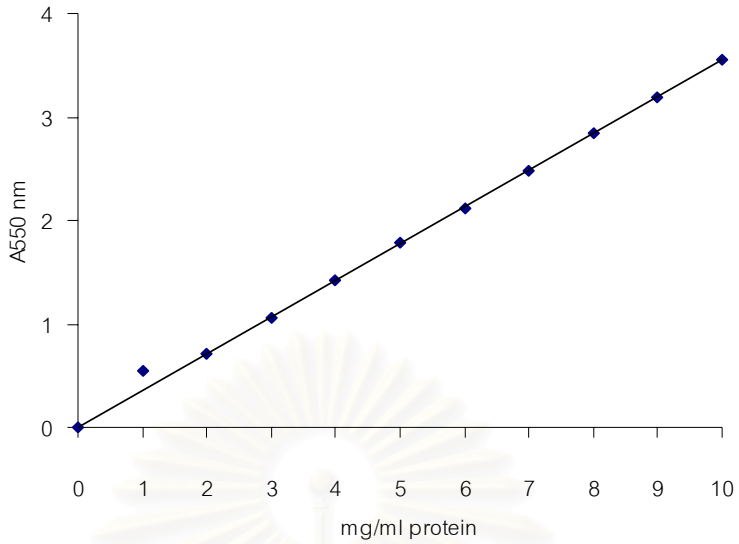
10.2 การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

วิธีทำ

(1) เตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) เข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

(2) เติมสารละลาย Biuret reagent ลงไปหลอดละ 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

(3) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยเขย่าให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง Vortex ก่อนนำไปวัดทันที แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีนดังภาพที่ 26



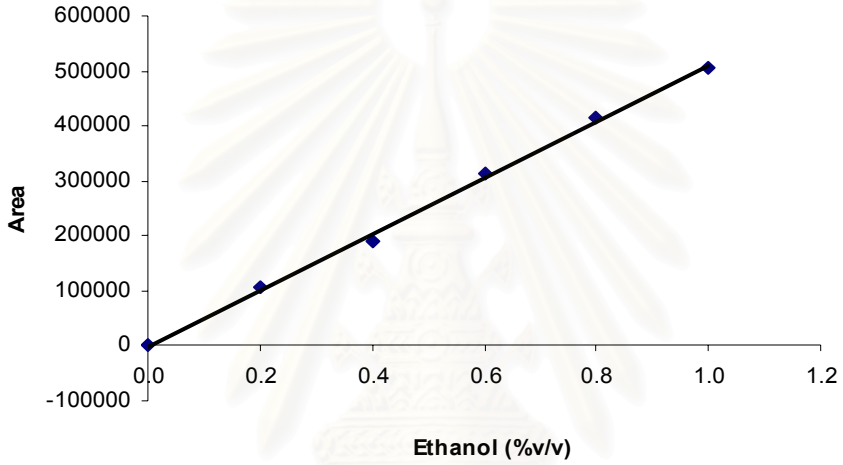
ภาพที่ 27 กราฟมาตรฐานโปรตีน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี Biuret method

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

1. การสร้างกราฟมาตรฐานเอทานอล

เตรียมเอทานอลความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0% (v/v) (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำไปตรวจสอบความเข้มข้นด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลและพื้นที่ใต้กราฟ ดังภาพที่ 27



ภาพที่ 28 กราฟมาตรฐานเอทานอล

2.การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหนัก (Miller, 1959)

(1) ปิเปตน้ำหมักที่เจือจางแล้วปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

(2) เติม 1% DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน

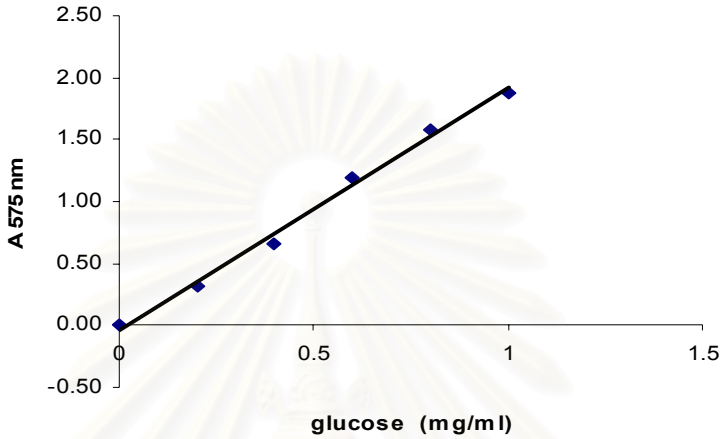
(3) นำไปต้มบน Water bath ที่มีน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นยกลงมาวางในอ่างน้ำเย็นเพื่อให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

