การผลิตเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

นางสาวสุนันทา ชูแก้ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ETHANOL PRODUCTION BY WHITE-ROT FUNGI

Miss Sununta Chukaw

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต
โดย	นางสาวสุนันทา ชูแก้ว
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ศิริลักษณ์ ธีระดากร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. ศิริลักษณ์ ธีระดากร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุนันทา ชูแก้ว: การผลิตเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต (ETHANOL PRODUCTION BY WHITE-ROT FUNGI) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ อ. ที่ปรึกษาร่วม: ดร. ศิริลักษณ์ ธีระดากร; 99 หน้า.

การคัดเลือกเชื้อรากลุ่มไวต์รอตจำนวน 6 สายพันธ์ คือ *Coriolus versicolor, Flammulina velutipes, Pleurotus cornucopiae, Pleurotus ostreatus, Pleurotus sajor-caju,* และ *Schizophyllum commune* ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการผลิตเอทานอล และมีเอนไซม์ในการย่อยสลายองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร พบว่า *C. versicolor* เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสมีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด 2.583 U/mg protein การผลิตเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยสลายลิกนิน ได้แก่ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส พบว่า *F. velutipes* ให้ค่าเอนไซม์แอคติวิตีสูงที่สุดคือ $8.55x10^{-2}$U/ml, $9.86x10^{-2}$U/ml และ $4.09x10^{-2}$U/ml ตามลำดับรองลงมาคือ *C. versicolor* ให้ค่าเอนไซม์แอคติวิตี $9.11x10^{-2}$U/ml, $2.41x10^{-2}$U/ml และ $1.75x10^{-2}$U/ml ตามลำดับ การผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งได้แก่ เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดส พบว่าเชื้อ *S. commune* ให้ค่าแอคติวิตีสูงที่สุด คือ $8.38x10^{-2}$U/ml, $25.39x10^{-2}$U/ml และ$17.29x10^{-2}$U/ml ตามลำดับ และรองลงมาคือ *C. versicolor* ให้ค่าเอนไซม์แอคติวิตี $5.65x10^{-2}$U/ml, $23.63x10^{-2}$U/ml และ $13.60 x10^{-2}$U/ml ตามลำดับ จากนั้นเลือก *C. versicolor* ซึ่งมีค่าแอคติวิตีของแต่ละกลุ่มเอนไซม์ดีที่สุด นำมาหมักในระดับขวดเขย่าเพื่อผลิตเอทานอล โดยใช้กลูโคสและเซลลูโลสเป็นสับสเตรต พบว่าในการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นเอทานอล 2.193 กรัมต่อลิตร เมื่อเปลี่ยนสับสเตรตเป็นเซลลูโลส 2 ชนิดที่มีคุณสมบัติในการละลายต่างกันคือ microcrystalline cellulose (Avicel) ซึ่งเป็นเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ต่ำ และ carboxymethyl cellulose (CMC) ซึ่งเป็นเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ดี ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร *C. versicolor* สามารถผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้น 0.634 กรัมต่อลิตร และ 0.322 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา..... เทคโนโลยีชีวภาพ... ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4672454823: MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORDS: WHITE-ROT FUNGI/ LIGNOCELLULOLYTIC ENZYME/ CELLULASE
SUNUNTA CHUKAW: ETHANOL PRODUCTION BY WHITE-ROT FUNGI. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. SURAPONG NAVANKASUTTUSAS, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: SIRILUK TEERADAKORN, Ph.D, 99 pp.

Six strains of white-rot fungi were selected for assessing their ethanol production via alcohol dehydrogenase activity, and their capabilities of degrading agriculture residues. They were *Coriolus versicolor, Flammulina velutipes, Pleurotus cornucopiae, Pleurotus ostreatus, Pleurotus sajor-caju* and *Schizophyllum commune*. *C. versicolor* showed highest alcohol dehydrogenase activity of 2.583 U/mg protein. Determination of lignocellulolytic enzyme activities: lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase, *F. velutipes* gave highest enzyme activities of $8.55x10^{-2}$ U/ml, $9.86x10^{-2}$ U/ml and $4.09x10^{-2}$ U/ml respectively. Lignocellulolytic enzyme activities of *C. versicolor* were $9.11x10^{-2}$ U/ml, $2.41x10^{-2}$ U/ml and $1.75x10^{-2}$ U/ml, respectively. For cellulase enzyme activities: exoglucanase, endoglucanase and beta-glucosidase, *S. commune* yielded highest activities of $8.38x10^{-2}$ U/ml, $25.39x10^{-2}$ U/ml and $17.29x10^{-2}$ U/ml, respectively. Meanwhile, *C. versicolor* yielded activities of $5.65x10^{-2}$ U/ml, $23.63x10^{-2}$ U/ml and $13.60x10^{-2}$ U/ml respectively. *C. versicolor* was selected for further studies based on its moderately high activities of alcohol dehydrogenase production, lignocellulolytic enzyme and cellulase enzyme. It was cultivated in a shake flask. Comparative study of simple sugar and complex oligosaccharides as substrate showed that the culture yielded ethanol of 2.193 gl^{-1} when using 30 gl^{-1} glucose. The use of cellulose at 10 gl^{-1}: microcrystalline cellulose (Avicel), low solubility cellulose; and carboxymethyl cellulose (CMC), soluble cellulose; yielded ethanol concentration at 0.634 and 0.322 gl^{-1}, respectively.

Field of study.....Biotechnology.....Student's signature...Sununta Chukaw.....
Academic year.....2006.....Advisor's signature...Surapong Navankasuttusas.....
Co-advisor's signature...Siriluk Teeradakorn.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาในหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต ซึ่งสำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจาก ผศ. ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และ ดร. ศิริลักษณ์ ธีระดากร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำและร่วมตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ จึงขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. อมร เพชรสม ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์ และ รศ. ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณะผู้บริหารสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมี และขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ นักวิจัย เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ห้องช่าง ประจำสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆในการวิจัย และขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ที่ให้ความช่วยเหลือในการติดต่อด้านต่างๆ

ขอขอบคุณพี่ๆภาควิชาพฤกษศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการวิเคราะห์ต่างๆในงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆเพื่อนๆและน้องๆทุกคนในห้องปฏิบัติการตลอดจนเพื่อนๆภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาน้องชายและญาติทุกคนที่ให้กำลังใจ เข้าใจผู้วิจัยและให้การสนับสนุน ช่วยเหลือในทุกๆด้านตลอดมา ทำให้งานวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……..ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……..จ
กิตติกรรมประกาศ……..ฉ
สารบัญ……ช
สารบัญตาราง……..ฌ
สารบัญภาพ……..ฎ
บทที่
1. บทนำ
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย……3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย……3
2. ตรวจเอกสาร
2.1 เอทานอล……4
2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล……4
2.3 องค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร……6
2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก……10
2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร...14
2.6 การผลิตเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต……18
3. วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย
3.1 วัสดุอุปกรณ์……21
3.2 เคมีภัณฑ์……22
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย……24
4. ผลการทดลอง
4.1 การคัดเลือกและการเจริญของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตที่ใช้ในงานวิจัย……29
4.2 การผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต……32

หน้า

4.3 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของลิกนิน
โดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต……..……...…..…33
4.4 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของเซลลูโลส
โดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต……..……...…38
4.5 การผลิตเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต……...…..46
5. วิจารณ์ผลการทดลอง
5.1 การคัดเลือกและการเจริญของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตที่ใช้ในงานวิจัย……..…65
5.2 การผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต……..…65
5.3 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของลิกนิน
โดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต……..……66
5.4 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของเซลลูโลส
โดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต……..……...……...68
5.5 การผลิตเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต..……....69
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ
6.1 สรุปผลการทดลอง……..……73
6.2 ข้อเสนอแนะ……..……75
รายการอ้างอิง……..……...…76
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก……..85
ภาคผนวก ข……..88
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……..……99

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. สายพันธุ์เชื้อรากลุ่มไวต์รอตที่ใช้ในการทดลอง.....25
2. การเจริญของเชื้อรากลุ่มไวต์รอต 6 สายพันธุ์.....30
3. น้ำหนักเส้นใยแห้งเฉลี่ยสูงสุดของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์.....31
4. ค่า specific activity ของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส
ที่ได้จากเชื้อรากลุ่มไวต์รอต 6 สายพันธุ์.....32
5. ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส
ของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์.....34
6. ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
ของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์.....35
7. ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคส
ของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์.....37
8. ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส
ของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์.....39
9. ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส
ของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์.....42
10. ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส
ของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์.....44
11. ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่และการเจริญ
ของเชื้อที่ได้จากการใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร
20 กรัมต่อลิตรและ 30 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*.....47
12. ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*.....51
13. ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*.....52

ตารางที่ หน้า

14. ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*……..……54
15. ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*…….56
16. ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*…..……..58
17. ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*……..……...60
18. ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*…….……...62
19. ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*……..……..63

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. องค์ประกอบของเนื้อไม้……..…….....…5
2. โครงสร้างของเซลลูโลส……..……..……..6
3. โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส……..……..……..7
4. โครงสร้างของลิกนินและหน่วยย่อยของลิกนิน……..……..……9
5. กระบวนการเมตาบอลิซึ่มการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็น pyruvate……..……..11
6. การทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส……..……..…..12
7. การทำงานของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
และแลคเคส……..……..……..……15
8. สมมติฐานการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส……..…15
9. การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส ……..…17
10. กระบวนการเมตาบอลิซึ่มของการผลิตเอทานอล……19
11. ลักษณะของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA……..…....29
12. การเจริญของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ ในอาหาร PDB ที่ระยะเวลาต่างๆ……..31
13. ค่า specific activity ของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์……..33
14. ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรากลุ่มไวต์รอต
แต่ละสายพันธุ์.....……..34
15. ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรากลุ่มไวต์รอต
แต่ละสายพันธุ์……..36
16. ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อรากลุ่มไวต์รอต
แต่ละสายพันธุ์……..…….....37
17. ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส……38
18. ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสจากเชื้อรากลุ่มไวต์รอต
แต่ละสายพันธุ์……..40
19. ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากเชื้อรากลุ่มไวต์รอต
แต่ละสายพันธุ์……..43

ภาพที่ หน้า

20. ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสจากเชื้อรากลุ่มไวต์รอต
แต่ละสายพันธุ์.....45
21. ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดส.....45
22. ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่และการเจริญของเชื้อ
ที่ได้จากการใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร
20 กรัมต่อลิตรและ 30 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*.....48
23. ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตรและมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor* 51
24. ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*.....53
25. ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C.versicolor*..... 54
26. ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*..... 57
27. ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*.....58
28. ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor* 61
29. ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*.....62

ภาพที่ หน้า

30. ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรต
ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของ
สารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*.....64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ดังนั้นการผลิตเอทานอลโดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบจึงเป็นสิ่งที่มีการให้ความสนใจ ทั้งนี้เพราะมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอยู่เป็นจำนวนมาก โดยวัตถุดิบประเภทนี้เป็นผลิตผลพลอยได้จากการทำเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมเกษตรซึ่งได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด และของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษเป็นต้น (กล้าณรงค์และคณะ, 2544) โดยองค์ประกอบที่สำคัญของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในอัตราส่วนโดยประมาณ 4:3:3 ตามลำดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ชนิดของพืช สรีรวิทยาของพืช อายุของพืช ตลอดจนถึงสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตและวิธีการวิเคราะห์ (Tangnu, 1982)

การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจะอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ในการหมัก ซึ่งโดยทั่วไปนั้นวัตถุดิบที่นำมาใช้จะเป็นวัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาล เชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ก็ได้แก่เชื้อยีสต์ ซึ่งสามารถหมักได้ในภาวะไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) ยีสต์ที่นำมาผลิตเอทานอลมีหลายชนิดด้วยกันที่นิยมใช้กันคือยีสต์ในจีนัส *Saccharomyces* ทั้งนี้เนื่องจากเจริญได้รวดเร็ว มีความคงทนต่อแอลกอฮอล์ได้สูง และให้ปริมาณแอลกอฮอล์ในปริมาณสูง (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

การนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์นั้นต้องผ่านหลายขั้นตอนได้แก่การปรับสภาพ (pretreatment) การย่อย (hydrolysis) และการหมัก (fermentation) ทั้งนี้เนื่องจากเหตุผลหลักคือ ยีสต์สามารถใช้ได้เฉพาะน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม เช่นน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอลเท่านั้นในขณะที่วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมีองค์ประกอบเป็นลิกนินซึ่งเป็นส่วนที่ไม่เป็นที่ต้องการ จำเป็นต้องมีการกำจัดทิ้ง และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรก็ยังมีเฮมิเซลลูโลสซึ่งประกอบไปด้วยโพลิเมอร์หลายชนิดด้วยกัน โดยหลักๆคือไซแลนมีหน่วยย่อยคือน้ำตาลไซโลส ซึ่งเป็นน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม (pentoses) ซึ่งยีสต์ *S. cerevisiae* ไม่สามารถนำไปใช้ได้ แต่ก็ยังพบว่ามีเชื้อยีสต์บางตัวที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ ได้แก่ *Pichia stipitis, Candida shehatae* และ *Pachysolen tannophilus* โดยใช้ pentose metabolism pathway แต่ได้เอทานอลในปริมาณที่น้อย (Hahn-Hagerdal et al., 1994) ดังนั้นกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อยีสต์จึงต้องผ่านขั้นตอนหลายขั้นตอนซึ่งค่อนข้างยุ่งยากเพราะต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆด้วย วิธีที่ใช้มากได้แก่กระบวนการ simultaneous saccharification and fermentation (Mohagheghi et al.,

1992) และการหมักแบบใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน (mixed culture or co-culture) (Palnitkar and Lachke, 1990)

จากข้อจำกัดในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ จึงเริ่มมีการศึกษาถึงความสามารถของเชื้อสายพันธุ์อื่นในการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เชื้อราเป็นกลุ่มที่มีการให้ความสนใจ ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะตัวคือมีกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้ ซึ่งได้แก่กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินที่ประกอบด้วยเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส และกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสประกอบด้วยเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนสและบีตา-กลูโคซิเดส ในการย่อยองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เชื้อแต่ละชนิดเลือกที่จะย่อยองค์ประกอบต่างๆกันโดยบางเชื้อเลือกย่อยเฉพาะเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสก่อนแล้วย่อยลิกนินเป็นลำดับสุดท้าย แต่บางเชื้อเลือกที่จะย่อยส่วนต่างๆไปพร้อมกัน (Alexopoulos and Mims, 1979) วิธีการย่อยสลายด้วยใช้เอนไซม์มีข้อดีคือแม้ปริมาณของเอนไซม์จะมีน้อย แต่ก็สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเอนไซม์จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเมื่อทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาแล้ว นอกจากนี้เอนไซม์ยังเป็นตัวเร่งที่มีความจำเพาะและเร่งปฏิกิริยาโดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูง (เบญจวรรณ, 2545) ในการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยเชื้อรานั้น พบว่าเชื้อราที่ใช้ในกระบวนการหมักนั้น จำเป็นต้องมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสได้ (Rudge and Bickerstaff, 1986) จะเห็นได้ว่าเชื้อรามีข้อได้เปรียบกว่าเชื้อยีสต์คือในขณะที่เชื้อยีสต์ต้องใช้หลายขั้นตอนกว่าจะผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ได้ เชื้อราสามารถใช้ขั้นตอนที่น้อยกว่า จากคุณสมบัติของเชื้อดังที่กล่าวมาสามารถใช้เชื้อราเพียงตัวเดียวก็สามารถมีกลุ่มเอนไซม์ที่ทั้งย่อยองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลิตเอทานอลได้ในเวลาเดียวกันและหมักได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Okamura-Matsui et al., 2003)

เชื้อรากลุ่มที่จะนำมาศึกษาและใช้ในการผลิตเอทานอลคือเชื้อรากลุ่มไวต์รอต (white-rot fungi) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเห็ดราที่บริโภคได้ (edible mushroom) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยที่ใช้เชื้อรากลุ่มไวต์รอตเพื่อประโยชน์ในด้านสุขภาพ โดยพบว่าเชื้อรากลุ่มนี้สามารถผลิตสารหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ ไฟเบอร์ โปรตีน และ วิตามิน เช่น thiamine (B_1) และ riboflavin (B_2) สารทางการแพทย์เช่น β-D-glucan ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง โดยเป็นตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Takaku et al., 2001; Cohen et al., 2002; Ker et al., 2005) และมีสาร anti-thrombin ที่ช่วยในการรักษาโรค thrombin ซึ่งเป็นลักษณะของการเกิดการอุดตันของลิ่มเลือดในหลอดเลือดซึ่งอาจทำให้เสียชีวิตได้ (Khan and Gowda, 2003)

งานวิจัยนี้ศึกษาแนวทางการพัฒนาการคัดเลือกเชื้อรากลุ่มไวต์รอตเพื่อผลิตเอทานอล

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษากลุ่มเอนไซม์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจากเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

1.2.2 ศึกษาความสามารถของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตในการผลิตเอทานอล

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้สายพันธุ์เชื้อรากลุ่มไวต์รอตที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลและมีเอนไซม์ย่อยสลายองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

1.3.2 ทราบถึงการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอตเพื่อจะได้นำข้อมูลไปประกอบกับการปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

1.3.3 ทราบแนวทางพื้นฐานถึงความสามารถในการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อรากลุ่มไวต์รอตโดยสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาหาภาวะที่เหมาะสมและศึกษาปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการผลิตต่อไป

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 คัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลและมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

1.4.2 ศึกษาการใช้เชื้อรากลุ่มไวต์รอตในการผลิตเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์โดยเป็นตัวแทนของเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 เอทานอล

เอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้รับประทานได้โดยมีชื่อทางเคมีว่า เอทธิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) สูตรคือ C_2H_5OH เอทานอลเกิดจากกระบวนการหมักของพืช หรือเศษซากพืชเพื่อเปลี่ยนแป้งจากพืชให้เป็นน้ำตาล จากนั้นจากน้ำตาลก็เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ (สำนักงานโครงการเอทานอลแห่งประเทศไทย, 2544) สำหรับในประเทศไทยปริมาณเอทานอลที่ผลิตประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์จะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการทำสุราและผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ โดยหลังกระบวนการหมักมักจะนำแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้มาบ่มหรือเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลาหนึ่งเพื่อให้ได้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีกลิ่นและรสที่ดีขึ้น และนอกจากนี้ยังสามารถนำมากลั่นต่อเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ที่มีเปอร์เซนต์สูงขึ้นและนำมาผลิตเป็นเหล้าชนิดต่างๆอีก เช่น วิสกี้ บรั่นดี วอดก้า จิน รัม และอื่นๆ ส่วนอีกประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตจะถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่นใช้ในอุตสาหกรรมสีโดยใช้ในการผลิตเป็นสีและน้ำมันชักเงา หรือในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางโดยใช้เป็นตัวทำละลาย น้ำยาฆ่าเชื้อ และใช้เป็นเชื้อเพลิง

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

ในการผลิตเอทานอลโดยวิธีการหมัก วัตถุดิบที่นำมาใช้มีหลายประเภทด้วยกัน ได้แก่ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้ง สารประกอบเซลลูโลส และผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น whey กากผลไม้จากโรงงานผลไม้กระป๋อง และน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ (sulfite liquor) เป็นต้น

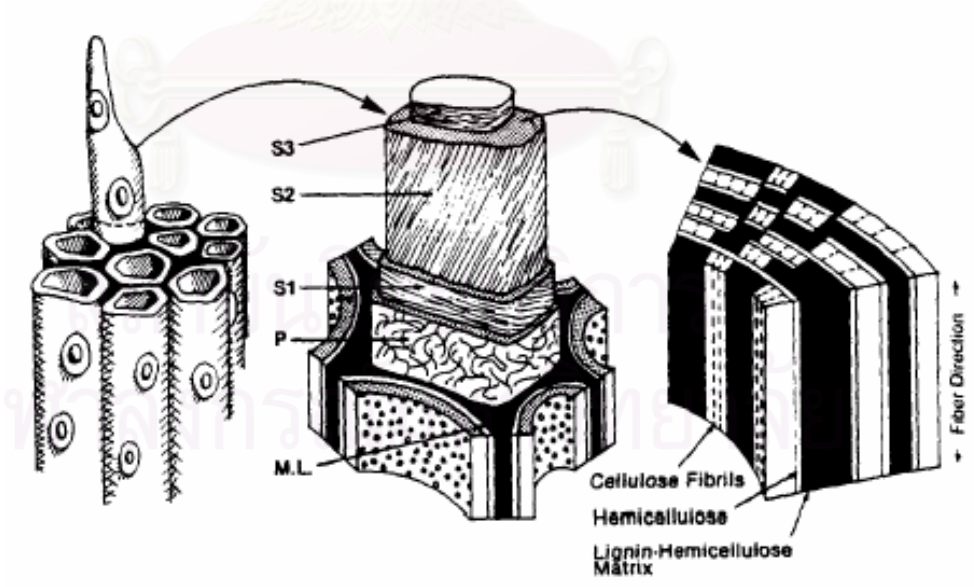
วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ น้ำตาลจากอ้อย sugar beet และกากน้ำตาล (molasses) ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมโดยเฉพาะกากน้ำตาล เนื่องจากสามารถนำเข้าสู่กระบวนการหมักได้โดยตรง ขั้นตอนการผลิตไม่ยุ่งยาก และให้ผลผลิตสูง

วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ข้าวโพด มันฝรั่ง มันสำปะหลัง ข้าวฟ่าง และ ธัญญพืชต่างๆ เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของแป้ง ประกอบด้วย อะไมโลส และ อะไมโลเปคติน ดังนั้นจึงต้องมีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ อัลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อนแล้วจึงนำไปหมักเป็นเอทานอลต่อไป (วราวุฒิ, 2529) ซึ่งการใช้แป้งเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลอาจมีผลกระทบต่อปริมาณความต้องการวัตถุดิบและราคาสินค้าเกษตรที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบ เนื่องจากวัตถุดิบประเภทแป้งสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวาง

วัตถุดิบประเภทสารประกอบเซลลูโลส ได้แก่ เศษไม้จากอุตสาหกรรมแปรรูปไม้ และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต่างๆเช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด ซึ่งมีอยู่ในปริมาณมาก หาได้ง่าย และมีราคาถูก แต่การใช้วัตถุดิบประเภทนี้มาใช้ประโยชน์ยังอยู่ในวงจำกัด ปัจจุบันได้มีการสนใจนำวัตถุดิบประเภทนี้มาใช้ โดยมีการศึกษาองค์ประกอบชนิดต่างๆของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการใช้งาน (Lee, 1997) ในการนำมาใช้ผลิตเป็นพลังงานเชื้อเพลิงและสารเคมี (Saddler, 1992) นอกจากนี้การมีเซลลูโลสอยู่จำนวนมากที่ไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์อาจก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมด้วย (Arauji and Sauza' D, 1981)

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรือกลุ่มลิกโนเซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญ โดยส่วนใหญ่มักจะพบได้ในพืชที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ซึ่งมักจะมีโครงสร้างผลึกที่ซับซ้อนและแข็งแรง องค์ประกอบหลักๆได้แก่ กลุ่มของโพลิแซคคาไรด์ที่ประกอบไปด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (ภาพที่ 1) ส่วนของโพลิแซคคาไรด์จะได้จากไมโครไฟเบอร์ (microfiber) ซึ่งจะรวมตัวกันอยู่อย่างหนาแน่นในชั้นของลิกนิน สามารถที่จะช่วยป้องกันการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เข้ามาย่อย (hydrolysis) ทำให้โครงสร้างสามารถคงรูปได้ (Fengel, 1971)



ภาพที่ 1. องค์ประกอบของเนื้อไม้ (Kirk and Cullen, 1998)

(M.L: middle lamella , P: primary wall, S1-S3: secondary cell wall layer)

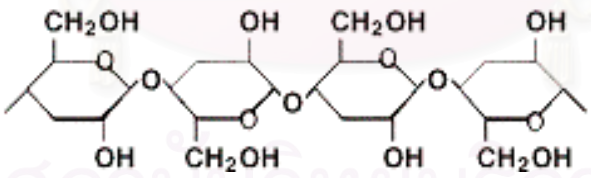
2.3 องค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

2.3.1 เซลลูโลส

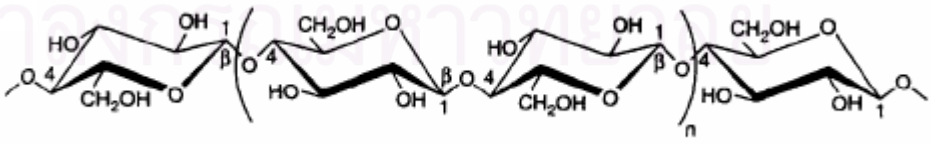
พืชที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะพบเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบมากที่สุด โดยจะไม่อยู่ในรูปอิสระ แต่มักจะอยู่รวมกับองค์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส กัม (gum) แพนโตแซน (pentosan) แทนนิน (tannin) ไขมัน และสารเกิดสี (colouring matter) เป็นต้น (Cowling and Kirk, 1976)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตชนิดสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) ที่อยู่ในรูปบีต้า-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-glucopyranose) หลายโมเลกุลมาเชื่อมต่อกันกลายเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ โดยอาศัยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ของโมเลกุลถัดไป (ภาพที่ 2) และเนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, OH) ของคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 อยู่ในตำแหน่งบีต้า (beta) จึงเรียกพันธะนี้ว่าพันธะบีต้า-1,4 ไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic bond) ขนาดของโมเลกุลเซลลูโลสจะนิยามอยู่ในรูปของ Degree of polymerization (DP) ซึ่งบอกถึงจำนวนกลูโคสในสายโพลิเมอร์ (Eriksson et al., 1990) โดยทั่วไปสายของเซลลูโลสจะประกอบด้วย กลูโคส 8,000-12,000 หน่วย (Saha and Bothast, 1997) และอาจมากถึง 14,000 หน่วย ในพืชชั้นสูงบางชนิด (Eriksson et al., 1990) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้าง (conformation)

ก.)



ข.)



