

การคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายใบยางนาเพื่อผลิตไบโอเอทานอล[†]

Isolation of High Efficiency Alatus Leaves Degrading Fungi for Bioethanol Production

จุฑาพร แสงแก้ว*, พลสันต์ มหาขันธ, ผุสรัตน์ สิงห์คุณ, ณัฐพร หมูปราหมณ์, ปาจารย์ โนนิล และ สุพิชชา พันธุ์คะชะ
Jutaporn Sawaengkaew*, Polson Mahakhan, Phudsarat Singkoon, Natthaporn Moopram,
Pajaree Nonil and Suphitcha Phankacha

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen 40002, Thailand

* อีเมล: sjutap@kku.ac.th

บทคัดย่อ

ยางนาเป็นพืชที่พบได้ทั่วทุกภาคในประเทศไทย และมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน รวมถึงสามารถนำไปผลิตเป็นพลังงานทดแทนได้ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายใบยางนา เพื่อใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล โดยเก็บตัวอย่างดินภายในสวนป่ายางนาสิฐาน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งเลือกเก็บบริเวณรอบลำต้นยางนา และดินที่ติดบนใบยางนาที่ร่วงลงพื้น เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูโลสและเพนติโนสในอาหารแข็ง เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการผลิตเอนไซม์ภายใต้สภาวะ solid-state fermentation ในอาหารที่มีอัตราส่วนของรำข้าวสาลีและใบยางนาที่ต่างกัน พร้อมกับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูโลสและเพนติโนส ผลการศึกษาพบว่า เชื้อราจากไอโซเลท L1-1 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส และเอนไซม์ฟิลเตอร์เปเปอร์เอสสูงที่สุดเท่ากับ 13.07 และ 87.00 IU/g solid ตามลำดับ และเชื้อราจากไอโซเลท I10-2 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงที่สุดเท่ากับ 2403.24 IU/g solid เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้อัตราส่วนของรำข้าวสาลี (กรัม) ต่อใบยางนา (กรัม) เท่ากับ 8:12 (สูตร E) และจากการระบุหาสายพันธุ์ของเชื้อราที่คัดแยกได้ พบว่าเชื้อราจากไอโซเลท L1-1 และ I10-2 คือ *Penicillium citrinum* และ *Aspergillus alabamensis* ตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพการปรับสภาพใบยางนาด้วยต่าง-กรดที่ความเข้มข้นต่างกัน ย่อยสลายร่วมกับเซลลูโลสและเพนติโนสจากเชื้อรา *P. citrinum* L1-1 และ *A. alabamensis* I10-2 พบว่าที่ความเข้มข้น 2% NaOH ตามด้วย 2% H₂SO₄ ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดเท่ากับ 12.29 และ 12.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำน้ำตาลที่ได้ไปหมักร่วมกับยีสต์เพื่อผลิตไบโอเอทานอล พบว่าการหมักใบยางนาที่ผ่านการย่อยโดยเชื้อ *P. citrinum* L1-1 ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 0.40 g ethanol/g sugar คิดเป็น 78.50 เปอร์เซ็นต์ ตามทฤษฎี ดังนั้นใบยางนาจึงถือเป็นวัสดุทางการเกษตรที่น่าสนใจ เพราะสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ยางนา, เชื้อรา, เซลลูโลสและเพนติโนส, การปรับสภาพ, ไบโอเอทานอล

Abstract

Alatus (Dipterocarpus alatus) is a plant that can be found in all parts of Thailand and has the potential for various uses including renewable energy production. This research focuses on the screening of fungi that effectively decompose alatus leaves for bioethanol production. Fungi were isolated from soil around the Alatus trees and soil attached to the Alatus leaves at Sithan garden, Khon Kaen University. Selected fungal isolates which can produce cellulolytic enzyme were tested for enzyme production under solid-state fermentation in medium with different ratio of wheat bran to alatus leaves and the activities of cellulolytic enzymes were also determined. The result show that, isolate L1-1 had the highest beta-glucosidase and filterpaperase activity at 13.07 and 87.00 IU/g solid, respectively, and isolate I10-2 had the highest carboxymethyl cellulase activity at 2403.24 IU/g solid within 7 days of cultivation by medium with the ratio of wheat bran (g) to Alatus leaves (g) of 8:12 (E). For identification of fungi using ITS-PCR method, it was found that isolate L1-1 was *Penicillium citrinum* and the isolate I10-2 was *Aspergillus alabamensis*. The efficiency of alatus leaves pretreatment by various alkaline-acid concentration followed with cellulolytic enzyme from *P. citrinum* L1-1 and *A. alabamensis* I10-2 was investigated. The reducing sugars were obtained at 12.29 and 12.11 g/L respectively, when treated with 2 % NaOH

[†]การประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงาน ชมรมคณะปฏิบัติการงานวิชาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 10 (ระหว่างวันที่ 20 - 22 กันยายน 2565 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์)

followed by 2 % H_2SO_4 . The reducing sugar was used for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339, the fermentation of alatus leaves digested by *P. citrinum* L1-1 has the highest ethanol yield of 0.40 g ethanol/g sugar or 78.50 % theoretically. Therefore, alatus leaves are interesting agricultural materials because it can be used as a substrate for bioethanol production, an efficiency renewable energy for the future.

Keywords: Alatus, Fungi, Cellulolytic enzyme, Pretreatment, Bioethanol

บทนำ

พลังงานถือเป็นปัจจัยขั้นพื้นฐานที่มนุษย์ต้องการในชีวิตประจำวัน เนื่องจากจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นรวมถึงการเติบโตของเศรษฐกิจในปัจจุบัน จึงจำเป็นต้องมีการสรรหาพลังงานทดแทน เพื่อให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการของมนุษย์ ซึ่งแหล่งของพลังงานที่เราใช้กันอยู่ในปัจจุบัน แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ พลังงานที่ใช้แล้วไม่หมดหรือพลังงานหมุนเวียน เช่น ชีวมวล แสงอาทิตย์ ลม และน้ำ และพลังงานที่ใช้แล้วหมดไปหรือพลังงานฟอสซิล เช่น ถ่านหิน น้ำมัน รวมถึงแก๊สธรรมชาติ จากสถานการณ์การใช้พลังงานฟอสซิลได้ส่งผลให้เกิดการขาดแคลนพลังงาน ซึ่งส่งผลกระทบต่อความต้องการของมนุษย์ และอาจทำให้ราคาของพลังงานฟอสซิลมีราคาสูง ในปัจจุบันจึงได้มีการส่งเสริมและวิจัยการศึกษาเกี่ยวกับพลังงานทางเลือกอย่างแพร่หลาย

วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลที่ประกอบด้วยลิกโนเซลลูโลส สามารถผลิตได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ชานอ้อย กากมันสำปะหลัง ข้าวโพด ฟางข้าว เปลือกไม้ รวมถึงใบยางนา โดยลิกโนเซลลูโลสจะมีส่วนประกอบของ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งส่วนประกอบเหล่านี้ถือเป็นโครงสร้างพื้นฐานของพืช ซึ่งมีโครงสร้างที่ซับซ้อน และเมื่อนำมาผลิตเอทานอลจะต้องทำการแยกส่วนประกอบเหล่านี้ออกจากกัน โดยใช้กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) เพื่อให้ได้น้ำตาล โดยกระบวนการปรับสภาพจะกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางด้านกายภาพคือทำให้ชั้นเมทริกซ์ของวัสดุลิกโนเซลลูโลสถูกทำลาย ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์สามารถทำงานอย่างมีประสิทธิภาพส่งผลต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถทำงานได้ง่ายขึ้น (รัชพล พะวงศรีรัตน์, 2558) จึงจะสามารถนำไปหมักโดยเชื้อยีสต์ ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงต่อไปได้ และยังถือเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่วัตถุดิบที่มีส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสอีกด้วย

ยางนาเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เดิมมีความสนใจในพืชชนิดนี้ไม่มาก จึงถูกปล่อยปละละเลย แต่ปัจจุบันเป็นพืชที่ได้รับความนิยมอย่างมาก และมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น ด้านพลังงานทดแทน เนื่องจากยางนามีน้ำยางที่สามารถนำมาใช้เป็น น้ำมันไบโอดีเซลได้ดี และการใช้ประโยชน์ทางยาและสมุนไพร ในปี พ.ศ. 2559 พืชยางนาได้รับพระราชวินิจฉัยจากสมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้า กรมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พระราชทานประกาศเป็นพืชอนุรักษ์ลำดับที่เก้าของ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (อพ.สธ.) โดยมีมหาวิทยาลัยขอนแก่นเป็นมหาวิทยาลัยหลักที่ดำเนินงานวิจัยศึกษาวิจัยอนุรักษ์และพัฒนาการใช้ประโยชน์พืชยางนาอย่างบูรณาการ เพื่อเป็นการสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (อพ.สธ.) ทีมผู้วิจัยจึงสนใจนำใบยางนามาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยมุ่งเน้นศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาประสิทธิภาพในการปรับสภาพใบยางนาด้วยสารเคมีและ/หรือเอนไซม์สลายใบยางนาด้วยเอนไซม์เซลลูเลสได้น้ำตาลเพื่อเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตไบโอเอทานอล สำหรับนำไปผลิตพลังงานทดแทนได้ จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาการคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายใบยางนา และนำมาใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายใบยางนาที่มีจำนวนมาก โดยอาศัยการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเป็นกระบวนการย่อยสลายที่มีความจำเพาะสูง ทำให้ได้ผลผลิตที่มีความบริสุทธิ์สูง โดยเซลลูโลสไฮโดรไลติกเอนไซม์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน คือ endoglucanase, exoglucosidase และ β -1,4-glucosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ละลายน้ำได้ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรง กลไกการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส จึงต้องอาศัยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ทำงานร่วมกัน (Wood & McCrae, 1986; Wood et al., 1989) โดยเอนไซม์เซลลูเลสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด นิยมใช้วิธีการหมักแบบอาหารแข็ง (solid state fermentation) เนื่องจากมีลักษณะคล้ายกับสภาวะธรรมชาติสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ จึงทำให้มีการเจริญได้อย่างรวดเร็วและได้ผลผลิตสูง (Pandy et al., 2000) ในงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายใบยางนา เพื่อนำมาผลิตเอทานอลใช้เป็นพลังงานทดแทนได้

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมวัตถุดิบ

เก็บใบยางนาบริเวณทางเข้าสวนป่ายางนาสีฐาน มหาวิทยาลัยขอนแก่น และตากแดดจนแห้ง นำมาป่นเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร และนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเซลลูโลสไดกลีโคไซด์

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ดินบริเวณรอบต้นยางนา และดินที่ติดกับใบยางนา ณ บริเวณทางเข้าสวนป่า ยางนาสีฐาน มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำตัวอย่างดิน 1 กรัม มาทำการเจือจางกับน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการ cross streak ลงในจานอาหาร PDA ที่มีส่วนผสมของใบยางนา 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน คัดแยกเชื้อที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร โดยเทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดส (β -glucosidase) นำเชื้อราที่แยกได้มาทำการ point inoculation ลงในจานอาหาร Mineral salt medium ที่มีผิวหน้าอาหาร spread ด้วย 0.04% MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผล โดยสังเกตการเรืองแสงเมื่อนำจานอาหารไปส่องภายใต้แสงยูวี คัดเลือกเชื้อราที่มีการเรืองแสงมากที่สุดเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (CMCase) นำเชื้อราที่แยกได้มาทำการ point inoculation ลงในจานอาหาร Mineral salt medium ที่มี carboxy methyl cellulose บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจความสามารถในการย่อย CMC โดยวางเกล็ดไอโอดีนลงบนผิวจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ประมาณ 10-30 นาที ไอโอดีนจะเข้าทำปฏิกิริยากับ CMC เชื้อที่สามารถย่อย CMC ได้จะเกิดโซนใสรอบ ๆ โคลนินของเชื้อ

การผลิตเซลลูโลสไดกลีโคไซด์ภายใต้สภาวะ solid-state fermentation

เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีส่วนผสมของ รำข้าวสาลี (กรัม) และ ใบยางนา (กรัม) ในอัตราส่วนต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ Mandel's medium broth (Mandels, 1975) พีเอช 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในถุงพลาสติกชนิดถุงร้อนขนาด 12x18 ตารางนิ้ว ปากครอบด้วยท่อพลาสติกรูปทรงกระบอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร เพื่อบังคับขนาดของปากถุง และปิดปากถุงด้วยจุกสำลี โดยสวมตรงบริเวณที่ครอบไว้ด้วยท่อพลาสติก (Lotong & Suwanarit, 1983) ทั้งนี้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนหลังจากการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง นำกล้าเชื้อราอายุ 5 วัน ที่เพาะในอาหาร PDA + ใบยางนา มาทำให้เป็นสารละลายสปอร์ (spore suspension) ให้มีค่าเท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในถุงปริมาณ 5 มิลลิลิตร คลุกสปอร์ให้ทั่วอาหาร บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างวันที่ 1, 3, 5 และ 7 วัน แยกเชื้อราออกจากอาหารโดยการปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเซลลูโลสไดกลีโคไซด์เอนไซม์ พร้อมทั้งวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยซัสเตรตภายหลังจากการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 1 อัตราส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเซลลูโลสไดกลีโคไซด์จากเชื้อรา

อัตราส่วน	สูตร A	สูตร B	สูตร C	สูตร D	สูตร E
รำข้าวสาลี : ใบยางนา	16 : 4	14 : 6	12 : 8	10 : 10	8 : 12

การศึกษากิจกรรมของเซลลูโลสไดกลีโคไซด์

ศึกษากิจกรรมของเซลลูโลสไดกลีโคไซด์ ได้แก่ เอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และฟิเตอร์เพปเปอร์เอส จากตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ solid-state fermentation เป็นเวลา 7 วัน

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดส บีเบต 0.002 M p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside 0.2 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม 0.25M Na_2CO_3 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside แล้วทำให้เกิด p-nitrophenol 1 ไมโครโมลต่อนาที ในสภาวะที่ใช้ในการทดลอง (Rodriguez et al., 2004)

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส บีเบตซัสเตรต (1% CMC + 0.05M CP buffer) 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง และบีเบตตัวอย่างเอนไซม์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่าง นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที เสร็จแล้วนำไปแช่ในน้ำเย็น เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย carboxymethyl cellulose แล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลต่อนาที ในสภาวะที่ใช้ในการทดลอง (Sengupta et al., 2000)

วัตถุดิบของเอนไซม์ฟิเตอร์เปเปอร์เอส (FPase) ตัดกระดาษกรองให้มีขนาด 3×0.5 ตารางเซนติเมตร ใช้เป็นซับสเตรตใส่ในหลอดทดลอง ปิด 0.05M CP buffer 0.5 มิลลิลิตร และเปิดตัวอย่างเอนไซม์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่าง นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เสร็จแล้วนำไปแช่ในน้ำเย็น เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์ฟิเตอร์เปเปอร์เอส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้อยู่สลายกระดาษกรองแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลต่อนาที ในสภาวะที่ใช้ในการทดลอง (Ghose, 1987)

การระบุสายพันธุ์ของเชื้อราที่คัดแยกได้

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราบนอาหารแข็ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และระบุสายพันธุ์ของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์มากที่สุด ด้วยวิธีไอทีเอส-พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G)3' และ ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC)3'

การย่อยสลายไอยางนาด้วยวิธีทางเคมีและเอนไซม์

การปรับสภาพไอยางนาโดยใช้ด่าง-กรด นำไอยางนามาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปตากแดดจนแห้ง ปั่นให้ละเอียด จากนั้นปรับสภาพด้วย 1% NaOH หรือ 2% NaOH และใช้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดทำให้สภาพเป็นกลาง (pH 7.0) จากนั้นนำไปบ่มให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาย่อยต่อยด้วย 1% H₂SO₄ หรือ 2% H₂SO₄ โดยวิธีการจะเหมือนกันกับการปรับสภาพดังที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นนำไปย่อยด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา

การย่อยไอยางนาโดยใช้เซลล์ูโลติกเอนไซม์ที่ผลิตได้จากราด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ solid-state fermentation เป็นเวลา 7 วัน นำไอยางนาที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยด่างและกรดมาแล้วนั้น นำมาย่อยสลายด้วยเซลล์ูโลติกเอนไซม์ โดยใช้อัตราส่วนไอยางนาบดละเอียด 1 กรัม ต่อสารละลายเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเอนไซม์ชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18 และ 24 เพื่อนำไปศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดยวิธี DNS

การผลิตเอทานอลจากไอยางนาด้วยวิธี simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

การผลิตเอทานอลจะทำในขวดรูปชมพู่ขนาดปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไอยางนาที่ผ่านการปรับสภาพในอัตราส่วนไอยางนา 10 กรัม ต่อเซลล์ูโลติกเอนไซม์ 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหาร ethanol production medium พีเอช 5.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เริ่มหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 โดยให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48 และ 72 เพื่อศึกษาจำนวนเซลล์ด้วยวิธี cell count ศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี DNS และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วย gas chromatography

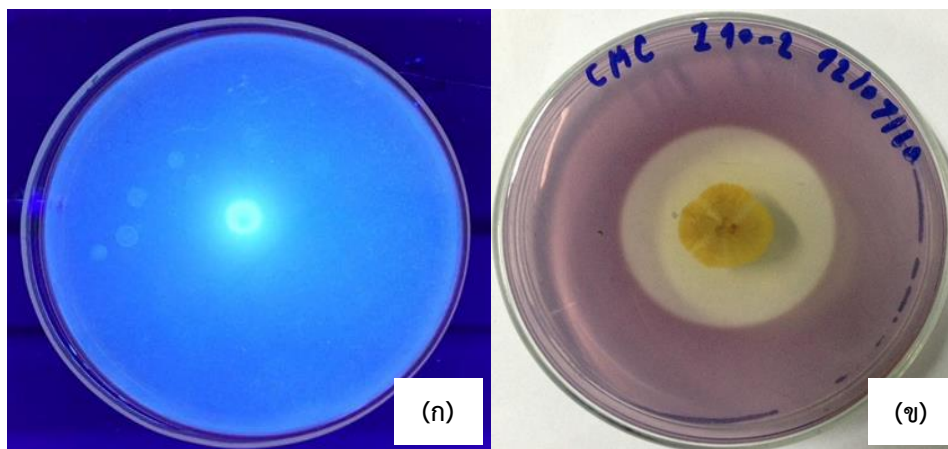
ผลและอภิปรายผล

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเซลล์ูโลติกเอนไซม์

จากตัวอย่างดินบริเวณรอบต้นยางนา และดินที่ติดบนไอยางนา (ภาพที่ 1) ทั้งหมด 14 ตัวอย่าง คัดแยกเชื้อราด้วยวิธีการ cross streak สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 37 ไอโซเลท เมื่อนำไปทดสอบหาความสามารถเบื้องต้นในการสร้างเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดส พบว่ามีเชื้อรา 22 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดสได้ ซึ่งสังเกตการเรืองแสงเมื่อนำจานอาหารไปส่องภายใต้แสงยูวี โดย MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside) จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์บีตาไกลูโคซิเดสที่เชื้อราสร้างขึ้น ได้เป็น 4-methylumbelliferone ซึ่งเป็นสารเรืองแสง ดังแสดงในภาพที่ 2 (ก) และการทดสอบหาความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลส พบว่ามีเชื้อรา 9 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยคาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลส ซึ่งจะปรากฏลักษณะโซนใสรอบ ๆ โคโลนี หลังจากการวางเกล็ดไอโอดีนลงบนผาจานประมาณ 10-30 นาที ดังแสดงในภาพที่ 2 (ข) และจากการทดสอบเบื้องต้นพบว่ามีเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวมากที่สุด 2 ไอโซเลท ได้แก่ I10-2 และ L1-1 ซึ่งถูกคัดเลือกเพื่อนำไปผลิตเอนไซม์ภายใต้สภาวะ solid-state fermentation



ภาพที่ 1 ตัวอย่างดินบริเวณรอบต้นยางนา และดินที่ติดบนใบยางนา



ภาพที่ 2 การเรืองแสงซึ่งเกิดจากการสร้างเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส (ก) วงใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ข)

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์จากเชื้อรา

การทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท I10-2 และ L1-1 เพื่อผลิตเซลลูโลสไดกลิตอนเอนไซม์ เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วันพบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่วัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีใบยางนาในอัตราส่วนต่างกัน ทั้งหมด 5 สูตร คือ สูตร A, B, C, D และ E แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณเอนไซม์เอนไซม์บีตากลูโคซิเดส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และฟิเตอร์เปเปอร์เอส จากเชื้อราไอโซเลท I10-2 และ L1-1 ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีอัตราส่วนใบยางนาแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน

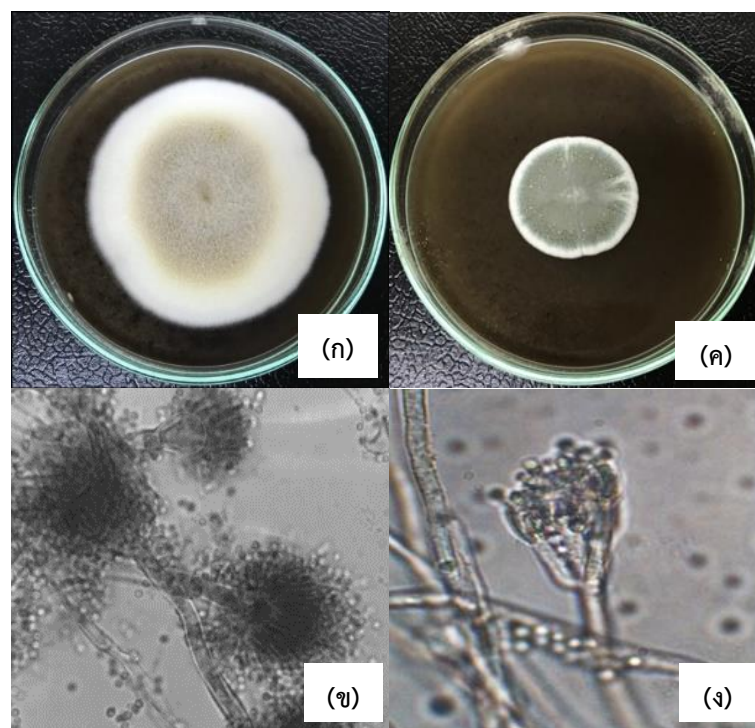
สูตรอาหาร	เอนไซม์บีตากลูโคซิเดส (IU/g solid)		เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (IU/g solid)		เอนไซม์ฟิเตอร์เปเปอร์เอส (IU/g solid)	
	I10-2	L1-1	I10-2	L1-1	I10-2	L1-1
A	2.52	9.75	1976.16	1594.44	21.15	12.40
B	1.68	13.07	2037.50	1989.17	22.49	16.22
C	3.98	9.78	2289.24	1928.52	26.50	36.76
D	4.74	5.63	2353.47	2131.30	24.36	69.17
E	4.79	10.00	2403.24	2286.85	28.90	87.00

จากตารางที่ 2 พบว่าเชื้อราทั้งสองไอโซเลทสามารถผลิตเซลลูโลสไดกลิตอนเอนไซม์ได้ โดยเชื้อราไอโซเลท I10-2 ผลิตเอนไซม์ เอนไซม์บีตากลูโคซิเดส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และฟิเตอร์เปเปอร์เอส ได้สูงที่สุดเท่ากับ 4.79, 2403.24 และ 28.90 IU/g solid ตามลำดับ เมื่อ

เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร E (รำข้าวสาลี : ไบยางนา อัตราส่วน 8 : 12) เช่นเดียวกับเชื้อราไอโซเลท L1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร E สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและฟิเตอร์เปเปอร์เอส ได้สูงที่สุดเท่ากับ 2286.85 และ 87.00 IU/g solid ตามลำดับ จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเซลลูโลสไดกลูโคส พบว่าอาหารสูตร E สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุด และจากอัตราส่วนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีไบยางนามากกว่ารำข้าวสาลี แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ไบยางนาเป็นซับสเตรตเพื่อผลิตเอนไซม์จากเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลจากไบยางนาในขั้นต่อไป

การระบุสายพันธุ์ของเชื้อราที่คัดแยกได้

ผลจากการระบุสายพันธุ์ของเชื้อราที่คัดแยกได้ด้วยวิธีด้วยไอทีเอส-พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่า เชื้อราจากไอโซเลท I10-2 คือ *Aspergillus alabamensis* (ภาพที่ 3ก.) และ เชื้อราจากไอโซเลท L1-1 คือ *Penicillium citrinum* (ภาพที่ 3ค)) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ng et al. (2010) ที่ได้ศึกษาการผลิตเซลลูโลสไดกลูโคสจาก *P. citrinum* YS40-5 ที่คัดแยกได้จากกองปุ๋ยหมักฟางข้าว ภายใต้สภาวะ solid-state fermentation ที่มีรำข้าวเป็นซับสเตรต อาหารมีค่าพีเอช 6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 4 วัน พบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ฟิเตอร์เปเปอร์เอส และบีตาไกลูโคซิเดส ได้สูงที่สุดเท่ากับ 89.70, 0.60 และ 57.50 IU/g solid ตามลำดับ



ภาพที่ 3 ลักษณะเชื้อรา *A. alabamensis* I10-2 บนจานอาหาร PDA ผสมไบยางนา (ก) ลักษณะของเชื้อรา *A. alabamensis* I10-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ข) ลักษณะเชื้อรา *P. citrinum* L1-1 บนจานอาหาร PDA ผสมไบยางนา (ค) ลักษณะของเชื้อรา *P. citrinum* L1-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ง) (scale bar = 10 μm)

การย่อยสลายไบยางนาด้วยวิธีทางเคมีและเอนไซม์

จากการศึกษาการย่อยสลายไบยางนาเป็นแหล่งน้ำตาลโดยวิธีการปรับสภาพ (pretreatment) ด้วยด่าง 1% NaOH และ 2% NaOH และตามด้วยกรด 1% H₂SO₄ และ 2% H₂SO₄ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยไบยางนาให้มีโครงสร้างผลึกของเซลลูโลสมีขนาดเล็กลง และช่วยให้เซลลูโลสไดกลูโคสย่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพทำงานได้ดียิ่งขึ้น โดยทดสอบการใช้ความเข้มข้นของด่างและกรดที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ ดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าไบยางนาที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% NaOH และตามด้วย 2% H₂SO₄ เมื่อนำมาย่อยสลายด้วยเซลลูโลสไดกลูโคสของเชื้อรา *P. citrinum* L1-1 และเชื้อรา *A. alabamensis* I10-2 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดเท่ากับ 12.29 และ 12.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

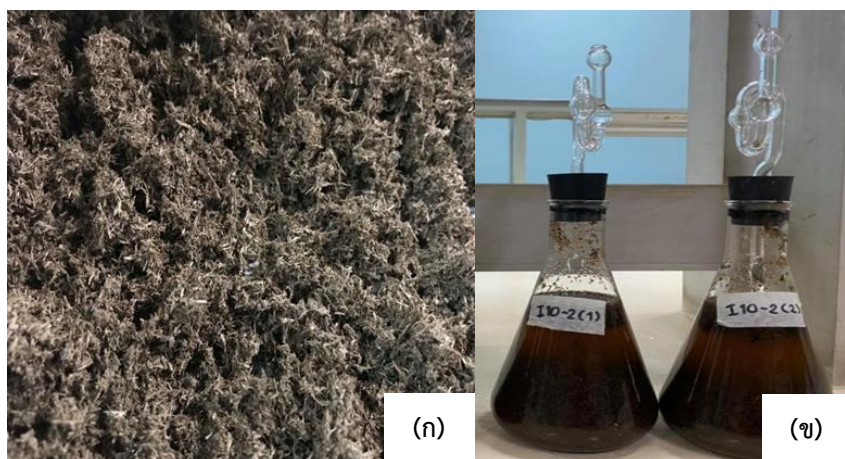
ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากการปรับสภาพไບียงนาด้วยต่างและตามด้วยกรดในแต่ละความเข้มข้น ร่วมกับเซลล์โลไลติกเอนไซม์ของเชื้อราในอัตราส่วน 1:10 (กรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การปรับสภาพไບียงนา	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	
	<i>P. citrinum</i> L1-1	<i>A. alabamensis</i> I10-2
1% NaOH + 1% H ₂ SO ₄	6.78	8.55
1% NaOH + 2% H ₂ SO ₄	8.14	8.75
2% NaOH + 1% H ₂ SO ₄	11.81	11.59
2% NaOH + 2% H ₂ SO ₄	12.29	12.11

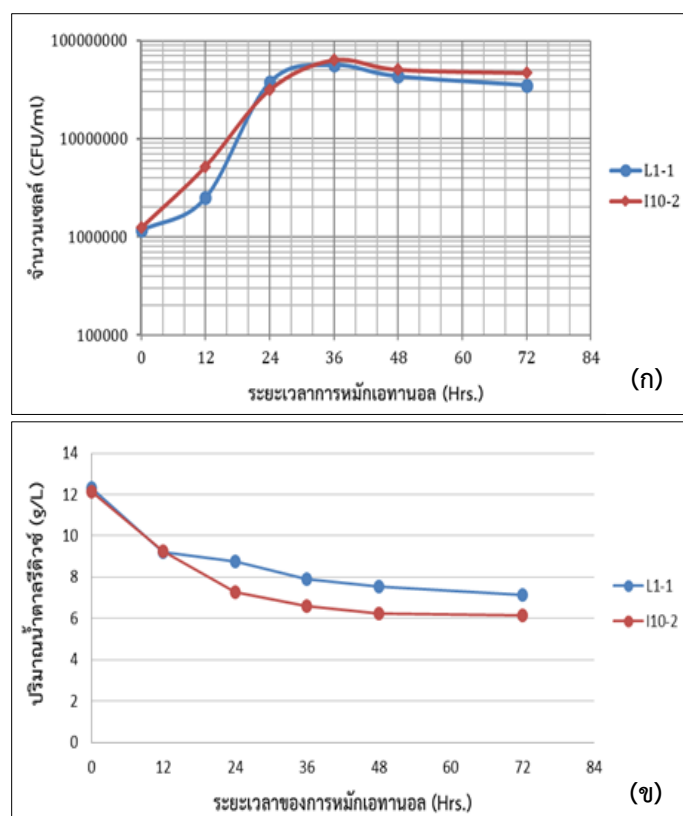
การผลิตไบโอเอทานอลจากไບียงนา

จากการทดลองการผลิตเอทานอลจากไບียงนา โดยใช้ไບียงนาที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% NaOH ตามด้วย 2% H₂SO₄ (ภาพที่ 4(ก)) และย่อยด้วยเซลล์โลไลติกเอนไซม์ของเชื้อรา *P. citrinum* L1-1 และ *A. alabamensis* I10-2 เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์นำมาหมักร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4(ข)) เมื่อเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ด้วยวิธี cell count แบบ viable cell count พบว่าชั่วโมงที่ 36 มีจำนวนเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้นสูงสุด หลังจากนั้นจำนวนเซลล์จึงเริ่มลดลง ในชั่วโมงที่ 48 และ 72 ดังภาพที่ 5 (ก) ซึ่งสอดคล้องกับกราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงอย่างมากในช่วง 36 ชั่วโมงแรกของการหมัก ดังภาพที่ 5 (ข)

จากกราฟดังภาพที่ 5 (ข) พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นที่หมักด้วยเอนไซม์ของเชื้อรา *P. citrinum* L1-1 และเชื้อรา *A. alabamensis* I10-2 มีค่าเท่ากับ 12.29 และ 12.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อกระบวนการหมักผ่านไป 72 ชั่วโมง น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเท่ากับ 7.12 และ 6.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ายีสต์มีการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและใช้ในโตรเจนจากอาหาร ethanol production medium ในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งเมื่อยีสต์นำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ น้ำตาลจะเข้าวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นไพรูเวท 2 โมเลกุล และไพรูเวทจะเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอล โดยในการหมักไບียงนาที่ผ่านการย่อยโดยเชื้อ *P. citrinum* L1-1 ยีสต์ใช้น้ำตาลไป 5.17 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.40 g ethanol / g sugar คิดเป็น 78.50 เปอร์เซ็นต์ ตามทฤษฎี และการหมักไບียงนาที่ผ่านการย่อยโดยเชื้อ *A. alabamensis* I10-2 ยีสต์ใช้น้ำตาลไป 5.98 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.37 g ethanol / g sugar คิดเป็น 72.01 เปอร์เซ็นต์ ตามทฤษฎี จากงานวิจัยของวนิดา และคณะ (2553) ทำการผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัส โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 จากการศึกษาปริมาณเยื่อ 5-10% (w/v) และอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณเยื่อ 10% (w/v) หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นสภาวะที่เหมาะสม มีปริมาณเอทานอล 28.47 กรัมต่อลิตร และ ethanol yield 79.01 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่างส่งผลต่อกระบวนการผลิตเอทานอลและปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ เช่น สายพันธุ์จุลินทรีย์ ปริมาณ ซับสเตรต อุณหภูมิในการหมัก



ภาพที่ 4 ไบยางที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (ก) การหมักเอทานอลจากไบยางนาด้วยวิธี Simultaneous Saccharification and Fermentation เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ข)



ภาพที่ 5 จำนวนเซลล์ยีสต์ (ก) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการหมักเอทานอลหมักร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 (ข)

สรุปผล

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูโลสไดกลูโคสจากตัวอย่างดิน เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลจากใบยางนา ได้เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ 2 สายพันธุ์ คือ *P. citrinum* L1-1 และ *A. alabamensis* I10-2 โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง ในอาหารที่มีรำข้าวสาลี และใบยางนา อัตราส่วน 8 : 12 กรัมตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน และในกระบวนการหมักเอทานอล จะใช้ใบยางนาที่ปรับสภาพด้วย 2% NaOH ตามด้วย 2% H₂SO₄ แล้วนำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของเชื้อรา เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เป็นข้อบ่งชี้ในการผลิตเอทานอลโดยการหมักร่วมกับยีสต์ พบว่าการหมักใบยางนาที่ผ่านการย่อยโดยเชื้อ *P. citrinum* L1-1 และ *A. alabamensis* I10-2 ได้ ethanol yield เท่ากับ 78.50 และ 72.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการวิจัยในครั้งนี้พบว่ายางนาถือเป็นพืชที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย ใบยางนาใช้เป็นข้อบ่งชี้เพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์ และผลิตเอทานอลได้ รวมถึงในอนาคตจะมีการศึกษาประโยชน์จากใบยางนาทางด้านอื่นๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากโครงการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป (มุ่งเป้า) ยางนา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- รัชพล พะวงศ์รัตน์. (2558). กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส. *สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2*(1), 143-157.
- วนิดา ปานอุทัย, นิคม แผลมสัก, สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน และ ประมุข ภาระกุลสุขสถิตย์. (2553). *การผลิต เอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน* (น. 392-400). การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59, 257-268.

- Lotong, N., & Suwanarit, P. (1983). Production of soy sauce koji mold spore inoculum in plastic bags. *Applied Environmental Microbiology*, 46, 1224-1226.
- Mandel, M. (1975). Microbial sources of cellulases. *Biotechnology and Bioengineering*, 5, 81-105.
- Ng, I. S., Li, C. W., Chan, S. P., Chir, J. L., Chen, P. T., Tong, C. G., & Ho, T. H. D. (2010). High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40 - 5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource Technology*, 101(4), 1310-1317.
- Pandy, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and product. *Process Biochemistry*, 35, 1153-1169.
- Rodriguez, M. E., Lopes, C. A., Broock, M. V., Valles, S., Ramon, D., & Caballero, A. C. (2004). Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *Journal Applied Microbiology*, 96, 84-95.
- Sengupta, S., Jana, M. L., Sengupta, D., & Naskar, A. K. (2000). A note on the estimation of microbial glycosidase activities by dinitrosalicylic acid reagent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 732-735.
- Wood, T. M., & McCrae, S. I. (1986). The cellulase of *Penicillium pinophilum*: Synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically distinct cellobiohydrolases. *Biochemical Journal*, 234, 93-99.
- Wood, T. M., McCrae, S. I., & Bhat, K. M. (1989). The mechanism of fungal cellulase action: Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose. *Biochemical Journal*, 260, 37-43.