(4) เมื่อเย็นแล้วเติม 40% Potassium sodium tartate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน

(5) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในกราฟมาตรฐานที่ใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน แล้วคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (% w/v)

<u>2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน</u>

เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำตามวิธีในข้อ 2 (1-4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของกลูโคส ดังภาพที่ 28



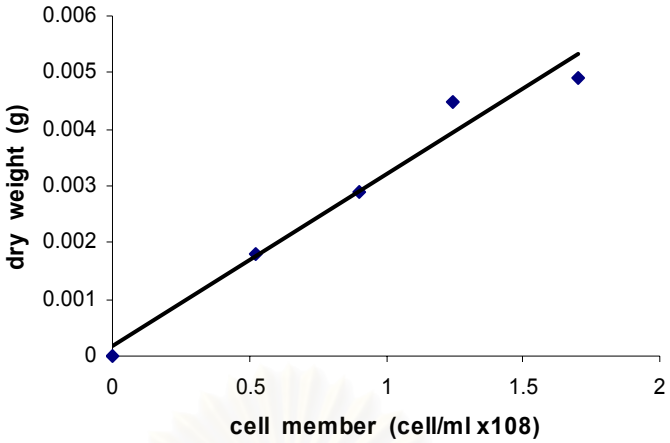
ภาพที่ 29 กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน

3.การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์ยีสต์

(1) เจือจางเซลล์ยีสต์เข้มข้นด้วย Normal saline เข้มข้น 0.85% ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ต่าง ๆ กัน นับจำนวนเซลล์ในแต่ละความเข้มข้นโดยใช้ heamacytometer

(2) ปิเปตเซลล์ในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ที่ชั่งน้ำหนักแห้งไว้ แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปล่อยให้เย็นใน dessicator ชั่งน้ำหนักแห้ง เมื่อหักลบน้ำหนักกระดาษกรองออกแล้ว น้ำหนักที่ได้คือน้ำหนักเซลล์ยีสต์

(3) นำค่าน้ำหนักที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเลล์และความเข้มข้นของเซลล์ (จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร) ดังภาพที่ 29



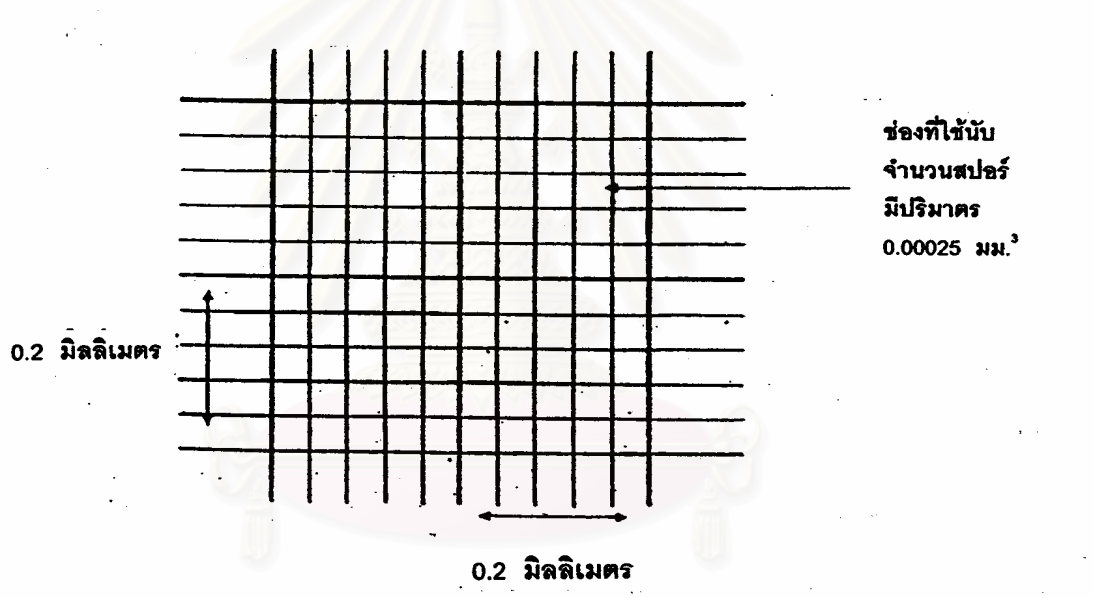
ภาพที่ 30 กราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้งของยีสต์ *K. thermotolerans* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร YMB