ภาพที่ 2. โครงสร้างของเซลลูโลส

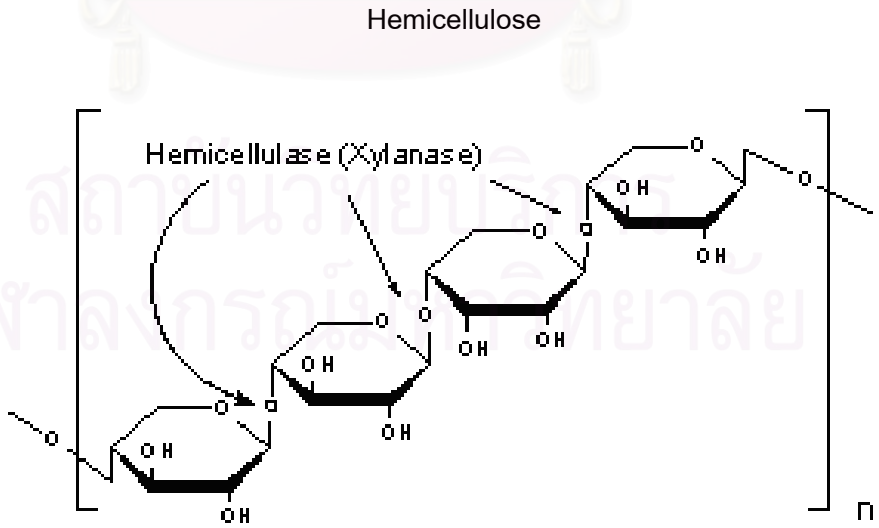
ก.) ลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส

ข.) ลักษณะการจัดเรียงตัวแบบเก้าอี้ของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส (chair form)

ในการจัดเรียงตัวของหน่วยย่อยที่เชื่อมต่อกัน จะอยู่ในลักษณะรูปเก้าอี้ (chair form) แต่ละสายของเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) การเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงไม่มีแขนงย่อยโดยบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนหนาแน่นจะมีรูปแบบที่เป็น crystalline ซึ่งยากต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ส่วนบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนหนาแน่นน้อยจะเป็น amorphous และเนื่องจากมีการจัดเรียงตัวเป็นระเบียบจึงทำให้มีอุณหภูมิการหลอมตัวสูง และมีความสามารถในการละลายต่ำ

2.3.2 **เฮมิเซลลูโลส**

เฮมิเซลลูโลสเป็นอินทรีย์สารที่พบมากรองจากเซลลูโลส เป็นโพลิแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งคล้ายเซลลูโลส โดยเฮมิเซลลูโลสจะเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (ภาพที่ 3) (Robinson, 1977) โครงสร้างเป็นโพลิเมอร์สายตรงที่มีกิ่งก้านสาขา โดยประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดรวมกัน ส่วนที่เป็นสายตรงของเฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่จะเป็นหน่วยของไซโลส ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4 ไกลโคซิดิก ส่วนกิ่งก้านสาขาจะเป็นหน่วยของอะราบิโนส แพนโตส กลูโคส กาแลคโตส กรดกลูคูโรนิค และน้ำตาลเพนโตสชนิดอื่น (Bungay, 1981) โดยโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสสามารถที่จะถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าโครงสร้างเซลลูโลส (Brigham et al., 1996) ซึ่งทั้งชนิดและอัตราส่วนขององค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชนั้นๆ (Wiselogel et al., 1996)



ภาพที่ 3. โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

2.3.3 ลิกนิน

ลิกนินเป็นสารประกอบอะโรมาติกเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสามารถพบได้ทั่วไปในผนังเซลล์ของพืชรองลงมาจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โดยจะทำหน้าที่เสมือนตัวเชื่อมประสานเส้นใยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงของไม้ ลิกนินถูกสังเคราะห์โดยกระบวนการที่เรียกว่า ลิกนิฟิเคชั่น (lignification) โดยโมเลกุลของลิกนินจะแทรกอยู่ในช่องว่างระหว่าง cellulose fibrils และสายของเฮมิเซลลูโลส ลิกนินที่พบในส่วนของผนังเซลล์จะทำหน้าที่เสมือนเกราะป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ โดยโครงสร้างของลิกนินจะเป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) หรือที่เรียกว่า ฟีโนลิกโพลิเมอร์ (phenolic polymer) หน่วยย่อยของลิกนินสามารถแบ่งได้ 3 ชนิด ได้แก่ *p* – coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol (Winkelman, 1992) (ภาพที่ 4)

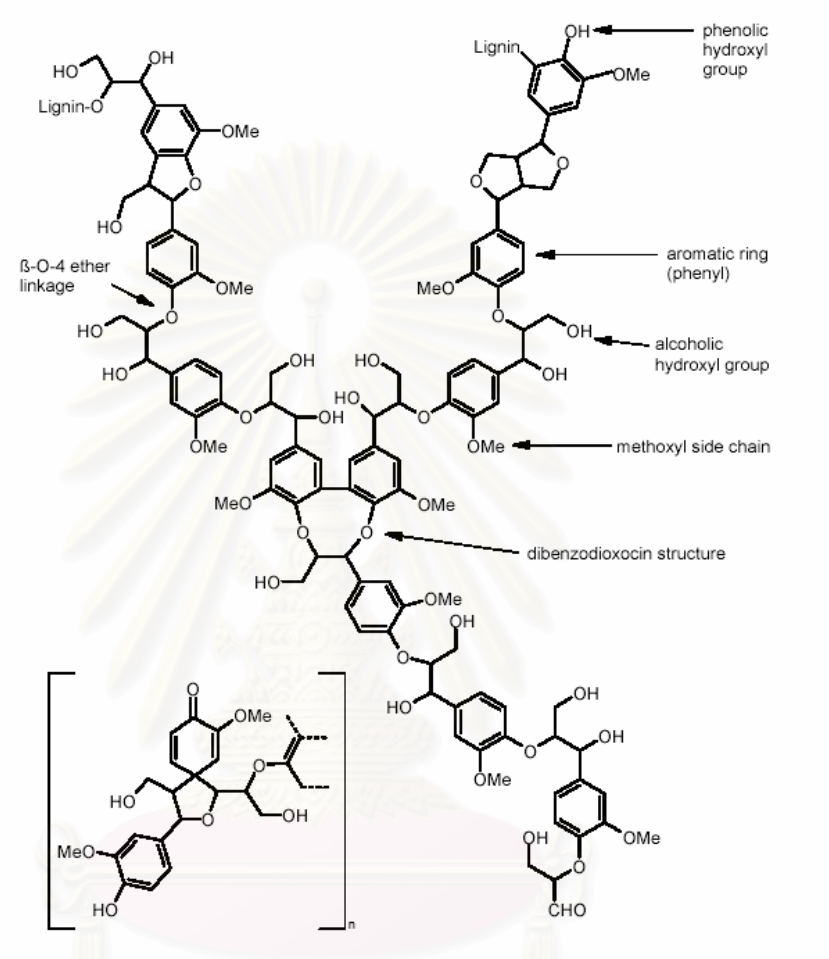
ลิกนินไม่มีคุณสมบัติทางการยืดหยุ่นและไม่ละลายน้ำ เพราะฉะนั้นจึงทำให้พืชที่มีลิกนินมากมีความแข็งแรง ทนทาน ซึ่งไม้แต่ละชนิดจะมีอัตราส่วนระหว่างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินไม่เท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่าพืชแต่ละชนิดหรือแม้แต่พืชชนิดเดียวกัน แต่มีอายุและการเจริญในสภาพที่แตกต่างกัน ก็มีผลทำให้มีลิกนินเป็นองค์ประกอบต่างกันด้วย

Lock (1969) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยป่านศรนารายณ์ พบว่าประกอบด้วย เซลลูโลส 62 เปอร์เซ็นต์ แพนโตแซน 16 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น 10 เปอร์เซ็นต์ ขี้ผึ้ง 2 เปอร์เซ็นต์ และ FAO รายงานว่า เส้นใยป่านศรนารายณ์มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ เซลลูโลส 78 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 10 เปอร์เซ็นต์ ลิกนินและองค์ประกอบอื่นๆ 8 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าป่านศรนารายณ์มีปริมาณเซลลูโลสสูงเพียงพอ ที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

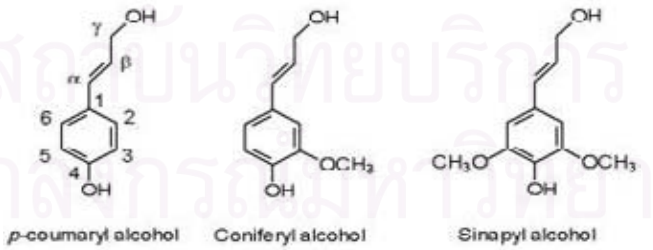
สันทนา (2539) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสโดยใช้กระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องซึ่งเป็นการรวมปฏิกิริยาการย่อยสลายและการหมักไว้เป็นขั้นตอนที่ต่อเนื่องในถังหมักเดียวกัน เมื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Acrophialophora sp.* และยีสต์ *Candida brassicae* โดยใช้เส้นใยป่านศรนารายณ์เป็นวัตถุดิบ พบว่าการใช้ปริมาณเอนไซม์ 25 เท่า โดยคำนวนจากจำนวนของน้ำหนักแห้งวัสดุหมัก ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้น $3x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ pH 5.0 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถให้ผลผลิตเอทานอลความเข้มข้นสูงสุด 9.125 กรัมต่อลิตร และศึกษาการเติมอาหารเสริม 2 ชนิด คือ casein peptone และ soy peptone ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า casein peptone ที่มีความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าความเข้มข้นเอทานอล 12.67 กรัมต่อลิตร และ soy peptone ที่ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความ

เข้มข้นเอทานอล 9.30 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่าวัสดุหมักที่ไม่มีการเติมอาหารเสริม 1.76 เท่าและ 1.29 เท่า ตามลำดับ

ก)



ข)



ภาพที่ 4. โครงสร้างของลิกนิน

ก.) โครงสร้างฟีโนลิกโพลิเมอร์ของลิกนิน (Brunow, 2001)

ข.) หน่วยย่อยของลิกนิน (Buswell and Odier, 1987)

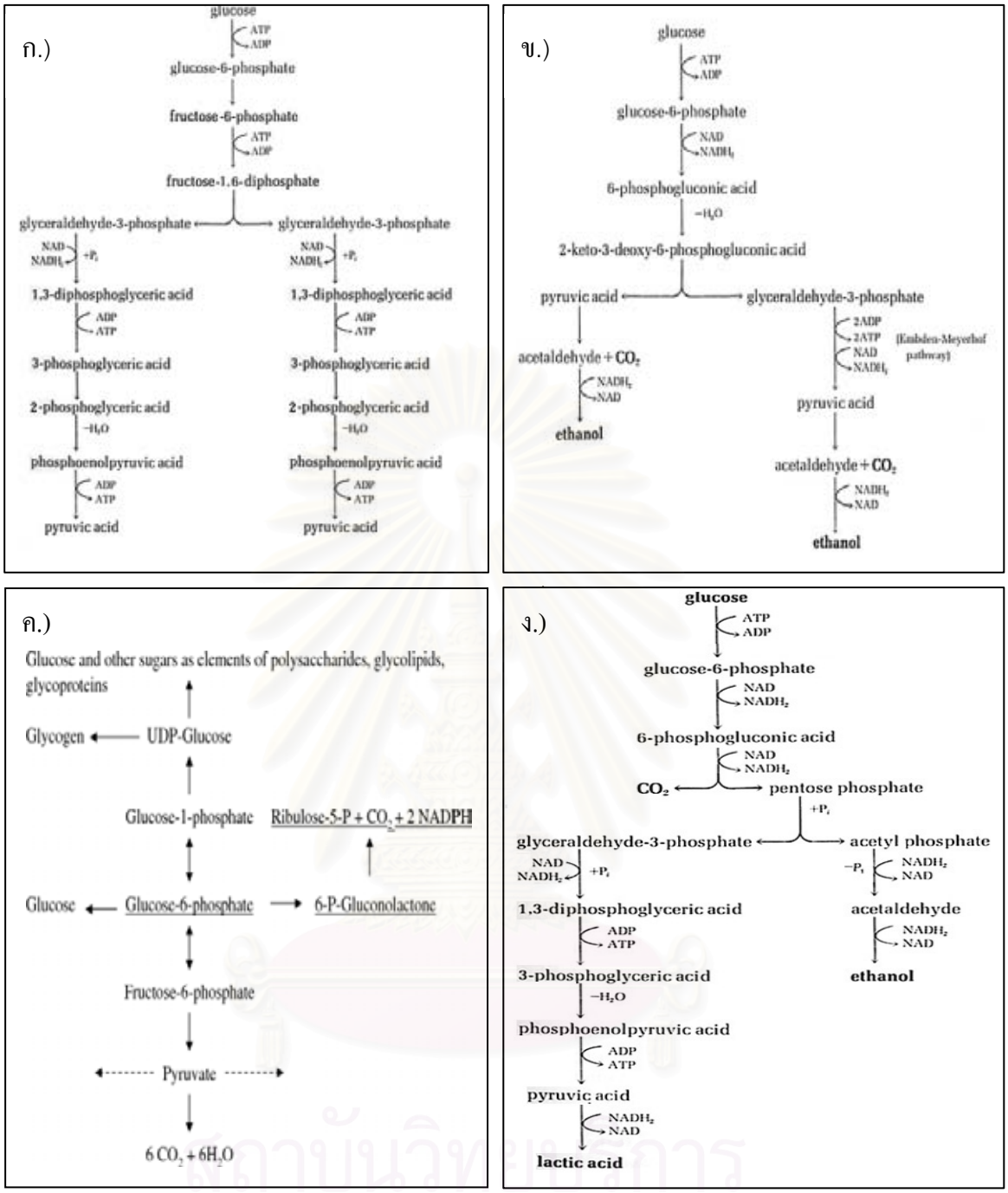
2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก

2.4.1 เชื้อยีสต์

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์คือเชื้อยีสต์ *Saccharomyces sp.* ซึ่งจัดเป็นราชนิดหนึ่ง อยู่ในชั้นแอสโคไมซีเตส (Class Ascomycetes) สายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการหมักได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*) (ยุทธพงษ์, 2540) เนื่องจากสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่สูง โดยเชื้อยีสต์สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) ได้ทั้งในรูปเชิงเดี่ยวและเชิงซ้อน เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส (fructose) น้ำตาลกาแลคโตส (galactose) น้ำตาลแมนโนส (mannose) น้ำตาลซูโครส (sucrose) และน้ำตาลแรฟฟิโนส (raffinose) เป็นต้น โดยในการหมักแอลกอฮอล์เป็นกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึมของเซลล์ยีสต์ โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสในการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์กับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) ซึ่งในขั้นตอนแรกกลูโคสจะเปลี่ยนแปลงไปตามวิถีไกลโคไลซีส (Glycolysis) หรือ Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP pathway) จนได้ pyruvate และจากนั้นก็จะเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ (Paturau, 1989)

ในขั้นตอนของการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็น pyruvate นั้น เชื้อกลุ่ม anaerobic microorganism พบว่าใช้ EMP pathway เชื้อกลุ่ม facultative aerobics จะใช้ EMP และ Hexose monophosphate pathway (HMP pathway) และ เชื้อ strict aerobics จะใช้เฉพาะ Entner-Doudoroff pathway (ED pathway)(ภาพที่ 5) หลังจากได้ไพรูเวทแล้วก็จะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวทดีคาร์บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase) เพื่อเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นอะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และเปลี่ยนเป็นเอทานอทโดยการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งมี NADH เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ภาพที่ 6)

ข้อจำกัดของการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์คือเชื้อยีสต์ไม่สามารถทำการย่อยสลายองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้โดยตรง ทั้งนี้เพราะเชื้อยีสต์ไม่มีกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (Lignocellulolytic enzymes) ในการผลิตแอลกอฮอล์โดยใช้วัตถุดิบเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เชื้อยีสต์นั้น จึงจำเป็นต้องมีการผ่านขั้นตอนต่างๆก่อน อันได้แก่การปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อให้มีโครงสร้างที่เหมาะสม การย่อยสลาย (hydrolysis) โดยอาศัยกรดหรือเอนไซม์ทั้งนี้เพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส และการหมัก (fermentation) โดยเชื้อยีสต์ (Gong et al., 1999)



ภาพที่ 5. กระบวนการเมตาบอลิซึ่มการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็น pyruvate

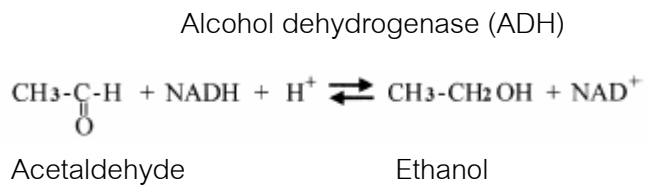
(Okamura-Mutsui et al., 2003)

ก.) Embden-Meyerhof-Panas pathway (EMP)

ข.) Entner-Doudoroff pathway (ED)

ค.) Hexose monophosphate pathway (HMP)

ง.) Phosphoketolase pathway



ภาพที่ 6. การทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส (Okamura-Mutsui et al., 2003)

Shambe และ Kennedy (1985) ทำการย่อยข้าวฟ่าง acha (*Digitaria exilis*) และ ฟางข้าว โดยการใช้กรดและเอนไซม์ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตเป็นเอทานอลได้ การทดลองแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มแรกทำการบ่ม ข้าวฟ่าง acha และ ฟางข้าว (15% w/v) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ที่อิ่มตัวในลิเทียมคลอไรด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการย่อย 45-60 วินาที ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ให้ค่า yield 79.2, 84.0 และ 74.7% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่สองทำการปรับสภาพข้าวฟ่าง acha และฟางข้าว ก่อนในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ที่มีลิเทียมคลอไรด์อิ่มตัว เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ทำการล้างและ freeze dried จากนั้นนำมาย่อย (0.5% w/v) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสMVA1284 จากเชื้อ *Trichoderma viride* ให้ผลผลิตภัณฑ์ที่ย่อยได้เท่ากับ 16.4, 34.4 และ 52.8% ตามลำดับ

Itoh และคณะ (2003) ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้วิธี simultaneous saccharification and fermentation (SSF) จากไม้บีช (beech wood: *Fagus crenata*) ปรับสภาพเนื้อไม้ด้วยวิธีการ ethanolysis และเชื้อรากลุ่มไวต์รอต (*Ceriporiopsis subvermispora, Dichomitus squalens, Pleurotus ostreatus* และ *Coriolus versicolor*) โดยนำไม้บีชมาปรับสภาพด้วยเชื้อรากลุ่มไวต์รอตเป็นเวลา 2-8 สัปดาห์ ไม่มีการเติมสารอาหารจากนั้นนำไปทำการ ethanolysis และแยกส่วนของเยื่อไม้และส่วนที่ละลายออกจากกัน จากนั้นนำส่วนของเยื่อไม้เข้าสู่กระบวนการ SSF ใช้เชื้อ *S. cerevisiae* AM12 และเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. viride* จากการทดลองทั้ง 4 สายพันธุ์พบว่า *C. subvermispora* ให้ค่า yield สูงสุด ค่าเอทานอลที่ได้หลังการผ่านการปรับสภาพด้วย *C. subvermispora* เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีค่าความเข้มข้นเอทานอล 0.294 กรัมต่อกรัมของเยื่อไม้ที่ทำการ ethanolysis ส่วนค่าเอทานอลที่ได้จากไม้บีชที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพมีค่า 0.176 กรัมต่อกรัมของไม้บีช ซึ่งจะเห็นว่าการปรับสภาพจะให้ผลมากกว่าการไม่ปรับสภาพ 1.6 เท่า

Soderstrom และคณะ (2003) ผลิตเอทานอลโดยใช้ไม้เนื้ออ่อน (*Picea abies*) มาทำการย่อยด้วยกระบวนการ enzymatic ก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยต้องมีการนำมาปรับสภาพ ในงานวิจัยนี้ศึกษาการปรับสภาพโดยใช้ความดัน 2 ขั้นตอน (two-step steam pretreatment) ด้วยกรดซัลฟิวริก (dilute H_2SO_4) ขั้นตอนแรกทำภายใต้ภาวะที่รุนแรงคือที่อุณหภูมิ 180^0C เป็นเวลา 10 นาทีใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก 0.5 % เพื่อย่อยเฮมิเซลลูโลส ขั้นตอนที่ 2 นำส่วนที่ได้จากตอนแรกมาล้างและทำให้อิ่มตัวด้วยกรดซัลฟิวริกและปรับสภาพภายใต้ภาวะที่รุนแรงกว่าตอนแรกเพื่อย่อยเซลลูโลส โดยอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 180^0C และ 200^0C เวลา 2, 5 และ 10 นาที ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก 1% และ 2% ผลของเอทานอลสูงสุดได้จากการใช้ภาวะที่ 2 คือที่การใช้อุณหภูมิ 200^0C เวลา 2 นาที และความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก 2% โดยได้ค่าเอทานอลคือ 65% (65% of theoretical)

2.4.2 **เชื้อรากลุ่มไวต์รอต** (white-rot fungi)

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้ส่วนใหญ่มักจะอยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes โดยสามารถจำแนกชนิดของเชื้อรานี้ตามลักษณะการย่อยได้ 3 ชนิด คือ ชนิดที่หนึ่งเชื้อรากลุ่มซอฟต์รอต (soft-rot fungi) สามารถย่อยสลายโพลิแซคคาไรด์ทั้งที่เป็นส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและย่อยลิกนินได้เพียงบางส่วน ชนิดที่สองเชื้อรากลุ่มบราวน์รอต (brown-rot fungi) ย่อยสลายได้เฉพาะเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเท่านั้น และชนิดที่สามเชื้อรากลุ่มไวต์รอต (white-rot fungi) ซึ่งสามารถย่อยองค์ประกอบของเนื้อไม้ได้ทั้งหมด (เบญจวรรณ, 2545)

เชื้อรากลุ่มไวต์รอตจัดเป็นเชื้อราที่อยู่ในไฟลัมเบสิดิโอไมโคต้าของอาณาจักรรา (Kingdom fungi) ซึ่งเกิดขึ้นมาในโลกนี้กว่า 1,000ปีมาแล้ว โดยส่วนใหญ่เชื้อราในกลุ่มนี้ มักจะเป็นเห็ดราที่บริโภคได้ (edible mushroom) มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ *Auricularia auricula-jude* (เห็ดหูหนู) และ *Lentinula edodes* (shiitake, เห็ดหอม) ที่มีการเพาะเลี้ยงมานานในประเทศจีน (Chang and Miles, 1989) และอีกมากกว่า 20 ชนิดที่มีการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้า โดย *Agaricus bisporus* (champignon, เห็ดแชมปิญอง, เห็ดกระดุม), *Lentinula edodes* (shiitake, เห็ดหอม) และ *Pleurotus ostreatus* (เห็ดนางรม) เป็นกลุ่มเห็ดราที่มีการเพาะเลี้ยงเพื่อการบริโภคอย่างกว้างขวางทั่วโลก

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนื้อไม้ พบว่าเชื้อรากลุ่มไวต์รอตมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายลิกนินและองค์ประกอบอื่นๆในเนื้อไม้เช่น เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส (Rodriguez et al., 1999) โดยเชื้อจะผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนื้อไม้ในกลุ่มที่เป็น secondary metabolite ออกมานอกเซลล์ เช่น ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin

peroxidase) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase) และแลคเคส (Laccase) เพื่อทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) และอะโรมาติกโพลิเมอร์ (aromatic polymer) ในโครงสร้างลิกนิน (Have and Franssen, 2001) และผลิตเอนไซม์ในกลุ่มที่เป็น primary metabolite ในการย่อยสลายโพลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ในเนื้อไม้เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) และบีตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) ซึ่งในการศึกษาการย่อยสลายลิกนิน เชื้อที่พบว่ามีประสิทธิภาพสูงได้แก่เชื้อ *Phanerocheate chrysosporium* (Kennes and Lema, 1994)

2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

2.5.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายองค์ประกอบของลิกนิน

2.5.1.1 ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase, LiP; EC 1.11.1.14)

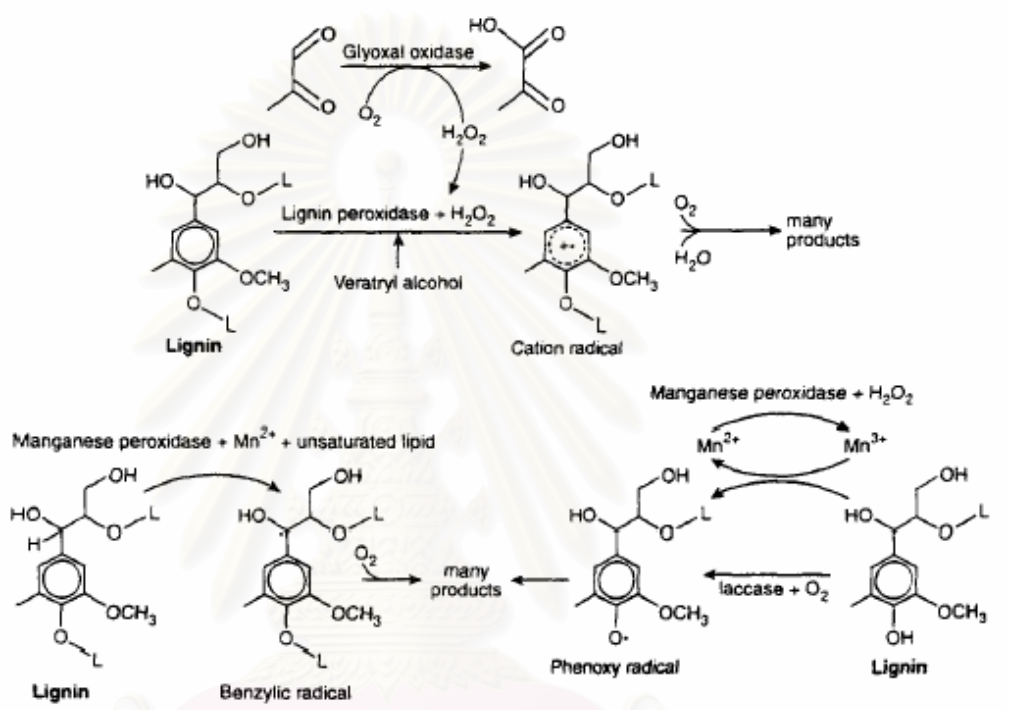
เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสคือเอนไซม์ชนิดออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductase) สามารถออกซิไดซ์พันธะ C-C ทำให้วงแหวนของลิกนินเปิดออก โดยมี H_2O_2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา LiP สามารถออกซิไดซ์ non-phenolic aromatic ของลิกนิน โดยมี veratryl alcohol เป็น mediator เมื่อเสร็จกระบวนการอิเล็กตรอนหนึ่งตัวจะถูกปล่อยออกมา จึงมีผลให้ non-phenolic aromatic กลายเป็น aryl cation radical (Pointing, 2001) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายลิกนิน ได้แก่ vanillin, syringaldehyde, isovanillic acid, vanilic acid และ veratric acid เป็นต้น ลิกนินเปอร์ออกซิเดสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 41,000 – 42,000 ดาลตัน และถือได้ว่าเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสูงโดยมีรายงานการค้นพบเอนไซม์นี้ครั้งแรกจากเชื้อไวต์รอต *Phanerochaete chrysosporium* (Cai and Tien, 1993)

2.5.1.2 แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase, MnP; EC 1.11.1.13)

เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์สารประกอบที่เป็น phenolic lignin เช่น veratryl alcohol ได้ เนื่องจากเอนไซม์นี้ต้องการสารที่มีกลุ่ม phenolic อิสระ ใน aromatic ring เป็นสารตั้งต้นและใช้แมงกานีสเป็นตัวร่วมปฏิกิริยาในภาวะที่ต้องการ H_2O_2 เป็น oxidize intermediate (Heinzkill and Messner, 1997)

2.5.1.3 แลคเคส (Laccase, Lac; EC 1.10.3.2)

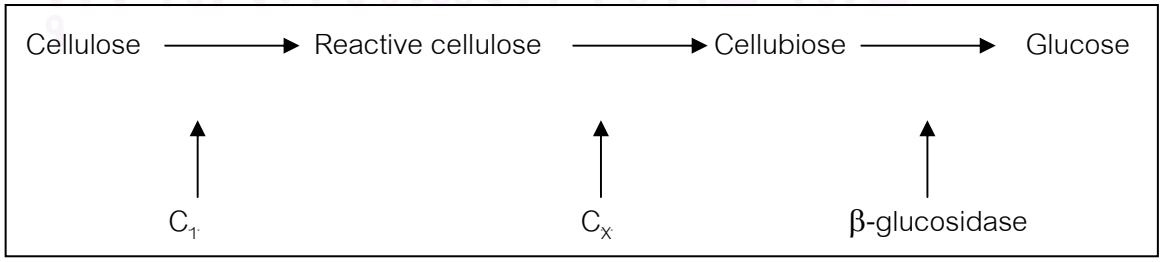
เอนไซม์แลคเคสเป็น polyphenol oxidase ที่สามารถเร่งปฏิกิริยา oxidation ของ phenolic compound และ aromatic amines โดยใช้โมเลกุลของ oxygen เป็น eletron acceptor (Min et al., 2001) แลคเคสเป็นเอนไซม์ชนิด multicopper blue oxidase ซึ่งจะมีทองแดง (Cu) 2-4 อะตอมต่อ 1 โมเลกุล และพบได้ในพืชและเชื้อราหลายชนิดโดยการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7. การทำงานของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส (Kirk and Cullen, 1998)

2.5.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลส

ในปี ค.ศ1950 ได้มีการตั้งสมมติฐานการศึกษาการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสขึ้น (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 สมมติฐานการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส

จากสมมติฐานนี้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดสามารถที่จะย่อยสลายเซลลูโลสโดยอาศัยเอนไซม์ C_1 และ C_x ซึ่งปฏิกิริยาจะเริ่มจากจุลินทรีย์หลั่ง C_1 ออกมานอกเซลล์เพื่อทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสให้สั้นลง กลายมาเป็นเซลลูโลสเส้นตรงยาวก่อนหลังจากนั้น C_x จะเข้าทำงานต่อเพื่อย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลสายสั้นๆเช่น เซลโลไบโอส (cellobiose) ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายนอกเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยกระบวนการทางชีวเคมี หลังจากนั้นเซลโลไบโอสซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดเล็กก็จะซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์จากนั้น β-glucosidase จะทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสต่อไป

จากการศึกษาต่อมาทำให้ทราบว่า C_1 คือเอนไซม์ exoglucanase และ C_x คือเอนไซม์ endoglucanase (Wike et al., 1983) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์สามารถถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือถ้ามีกลูโคสอยู่ในระบบมากจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ทำให้เกิดการสะสมของเซลโลไบโอส ซึ่งถ้ามีการสะสมมากพอเซลโลไบโอสก็จะไปยับยั้งการทำงานของ C_1 และ C_x ต่อไป (Eriksson et al., 1990)

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์จากนั้นจะถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีหลายองค์ประกอบ (multicomponent enzyme) โดยจะมีองค์ประกอบของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกัน (Beldman et al., 1987) เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่

2.5.2.1 Exoglucanase

Exoglucanase หรือ cellobiohydrolase หรือ 1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณพันธะบีตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic linkage) ที่ปลายด้าน non-reducing end ของ crystalline cellulose ทำให้ได้เป็นเซลโลไบโอสและกลูโคสบางส่วน สามารถวัดแอคติวิตีโดยบ่มเอนไซม์ exoglucanase กับ crystalline cellulose เช่น กระดาษกรอง และ Avicel เป็นต้น (Wike et al., 1983) นอกจากนี้เอนไซม์ตัวนี้ยังมีชื่อเรียกทั่วไปอีกว่า exocellulase, cellobiosidase และ avicellase

2.5.2.2 Endoglucanase

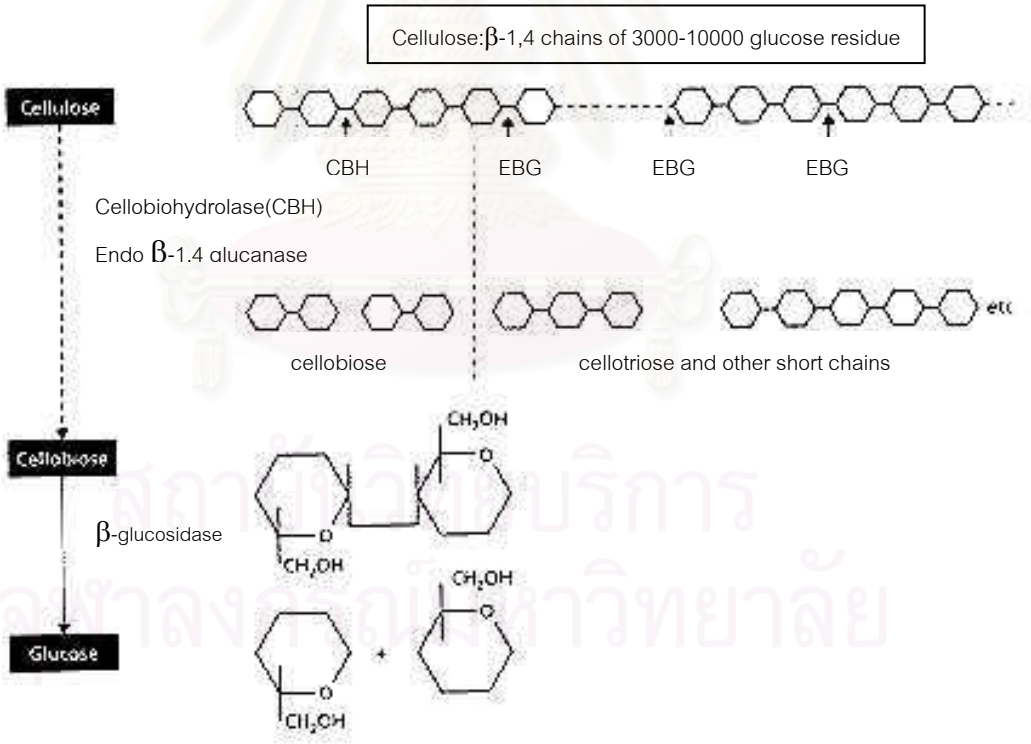
Endoglucanase หรือ 1,4-β-D-glucan 4-glucanohydrolase (EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณพันธะ β-1,4-glucosidic linkage ภายในสายเซลลูโลสบริเวณ amorphous cellulose อย่างสุ่ม ทำให้ได้เซลโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์

หลักและได้กลูโคสเป็นบางส่วน สามารถทำการวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ได้โดยบ่มเอนไซม์ endoglucanase กับ carboxymethyl cellulose (CMC) เป็นต้น (Wike et al., 1983) นอกจากนี้ยังมีชื่อที่เรียกทั่วไปอีกคือ CM-cellulase

2.5.2.3 β-glucosidase

β-glucosidase หรือ β-D-glucoside glucohydrolase หรือ cellobiose (EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลโลไบโอส บริเวณพันธะ β-1,4-glucosidic bond ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส (β-D-glucose) 2 โมเลกุล สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้โดยบ่มเอนไซม์ β-glucosidase กับ cellobiose และ p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (p-NPG) เป็นต้น (Wike et al., 1983)

จะเห็นได้ว่าการย่อยสลายเซลลูโลสโดยอาศัยเอนไซม์เซลลูเลสให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกลูโคสนั้น ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดด้วยกัน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9. การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส

Alder (1990) รายงานว่าเชื้อรากลุ่มไวต์รอตในแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประกอบของสารที่พบในเนื้อไม้ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆอีกเช่นปริมาณความชื้นของภาวะแวดล้อม ปริมาณออกซิเจน และความเข้มข้นของปริมาณไนโตรเจนที่มีอยู่ในเนื้อไม้ ซึ่งมีผลต่ออัตราการย่อยสลายสารที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อไม้

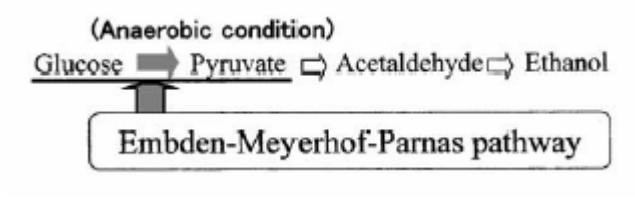
Ferraz และคณะ (2003) ศึกษาการย่อยสลายเนื้อไม้ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus grandis*) โดยเชื้อรา *Ceriporiopsis subvermispora* ภายใต้ภาวะ solid-state fermentation จากนั้นศึกษาเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolysis enzyme (beta-glucosidase และ xylanase) และ oxidative enzyme (laccase และ peroxidase) พบว่ากลุ่ม hydrolysis ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ xylanase จะสูงกว่า beta-glucosidase มาก และในกลุ่ม oxidative ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ laccase จะสูงกว่า peroxidase

Elisashvili และคณะ (2006) ใช้เชื้อ *Pleurotus dryinus* ในการผลิต lignocellulolytic enzymes ภายใต้ภาวะ submerged fermentation ประเภทลิกโนเซลลูโลสที่ใช้คือ mandarin peels และ tree leaves จากนั้นศึกษาปัจจัยต่างๆอันได้แก่ ความเข้มข้นของสับสเตรต แหล่งไนโตรเจน สารอาหารและแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ laccase (Lac), manganese peroxidase (MnP), endoglucanase (CMCase), exoglucanase (FPA) และ xylanase ผลที่ได้พบว่าเอนไซม์แต่ละตัวมีการใช้สารต่างๆแตกต่างกันเช่น CMCase และ xylanase ทำงานได้ดีที่ความเข้มข้นของสับสเตรต 4% ในขณะที่ Lac และ FPA ทำงานได้ดีที่ความเข้มข้นของสับสเตรต 6% และ MnP ทำงานได้ดีที่ความเข้มข้นของสับสเตรต 2% โดยสารแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้ดีคือ $(NH_4)_2SO_4$ สารอาหารที่ใช้คือ Mn^{2+} รองลงมาคือ Xylidine และแหล่งคาร์บอนคือ Avicel

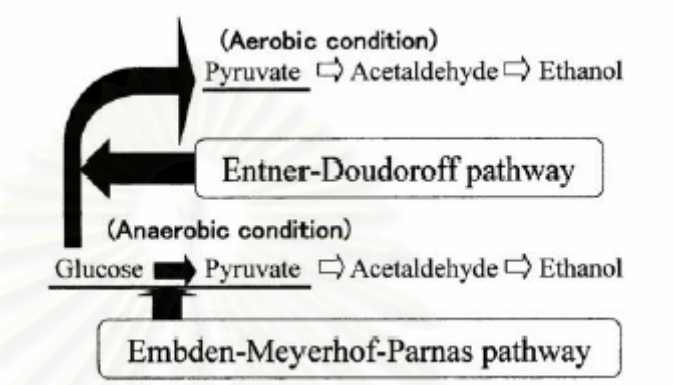
2.6 การผลิตเอทานอลโดยเชื้อราในกลุ่มไวต์รอต

เอนไซม์กลุ่ม lignocellulolytic enzymes ที่ได้จากเชื้อราเป็นที่รู้จักและศึกษากันมานาน ต่อมามีรายงานการวิจัยพบว่าเชื้อรากลุ่มไวต์รอตที่มีเอนไซม์กลุ่ม lignocellulolytic enzymes สามารถผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ดังนั้นจึงนำคุณสมบัติจากการมีเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มมาใช้ร่วมกัน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเป็นเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต และยังมีข้อดีคือเชื้อรายังสามารถผลิตเอทานอลได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เช่นเชื้อ *A. brazei* ในขณะที่ยีสต์ผลิตเอทานอลได้ดีเฉพาะภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น (ภาพที่ 10)

ก.)



ข.)



ภาพที่ 10. กระบวนการเมตาบอลิซึ่มของการผลิตเอทานอล (Okamura-Matsui et al., 2003)

ก.) การหมักโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae*

ข.) การหมักโดยใชเชื้อ *A. brazei*

Rudge และ Bickerstaff (1986) ใช้เชื้อราไวต์รอต *Sporotrichum pulverulentum* ศึกษาการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสและการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ พบว่าหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดย Cibacron Blue 3GA/Sepharose 4B เอนไซม์จะบริสุทธิ์ขึ้น 35 fold มีค่าน้ำหนักโมเลกุล 168000 ดาลตัน ค่าพีเอชที่เหมาะสมของ alcohol oxidation และ aldehyde reduction อยู่ในช่วง 5.6-6.5 และ 8.0-8.4 ตามลำดับ และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส

Chen และ Johns (1994) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตเอทานอลและการสร้าง pigment ของเชื้อ *Monascus purpureus* โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้คือน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตส เมื่อใช้มอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ความเข้มข้นเอทานอลน้อยกว่า 0.1 กรัมต่อลิตร และพบ pigment 3 ชนิดคือ monascorubramine, monascin และ monascorubrin เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นที่ กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร จะได้ความเข้มข้นเอทานอล 22 กรัมต่อลิตร และพบ pigment 5 ชนิดด้วยกันคือ rubropunctatin, ankaflavin, monascorubramine, monascorubrin และ monascin โดย pigment ที่พบจะให้สีแตกต่างกันคือ rubropunctatin และ monascorubrin ให้สีส้ม ankaflavin และ monascin ให้สีเหลือง และ monascorubramine ให้สีแดง

Okamura และคณะ (2001) ศึกษาการใช้เชื้อไวต์รอตในการทำไวน์ โดยเชื้อที่ใช้ได้แก่ *Agaricus brazei* MWU-C20, *Flammulina velutipes* MWU-C3 และ *Pleurotus ostreatus* MWU-C1 โดยใช้สับสเตรตคือ น้ำองุ่น จากนั้นวิเคราะห์ specific activity ของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส น้ำหนักโมเลกุล ปริมาณเอทานอล สารβ-D-glucan และ Fibrinolytic activity พบว่าเชื้อ *A. brazei* MWU-C20 จะให้ค่า specific activity สูงสุดคือ 98 unit/mg protein มีค่าน้ำหนักโมเลกุล 59 kDa ความเข้มข้นเอทานอล 8.0% สารβ-D-glucan 0.68% และมีค่า Fibrinolytic activity 15±0.5 (mm^2)

Okamura-Matsui และคณะ (2003) ศึกษาการใช้เชื้อรากลุ่มเชื้อเห็ดในการผลิตเอทานอล โดยศึกษาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสที่มีในเชื้อเห็ด และใช้เชื้อกลุ่มนี้มาทำไวน์ เบียร์และสาเก โดยใช้แทนที่ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งมีรายงานทั่วไปว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์หลักในการผลิตแอลกอฮอล์ ผลการวิเคราะห์พบว่าค่าเปอร์เซนต์แอลกอฮอล์สูงสุดของไวน์เบียร์และสาเกได้จาก *Pleurotus ostreatus* (12.2%), *Tricholoma matsutake* (4.6%) และ *Agaricus blazei* (8.0%) ในการทำไวน์ *Agaricus blazei* ให้ความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากัน (8.0%) ทั้งการผลิตภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงคัดเลือกเชื้อราที่อยู่ในกลุ่มเชื้อราไวต์รอตมา 6 สายพันธุ์อันได้แก่ *Coriolus versicolor, Flammulina velutipes, Pleurotus cornucopiae, Pleurotus ostreatus, Pleurotus sajor-caju* และ *Schizophyllum commune* จากนั้นศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งได้แก่เซลลูโลสและลิกนิน ทำการคัดเลือกเพียงหนึ่งสายพันธุ์ที่มีเอนไซม์เหล่านี้อยู่และคาดว่าให้ผลดีที่สุดไปเข้าสู่ขั้นตอนการหมักในระดับขวดเขย่า โดยเริ่มแรกใช้วัตถุดิบเป็นกลูโคสเพื่อดูความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอล จากนั้นจึงเปลี่ยนวัตถุดิบเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ (commercial cellulose) ในการศึกษาในงานวิจัยนี้ได้แก่ microcrystalline cellulose (Avicel) และ carboxymethyl cellulose (CMC) โดยใช้เซลลูโลสดังกล่าวเป็นตัวแทนของเซลลูโลสที่มีอยู่ในองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ทั้งนี้เพื่อลดปัญหาจากผลกระทบของสารอื่นๆที่อาจปนเปื้อน ซึ่งยังไม่ต้องการศึกษาในงานวิจัยนี้

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Model PB3002-S, Mettler Toledo, Thailand)
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Model AE240, Mettler Toledo, Thailand)
3. Vortex (Model G-560E, Scientific Industries, USA)
4. Hot plate (Model PC-101, Corning, N.Y, U.S.A)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) (Model MTX-150, Tomy Seiko Co., Ltd. Tokyo Japan)
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Model-UV160, Shimadzu Corporation, Kyoto Japan)
7. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Mettler Toledo, Thailand)
8. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated incubator shaker) (Model INNOVA4330, Scientific Promotion Co., Ltd. Thailand)
9. ตู้อบความร้อนสูง (hot air oven)(Contherm Digital Series Oven, New Zealand)
10. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) (Model HV-50, Hirayama Manufacturing Corporation, Japan)
11. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) (NK System, Clean Bench, Japan)
12. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)(Model D3009, Burgwedal, Germany)
13. Ultrasonic disruption (Model UD-201, Tomy Seiko Co., Ltd. Tokyo Japan)
14. Gas chromatography (Model 163, Hitachi, Ltd. Tokyo Japan)
15. เตาอบไมโครเวฟ (Model NE-767C, Matsushita Electric Industrial Co, Ltd. Japan)
16. ปั๊ม (Model MPN125, Thakita Electric Works., Ltd. Japan)

3.2 เคมีภัณฑ์	บริษัท	ประเทศ
1. Agar (วุ้นผงตรานางเงือก)	พัฒนสินเอนเตอร์ไพรส์	ไทย
2. Albumin from bovine serum (BSA)	Sigma	Germany
3. Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	Carlo Erba	Italy
4. Ammonium tartrate ($(NH_4)_2C_4H_4O_6$)	Fluka	Spain
5. Avicel	Fluka	Ireland
6. Boric acid (H_3BO_3)	Merck	Germany
7. Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)	Fluka	Switzerland
8. Calcium hydrogen phosphate dihydrate ($CaHPO_4$)	Fluka	Switzerland
9. Carboxymethylcellulose sodium salt (CMC)	Fluka	Finland
10. Citric acid ($C_6H_8O_7$)	Merck	German
11. Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)	Fluka	Switzerland
12. Corn steep liquor	Sigma	U.S.A
13. 2,6-Dimethoxyphenpol	Fluka	Switzerland
14. 3,4-Dimethoxybenzyl alcohol (Veratryl alcohol)	Fluka	Switzerland
15. Dinitrosalicylic acid	Sigma	U.S.A
16. Ethanol absolute 99.5%	Merck	Germany
17. Ferric sulfate ($Fe_2(SO_4)_3$)	Fluka	Switzerland
18. Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Folin-phenol)	Fluka	Switzerland
19. Fumaric acid ($C_4H_4O_4$)	Fluka	Switzerland
20. Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	Riedel-de Haen	France
21. Guaiacol ($C_7H_8O_2$)	Fluka	Switzerland
22. Hydrochloride acid (HCl)	Merck	Germany
23. Hydrogen peroxide solution 35% (H_2O_2)	Merck	Germany
24. Iron(II)sulfate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$)	Merck	Germany
25. Kobalt(II)-chloride hexahydrate ($CoCl_2.6H_2O$)	Fluka	Switzerland
26. L-asparagine	Fluka	U.S.A
27. Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)	Fluka	Switzerland
28. Malt extract	Difco	U.S.A
29. Manganese(II)sulfate-1-hydrate ($MnSO_4.H_2O$)	Merck	Germany
30. Nicotinamide adenine dinucleotide free acid (NAD)	Merck	Germany

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

31. Peptone	Difco	U.S.A
32. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck	Germany
33. Potassium sodium tartrate ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$)	Carlo Erba	Italy
34. Propanol (C_3H_8O)	Merck	Germany
35. Salicin ($C_{13}H_{18}O_7$)	Difco	U.S.A
36. Sodium chloride (NaCl)	Merck	Germany
37. Sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)	Fluka	Switzerland
38. Sodium hydroxide (NaOH)	Merck	Germany
39. Sodium molybdate dihydrate ($Na_2MoO_4 .2H_2O$)	Carlo Erba	Italy
40. Sodium percarbonate (Na_2CO_3)	Fluka	Switzerland
41. Sodium tartrate dibasic dihydrate ($Na_2C_4H_4O_6 .2H_2O$)	Univer	Australia
42. Tartaric acid ($C_4H_6O_6$)	Merck	Germany
43. Thiamine hydrochloride ($C_{12}H_{17}ClN_4OS.HCl$)	Sigma	U.S.A
44. Tris (hydroxymethyl) – aminomethan ($C_4H_{11}NO_3$)	Merck	Germany
45. Tween 80	Sigma	Germany
46. Yeast extract	Difco	U.S.A
47. Zine sulfate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$)	Fluka	Switzerland

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การคัดเลือกเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

งานวิจัยนี้ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบที่เป็นองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นเชื้อรากลุ่มไวต์รอต ซึ่งมีรายงานจากงานวิจัยว่าเชื้อกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรือวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ดังนั้นจึงมีการตั้งหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกเชื้อเพื่อให้เหมาะสมต่อการทดลอง ได้แก่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอล และจากงานวิจัยที่ผ่านมามีรายงานว่าเชื้อราสามารถผลิตเอทานอลได้แต่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์ (Okamura-Matsui et al, 2003) การนำไปใช้ก็อาจใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องดื่ม และเพื่อคำนึงถึงความปลอดภัยต่อสุขภาพจึงเพิ่มหลักเกณฑ์อีกข้อคือควรเลือกใช้เชื้อที่สามารถจะบริโภคได้ด้วย ดังนั้นหลักเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อรากลุ่มไวต์รอตในการทดลองครั้งนี้

คือ

- สามารถผลิตเอทานอลได้
- สามารถย่อยสลายองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้
- บริโภคได้ (edible mushroom)

3.3.2 การผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

3.3.2.1 การเลี้ยงเชื้อ

ทำการเลี้ยงเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ดังตารางที่ 1 บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก ข้อ1) เป็นเวลาประมาณ 7-10 วัน ตัดชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของเส้นใยบริเวณรอบนอกของโคโลนีที่มีการเจริญดี ซึ่งมีลักษณะเส้นใยแผ่สม่ำเสมอ ด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้กล้าเชื้อมาตรฐาน แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อจำนวน 3 ชิ้น ย้ายลงในอาหาร glucose-peptone (ภาคผนวก ก ข้อ3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี pH 5.0 จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อ โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated incubator shaker) โดยไม่มีการเขย่า ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่1 สายพันธุ์เชื้อรากลุ่มไวต์รอตที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์	ชื่อทั่วไป
Coriolus versicolor	เห็ดหางไก่งวง
Flammulina velutipes	เห็ดเข็มทอง
Pleurotus cornucopiae	เห็ดนางรมสีทอง
Pleurotus ostreatus	เห็ดนางรม
Pleurotus sajor-caju	เห็ดนางฟ้า, เห็ดนางรมอินเดีย
Schizophyllum commune	เห็ดแครง

3.3.2.2 การทำให้เซลล์แตก

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 ทำการกรองโดยผ่านชุดกรอง Buchner funnel เพื่อแยกเส้นใยและส่วนใสออกจากกัน ส่วนของเส้นใยที่กรองได้ นำมาเติม 10 mM Tris-HCl buffer จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic disrubtor (Tomy, UD-201, 20 kHz) เป็นเวลา 10 นาที โดยระวังไม่ให้เกิดฟอง (ขณะทำควรแช่ไว้ในน้ำแข็ง เพื่อให้เย็นตลอดเวลา) หลังจากเสร็จแล้วก็นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส (ADH) และปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ข ข้อ1)

3.3.2.3 การวิเคราะห์โปรตีน

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (ภาคผนวก ข ข้อ1) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นนำค่า OD ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

3.3.2.4 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส

นำ reaction mixture (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ที่มีการเติมตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 แล้ว ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร โดยเลือก mode kinetic จากนั้นนำผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาไปคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ (Unit of enzyme)

3.3.3 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของลิกนินโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

3.3.3.1 การเลี้ยงเชื้อ

ทำการเลี้ยงเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ตามตารางที่ 1 บนอาหาร PDA (ภาคผนวก ก ข้อ1) เป็นเวลาประมาณ 7-10 วัน ตัดชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของเส้นใยบริเวณรอบนอกของโคโลนีที่มีการเจริญดี ซึ่งมีลักษณะเส้นใยแผ่สม่ำเสมอ ด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้กล้าเชื้อมาตรฐาน แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อจำนวน 10 ชิ้น ย้ายลงในอาหาร production1 (ภาคผนวก ก ข้อ4) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี pH 5.0 จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อ โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated incubator shaker) เขย่าที่ 150 rpm เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน โดยทำการเก็บเชื้อทุกๆวัน (เตรียม 1 วันต่อ 1 ขวดทดลอง) ในแต่ละวันนำเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์กรองผ่านชุดกรอง Buchner funnel เพื่อแยกเส้นใยและส่วนของ supernatant ออกจากกัน นำส่วนของ supernatant ไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.3.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (ภาคผนวก ข ข้อ3)

นำ reaction mixture ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วนำผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาไปคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ (Unit of enzyme)

3.3.3.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (ภาคผนวก ข ข้อ4)

นำ reaction mixture ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร แล้วนำผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาไปคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ (Unit of enzyme)

3.3.3.4 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคส (ภาคผนวก ข ข้อ5)

นำ reaction mixture ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร แล้วนำผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาไปคำนวณค่าหน่วยของเอนไซม์ (Unit of enzyme)

3.3.4 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของเซลลูโลสโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

3.3.4.1 การเลี้ยงเชื้อ

ทำการเลี้ยงเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ดังตารางที่ 1 บนอาหาร PDA (ภาคผนวก ก ข้อ1) เป็นเวลาประมาณ 7-10 วัน เจาะชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของเส้นใยใส่บีกเกอร์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำsterilize ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงไป บดชิ้นวุ้นให้ละเอียด แล้วใช้ปิเปตขนาด 5 หรือ 10 มิลลิลิตร ที่ตัดปลายออกดูดชิ้นวุ้นที่บดแล้วขึ้นมา 5 มิลลิลิตร และนำมาเติมในอาหาร production 2 (ภาคผนวก ก ข้อ5) ที่มีอาหารอยู่ 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated incubator shaker) เขย่าที่ 150 rpm ทำการเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 12 วัน จากนั้นนำเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์กรองผ่านชุดกรอง Buchner funnel เพื่อแยกเส้นใยและส่วนของ supernatant ออกจากกัน นำส่วนของ supernatant ไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.4.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนสและบีตา-กลูโคซิเดส

ทำการวัดตามวิธีในภาคผนวก ข ข้อ 6 ข้อ 7 และข้อ 8 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่า OD ที่ได้ไปคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 3 ตัว โดยเทียบกับตัวมาตรฐาน

3.3.5 การผลิตเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

3.3.5.1 การหมักโดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรต

3.3.5.1.1 การเลี้ยงเชื้อ

ทำการเลี้ยงเชื้อรากลุ่มไวต์รอตที่คัดเลือกได้เพียงหนึ่งเชื้อโดยการพิจารณาคุณสมบัติจากข้อ 3.3.2, ข้อ 3.3.3 และข้อ 3.3.4 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA (ภาคผนวก ก ข้อ1) เป็นเวลาประมาณ 7-10 วัน เจาะชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของเส้นใยใส่บีกเกอร์ที่ฆ่าเชื้อแล้วเติมน้ำ sterilize ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงไป บดชิ้นวุ้นให้ละเอียด แล้วใช้ปิเปตขนาด 5 หรือ 10 มิลลิลิตร ที่ตัดปลายออกดูดชิ้นวุ้นที่บดแล้วขึ้นมา 5 มิลลิลิตร และนำมาเติมในอาหาร production 3 (ภาคผนวก ก ข้อ6) ที่มีอาหารอยู่ 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated incubator shaker) เขย่าที่ 150 rpm ทำการเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 15 วัน จากนั้นนำเชื้อมากรองผ่านชุดกรอง

Buchner funnel เพื่อแยกเส้นใยและส่วนใสออกจากกัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (reducing sugar) และการเจริญของเชื้อโดยวัดเป็นน้ำหนักแห้ง

3.3.5.1.2 การวิเคราะห์เอทานอล

นำ supernatant ที่ได้จากการกรองไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นดูดตัวอย่างมา 0.5 มิลลิลิตร ทำการผสมกับ propanol มาตรฐานที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ข ข้อ9) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC (gas chromatography) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำผลที่ได้มาคำนวนหาอัตราส่วน (ratio) ระหว่างพื้นที่ peak ของเอทานอลต่อพื้นที่ peak ของ propanol จากนั้นนำอัตราส่วนที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของเอทานอล

3.3.5.1.3 การวิเคราะห์น้ำตาล (reducing sugar)

นำ supernatant ที่ได้จากการกรองไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นดูดตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร เติม DNS reagent 1 มิลลิลิตร ต้ม 10 นาที จากนั้นทำให้เย็น เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ผลที่ได้ทำไปเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน (ภาคผนวก ข ข้อ10) เพื่อหาปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่

3.3.5.1.4 การวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง (cell dry weight)

จากข้อที่ 5.1.1 ในการกรองเส้นใยด้วยชุดกรอง Buchner funnel ให้ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองก่อน จากนั้นหลังจากกรองเสร็จแล้วให้นำไปอบในตู้อบความร้อนสูง (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำผลมาคำนวณหาน้ำหนักแห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.3.5.2 การหมักโดยใช้เซลลูโลสเป็นสับสเตรต

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.5.1 แต่เปลี่ยนสูตรอาหารใน production 4 จากสับสเตรตกลูโคสเป็นเซลลูโลส ซึ่งได้แก่ carboxymethylcellulose (CMC) ซึ่งเป็นเซลลูโลสที่มีความสามารถในการละลายสูง และ microcrystalline cellulose (Avicel) ซึ่งเป็นเซลลูโลสที่มีความสามารถในการละลายต่ำ ที่ความเข้มข้น 5 และ10 กรัมต่อลิตร ทำการแปรผันความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตรและ 2.0 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อเดียวกับข้อ 3.3.5.1 จากนั้นทำการทดลองและวิเคราะห์ผลของปริมาณเอทานอลและแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลส

บทที่ 4
ผลการทดลอง

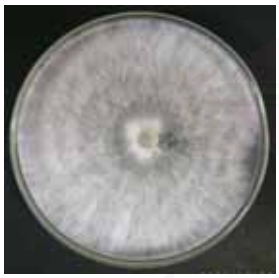
4.1 การคัดเลือกและการเจริญของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อที่คัดเลือกมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นเชื้อราในกลุ่มไวต์รอต ซึ่งมีด้วยกัน 6 สายพันธุ์ คือ *Coriolus versicolor*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus cornucopiae*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* และ *Schizophyllum commune* ดังภาพที่ 11 ซึ่งเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทุกสายพันธุ์เป็นเชื้อที่สามารถบริโภคได้ (edible mushroom) โดยได้มีการเพาะเลี้ยงเพื่อการพาณิชย์อย่างกว้างขวาง

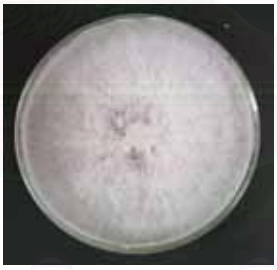
Coriolus versicolor

Flammulina velutipes

Pleurotus cornucopiae



Pleurotus ostreatus



Pleurotus sajor-caju

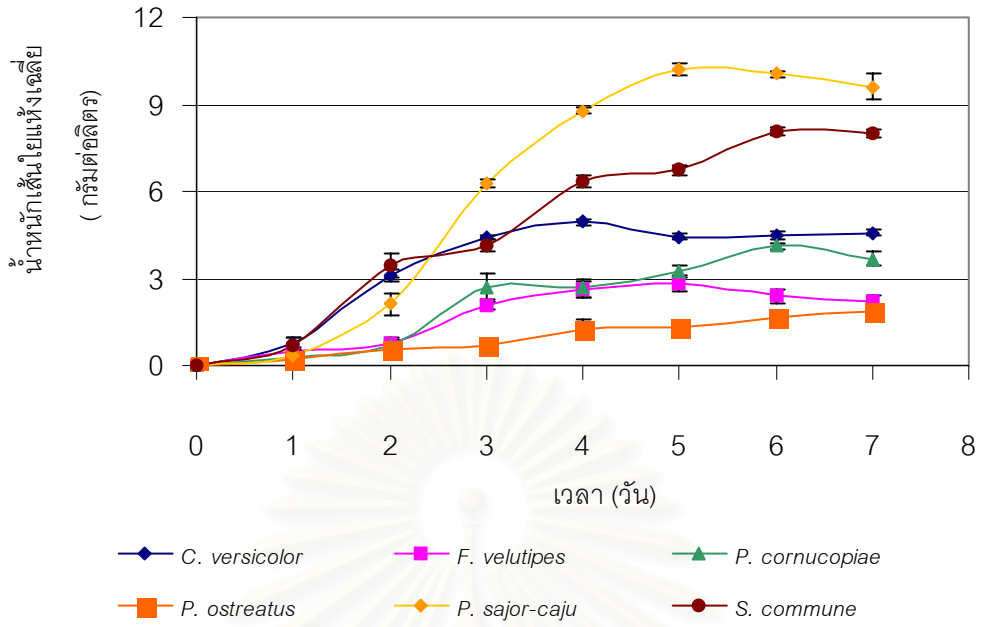
Schizophyllum commune

ภาพที่ 11 ลักษณะของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA

ในการศึกษาการเจริญของเชื้อรากลุ่มไวต์รอต นำเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์เลี้ยงในอาหาร PDB (ภาคผนวก ก ข้อ 2) จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรากลุ่มไวต์รอตต่างสายพันธุ์มีรูปแบบการเจริญที่คล้ายกัน (ตารางที่ 2, ภาพที่ 12) โดยเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตที่คงที่ (early stationary phase) ประมาณวันที่ 4 -6 ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 2 การเจริญของเชื้อรากลุ่มไวต์รอต 6 สายพันธุ์

สายพันธุ์	น้ำหนักเส้นใยแห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)							
	เริ่มต้น	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
C. versicolor	0	0.786 ± 0.162	3.110 ± 0.195	4.404 ± 0.058	4.932 ± 0.093	4.423 ± 0.101	4.461 ± 0.129	4.581 ± 0.090
F. velutipes	0	0.449 ± 0.137	0.763 ± 0.120	2.081 ± 0.147	2.635 ± 0.285	2.813 ± 0.256	2.402 ± 0.252	2.220 ± 0.164
P. cornucopiae	0	0.280 ± 0.071	0.675 ± 0.270	2.718 ± 0.439	2.681 ± 0.309	3.247 ± 0.186	4.113 ± 0.088	3.683 ± 0.263
P. ostreatus	0	0.216 ± 0.089	0.524 ± 0.122	0.689 ± 0.187	1.242 ± 0.325	1.337 ± 0.124	1.653 ± 0.163	1.872 ± 0.145
P. sajor-caju	0	0.362 ± 0.117	2.110 ± 0.387	6.278 ± 0.157	8.786 ± 0.084	10.200±0.201	10.049±0.115	9.620 ± 0.439
S. commune	0	0.720 ± 0.247	3.434 ± 0.398	4.161 ± 0.218	6.321 ± 0.200	6.733 ± 0.178	8.081 ± 0.146	7.970 ± 0.138



ภาพที่ 12 การเจริญของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ ในอาหาร PDB ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

จากตารางที่ 3 เป็นการเปรียบเทียบน้ำหนักเส้นใยแห้งเฉลี่ยของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ *P. sajor-caju* ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 10.20 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือสายพันธุ์ *S. commune* มีน้ำหนักเส้นใยแห้งเฉลี่ยเท่ากับ 8.081 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3 น้ำหนักเส้นใยแห้งเฉลี่ยสูงสุดของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	วันที่	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
C. versicolor	4	4.932 ± 0.093
F. velutipes	5	2.813 ± 0.256
P. cornucopiae	6	4.113 ± 0.088
P. ostreatus	6	1.653 ± 0.163
P. sajor-caju	5	10.200 ± 0.201
S. commune	6	8.081 ± 0.146

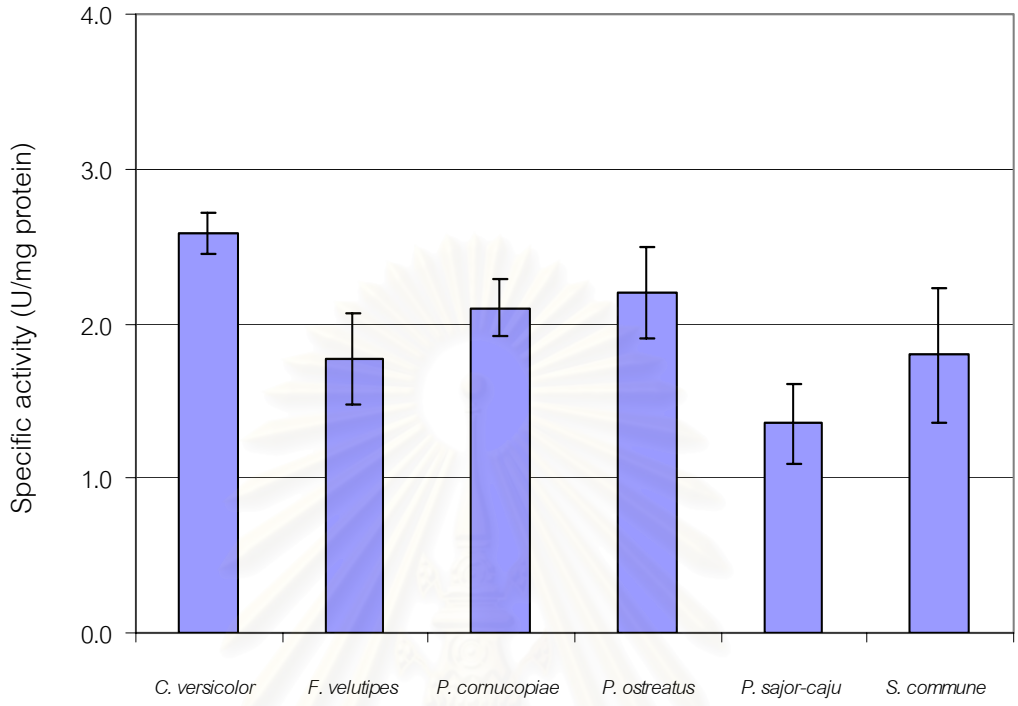
4.2 การผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

เลี้ยงเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ในอาหารสูตร glucose-peptone (ภาคผนวก ก ข้อ3) ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเขย่า ทั้งนี้เพื่อให้เป็นภาวะที่เหมาะต่อการผลิตเอทานอล กรองแยกส่วนของเส้นใยเพื่อนำไปทำให้เซลล์แตก จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาหาค่า specific activity ของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4

ในการศึกษาพบว่าเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์สามารถที่จะวิเคราะห์ค่า specific activity ของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสได้ โดย *C. versicolor* มีค่า specific activity สูงสุด เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆคือ 2.583 U/mg protein รองลงมาคือ *P. ostreatus* มีค่า specific activity 2.201 U/mg pertein ส่วน *F. velutipes*, *P. cornucopiae*, *P. sajor-caju* และ *S. commune* มีค่า specific activity 1.770, 2.098, 1.354 และ 1.795 U/mg protein ตามลำดับ โดยแสดงการเปรียบเทียบค่า specific activity ของแต่ละสายพันธุ์เป็นแบบกราฟดังภาพที่ 13

ตารางที่ 4 ค่า specific activity ของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสที่ได้จากเชื้อรากลุ่มไวต์รอต 6 สายพันธุ์

สายพันธุ์	แอคติวิตี (U/mg)	โปรตีน (กรัมต่อลิตร)	Specific activity (U/mg protein)
C. versicolor	0.328 ± 0.017	0.127 ± 0.010	2.583 ± 0.131
F. velutipes	0.271 ± 0.044	0.153 ± 0.005	1.770 ± 0.290
P. cornucopiae	0.293 ± 0.025	0.140 ± 0.011	2.098 ± 0.186
P. ostreatus	0.263 ± 0.034	0.120 ± 0.029	2.201 ± 0.300
P. sajor-caju	0.190 ± 0.036	0.141 ± 0.007	1.354 ± 0.262
S. commune	0.238 ± 0.061	0.133 ± 0.024	1.795 ± 0.441



ภาพที่ 13 ค่า specific activity ของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์

4.3 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของลิกนินโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

เอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการย่อยสลายองค์ประกอบของลิกนินได้แก่ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์แลคเคส ดังนั้นศึกษาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดโดยหาค่าแอคติวิตีของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร production (ภาคผนวก ก ข้อ4) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 rpm กรองแยกเอาเฉพาะส่วนใสเก็บตัวอย่างวันเว้นวัน จากนั้นวิเคราะห์ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในแต่ละสายพันธุ์

4.3.1 การทดสอบการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารสูตร production

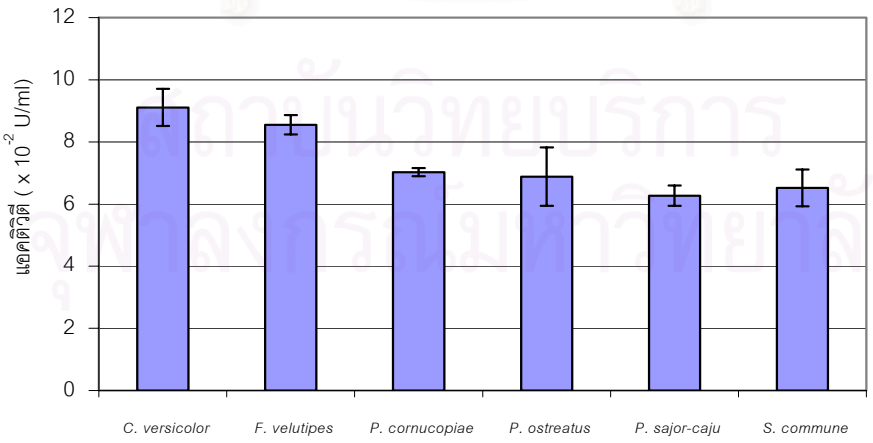
จากการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์พบว่าแต่ละสายพันธุ์ให้ค่าแอคติวิตีที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 5

จากผลการวิเคราะห์ที่ได้พบว่าในวันที่ 0 หรือเริ่มต้นการทดลองไม่สามารถวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ แต่เมื่อเวลาผ่านไปค่าแอคติวิตีจะเริ่มสูงขึ้นโดยจะสูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลองจากนั้นก็เริ่มลดลง ซึ่งเชื้อทุกสายพันธุ์จะให้ผลในทำนองเดียวกัน

ในระยะเวลาของการทดลองพบว่าเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์ให้ค่าแอคติวิตีสูงที่สุดในวันที่ 5 ของการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์พบว่าสายพันธุ์ *C. versicolor* ให้ค่าแอคติวิตีสูงที่สุดคือมีค่า 9.11×10^{-2} U/ml รองลงมาคือ *F. velutipes* ซึ่งมีค่าแอคติวิตีเอนไซม์ 8.55×10^{-2} U/ml ในขณะที่ *P. cornucopiae*, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* และ *S. commune* มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ 7.03×10^{-2} U/ml 6.88×10^{-2} U/ml 6.27×10^{-2} U/ml และ 6.52×10^{-2} U/ml ตามลำดับ แสดงผลเปรียบเทียบให้เห็นค่าที่ชัดเจนดังภาพที่ 14

ตารางที่ 5 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	ค่าแอคติวิตี (x 10^{-2} U/ml)				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
C. versicolor	0.00	5.34 ± 0.35	6.99 ± 0.28	9.11 ± 0.60	7.55 ± 0.10
F. velutipes	0.00	7.31 ± 0.75	7.67 ± 0.16	8.55 ± 0.31	8.39 ± 0.39
P. cornucopiae	0.00	4.31 ± 0.31	5.73 ± 0.16	7.03 ± 0.13	6.37 ± 0.14
P. ostreatus	0.00	2.51 ± 0.97	4.66 ± 0.33	6.88 ± 0.94	6.09 ± 0.96
P. sajor-caju	0.00	3.98 ± 0.75	4.49 ± 0.58	6.27 ± 0.33	5.88 ± 0.16
S. commune	0.00	3.30 ± 0.22	4.84 ± 0.29	6.52 ± 0.59	5.83 ± 0.85



ภาพที่ 14 ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์

4.3.2 การทดสอบการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในอาหารสูตร production

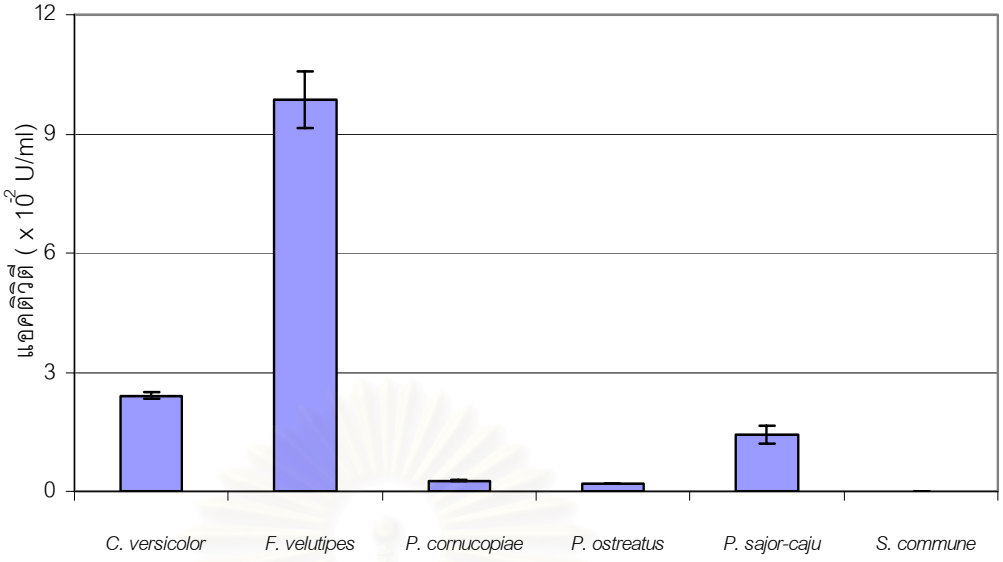
ศึกษาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์พบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์ให้ค่าแอคติวิตีที่แตกต่างกัน จากผลการวิเคราะห์พบว่าในวันที่ 0 หรือเริ่มต้นการทดลองจะไม่สามารถวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้แต่เมื่อเวลาผ่านไปเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซล์จึงเริ่มสามารถวัดค่าได้ ค่าแอคติวิตีจะเริ่มสูงขึ้นโดยจะสูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลอง จากนั้นค่าแอคติวิตีก็เริ่มลดลง ซึ่งเชื้อทุกสายพันธุ์จะให้ผลในทำนองเดียวกันยกเว้น *S. commune* ที่ไม่สามารถวัดค่าแอคติวิตีได้ในการทดลองครั้งนี้ โดยแสดงผลการวิเคราะห์ค่าแอคติวิตีแต่ละวันที่เก็บตัวอย่างของเชื้อ ดังตารางที่ 6

ในระยะเวลาที่ทำการทดลอง 7 วัน พบว่าในวันที่ 3 และวันที่ 5 ของการทดลองเชื้อรากลุ่มไวต์รอตให้ค่าแอคติวิตีสูงที่สุด โดยสายพันธุ์ *C. versicolor* และ *F. velutipes* ให้ค่าสูงในวันที่ 3 ในขณะที่ *P. cornucopiae*, *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* ให้ค่าสูงในวันที่ 5 ของการทดลอง ยกเว้น *S. commune* ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้

เมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์พบว่าสายพันธุ์ *F. velutipes* ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดคือ 9.86×10^{-2} U/ml รองลงมาคือ *C. versicolor* มีค่าแอคติวิตี 2.41×10^{-2} U/ml ในขณะที่ *P. cornucopiae*, *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ 0.27×10^{-2} U/ml 0.18×10^{-2} U/ml และ 1.43×10^{-2} U/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 15)

ตารางที่ 6 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	ค่าแอคติวิตี ($\times 10^{-2}$ U/ml)				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
C. versicolor	0.00	0.86 ± 0.35	2.41 ± 0.28	1.95 ± 0.60	1.71 ± 0.10
F. velutipes	0.00	0.20 ± 0.75	9.86 ± 0.16	5.13 ± 0.31	3.36 ± 0.39
P. cornucopiae	0.00	0.10 ± 0.31	0.13 ± 0.16	0.27 ± 0.13	0.18 ± 0.14
P. ostreatus	0.00	0.02 ± 0.97	0.05 ± 0.33	0.18 ± 0.94	0.06 ± 0.96
P. sajor-caju	0.00	0.04 ± 0.75	1.43 ± 0.58	1.43 ± 0.33	1.20 ± 0.16
S. commune	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00



ภาพที่ 15 ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากเชื้อรากลุ่มไวต์ร็อตแต่ละสายพันธ์

4.3.3 การทดสอบการผลิตเอนไซม์แลคเคสในอาหารสูตร production

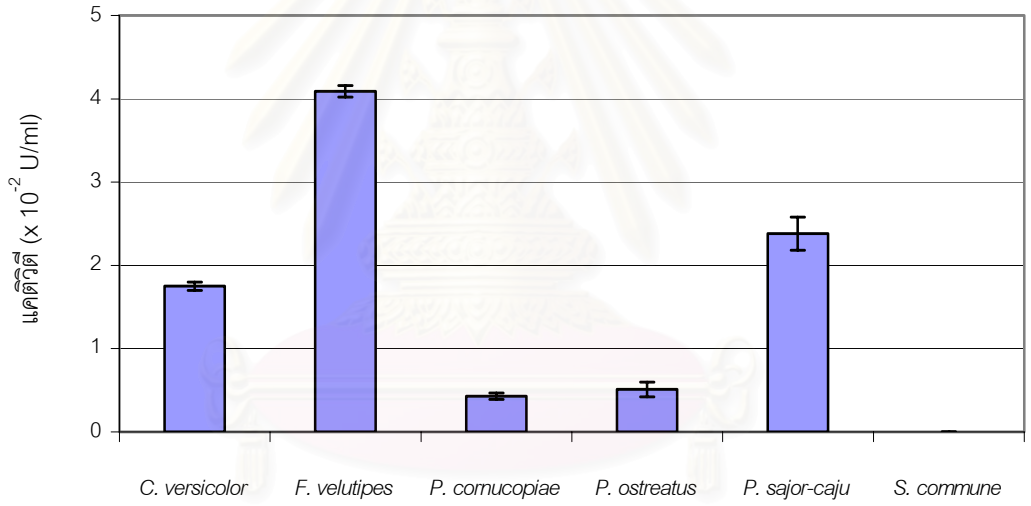
ศึกษาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสในเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์ให้ค่าแอคติวิตีแตกต่างกัน แสดงค่าแอคติวิตีในแต่ละวันที่เก็บตัวอย่างของเชื้อดังตารางที่ 7

จากตารางที่ 7 ศึกษาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสในเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ ในวันที่ 0 หรือเริ่มต้นการทดลองจะไม่สามารถวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสได้แต่เมื่อเวลาผ่านไปเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ได้จึงเริ่มสามารถวัดค่าได้ ค่าแอคติวิตีจะเริ่มสูงขึ้นโดยจะสูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลองจากนั้นก็เริ่มลดลง โดยเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะให้ผลไปในทำนองเดียวกันยกเว้น *S. commune* ที่ไม่สามารถวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสได้ในการทดลองนี้

ในระยะเวลาที่ทำการทดลองพบว่าเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทุกสายพันธุ์ให้ค่าแอคติวิตีสูงที่สุดในวันที่ 5 ของการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของเชื้อแต่ละสายพันธุ์พบว่าสายพันธุ์ *F. velutipes* มีค่าแอคติวิตีสูงที่สุดคือ 4.09×10^{-2} U/ml รองลงมาคือ *P. sajor-caju* ซึ่งมีค่าแอคติวิตี 2.38×10^{-2} U/ml ในขณะที่ *C. versicolor*, *P. cornucopiae* และ *P. ostreatus* มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ 1.75×10^{-2} U/ml 0.43×10^{-2} U/ml และ 0.51×10^{-2} U/ml ตามลำดับ ยกเว้น *S. commune* เพียงเชื้อเดียวที่ในการทดลองนี้ไม่สามารถวัดค่าแอคติวิตีได้ (ภาพที่ 16)

ตารางที่ 7 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์

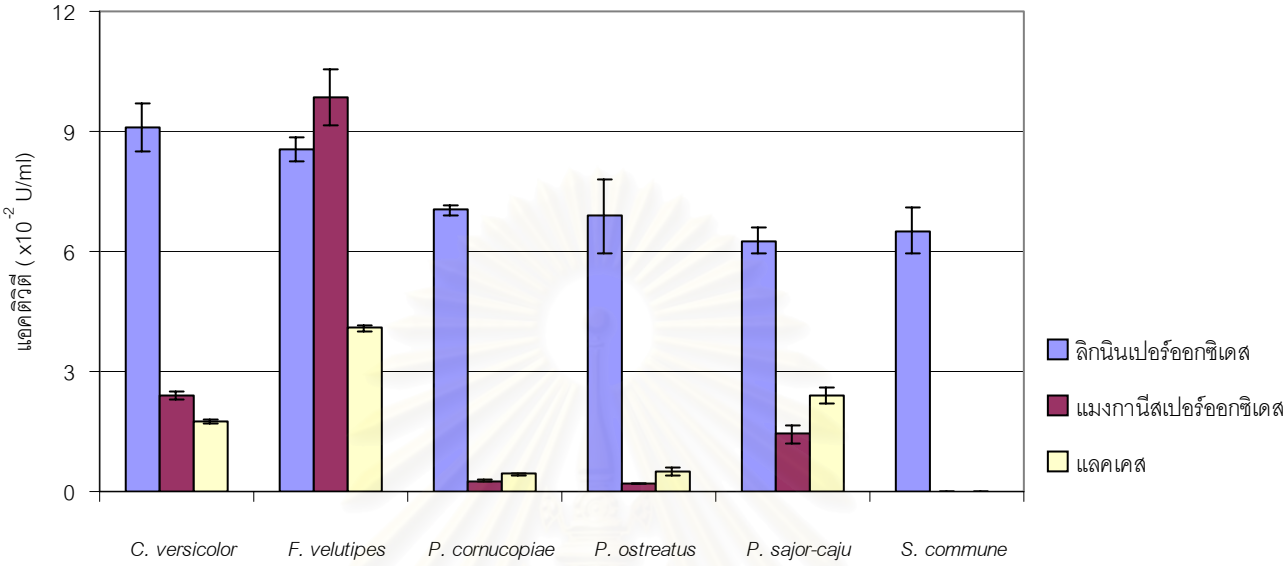
	ค่าแอคติวิตี (x 10^{-2} U/ml)				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
C. versicolor	0.00	0.78 ± 0.05	0.85 ± 0.11	1.75 ± 0.05	1.22 ± 0.17
F. velutipes	0.00	0.12 ± 0.02	0.93 ± 0.18	4.09 ± 0.07	1.70 ± 0.43
P. cornucopiae	0.00	0.05 ± 0.01	0.25 ± 0.09	0.43 ± 0.04	0.31 ± 0.08
P. ostreatus	0.00	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.04	0.51 ± 0.09	0.27 ± 0.04
P. sajor-caju	0.00	0.05 ± 0.05	1.36 ± 0.10	2.38 ± 0.03	0.76 ± 0.20
S.commune	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00



ภาพที่ 16 ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์

ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสที่ผลิตโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแสดงดังภาพที่ 17 พบว่าเชื้อเกือบทุกสายพันธุ์ ค่าแอคติวิตีเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสสูงกว่าค่าแอคติวิตีเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และมีเพียงสายพันธุ์ *S. commune* เพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่ในการทดลองนี้สามารถวิเคราะห์ค่าแอคติวิตีได้เฉพาะเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสเพียงเอนไซม์เดียวเท่านั้น และเมื่อดูผลโดยรวมของทุกเชื้อพบว่า *F. velutipes* ให้ค่าโดยรวมของกลุ่มเอนไซม์นี้สูงที่สุด รองลงมาคือ *C. versicolor* แต่เนื่องจากในข้อที่ 4.2 ซึ่งหาค่า specific activity ของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส *C. versicolor* ให้ค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ดังนั้นผลการวิเคราะห์ในข้อ 4.3 นี้

ระหว่างสายพันธุ์ *F. velutipes* และ *C. versicolor* สายพันธุ์ *C. versicolor* จะเป็นตัวที่ให้ความสนใจมากกว่า



ภาพที่ 17 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส

4.4 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของเซลลูโลสโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

เอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยกลุ่มเอนไซม์หลักๆ 3 ชนิดด้วยกันคือเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนสและบีตา-กลูโคซิเดสซึ่งทำงานร่วมกัน ดังนั้นในการทดลองจึงทำการศึกษาเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด หาค่าแอคติวิตีของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร production (ภาคผนวก ก ข้อ5) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 rpm เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด โดยเก็บทุกๆ 2 วัน จนกระทั่งค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เริ่มมีแนวโน้มลดลง

4.4.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส

จากตารางที่ 8 ศึกษาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส ในเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์ให้ค่าแอคติวิตีแตกต่างกัน จากผลการวิเคราะห์ที่ได้พบว่าในวันที่ 0 หรือเริ่มต้นการทดลองจะสามารถวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้เพียงเล็กน้อยและค่าแอคติวิตีจะเริ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอตมีการผลิตแอคติวิตีเอนไซม์ออกมานอกเซลล์จึงเริ่มสามารถวัดค่าได้ มีสูงสุดในวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง จากนั้นค่าแอคติวิตีก็เริ่มคงที่และลดลง ซึ่งเชื้อทุกสายพันธุ์จะให้ผลในทำนองเดียวกัน

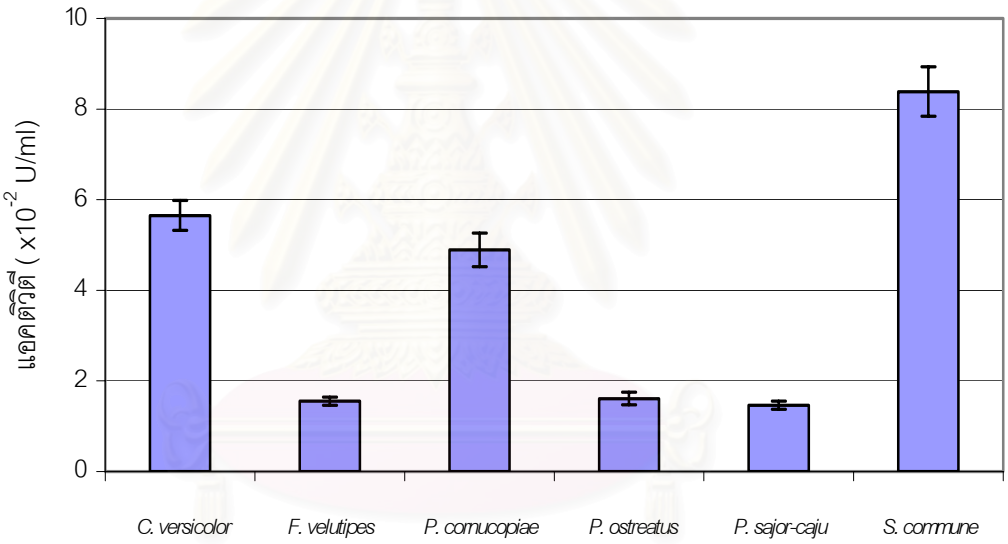
ตารางที่ 8 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	ค่าแอคติวิตี (x 10^{-2} U/ml)				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
C. versicolor	0.182 ± 0.091	0.547 ± 0.091	0.912 ± 0.091	5.653 ± 0.329	5.227 ± 0.593
F. velutipes	0.122 ± 0.053	0.456 ± 0.091	0.669 ± 0.053	1.094 ± 0.091	1.550 ± 0.091
P. cornucopiae	0.152 ± 0.053	0.517 ± 0.053	0.881 ± 0.053	4.893 ± 0.368	3.921 ± 0.158
P. ostreatus	0.091 ± 0.091	0.456 ± 0.091	1.337 ± 0.053	1.185 ± 0.158	1.611 ± 0.139
P. sajor-caju	0.122 ± 0.053	0.638 ± 0.091	1.125 ± 0.139	1.459 ± 0.091	0.790 ± 0.139
S. commune	0.091 ± 0.091	1.915 ± 0.569	3.465 ± 0.688	7.689 ± 0.502	8.388 ± 0.547

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในเวลาที่แตกต่างกันไปในระยะเวลาที่ทำการทดลอง โดยพบว่าเวลาที่สายพันธุ์ต่างๆ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีอยู่ในช่วงวันที่ 5 และวันที่ 7 ของการทดลอง โดยสายพันธุ์ *C. versicolor*, *P. cornucopiae* และ *P. sajor-caju* มีค่าแอคติวิตีสูงในวันที่ 5 ในขณะที่ *F. velutipes*, *P. ostreatus* และ *S. commune* มีค่าแอคติวิตีสูงสุดในวันที่ 7

และเมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสที่ได้จากเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์พบว่าสายพันธ์ *S. commune* มีค่าแอคติวิตีสูงที่สุดคือ 8.388×10^{-2} U/ml รองลงมาคือ *C. versicolor* ซึ่งมีค่าแอคติวิตี 5.653×10^{-2} U/ml ในขณะที่สายพันธุ์ *F. velutipes*, *P.* cornucopiae, *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ 1.550×10^{-2} U/ml 4.893×10^{-2} U/ml 1.611×10^{-2} U/ml และ 1.459×10^{-2} U/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสจากเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์

4.4.2 การทดสอบการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส

จากตารางที่ 9 ศึกษาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์พบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์ให้ค่าแอคติวิตีแตกต่างกัน จากผลที่ได้พบว่าในวันที่ 0 หรือเริ่มต้นการทดลองจะสามารถวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้เพียงเล็กน้อยแต่เมื่อเวลาผ่านไปเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ ค่าแอคติวิตีจะเริ่มสูงขึ้น โดยจะสูงสุดในวันที่ 5 และ 7 ของ

การทดลอง จากนั้นค่าแอคติวิตีก็เริ่มคงที่และลดลง ซึ่งเชื้อทุกสายพันธุ์จะให้ผลไปในทำนองเดียวกัน

ในระยะเวลาที่ทำการทดลองนั้นจะใช้เวลานานกว่าการศึกษาเอนไซม์ตัวอื่นๆโดยพบว่าในวันที่เริ่มต้นและวันที่ 1 ของการทดลอง ค่าแอคติวิตีที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์จะใกล้เคียงกันมาก จากนั้นจะเริ่มให้ค่าที่แตกต่างกันตามความสามารถในการผลิตของแต่ละสายพันธุ์ วันที่ 9 ของการทดลองเกือบทุกสายพันธุ์ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่สูง ยกเว้น *P. sajor-caju* เพียงสายพันธุ์เดียวที่ให้ค่าสูงในวันที่ 7

เปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่ได้จากเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์พบว่าสายพันธ์ *P. cornucopiae* มีค่าแอคติวิตีสูงที่สุด 28.113×10^{-2} U/ml รองลงมาคือสายพันธุ์ *F. velutipes* ซึ่งมีค่าแอคติวิตี 26.480×10^{-2} U/ml ในขณะที่ *C. versicolor*, *P.* ostreatus, *P. sajor-caju* และ *S. commune* มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ 23.639×10^{-2} U/ml 17.834×10^{-2} U/ml 20.979×10^{-2} U/ml และ 25.392×10^{-2} U/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 19) ซึ่งจะเห็นว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส จะมีค่าสูงเมื่อเทียบกับเอนไซม์อื่นๆ ในกลุ่มเดียวกัน

4.4.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส ในอาหารสูตร production

จากตารางที่ 10 ศึกษาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ ในเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ในวันที่ 0 หรือเริ่มต้นการทดลอง จะสามารถวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสได้เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเวลาผ่านไปเชื้อผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซล์ได้ จึงเริ่มสามารถวัดค่าแอคติวิตีได้ ค่าแอคติวิตีจะเริ่มสูงขึ้นโดยจะสูงสุดในวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง จากนั้นค่าแอคติวิตีก็เริ่มคงที่และลดลง ซึ่งเชื้อทุกสายพันธุ์จะให้ผลในทำนองเดียวกัน

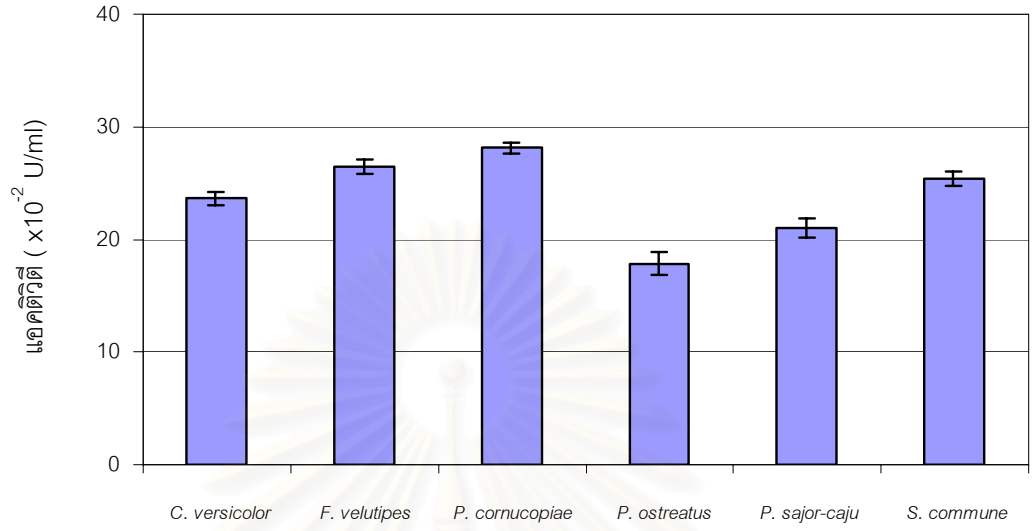
ในเวลาที่แตกต่างกันไปในระยะเวลาที่ทำการทดลอง โดยพบว่าเวลาที่สายพันธุ์ต่างๆสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีอยู่ในช่วงวันที่ 5 และวันที่ 7 ของการทดลองโดยเชื้อ *C. versicolor*, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* และ *S. commune* แอคติวิตีมีค่าสูงในวันที่ 5 และเชื้อ *F. velutipes* และ *P. cornucopiae* ค่าแอคติวิตีมีค่าสูงในวันที่ 7

เมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสที่ได้จากเชื้อไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์พบว่าสายพันธ์ *S. commune* มีค่าแอคติวิตีสูงที่สุดคือ 17.291×10^{-2} U/ml รองลงมาคือ *C. versicolor* มีค่าแอคติวิตี 13.603×10^{-2} U/ml โดยให้ผลทำนองเดียวกันกับผลของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส ในขณะที่ *F.* velutipes, *P. cornucopiae*, *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ 4.776×10^{-2} U/ml 3.567×10^{-2} U/ml 4.413×10^{-2} U/ml และ 2.539×10^{-2} U/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 20) (ภาพที่ 20)

ตารางที่ 9 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	ค่าแอคติวิตี (x 10^{-2} U/ml)						
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 9	วันที่ 11
C. versicolor	0.181 ± 0.181	0.484 ± 0.105	0.786 ± 0.209	1.511 ± 0.687	15.054 ± 0.654	23.639 ± 0.583	13.542 ± 0.930
F. velutipes	0.181 ± 0.181	0.484 ± 0.277	3.567 ± 0.733	4.655 ± 0.456	13.905 ± 0.895	26.480 ± 0.654	23.276 ± 0.733
P. cornucopiae	0.060 ± 0.105	0.363 ± 0.181	2.176 ± 0.181	5.078 ± 0.831	15.296 ± 0.554	28.113 ± 0.480	15.477 ± 0.999
P. ostreatus	0.121 ± 0.105	0.544 ± 0.181	1.330 ± 0.378	4.776 ± 0.277	15.235 ± 0.363	17.834 ± 0.998	14.812 ± 0.895
P. sajor-caju	0.060 ± 0.105	0.544 ± 0.181	1.209 ± 0.378	5.260 ± 0.314	20.979 ± 0.838	17.835 ± 0.999	10.399 ± 0.554
S. commune	0.242 ± 0.271	0.544 ± 0.181	2.237 ± 0.181	2.237 ± 0.831	23.397 ± 0.544	25.392 ± 0.654	18.621 ± 0.755

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



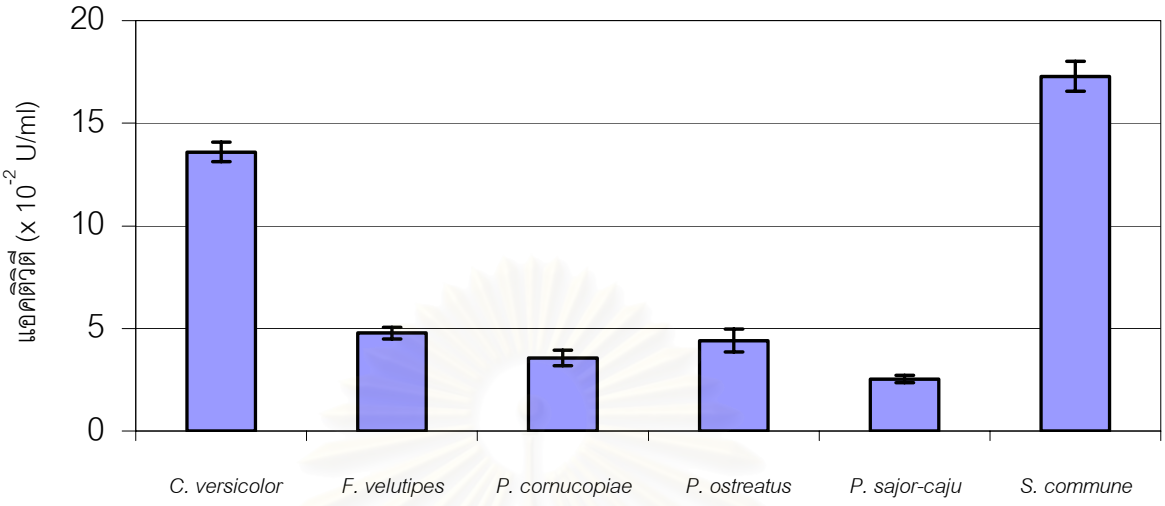
ภาพที่ 19 ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์

ในการวิเคราะห์ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสอันได้แก่เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอตนั้น พบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสสูง ในขณะที่ค่าแอคติวิตีที่ได้จากเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสและเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสจะมีค่าแอคติวิตีที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยแสดงการเปรียบเทียบดังภาพที่ 21 ยกเว้นเพียงสายพันธุ์ *S. commune* และ *C. versicolor* ที่จะให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสสูงกว่าเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสอย่างเห็นได้ชัดซึ่งต่างจากสายพันธุ์อื่น ในการดูผลโดยรวมพบว่าสายพันธุ์ *S. commune* และ *C. versicolor* ให้ผลของค่าแอคติวิตีของทั้ง 3 เอนไซม์ที่ดีใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาจากข้อที่ผ่านมาพบว่าสายพันธุ์ *C. versicolor* เป็นเชื้อที่ให้ความสนใจซึ่งจะเลือกไปใช้ในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอตในข้อต่อไป

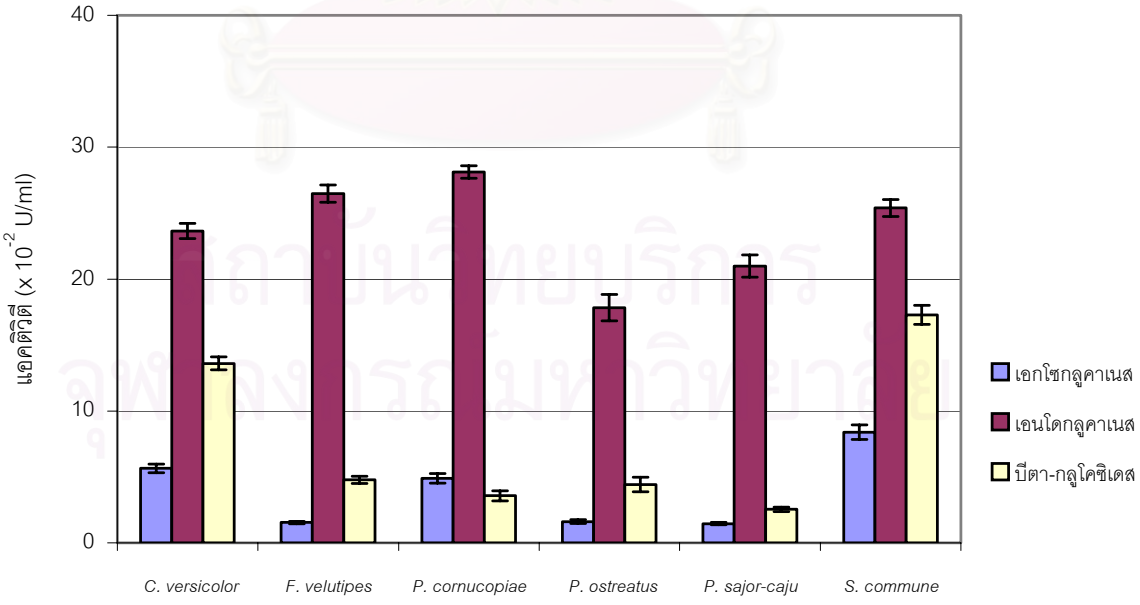
ตารางที่ 10 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	ค่าแอคติวิตี (x 10^{-2} U/ml)				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
C. versicolor	0.121 ± 0.105	0.846 ± 0.105	1.330 ± 0.456	13.603 ± 0.480	8.464 ± 0.818
F. velutipes	0.060 ± 0.105	1.209 ± 0.277	1.632 ± 0.181	3.204 ± 0.895	4.776 ± 0.277
P. cornucopiae	0.060 ± 0.105	0.544 ± 0.181	1.088 ± 0.181	1.209 ± 0.456	3.567 ± 0.378
P. ostreatus	0.121 ± 0.105	0.786 ± 0.105	1.088 ± 0.480	4.413 ± 0.554	3.325 ± 0.209
P. sajor-caju	0.242 ± 0.209	0.544 ± 0.363	0.846 ± 0.105	2.539 ± 0.181	1.995 ± 0.181
S. commune	0.242 ± 0.105	1.572 ± 0.456	5.078 ± 0.831	17.291 ± 0.733	16.565 ± 0.419

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 20 ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสจากเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์



ภาพที่ 21 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดส

4.5 การผลิตเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

จากการศึกษาเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอันได้แก่ เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส (ข้อ 4.2) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของลิกนิน (ข้อ 4.3) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของเซลลูโลส (ข้อ 4.4) ในการศึกษาเชื้อรากลุ่มไวต์รอตทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่า *C. versicolor* ให้ผลของค่าแอคติวิตีที่สูงในกลุ่มเอนไซม์ในแต่ละหัวข้อเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ *C. versicolor* มาใช้ในขั้นตอนการทดลองเพื่อผลิตเป็นเอทานอล

4.5.1 การใช้กลูโคสเป็นสับสเตรต

นำเชื้อสายพันธุ์ *C. versicolor* มาหมักในระดับขวดเขย่าเป็นเวลา 15 วัน โดยใช้อาหารสูตร Production 4 มีกลูโคสเป็นสับสเตรต (ภาคผนวก ก ข้อ6) ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ และการเจริญของเชื้อ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 22)

จากผลการทดลองพบว่าในการใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง จากนั้นค่าความเข้มข้นเอทานอลจะเริ่มลดลง ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันทั้ง 3 ความเข้มข้นของกลูโคส และเมื่อเปรียบเทียบกันทั้ง 3 ความเข้มข้นของกลูโคสพบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรให้ค่าความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสอื่นๆ คือมีค่าความเข้มข้นเอทานอล 2.193 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการทดลอง นั่นคือเมื่อความเข้มข้นกลูโคสเพิ่มขึ้นความเข้มข้นเอทานอลจะเพิ่มขึ้นสำหรับการทดลองครั้งนี้

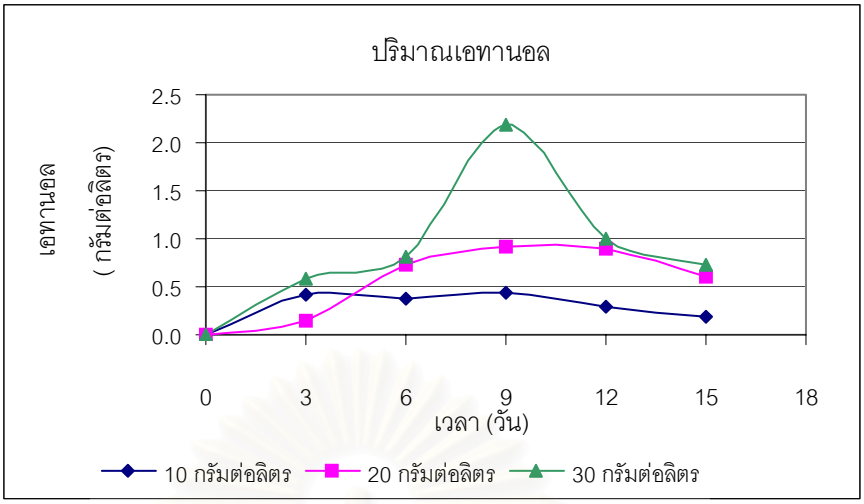
ในการศึกษาการเจริญของสายพันธุ์ *C. versicolor* โดยทำการชั่งน้ำหนักเส้นใยแห้งจากวันที่เริ่มการทดลองจนสิ้นสุดการทดลอง พบว่าน้ำหนักเส้นใยจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆนั่นคือเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันทั้ง 3 ความเข้มข้นของกลูโคส และเมื่อเปรียบเทียบกันทั้ง 3 ความเข้มข้นของกลูโคส พบว่าเชื้อจะเจริญใกล้เคียงกันทั้ง 3 ความเข้มข้นของกลูโคส โดยมีค่าการเจริญสูงสุดประมาณ 2.06-2.66 กรัมต่อลิตร ประมาณวันที่ 12 ของการทดลอง

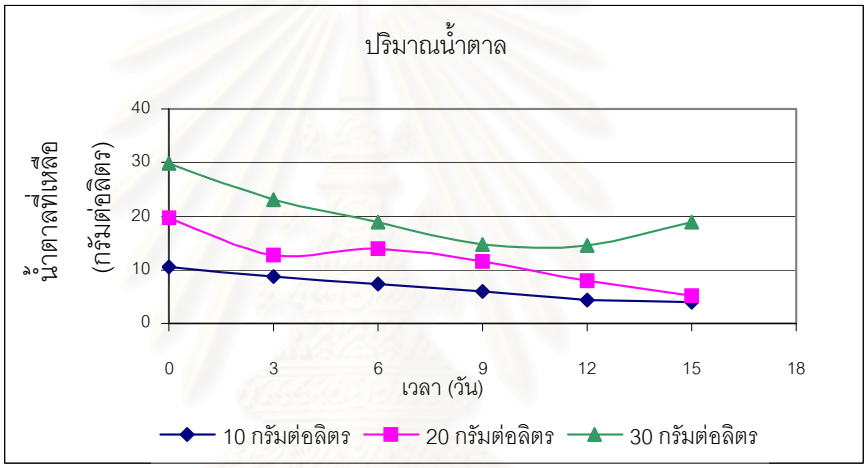
ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในน้ำหมักในแต่ละช่วงการทดลอง จากผลการทดลองพบว่าในการใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้นต่างๆปริมาณน้ำตาลจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าเชื้อมีการนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญของเชื้อและการผลิตเอทานอล ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันทั้ง 3 ความเข้มข้นของกลูโคส

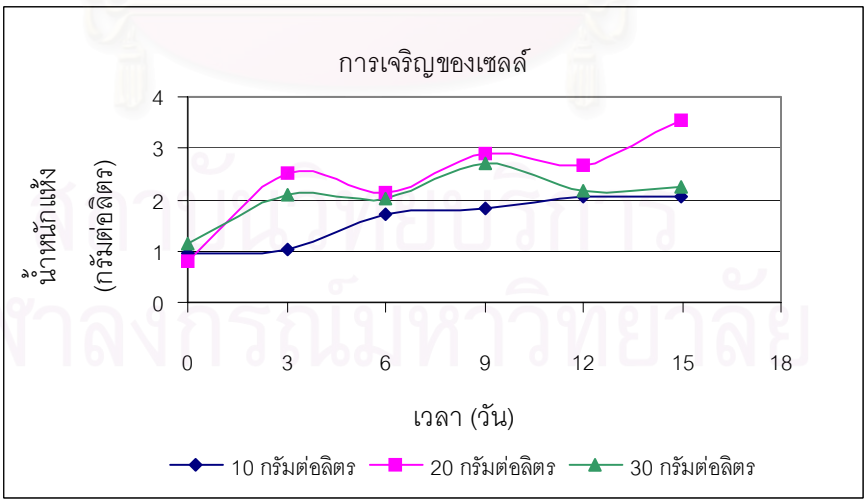
ตารางที่ 11 ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่และการเจริญของเชื้อที่ได้จากการใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร 20 กรัมต่อลิตรและ 30 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

เวลา (วัน)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			การเจริญ (กรัมต่อลิตร)			ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)		
	กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร	กลูโคส20 กรัมต่อลิตร	กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร	กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร	กลูโคส20 กรัมต่อลิตร	กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร	กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร	กลูโคส20 กรัมต่อลิตร	กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร
0	0.000	0.000	0.000	0.954	0.781	1.155	10.64	19.67	29.79
3	0.413	0.143	0.580	1.039	2.514	2.109	8.84	12.75	23.14
6	0.372	0.720	0.819	1.715	2.115	2.011	7.43	13.99	18.98
9	0.440	0.910	2.193	1.826	2.882	2.711	6.01	11.64	14.64
12	0.405	0.896	1.005	2.061	2.662	2.189	4.32	8.04	14.45
15	0.182	0.605	0.724	2.075	3.559	2.253	3.93	5.13	18.98

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย







ภาพที่ 22 ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่และการเจริญของเชื้อที่ได้จากการใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร 20 กรัมต่อลิตร และ 30 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

4.5.2 การใช้เซลลูโลสเป็นสับสเตรต

เนื่องจากในธรรมชาติวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีอัตราส่วนที่มากกว่าเมื่อเทียบกับเฮมิเซลลูโลสดังนั้นจึงทำการทดลองโดยใช้เซลลูโลสเป็นสับสเตรต แต่เนื่องจากต้องการมุ่งเน้นศึกษาเชื้อรากลุ่มไวต์รอตว่าสามารถผลิตเอทานอลได้หรือไม่เป็นหลักสำคัญ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เซลลูโลสบริสุทธิ์ (commercial cellulose) เป็นสับสเตรตทั้งนี้เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนจากสารอื่นๆซึ่งอาจมีผลกระทบต่อการทดลอง ซึ่งผลที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานในกรณีที่ทำการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลให้สูงขึ้น หรือในการนำตัวอย่างเซลลูโลสที่มีอยู่ในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้จริงในงานวิจัยต่อไปในอนาคต

จากผลการทดลองข้อ 4.5.1 ในการเลือกใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตโดยใช้สายพันธุ์ *C. versicolor* พบว่าสามารถที่จะผลิตเอทานอลโดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตได้ ดังนั้นจึงนำเชื้อ *C. versicolor* มาหมักในระดับขวดเขย่าเป็นเวลา 15 วัน ใช้อาหารสูตร Production 4 มีเซลลูโลสเป็นสับสเตรต (ภาคผนวก ก ข้อ6) ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ในการทดลองใช้เซลลูโลส 2 ชนิดคือ Carboxymethyl cellulose (CMC) ซึ่งเป็นเซลลูโลสที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้สูง และ Microcrystalline cellulose (Avicel) ซึ่งเป็นเซลลูโลสที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำ

4.5.2.1 ใช้เซลลูโลสชนิด Carboxymethyl cellulose (CMC)

นำเชื้อ *C. versicolor* มาหมักในระดับขวดเขย่าเป็นเวลา 15 วัน ใช้อาหารสูตร Production 4 มี CMC เป็นสับสเตรต (ภาคผนวก ก ข้อ6) ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลองคือ การทดลองที่มีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจนต่ำ (ammonium tartrate 0.2 กรัมต่อลิตร) และการทดลองที่มีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจนสูง (ammonium tartrate 2.0 กรัมต่อลิตร)

4.5.2.1.1 การทดลองที่มีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจนต่ำ

วิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 12 และภาพที่ 23) การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส (ตารางที่ 13 และภาพที่ 24)

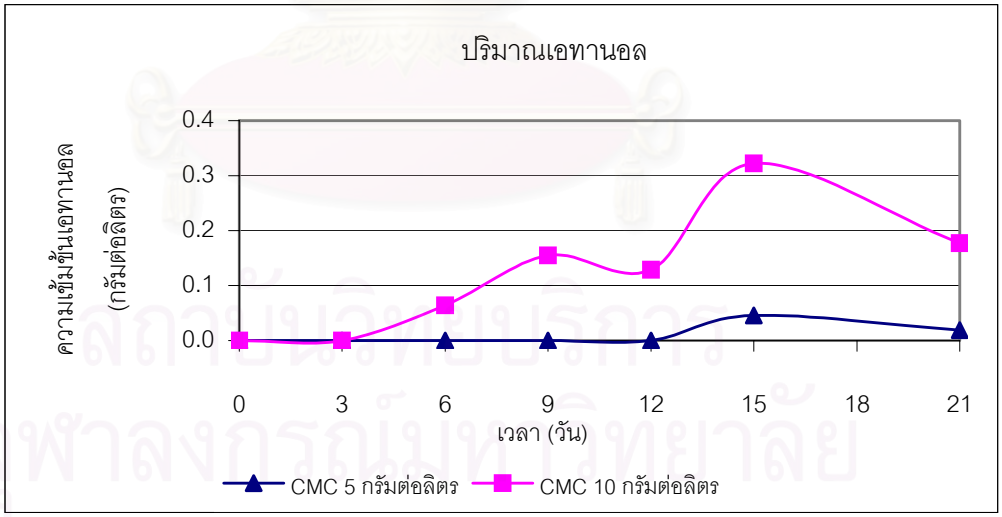
ในการใช้เซลลูโลสชนิด CMC เป็นสับสเตรต ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักในระดับขวดเขย่าและมีความความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร ตารางที่ 12 และภาพที่ 23 แสดงค่าความเข้มข้นเอทานอล พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่สามารถวัดค่าได้จะเกิดขึ้นในช่วงวันที่ 6 ของการทดลอง โดยจะมีความเข้มข้นสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 15 ของการทดลอง จากนั้นความเข้มข้นของเอทานอลจะเริ่มลดลง ซึ่งทั้ง 2 ความเข้มข้นของ CMC ให้ผลในทำนองเดียวกันและเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอลระหว่าง 2 ความเข้มข้น พบว่าที่ความเข้มข้น CMC 10 กรัมต่อลิตรให้ค่าความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่าที่ความเข้มข้น CMC 5 กรัมต่อลิตร คือมีค่าความเข้มข้นเอทานอล 0.322 และ 0.046 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และตารางที่ 13 และภาพที่ 24 แสดงค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสได้แก่ เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนสและบีตา-กลูโคซิเดส พบว่าสามารถวิเคราะห์ค่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดได้ *C. versicolor* สามารถมีเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสชนิด CMC ได้โดยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสจะให้ค่าแอคติวิตีสูงกว่าเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส คือมีค่า 4.689×10^{-2} U/ml 4.314×10^{-2} U/ml และ 1.556×10^{-2} U/ml ตามลำดับ ในวันที่ 9 ของการทดลองเมื่อใช้ CMC ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

4.5.2.1.2 การทดลองในที่มีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจนสูง

ในการใช้เซลลูโลสชนิด CMC เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตรโดยทำการหมักในระดับขวดเขย่าและมีความความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร แสดงผลดังตารางที่ 14 และภาพที่ 25 ซึ่งแสดงค่าของความเข้มข้นเอทานอล ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอลพบว่าจะมีความเข้มข้นเอทานอลเกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันทั้ง 2 ความเข้มข้นของ CMC เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอลระหว่าง 2 ความเข้มข้น พบว่าที่ความเข้มข้น CMC 5 กรัมต่อลิตรและ ความเข้มข้น CMC 10 กรัมต่อลิตร ให้ค่าความเข้มข้นเอทานอลใกล้เคียงกันคือ 0.038 และ 0.031 กรัมต่อลิตร แสดงว่าที่ภาวะการใช้ความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตรอาจไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล ทั้งนี้เมื่อเทียบกับเซลลูโลสชนิดเดียวกันที่ความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 12 ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

เวลา (วัน)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	
	CMC 5 กรัมต่อลิตร	CMC 10 กรัมต่อลิตร
0	0.000	0.000
3	0.000	0.000
6	0.000	0.064
9	0.000	0.155
12	0.000	0.129
15	0.046	0.322
21	0.019	0.177

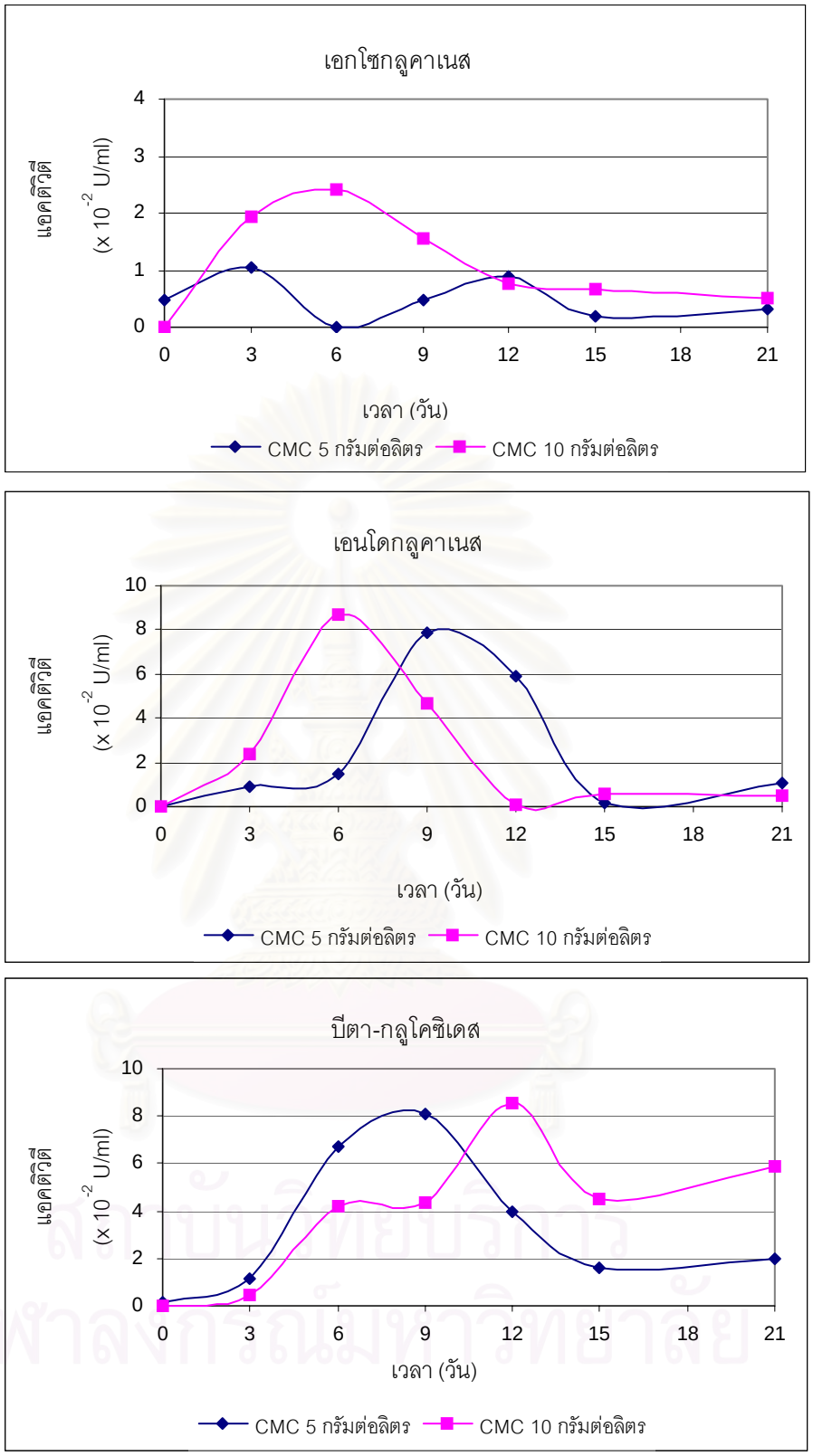


ภาพที่ 23 ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตรและมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

ตารางที่ 13 ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

เวลา (วัน)	เอกโซกลูคาเนส(x 10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		เอนโดกลูคาเนส (x 10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		บีตา-กลูโคซิเดส(x 10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
	CMC 5 กรัมต่อลิตร	CMC 10 กรัมต่อลิตร	CMC 5 กรัมต่อลิตร	CMC 10 กรัมต่อลิตร	CMC 5 กรัมต่อลิตร	CMC 10 กรัมต่อลิตร
0	0.471	0.000	0.000	0.000	0.188	0.000
3	1.037	1.933	0.938	2.345	1.125	0.469
6	0.000	2.405	1.501	8.722	6.753	4.221
9	0.471	1.556	7.878	4.689	8.066	4.314
12	0.896	0.754	5.909	0.094	3.939	8.535
15	0.189	0.660	0.188	0.563	1.594	4.502
21	0.330	0.519	1.032	0.469	1.970	5.909

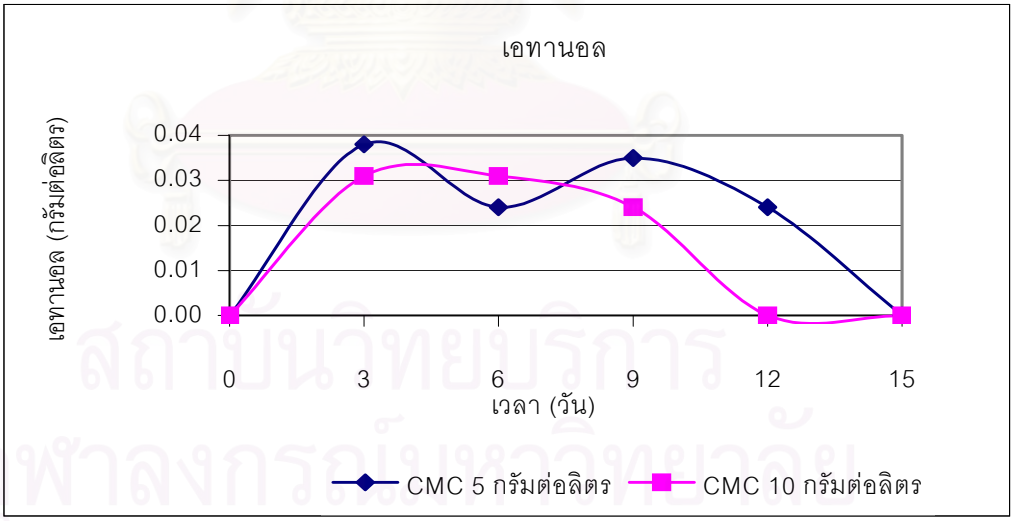
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 24 ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

ตารางที่ 14 ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

เวลา (วัน)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	
	CMC 5 กรัมต่อลิตร	CMC 10 กรัมต่อลิตร
0	0.000	0.000
3	0.038	0.031
6	0.024	0.031
9	0.035	0.024
12	0.024	0.000
15	0.000	0.000



ภาพที่ 25 ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C .versicolor*

ตารางที่ 15 และภาพที่ 26 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนสและบีตา-กลูโคซิเดส สามารถวิเคราะห์หาค่าแอคติวิตีเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดได้ แสดงว่าเซลลูเลสชนิด CMC สามารถถูกย่อยสลายได้ โดยเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสจะให้ค่าแอคติวิตีสูงกว่าเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสและเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสคือมีค่าแอคติวิตี 11.911×10^{-2} U/ml 4.809×10^{-2} U/ml และ 3.283×10^{-2} U/ml ในวันที่ 6 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้น CMC 10 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองใช้ CMC เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร และสารแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.2 และ 2.0 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี CMC 10 กรัมต่อลิตร และสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตรจะให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ 0.322 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการทดลอง นอกจากนี้พบว่าที่สารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร จะให้ความเข้มข้นเอทานอล 0.031 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้น CMC เดียวกัน

4.5.2.2 ใช้เซลลูโลสชนิด Microcrystalline cellulose (Avicel)

นำเชื้อ *C. versicolor* มาหมักในระดับขวดเขย่าเป็นเวลา 15 วัน ใช้อาหารสูตร Production4 มี Avicel เป็นสับสเตรต (ภาคผนวก ก ข้อ6) มีความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลองคือ การทดลองที่มีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจนเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร และการทดลองที่มีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจนเริ่มต้น 2.0 กรัมต่อลิตร

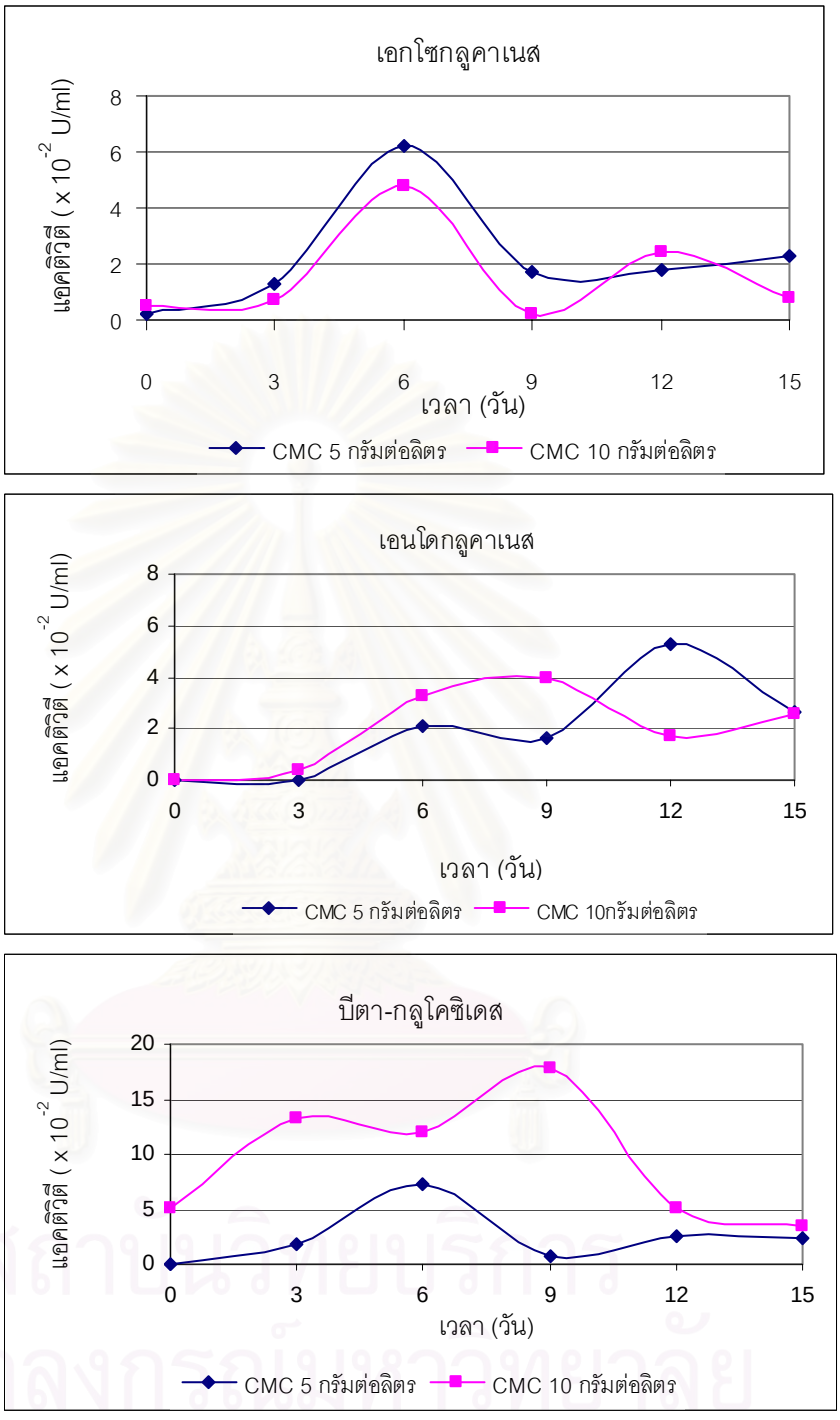
4.5.2.2.1 การทดลองที่มีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจนต่ำ

วิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 16 และภาพที่ 27) การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส (ตารางที่ 17 และภาพที่ 28) ในการทดลองโดยใช้เซลลูโลสชนิด Avicel เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักในระดับขวดเขย่า และมีความความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร แสดงผลดังตารางที่ 16 และภาพที่ 27 ซึ่งแสดงค่าของความเข้มข้นเอทานอล ความเข้มข้นเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 15 ของการทดลอง ค่าจะเริ่มลดลง ที่ความเข้มข้น Avicel 10 กรัมต่อลิตร ให้ค่าความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่าที่ความเข้มข้น Avicel 5 กรัมต่อลิตร คือมีค่าความเข้มข้นของเอทานอล 0.638 และ 0.257 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีสัดส่วนมากกว่าประมาณ 2 เท่า

ตารางที่ 15 ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

เวลา (วัน)	เอกโซกลูคาเนส(x 10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		เอนโดกลูคาเนส (x 10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		บีตา-กลูโคซิเดส(x 10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
	CMC 5 กรัมต่อลิตร	CMC 10 กรัมต่อลิตร	CMC 5 กรัมต่อลิตร	CMC 10 กรัมต่อลิตร	CMC 5 กรัมต่อลิตร	CMC 10 กรัมต่อลิตร
0	0.236	0.471	0.000	0.000	0.000	5.158
3	1.273	0.707	0.000	0.375	1.876	13.224
6	6.224	4.809	2.063	3.283	7.316	11.911
9	1.744	0.236	1.594	3.939	0.657	17.820
12	1.792	2.405	5.252	1.688	2.626	5.065
15	2.263	0.802	2.626	2.532	2.439	3.376

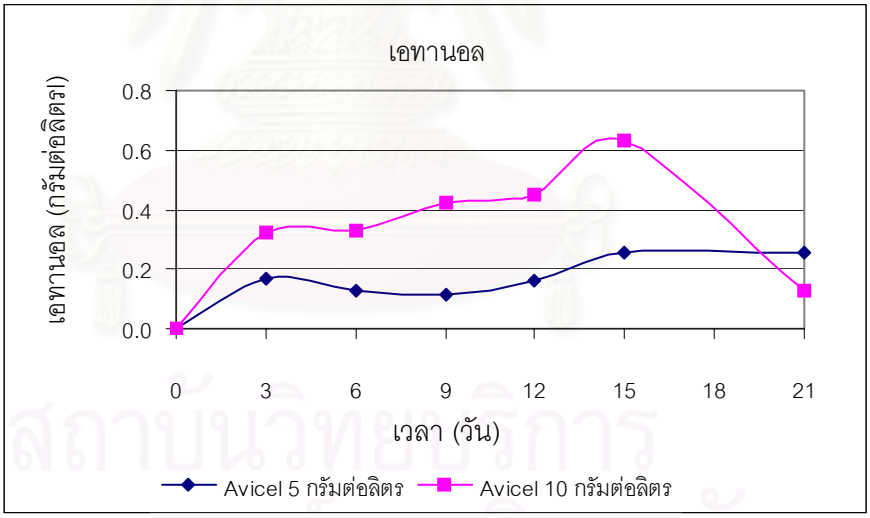
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 26 ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ CMC เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

ตารางที่ 16 ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

เวลา (วัน)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	
	Avicel 5 กรัมต่อลิตร	Avicel 10 กรัมต่อลิตร
0	0.000	0.000
3	0.166	0.323
6	0.131	0.330
9	0.115	0.424
12	0.158	0.450
15	0.257	0.634
21	0.255	0.128



ภาพที่ 27 ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรต ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 และภาพที่ 28 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลส อันได้แก่ เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนสและบีตา-กลูโคซิเดส สามารถวิเคราะห์หาค่าเอนไซม์ทั้ง 3 ได้ โดยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจะให้ค่าแอคติวิตีสูงกว่าเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส และเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสเอนไซม์ คือมีค่าแอคติวิตี $20.728x10^{-2}$ U/ml $4.008x10^{-2}$ U/ml และ $4.314x10^{-2}$ U/ml ตามลำดับ ในวันที่ 9 ของการทดลองที่ความเข้มข้น Avicel 10 กรัมต่อลิตร และค่าแอคติวิตีที่ได้จากทั้ง 2 ความเข้มข้นของ Avicel จะให้ค่าที่ใกล้เคียงกันในเอนไซม์แต่ละชนิด

4.5.2.2.2 การทดลองที่มีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจนสูง

วิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 18 และภาพที่ 29) การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส (ตารางที่ 19 และภาพที่ 30) ในการทดลองโดยใช้เซลลูโลสชนิด Avicel

ในการใช้เซลลูโลสชนิด Acivel เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตรโดยทำการหมักในระดับขวดเขย่า และมีความความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร แสดงผลดังตารางที่ 18 และภาพที่ 29 ซึ่งแสดงค่าของความเข้มข้นเอทานอล

ความเข้มข้นเอทานอลจะมีเกิดขึ้นในปริมาณที่น้อย ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันทั้ง 2 ความเข้มข้นของ Avicel ที่ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร และวันที่ 15 ของการทดลองไม่สามารถวิเคราะห์ค่าได้ โดยความเข้มข้นที่วัดได้สูงสุดอยู่ในวันที่ 6 ของการทดลอง มีค่า 0.034 และ 0.013 กรัมต่อลิตรของ Avicel ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

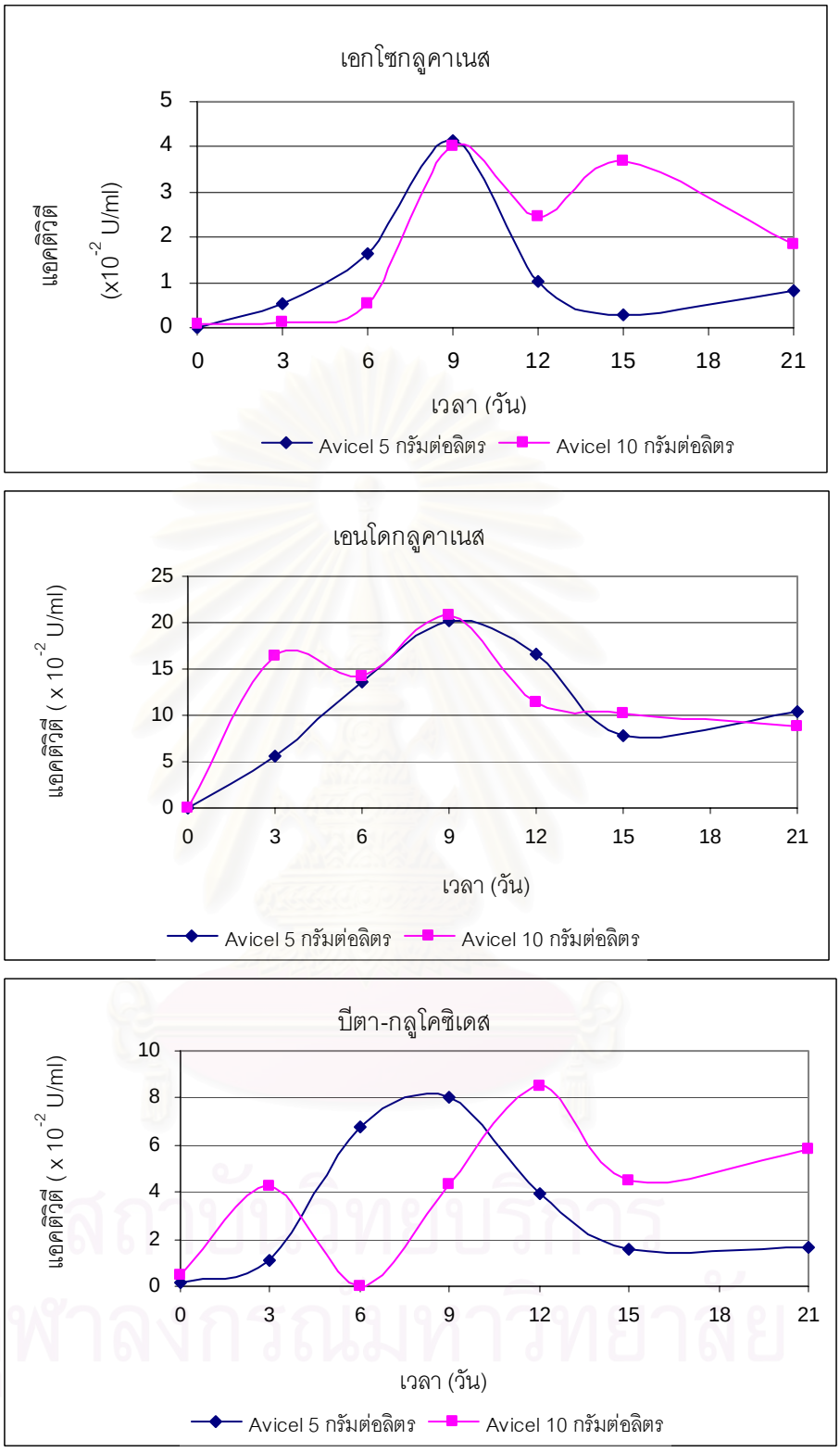
ตารางที่ 19 และภาพที่ 30 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนสและบีตา-กลูโคซิเดส สามารถวิเคราะห์ค่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดได้ โดยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส จะให้ค่าแอคติวิตีสูงรองลงมาคือเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส และเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส โดยมีค่า $20.728x10^{-2}$ U/ml $3.470x10^{-2}$ U/ml และ $1.179x10^{-2}$ U/ml ตามลำดับ ในวันที่ 9 ของการทดลอง ที่ Avicel 10 กรัมต่อลิตร และค่าแอคติวิตีที่ได้จากทั้ง 2 ความเข้มข้นของ Avicel จะให้ค่าที่ใกล้เคียงกันในเอนไซม์แต่ละชนิด

จากผลการทดลองใช้ Avicel เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตรและสารแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.2 และ 2.0 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Avicel 10 กรัมต่อลิตรและสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร จะให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ 0.634 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการทดลอง นอกจากนี้พบว่าที่สารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร จะให้ความเข้มข้นเอทานอล 0.013 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้น Avicel เดียวกัน

ตารางที่ 17 ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

เวลา (วัน)	เอกโซกลูคาเนส(x 10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		เอนโดกลูคาเนส (x 10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		บีตา-กลูโคซิเดส(x 10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
	Avicel 5 กรัมต่อลิตร	Avicel 10 กรัมต่อลิตร	Avicel 5 กรัมต่อลิตร	Avicel 10 กรัมต่อลิตร	Avicel 5 กรัมต่อลิตร	Avicel 10 กรัมต่อลิตร
0	0.000	0.094	0.000	0.000	0.188	0.469
3	0.519	0.141	5.534	16.413	1.125	4.221
6	1.650	0.519	13.599	14.162	6.753	0.000
9	4.149	4.008	20.165	20.728	8.066	4.314
12	1.037	2.452	16.601	11.349	3.939	8.535
15	0.283	3.678	7.878	10.223	1.594	4.502
21	0.802	1.839	10.317	8.722	1.688	5.815

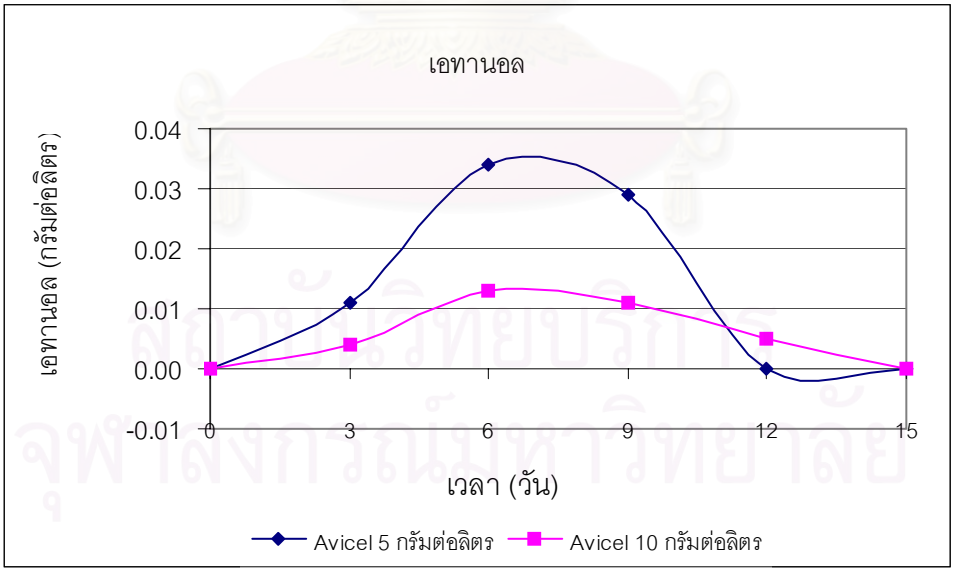
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 28 ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

ตารางที่ 18 ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

เวลา (วัน)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	
	Avicel 5 กรัมต่อลิตร	Avicel 10 กรัมต่อลิตร
0	0.000	0.000
3	0.011	0.004
6	0.034	0.013
9	0.029	0.011
12	0.000	0.005
15	0.000	0.000

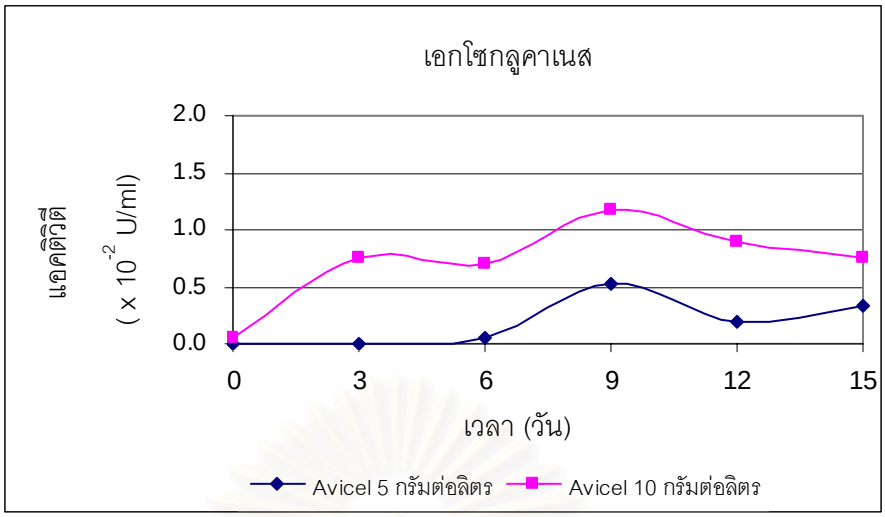


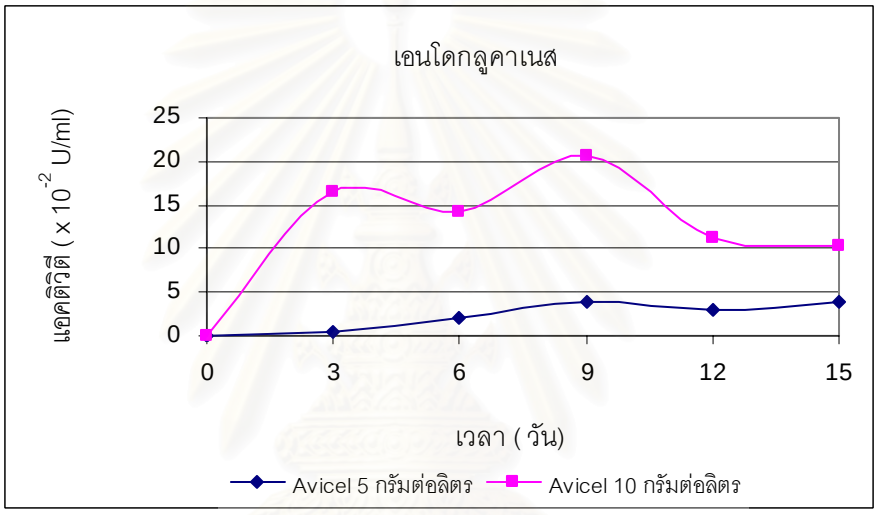
ภาพที่ 29 ความเข้มข้นเอทานอลที่เกิดขึ้นที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตรและมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

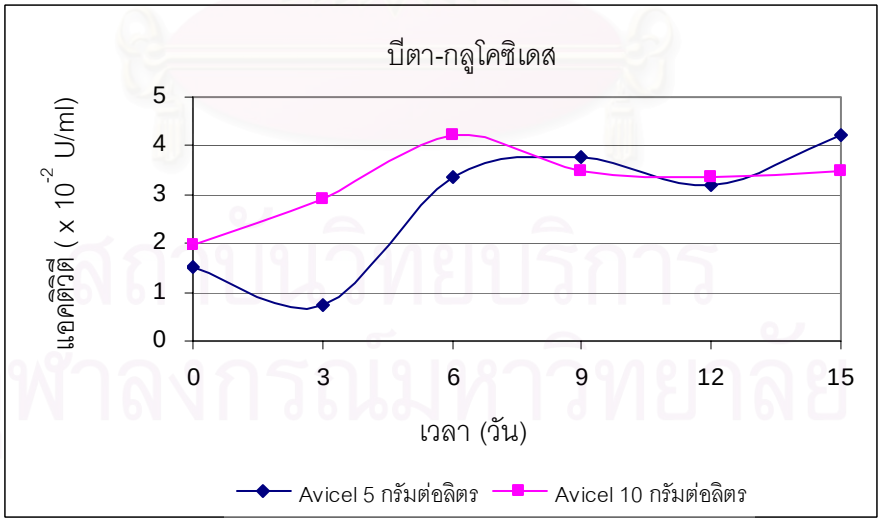
ตารางที่ 19 ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

เวลา (วัน)	เอกโซกลูคาเนส(x 10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		เอนโดกลูคาเนส (x 10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		บีตา-กลูโคซิเดส(x 10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
	Avicel 5 กรัมต่อลิตร	Avicel 10 กรัมต่อลิตร	Avicel 5 กรัมต่อลิตร	Avicel 10 กรัมต่อลิตร	Avicel 5 กรัมต่อลิตร	Avicel 10 กรัมต่อลิตร
0	0.000	0.047	0.000	0.000	1.501	1.970
3	0.000	0.754	0.563	16.413	0.750	2.907
6	0.047	0.707	2.063	14.162	3.376	4.221
9	0.519	1.179	3.845	20.728	3.752	3.470
12	0.189	0.896	3.095	11.349	3.189	3.376
15	0.330	0.754	3.845	10.223	4.221	3.470

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย







ภาพที่ 30 ค่าแอคติวิตีของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากการใช้ Avicel เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตรและมีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. versicolor*

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การคัดเลือกและการเจริญของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตที่ใช้ในงานวิจัย

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการเชื้อที่สามารถผลิตเอทานอลได้โดยใช้วัตถุดิบที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ดังนั้นหลักเกณฑ์เบื้องต้นที่ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ นอกจากสามารถผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการผลิตเอทานอลได้แล้วยังต้องเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ด้วยเช่นกัน จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อรากลุ่มไวต์รอตมีคุณสมบัติดังกล่าว (Leonowicz et al., 1999) ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการได้เชื้อที่ตรงตามหลักเกณฑ์จำนวน 6 สายพันธุ์ ซึ่งทั้ง 6 สายพันธุ์เป็นเชื้อจำพวกเห็ดโดยสามารถรับประทานได้และมีคุณค่าทางอาหารคือมีไฟเบอร์ โปรตีน และวิตามิน สารทางการแพทย์เช่น β-D-glucan (Takaku et al., 2001)

ในการศึกษาการเจริญของเชื้อรากลุ่มไวต์รอต เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายลิกนินได้ในปริมาณสูงเมื่อเชื้อเริ่มมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ stationary phase (Keyser et al.,1978) ดังนั้นการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรากลุ่มไวต์รอตจึงต้องทราบระยะเวลาที่เชื้อราเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ในการทดลองนี้ได้เลี้ยงเชื้อรากลุ่มไวต์รอตในอาหารเหลว PDB และตรวจสอบการเจริญด้วยการชั่งน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยของเชื้อ สายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งเฉลี่ยสูงที่สุดคือ *P. sajor-caju* และ *S. commune* โดยมีค่าน้ำหนักเส้นใยแห้งเฉลี่ยเท่ากับ 10.20 และ 8.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการพิจารณาน้ำหนักแห้งที่ได้ซึ่งมีค่าสูงสุดและคงที่ในระยะหนึ่งทำให้ทราบว่าถึงระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการนำเชื้อไปใช้เพื่อผลิตหรือศึกษาเอนไซม์ต่อไปโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอตเข้าสู่ early stationary phase ประมาณวันที่ 4-6 ของการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 การผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

เนื่องจากมีรายงานว่าเชื้อรากลุ่มไวต์รอตสามารถผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสได้ (Okamura et al., 2001) ดังนั้นจึงนำเชื้อรากลุ่มไวต์รอตที่คัดเลือกได้ในการทดลองครั้งนี้มาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ทั้งนี้เพื่อดูว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสได้หรือไม่

ในการทดลองทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร glucose-peptone โดยไม่มีการเขย่าทั้งนี้เพื่อให้เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล ในการวิเคราะห์ค่า specific activity ของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส เนื่องจากเอนไซม์นี้เป็น intracellular enzyme ดังนั้นจึงต้องนำเส้นใยของเชื้อรากลุ่มไวต์รอตที่เลี้ยงได้มา homogenize ด้วยเครื่อง ultrasonic disrubtor ที่ 20 kHz เป็นเวลา 10 นาที โดยเป็นการทำให้เซลล์แตก ซึ่งในระหว่างการทำให้เซลล์แตกเอนไซม์อาจมีการเสียสภาพไปบ้างเนื่องจากความร้อน นอกจากนี้เส้นใยของแต่ละสายพันธุ์จะมีการจับตัวหนาแน่นแตกต่างกัน อาจมีผลต่อการทำให้เซลล์แตกที่ระยะเวลาต่างกัน จากงานวิจัยนี้ใช้ระยะเวลาที่ทำให้เซลล์แตกเท่ากับ 10 นาที ดังนั้นในการแตกของเส้นใยของเชื้อจะพบว่าเส้นใยของเชื้อที่จับตัวกันไม่แข็งแรงพออาจมีการแตกของเส้นใยดีกว่าเชื้อที่เส้นใยมีการจับตัวกันอย่างแข็งแรง ซึ่งอาจให้ผลคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงไปบ้าง แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองแม้ค่า specific activity ที่ได้จะไม่สูงคือมีค่า specific activity อยู่ในช่วง 1.3-2.5 U/mg protein แต่ก็สามารถบอกได้ว่าเชื้อรากลุ่มไวต์รอตแต่ละสายพันธุ์ที่ศึกษาสามารถผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสได้เช่นกัน โดยมีรายงานวิจัยที่ผ่านมาศึกษาค่า specific activity ของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสของเชื้อราไวต์รอต *Tricholoma matsutake* พบว่ามีค่า specific activity 2.5 U/mg protein และเชื้อ *Pleurotus ostreatus* มีค่า specific activity 4.6 U/mg protein ณ ภาวะที่ศึกษา (Okamura-Matsui et al., 2003)

5.3 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของลิกนินโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

ทำการศึกษาความสามารถในการผลิต extracellular enzymes ในกลุ่มเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคส ทั้งนี้เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเชื้อในการผลิตกลุ่มเอนไซม์ดังกล่าว เพื่อย่อยสลายองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งเป็นกลุ่มลิกโนเซลลูโลส โดยเข้าไปทำลายวงแหวนโพลิเมอร์ที่ซับซ้อนของลิกนิน

ในการทดลองนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสูตร production ซึ่งเป็นสูตรมาตรฐานที่ใช้ชักนำให้เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนิน โดยเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ ทำการเก็บตัวอย่างวันเว้นวันเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่ไม่เก็บทุกวันทั้งนี้เพราะเชื้อราจะมีการเจริญเติบโตช้ากว่าเชื้อชนิดอื่นๆ จึงจำเป็นต้องให้ระยะเวลาในการพิจารณาการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย และการสิ้นสุดการตรวจสอบค่าแอคติวิตีที่ 7 วันเพราะในทางอุตสาหกรรมนั้นหากต้องใช้ระยะเวลาในการผลิตผลิตภัณฑ์นานเกินไปจะไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน ฉะนั้นหากเชื้อสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้ในระยะเวลาอันสั้นจึงเป็นที่ต้องการในทางอุตสาหกรรม (สมใจ, 2537)

จากการทดลองภาวะ pH เท่ากับ 5.0 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นค่า pH และอุณหภูมิทั่วไปของการเจริญของเชื้อรา ซึ่งยังไม่ใช่ภาวะที่เหมาะสมของแต่ละเชื้อ แต่ที่ต้องใช้ pH และอุณหภูมิที่เท่ากันทุกค่าก็เพื่อเปรียบเทียบค่า ณ ภาวะใดภาวะหนึ่งเพื่อเปรียบเทียบว่าเชื้อใดมีแอคติวิตีดีกว่า ซึ่งในงานวิจัยนี้ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์อยู่ในช่วง $6.2x10^{-2}$ U/ml ถึง $9.1x10^{-2}$ U/ml จากงานวิจัยที่ผ่านมาเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส 12.8 x 10^{-2} U/ml ในภาวะที่ศึกษา (Haddadin et al, 2002) เชื้อ *C. versicolor* ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสอยู่ในช่วง $5x10^{-2}$ U/ml ถึง $10x10^{-2}$ U/ml ในภาวะที่ศึกษา (Arora and Gill, 2001) และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีผลต่อการผลิตและการแสดงออกของการทำงานของเอนไซม์ (Varela et al., 2000) สูตรอาหาร production ที่ใช้จะมีส่วนประกอบของ guaiacol ที่ความเข้มข้น 0.4 mM เป็นตัวชักนำหรือกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้สูงกว่าแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส นอกจากนี้ก็ยังสามารถใช้สารชักนำตัวอื่นๆได้อีกเช่น veratryl alcohol (Ruttimann et al., 1992)

ระดับของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและแลคเคสนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแมงกานีสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจะถูกผลิตได้ดีก็ต่อเมื่อมีแมงกานีสเป็นตัวชักนำ ตัวชักนำมีค่าในระดับที่ต่ำอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การผลิตแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสอยู่ในระดับต่ำ โดยแมงกานีสจะเป็นตัวชักนำให้มีการผลิต veratryl alcohol ซึ่งจัดเป็นโคแฟคเตอร์ที่สำคัญในการย่อยสลายลิกนิน (Kondo et al., 1996) ซึ่งในงานวิจัยนี้สามารถตรวจพบแอคติวิตีเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ได้ในเชื้อไวต์รอตทุกสายพันธุ์ยกเว้น *S. commune* ที่ไม่สามารถตรวจพบ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า *S. commune* สามารถผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ (จันทร์เกษม, 2544) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากงานวิจัยนี้ภาวะการทดลองไม่เหมาะสมหรือแมงกานีสซัลเฟตน้อยเกินไปดังที่กล่าวมาข้างต้น ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากงานวิจัยนี้มีค่าอยู่ในช่วง $1x10^{-2}$ U/ml ถึง $2x10^{-2}$ U/ml ซึ่งถือว่าอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ผ่านมา มีรายงานว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของเชื้อ *Pleurotus dryinus* มีค่าแอคติวิตี ประมาณ $3.4x10^{-2}$ U/ml (Elisashvili et al., 2006) *Pleurotus ostreatus และ Trametes verscolor* มีค่าแอคติวิตีเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส $0.332x10^{-2}$ U/ml และ 0.324 x 10^{-2} U/ml ตามลำดับ (Valaskova and Baldrian, 2006)

การที่เอนไซม์แลคเคสมีค่าน้อย อาจเนื่องมาจากชนิดและความเข้มข้นของตัวชักนำยังไม่เหมาะสม จากงานวิจัยที่ผ่านมาของ Koroljova-Skorobogat'ko และคณะ ในปี 1998 ได้ทำการทดลองหาตัวชักนำที่เหมาะสม สำหรับการผลิตเอนไซม์แลคเคสของเชื้อรา *Coriolus hirsutus* ที่เป็นเชื้อราในกลุ่มของ basidiomycetes จะพบว่าในการเปรียบเทียบการเป็นตัวชักนำของสาร

syringaldazine, guaiacol, 3,4-xylidine และ caffeic acid ที่มีการเติมลงในอาหารพบว่า syringaldazine เป็นตัวชักนำที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการผลิตเอนไซม์แลคเคส ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสที่ได้จากงานวิจัยนี้มีค่าอยู่ในช่วง $1x10^{-2}$ U/ml ถึง $4x10^{-2}$ U/ml ซึ่งถือว่าอยู่ในระดับไม่สูงมากแต่ก็ไม่น้อยจนเกินไป จากงานวิจัยที่ผ่านมามีรายงานว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคสของเชื้อ *Schizophyllum commune* มีค่าประมาณ $3.0x10^{-2}$ U/ml ถึง $13.2x10^{-2}$ U/ml (Haddadin et al., 2002) *Pleurotus ostreatus และ Trametes verscolor* มีค่า $1.3x10^{-2}$ U/ml และ $3.2x10^{-2}$ U/ml ตามลำดับ (Valaskova and Baldrin, 2006)

5.4 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของเซลลูโลสโดยเชื้อราไวต์รอต

ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลส อันประกอบไปด้วยเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดส ทั้งนี้เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเชื้อในการผลิตกลุ่มเอนไซม์ดังกล่าวเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยมีรายงานว่าเชื้อรากลุ่มไวต์รอตซึ่งเป็นราใน Basidiomycetes มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินและเซลลูโลสได้

โดยทั่วไปการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสสามารถทำได้ 2 วิธี คือวิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ โดยวิธีทางเคมีจะใช้กรดเข้มข้นหรือเจือจางย่อยสลายเซลลูโลส เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสโดยตรงแต่จะได้ผลผลิตน้ำตาลต่ำ เพราะมีการทำลายน้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยกรดและกรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์พลอยได้ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้ปฏิกิริยายังเกิดรุนแรงและไม่เจาะจง (McMillan, 1994) ส่วนวิธีทางชีวภาพจะใช้เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งปฏิกิริยาเกิดขึ้นแบบไม่รุนแรงและจำเพาะเจาะจงระหว่างกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสกับสารประกอบเซลลูโลสทำให้ได้น้ำตาลค่อนข้างบริสุทธิ์ แต่ปฏิกิริยาเกิดแบบต่อเนื่องจึงใช้เวลานานกว่าวิธีทางเคมี

ในการพิจารณาค่าแอคติวิตีของเซลลูเลสนั้น จะพิจารณาที่ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสเป็นอันดับแรก เนื่องจากเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส ทำหน้าที่ตัดพันธะบีตา-1,4 ไกลโคซิดิก ที่บริเวณปลายด้านที่ไม่มีความสามารถในการรีดิวซ์ของเซลลูโลสได้เซลโลไบโอสเป็นส่วนใหญ่ อันดับต่อมาพิจารณาที่ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส เนื่องจากเอนไซม์จะทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสได้กลูโคส ส่วนเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ทำหน้าที่ตัดพันธะบีตา-1,4 ไกลโคซิดิกภายในสายเซลลูโลสบริเวณ amorphous แบบสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิดคือโอลิโกแซคคาไรด์ เซลโลไบโอสและกลูโคสที่ปริมาณน้อยมาก

ในงานวิจัยนี้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส พบว่า เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส มีค่าแอคติวิตีอยู่ในช่วงประมาณ $4.8x10^{-2}$ U/ml ถึง $8.3x10^{-2}$ U/ml เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสมีค่าแอคติวิตีอยู่ในช่วงประมาณ $23x10^{-2}$ U/ml ถึง $28x10^{-2}$ U/ml และเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส มีค่าแอคติวิตีอยู่ในช่วงประมาณ $13x10^{-2}$ U/ml ถึง $17x10^{-2}$ U/ml และงานวิจัยที่ผ่านมามีรายงานว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดของเชื้อ *Trametes versicolor* คือมีค่าแอคติวิตีเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส $0.11x10^{-2}$ U/ml, $4.19x10^{-2}$ U/ml และ $1.42 x10^{-2}$ U/ml ตามลำดับ และเชื้อ *Piptoporus betulinus* มีค่าแอคติวิตีเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส $7.5x10^{-2}$ U/ml, $217x10^{-2}$ U/ml และ $17.1x 10^{-2}$ U/ml ตามลำดับ (Valaskova and Baldrian, 2006)

การเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร production ใช้ค่า pH ที่ 5.0 แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์แต่ละตัวในกลุ่มเซลลูเลสจะมีภาวะที่เหมาะสมในการผลิตที่แตกต่างกัน มีรายงานของเชื้อ *Aspergillus terreus* ว่าแต่ละเอนไซม์มีภาวะ pH ที่เหมาะสมต่างกัน โดยเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และบีตา-กลูโคซิเดส มีค่า pH ที่เหมะสมเท่ากับ 6.0, 5.0 และ 4.0-4.5 ตามลำดับ (Bastawde, 1992) แต่ในงานวิจัยนี้ใช้การทดลองที่ pH เท่ากับ 5.0 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นค่า pH และอุณหภูมิทั่วไปของการเจริญของเชื้อรา ซึ่งยังไม่ใช่ภาวะที่เหมาะสมของแต่ละเชื้อ แต่ที่ต้องใช้ pH และอุณหภูมิ ที่เท่ากันทุกค่าก็เพื่อเปรียบเทียบค่า ณ ภาวะใดภาวะหนึ่งเพื่อเปรียบเทียบว่าเชื้อใดมีแอคติวิตีดีกว่า

จากผลการทดลองจะเห็นว่าสายพันธุ์แต่ละตัวให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกัน จึงเป็นข้อดีที่จะเลือกนำไปใช้งานในการย่อยสลายองค์ประกอบแต่ละชนิดของวัสดุทางการเกษตร

5.5 การผลิตเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

5.5.1 การใช้กลูโคสเป็นสับสเตรต

หลังจากที่ได้มีการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ต่างๆที่คาดว่าจะมีผลเกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลและการย่อยสลายวัตถุดิบที่เป็นองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแล้ว ทำการคัดเลือกเชื้อตัวที่ให้ผลของแอคติวิตีของเอนไซม์ต่างๆที่ดีมาทำการหมักเพื่อผลิตเอทานอล แต่ก่อนที่จะเริ่มใช้สับสเตรตที่เป็นเซลลูโลสซึ่งมีปริมาณมากในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สนใจในงานวิจัยครั้งนี้ จำเป็นต้องศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้กลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน ทั้งนี้เพราะเชื้อสามารถนำไปใช้ได้โดยตรง ถือเป็นการทดสอบความสามารถของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสอีกครั้งหนึ่ง

ในงานวิจัยที่มีการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่นอกเหนือจากเชื้อยีสต์ในการศึกษาการผลิตเอทานอลนั้น โดยมากสับสเตรตเริ่มต้นมักจะใช้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Sues et al., 2004) เชื้อที่นำมาใช้จะเป็นกลุ่มเชื้อรา เช่นคัดเลือกกลุ่มเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอล พบว่าเชื้อกลุ่ม *Aspergillus* และเชื้อกลุ่ม *Rhizopus* สามารถผลิตเอทานอลได้ โดยใช้สับสเตรตเริ่มต้นเป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส และเซลลูโลสในภาวะ anaerobic ซึ่งสับสเตรตแต่ละชนิดจะให้ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกันเมื่อเทียบความเข้มข้นของสับสเตรตเริ่มต้นที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยในการใช้น้ำตาลกลูโคสจะให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด รองลงมาจะเป็นที่การใช้น้ำตาลไซโลส และเซลลูโลสจะให้ความเข้มข้นเอทานอลที่ต่ำสุด ซึ่งให้ผลแบบเดียวกันทั้งในเชื้อกลุ่ม *Aspergillus* และเชื้อกลุ่ม *Rhizopus* ซึ่งคิดเป็นค่า yield ของเอทานอลจากการใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส และเซลลูโลสเป็นสับสเตรต มีค่าประมาณ 0.50 $g_{ethanol}/g_{glucose}$, 0.23 $g_{ethanol}/g_{xylose}$ และ 0.028 $g_{ethanol}/g_{cellulose}$ ตามลำดับ (Skory et al., 1997) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะทั่วไปที่ใช้เชื้อยีสต์จะเห็นว่างานวิจัยของ Skory และคณะใช้ภาวะ annaerobic แบบเดียวกับเชื้อยีสต์ แต่ที่แตกต่างกันคือสับสเตรตเริ่มต้นซึ่งเชื้อราสามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคาร์บอน 5 อะตอม (pentose) คือน้ำตาลไซโลสในการใช้เป็นสับสเตรตได้ ในขณะที่ยีสต์ใช้ได้เฉพาะน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม (hexose) เท่านั้น ถือได้ว่าเป็นข้อได้เปรียบข้อหนึ่งในการใช้เชื้อราในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล

ต่อมามีงานวิจัยของ Kenealy และคณะในปี 2004 ที่มีการใช้เชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* ซึ่งเป็นเชื้อราไวต์รอตที่เคยมีการนำมาศึกษากลุ่มเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายลิกนิน แต่ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอล พบว่าในการหมักที่ภาวะ aerobic โดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ 10 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณความเข้มข้นเอทานอล 0.55 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า yield เท่ากับ 0.055 $g_{ethanol}/g_{glucose}$ จากงานวิจัยนี้จะเห็นว่าเชื้อราสามารถใช้ภาวะ aerobic ในการผลิตเอทานอลได้ ในขณะที่เชื้อยีสต์ภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจะเป็นภาวะ anaerobic ซึ่งจากทั้ง 2 งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อรามีข้อได้เปรียบกว่าเชื้อยีสต์คือสามารถใช้สับสเตรตได้ทั้งน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอมและน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม และสามารถผลิตเอทานอลได้ในภาวะทั้ง aerobic และ anaerobic

จากการทดลองนี้ใช้เชื้อสายพันธุ์ *C. versicolor* ในภาวะที่เป็น aerobic ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรต เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้แม้จะยังไม่สูงมากนัก แต่ก็สามารถผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้นในระดับหนึ่งคือมีค่าความเข้มข้นเอทานอล 2.193 กรัมต่อลิตรที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า yield เท่ากับ 0.073 $g_{ethanol}/g_{glucose}$ การที่ผลิตได้ไม่สูงอาจเนื่องมาจากเอทานอลบางส่วนเชื้อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ บางส่วนสลายไปเนื่องจากเลี้ยงในภาวะที่เขย่า ทั้งนี้ก่อนที่จะทำให้ได้ผลความเข้มข้นเอทานอลที่สูง อาจต้องมีการหาภาวะที่

เหมาะสมที่เชื้อโตได้ดี จากนั้นก็หาภาวะที่เหมาะสมที่เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสทำงานได้ดีเช่นกัน

5.5.2 การใช้เซลลูโลสเป็นสับสเตรต

ในการผลิตเอทานอลโดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งเป็นประเภทวัสดุลิกโนเซลลูโลส แบ่งการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยวัตถุดิบเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลและกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทในการผลิตเป็นเอทานอล จากงานวิจัยที่ผ่านมาสามารถแบ่งงานวิจัยออกได้เป็น 4 ประเภทด้วยกันคือประเภทที่ 1 ใช้กรดและยีสต์ (Soderstrome et al., 2003) ประเภทที่ 2 ใช้ราและยีสต์ (สันทนา, 2539) ประเภทที่ 3 ใช้กรดและรา (Rao et al., 1985) ประเภทที่ 4 ใช้ราและรา (Kenealy and Dietrich, 2004) ในกลุ่ม 1 และ 2 ตามลำดับ โดยใน 2 ประเภทแรกมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาอยู่มากและศึกษามานาน ค่า yield ของเอทานอลที่ได้จะมีค่าสูงประมาณ 0.75 และ 0.26 $g_{ethanol}/g_{substrate}$ ตามลำดับ ส่วนประเภทที่ 3 และ 4 เป็นงานวิจัยที่เริ่มทำการศึกษาในระยะหลัง หลังจากที่มีรายงานการค้นพบกลุ่มเอนไซม์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอล แต่ค่า yield ของเอทานอลที่ได้ยังต่ำกว่าประเภทที่ 1 และ 2 คือมีค่าประมาณ 0.25 และ 0.0004 $g_{ethanol}/g_{substrate}$ ตามลำดับ โดยเฉพาะในประเภทที่ 4 ค่า yield ของเอทานอลยังมีค่าต่ำมากทั้งนี้เพราะต้องอาศัยเอนไซม์ในการทำงานทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งการควบคุมการทำงานอาจยังทำได้ไม่ดีพอเนื่องจากค่อนข้างที่จะต้องอาศัยปัจจัยหลายๆปัจจัยด้วยกันและข้อมูลที่นำมาประกอบการทดลองก็ยังมีการศึกษาไม่มาก ดังนั้นการที่จะให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สูงขึ้นจะต้องอาศัยระยะเวลาในการศึกษาทดลองต่อไปอีก

ในงานวิจัยนี้หลังจากทำการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตแล้วพบว่าเชื้อ *C. versicolor* สามารถที่จะผลิตเอทานอลได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้เซลลูโลสบริสุทธิ์มาใช้ในการศึกษา เพื่อดูความเป็นไปได้ในการย่อยสลายและการผลิตเอทานอล โดยไม่มีปัจจัยอื่นๆเข้ามารบกวน และเนื่องจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่อยู่ตามธรรมชาติมีโครงสร้างหลายแบบ ดังนั้นเซลลูโลสบริสุทธิ์ที่นำมาใช้จึงมีทั้งเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้สูงและเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ต่ำ ได้แก่ carboxymethyl cellulose (CMC) จัดเป็นแบบละลายน้ำได้สูงและ microcrystalline celluloce (Avicel) เป็นแบบละลายน้ำได้ต่ำ โดยทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจนต่ำ (0.2 กรัมต่อลิตร) และที่มีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจนสูง (2.0 กรัมต่อลิตร) ซึ่งสารแหล่งไนโตรจนในที่นี้คือ ammonium tartrate ทั้งนี้เพราะมีรายงานว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไนโตรเจน ปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้น (Kenealy and Dietrich, 2004) ผลที่ได้พบว่าที่ความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจนต่ำ (0.2 กรัมต่อลิตร) ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าเมื่อใช้ทั้ง CMC และ Avicel เป็นสับสเตรตและที่ความเข้มข้นของสับสเตรตสูงจะให้ปริมาณความเข้มข้น

ของเอทานอลที่ดีกว่าความเข้มข้นของสับสเตรตต่ำ ประมาณ 3-4 เท่า โดยให้ค่า yield ของเอทานอลเท่ากับ 0.063 $g_{ethanol}/g_{cellulose}$ นอกจากนี้ได้วิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสควบคู่ไปด้วย พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ แต่อาจย่อยให้เป็นกลูโคสในปริมาณที่ไม่สูงนัก และกลูโคสนอกจากจะผลิตไปเป็นเอทานอลแล้วส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้ในการเจริญของเซลล์ นั่นคือถ้าต้องการให้มีการย่อยเซลลูโลสให้เป็นกลูโคสสูงๆก็ต้องมีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเซลลูโลสในปริมาณที่สูงเช่นกัน ซึ่งเชื้อก็จำเป็นต้องใช้กลูโคสในการเจริญด้วย

การเจริญเติบโตได้เร็วในช่วงแรกของการหมักมีความสำคัญเนื่องจากในช่วงแรกของการหมักและการย่อยสลายเซลลูโลสแบบต่อเนื่องนั้น มีปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นน้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่กลูโคสเป็นพลังงานที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตเอทานอล ดังนั้นเซลล์ที่แข็งแรงและเจริญเติบโตได้รวดเร็วในช่วงแรกของการหมัก จะมีความได้เปรียบมากกว่า (ศรัญญา, 2547)

การที่เชื้อ *C. versicolor* ผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้นที่ไม่สูงอาจเป็นไปได้ว่าภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์แต่ละกลุ่มแตกต่างกัน นั่นคือเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสเป็นอีกภาวะหนึ่ง ในขณะที่การผลิตเอทานอลก็อาจใช้แบบภาวะหนึ่ง แต่เนื่องจากงานวิจัยในครั้งนี้เป็นการทดลองเพื่อดูภาพโดยรวมในการทำงานของเอนไซม์ต่างๆของเชื้อยังไม่ได้ลงลึกไปยังรายละเอียดต่างๆดังนั้นผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ถือเป็นค่าต่ำสุดสำหรับใช้ในการอ้างอิงในกรณีที่มีการศึกษาลึกลงไปในจุดต่างๆ

ดังนั้นกล่าวได้ว่าในการทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองเพื่อจะพัฒนาไปเป็นงานวิจัยประเภทที่ 4 ที่มีการใช้วัตถุดิบเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีอยู่จริง แต่จากการทดลองเนื่องจากปริมาณเอทานอลที่ได้ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นอาจปรับปรุงการทดลองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเชื้อได้โดยอาจใช้เชื้อ 2 เชื้อทำงานร่วมกันคือนำไปรวมกับเชื้อยีสต์ ซึ่งจากข้อดีที่ได้กล่าวมาคือในแง่ของกลุ่มเอนไซม์ เชื้อรามีเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยสลายลิกนินและย่อยเซลลูโลสได้ซึ่งเชื้อยีสต์ไม่มี ดังนั้นก็จะใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติข้อนี้ในการย่อยสลายวัตถุดิบ และในการใช้กลุ่มน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในกรณีที่มีทั้งน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม และ น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม เชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอมได้ และเชื้อราใช้ได้ทั้ง 2 กลุ่ม ทำให้ลดข้อจำกัดในการใช้สับสเตรตเริ่มต้นในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล และนอกจากนี้ในการหมักเมื่อมีเชื้อทั้ง 2 เชื้อสามารถใช้ภาวะการหมักได้ทั้ง anaerobic และ aerobic โดยเชื้อยีสต์ใช้การหมักที่ภาวะ anaerobic และเมื่อเป็นภาวะ aerobic เชื้อราก็จะมีบทบาทในการหมักได้ทำให้ลดข้อจำกัดในด้านภาวะการหมักได้อีกข้อหนึ่ง หรืออาจมีการพัฒนาต่อไปในด้าน molecular คืออาจมีการปรับปรุงสายพันธุ์ (genetic engineering) เช่นตัดต่อยีนส์ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการในการย่อยลงไปในเชื้อยีสต์ เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักได้อีกทางหนึ่ง

บทที่ 6
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

6.1.1 การคัดเลือกและการเจริญเชื้อรากลุ่มไวต์รอตที่ใช้ในงานวิจัย

คัดเลือกเชื้อไวต์รอตมาใช้ในงานวิจัย 6 สายพันธ์คือ *Coriolus versicolor* *Flammulina velutipes* *Pleurotus cornucopiae* *Pleurotus ostreatus* *Pleurotus sajor-caju* และ *Schizophyllum commune* และศึกษาการเจริญโดยเลี้ยงในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อเจริญและมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นจนคงที่ โดยแต่ละสายพันธุ์เข้าสู่ระยะ early station phase ในวันที่ 4-6 ของการเลี้ยงเชื้อ

6.1.2 การผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

เลี้ยงเชื้อราไวต์รอต 6 สายพันธุ์อาหาร glucose-peptone ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่มีการเขย่า วิเคราะห์ค่า specific activity ของทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อ *Coriolus versicolor* ให้ค่า specific activity ของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส 2.583 U/mg protein ซึ่งให้ค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อื่น รองลงมา *Pleurotus ostreatus* ให้ค่า 2.201 U/mg protein

6.1.3 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของลิกนินโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

6.1.3.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในอาหารสูตร production

เชื้อสายพันธุ์ *Coriolus versicolor* ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดรองลงมาคือ *Flammulina velutipes* ซึ่งให้ค่าแอคติวิตี 9.11×10^{-2} U/ml และ 8.55×10^{-2} U/ml ตามลำดับ

6.1.3.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ในอาหารสูตร production

เชื้อสายพันธุ์ *Flammulina velutipes* ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดรองลงมาคือ *Coriolus versicolor* ซึ่งให้ค่าแอคติวิตี 9.86×10^{-2} U/ml และ 2.41×10^{-2} U/ml ตามลำดับ

6.1.3.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์แลคเคสในอาหารสูตร production

เชื้อสายพันธุ์ *Flammulina velutipes* ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดรองลงมาคือ *Pleurotus sajor-caju* ซึ่งให้ค่าแอคติวิตี 4.09×10^{-2} U/ml และ 2.38×10^{-2} U/ml ตามลำดับ

6.1.4 การผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของเซลลูโลสโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

6.1.4.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส

เชื้อสายพันธุ์*Schizophyllum commune* ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดรองลงมาคือ *Coriolus versicolor* ซึ่งให้ค่าแอคติวิตี 8.388×10^{-2} U/ml และ 5.653×10^{-2} U/ml ตามลำดับ

6.1.4.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส

เชื้อสายพันธุ์ *Pleurotus cornucopiae* ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดรองลงมาคือ *Flammulina velutipes* ซึ่งให้ค่าแอคติวิตี 28.113×10^{-2} U/ml และ 26.480×10^{-2} U/ml ตามลำดับ

6.1.4.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส

เชื้อสายพันธุ์*Schizophyllum commune* ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดรองลงมาคือ *Coriolus versicolor* ซึ่งให้ค่าแอคติวิตี 17.291×10^{-2} U/ml และ 13.603×10^{-2} U/ml ตามลำดับ

6.1.5 การผลิตเอทานอลโดยเชื้อรากลุ่มไวต์รอต

6.1.5.1 การใช้กลูโคสเป็นสับสเตรต

เลี้ยงเชื้อ *Coriolus versicolor* ในการผลิตเอทานอลโดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรให้ความเข้มข้นเอทานอล 2.193 กรัมต่อลิตรในขณะที่เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นและน้ำตาลมีปริมาณลดลงเมื่อเวลาผ่านไป

6.1.5.2 การใช้เซลลูโลสเป็นสับสเตรต

6.1.5.2.1 ใช้เซลลูโลสชนิด Carboxymethylcellulose (CMC)

เลี้ยงเชื้อ *Coriolus versicolor* ในการผลิตเอทานอลโดยใช้เซลลูโลสชนิด CMC เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ภายใต้ภาวะที่มีความ

เข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 และ 2.0 กรัมต่อลิตร พบว่าค่าที่ให้ผลดีคือการใช้ CMC 10 กรัมต่อลิตร ภายใต้ภาวะที่มีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร ให้ค่าความเข้มข้นเอทานอล 0.322 กรัมต่อลิตร

6.1.5.2.2 ใช้เซลลูโลสชนิด Microcrystalline cellulose (Avicel)

เลี้ยงเชื้อ *Coriolus versicolor* ในการผลิตเอทานอลโดยใช้เซลลูโลสชนิด Avicel เป็นสับสเตรตที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ภายใต้ภาวะที่มีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 และ 2.0 กรัมต่อลิตร พบว่าค่าที่ให้ผลดีคือการใช้ Avicel 10 กรัมต่อลิตร ภายใต้ภาวะที่มีความเข้มข้นของสารแหล่งไนโตรเจน 0.2 กรัมต่อลิตร ให้ค่าความเข้มข้นเอทานอล 0.634 กรัมต่อลิตร

6.2 ข้อเสนอแนะ

6.2.1 ในการศึกษาการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลอาจแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ช่วงคือทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมที่จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงและทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมที่จุลินทรีย์ใช้ในการผลิตเอทานอล

6.2.2. การเลือกเชื้อมาใช้ในการหมักต้องศึกษาความเป็นไปได้ของเชื้อชนิดนั้นๆก่อนโดยอาจดูลักษณะการย่อยของเชื้อที่มีอยู่จริงในธรรมชาติกับวัตถุดิบที่เราต้องการใช้เพื่อดูความเป็นไปได้ในการทดลอง

6.2.3. อาจมีการใช้เชื้อชนิดอื่นเข้ามามีส่วนร่วมในกระบวนการหมัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กล้าณรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2544. จากมันสำปะหลังสู่เอทานอล เทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง. ภารกิจโครงการและประสานงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

จันทร์เกษม นรสิงห์. 2544. การเติบโตและสมบัติในการฟอกสีเยื่อกระดาษของสายพันธุ์เห็ดแครง *Schizophyllum commune* Fr. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี. 2545. การผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากรากลุ่มไวท์รอทบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ยุทธพงษ์ ประถมจินดา. 2540. การวิเคราะห์ปริมาณและผลของสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมในกากน้ำตาลต่อการหมักเอทานอลด้วยยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 163 หน้า.

วราวุฒิ บุญส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 1-24.

ศรัญญา ยิ้มย่อง. 2547. การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของแอลฟาเซลลูโลสจากวัชพืชไปเป็นเอทานอล. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สันทนา เสถียรไพศาล. 2539. การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของลิกโนเซลลูโลสเป็นเอทานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องโดย *Acrophialophora sp.* และ *Candida brassic*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานโครงการเอทานอลแห่งประเทศไทย. วารสารโลกพลังงาน. 4,11 (เมษายน-มิถุนายน 2544): 65-70.

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก.กรุงเทพมหานคร: สหมิตรออฟเซท, 250 หน้า.

ภาษาอังกฤษ

Alder, E. 1990. Lignin chemistry : past, present and future. Wood Sci Technol. 11: 169-218.

Alexopoulos, C. J. and Mims, C. W. 1979. Subdivision basidiomycotina. Introductory mycology. 414-429.

Arauji, A. and Sauza'D, T. 1981. Production of biomass from enzymatic hydrolysate of agriculture waste. Journal of Fermentation Technology. 58(4): 339-401.

Arora, D. S. and Gill, P. K. 2001. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. Enzyme and Microbial Technology. 28: 602-605.

Bastawde, K.B. 1992. Cellulolytic enzymes of a thermotolerant *Aspergillus terreus* strain and their action on cellulosic substrates. World Journal of Microbiology and Biotechnology. vol. 8 pp. 45-49.

Beldman, G.,Veragon, A. G., Rombout, F. M., Searle-vanleewen, M. F. and Pilnic. 1987. Adsorption and kinetic behavior of purified endoglucanase and exoglucanase from *Trichoderma viride*. Biotechnology and Bioengineering. vol 30. 251-257.

Bernfeld, P. 1955. Amylases alpha and beta. In: S.P. Colowick and O.N. Kaplan, Editors, Methods Enzymology, Academic Press, New York (1955), pp. 140–146.

Brigham, J. S., Adney, W. S. and Himmel, M. E.1996. Hemicellulose : diversity and application.In: Wyman CE (ed) Handbook on bioethanol : production and utilization. Taylor and Francis, Washington, DC. pp. 119-142.

Brunow, G. 2001. Method to reveal the structure of lignin. In M. Hofrichter and A. Steinbuchel (eds), Biopolymer, vol.1. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 89-116.

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

Buswell, J. A. and Odier, E. 1987. Lignin biodegradation. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 6: 1-60.

Cai, D. and Tien, M. 1993. Lignin-degrading peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Biotechnology. 30 : 79-90.

Chang, S. and Miles, P.G. 1989. Edible mushrooms and their cultivation. CRC Press.Inc., Boca Raton, Florida. 345 p.

Chen, M.-H. and Johns, M. R. 1994. Effect of carbon source on ethanol and pigment production by *Monascus purpureus*. Enzyme and Microbial Technology , vol 16, 584-590.

Cohen, R., Persky, L. and Hader, Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood- degrading mushroom of the genus *Pleurotus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 58: 582-594.

Cowling, E.B. and Kirk, T.K. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrate for enzymatic conversion process. Biotechnology and Bioengineering Symposium. 6:95-123.

Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Asatiani, M. and Kvesitadze, G. 2006. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. Enzyme and Microbial Technology.38:998-1004.

Eriksson, K.-E.L., Blanchette, R.A. and Ander, P.1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood component. Germany: Springer-Verlag.

Fengel, D. 1971. Ultrastructural organization of the cell wall components. Journal of Polymer Science C 36: 383-392.

Ferraz, A., Cordova, A. M. and Machuca, A. 2003. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. Enzyme and Microbial Technology 32: 59.65.

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

Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J. and Tsao, G. T. 1999. Ethanol production from resources. Advances in Biochemical/Biotechnology, vol 65: 207-241.

Haddadin, M. S., Al-Natour, R., Al-Qsous, S. and Robinson, R. K. 2002. Bio-degradation of lignin in olive pomace by freshly-isolated species of basidiomycete. Bioresource Technology. 82: 131-137.

Hahn- Hagerdal, B., Jeppsson, H., Skoog, K. and Prior, B.A. 1994. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast. Emzyme and Microbial Technology.16: 933-943.

Have, R. T. and Franssen, M. C. R. 2001. On a revised mechanism of side product formation in the lignin peroxidase catalyzed oxidation of veratryl alcohol. FEBS Letters. 487: 313-317.

Heinzkill, M. and Messner, K. 1997. The Ligninolytic system of fungi. In T. Anke (ed.), Fungal Biotechnology, pp. 213-226. Chapman & Hall, Weinheim.

Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M. and Watanaba, T. 2003. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. Journal of Biotechnology . 103 :273-280.

Kenealy, W. R. and Dietrich D. M. 2004. Growth and fermentation responses of *Phanerochaete chrysosporium* to O_2 limitation. Enzyme and Microbial Technology. 34: 490-498.

Kennes, C. and Lema, J. M. 1994. Simultaneous biodegradation of *p*-cresol and phenol by the basidiomycete *Phanerocheate chrysosporium*.Journal of Industrial Microbiology. 13: 311-314.

Ker, Y.-B., Chen, K.-C., Chyau, C.-C., Chen, C.-C., Guo, J.-H., Hsieh, C.-L., Wang, H.-R., Peng, C.-C., Chang, C.-H. and Peng, R. Y. 2005. Antioxidant capability of polysaccharide fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei* mycelia. Journal of Agricultural and Food Chemistry.53:7052-7058.

Keyer, P., Kirk, T. K. and Zeikus, J. K. 1978. Ligninolytic enzyme system of phanerocheate *chrysosporium* : synthesized in the absence of lignin inresponse nitrogen starvation. Journal of Bacteriology. 135: 790-797.

Khan, I. J. and Gowda, R. M. 2003. Clinical perspectives and therapeutics of thrombolysis . International Journal of Cardiology ,91:115-127.

Kirk, T. K. and Cullen, D. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. Environmentally Friendly Technologies and Pulp and Paper Industry, 273-307.

Kondo, R., Tsuchikawa, K., Harazono, K. and Sakai, K. 1996. Biobleaching of kraft pulp with lignin-degradation fungi and their enzymes. In S.Ewald and M. Kurt (eds.) Biotechnology in the pulp and paper industry. Vienna, Austria: 33-37.

Koroljova-Skorobogat'ko, O. V., Stepanova, E. V., Gavrilova, V. P., Morozova, O. V., Lubimova, N. V., Dzchafarova, A. N., Jaropolov, A. I. and Makower, A. 1998. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. Biotechnology Applied Biochemistry 28:47-54

Lee, J. 1997.Biological conversion of lignocellulose biomass to ethanol. Journal of Biotechnology. 56:1-24.

Lehninger, A. L., 1982. Principles of biochemistry, 2nd ed.; Worth Publishers Inc: New York, NY,

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.,Hofrichter, M. and Rogalski, J. 1999. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. Fungal Genetics and Biology 27, 175-185.

Lock, G. W. 1969. Sisal: thirty years sisal research in Tanzania. London: Longmans Green and Co. Ltd., Great Britain.

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

Min, K.-L., Kim, Y.-H., Kim, Y. W., Jung, H. S. and Hah, Y. C. 2001. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting *Phellinus ribis*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 392(2): 279-286.

Mohagheghi, A., Tucker, M.,Grohmann, H., and Wyman, C. 1992. High solid simultaneous saccharification and fermentation of pretreatment wheat straw to ethanol. Applied Biochemistry and Biotechnology. 33: 67-81.

Okamura, T., Ogata, T., Minarmimoto, N., Takeno, T., Noda, H., Fukuda, S. and Ohsugi, M. 2001. Characteristics of wine produced by mushroom fermentation. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 65(7). 1596-1600.

Okamura-Matsui, T., Tomoda, T., Fukuda, S. and Ohsugi, M. 2003. Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverage. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 23: 133-144.

Palnitkar, S. and Lachke, A. H. 1990. Efficient simultaneous saccharification and fermentation of agricultural residues by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. Applied Biochemistry and Biotechnology.26(2): 151-158.

Paszczynski, A., Crawford, R. L. and Huynh, V. B. 1988. Manganese peroxidase of *Phanerocheate chrysosporium*: Purification. Method in Enzymology.161: 264-270

Paturau, J. M. 1989. Sugar series. By-Product of the cane sugar: Introduction to their industrial utilization. 3 rd ed. Amsterdam: Elsevier.

Pointing, S. B. 2001. Exploiting the versatile ligninolytic system of white-rot fungi. Fungal Diversity Research. 6: 253-290.

Rao, M., Mishra, C., Keskar, S. and Srinivasan, M. C. 1985. Production of ethanol from wood and agricultural residues by *Neurospora crassa*. Enzyme and Microbial Technology, vol 7, 625-628.

Robinson, D. G. 1977. Plant cell wall synthesis. Adv. Bot. Res. 5: 300-312.

Rodriguez, S., Longo, M. A., Cameselle, C. and Sanroman, A. 1999. Production of manganese peroxidase and laccase in laboratory-scale bioreactor by *Phanerochaete chrysosporium*. Bioprocess Engineering. 20: 531-535.

Rudge, J. and Bickerstaff, G. F. 1986. Purification and properties of an alcohol from *Sporotrichum pulverulentum*. Enzyme and Microbial Technology, vol 8, 120-124.

Ruttimann, C., Schwember, E., Salas, L., Cullen, D. and Vicuna, R. 1992. Ligninolytic enzymes of white rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. Biotechnology Applied Biochemistry. 16: 64-76.

Saddler, J. N. 1992. Biotechnology for the conversion of lignocellulose. Biomass and Biotechnol.2(1-6): 229-238.

Saha, B. C. and Bothast, R. I. 1997. Enzyme in lignocellulosic biomass conversion. In B. C. Saha, and J. Woodward (ed.),Fuel and Chemicals from Biomass, ACS Symposium Series 666, pp. 46-56. Washington, DC : American Chemical Society.

Shambe, T. and Kennedy, J. F. 1985. Acid and enzymic hydrolysis of chaotropically pretreated millet stalk acha and rice straws and conversion of the products to ethanol. Enzyme and Microbial Technology.,vol 7: 117-120.

Skory, C. D., Freer, S. N. and Bothast, R. J. 1997. Screening for ethanol-producing filamentous fungi. Biotechnology Letters. vol 19. 3: 203-206.

Soderstrom, J., Pilcher, L., Galbe, M. and Zacchi, G. 2003. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H_2SO_4 impregnation for ethanol production. Biomass and Bioenergy ,24:475-486.

Srinivasan, C., D'Souza, T. M., Boominathan, K. and Reedy, C. A. 1995. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerocheate chrysosporium* BKMF1767. Applied and Environmental Microbiology.61 (12): 4274-4277.

Sternberg, D. 1976. Production of cellulase by *Trichoderma*. Biotechnology and Bioengineering Symposium, pp 35–53.

Sues, A., Millati, R., Edebo, L. and Taherzadeh, M. J. 2005. Ethanol production from hexoses, and dilute-acid hydrolyzate by Mucor indicus. FEMS Yeast Research, vol 5, 6-7:669-676.

Takaku, T., Kimura, Y. and Okuda, H. 2001. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* murill and its mechanism of action. The Journal of Nutrition;May;131;5; Health & Medical Complete. 1409-1413.

Tangnu, S.K. 1982. Process development for ethanol production based on enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. Process Biochemistry. May/June: 36-49.

Tien, M. and Kirk, T. K. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerocheate chrysosporium*. Method in enzymology. 161: 238-249.

Todar, K. 2006. The diversity of mechanism in procaryote.Todar's online texbook of Bacteriology.University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.

Varela, E., Martinez, A. T. and Martinez, M. J. 2000. Southern blot screening for lignin peroxidase and aryl-alcohol oxidase genes in 30 fungal species. Journal of Biotechnology. 83: 245-251.

Valaskova, V. and Baldrian, P. 2006. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzmes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus, Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus.* Research in Microbiology. 157: 119-124.

Wike, C. R., Maiorella, B., Sciamanna, A., Tangnu, K., Wiley, D., and Wong, H. 1983. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Park Ridge, New Jersey, USA: Noyes Data Corporation.

Winkelman, G. 1992. Microbial degradation of natural product. New York: VCH Publisher.

Wiselogel, A., Tyson, J. and Johnson, D.1996. Biomass feedstock resources and composition. In: Wyman CE (ed) Handbook on bioethanol: production and utilization. Taylor and Francis, Washington, DC. pp. 105-118.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดร็กโตส	20	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำมันฝรั่งปอกเปลือกล้างให้สะอาดแล้วหั่นเป็นรูปลูกเต๋าขนาด 1 ลบ.ซม. ไปต้มในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก สังเกตได้โดยใช้มือบีบมันฝรั่งจะแตกออกได้ง่าย จากนั้นนำไปกรองบนผ้าขาวบางเอาเฉพาะส่วนน้ำ เติมส่วนผสมที่เหลือลงไป คนให้ละลาย จากนั้นใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121^0C เวลา 15-20 นาที

2. Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดร็กโตส	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำมันฝรั่งปอกเปลือกล้างให้สะอาดแล้วหั่นเป็นรูปลูกเต๋าขนาด 1 ลบ.ซม. ไปต้มในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก จากนั้นนำไปกรองบนผ้าขาวบางเอาเฉพาะส่วนน้ำ เติมน้ำตาลเดร็กโตสลงไป คนให้ละลาย จากนั้นใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121^0C

3. Glucose – Peptone medium

Glucose	20	กรัม
Peptone	2	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม

$MgSO_4.7H_2O$	0.3	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH ประมาณ 5.4 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

4. Production medium 1 (for lignocellulolytic enzyme production)

Guaiacol	0.4	มิลลิโมลาร์
Glucose	25	กรัม
L-Asparagine	1	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
Fumaric acid	1.32	กรัม
Na_2CO_3	1.12	กรัม
$Fe_2(SO_4)_3$	0.2	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	0.2	มิลลิกรัม
$MnSO_4$	0.2	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น อาจใช้ความร้อนช่วยในการละลายด้วย ปรับปริมาตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5. Production medium 2 (for cellulase production)

Microcrystalline celluloes	30	กรัม
Corn steep liquor	7	กรัม
$CaHPO_4$	5	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	3	กรัม
$MgSO_4$	1	กรัม
$FeSO_4$	5	มิลลิกรัม
$CoCl_2$	3.6	มิลลิกรัม
$MnSO_4$	1.6	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	1.4	มิลลิกรัม
Tween80	2	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นตัวที่ไม่ละลายน้ำและ Tween80 แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรใกล้ 1 ลิตร แล้วปรับ pH ให้เป็น 5.0 ด้วย 1 N NaOH แล้วจึงเติม Tween80 ปรับปริมาตรให้เป็น 1ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

หมายเหตุ $CaHPO_4$ และ α-cellulose ไม่ละลายน้ำ ให้แบ่งชั่งใส่ flask ไว้ก่อน

6. Production medium 3 (for ethanol production)

Glucose	30	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	7.5	กรัม
KH_2PO_4	3.0	กรัม
$MgSO_4.H_2O$	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 5.0		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

7. Production medium 4 (for ethanol production)

Glucose	10	กรัม	*** ใช้ Avicel และ CMC แทนกลูโคส
Ammonium tartrate	0.2	กรัม	*** ใช้ 0.2 และ 2.0 กรัม
KH_2PO_4	2.0	กรัม	
$MgSO_4.H_2O$	0.5	กรัม	
$CaCl_2.2H_2O$	0.1	กรัม	
Thiamine hydrochloride	1.0	มิลลิกรัม	
$MnSO_4$	0.04	กรัม	
NaCl	1.0	กรัม	
$FeSO_4.7H_2O$	0.1	กรัม	
$CoCl_2.6H_2O$	0.02	กรัม	
$ZnSO_4.7H_2O$	0.1	กรัม	
$CuSO_4.5H_2O$	0.01	กรัม	
H_3BO_3	0.01	กรัม	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.01	กรัม	
น้ำกลั่น	1	ลิตร	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

สารเคมี A. 2% Na_2CO_3 ใน 0.2 M NaOH

B. 1% KNa Tartrate ในน้ำ

C. 0.5% $CuSO_4.5H_2O$ ในน้ำ

D. นำ A 48 มิลลิลิตร + B 1 มิลลิลิตร + C 1 มิลลิลิตร

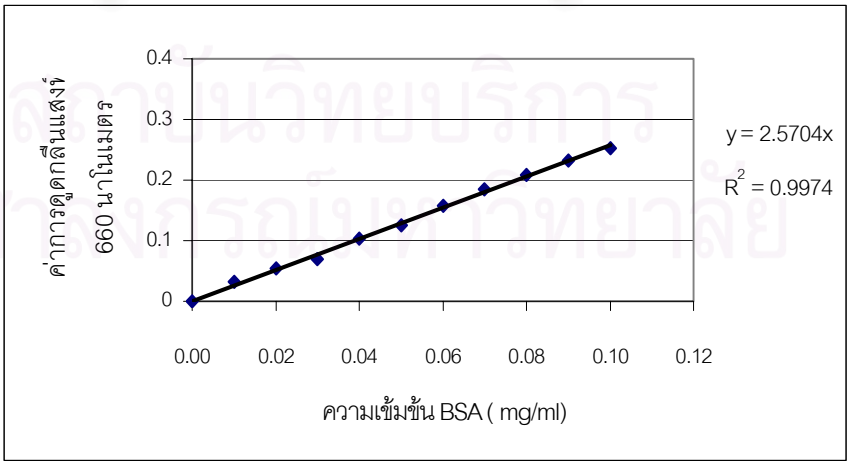
F. Folin-Phenol reagent

Standard BSA 1 mg/ml โดยใช้ที่ความเข้มข้น 0-100 µg/ml

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. เติมสารละลายที่ dilution 1 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย D 2 มิลลิลิตร
3. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
4. เติม folin-phenol 0.2 มิลลิลิตร
5. ผสม (vortex) อย่างรวดเร็ว
6. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานโปรตีน

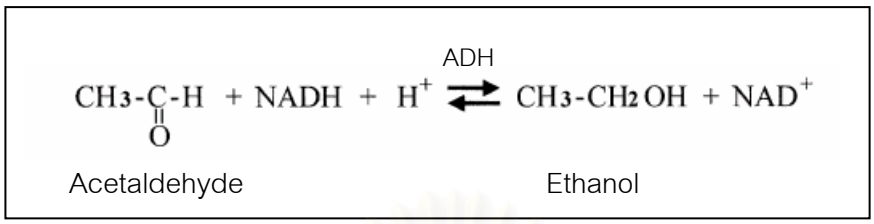


slope = 2.5704

2. การตรวจวัดหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส

(Alcohol dehydrogenase)

หลักการ



เครื่องมือ - Shimadzu UV-Visible recording spectrophotometer UV-160

วิธีการตรวจวัดหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส

1. เติม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย

75 µl	0.17 M Ethanol
15 µl	3.3 mM NAD
460 µl	10 mM Tris-HCl buffer pH 7.5
50 µl	Crude enzyme

2 นำ reaction ในข้อ 1 มาผสมใน cuvett เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว

3 หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที โดยมี blank เป็นสารละลายผสมเช่นเดียวกับข้อ1 แต่ไม่ใส่เอนไซม์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณ

จากกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer and Lambert's Law) กล่าวว่า

" ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้น "

หรือเขียนสมการ

$A = \varepsilon bc$

$\varepsilon = A / bc$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสง

ε = molar extinction coefficient ($M^{-1}cm^{-1}$)

b = ความกว้างของคิวเวทท์ (cm)

c = ความเข้มข้นของสาร (Molar)

ค่า ε ของ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 6220 หมายความว่า NADH 1 ไมโครโมล จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร เท่ากับ 6220 หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรที่เพิ่มขึ้น 6.22 หน่วย มีค่าเทียบเท่ากับปริมาณของ NADH ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล

นั่นคือ 1 หน่วยเอนไซม์ = ปริมาณของ NADH ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ต่อ 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

$A = 6220 \times 1 \times C\ M^{-1}cm^{-1}\ cm\ min^{-1}$

$C = (A/6.2 \times 10^{3})\ mol.\ L^{-1}.\ Min^{-1}$

$= (A/6.2 \times 10^{3}) \times 10^{-3}\ mol.\ ml^{-1}.\ min^{-1}$

$= 0.16A \times 10^{-6}\ mol.\ ml^{-1}.\ min^{-1}$

$= 0.16A\ \mu mol.\ ml^{-1}.min^{-1}$

$= 0.16A\ U.\ ml^{-1}$

ค่าแอคติวิตี (Activity)

จากการทดสอบใช้ เอนไซม์ 0.05 มิลลิลิตร ได้ค่าแอตติวิตี $0.16A\ U.ml^{-1}$

ถ้าใช้ เอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ได้ค่าแอตติวิตี $(0.16A\ U.ml^{-1}) \times (1/0.05)$

ได้ค่าแอตติวิตี = $B\ U.ml^{-1}$

ค่า specific activity

specific activity = (B U/ml) / (mg protein /ml)

= C U/mg protein

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การตรวจวัดหาแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP)

(Tien and Kirk, 1988)

หลักการ

เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจะทำหน้าที่เป็นตัวคะตะไลด์ในปฏิกิริยาออกซิเดสชั่นของ veratryl alcohol ให้เปลี่ยนเป็น veratraldehyde ซึ่ง veratraldehyde ที่เกิดขึ้นสามารถตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร (molar extinction coefficient เท่ากับ 9300 $M^{-1}cm^{-1}$)

วิธีการตรวจวัดหาแอคติวิตีของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

1. เติม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย

   100 µl 20 mM Veratryl alcohol

   700 µl 0.1 M Sodium tartrate buffer pH 3.0

   100 µl 2.5 mM H_2O_2

   100 µl Crude enzyme

2. นำ reaction ในข้อ 1 มาผสมใน cuvett โดยเติม 1 mM H_2O_2 เป็นลำดับสุดท้าย
3. หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตรเป็นเวลา 1 นาที โดยมี blank เป็นสารละลายผสมเช่นเดียวกับข้อ1 แต่ไม่ใส่เอนไซม์

การคำนวณ

ค่า ε ของ veratryldehyde ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 9300 หมายความว่า veratryldehyde 1 ไมโครโมล จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 310 นาโนเมตร ที่เพิ่มขึ้น 9.3 หน่วย มีค่าเทียบเท่ากับปริมาณของ veratryldehyde ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล

นั่นคือ 1 หน่วยเอนไซม์ = ปริมาณของ veratryldehyde ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ต่อ 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

จากการทดสอบใช้ เอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร ได้ค่าแอตติวิตี 0.11A $U.ml^{-1}$

ถ้าใช้ เอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ได้ค่าแอตติวิตี (0.11A $U.ml^{-1}$) x (1/0.1)

ได้ค่าแอตติวิตี = B $U.ml^{-1}$

4. การตรวจวัดหาแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP)

(Paszczynski et al., 1988)

หลักการ

เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวคะตะไลด์ปฏิกิริยาออกซิเดสชั่นของ Mn^{2+} เปลี่ยนเป็น Mn^{3+} เพื่อรวมตัวเป็นโครงสร้างกับ tartrate จาก Sodium tartrate แล้วชักนำให้ 2,6-dimethoxyphenol เปลี่ยนไปเป็น product ชนิดหนึ่ง ซึ่ง product นี้สามารถตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่น 568 นาโนเมตร (molar extinction coefficient เท่ากับ 49600 $M^{-1}cm^{-1}$)

วิธีตรวจวัดหาแอคติวิตีของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

1. เติม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย

50 µl	4 mM 2,6 Dimethoxyphenol
650 µl	0.1 M Sodium tartrate buffer pH 5.0
100 µl	5 mM $MnSO_4$
100 µl	1 mM H_2O_2
100 µl	Crude enzyme

2. นำ reaction ในข้อ 1 มาผสมใน cuvett โดยเติม 1 mM H_2O_2 เป็นลำดับสุดท้าย
3. หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรเป็นเวลา 1 นาที โดยมี blank เป็นสารละลายผสมเช่นเดียวกับข้อ1 แต่ไม่ใส่เอนไซม์

การคำนวณ

ค่า ε ของ product ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 49600 หมายความว่า product 1 ไมโครโมลจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร เท่ากับ 49600 หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตรที่เพิ่มขึ้น 49.6 หน่วย มีค่าเทียบเท่ากับปริมาณของ product ที่เกิดขึ้น1 ไมโครโมล

นั่นคือ 1 หน่วยเอนไซม์ = ปริมาณของ product ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ต่อ 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

จากการทดสอบใช้	เอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร ได้ค่าแอตติวิตี	0.02A $U.ml^{-1}$
ถ้าใช้	เอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ได้ค่าแอตติวิตี	(0.02A $U.ml^{-1}$) x (1/0.1)
	ได้ค่าแอตติวิตี	= B $U.ml^{-1}$

5. การตรวจวัดหาแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคส (Srinivasan et al., 1995)

หลักการ

เอนไซม์แลคเคสเป็นตัวคะตะไลด์ปฏิกิริยาออกซิเดสชั่นของ 2,6-dimethoxyphenol เปลี่ยนไปเป็น product ชนิดหนึ่ง ซึ่ง product นี้สามารถตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร (molar extinction coefficient เท่ากับ 49600 $M^{-1}cm^{-1}$)

วิธีตรวจวัดหาแอคติวิตีของเอนไซม์แลคเคส

1. เติม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย

   50 μl 4 mM 2,6 Dimethoxyphenol

   850 μl 0.1 M Sodium tartrate buffer pH 5.0

   100 μl Crude enzyme

2. นำ reaction ในข้อ 1 มาผสมใน cuvett เขย่าอย่างรวดเร็ว
3. หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรเป็นเวลา 1 นาที โดยมี blank เป็นสารละลายผสมเช่นเดียวกับข้อ1 แต่ไม่ใส่เอนไซม์

การคำนวณ

ค่า ε ของ product ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 49600 หมายความว่า product 1 ไมโครโมล จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร เท่ากับ 49600 หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร ที่เพิ่มขึ้น 49.6 หน่วย มีค่าเทียบเท่ากับปริมาณของ product ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล

นั่นคือ 1 หน่วยเอนไซม์ = ปริมาณของ product ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ต่อ 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

จากการทดสอบใช้ เอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร ได้ค่าแอตติวิตี 0.02A $U.ml^{-1}$

ถ้าใช้ เอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ได้ค่าแอตติวิตี (0.02A $U.ml^{-1}$) x (1/0.1)

ได้ค่าแอตติวิตี = B $U.ml^{-1}$

6. การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส (Exoglucanase) (Ghose, 1987)

วิธีการ

1. ใส่ 0.05 M Citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ใส่กระดาษ whatman No.1 ขนาด 1x6 เซนติเมตร (50 มิลลิลิตร)
3. ใส่ตัวอย่างเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. นำไปอุ่นใน water bath ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่งโมง (T_1)
5. เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาทีและทิ้งไว้ให้เย็น
6. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M Citrate buffer pH 4.8 แทนเอนไซม์เป็น blank

หมายเหตุ ที่ T_0 ไม่ต้องทำข้อ 4 ให้ข้ามไปทำข้อ 5

วิธีคำนวณค่า Unit of enzyme **ของวิธี** The International Union of Biochemistry

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย substrate ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 μmole ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ (Lehninger, 1982)

1 หน่วยเอนไซม์ = 1 μmole ของ substrateที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1 μmole ของ glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาในเวลา 1 นาที

= 0.18 มิลลิกรัม ของ glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาในเวลา 1 นาที

คำนวณค่า FPA (Filter Paper Activity)

ถ้า 0.18 mg glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า 1 หน่วย

1 mg glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 60 นาที มีค่า $\frac{1}{0.18 \times 60}$ หน่วย

$= \frac{}{0.093}$ นาที

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5 ml สามารถปล่อยglucose A mg ใน 60 นาที มีค่า = A x 0.093 หน่วย

เมื่อใช้เอนไซม์ 1 ml สามารถปล่อยglucose A mg ใน 60 นาที มีค่า = $\frac{A \times 0.093}{0.5}$ หน่วย

หรือ $= \frac{\text{mg glucose} \times 0.093}{\text{ml ของ เอนไซม์}}$ U/ml

7. การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (Endoglucanase) (Ghose, 1987)

วิธีการ

1. ใส่ 2% CMC ที่ละลายใน 0.05 M Citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ใส่ตัวอย่างเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปอุ่นใน water bath ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่งโมง (T_1)
4. เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาทีและทิ้งไว้ให้เย็น
5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M Citrate buffer pH 4.8 แทนเอนไซม์เป็น blank

หมายเหตุ ที่ T_0 ไม่ต้องทำข้อ 3 ให้ข้ามไปทำข้อ 4

วิธีคำนวณค่า Unit of enzyme **ของวิธี** The International Union of Biochemistry

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย substrate ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 μmole ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ (Lehninger, 1982)

1 หน่วยเอนไซม์ = 1μmole ของ substrateที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1μmole ของ glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาในเวลา 1 นาที

= 0.18 มิลลิกรัม ของ glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาในเวลา 1 นาที

คำนวณค่า Carboxymethyl cellulase (CMCase)

ถ้า 0.18 mg glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า 1 หน่วย

1 mg glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 30 นาที มีค่า $\frac{1}{0.18 \times 30}$ หน่วย

$= 0.185$ นาที

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5 ml สามารถปล่อยglucose B mg ใน 30 นาที มีค่า = $B \times 0.185$ หน่วย

เมื่อใช้เอนไซม์ 1 ml สามารถปล่อยglucose B mg ใน 30 นาที มีค่า = $\frac{B \times 0.185}{0.5}$ หน่วย

หรือ $= \frac{\text{mg glucose} \times 0.185}{\text{ml ของ เอนไซม์}}$ U/ml

8. **การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส** (beta-glucosidase)
(Sternberg et al., 1976)

วิธีการ

1. ใส่ 4 mg/ml salicin ที่ละลายใน 0.025 M Citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลง ในหลอดทดลอง
2. ใส่ตัวอย่างเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปอุ่นใน water bath ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่งโมง (T_1)
4. เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที และทิ้งไว้ให้เย็น
5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M Citrate buffer pH 4.5 แทนเอนไซม์เป็น blank

หมายเหตุ ที่ T_0 ไม่ต้องทำข้อ 3 ให้ข้ามไปทำข้อ 4

คำนวณค่า Carboxymethyl cellulase (CMCase)

วิธีการคำนวณแบบเดียวกับวิธีคำนวณเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

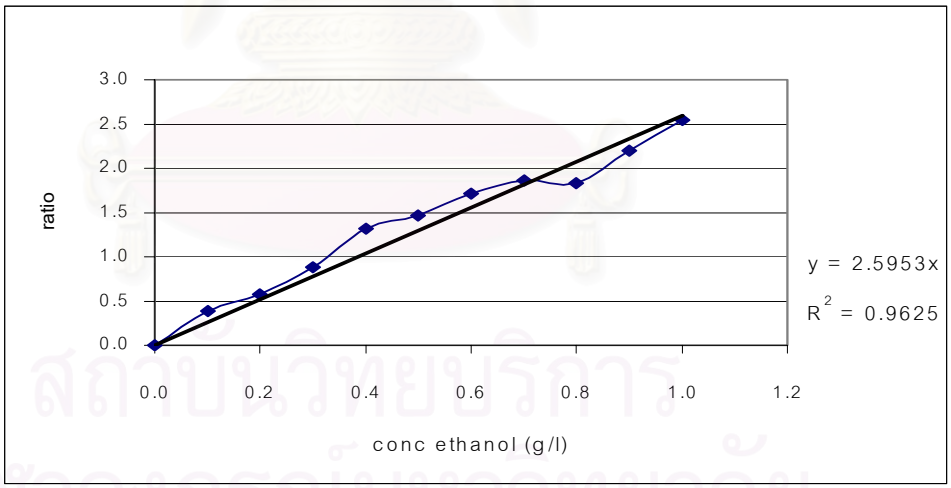
9. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

วิธีการ

1. ทำ standard curve ของ ethanol โดยเตรียม 0-1.0 mg/ml
2. ผสม ตัวอย่าง std ethanol 1 มิลลิลิตร กับ 3 g/l propanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Internal Std)
3. ฉีด GC 1 μl ตัวอย่างที่จะใช้ฉีด GC ต้อง centrifuge ก่อนที่ 12,000 rpm จากนั้นทำแบบเดียวกับข้อ 2 และ 3

การคำนวณ

ค่า Peak area ได้จากการวัดด้วยเครื่อง Gas Liquid Chromatography ในการคำนวณนำค่า peak area ของเอทานอลมาตรฐานหารด้วย area ของ propanol จะได้เป็นค่า ratio ไป plot กราฟมาตรฐานของเอทานอล จากนั้นนำค่า area ของตัวอย่างหารด้วย area ของ propanol ได้ค่า ratio จากนั้นนำไปหาค่าปริมาณเอทานอลจากกราฟมาตรฐาน ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร (g/l)



กราฟเอทานอลมาตรฐาน

slope = 2.5953

10. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล โดยวิธี DNS (Bernfeld, 1955)

ขั้นตอนการเตรียม

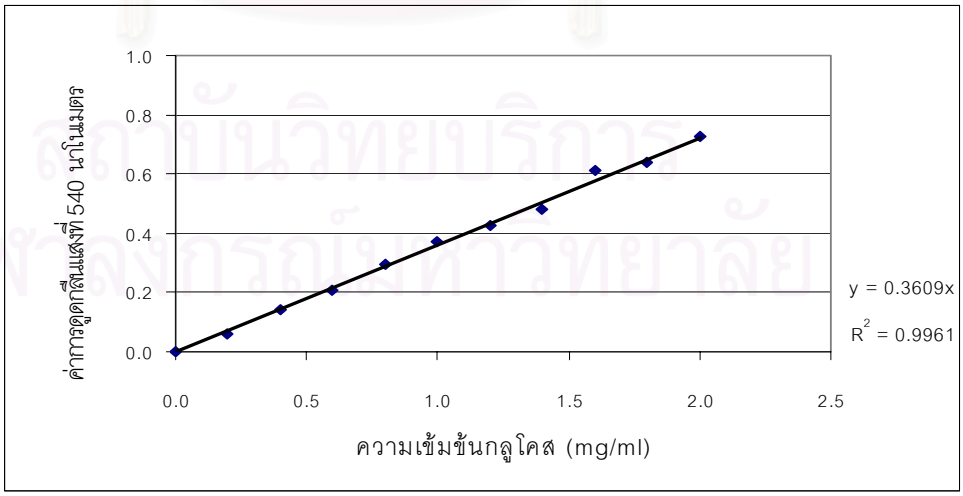
1. ชั่ง nitrosalicylic acid	1.0	กรัม
2. ชั่ง Sodiumhydroxide	20	กรัม
3. ผสมให้เข้ากัน		
4. เติมน้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร
5. เติม KNa tartrate	30	กรัม
6. ปรับปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร
7. เก็บในขวดสีชา		

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตสารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร
2. เติม DNS reagent 1 มิลลิลิตร
3. ต้ม 10 นาที จากนั้นทำให้เย็น
4. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
5. วัดค่าที่ 540 นาโนเมตร

** ทำ standard ของน้ำตาล โดยเตรียม 0-2.0 mg/ml

กราฟมาตรฐานน้ำตาล



slope = 0.3609

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุนันทา ชูแก้ว เกิดเมื่อวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2523 ที่จังหวัดตรัง สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2545 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี 2546 และสำเร็จการศึกษาในภาคปลาย ปีการศึกษา 2549

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย