

การศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสจากเห็ดราทำลายไม้ในการผลิตแอลกอฮอล์จากผักตบชวา ด้วยวิธีการย่อยสลายให้เกิดเป็นน้ำตาลแบบต่อเนื่องกับการหมัก

วัฒนา อัจฉริยะโพธา^{1*} ดวงเดือน วัฏฏานุรักษ์² พิมณาร นิลฤทธิ์³

บทคัดย่อ

เห็ดราทำลายไม้เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักชนิดหนึ่งในผนังเซลล์พืชทำให้ได้ผลผลิตเป็นคาร์โบไฮเดรตสายสั้น ในงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสจากเห็ดราทำลายไม้ที่พบขึ้นอยู่ตามขอนไม้ภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ต่อการย่อยสลายวัสดุเซลลูโลสชนิดต่างๆ ซึ่งจะให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเห็ดราที่ใช้ในการศึกษานี้มี 7 สกุล คือ *Favolus* sp., *Marasmius* sp., *Lenzites* sp., *Daldinia* sp., *Leucocoprinus* sp., *Polyporus* sp., *Schizophyllum* sp. พบว่าเอนไซม์หยาบของเห็ดราสกุล *Leucocoprinus* sp. มีแอคติวิตีได้สูงสุดที่สุดคือ 52.77 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อใช้กระดาษกรองเป็นวัสดุและมีแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสต่อวัสดุผ้าฝ้ายและวัสดุฟางข้าวคือ 45.10 และ 39.61 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ และจากการนำเอนไซม์หยาบที่ได้มาทำการย่อยวัสดุเซลลูโลสคือผักตบชวาน้ำหนักแห้ง 5 กรัม ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลาย 10% NaOH และทำการหมักด้วยวิธีการย่อยสลายให้เกิดเป็นน้ำตาลแบบต่อเนื่องกับการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แล้วทำการตรวจสอบปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นสารมาตรฐาน ได้ผลว่าพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลที่ผ่านกระบวนการหมักมากกว่าสารมาตรฐานถึง 17.215 เท่าซึ่งคุณสมบัตินี้จะใช้เป็นข้อมูลในการย่อยสลายวัสดุชีวมวลที่เป็นสิ่งไม่ต้องการในธรรมชาติเหลือทิ้งต่างๆ ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเอทานอลซึ่งเปลี่ยนให้เป็นเชื้อเพลิงที่มีความสำคัญต่อระบบพลังงานในประเทศ

คำสำคัญ : แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส เห็ดราทำลาย การย่อยสลายให้เกิดเป็นน้ำตาลแบบต่อเนื่องกับการหมัก

¹ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี e-mail: wattana@vru.ac.th

² อาจารย์ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี e-mail: doudgeun@vru.ac.th

³ นักวิทยาศาสตร์ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี e-mail: somnuk@vru.ac.th

* ผู้รับผิดชอบหลัก e-mail: wattana@vru.ac.th

CELLULASE ACTIVITY ASSAY FROM WOOD DESTROYING FUNGI IN ALCOHOL PRODUCTION FROM WATER HYACINTH (*Eichornia crassipes*) BY SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION

Wattana Ascharyaphotha^{1*} Duangduen Wattanuruk² Pimnara Nilrit³

Abstract

Wood destroying fungi is a cellulose-degrading enzyme fungus. These fungi had the ability to decompose all stages of growth in plant. It can destroy the woody part of the tree and leave by releasing the enzyme. Most of the fungus will destroy from sapwood to heartwood, when it is in proper condition to grow and germinate. The mycelia will growth through the wood, causing to wood decay. Thus, the purpose of this study was to investigate the activity of cellulase enzymes from the wood destroying fungus, which was found in Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage, on degradation of various cellulose materials will yield the glucose. The 7 fungus were used in this study consist of: *Favolus* sp., *Marasmius* sp., *Lenzites* sp., *Daldinia* sp., *Leucocoprinus* sp., *Polyporus* sp., and *Schizophyllum* sp. The cellulase activity was used to determine the ability of each fungus. *Leucocoprinus* sp. presents the highest cellulase activity of 52.77 U/mg Protein and had the high cellulase activity on cotton and rice straw materials of 45.10 and 39.61 U/mg Protein, respectively. Crude enzyme was derived from *Leucocoprinus* sp. was subjected to 5 g dry cellulose hydrolysis treated with 10% NaOH solution and *Saccharomyces cerevisiae* was added in the flask for used to produce alcohol by simultaneous saccharification and fermentation. The alcohol content was verified by HPLC using 70% alcohol as the standard substance. It results that the chronometric display of the fermented material showed the area underneath the graph of processed alcohol indicating that the area under the alcohol production curve was more than 17.215 times that of the standard substance. This is used as information on the degradation of biomass materials, which is the main raw material for ethanol production. This study will promote ethanol production into important fuel to the domestic power system.

Keywords : Cellulase activity, Wood destroying fungi, Simultaneous saccharification and fermentation

¹ Assistance Professor in Biotechnology Program, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University Under The Royal Patronage, e-mail: wattana@vru.ac.th

² Lecturer in Biotechnology Program, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University Under The Royal Patronage, e-mail: doungdeun@vru.ac.th

³ Scientist in Biotechnology Program, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University Under The Royal Patronage, e-mail: somnuk@vru.ac.th

* Corresponding author, e-mail: wattana@vru.ac.th

บทนำ

พืชสะสมพลังงานจากดวงอาทิตย์ในรูปพลังงานเคมีของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ในเนื้อเยื่อพืชที่เราเรียกรวม ๆ ว่าไบโอแมส ประกอบด้วยส่วนสำคัญคือเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลซึ่งต่อกันเป็นสายยาว ถ้าเราตัดเซลลูโลสออกเป็นแต่ละยูนิตของน้ำตาลเราก็จะได้น้ำตาลสามารถนำมาหมักด้วยยีสต์เพื่อผลิตเป็นแอลกอฮอล์ได้ ผักตบชวา (*Eichhornia crassipes*) เป็นวัชพืชน้ำประเภทใบเลี้ยงเดี่ยวลอยน้ำ ในเนื้อเยื่อผักตบชวามีส่วนประกอบไบโอแมสส่วนสำคัญคือเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน งานวิจัยของ บวร อิศรางกูร ณ อยุธยา ปรีดา จันทวงษ์ และ โยธิน อึ้งกุล (2555) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผักตบชวาพบว่าส่วนใหญ่เป็นเซลลูโลส ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของ เส้นใยจากลำต้นผักตบชวา

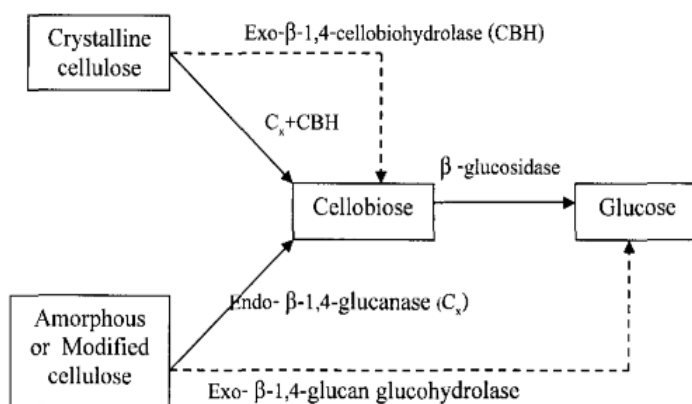
องค์ประกอบ	ร้อยละโดยน้ำหนัก (g)
เฮมิเซลลูโลส	14.85
เซลลูโลส	44.71
ลิกนิน	3.06
อื่นๆ	37.36

ที่มา : บวร อิศรางกูร ณ อยุธยา ปรีดา จันทวงษ์ และ โยธิน อึ้งกุล (2555).

ผักตบชวามีอัตราการเจริญเติบโตสูงมาก มีการสะสมมวลชีวภาพได้สูงถึง 20 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อตารางเมตรต่อวัน โดยมีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์สูงสุดเท่ากับร้อยละ 1.50 ต่อวัน ถ้าปล่อยให้ผักตบชวาเติบโตในแหล่งน้ำโดยเริ่มต้นจาก 500 กรัม/น้ำหนักสดต่อตารางเมตร ในระยะเวลาเพียง 3 เดือนครึ่ง ผักตบชวาสามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ให้มวลชีวภาพสูงถึง 40,580 กรัม/น้ำหนักสดต่อตารางเมตร ในระยะเวลา 1 ปี ซึ่งผักตบชวาน่าจะเป็นแหล่งของสารเคมีสำคัญที่สามารถนำมาใช้ในกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ให้ได้น้ำตาลกลูโคส

เห็ดราทำลายไม้ (Wood destroying fungi) เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ที่ทำปฏิกิริยาย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักชนิดหนึ่งในผนังเซลล์พืช เห็ดราทำลายไม้มีความสามารถในการย่อยสลายไม้ได้ ทุกระยะการเจริญเติบโตโดยเมื่ออยู่ในสภาพที่เหมาะสมจะเข้าทำลายกระพี้ก่อนแล้วจึงทำลายถึงแกนไม้โดยสร้างเส้นใยแทงทะลุไปในเนื้อไม้ทำให้เนื้อไม้ผุพังแล้วเส้นใยจะเข้าไปภายในเนื้อไม้มากขึ้น ทำให้ได้ผลผลิตเป็นคาร์โบไฮเดรตสายสั้น โดยเอนไซม์เซลลูเลส หมายถึง กลุ่มของเอนไซม์ที่ทำงานร่วมกันเพื่อเร่งปฏิกิริยาการในการย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักชนิดหนึ่งในผนังเซลล์พืชซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่มหลักตามระบบการจัดจำแนกเอนไซม์ (enzyme classification, E.C.) คือ 1) เอนโดกลูคาเนส หรือเอนโด-บีต้า-1,4-กลูคาเนส (E.C.3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูเลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) หรือย่อยอนุพันธของเซลลูโลสโดยตัดย่อยเซลล์ที่ตำแหน่งพันธะ บีต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่ม (random) 2) เอกโซกลูคาเนส หรือ เอกโซ-1,4-กลูคาเนส หรือเอกโซบีต้า-1,4-กลูแคนกลูโคไฮโดรเนส หรือเอกโซบีต้า-1,4-เซลโลโลโบไฮโดรเนส (E.C.3.2.1.91) พบว่ามักทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสโดยการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ของเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือน้ำตาลเซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่อย

สลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบ (microcrystalline cellulose) ได้โดยอาศัยการทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนส 3) เอนไซม์บีต้า-1,4-กลูโคไซด์เนส (E.C.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรงกลไกการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในส่วนที่เป็นระเบียบ (crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส (ดังภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 กลไกการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส
ที่มา: (Fan and Lee, 1983 อ้างโดยอมรรัตน์, 2547)

กระบวนการหนึ่งในการเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นเอทานอลคือวิธีการที่เรียกว่าวิธีการย่อยสลายให้เกิดเป็นน้ำตาลแบบต่อเนื่องกับการหมัก (simultaneous saccharification and fermentation หรือ SSF) ซึ่งกระบวนการนี้จะรวมเอากระบวนการย่อยสลายกับกระบวนการหมักไว้ด้วยกันมีเทคนิคการเติมยีสต์และเอนไซม์เซลลูเลสลงไปพร้อมกันกับตัวอย่างพืชที่ต้องการลดการใช้ถังหมักหลายใบ (हरราช ปุณณะพยัคฆ์ และ สีหนาท ประสงค์สุข, 2558) ในงานวิจัยนี้จึงเป็นการตรวจสอบความสามารถการย่อยสลายวัสดุเซลลูโลสชนิดต่างๆ จากเห็ดที่พบขึ้นอยู่ตามขอนไม้ภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ซึ่งจะให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคส และทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสจากผักตบชวาเพื่อผลิตเป็นเอทานอลด้วยวิธีการย่อยสลายให้เกิดเป็นน้ำตาลแบบต่อเนื่องกับการหมัก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสจากเห็ดราทำลายไม้ที่พบอยู่บนขอนไม้ในบริเวณต่างๆ ในการการย่อยสลายวัสดุประเภทเซลลูโลสเป็นน้ำตาล
2. เพื่อศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ผักตบชวาเป็นสับสเตรท ด้วยวิธีการย่อยสลายให้เกิดเป็นน้ำตาลแบบต่อเนื่องกับการหมัก

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเห็ดและศึกษาสัณฐานวิทยา

เลือกเก็บตัวอย่างดอกเห็ดที่ขึ้นอยู่บนไม้ผุและขอนไม้ภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ โดยเลือกขอนไม้ที่มีลักษณะผุกร่อนอันเกิดจากการย่อยสลายของเห็ด พร้อมทั้งศึกษา สัณฐานวิทยาของเห็ดแต่ละชนิด

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดบรืสุทธิ์ (ประสาน ยิ้มอ่อน, 2549)

คัดเลือกดอกเห็ดที่สมบูรณ์มาทำความสะอาดและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 ผ่าดอก เห็ดดอกเป็น 2 ส่วนพร้อมใช้เข็มเย็บที่ผ่านการลนไฟแล้วตัดเนื้อเยื่อเห็ดดอก วางเนื้อเยื่อเห็ดลงตรงกลางอาหาร แข็ง PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อเห็ดมีเส้นใยและสร้างสปอร์

3. การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และสีหนาท ประสงค์สุข, 2552)

ตรวจสอบการเจริญของเชื้อเห็ดบนจานเพาะเลี้ยงในขั้นที่ 2. เตรียมอาหารสูตร production medium (ตามวิธีของ หรรษา และสีหนาท, 2552) และทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเจาะชั้นวุ้นที่มีเชื้อเห็ดเจริญอยู่ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ จำนวน 5 ชั้น แล้วนำไปเลี้ยงในอาหาร เลี้ยงเชื้อสูตร production medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยทำการบ่ม ฟลาสก์อาหารเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

4. การตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส (Miller, 1959)

ทำการปั่นเหวี่ยงแยกเส้นใยเห็ดแต่ละชนิดจากขั้นตอนที่ 3 ออกจากอาหาร production medium แล้วนำส่วนใส 0.5 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส โดยผสมกับ ซิเตรทบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 18 มิลลิเมตร แล้วใส่แผ่นกระดาษกรองขนาด 1 X 6 เซนติเมตร จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยหลอดควบคุมไม่ต้องใส่เอนไซม์ ทำการเติม DNS ลงไป 3 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดทดลองทุกหลอดไปต้มเป็นเวลา 5 นาที หลังจากต้มแล้วนำวุ้นให้เย็นแล้วทำการ เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณกลูโคส ที่ถูกผลิตขึ้นโดยการนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เปรียบเทียบกับกราฟหาน้ำตาลมาตรฐานกลูโคส (ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 และ 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ทำการคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ เซลลูเลสในการย่อยซับสเตรทกระดาษกรอง (FP unit) ของเอนไซม์ที่ได้จากเห็ดแต่ละชนิด (FP unit หรือ Filter paper unit คือ ปริมาณมิลลิกรัมของน้ำตาลกลูโคสที่ผลิตขึ้นเมื่อสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ 50 มิลลิกรัม ของกระดาษกรองที่ pH 4.8 และ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง) ทุกขั้นตอน ทำ 3 ซ้ำ

5. การตรวจวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส (Lowry et al, 1951)

ใช้เอนไซม์หยาบ 1.0 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตรเติม Folin-Ciocalteu reagent (1N) จำนวน 0.13 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น ร้อยละ 7 จำนวน 1.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร แล้วเทียบปริมาณกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานแล้วคำนวณเป็นกิจกรรม จำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) ตามสมการที่ 1

มิลลิกรัมของโปรตีน

นำเอนไซม์หยาบจาก production medium ของเห็ดที่มีค่าแอดติวิตีสูงสุดจากข้อ 4 มา
 ทำการศึกษาการย่อยสลายวัสดุเซลลูโลส ได้แก่ α -cellulose, Carboxymethyl cellulose(CMC), กระดาษ
 หนังสือพิมพ์, สำลี, ผ้าขาวบาง, ผ้าฝ้าย และ ฟางข้าว อย่างละ 50 มิลลิกรัม โดยทำด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 4

นำวัสดุเซลล์ulosที่ใช้คือผักตบชวาตากแห้งมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ แขนในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 10 และให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ใช้ผักตบชวาตากแห้ง 5 กรัม ต่อ NaOH ปริมาตร 200 มิลลิลิตร) ล้างด้วยน้ำจนมีสภาพ pH เป็นกลาง กรองให้แห้ง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้งให้ได้ 5 กรัม ใส่ลงใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F2 (ตามวิธีของ ھرรชษ และสีหนาท, 2552) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ Acetate buffer 10 มิลลิลิตร จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมเอนไซม์หยาบที่ได้จากเห็ดที่มีแอกติวิตีสูงลงไปในอัตราส่วน เอนไซม์:สับสเตรท = 4:1 ทำการเติมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในรูปของสารละลาย 5 มิลลิลิตร แล้วปิดฟลาสก์ให้มิดชิด นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการตรวจสอบปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC

1. การตรวจสอบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลล์เลส

ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากเห็ดราทำลายไม้ทั้ง 7 สกุล ได้ผลการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นวิธีการวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งชนิด Endocellulase และ Exocellulase โดยเห็ดที่แสดงค่ามากที่สุดคือเห็ดสกุล *Leucocoprinus* sp. ซึ่งมีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส คือ 0.763 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และผลของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส (specific activity) โดยการใช้เอนไซม์หยาบ 1.0 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent (1N) และวัดค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร แล้วเทียบกับปริมาณกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานแล้วคำนวณเป็นกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ได้ค่าเป็น 52.77 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยซับสเตรทกระดาษกรองจากเห็ดราทำลายไม้ทั้ง 7 สกุล

สกุลเห็ด	ความเข้มข้นของ สารละลายน้ำตาลกลูโคส (mg/ml)	แอคติวิตีของเอนไซม์ เซลลูเลส (unit/ml)	กิจกรรมจำเพาะของ เอนไซม์ (unit/mg protein)
<i>Favolus</i> sp.	1.89	0.35	42.53
<i>Marasmius</i> sp.	1.816	0.336	41.53
<i>Lenzites</i> sp.	2.852	0.528	43.78
<i>Daldinia</i> sp.	0.799	0.148	31.97
<i>Leucocoprinus</i> sp.	4.119	0.763	52.77
<i>Polyporus</i> sp.	1.109	0.205	38.53
<i>Schizophyllum</i> sp.	1.635	0.303	41.74

2. การใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายวัสดุเซลลูโลสชนิดต่างๆ

เมื่อนำเอนไซม์หยาบจาก production medium ของเห็ดสกุล *Leucocoprinus* sp. ที่มีค่าแอคติวิตีสูงสุด มาทำการศึกษาการย่อยสลายวัสดุเซลลูโลสคือ Cellulose powder, Carboxymethyl cellulose (CMC), กระดาษหนังสือพิมพ์, สำลี, ผ้าขาวบาง, ผ้าฝ้าย และ ฟางข้าว อย่างละ 50 มิลลิกรัม และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยเห็ดสกุล *Leucocoprinus* sp. มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสต่อวัสดุผ้าฝ้ายและวัสดุฟางข้าวซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ 45.10 และ 39.61 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

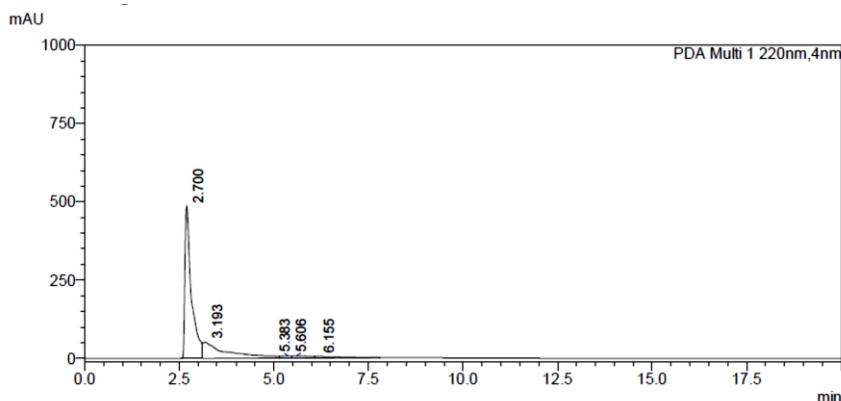
จากการศึกษาการใช้เห็ดราในการย่อยสลายไม้ไม่มีผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Puntambekar (1995) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเห็ด *Volvariella diplasia* ซึ่งเป็นเห็ดในสกุลเดียวกับเห็ดฟาง พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ 550 U จากการใช้ CMC เป็นซับสเตรท และ 69 U เมื่อใช้กระดาษกรองเป็นซับสเตรท เมื่อทำการเลี้ยงในระบบเขย่าที่ pH 5.4 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และใช้เซลลูโลสแบบผงเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ สุรรัตน์ ถือแก้ว และคณะ (2556) ศึกษาการนำเห็ดนางรมมาผลิตเอนไซม์ย่อยเยื่อใยโดยใช้เศษเหลือจากข้าวโพดเป็นวัสดุเพาะ ได้แก่ ชังข้าวโพด ต้นข้าวโพด และเปลือกข้าวโพด เปรียบเทียบกับขี้เลื่อย กิจกรรมของเซลลูเลส เอนโดกลูคาเนส และไซแลนเนส ของวัสดุเพาะที่เป็นต้นข้าวโพดมีค่าสูงสุดทั้งที่ pH 3 คือ 55, 321, และ 27 ยูนิต/กรัม และ ที่ pH 6.8 ได้ 286, และ 323, 322 ยูนิต/กรัม สำหรับงานวิจัยของ Tan และ Wahab (1997) ทดลองเลี้ยงเห็ดนางรม (*Pleurotus sajor-caju*) ในวัสดุเซลลูโลสประเภทฝ้าย และได้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ cellobiohydrolase, CMCase และ β -glucosidase เป็น 10.0, 71.4 และ 21.6 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน หลังจากผ่านไป 15 วัน ค่าแอคติวิตีที่ได้สูงสุดได้จากการปรับสภาพฝ้ายด้วยสภาวะต่าง คือ 15.6, 83.4 และ 56.1 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับเมื่อผ่านไป 20 วันของการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 3 แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสของเห็ดสกุล *Leucocoprinus* sp. ในการย่อยวัสดุเซลลูโลสชนิดต่างๆ

วัสดุเซลลูโลส	ความเข้มข้นของ สารละลายน้ำตาล กลูโคส (mg/ml)	แอคติวิตีของ เอนไซม์เซลลูเลส (unit/ml)	กิจกรรมจำเพาะของ เอนไซม์ (unit/mg protein)
Cellulose	1.096	0.203	30.39
Microcrystalline Cellulose (CMC)	0.912	0.169	37.98
กระดาษหนังสือพิมพ์	0.786	0.146	37.82
สำลี	0.059	0.011	24.55
ผ้าขาวบาง	0.562	0.104	26.26
ผ้าฝ้าย	2.81	0.52	45.10
ฟางข้าว	1.659	0.307	39.61

3. การศึกษาการนำเอนไซม์หยาบจากเห็ดมาแอลกอฮอล์โดยใช้ผักตบชวาด้วยกระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation

จากการนำเอนไซม์หยาบที่ได้จากเห็ดที่มีแอคติวิตีสูงมาทำการย่อยวัสดุเซลลูโลสคือผักตบชวา น้ำหนักแห้ง 5 กรัม ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ในอัตราส่วน เอนไซม์:สับสเตรท = 4:1 และมีการเติมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในรูปของสารละลาย 5 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ให้มิดชิดให้เกิดการผลิตแอลกอฮอล์ด้วยวิธีการย่อยสลายให้เกิดเป็นน้ำตาลแบบต่อเนื่องกับการหมักด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการตรวจสอบปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นสารมาตรฐาน ได้ผลว่าช่วงเวลาที่แสดงโครมาโทแกรมของสารจากกระบวนการหมักแสดงนาที่ที่ 2.7 (ภาพที่ 2) ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับโครมาโทแกรมของเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 คือนาที่ที่ 2.778 (ข้อมูลไม่ได้แสดง) และพื้นที่ใต้กราฟของแอลกอฮอล์ที่ผ่านกระบวนการหมักมีค่า 5689834 (ตารางที่ 4) โดยเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 คือ 330510 (ข้อมูลไม่ได้แสดง) แสดงให้เห็นว่ามีพื้นที่ใต้กราฟการผลิตเอทานอลมากกว่าสารมาตรฐานถึง 17.215 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายวัสดุเซลลูโลสชนิดต่างๆ



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของเอทานอลจากการหมักด้วยวิธีวิธีการย่อยสลายให้เกิดเป็นน้ำตาลแบบต่อเนื่องกับการหมักผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้นร้อยละ 10

ตารางที่ 4 ตารางแสดงผลโครมาโทแกรมของแอลกอฮอล์จากการหมักด้วยวิธีวิธีการย่อยสลายให้เกิดเป็นน้ำตาลแบบต่อเนื่องกับการหมักผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้นร้อยละ 10

Peak	Ret. Time	Area	Height
1	2.700	5689834	486212
2	3.193	2237228	51432
3	5.383	133549	7043
4	5.606	214368	6909
5	6.155	203093	4643
Total		8478071	556238

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสจากเห็ดราทำลายไม้ที่พบอยู่บนขอนไม้ในบริเวณต่างๆ ของมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ เพื่อย่อยสลายวัสดุประเภทเซลลูโลสเป็นน้ำตาล และการศึกษาปริมาณเอทานอลโดยใช้ผักตบชวาเป็นสับสเตรท ด้วยวิธีการย่อยสลายให้เกิดเป็นน้ำตาลแบบต่อเนื่องกับการหมักได้ทำการคัดเลือกเห็ดราทำลายไม้ 7 สกุล ที่ขึ้นไม้เบื้องต้นโดยการเลี้ยงบนอาหารที่ใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสตามต้องการ และสามารถทำการคัดแยกเห็ดที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสย่อยเซลลูโลส โดยเห็ดที่แสดงค่ามากที่สุดคือเห็ดสกุล *Leucocoprinus* sp. ซึ่งมีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ 0.763 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส 52.77 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความสามารถในการย่อยสลายผ้าฝ้ายได้ดีที่สุดรองลงมาคือฟางข้าวซึ่งมีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ 0.52 และ 0.307 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสต่อวัสดุผ้าฝ้ายและวัสดุฟางข้าวซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ 45.10 และ 39.61 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และจากการนำเอนไซม์หยาบที่ได้จากเห็ดสกุล *Leucocoprinus* sp. มาทำการย่อยวัสดุเซลลูโลสคือผักตบชวา น้ำหนักแห้ง 5 กรัมที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้นร้อยละ 10 และมีการเติมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในรูปของสารละลายในพลาสติกให้หมักให้เกิดการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการย่อย

สลายให้เกิดเป็นน้ำตาลแบบต่อเนื่องกับการหมักแล้วทำการตรวจสอบปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นสารมาตรฐาน ได้ผลว่าช่วงเวลาที่เกิดโครมาโทแกรมของสารจากกระบวนการหมักแสดงนาฬิกาที่ 2.700 ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับโครมาโทแกรมของเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 และพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลที่ผ่านกระบวนการหมักมีค่า 5689834 โดยเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 แสดงให้เห็นว่ามีพื้นที่ใต้กราฟการผลิตเอทานอลมากกว่าสารมาตรฐานถึง 17.215 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายวัสดุเซลลูโลสชนิดต่างๆ ดังนั้นผลจากการศึกษานี้จึงสนับสนุนข้อมูลของการนำเห็ดราที่ขึ้นตามขอนไม้หรือตามเศษไม้มาย่อยสลายวัสดุเซลลูโลสหรือชีวมวลให้เป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นการนำชีวมวลที่เป็นสิ่งไม่ต้องการในธรรมชาติมาเปลี่ยนให้เป็นเชื้อเพลิงที่มีความสำคัญต่อระบบพลังงานในประเทศไทย

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ทำการหมักในระดับห้องปฏิบัติการทำให้ได้ปริมาตรของเอทานอลน้อยจึงไม่สามารถจะนำมาคิดเทียบเป็นความเข้มข้นร้อยละของเอทานอลได้ด้วยเครื่องมือวัดปริมาณเอทานอล ในอนาคตจึงต้องวางแผนการศึกษาถึงกระบวนการที่จะให้ได้ปริมาตรของเอทานอลที่มากเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือวัดปริมาณเอทานอลในรูปแบบต่างๆ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยปีงบประมาณ 2558 จากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณสำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- บวร อิศรางกูร ณ อยุธยา, ปรีดา จันทวงษ์ และ โยธิน อึ้งกุล. (2555). **การศึกษาคุณสมบัติทางกลของคอนกรีตมวลเบาอบไอน้ำผสมเส้นใยของผักตบชวา**. กรุงเทพฯ: วิศวกรรมลาดกระบัง ปีที่ 29 ฉบับที่ 1 มีนาคม.
- บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ. (2552). **การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส**. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (อาคารทรัพยากรพันธุกรรมพืชสิรินธร).
- ประสาน ยิ้มอ่อน. (2549). **การเพาะเห็ด**. คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์, ปทุมธานี.
- พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล. (2548). **Biofuel Roadmap, APEC Symposium on Foresighting Future Fuel Technology**. ณ อาคารสำนักงานใหญ่ บริษัทปตท. จำกัด (มหาชน) วันที่ 28 พฤศจิกายน 2548.
- พิจิตรา ตั้งเชื่อนพันธ์, รสรินทร์ รุจนาพันธ์ และอัญชลี อานาตสมบุญ. (2548). **การคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวัชมะพร้าวที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากโรงงาน**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. กรุงเทพมหานคร : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ยศนันท์ พรหมโชติกุล และอรุณี วิณิน. (2549). **เห็ดราทำลายไม้**. สำนักวิจัยการป่าไม้ และผลิตผลป่าไม้, กรมป่าไม้.

- สุรรัตน์ ถือแก้ว, วรณพร ทะพิงค์แก และมงคล ยะไย. (2556). **ประสิทธิภาพการผลิตและการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ย่อยเยื่อใยจากการเพาะเห็ดนางรมโดยใช้เศษเหลือจากข้าวโพด**. ว. วิทย์. กษ. 44 : 1 (พิเศษ) : 51-54.
- หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และ สีหนาท ประสงค์สุข. (2558). **พฤกษศาสตร์เชิงอุตสาหกรรม**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และ สีหนาท ประสงค์สุข. (2552). **คู่มือปฏิบัติการรายวิชาพฤกษศาสตร์เชิงอุตสาหกรรม**. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Deswal D., Khasa Y.P. and Kuhad R.C., (2011). **Optimization of cellulase production by a brown rot fungus Fomitopsis sp. RCK2010 under solid state fermentation**. *Bioresource Technol.* May; 102(10): 6065-72.
- Kumaran S., Sastry C.A. and Vikineswary S. (1997). **Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sagohampas**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. January 1997, Volume 13, Issue 1, pp 43–49.
- Lowry, H.O., Rosebrough, J.N., Farr, L.A., and Randall, J.R. (1951). **Protein measurement with the folin phenol reagent**. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Miller, G.L.. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3). 426-428.
- Mira Madan and Ragini Bisaria. (1983). **Cellulolytic enzymes from an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju***. Centre for Rural Development and Appropriate Tech., Indian Institute of Technology. *Biotechnology Letters*. 08/1983; 5(9):601-604.
- Puntambekar U.S. (1995). **Cellulase production by the edible mushroom *Volvariella diplasia***. *World J Microbiol Biotechnol.* Nov;11(6):695.
- Sermanni, G.G., Annibale, A., Lena, D., Vitale, G., Di, N.S. and Mattia, E.. (1994). **The production of exo-enzymes by *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus* and their use for upgrading corn straw**. *Bioresour. Technol.* 48: 173-178.
- Tan, Y.H. and Wahab, M.N.. (1997). **Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju***. *World J. Microb. Biot.* 13: 613-617.
- Wei-Chuan Chen, Yin-Chen Lin, Ya-Lian Ciou, I-Ming Chu, Shen-Long Tsai, John Chi-Wei Lan, Yu-Kaung Chang and Yu-Hong Wei. (2017). **Producing bioethanol from pretreated-wood dust by simultaneous saccharification and co-fermentation process**. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 79. pp 43–48.