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

1. การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยวิธี Direct Microscopic Count โดยใช้ Haemacytometer

Haemacytometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือด แต่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการนับสปอร์ของราหรือจำนวนเซลล์จุลินทรีพย์ได้ Haemacytometer เป็น สไลด์มีช่องแบ่งไว้เป็นตาราง เมื่อปิดด้วย cover glass ซึ่งใช้เฉพาะกับอุปกรณ์นี้จะทำให้มีความลึกระหว่างตัวสไลด์กับ cover glass ทำให้บรรจุของเหลวซึ่งมีตัวอย่างที่ต้องการนับจำนวนไว้ได้ ขีดแบ่งจะแบ่งออกเป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัส 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2 × 0.2 ตารางมิลลิเมตร ซึ่งภายในแต่ละช่องใหญ่จะแบ่งย่อยออกเป็น 16 ช่องเล็ก แต่ละช่องมีขนาด 0.05 × 0.05 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นเมื่อปิดทับสไลด์ด้วย cover glass ซึ่งใช้เฉพาะกับอุปกรณ์นี้ ของเหลวที่บรรจุอยู่จึงมีปริมาตรเท่ากับ 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร



ในการนับจำนวนเซลล์ควรเจือจางเซลล์ให้มีปริมาณที่สามารถนับได้สะดวกและแม่นยำไม่เจือจางหรือหนาเกินจนเกินไป ในการนับให้หยดน้ำตัวอย่างที่ต้องการนับจำนวนเซลล์ลงบน Haemacytometer แล้วปิดทับด้วย cover glass จากนั้นนำไปตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถ้านับจากช่องใหญ่ควรนับอย่างน้อย 5 ช่อง

วิธีการคำนวณ

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก)		=	0.1	ลูกลาศก์มิลลิเมตร
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องใหญ่		=	X	เซลล์
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก		=	Y	เซลล์
นั่นคือ	X	=	16Y	เซลล์

ดังนั้น

ใน 0.1 ลบ.มม.มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด $X \times 25$ หรือ $Y \times 16 \times 25$ เซลล์

ใน 1.0 ลบ.มม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด $X \times 25 \times 10$ หรือ $Y \times 16 \times 25 \times 10$ เซลล์

ใน 1 ลบ.ซม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด $X \times 25 \times 10 \times 1000$ หรือ $Y \times 16 \times 25 \times 10 \times 1000$ เซลล์

หรือเท่ากับ $X \times 25 \times 10^4$ หรือ $4Y \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิเมตร

2. การคำนวณหาปริมาณแอลกอฮอล์

นำค่า area ที่ได้จากการวัดแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง gas liquid chromatograph ไปคำนวณหาค่าปริมาณของแอลกอฮอล์ จากกราฟมาตราฐาน (รูปที่ 24) ผลที่ได้มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ นั่นคือ มีปริมาณแอลกอฮอล์ X กรัม ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร หรือถ้าต้องการคิดให้มีหน่วย กรัมแอลกอฮอล์ต่อกรัมสับสเตรท (ก./ก.)

