จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน

รายงานผลการวิจัย

การผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราบางชนิด

PRODUCTION OF CELLULASE ENZYMES FROM CERTAIN FUNGI

โดย

หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และมุกดา คูหิรัญ

ปีงบประมาณ 2538

บทคัดย่อภาษาไทย

เซลลูเลสเป็นเอ็นไซม์ที่สำคัญ มีบทบาททั้งในทางนิเวศวิทยาในการย่อยสลายชีวมวลของพืช รวมทั้งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และในเชิงการค้า และอุตสาหกรรม การวิจัยถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา ทำให้พบว่า *Trichoderma reesei* ผลิตเอ็นไซม์ได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 30°C โดยดูจากค่าเซลลูเลสรวม (Filter Paper Activity หรือ FPA) สูงสุดระหว่าง 0.296 - 0.300 U/ml และendoglucanase (Carboxymethyl Cellulase หรือ CMCase) สูงสุดระหว่าง 11.949 - 11.956 U/ml ส่วน *Acrophialophora* ผลิตเอ็นไซม์ได้ดีที่สุดที่ pH ระหว่าง 5.0 - 5.5 และอุณหภูมิ 40°C โดยให้ค่า FPA สูงสุดระหว่าง 9.028 - 11.947 U/ml การสกัดเอ็นไซม์โดยใช้ตัวทำละลาย acetone หรือเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ทำให้ได้เอ็นไซม์ออกมาในรูปผงที่มีความเข้มข้นของเอ็นไซม์สูงกว่าเดิมระหว่าง 43 - 70 เท่า งานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงศักยภาพการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราอันเป็นแนวทางของการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

ABSTRACT

Cellulase are enzymes having important roles in ecology for the degradation of plant biomass and crop residues and are applicable for commerce and industry. This investigation to determine the optimal conditions for the production of cellulases revealed that *Trichoderma reesei* prefered pH 5.0 and 30°C as determined from the maximal total cellulase (Filter Paper Activity or FPA) between 0.296-0.300 U/ml and the endoglucanase (Carboxymethyl Cellulase or CMCase) between 11.949-11.956 U/ml. *Acrophialophora* produced enzymes optimally at pHs between 5.0-5.5 and 40°C, giving the optimal FPA between 0.255-0.295 U/ml and the optimal CMCase between 9.028-11.947 U/ml. The extraction of enzymes with acetone or $(NH_4)_2SO_4$ yielded concentrated enzyme powder with 43-70 times more activities. This research project showed the potential of producing cellulases from fungi and provided informations on the production essential for industries involved.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2538 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ นายพรเทพ ถนนแก้ว นางสาวอำนวย ขวัญเมือง และนายพงษ์ศักดิ์ ละไมพิศ ซึ่งช่วยให้งานวิจัยนี้ลุล่วงไปด้วยดี

ส่วนหนึ่งของผลงานนี้ได้รับการเผยแพร่เสนอในที่ประชุมทางวิชาการ การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 21 พ.ศ. 2538 และ 1995 Society for Industrial Microbiology Annual Meeting ที่ San Jose, CA, สหรัฐอเมริกา

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทนำ	1
วิธีวิจัย	2
ผลการวิจัย	8
การอภิปรายผล	26
ข้อสรุปและเสนอแนะ	28
บรรณานุกรม	29

เลขหมู่ จฬ
วท 15
เลขทะเบียน 008747
วัน,เดือน,ปี 7 มิ.ย. 39

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ค่า FPA (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *Acrophialophora* ที่ 30°C ช่วง pH 3.0-7.0---------- 10
2. ค่า FPA (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *T. reesei* QM 9414 ที่ 30°C ช่วง pH 3.0-7.0---------- 11
3. ค่า CMCase (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *Acrophialophora* ที่ 30°C ช่วง pH 3.0-7.0---------- 12
4. ค่า CMCase (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *T. reesei* QM 9414 ที่ 30°C ช่วง pH 3.0-7.0---------- 13
5. ค่า FPA (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *Acrophialophora* ที่ pH 5.0 ช่วงอุณหภูมิ 25-45°C---------- 14
6. ค่า CMCase (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *Acrophialophora* ที่ pH 5.0 ช่วงอุณหภูมิ 25-45°C---------- 15
7. ค่า FPA (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *T. reesei* QM 9414 ที่ pH 5.0 ช่วงอุณหภูมิ 25-45°C----------16
8. ค่า CMCase (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *T. reesei* QM 9414 ที่ pH 5.0 ช่วงอุณหภูมิ 25-45°C----------17
9. การผลิตเซลลูเลส (FPA และ CMCase) โดย T. reesei QM 6a ที่ pH 5.5 อุณหภูมิ 30°C---------- 19
10. ผลของการเติม soybean meal (0-0.125%) ที่มีต่อการผลิตเซลลูเลสโดย *Acrophialophora sp.*---------- 20
11. ปริมาณเซลลูเลส (FPA และ CMCase) จากเชื้อราที่ได้จากการสกัดด้วย acetone หรือ $(NH_4)_2SO_4$---------- 23

สารบัญภาพ

ภาพประกอบที่ หน้า

1. ผังแสดงการวิเคราะห์ปริมาณเอ็นไซม์เซลลูเลสรวม
   ด้วยวิธี Filter Paper Activity (FPA)---------- 6
2. ผังแสดงการวิเคราะห์ปริมาณเอ็นไซม์ endoglucanase
   ด้วยวิธี Carboxymethyl cellulase (CMCase)---------- 7
3. ลักษณะโคโลนี
   ก. *Trichoderma reesei* QM 9414---------- 9
   ข. *T. reesei* QM 6a---------- 9
   ค. *Acrophialophora sp.*---------- 9
4. ผลของการเติมอาหารเสริม soybean meal ต่อ
   การผลิตเซลลูเลส (FPA)---------- 21
5. ผลของการเติมอาหารเสริม soybean meal ต่อ
   การผลิตเซลลูเลส (CMCase)---------- 22
6. ลักษณะผงที่ได้จากการสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลส
   ก. สกัดด้วย Acetone----------24
   ข. สกัดด้วย $(NH_4)_2SO_4$---------- 24

การผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราบางชนิด

บทนำ

เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบโครงสร้างที่สำคัญในเซลของพืช มีลักษณะประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสมาต่อกันเป็นสาย ถือกันว่าเซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์เคมีที่มีมากที่สุดในโลก พบทั่วไปในชีวมวลของพืช ปริมาณเซลลูโลสในโลกได้มีผู้ประมาณไว้ในช่วง 1.4 ถึง 1.8 x 10^{12} ตัน และในแต่ละปีจะมีการสร้างขึ้นใหม่จากการสังเคราะห์แสงของพืชเป็นจำนวนประมาณในช่วง 0.1 ถึง 28 x 10^{12} ตัน (Arora et al., 1991 และ Fogarty and Kelly, 1990) ตามปกติเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายในธรรมชาติก็โดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ใน สิ่งแวดล้อมเป็นส่วนใหญ่ จุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสที่สำคัญคือ พวกราซึ่งมีอยู่หลายชนิด แต่ที่มีการศึกษากันมากจนถึงขั้นนำมาใช้ในเชิงการค้าและอุตสาหกรรมได้แก่ *Trichoderma reesei* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ในสหรัฐอเมริกาของ *Trichoderma* ที่ แยกได้จากธรรมชาติ

เนื่องจากเซลลูเลสเป็นเอ็นไซม์เชิงซ้อน (Complex enzyme) ประกอบด้วยเอ็นไซม์อย่างน้อย 3 ตัวมาทำงานร่วมกันคือ Endoglucanase (EC 3.2.1.4), Exoglucanase (Cellobiohydrolase) และ β-glucosidase การย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสจะมีประสิทธิภาพมากน้อยแค่ไหน ขึ้นกับการทำงานร่วมกันแบบต่อเนื่องของเอ็นไซม์เหล่านี้ ปกติเชื้อรา *Trichoderma* จะมีองค์ประกอบ Cellobiohydrolase มากกว่าส่วนอื่นคือประมาณ 50-80% ทำการย่อยสลายในบางครั้งมีขีดจำกัด (Arora et at., 1991) นอกจากนั้นแล้วเชื้อ *Trichoderma* ยังชอบเจริญที่อุณหภูมิระหว่าง 25-30°C ในขณะที่การทำงานหรือ activity ของเอ็นไซม์จะมีสูงสุดที่ 55°C (Worthington, 1979) ทำให้ต้องมีการแยกถังสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอ็นไซม์ออกจากถังหมักที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสจากปัญหาข้อจำกัด และความสำคัญของเอ็นไซม์ทำให้มีนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกพยายามศึกษาถึงเซลลูเลสมาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลามากกว่า 30 ปี อาทิเช่น มีการปรับปรุงสายพันธุ์ *Trichoderma* ให้ได้ประสิทธิภาพดีขึ้น (Robison, 1984) หรือ แยกเชื้อราใหม่ที่ผลิตเอ็นไซม์ได้ดี ได้แก่ *Penicillium* และ *Neocallimastis* เป็นต้น (Arora et al., 1991)

ประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อนมีทรัพยากรประเภทลิกโนเซลลูโลส อันเป็นองค์ประกอบที่ได้จากพืช และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นจำนวนมากทำให้เกิดสภาวะการย่อยสลายโดยเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ จากการสำรวจตัวอย่างดิน และเศษพืชในบางจังหวัดของภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยทำให้ทางห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ได้พบเชื้อรา *Acrophilophora* จากดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความสามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ใกล้เคียงกับ *Trichoderma sp.* และยังมีคุณสมบัติที่เหนือกว่า *Trichoderma* ตรงที่สามารถทนร้อน และสร้างเอ็นไซม์ที่อุณหภูมิสูงกว่า (Punnapayak et al., 1995) ทำให้มีแรงจูงใจที่ทำให้เกิดโครงการนี้ขึ้นเพื่อวิจัยถึงความเป็นไปได้ในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา ทั้งจาก สายพันธุ์ต่างประเทศ และสายพันธุ์ที่แยกได้เองในประเทศไทยเพื่อประโยชน์อันพึงมีแก่วงการอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องต่อไป

วิธีวิจัย

จุลินทรีย์และการเลี้ยงเชื้อ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยคือ เชื้อรา มี 3 สายพันธุ์คือ

Trichoderma reesei QM 9414 ได้รับจาก American Type Culture Collection, สหรัฐอเมริกา

T. reesei QM 6a ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย และ

Acrophilophora จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินบริเวณที่มีการปลูกป่านศรนารายณ์

การเลี้ยงเชื้อแบ่งได้เป็น

1. การเตรียมหัวเชื้อ (stock culture)

เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) ซึ่งประกอบด้วย 3.9% PDA (Difco Laboratories, MI, USA) ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที เลี้ยงหัวเชื้อในรูปของ slant culture

2. <u>การเตรียมเชื้อตั้งต้น</u> (inoculum)

ใช้อาหารกึ่งแข็งสูตร PDA มาเทใส่ในจานแก้ว Petridish ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อเตรียม agar plate หลังจากนั้นก็นำหัวเชื้อมาถ่ายลง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40°C สำหรับ *Acrophilophora* และ 30°C สำหรับ *T. reesei* QM 9414 และ *T. reesei* QM 6a เป็นเวลา 7 วัน

<u>การผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส</u>

1. <u>การผลิตเพื่อหาสภาวะ pH ที่เหมาะสม</u>

เตรียมอาหารเหลวสูตร Production medium (Punnapayak and Emert, 1986) ประกอบด้วย

1% macronutrients ($MgSO_4$, $CaHPO_4$ และ $(NH_4)_2SO_4$)

0.00116% micronutrients ($FeSO_4$, $ZnSO_4$, $MnSO_4$, $CoCl_2$)

0.7% Corn steep liquor

0.2% Tween 80

น้ำกลั่น และ3% microcrystalline cellulose

บรรจุใน flask ขนาด 250 ml ปริมาณ 100 ml ต่อ flask ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl ให้มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที แล้วนำเชื้อตั้งต้นมาจาก agar plate เจาะวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่เป็นชิ้นกลม แต่ละชิ้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ใส่ชิ้นของเชื้อตั้งต้นนี้ลงในอาหารจำนวน 5 ชิ้นต่อ 1 flask บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker Model G 25, New Brunswick Scientific, USA) ที่ความเร็ว 150 รอบ ต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน นำไปวิเคราะห์เอ็นไซม์

2. <u>การผลิตเพื่อหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม</u>

ใช้อาหารสูตร Production medium (Punnapayak and Emert, 1986) ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 5.0 ใช้อาหาร 100 ml ต่อ flask ขนาด 250 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที ใส่เชื้อตั้งต้นจำนวน 5 ชิ้นต่อ flask แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่า

แบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิที่ใช้มี 25, 30, 35, 40, และ 45°C เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน นำไปวิเคราะห์เอ็นไซม์

3. การผลิตในสภาวะที่มีอาหารเสริมประเภท Protein nutrients

อาหารเสริมประเภท Protein nutrient ที่ใช้ soybean meal ซึ่งเป็นโปรตีนแปรรูปจากถั่วเหลือง ใช้ความเข้มข้น 0.05, 0.075, 0.1, 0.125% เทียบกับไม่ได้ใช้ (0%) โดยเติมลงไปในอาหารเหลวที่ใช้ผลิตเอ็นไซม์สูตร Production medium ที่มี 0.4% NH_4NO_3 ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน นำไปวิเคราะห์เอ็นไซม์

การแยกสกัดเอ็นไซม์เซลลูเลส

ทำการแยกสกัดเอ็นไซม์ออกมาเป็นผงโดยใช้ 2 วิธีคือ

1. Solvent extraction ใช้ acetone

นำสารละลายเอ็นไซม์ที่ได้มาจากการผลิตของเชื้อรา มาเติม acetone ในอัตราส่วน 1 : 3 เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งให้ตกตะกอนที่ 15°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมงนำไปปั่นแยกตะกอนที่ 1,700 rpm 27°C เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนไปอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง

2. Salt precipitation ใช้ $(NH_4)_2SO_4$

นำสารละลายเอ็นไซม์ที่ได้มาจากการผลิตของเชื้อรามาเติมผง $(NH_4)_2SO_4$ อย่างช้าๆ จนมีความอิ่มตัว 40% คนต่อไปอีก 30 นาที นำไปปั่นเพื่อแยกตะกอนที่ 7,000 rpm 45 นาที ที่ 4°C นำน้ำใสที่ได้มาตกตะกอนซ้ำ แล้วรวมตะกอนที่ได้มาอบแห้งที่ 35°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ทางเคมี

การวิเคราะห์ปริมาณเอ็นไซม์เซลลูเลสรวม

ใช้วิธี Filter Paper Activity (FPA) ของ Mandels และ Sternberg (1976) โดยการนำสารละลายเอ็นไซม์ 0.5 ml มาเติม 0.05 M Citrate buffer pH 4.8 ตามด้วยกระดาษกรอง นำไปอุ่นใน waterbath ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารวิเคราะห์ Dinitrosalicylic acid reagent (DNS) นำไปต้มที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 16 ml แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 550 nm วิธีการแสดงในภาพประกอบที่ 1

ค่า FPA (1 หน่วย) = ปริมาณของเอ็นไซม์ที่สามารถย่อยสลายกระดาษกรองให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส 1 μm ภายในเวลา 1 นาที

การวิเคราะห์ปริมาณเอ็นไซม์ endoglucanase

ใช้วิธี CMCase assay ของ Acebal และคณะ (1986) นำสารละลายเอ็นไซม์ 50 μm มาเติม citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.95 ml และเติม carboxymethyl cellulase (CMC) นำไปอุ่นใน waterbath ที่อุณหภูมิ 50°C เติมสารวิเคราะห์ DNS 3 ml นำไปต้มที่ 100°C 5 นาที เติมน้ำกลั่นแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm วิธีการแสดงในภาพประกอบที่ 2

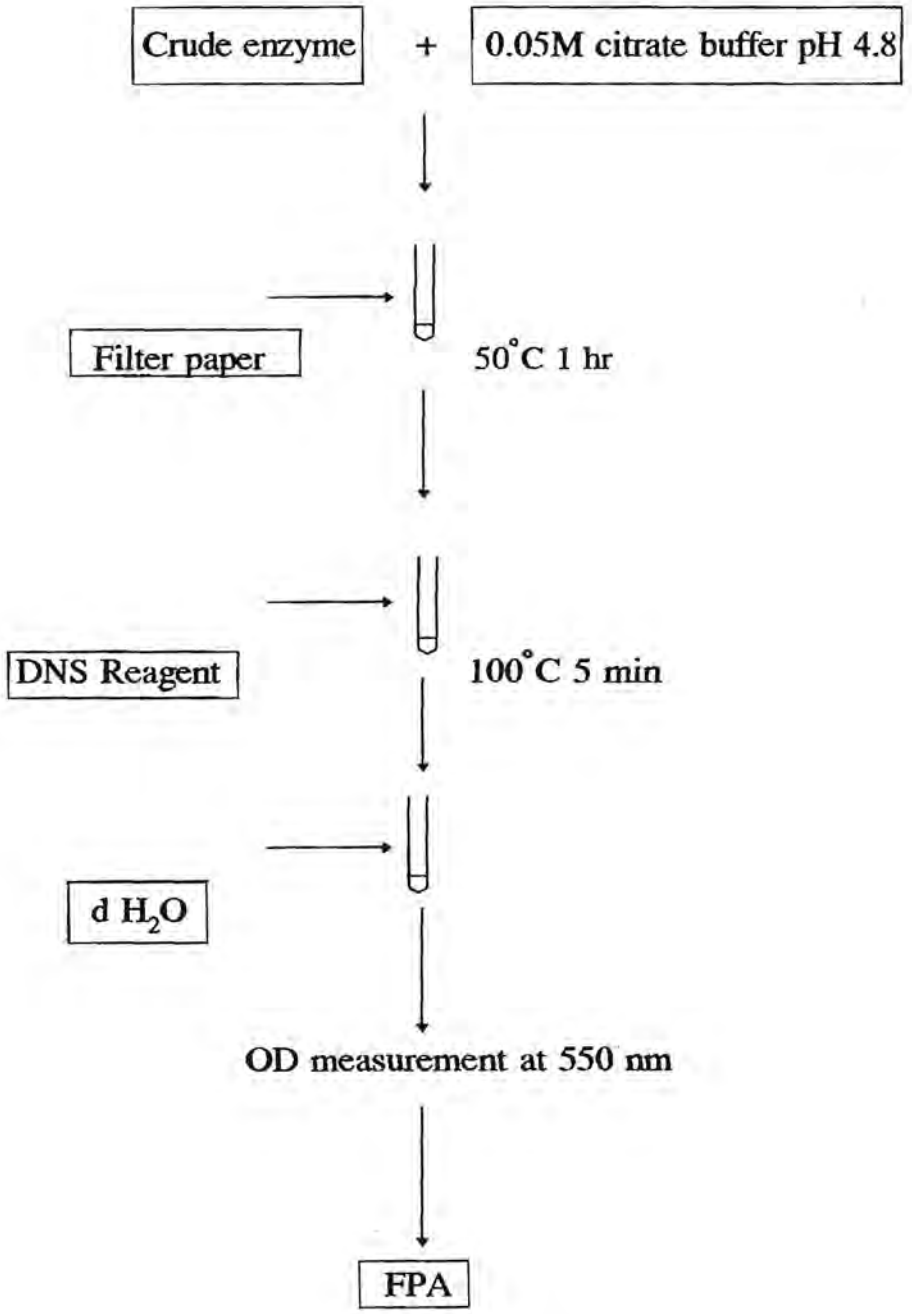
CMCase (1 หน่วย) = ปริมาณของเอ็นไซม์ที่สามารถย่อยสลาย CMC ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 μm ในเวลา 1 นาที

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาย่อยสลายของเอ็นไซม์จะถูกตรวจพบได้โดยใช้วิธี DNS assay (Miller, 1959) โดยใช้สารวิเคราะห์ DNS ประกอบด้วย NaOH, Phenol, $NaHSO_3$ และ Rochell salt

การทดลองทุกขั้นตอนมีการทำซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย

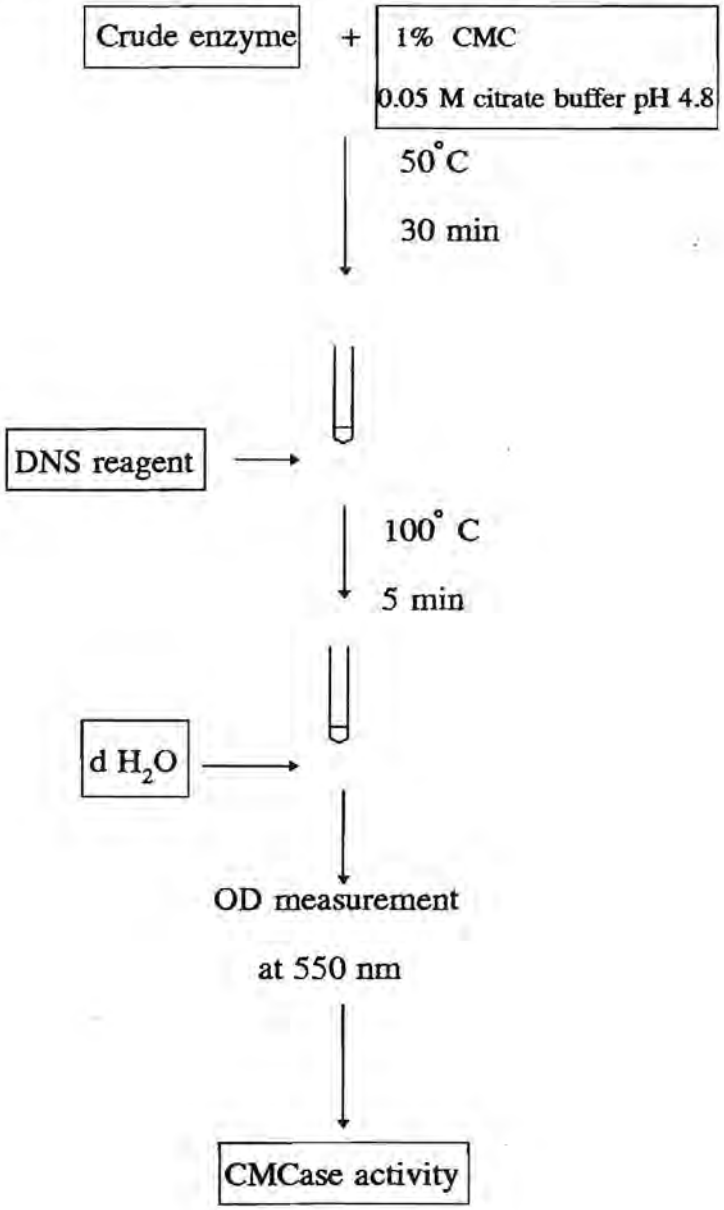
Filter paper activity method (FPA)



ภาพประกอบที่ 1 ผังแสดงวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเอ็นไซม์เซลลูเลส
รวมด้วยวิธี Filter Paper Activity (FPA)

การวิเคราะห์เอนไซม์

Carboxymethylcellulase activity method (CMCase)



ภาพประกอบที่ 2 ผังแสดงวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเอ็นไซม์ endoglucanase ด้วยวิธี Carboxymethyl cellulase (CMCase)

ผลการวิจัย

การเลี้ยงเชื้อรา *T. reesei* QM 9414, *T. reesei* QM 6a และ *Acrophialophora* คือ เชื้อราทั้ง 3 ชนิดที่ถูกเลี้ยงใน agar plate ลักษณะของโคโลนี และสีของเส้นใย หรือสปอร์ที่เกิดขึ้น แสดงให้เห็นในภาพประกอบที่ 3 (ก ข และ ค)

การผลิตเพื่อหา pH ที่เหมาะสม

ผลของ pH เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบระหว่าง *Acrophialophora* กับ *T. reesei* โดยใช้สายพันธุ์ QM 9414 เป็นตัวแทน พบว่า ทั้ง *Acrophialophora* และ *T. reesei* มีค่า pH ที่ให้ FPA สูงสุดที่ pH = 5.0 โดย *Acrophialophora* ให้ FPA สูงสุด 0.255 U/ml (ตารางที่1) ขณะที่ *T. reesei* ให้ค่า FPA สูงสุด 0.296 U/ml (ตารางที่ 2) ผลของ pH เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบระหว่าง *Acrophialophora* และ *T. reesei* โดยใช้สายพันธุ์ QM 9414 เป็นตัวแทน พบว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับ *Acrophialophora* คือ 5.5 โดยให้ค่า CMCase สูงสุดที่ 9.028 U/ml (ตารางที่ 3) ส่วน *T. reesei* มี pH ที่เหมาะสม คือ 5.0 โดยให้ค่า CMCase สูงสุดที่ 11.956 U/ml (ตารางที่ 4)

การผลิตที่อุณหภูมิเหมาะสม

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจาก *Acrophialophora* คือ 40°C โดยให้ค่า FPA สูงสุด 0.295 U/ml (ตารางที่ 5) และ CMCase สูงสุด 11.947 U/ml (ตารางที่ 6) ส่วน *T. reesei* โดยมีสายพันธุ์ QM 9414 เป็นตัวแทน พบว่า มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30°C โดยให้ FPA สูงสุด 0.30 U/ml (ตารางที่ 7) และ CMCase สูงสุด 11.949 U/ml (ตารางที่ 8)

ก

ภาพประกอบที่ 3 ลักษณะโคโลนี

ก. Acrophialophora sp.

ข. Trichoderma reesei QM 9414

ค. Trichoderma reesei QM 6a

ตารางที่ 1 ค่า FPA (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *Acrophialophora* ที่ 30°C ช่วง pH 3.0-7.0

อายุ	pH เริ่มต้น						
(วัน)	3.0	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	7.0
3	0.026	0.054	0.060	0.076	0.071	0.064	0.029
6	0.113	0.172	0.198	0.222	0.208	0.184	0.169
9	0.162	0.192	0.222	0.255	0.239	0.220	0.218
12	0.148	0.181	0.215	0.247	0.231	0.216	0.213
15	0.157	0.181	0.212	0.249	0.232	0.223	0.192

ตารางที่ 2 ค่า FPA (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *T. reesei* QM 9414 ที่ 30°C ช่วง pH 3.0-7.0

อายุ (วัน)	pH เริ่มต้น						
	3.0	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	7.0
3	0.035	0.062	0.074	0.093	0.085	0.070	0.041
6	0.120	0.176	0.221	0.270	0.239	0.210	0.174
9	0.160	0.216	0.250	0.289	0.258	0.226	0.199
12	0.155	0.219	0.246	0.296	0.268	0.227	0.191
15	0.158	0.217	0.252	0.294	0.266	0.230	0.186

ตารางที่ 3 ค่า CMCase (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *Acrophialophora* ที่ 30°C ช่วง pH 3.0-7.0

อายุ (วัน)	pH เริ่มต้น						
	3.0	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	7.0
3	1.308	2.433	3.002	3.606	3.719	2.640	2.043
6	2.456	4.040	4.996	6.440	6.676	5.303	3.972
9	3.972	5.280	6.519	7.971	8.132	6.589	4.775
12	4.591	6.313	7.392	8.618	8.804	6.749	5.900
15	4.568	6.956	7.661	8.753	9.028	7.208	6.015

ตารางที่ 4 ค่า CMCase (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *T. reesei* QM 9414 ที่ 30°C ช่วง pH 3.0-7.0

อายุ (วัน)	pH เริ่มต้น						
	3.0	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	7.0
3	1.381	2.551	3.123	5.589	4.012	3.537	2.168
6	2.469	4.155	6.469	8.992	7.671	5.347	4.222
9	4.044	5.356	8.715	10.126	9.965	6.622	5.573
12	4.602	6.573	9.894	11.684	10.823	7.182	5.778
15	4.596	7.227	10.044	11.956	10.910	7.492	5.742

ตารางที่ 5 ค่า FPA (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *Acrophialophora* ที่ pH 5.0 ช่วง อุณหภูมิ 25-45°C

อายุ	อุณหภูมิ (°C)				
(วัน)	25	30	35	40	45
3	0.061	0.077	0.079	0.091	0.019
5	0.202	0.210	0.253	0.270	0.027
9	0.216	0.254	0.261	0.284	0.052
12	0.227	0.235	0.270	0.294	0.073
15	0.218	0.239	0.278	0.295	0.091

ตารางที่ 6 ค่า CMCase (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *Acrophialophora* ที่ pH 5.0 ช่วง อุณหภูมิ 25-45°C

อายุ (วัน)	อุณหภูมิ (°C)				
	25	30	35	40	45
3	3.184	3.591	4.359	5.533	0.452
5	4.201	6.436	7.159	8.988	1.310
9	4.901	7.927	8.582	10.117	1.536
12	5.420	8.582	9.598	11.631	2.642
15	5.488	8.627	9.756	11.947	2.529

ตารางที่ 7 ค่า FPA (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *T. reesei QM 9414* ที่ pH 5.0 ช่วง อุณหภูมิ 25-45°C

อายุ	อุณหภูมิ (°C)				
(วัน)	25	30	35	40	45
3	0.090	0.101	0.072	0.056	0.013
5	0.266	0.276	0.215	0.090	0.015
9	0.282	0.291	0.234	0.169	0.020
12	0.293	0.300	0.240	0.180	0.023
15	0.290	0.297	0.232	0.194	0.024

ตารางที่ 8 ค่า CMCase (U/ml) ที่ได้จากการผลิตเซลลูเลสโดย *T. reesei QM 9414* ที่ pH 5.0 ช่วง อุณหภูมิ 25-45°C

อายุ (วัน)	อุณหภูมิ (°C)				
	25	30	35	40	45
3	5.517	5.646	3.713	0.640	0.129
5	8.577	9.002	6.333	1.613	0.559
9	10.095	10.137	6.827	2.132	0.824
12	11.555	11.711	7.169	2.692	1.045
15	11.778	11.949	7.143	2.660	1.062

การผลิตเอ็นไซม์จาก *T. reesei* QM 6a

การผลิตเอ็นไซม์จาก *T. reesei* สายพันธุ์ QM 6a ที่อุณหภูมิ 30°C pH 5.5 ในช่วง 15 วัน พบว่าได้ CMCase สูงสุดที่ 3.92 U/ml และ FPA สูงสุด 0.612 U/ml (ตารางที่ 9)

การผลิตในสภาวะที่มีอาหารเสริมประเภท Protein nutrients

การผลิตเอ็นไซม์จาก *Acrophialophora* ที่อุณหภูมิ 40°C pH 5.0 เติมอาหารเสริมประเภท Protein nutrients คือ soybean meal ความเข้มข้นช่วง 0.05 ถึง 0.125% พบว่าการเติม soybean meal ที่ 0.1% มีผลดีต่อการผลิต ให้ค่า FPA สูงสุด 0.369 U/ml และ CMCase สูงสุด 21.143 U/ml (ตารางที่ 10 ภาพประกอบที่ 4 และ 5)

การสกัดเอ็นไซม์

ผลการทดลองสกัดเอ็นไซม์ที่ได้จาก *T. reesei* QM 6a และ *Acrophialophora* โดยวิธีการตกตะกอน พบว่าทำให้ได้เอ็นไซม์เซลลูเลสในรูปผงที่มีความเข้มข้น และปฏิกิริยาสูงขึ้นเช่น Acrophialophora มีค่าของ CMCase ก่อนการสกัดด้วย acetone 12.063 U/ml สามารถเพิ่มปริมาณได้เป็นถึง 696.38 U/ml หลังการสกัดแล้ว (เพิ่ม 58 เท่า) เป็นต้น ดังแสดงสรุปในตารางที่ 11 ลักษณะของผงที่ได้แสดงให้เห็นในภาพประกอบที่ 6 (ก ข) การสกัดเอ็นไซม์ออกมาในรูปผงทำให้เกิดความสะดวกถ้าจะมีการนำไปใช้งานในเชิงอุตสาหกรรม นอกจากนั้นแล้วยังทำให้เอ็นไซม์เข้มข้นขึ้นกว่าเดิมอีกในช่วงระหว่าง 44 ถึง 70 เท่า โดยทั่วไปพบว่า acetone ซึ่งเป็น organic solvent สามารถสกัดเอ็นไซม์ ออกมาได้ดีกว่าการตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อย่างไรก็ตามการใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ตกตะกอนมีข้อดีอยู่ตรงที่สามารถทำได้ไม่ยุ่งยาก ในราคาที่ถูกกว่าผงที่ผลิตได้จากการสกัดทั้ง 2 วิธี มีประสิทธิภาพดีดังจะเห็นได้จากปริมาณเอ็นไซม์ที่วิเคราะห์ได้ที่เพิ่มขึ้นหลายเท่า

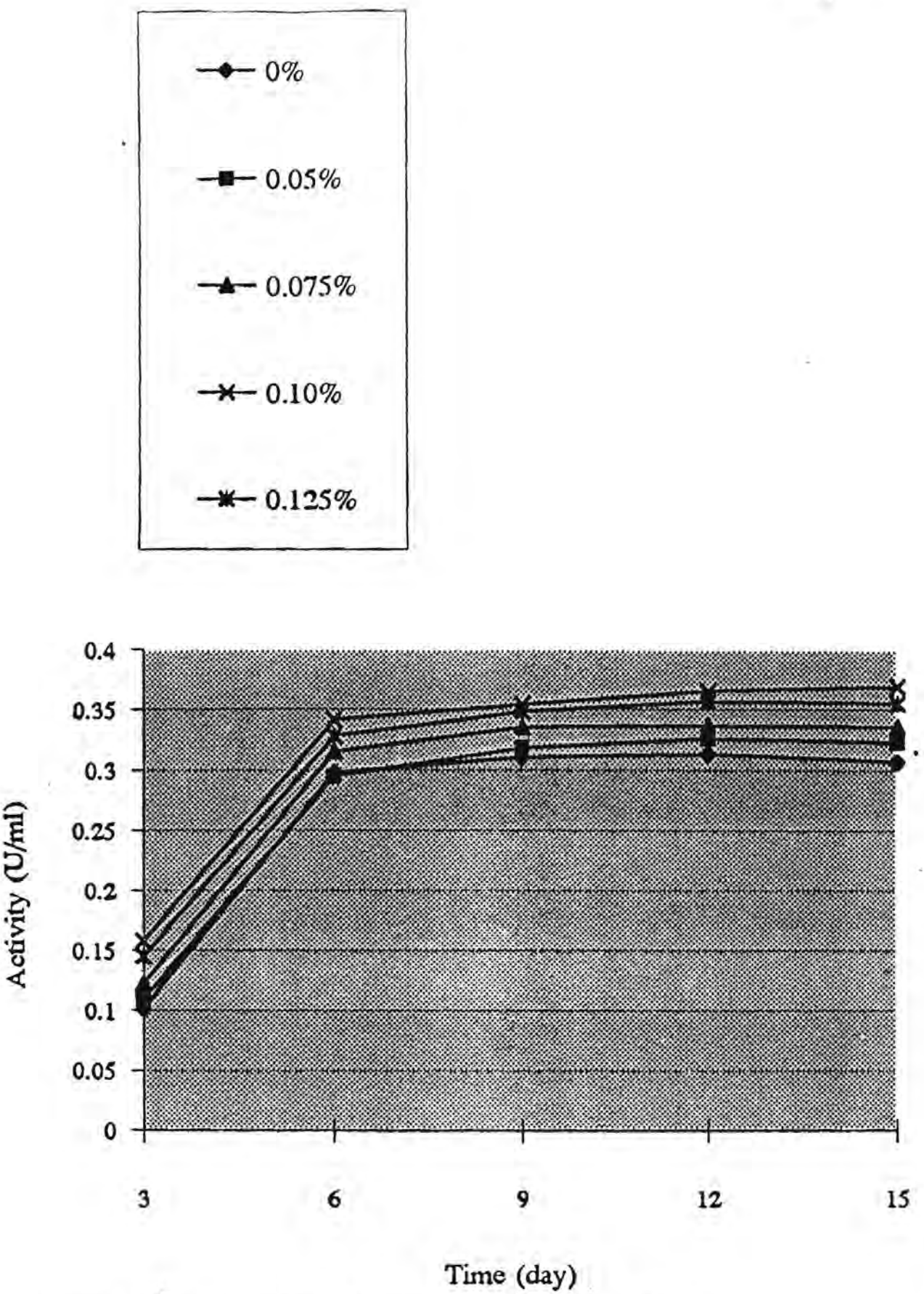
งานวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบถึงศักยภาพในแง่มุมต่างๆ ของการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราทั้งสายพันธุ์ต่างประเทศคือ *T. reesei* และสายพันธุ์ที่แยกได้เองในประเทศไทยคือ *Acrophialophora* เป็นข้อมูลเพิ่มเติมจากที่ได้มีผู้ศึกษามาแล้วในการแยกเชื้อและผลิตเอ็นไซม์จาก *Acrophialophora* (Punnapayak et al. 1995 และ พรเทพ ถนนแก้ว

ตารางที่ 9 การผลิตเซลลูเลส(FPA และCMCase (U/ml) โดย *T. reesei* QM 6a ที่ pH 5.5 อุณหภูมิ 30°C

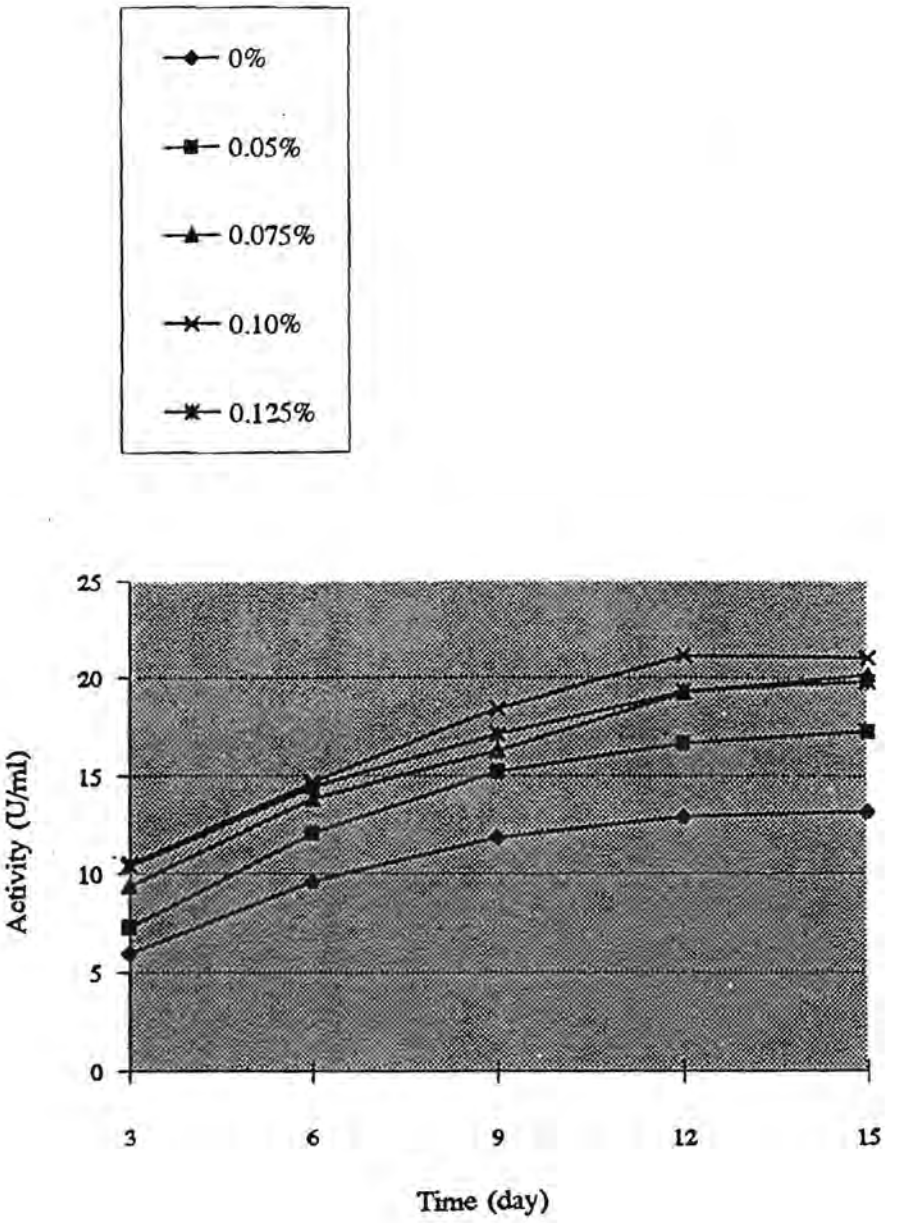
ระยะเวลาการผลิต (วัน)	ปริมาณเอ็นไซม์ (U/ml)	
	CMCase	FPA
3	0.706	0.007
6	3.238	0.313
9	3.920	0.531
12	3.825	0.612
15	2.564	0.430

ตารางที่ 10 ผลของการเติม soybean meal (0-0.125%) ที่มีต่อการผลิตเซลลูเลสโดย *Acrophialophora sp.*

ปริมาณ soybean meal	ชนิดและปริมาณเอ็นไซม์ (U/ml)	เวลาในการผลิต (วัน)				
		3	6	9	12	15
0	FPA	0.101	0.298	0.310	0.313	0.307
	CMCase	5.923	9.596	11.823	12.902	13.177
0.05	FPA	0.109	0.295	0.318	0.326	0.323
	CMCase	7.254	12.075	15.197	16.667	17.241
0.075	FPA	0.122	0.315	0.335	0.337	0.336
	CMCase	9.366	13.843	16.253	19.261	20.156
0.10	FPA	0.158	0.341	0.354	0.365	0.369
	CMCase	10.468	14.646	18.434	21.143	21.051
0.125	FPA	0.145	0.328	0.348	0.357	0.355
	CMCase	10.376	14.417	17.103	19.307	19.812



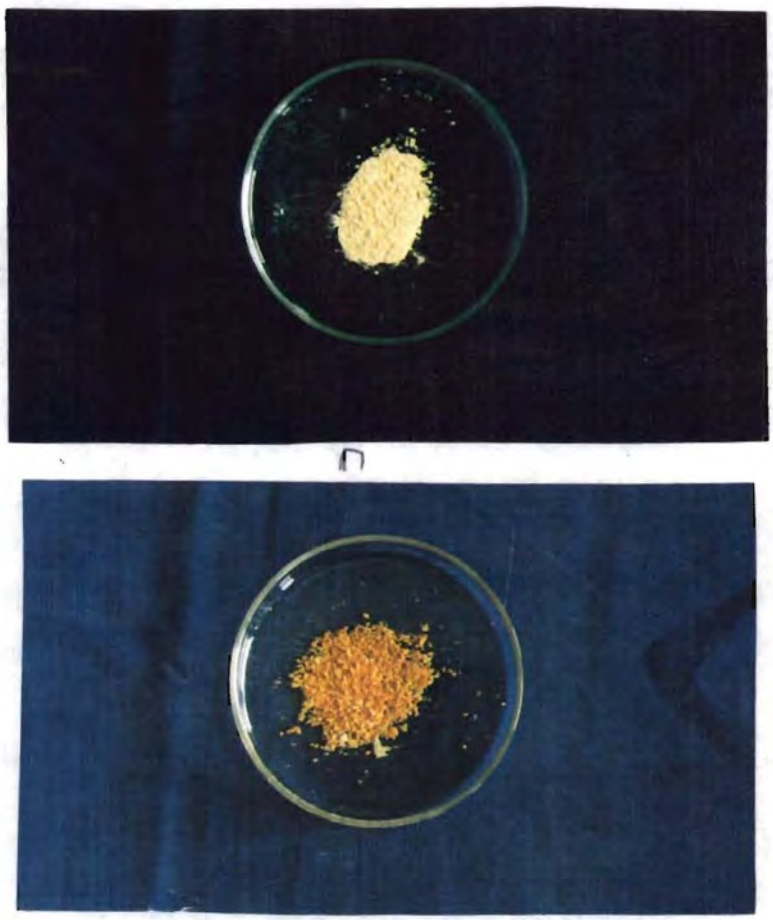
ภาพประกอบที่ 4 ผลของการเติมอาหารเสริม Soy bean meal ต่อการผลิตเซลลูเลส (FPA)



ภาพประกอบที่ 5 ผลของการเติมอาหารเสริม Soy bean meal ต่อการผลิตเซลลูเลส (CM Case)

ตารางที่ 11 ปริมาณเอ็นไซม์เซลลูเลสก่อน และหลังการสกัดโดยวิธีตกตะกอน

เชื้อรา	สารเคมี	ปริมาณเอ็นไซม์ (U/ml) ก่อนการสกัด		ปริมาณเอ็นไซม์ (U/ml) ที่สกัดได้	
		FPA	CMCase	FPA	CMCase
Acrophialophora	acetone	0.252	12.063	15.880	696.368
	$(NH_4)_2SO_4$	0.255	12.158	12.809	544.528
T. reesei QM 9414	acetone	0.480	23.310	28.075	1,293.255
	$(NH_4)_2SO_4$	0.478	23.059	20.881	1,120.472
T. reesei QM 6a	acetone	0.28	17.92	17.10	553.60
	$(NH_4)_2\ SO_4$	0.27	7.32	14.20	449.40



ภาพประกอบที่ 6 ลักษณะผงที่ได้จากการสะกัดเอ็นไซม์เซลลูเลส

ก. สะกัดด้วย Acetone

ข. สะกัดด้วย $(NH_4)_2\ SO_4$

และคณะ 2538) หรือการผลิตเอ็นไซม์ในประเทศไทยจาก *T. reesei* (หรรษา ปุณณพยัคฆ์ และคณะ 2538) รวมทั้งการที่มีผู้เคยศึกษาการผลิตเอ็นไซม์จาก *T. reesei* เพื่อดูถึงการย่อยสลายเปลือกถั่วลิสง (พงษ์ศักดิ์ ละไมพิศ และคณะ 2538) สภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้นำไปใช้เป็นข้อมูลสำคัญเบื้องต้นของการใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

การอภิปรายผล

เซลลูเลสเป็นเอ็นไซม์ที่มีความสำคัญมากในธรรมชาติ จำเป็นต่อการดำรงอยู่อย่างสมดุลย์ของสภาวะแวดล้อมนอกจากนั้นแล้วเซลลูเลสยังมีประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมหลายชนิด อาทิเช่น การผลิตแอลกอฮอล์ในอุตสาหกรรมการหมัก หรืออุตสาหกรรมอาหารหลายชนิดที่อาจใช้โดยตรงหรือร่วมกับเอ็นไซม์อื่น ๆในการปรับสภาพของอาหารให้ได้ผลผลิตที่เหมาะสมตามต้องการ (Finkelstein และ Ball, 1992) โครงการนี้มีการวิจัยถึงการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราสายพันธุ์ต่างประเทศ คือ *T. reesei* QM 9414 กับ QM 6a และเชื้อราสายพันธุ์ที่แยกในประเทศไทย คือ *Acrophialophora sp.* การวิเคราะห์เพื่อให้ทราบปริมาณของเอ็นไซม์ที่ผลิตได้มีการทำ 2 วิธีคือ FPA และ CMCase เนื่องจากเซลลูเลสเป็นเอ็นไซม์เชิงซ้อนประกอบด้วยเอ็นไซม์มาทำงานร่วมกัน ดังนั้นการใช้ FPA จึงจำเป็นสำหรับการทราบปริมาณรวมของ เอ็นไซม์ทั้งระบบ เนื่องจากผลที่ได้เป็นผลจากการย่อยกระดาษกรอง ส่วน CMCase เป็นการวัดปริมาณของ endoglucanase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์เซลลูเลสตัวหนึ่งที่สำคัญในการทำให้สายของเซลลูโลส เปิดออก (Wilke et al., 1983) ในการผลิตเพื่อหา pH ที่เหมาะสมทำให้ทราบว่า ทั้ง *T. reesei* และ *Acrophialophora* ชอบอยู่ในช่วง pH 5.0 ถึง 5.5 ในการทำงานของเอ็นไซม์ (FPA) และ endoglucanase (CMCase) ในการผลิตเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมทำให้ทราบถึงความแตกต่างกันระหว่าง *Acrophialophora* กับ *T. reesei* คือ *Acrophialophora* จะทนร้อนได้สูงกว่าโดยผลิตได้ดีที่สุดที่ 40°C ขณะที่ *T. reesei* ผลิตได้ดีที่สุดที่ 30°C ทั้ง FPA และ CMCase ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปถึง 45°C การผลิตจะลดลง แต่ *Acrophialophora* ก็ยังคงให้ค่าเอ็นไซม์สูงกว่า *T. reesei*

เมื่อนำ *T. reesei* QM 6a มาผลิตในสภาวะที่เหมาะสมคือ 30°C pH 5.5 พบว่ามีการสร้างทั้ง FPA และ CMCase เช่นเดียวกับสายพันธุ์ QM 9414 แต่อาจต่างไปบ้างเนื่องจากเป็นสายพันธุ์แปลงที่เกิดก่อนสายพันธุ์แปลง QM 9414 ทำให้องค์ประกอบของเซลลูเลส เช่น endoglucanase อาจต่างไปบ้าง

อาหารเสริมประเภท Protein nutrient ที่นำมาใช้วิจัยคือ soybean meal ซึ่งได้มาจากถั่วเหลืองซึ่งปกติมีโปรตีนค่อนข้างสูงประมาณ 52-54% (Soy Protein Coumcil, 1987)

ทำให้เชื้อราอาจนำไปใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึ่มได้ดีขึ้น ซึ่งทำให้ผลของ FPA และ CMCase ในเชื้อราที่ใช้ทดสอบการผลิตมีค่าสูงขึ้น

ข้อสรุปและเสนอแนะ

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยทำให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T. reesei* และ *Acrophialophora* เชื้อราทั้ง 2 ชนิดสามารถผลิตเอ็นไซม์ได้ดีในช่วง pH 5.0-5.5 โดยดูจากค่า CMCase และ FPA ผลที่ได้จากการผลิตที่ 30°C มีค่าใกล้เคียงกันระหว่างเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์โดย *T. reesei* ให้ผลผลิตสูงกว่าเล็กน้อย. *Acrophialophora* ผลิตเอ็นไซม์ได้ดีที่สุดที่ 40°C ที่ pH 5.0 ขณะที่ *T. reesei* ผลิตได้ดีที่สุดที่ 30°C ที่ pH 5.0 ทำให้ทราบอย่างชัดเจนว่า *Acrophialophora* ทนอุณหภูมิได้สูงกว่า *T. reesei* ตามที่ได้มีการศึกษาเบื้องต้นมาก่อน (Punnapayak et al, 1995) คุณสมบัติที่ *Acrophialophora* ชอบอุณหภูมิสูง ทำให้น่าที่จะมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแบบเชื้อผสมที่อาจใช้กระบวนการแบบต่อเนื่อง อาทิเช่น Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) (Takagi et al, 1976) ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่เป็นที่ยอมรับว่ามีประสิทธิภาพดีในการเปลี่ยนวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสให้เป็นเอทธานอลให้ได้ดียิ่งขึ้น (Wilke et al, 1983 และ Punnapayak and Hoffman, 1994)

เนื่องจาก *T. reesei* เป็นเชื้อราที่ได้ผ่านการกลายพันธุ์โดยการทำให้เกิด mutation มาก่อน ผลผลิตของ *T. reesei* จึงสูงกว่า *Trichoderma* ดั่งเดิมที่แยกได้จากธรรมชาติ ในทำนองเดียวกันถ้ามีการศึกษาวิจัยต่อถึงการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Acrophialophora* โดยการทำ mutation ก็อาจจะทำให้ได้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นทั้งในแง่ผลผลิต และการทนอุณหภูมิ ถ้าทำสำเร็จเช่นเดียวกับ *Trichoderma* ก็จะทำให้ได้เชื้อที่เป็นประโยชน์กว่า และเป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรม และวงการที่เกี่ยวข้องทั้งใน และต่างประเทศอย่างยิ่ง พบว่าเป็นการเริ่มต้นที่ดีในการทราบถึงแนวทางการใช้ *Acrophialophora* ให้เป็นประโยชน์จากงานวิจัยครั้งนี้

บรรณานุกรม

Acebal, C.M.P. Castillon, P. Estrada, I. Mata, E. Costa, J. Aguado, D. Romero, and F. Jimenez. 1986. Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* on physically treated wheat straw. *Appl. Microbiol. Biotechnal*, **24**:218-223

Arora, D., B. Rai, K.G. Mukerji and G.R. knudsen (eds). 1991. Handbook of Applied Mycrology. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, pp. 379-424

Finkelstein, D. and C. Ball (eds). 1992. Biotechnology of filamentous fungi. Butterworth-Heinemann. Stoneham, MA, USA., p. 520

Fogarty, W.M. and C.T. Kelly (eds). 1990. Microbial enzymes and Biotechnology. Elsevier Applied Science, Essex, England, p. 472

Mandels, M. and D. Sternberg. 1976. Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol*, **15**(4):267-286

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analysis of chemistry*, **31**:426-428

Punnapayak, H. and G.H. Emert. 1986. Use of Pachysolen tannophilus in the Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Lignocellulosics. *Biotechnol. Lett.*, **8**:63-66

Punnapayak, H. and J.J. Hoffmann. 1995. Amsonia spp. as potential fuel crops for arid lands. *World J.of Microbiol & Biotechnol.*, **10**:290-292

Punnapayak, H., M. Kuhirun and P. Thanonkeo. 1995. Microbial conversion of Agave biomass. *Program and abstracts*. Society for Industrial Microbiology Annual meeting, San Jose, CA, USA.

Robison, P.D. 1984. Cellulase and xylanase production by *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Biotechnol. Lett.*, **6**:119-122

Soy Protein Council. 1987. Soy Protein Products. Soy Protein Council, Washington, D.C., USA. p.43

Takagi, M., S. Abal, S. Suzuki, G.H. Emert, and N. Yata. 1977. A method for production of alcohol directly from cellulase and yeast.. *Proceedings of the Bioconversion symposium*, New Delhi, pp. 551-571

Wilke, C.R., B. Maiorella, A. Sciamanna, K. Tangnu, D. Wiley, and H. Wong. 1983. Enzymatic Hydrolysis of Cellulase. Noyes Data Crop. Park Ridge, USA.

พงษ์ศักดิ์ ละไมพิศ และหรรษา ปุณณะพยัคฆ์. 2538. เอ็นไซม์จาก *Trichoderma reesei* และผลต่อการย่อยสลายเปลือกถั่วลิสง. กำหนดการและบทคัดย่อ; การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 21, ชลบุรี, หน้า 465-457

พรเทพ ถนนแก้ว, หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, และมุกดา คูหิรัญ. 2538. เซลลูเลสจาก *Acrophialophora sp.* กำหนดการและบทคัดย่อ; การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 21, ชลบุรี, หน้า 458-459

หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, มุกดาคูหิรัญ และอำนวย ขวัญเมือง. 2538. การผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราบางชนิด. กำหนดการและบทคัดย่อ; การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 21, ชลบุรี, หน้า 460-461