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

3. การคำนวณ % Conversion

คำนวณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ให้เป็นความหนาแน่น โดยเทียบกับ absolute alcohol แล้วคิดเทียบต่อ 1 กรัมสับสเตรท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ช

ตารางสถิติ

1=Leaves-Srilangka-10, 2=Soil-Srilangka-1, 3=Leaves-Songkla-1, 4=Soil-Songkla-1, 5=Leaves-Surathanee-14, 6=Soil-Surathanee-18

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Isolate		N	Subset for alpha = .05			
			d	c	b	a
Duncan	5	9	0.0296			
	3	9	0.0398			
	2	9		0.0894		
	6	9		0.0910		
	1	9			0.1187	
	4	9				0.2447
Sig.			0.3859	0.8946	1.0000	1.0000

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ endoglucanase ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Isolate		N	Subset for alpha = .05			
			d	c	b	a
Duncan	5	9	0.2131			
	3	9		0.5796		
	6	9		0.6430		
	2	9		0.6554		
	4	9		0.7790	0.7790	
	1	9				1.3236
Sig.			1.0000	0.1551	0.1309	1.0000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ β-glucosidase ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Isolate	N	Subset for alpha = .05		
		c	b	a
Duncan 3	9	0.0000		
6	9	0.0000		
1	9	0.0026		
2	9		0.0726	
4	9			0.1252
5	9			0.1337
Sig.		0.8538	1.0000	0.5284

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase ที่อุณหภูมิ 30-35-40 องศาเซลเซียส

Isolate	N	Subset for alpha = .05		
		c	b	a
Duncan 2	9	0.0460		
3	9		0.1101	
1	9			0.2447
Sig.		1.0000	1.0000	1.0000

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ endoglucanase ที่อุณหภูมิ 30-35-40 องศาเซลเซียส

Isolate	N	Subset for alpha = .05	
		b	a
Duncan 2	9	0.7600	
1	9	0.7790	
3	9		1.2494
Sig.		0.9049	1.0000

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ β-glucosidase ที่อุณหภูมิ 30-35-40 องศาเซลเซียส

Isolate	N	Subset for alpha = .05	
		b	a
Duncan 1	9	0.1252	
2	9	0.2977	
3	9		0.5788
Sig.		0.1519	1.0000

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase ที่ pH 4-5-6-7

Isolate	N	Subset for alpha = .05	
		b	a
Duncan 3	9	1.1670	
4	9	1.1968	
1	9	1.2557	
2	9		1.6575
Sig.		0.4764	1.0000

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ endoglucanase ที่ pH 4-5-6-7

Isolate	N	Subset for alpha = .05	
		b	a
Duncan 3	9	1.1670	
4	9	1.1968	
1	9	1.2557	
2	9		1.6575
Sig.		0.4764	1.0000

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ β glucosidase ที่ pH 4-5-6-7

Isolate	N	Subset for alpha = .05	
		b	a
Duncan 4	9	0.1442	
2	9		0.1983
3	9		0.1984
1	9		0.2050
Sig.		1.0000	0.7700

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ exoglucanase ที่ 3-5-7-9-11-13 วัน

Isolate	N	Subset for alpha = .05		
		c	b	a
Duncan 2	9	0.0693		
6	9	0.0812	0.0812	
5	9	0.0827	0.0827	
4	9		0.0955	0.0955
1	9			0.1015
3	9			0.1101
Sig.		0.1387	0.1146	0.1091

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ endoglucanase ที่ 3-5-7-9-11-13 วัน

Isolate	N	Subset for alpha = .05			
		d	c	b	a
Duncan 1	9	0.7790			
2	9		1.5915		
6	9		1.6202		
3	9		1.6575	1.6575	
4	9			1.8585	1.8585
5	9				1.8916
Sig.		1	0.5681	0.0678	0.7596

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของ β-glucosidase ที่ 3-5-7-9-11-13 วัน

Isolate	N	Subset for alpha = .05			
		d	c	b	a
Duncan 1	9	0.1573			
3	9	0.1983			
2	9		0.3474		
4	9			0.6533	
6	9			0.6597	
5	9				0.7888
Sig.		0.2708	1.0000	0.8617	1.0000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอรุณวรรณ นุชพ่วง เกิดเมื่อวันที่ 13 พฤษภาคม 2522 ที่จังหวัดพิษณุโลก สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในปีการศึกษา 2543 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2544 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2547

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย