



โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ  
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สำนักพระราชวัง  
Plant Genetic Conservation Project as The Royal Initiation of  
Her Royal highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG)  
The Bureau of The Royal Household

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสจากยีสต์ที่ได้คัดเลือกแล้วจาก  
ป่าภูตาคา เขื่อนจุฬาภรณ์ และ เขื่อนอุบลรัตน์  
Study of high efficiency cellulose utilizing yeast isolated from  
Phu-Ta-Ka, Chulabhorn and Ubonrat Dam

ชื่อผู้วิจัย

อ.ดร. จุฑาพร แสงวงแก้ว  
อ.ดร พลสันต์ มหาจันทร์  
ดร. ศศิธร จินตามรกฏ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## บทคัดย่อ

คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และ ปีต้ากลูโคซิเดส เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส จึงได้มีการพัฒนานำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมและด้านการผลิตพลังงานเชื้อเพลิง งานวิจัยครั้งนี้ได้คัดเลือกยีสต์มาทำการศึกษา 16 สายพันธุ์ คือ ยีสต์ที่สร้าง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 8 ชนิด และ ปีต้ากลูโคซิเดส 8 ชนิด โดยทำการศึกษาแหล่งคาร์บอน, พีเอช และอุณหภูมิเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมต่อการสร้าง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และ ปีต้ากลูโคซิเดส โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YP (1% yeast extract, 2% peptone, pH 5.0 ) ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันคือ 1% กลูโคส, 1% CMC, 1% ฟางข้าว และ 1% ชานอ้อย , มี pH ที่แตกต่างกันในช่วง 4-7 , อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แตกต่างกันคือ 25 , 30, 35 °C เมื่อศึกษาการเจริญและสร้าง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ผลจากการศึกษาพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ เจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้กลูโคสและ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 25 °C โดยเชื้อ *Candida* sp. (New sp.) สามารถสร้าง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ได้มากที่สุดคือ 73.52 U/ml เมื่อศึกษาการเจริญและสร้าง ปีต้ากลูโคซิเดส พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ เจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 25 °C โดยเชื้อ *Wickerhamomyces* sp. (sister sp.) สามารถสร้าง ปีต้ากลูโคซิเดส ได้มากที่สุดคือ 52.78 U/ml ซึ่งจะนำเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ไปใช้ในการพัฒนาการผลิตไบโอเอทานอลต่อไป

คำสำคัญ: ปีต้ากลูโคซิเดส ยีสต์

## Abstract

Cellulosic material is hydrolyzed to glucose by synergistically of carboxymethyl cellulase and beta -glucosidase. Cellulolytic enzymes are industrially important hydrolytic enzyme and production economic of bioethanol. The sixteen yeast isolates which eight species could produce carboxymethyl cellulase and eight species could produce beta -glucosidase were used in this study. The determination of optimal culture conditions for enzyme production from various carbon sources, optimal pH and optimal temperatures in medium were investigated. Yeast isolates were cultured on the YP broth (1% yeast extract, 2% peptone, pH 5.0) various carbon sources (1% glucose, 1% CMC, 1% rice straw, 1% sugar cane bagasse), pH (4-7) and temperatures (25, 30, 35°C). The results showed that, high cellular growth and carboxymethyl cellulase production from isolates yeast were grown in 1% glucose and 1% CMC, pH 4.0 at 25°C. In addition *Candida* sp. PM47 (New sp.) showed the highest activity of carboxymethyl cellulase, 73.52 U/ml. In case of beta -glucosidase production, the optimum of enzyme was 1% glucose, pH 5.0, at 25°C. In addition *Wickerhamomyces* sp.HT4-37 (sister sp.) was shown the highest activity, 52.78 U/ml. Therefore, high efficacy yeast will be developing to enzyme production for bioethanol in the future.

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณาจารย์ และบุคลากรของภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนการวิจัยเป็นอย่างดี ขอขอบคุณ นางสาวสมพร สาระวัน และ นางสาวดวงเพ็ญ บุตรสุวรรณ นักศึกษาช่วยงานวิจัย ที่ช่วยให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่และบุคลากร สำนักงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาอำนวยความสะดวก และประสานงานเป็นอย่างดี และต้องขอขอบคุณ บุคลากรจาก โครงการ อพ.สธ. สำนักพระราชวัง และเจ้าหน้าที่การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย เป็นอย่างสูง ที่ให้การสนับสนุน และอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างในพื้นที่เขื่อน

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทยอดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 มหาวิทยาลัยขอนแก่น และอยู่ภายใต้ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

จุฑาพร แสงแก้ว  
พฤศจิกายน 2555

## สารบัญ

| เรื่อง          | หน้า |
|-----------------|------|
| บทคัดย่อ        | ก    |
| Abstract        | ข    |
| กิตติกรรมประกาศ | ค    |
| สารบัญ          | ง    |
| สารบัญตาราง     | จ    |
| สารบัญรูปภาพ    | ฉ    |
| บทที่ 1 บทนำ    | 1    |

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง   | 5  |
| บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์          | 13 |
| บทที่ 4 วิธีดำเนินงานวิจัย    | 14 |
| บทที่ 5 ผลการศึกษา            | 18 |
| บทที่ 6 สรุปผลการศึกษา        | 85 |
| เอกสารอ้างอิง                 | 88 |
| ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ    | 90 |
| ภาคผนวก ข สารเคมี             | 91 |
| ภาคผนวก ค ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ | 92 |
| ภาคผนวก ง ลักษณะของยีสต์      | 96 |

## สารบัญตาราง

| ตาราง                                                                                                          | หน้า |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 5.1 ยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส                                                     | 18   |
| ตารางที่ 5.2 การจัดจำแนกประเภทยีสต์สร้างเอนไซม์เซลลูเลส<br>โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2         | 19   |
| ตารางที่ 5.3 ยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ปีต้ากลูโคสซิเดส                                             | 52   |
| ตารางที่ 5.4 การจัดจำแนกประเภทยีสต์สร้างเอนไซม์ปีต้ากลูโคสซิเดส<br>โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 | 53   |
| ตารางที่ 6.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของยีสต์ที่สร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส                                 | 85   |
| ตารางที่ 6.2 ยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ ปีต้ากลูโคสซิเดส จำนวน 8 ตัว                                                 | 86   |
| ตารางภาคผนวกที่ 1 ตารางการทดสอบ Glucose มาตรฐาน เพื่อหาปริมาณ reducing sugar<br>ของกราฟมาตรฐาน                 | 92   |
| ตารางภาคผนวกที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจากยีสต์                                              | 93   |
| ตารางภาคผนวกที่ 3 การทดสอบ standard pNP                                                                        | 94   |
| ตารางภาคผนวกที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ ปีต้ากลูโคสซิเดส                                                           | 95   |

### สารบัญรูปภาพ

| รูปที่                                                                        | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------------------|------|
| รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล                                         | 2    |
| รูปที่ 2.2 การย่อย cellulose ของ enzyme cellulose และ ปีศาจกลูโคซิเดส         | 9    |
| รูปที่ 5.1 การสร้างเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส บนอาหารแข็ง                 | 20   |
| รูปที่ 5.2 <i>Pichia fabianii</i> 204-1 ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน           | 22   |
| รูปที่ 5.3 <i>Candida orthopsilosis</i> 214-1 ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน     | 23   |
| รูปที่ 5.4 <i>Torulaspora</i> sp. PM 34 (New sp.) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน | 24   |
| รูปที่ 5.5 <i>Candida</i> sp. PM 47 (New sp.) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน     | 25   |
| รูปที่ 5.6 <i>Kluyveromyces africanus</i> S2-1-2 ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน  | 26   |
| รูปที่ 5.7 <i>Candida tropicalis</i> S1-1 ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน         | 27   |
| รูปที่ 5.8 <i>Candida</i> sp. F5-1 (New sp.) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน      | 28   |
| รูปที่ 5.9 <i>Candida</i> sp. FW10 (New sp.) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน      | 29   |
| รูปที่ 5.10 <i>Pichia fabianii</i> 204-1 ที่มี pH ต่าง ๆ กัน                  | 32   |
| รูปที่ 5.11 <i>Candida orthopsilosis</i> 214-1 ที่มี pH ต่าง ๆ กัน            | 33   |
| รูปที่ 5.12 <i>Torulaspora</i> sp. PM 34 (New sp.) ที่มี pH ต่าง ๆ กัน        | 34   |
| รูปที่ 5.13 <i>Candida</i> sp. PM 47 (New sp.) ที่มี pH ต่าง ๆ กัน            | 35   |
| รูปที่ 5.14 <i>Kluyveromyces africanus</i> S2-1-2 ที่มี pH ต่าง ๆ กัน         | 36   |
| รูปที่ 5.15 <i>Candida tropicalis</i> S1-1 ที่มี pH ต่าง ๆ กัน                | 37   |
| รูปที่ 5.16 <i>Candida</i> sp. F5-1 (New sp.) ที่มี pH ต่าง ๆ กัน             | 38   |
| รูปที่ 5.17 <i>Candida</i> sp. FW10 (New sp.) ที่มี pH ต่าง ๆ กัน             | 39   |

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| รูปที่ 5.18 <i>Pichia fabianii</i> 204-1 ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                                      | 42 |
| รูปที่ 5.19 <i>Candida orthopsilosis</i> 214-1 ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                                | 43 |
| รูปที่ 5.20 <i>Torulaspora</i> sp. PM 34 (New sp.) ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                            | 44 |
| รูปที่ 5.21 <i>Candida</i> sp. PM 47 (New sp.) ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                                | 45 |
| รูปที่ 5.22 <i>Kluyveromyces africanus</i> S2-1-2 ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                             | 46 |
| รูปที่ 5.23 <i>Candida tropicalis</i> S1-1 ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                                    | 47 |
| รูปที่ 5.24 <i>Candida</i> sp. F5-1 (New sp.) ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                                 | 48 |
| รูปที่ 5.25 <i>Candida</i> sp. FW10 (New sp.) ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                                 | 49 |
| รูปที่ 5.26 การสร้างเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส บนอาหารแข็ง YNB ของเชื้อ<br><i>Wickerhamomyces</i> sp. HT4-37 (sister sp.) | 54 |
| รูปที่ 5.27 <i>Debaryomyces</i> sp. S11-1 (New sp.) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน                                        | 55 |
| รูปที่ 5.28 <i>Wickerhamomyces</i> sp. HT4-37 (sister sp.) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน                                 | 56 |
| รูปที่ 5.29 <i>Hanseniaspora occidentalis</i> L3 ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน                                           | 57 |
| รูปที่ 5.30 <i>Candida</i> sp. HFr2-24 (sister sp.) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน                                        | 58 |
| รูปที่ 5.31 HS1-8 ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน                                                                          | 59 |
| รูปที่ 5.32 <i>Candida</i> sp. PM05 (New sp.) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน                                              | 60 |
| รูปที่ 5.33 <i>Torulaspora</i> sp. PM34 (New sp.) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน                                          | 61 |
| รูปที่ 5.34 <i>Candida</i> sp. PM47 (New sp.) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน                                              | 62 |
| รูปที่ 5.35. <i>Debaryomyces</i> sp. S11-1 (New sp.) ที่มี pH ต่าง ๆ กัน                                               | 65 |
| รูปที่ 5.36 <i>Wickerhamomyces</i> sp. HT4-37 (sister sp.) ที่มี pH ต่าง ๆ กัน                                         | 66 |
| รูปที่ 5.37 <i>Hanseniaspora occidentalis</i> L3 ที่มี pH ต่าง ๆ กัน                                                   | 67 |
| รูปที่ 5.38 <i>Candida</i> sp. HFr2-24 (sister sp.) ที่มี pH ต่าง ๆ กัน                                                | 68 |
| รูปที่ 5.39 HS1-8 ที่มี pH ต่าง ๆ กัน                                                                                  | 69 |
| รูปที่ 5.40 <i>Candida</i> sp. PM05 (New sp.) ที่มี pH ต่าง ๆ กัน                                                      | 70 |
| รูปที่ 5.41 <i>Torulaspora</i> sp. PM34 (New sp.) ที่มี pH ต่าง ๆ กัน                                                  | 71 |
| รูปที่ 5.42 <i>Candida</i> sp. PM47 (New sp.) ที่มี pH ต่าง ๆ กัน                                                      | 72 |
| รูปที่ 5.43 <i>Debaryomyces</i> sp. S11-1 (New sp.) ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                           | 75 |
| รูปที่ 5.44 <i>Wickerhamomyces</i> sp. HT4-37 (sister sp.) ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                    | 76 |
| รูปที่ 5.45 <i>Hanseniaspora occidentalis</i> L3 ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                              | 77 |
| รูปที่ 5.46 <i>Candida</i> sp. HFr2-24 (sister sp.) ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                           | 78 |
| รูปที่ 5.47 HS1-8 ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                                                             | 79 |
| รูปที่ 5.48 <i>Candida</i> sp. PM05 (New sp.) ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                                 | 80 |
| รูปที่ 5.49 <i>Torulaspora</i> sp. PM34 (New sp.) ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                             | 81 |
| รูปที่ 5.50 <i>Candida</i> sp. PM47 (New sp.) ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน                                                 | 82 |
| รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของ reducing sugar                                                                          | 92 |
| รูปภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส                                                                   | 94 |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มา

พลังงานเป็นปริมาณพื้นฐานอย่างหนึ่งของกระบวนการในระบบทางกายภาพชนิด พลังงานในระบบเหล่านี้ ที่สถานะหนึ่งๆจะทำให้ได้งาน ที่ต้องใช้ในการเปลี่ยนจากสถานะแรกเริ่ม ไปยังสถานะต่าง ๆ และปัจจุบันพลังงานหลักที่มนุษย์นำมาใช้ ได้มาจากฟอสซิล (น้ำมันปิโตรเลียม แก๊สธรรมชาติ และถ่านหิน) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลก ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต อีกทั้งยังมีราคาแพงและกำลังจะหมดสิ้นไป ดังนั้นการพัฒนาพลังงานทดแทนที่เราสามารถผลิตได้เองมาใช้ทดแทนพลังงานที่กำลังจะหมดไป จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการบรรเทาปัญหาและแก้ปัญหาต่างๆ ที่เป็นผลมาจากการใช้พลังงานฟอสซิล รวมทั้งช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อภาวะโลกร้อน และยกระดับคุณภาพชีวิตของประชาชน พลังงานสะอาดเป็นทางเลือกหนึ่งของการใช้พลังงานที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งส่วนใหญ่พลังงานสะอาดได้มาจากพลังงานหมุนเวียน (renewable energy) เช่น พลังงานชีวมวล พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังงานน้ำ และพลังงานความร้อนใต้พิภพ เป็นต้น หนึ่งในยุทธศาสตร์การพัฒนาพลังงานทดแทน คือการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuels) ซึ่งหลายหน่วยงานให้ความสำคัญ ทั้งยังมีความพยายามในการพัฒนาการผลิตและการใช้ประโยชน์พลังงานทดแทนในเชิงพาณิชย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ไบโอดีเซล (biodiesel) และไบโอเอทานอล (bio-ethanol) ผสมในน้ำมันสำเร็จรูป ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยมีศักยภาพในด้านวัตถุดิบที่ได้จากผลผลิตทางการเกษตรสำหรับใช้ในการผลิตไบโอดีเซลและไบโอเอทานอล สามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนพลังงานจากฟอสซิลได้เป็นอย่างดี เช่น เอทานอล ที่ผลิตได้จากมันสำปะหลัง อ้อย และกากน้ำตาล ไบโอดีเซลจากปาล์มน้ำมัน และสบู่ดำ เป็นต้น

พลังงานทดแทน หมายถึง พลังงานที่มีอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติและสามารถมีทดแทนได้อย่างไม่จำกัด (เมื่อเทียบกับพลังงานหลักในปัจจุบัน เช่น น้ำมันหรือถ่านหิน) ได้แก่ พลังงานไบโอดีเซล ไบโอเอทานอล เอทานอล แก๊สโซฮอล์ ก๊าซเอ็นจีวี เป็นต้น พลังงานเหล่านี้ได้รับความสนใจ และมีการศึกษาว่าคว้ามายทั้งการผลิตจากวัสดุเหลือใช้ จากผลผลิตทางการเกษตร และจากจุลินทรีย์ พลังงานที่ได้เป็นพลังงานที่ไม่ก่อมลพิษหรือมีน้อย ซึ่งจะถูกนำมาใช้ในอนาคต เพื่อลดการใช้พลังงานจากน้ำมัน และลดการนำเข้าพลังงานเชื้อเพลิงจากต่างประเทศ ทำให้ประเทศลดค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ลงได้อย่างมหาศาล เพราะประเทศไทยมีการนำเข้าน้ำมันถึงร้อยละ 60 ของปริมาณการใช้พลังงานทั้งหมด

พลังงานทดแทนที่เหมาะสมควรมีคุณสมบัติ ดังต่อไปนี้

1. สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง ใช้เชื้อเพลิงและวัตถุดิบที่สามารถหมุนเวียนมาใช้ได้อย่างไม่มีวันหยุด
2. สะอาด เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ไม่กระทบต่อสมดุลของระบบนิเวศ
3. สามารถถ่ายทอดความรู้และเทคโนโลยี เพื่อให้ชาวบ้านผลิตมาใช้เองได้ เชื่อมโยงถึงเศรษฐกิจพอเพียง
4. มีประสิทธิภาพ ประหยัดทั้งทรัพยากร แรงงานค่าใช้จ่าย
5. ง่าย เป็นเทคโนโลยีที่ไม่ซับซ้อน ชุมชนสามารถจัดการเองได้

พลังงานดังกล่าว เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานน้ำ พลังงานลมผลิตไฟฟ้า ชีวมวล เป็นการช่วยค่าใช้จ่าย และเพิ่มรายได้ อีก เพื่อการพึ่งพาตนเองด้านพลังงานอย่างยั่งยืน

#### ไบโอเอทานอล

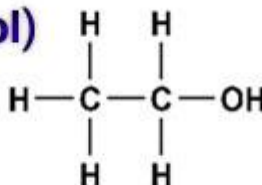
เอทานอล (Ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) ในทางเคมีเป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์มีสูตรทางเคมีคือ  $C_2H_5OH$  ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นไฮดรอกซิล



ดริเวทีฟของไฮโดรคาร์บอน เกิดจากการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมด้วย hydroxyl group (OH) มีน้ำหนักโมเลกุล 46.07 จุดเดือดประมาณ 78 องศาเซลเซียส เป็นของเหลวใสไม่มีสีติดไฟง่าย ให้เปลวไฟสีน้ำเงิน ไม่มีควัน ลักษณะโครงสร้างของเอทานอลแสดงดังรูปที่ 1

รูปที่ 1.1  
ทางเคมี  
นอล  
(ที่มา:

### เอทานอล(Ethanol)



โครงสร้าง  
ของเอทา

<http://www.vcharkarn.com/varticle/38199>

ประเทศที่ผลิตเอทานอลมากที่สุดในโลกในลำดับต้นๆ ได้แก่ บราซิล และประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งแนวโน้มการใช้ น้ำมันแก๊สโซฮอล์ของโลกยังคงเติบโตอย่างต่อเนื่อง ส่วนในประเทศแถบเอเชีย เช่น จีน อินเดีย ก็ให้ความสนใจมากในการใช้พลังงานทดแทนโดยเฉพาะเอทานอล และปัจจุบันอินเดียได้มีการส่งเสริมและพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์ เพื่อใช้ภายในประเทศ อีกทั้งยังสามารถส่งออกเทคโนโลยีไปยังประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย

โดยทั่วไปเอทานอลมี 2 ประเภทคือ เอทานอลสังเคราะห์ (synthetic ethanol) ซึ่งได้จากกระบวนการผลิตทางเคมี และเอทานอลชีวภาพ (ไบโอเอทานอล) ซึ่งได้จากการใช้จุลินทรีย์จำพวกยีสต์หมักกับวัตถุดิบจากการเกษตรผลิตได้จากวัตถุดิบที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอยู่ในโครงสร้างโมเลกุล เช่น มันสำปะหลัง อ้อย molasses เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมน้ำตาล ข้าวโพด ข้าวฟ่างและของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ฯลฯ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิดแต่ ยีสต์ (Yeast) ก็ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลายเพราะสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วและมีปริมาณมาก ยีสต์ยังสามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลาย เอทานอลยังสามารถทำเป็นแอลกอฮอล์หรือสุราที่ใช้บริโภคได้ และเนื่องจากเอทานอลมีค่าออกเทนสูงจึงนำไปผสมกับน้ำมันเบนซิน เรียกว่า น้ำมันแก๊สโซฮอล์ ใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนการใช้น้ำมันจากฟอสซิลได้ ประเทศบราซิล (ผู้ผลิตเอทานอลรายใหญ่ของโลก) ใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ประเทศสหรัฐอเมริกาใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ และเอทานอลยังมีประโยชน์ ในการช่วยลดผลกระทบต่องlobal warming ซึ่งทำให้เครื่องยนต์มีการเผาไหม้ดีขึ้น ทำให้ไอเสียจากการใช้แก๊สโซฮอล์มีปริมาณแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ลดลงร้อยละ 20 และปริมาณไฮโดรคาร์บอนลดลงร้อยละ 10 เมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันเบนซิน ซึ่งจะส่งผลให้ลดค่าใช้จ่ายในการแก้ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของประชาชน ลดปริมาณการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิง จากต่างประเทศได้ประมาณ 3,000 ล้านบาทต่อปี ลดการใช้เชื้อเพลิงปิโตรเลียมซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิด Greenhouse Effect

ที่ทำให้อากาศบนโลกร้อนขึ้น ส่งผลกระทบต่อการเกษตรกรรม การละลายของน้ำแข็งขั้วโลก ระดับน้ำทะเลที่สูงขึ้น และการเกิดอุทกภัยบ่อยครั้งในพื้นที่ชายฝั่งทะเล ทำให้ปริมาณก๊าซพิษในบรรยากาศลดลง ช่วยให้คุณภาพชีวิตดีขึ้น และเนื่องจากการผลิตเอทานอล ได้จากกพืชผลการเกษตร ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงมีผลผลิตเหล่านี้มากมาย ช่วยลดการนำเข้าวัตถุดิบ และลดการพึ่งพาเชื้อเพลิงปิโตรเลียมจากต่างประเทศ ช่วยพยุงเศรษฐกิจในระดับระดับไร่นา สร้างความมั่นคงทางด้านอาชีพและเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร ทำให้เกิดการพัฒนาเทคโนโลยีทั้งในด้านการผลิตและการใช้ประโยชน์ การสร้างงานและสร้างรายได้ให้กับเศรษฐกิจครัวเรือนภาคการเกษตร ช่วยสร้างผลตอบแทนทางเศรษฐกิจให้กับประเทศ

แต่การใช้ผลผลิตทางการเกษตรโดยตรงอาจจะมีผลกระทบต่อราคาของผลผลิตซึ่งเป็นพืชที่ใช้ในการบริโภค ทำให้มีราคาสูงขึ้น เกิดความเดือดร้อนต่อประชาชน จึงมีการศึกษาที่จะนำเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ในการเป็นวัตถุดิบการผลิตไบโอเอทานอล ทั้งยังช่วยลดต้นทุนการผลิตอีกด้วย ซึ่งการพัฒนาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรม มักจะมีเศษวัสดุเหลือใช้จากการผลิตมากมาย เช่น ฟางข้าว กากขานอ้อย ชังข้าวโพด ฯลฯ ส่วนใหญ่จะมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย เซลลูโลสมีโครงสร้างที่แข็งแรง ไม่ละลายน้ำ และไม่สามารถย่อยสลายไปได้ในเวลาอันรวดเร็วจึงมักเกิดปัญหาเศษวัสดุเหลือใช้ที่เกษตรกรไม่ต้องการทำให้เกิดการเน่าเหม็น เกิดเป็นมลพิษที่ไม่ดีต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งการย่อยเซลลูโลสจำเป็นต้องใช้สารละลายกรดหรือใช้เอนไซม์ cellulase ที่จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างขึ้นได้ เช่น *Trichoderma* species, *Aspergillus* species, *Bacillus*, *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น ขณะนี้การศึกษาค้นคว้าและนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากขึ้นเพราะสามารถเจริญเติบโตรวดเร็ว ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย ต้นทุนในการเพาะเลี้ยงน้อย และยังเจริญได้ในทุก ๆ ฤดูกาล ยีสต์ก็เช่นเดียวกัน ที่เป็นที่ยอมรับมาสกัดเอาสารต่างๆ ที่ยีสต์สร้างขึ้นมาใช้ประโยชน์ซึ่งก็คือ น้ำตาลกลูโคส นำมาผลิต ไบโอเอทานอล เพื่อใช้ลดปัญหาเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมที่มีมากเกินไปและกำจัดไปได้ยาก และช่วยพัฒนาในด้านการเกษตรและเทคโนโลยีเพื่อให้ได้วัตถุดิบต่างๆ มากขึ้น ซึ่งการนำยีสต์มาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล เรามุ่งเน้นไปที่ยีสต์ที่สร้าง เอนไซม์ คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลส และ ปีต้ากลูโคซิเดส จะช่วยในการย่อยสลาย 1,4-beta-D- glycosidic linkages ในเซลลูโลส, lichenin และ beta-D-glucans ในธัญพืช ช่วยย่อย cellubios ให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส

จากโครงการวิจัยการกระจายตัวของยีสต์บริเวณป่าภูตากา เขื่อนจุฬาภรณ์ เขื่อนอุบลรัตน์ โครงการย่อยภายใต้ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้ศึกษาและเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของยีสต์ที่มีคุณสมบัติพิเศษต่างๆ ที่น่าสนใจเพื่อจะนำมาใช้ประโยชน์ จากการศึกษาดังกล่าวสามารถแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสได้จำนวนหลายสายพันธุ์และเป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ขานอ้อย เปลือกมันสำปะหลัง ให้ได้เป็นน้ำตาล จากนั้นน้ำตาลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์โดยกระบวนการหมักโดยยีสต์ ทำให้ต้นทุนในการผลิตแอลกอฮอล์ต่ำลงประกอบกับมีแหล่งพลังงานทดแทนเพิ่มมากขึ้น นอกจากนั้นยังเป็นการทำให้ผลผลิตทางการเกษตรที่มีราคาต่ำของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้ผลผลิตดังกล่าวอีกด้วย

แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้จากการคัดเลือกยีสต์จากโครงการข้างต้นเป็นเพียงการศึกษาขั้นต้น ดังนั้นหากจะนำเอนไซม์จากยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสมาใช้ประโยชน์ต่อจำเป็นจะต้องศึกษาการผลิตและคุณลักษณะของเอนไซม์ก่อนเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนที่นำไปประยุกต์ใช้ นอกจากนั้นยังเป็นการต่อยอดงานวิจัยฯ เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และ ปีต้ากลูโคซิเดส จากยีสต์ที่คัดแยกได้จาก จากเชื้อนภูตกาา เชื้อนจุฬารณณ์ เชื้อนอุบลรัตน์ และเชื้อนห้วยกุ่ม

### 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และ ปีต้ากลูโคซิเดส จากยีสต์ที่คัดแยกได้จากเชื้อนภูตกาา เชื้อนจุฬารณณ์ เชื้อนอุบลรัตน์ และเชื้อนห้วยกุ่ม ทั้งแหล่งคาร์บอน pH และอุณหภูมิ

### 1.4 ขอบเขตการทำการวิจัย

ศึกษาการเจริญ การผลิต และ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสจากยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณป่าภูตกาา เชื้อนจุฬารณณ์ และ เชื้อนอุบลรัตน์

## บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับยีสต์

ยีสต์ หรือ ส่าเหล้า (อังกฤษ: yeast) คือ รากลุ่มหนึ่งที่มีส่วนใหญเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รี สามเหลี่ยม รูปร่างแบบมะนาว ฝรั่ง เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ มีน้อยชนิดที่เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งเซลล์แบบฟิสชันหรือวิธีอื่นๆ มีทั้งชนิดที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างแอสโคสปอร์ ที่เรียกว่าแอสโคไมซีตส์ยีสต์ และชนิดที่สร้างแบบสิดิโอสปอร์ ที่เรียกว่าแบสิดิโอไมซีตส์ยีสต์ ยีสต์มีความสัมพันธ์กับพืชหรือสัตว์ที่มีชีวิตหรือสารอินทรีย์ที่ได้จากพืชและสัตว์ที่ตายแล้ว โดยยีสต์สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างหลากหลาย เช่น น้ำตาล กรดอินทรีย์ กรดไขมัน ไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ และพอลิเมอร์หลายชนิด มีบางชนิดที่เป็นโรคทำให้เกิดโรคพืชและสัตว์ ยีสต์พบได้ทั่วไปแบบไม่มีจำกัดในชีวภาค โดยในธรรมชาติแล้วยีสต์แต่ละชนิดมีแหล่งที่อยู่จำเพาะ ขึ้นอยู่กับลักษณะสรีรวิทยาของยีสต์ชนิดนั้น ๆ พบบนบก ในน้ำ รวมทั้งแหล่งที่อยู่ที่มีความรุนแรง เช่น มีความเค็มสูง และมีความเย็นจัด แหล่งที่อยู่ที่ยีสต์ชอบคือ พืช โดยพบทั้งที่ดอก ผล ใบ ลำต้น และยางไม้ แหล่งที่พบยีสต์อยู่

บ่อยๆ คือแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน ยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ มักจะปนลงไปในอาหาร เป็นเหตุให้อาหารเน่าเสียได้ (สาวิตรี, 2549)

### รูปร่างของยีสต์

ยีสต์เป็นราชนิดที่ส่วนใหญ่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม รี สามเหลี่ยม รีและปลายด้านหนึ่งแหลม ทรงกระบอกที่มีปลายมน รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง รูปคนโทหรือฟลาสก์ ยาว เป็นเส้นสาย บางชนิดมีการสร้างเส้นใยเทียม บางชนิดสร้างเส้นใยแท้ ขนาดของเซลล์ยีสต์จะผันแปร บางชนิดมีความยาวของเซลล์ 2-3 ไมโครเมตร ขณะที่บางชนิดยาว 20-50 ไมโครเมตร ส่วนความกว้างผันแปรน้อยกว่า คือระหว่าง 1-10 ไมโครเมตร(สาวิตรี, 2549)

### การเจริญของเซลล์และการแบ่งเซลล์ของยีสต์

การเจริญของเซลล์ยีสต์เกิดโดยการเพิ่มขนาดจนถึงขนาดวิกฤต จะมีการแบ่งเพื่อเพิ่มจำนวน ในระหว่างนี้เซลล์มีการแบ่งแบบไมโทซิส เป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ ส่วนใหญ่เกิดโดยการแตกหน่อ (budding) ทั้งนี้การแตกหน่ออาจเกิดจากเซลล์หรือเส้นใย และยังพบการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีฟิสชัน โดยการที่เซลล์ขยายออกตามยาว แล้วสร้างผนังกันขวาง แบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน การสร้างโคนิเดียที่ปลายก้านเป็นอีกวิธีหนึ่งของการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ เมื่อโคนิเดียแก่เต็มที่จะหลุดออกจากบริเวณผนังก้านที่ส่วนกลางของก้านและยังพบการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

**การแตกหน่อ** เป็นการแบ่งเซลล์ที่มีลักษณะค่อนข้างจำเพาะต่างจากการแบ่งเซลล์ของยูคาริโอตอื่นๆ การแตกหน่อแบ่งตามตำแหน่งที่เกิดหน่อได้ เป็น 3 แบบ คือ

1. การแตกหน่อข้างเดียว เป็นการแตกหน่อที่เกิดที่ขั้วหรือปลายเพียงด้านเดียว โดยการแตกหน่อจะเกิดขึ้นซ้ำ ๆ กันที่ตำแหน่งเดิม
2. การแตกหน่อแบบสองขั้ว การแตกหน่อแบบนี้เกิดขึ้นที่ขั้วหรือปลายทั้งสองด้านของเซลล์ ปกติจะเกิดที่ละขั้วหรืออาจจะเกิดพร้อมกันทั้งสองขั้วก็ได้
3. การแตกหน่อหลายขั้ว ยีสต์ส่วนใหญ่มีการแตกหน่อแบบนี้ โดยการแตกหน่อเกิดได้โดยรอบเซลล์ทุกๆ ด้าน

**การแบ่งเซลล์แบบฟิสชัน** พบในยีสต์สกุลเดียว คือ *Schizosacharomyces* ซึ่งมีรูปร่างยาวหรือทรงกระบอก มีปลายทั้งสองด้านเป็นครึ่งวงกลม ผลจากการแบ่งเซลล์แบบฟิสชันจะได้สองเซลล์ที่มีขนาดเท่ากัน การแบ่งเซลล์แบบนี้เหมือนกับที่พบในยูคาริโอตอื่นมากกว่าการแตกหน่อ

**การสร้างเส้นใย** พบได้ในยีสต์หลายสปีชีส์โดยบางชนิดสร้างเส้นใยแท้ บางชนิดสร้างเส้นใยเทียม กระบวนการสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมในยีสต์แตกต่างกัน นอกจากนั้นยีสต์ที่สร้างเส้นใยเหล่านี้เมื่อกลับไปอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญมากกว่าจะกลับเป็นเซลล์เดี่ยว ซึ่งแสดงว่าการเจริญแบบนี้เป็นการปรับตัวของยีสต์เมื่อขาดแคลนอาหาร

**การสร้างโคนิเดีย** เป็นการใช้ในการแยกสกุลยีสต์ โคนิเดียอาจเป็นบอลลิสโตรโคนิเดียซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศที่ค่อนข้างจำเพาะ จะสร้างบนปลายสเทริกมาที่ยื่นออกมาจากเซลล์ เมื่อแก่เต็มที่จะติดตัวออกโดยกลไกแบบหยด พบเฉพาะในแบคทีเรียอิมยัสต์ยีสต์บางชนิดมีทั้งที่เกิดทั้งสองด้านของเซลล์แบบสมมาตร หรือเกิดรอบเซลล์แบบสมมาตร การสร้างบอลลิสโตรโคนิเดียสูญเสียง่ายดังนั้นลักษณะนี้อาจทำให้เกิดปัญหาในการจัดจำแนก

### การเพาะเลี้ยงยีสต์

แหล่งของสารอาหารสำหรับยีสต์ ยีสต์ต้องการสารอาหารซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน รวมทั้งธาตุอาหารหลัก อื่น ๆ ได้แก่ ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส นอกจากนั้นยังต้องการธาตุอาหารบางชนิดในปริมาณค่อนข้างมากธาตุอาหารเหล่านั้นจัดเป็น macroelement ประกอบด้วย

แมกนีเซียม และโพแทสเซียม ในขณะที่ธาตุอาหารบางชนิดยีสต์ต้องการในปริมาณที่ต่ำ microelement ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก ทองแดง แมงกานีส สังกะสี นิเกิล โคบอลต์ และโมลิบดีนัม ยิ่งไปกว่านั้นยีสต์ยังต้องการสารประกอบบางชนิดเพื่อทำหน้าที่เป็น growth factor เช่น วิตามิน พิวรีน ไพริมิดีน และ นิวคลีโอไทด์

#### อิทธิพลของสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตชีวมวล

อุณหภูมิ ปกติจุลินทรีย์จะเจริญเร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ การเลี้ยงยีสต์ส่วนใหญ่มักบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส โดยการเจริญจะลดลงมากที่ 20 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่ 60-70 องศาเซลเซียส (Halasz and Lasztity, 1991)

พีเอช มีผลต่อกิจกรรมทางชีววิทยาของเซลล์น้อยกว่าอุณหภูมิเพราะว่าเซลล์สามารถควบคุมความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์ได้อย่างดีเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชภายนอกเซลล์ พีเอชของอาหารภายนอกอาจมีผลต่อโครงสร้างและสภาพให้ซึมผ่านได้ของเซลล์ พีเอชมีบทบาทช่วยลดการปะปนของจุลินทรีย์อื่นในระหว่างการหมัก โดยปกติอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญของยีสต์มีพีเอชอยู่ในช่วง 4-5

ออกซิเจนละลาย เป็น growth factor ของยีสต์

คาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 5 เปอร์เซ็นต์ของอากาศทั้งหมด

#### ประโยชน์จากยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์นำมาใช้ เริ่มจากการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Boozah เมื่อประมาณ 7,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช ต่อมามีการใช้ยีสต์ในการผลิตไวน์เมื่อ 3,500 ปีก่อนคริสต์ศักราช เมื่อ 2,000 ปี ก่อนคริสต์ศักราชมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่าขนมปังที่ใช้ยีสต์ขึ้นฟูกว่าที่ไม่ได้ใช้อย่างชัดเจน จากนั้นเทคโนโลยีการผลิตเบียร์ ไวน์ และขนมปัง ถูกถ่ายทอดจากประเทศอียิปต์ไปยังประเทศกรีก และต่อไปยังโรมัน สำหรับทวีปเอเชียมีมาประมาณ 1,000 ปีก่อนคริสต์ศักราชมีรายงานในประเทศจีนเกี่ยวกับสุรากลั่น ต่อมาในศตวรรษที่ 12 การผลิตวิสกีเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก นอกจากนั้นในเอเชียมีการผลิตน้ำนมหมักที่เรียกว่า Kefyr และ Koumiss มาเป็นเวลาหลายศตวรรษ ปัจจุบันยีสต์ในผลิตภัณฑ์จากการหมักในอุตสาหกรรมที่มีการผลิตปริมาณมากอยู่ 4 ชนิด คือ เบียร์ ไวน์ ยีสต์ขนมปัง และโปรตีนเซลล์เดี่ยวและยีสต์อาหารสัตว์ และสามารถแบ่งกว้าง ๆ ได้เป็น

1. เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ และวิสกี
2. ผลิตภัณฑ์จากการหมัก เช่น เอทานอล และกลีเซอรอล
3. ผลิตภัณฑ์ในรูปของเซลล์ยีสต์ เช่น ยีสต์ขนมปัง ยีสต์อาหารคน และยีสต์อาหารสัตว์
4. ผลิตภัณฑ์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ เช่น วิตามินบี และวิตามินดี เอ็นไซม์

นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการใช้ยีสต์ผลิตผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น นมที่ปราศจากแล็กโทส สารให้ความหวานและยีสต์ยังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ cellulase และ ปีต้ากลูโคซิเดส (สาวิตรี, 2549)

## 2.2 เซลลูโลส

เป็นโพลิแซ็กคาไรด์ขนาดใหญ่ ประกอบด้วยน้ำตาล D-glucose จับกันเป็นสายยาวโดยไม่มีกิ่งก้านสาขายาวถึง 2,000 – 10,000 หน่วยกลูโคส หน่วยกลูโคสที่เหมือนกันหมดแต่ละตัวจะจับกับตัวต่อไปโดยพันธะโคเวเลนประเภทไกลโคซิดิกบอนด์ C-1  $\beta$  ถึง C-4 ตลอดทั้งสาย พบมากในพืชสีเขียวและแบคทีเรียบางชนิด เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ แต่ละปีคาดว่าพืชผลิตเซลลูโลสประมาณ 1014 กิโลกรัม (แสนล้านตัน) สายเซลลูโลสในพืชบางตัวเป็นชั้นๆ มีพันธะไฮโดรเจน ระหว่างหน่วยกลูโคสต่างๆ ที่อยู่ชั้นที่ติดกัน และระหว่างหน่วยกลูโคสต่างๆ ในสายเดียวกันด้วย ทำให้เกิดเป็นแผ่นเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ยากและย่อยด้วยเอนไซม์ได้

ไม่ย่ายนัก แต่เมื่อเซลลูโลสแตกออกมาจนเป็นน้ำตาล ดี-กลูโคส ได้โดยวิธีการต่างๆ เราสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหน่วยเดี่ยวนี้มาเป็นอาหารของคนและสัตว์ทั่วไปได้

ปริมาณเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็งจะมีมากกว่าในไม้เนื้ออ่อน อย่างไรก็ตามปริมาณเซลลูโลสในต้นพืชยังมีความแตกต่างตามอายุของต้นพืช การเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์พืช และชนิดของพืช พบเซลลูโลสมากที่ secondary cell wall คือ ประมาณ 50% ของปริมาณเซลลูโลสทั้งหมด ที่ primary cell wall คือ ประมาณ 10-20% ของปริมาณเซลลูโลสทั้งหมด (Franz และ Blaschek, 1990) ในส่วนของ secondary cell wall เซลลูโลสและสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นที่เป็นองค์ประกอบร่วมของผนังเซลล์พืช ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และ เพคติน แต่ละชนิดจะรวมตัวกันเป็นไมโครไฟบริล แต่ละสายของไมโครไฟบริลจะเรียงขนานกันและยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยไมโครไฟบริลเหล่านั้นอาจจะม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยไมโครไฟบริลของเซลลูโลส ทำให้รูปร่างของเซลลูโลสในผนังเซลล์มีรูปร่างต่างกัน 3 แบบ

### 2.3 การย่อยสลายเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ได้แก่ การนำเซลลูโลสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมทำเยื่อกระดาษและกระดาษ อุตสาหกรรมทอผ้า มีรายงานการใช้เซลลูโลสในการผลิตแอลกอฮอล์ เป็นต้น จึงมีความจำเป็นต้องมีการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลงหรือในบางครั้งจำเป็นต้องให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส การย่อยสลายเซลลูโลสทำได้ 2 วิธี คือการย่อยสลายด้วยกรดและการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

#### 1. การย่อยสลายด้วยกรด (Acid hydrolysis)

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรด ได้ทำกันมานานแล้วด้วยวัตถุประสงค์ที่จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือน้ำตาล แต่จากการย่อยเซลลูโลสด้วยกรดจะได้สารประกอบ furfural และอนุพันธ์ของ furfural ซึ่งไม่พึงประสงค์เกิดขึ้น วิธีการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรดกระทำกันเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกคือ ขั้นตอนการใช้กรดเข้าไปทำลายโครงสร้างของเซลลูโลส โดยกรดจะเป็น selling agent คือทำให้เซลลูโลสพองตัว ขั้นที่สองเป็นการเติมน้ำเพื่อลดความเป็นกรด จากนั้นให้ความร้อนซึ่งมีผลทำให้เซลลูโลสถูกตัดเป็นโมเลกุลเล็กๆ คือน้ำตาล ปัจจุบันที่มีผลต่อการย่อยสลายเพื่อให้โครงสร้างประเภท crystalline ซึ่งทนต่อการย่อยด้วยกรดเกิดการแตกตัวให้หมดด้วย กรดที่นิยมได้แก่ กรดซัลฟูริกเข้มข้น 72 % กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 41% หรือกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 80 %

การย่อยสลายด้วยกรดไม่เป็นที่นิยมเนื่องจาก ปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยกรดไม่จำเพาะเจาะจงบางครั้งก่อให้เกิดปฏิกิริยาอื่น ๆ เช่น ปฏิกิริยาการดัดน้ำ และปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลที่เป็นผลิตภัณฑ์ เป็นต้น นอกจากนี้กรดที่ใช้มีผลกัดกร่อนอุปกรณ์ต่างๆ การปรับสภาพให้เป็นกลาง มีผลให้เสียเวลาและค่าใช้จ่าย

#### 2. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis)

ปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ เป็นกระบวนการย่อยสลายที่มีความจำเพาะสูง เอนไซม์จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปะปนมา ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ปฏิกิริยาไม่รุนแรง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่ถูกทำปฏิกิริยาต่อไป

### 2.4 เอนไซม์ cellulase

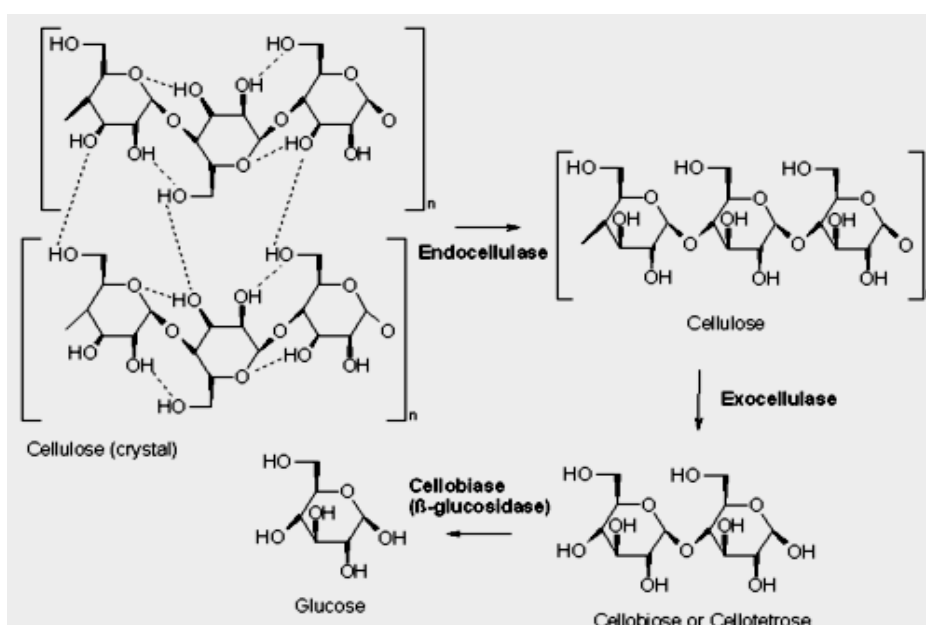
เอนไซม์ cellulase ประกอบด้วย 3 องค์ประกอบสำคัญ คือ Endocellulase (EC 3.2.1.4), Exocellulase (EC 3.2.1.91) และ ปีตากลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21) หน้าที่การทำงานของแต่ละตัว

(1) Endocellulase (EC3.2.1.4) ตัดสายเซลลูโลสแบบสุ่ม ได้เซลลูโลสสายสั้นๆ ได้ cello-oligo saccharides

(2) Exocellulase (EC 3.2.1.91) : ทำลาย non-reducing จากภายนอก ทำให้ได้ cellobiose

(3) ปีศาจกลูโคซิเดส: ย่อยสลาย cellobiose เป็นน้ำตาลกลูโคส

ปีศาจกลูโคซิเดส เอนไซม์ที่มีความสำคัญซึ่งสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ เอนไซม์นี้มีความสามารถในการย่อยหมู่อัลคิล และออลิโกของเบต้ากลูโคไซด์ ไคโรกลูโคไซด์และโอลิโกกลูโคไซด์ เป็นต้น จากคุณสมบัติดังกล่าว เอนไซม์ ปีศาจกลูโคซิเดส จึงได้รับการพัฒนามาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ หลากหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล การผลิตเครื่องดื่ม และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย cellobiose ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาล glucose ช่วยในการแก้ไขปัญหาวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและใช้ในการพัฒนาความเจริญก้าวหน้าทางด้านต่าง ๆ ที่ได้จากการนำเอนไซม์มาใช้งาน เช่น นำมาทำปุ๋ยชีวภาพ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการที่เอนไซม์ไปย่อยได้ ในการผลิต เอทานอล เพื่อเป็นพลังงานทางเลือกในอนาคตต่อไป เป็นต้น ซึ่งดีกว่าการกำจัดเศษวัสดุเหล่านี้แบบในปัจจุบันที่ผู้คนทั่วไปนิยม คือการเผาทำลายและการนำไปทิ้งขยะ ฯลฯ



รูปที่ 2.2 การย่อยเซลลูโลสโดยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส

(ที่มา : <http://www.thefullwiki.org/Hemicellulase>)

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และ ปีศาจกลูโคซิเดส จากยีสต์ในครั้งนี้ มีการศึกษาเกี่ยวกับ อุณหภูมิ, แหล่งคาร์บอนที่ยีสต์ใช้ ค่า pH ที่เหมาะสมและ ความเร็วรอบการเขย่า ในการเพาะเลี้ยง ที่จะทำให้อีสต์สามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสองนี้ได้ในปริมาณมากที่สุด รวมถึงสภาวะต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ด้วย

## 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิเชียร และคณะ (2538) แยกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจากตัวอย่างดินและน้ำบริเวณที่มีการเน่าเปื่อยของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ดินบริเวณนาข้าว ดินไร่ข้าวโพด ดินไร่อ้อย ดินในป่า และน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ รวมจำนวน 55 ตัวอย่าง ได้ยีสต์ 105 ไอโซเลต และเมื่อนำมาคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตไซลิทอลซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ของไซโลสที่มีความหวานใกล้เคียงกับซูโครส ร่วมกับ

ยีสต์ที่ใช้ไซโลสได้ที่เก็บรวบรวมอยู่ที่มหาวิทยาลัยฮิโรชิมา ประเทศญี่ปุ่น 15 สายพันธุ์ โดยใช้ในการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีไซโลสและตรวจการสร้างไซลิทอลโดยการเกิดสีหลังจากเกิดปฏิกิริยาเคมีของไซลิทอล พบว่า *Candida* sp. WT52 มีประสิทธิภาพสูงสุด

ภัชราพร (2543) ได้ทำการตรวจสอบเอนไซม์เซลลูเลส, เอนไซม์ไซแลนเนส, เอนไซม์ย่อยแป้ง, เอนไซม์บีต้า-ฟรุคโตฟิวแรนโนสซิเดสหรือเอนไซม์อินเวอร์เทส, เอนไซม์ไลเปส, เอนไซม์กลูคาโนทรานสเฟอเรส, เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส, และเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสจากแอคติโนมัยซิสจำนวนทั้งหมด 81 สายพันธุ์ และเชื้อราจำนวนเฉลี่ยทั้งหมด 651 สายพันธุ์ จากการทดสอบ พบว่า ความสามารถในการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิดเป็นคุณสมบัติเฉพาะของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มและแต่ละสายพันธุ์ และมีความสัมพันธ์กับลักษณะถิ่นที่อยู่เดิมของเชื้อราก่อนการจำแนก สามารถสรุปได้ว่า กลุ่มเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ทั้ง 7 ได้ดีที่สุด คือ เชื้อราที่ขึ้นบนขอนไม้ผุในป่าและเชื้อราที่อาศัยรวมอยู่กับไลเคน สำหรับเอนไซม์เซลลูเลส เชื้อราสามารถผลิตได้ในระดับปานกลาง ในขณะที่แอคติโนมัยซิสที่นำมาทดสอบสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ดี วิธีที่ใช้ wheat bran เป็นสารอาหารเหนียวสำหรับการผลิตและตรวจสอบโดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเซลลูโลสหรือไซแลนเป็นสับสเตรท (วิธีของ Novo Nordisk?) เป็นวิธีที่ให้ผลการตรวจสอบเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อราที่ขึ้นบนขอนไม้ผุในป่าและเชื้อราที่อาศัยรวมอยู่กับไลเคนได้เหมาะสมกว่าวิธีการตรวจโดยใช้กระดาษกรองหรือไซแลน และการตรวจสอบดังกล่าวไม่ขึ้นอยู่กับสูตรอาหารแบบแข็งหรือเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยง ซึ่งควรมี cellulose, wheat bran, หรือ xylan เป็นสารเหนียวสำหรับการผลิตเอนไซม์

ชาลีนีย์ (2553) คัดเลือก เซลลูเลส และ บีต้ากลูโคซิเดส จากยีสต์ จากบริเวณพื้นที่ป่าในจังหวัดขอนแก่น ซึ่งคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 118 ไอโซเลต ที่ได้จากตัวอย่างใบไม้ ดอกไม้ ผลไม้ และตัวอย่างดิน เมื่อศึกษาความสามารถในการสร้าง เซลลูเลส บนอาหารแข็ง Yeast extract Malt extract ที่มี 1% Carboxymethyl cellulose เป็นองค์ประกอบ พบยีสต์จำนวน 30 ไอโซเลต และเมื่อศึกษาความสามารถในการสร้างบีต้ากลูโคซิเดส บนอาหารแข็ง yeast nitrogen base ที่มี 0.004%(w/v) MUG (4-methylumbelliferyl-  $\beta$ -glucoside) เป็นส่วนประกอบ พบยีสต์จำนวน 38 ไอโซเลต สามารถสร้างบีต้ากลูโคซิเดส

Haan *et al.* (2007) ได้วิเคราะห์กระบวนการผลิตเอทานอลจาก lignocellulose โดยใช้กระบวนการ Consolidated bioprocessing (CBP) แบบ one-step เพื่อลดขั้นตอนและต้นทุนของกระบวนการผลิต โดยการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ให้มีคุณสมบัติทั้งการย่อยสับสเตรทที่มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลสและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลให้รวมอยู่ด้วยกัน โคลนยีนที่สร้างเอนไซม์ Cellobiohydrolase (CBH) ของเชื้อรา (*Trichoderma reesei* *cbh1* และ *cbh2*, *Aspergillus niger* *cbhB* และ *Phanerochaete chrysosporium* *cbh1-4*) ให้มีการแสดงออกในยีสต์ พบว่าเอนไซม์ทั้งสี่ชนิด (CBH1, CBH2, CBHB และ CBH1-4) มีการแสดงออกและมีกิจกรรมของเอนไซม์ภายนอกเซลล์เหมือนกัน โดยจะเห็นว่าทั้ง recombinant CBHs และ native *Trichoderma reesei* CBH มีระดับการแสดงออกต่ำเหมือนกัน จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของ Cellobiohydrolase (CBH) CBH2 มีกิจกรรมสูงกว่า CBH1 CBHB CBH1-4 แต่เมื่อเทียบ recombinant CBHs กับ native *T. reesei* CBH กิจกรรมของเอนไซม์ไม่ได้แตกต่างกัน และ CBH2 มีกิจกรรมบน phosphoric acid swollen cellulose (PASC) สูงกว่า bacterial microcrystalline cellulose (BMCC) แต่กิจกรรมของ CBH1 บน PASC และ BMCC ไม่ต่างกัน ดังนั้นจึงนำ CBH1 ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ปริมาณโปรตีนที่ได้  $0.22 \pm 0.17$  กรัมต่อมิลลิลิตร และค่า specific activity คือ  $0.22 \pm 0.07$  ยูนิตต่อมิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่า Y294[REF] ที่ผสมกับ native CBH1 ที่มีค่า specific activity เท่ากับ  $0.14 \pm 0.04$  ยูนิตต่อมิลลิกรัม จากการทดลองทั้งหมดพบว่าระดับการแสดงออกของ Cellobiohydrolase (CBH) เท่ากับ native *Trichoderma reesei* CBH สุดท้ายสิ่งที่จะต้องทำคือเพิ่มระดับการแสดงออกใน *Saccharomyces cerevisiae* ต่อไป



Badal *et al.* (2008) ทดลองการนำเปลือกข้าว (rice hulls) เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรมาพัฒนาเป็น feedstock เพื่อผลิตเอทานอล โดยย่อยเปลือกข้าวด้วย ปูนขาว (lime หรือ  $\text{CaCO}_3$ ) 100 มิลลิกรัมต่อกรัมของเปลือกข้าว มีการปลดปล่อยน้ำตาลสูงสุดที่  $126 \pm 1$  มิลลิกรัมต่อกรัมของเปลือกข้าว (กลูโคส  $93 \pm 1$  มิลลิกรัม ไสโลส  $27 \pm 0$  มิลลิกรัม อะราบินอส  $6 \pm 0$  มิลลิกรัม) จากนั้นใช้เซลล์จุลินทรีย์ *E. coli* ปริมาณ 0.05 มิลลิลิตรต่อกรัมสับสเตรต ในสภาวะพีเอช 5 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเวลา 72 ชม. จากสภาวะการย่อยด้วยเอนไซม์ที่พีเอช 5 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณของเอนไซม์ 3 ชนิดที่ 0.15 มิลลิลิตรต่อกรัมสับสเตรต ให้น้ำตาลสูงที่สุด  $154 \pm 1$  มิลลิกรัมต่อกรัมของเปลือกข้าว จากนั้นตัวอย่างน้ำตาลที่ได้ในขั้นตอน enzymatic saccharification นำเข้าสู่กระบวนการหมักโดยใช้ recombinant *E. coli* สายพันธุ์ FBR5 ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล กระบวนการหมักมี 2 ระบบ คือ separate hydrolysis and fermentation (SHF) และ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) จากการทดลองพบว่า ระบบ SHF ได้ความเข้มข้นของเอทานอล  $9.8 \pm 0.5$  กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุดที่ A 660 นาโนเมตร ถึง  $6.5 \pm 0.5$  ในเวลา 19 ชม. ส่วนในระบบ SSF ความเข้มข้นของเอทานอล  $11.0 \pm 1.0$  กรัมต่อลิตรที่เวลา 53 ชม.

Dogaris *et al.* (2009) ปรับปรุงการผลิตเอทานอลของ *Neurospora crassa* โดยสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงแบบ solid-state cultivation (SSC) โดยใช้ก้านข้าวฟ่างเป็นสับสเตรต กลูโคสเป็นผลผลิตหลักที่ได้จากกระบวนการย่อยข้าวฟ่างหวาน สุดท้ายความเข้มข้นของกลูโคสที่ได้ 5.4 กรัมต่อลิตรหลังจาก 51 ชั่วโมงของการย่อย ไสโลไบโอสมีความเข้มข้น 5.4 กรัมต่อลิตร การเปลี่ยนข้าวฟ่างหวานไปเป็นเอทานอลภายใต้สภาวะ SSC ผลผลิตที่ได้เอทานอล 81.5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 8.1 เปอร์เซ็นต์ ไสลิทอล 5.7 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 4.7 เปอร์เซ็นต์

Rajeev *et al.* (2009) ศึกษาข้อจำกัดของการย่อยวัสดุทางการเกษตรสำหรับการผลิตเอทานอล คือราคาของเอนไซม์เซลลูเลส ราคากระบวนการผลิตเซลลูเลสเพื่อที่จะให้ราคาถูกลงก็ต้องใช้ลิกโนเซลลูเลสที่มีราคาถูกสำหรับเป็นสับสเตรต กระบวนการหมักด้วยเอนไซม์และกระบวนการหมักก็เป็นเหมือนกับ Solid state fermentation (SSF) เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการผลิต ในการศึกษาจะใช้เอนไซม์เซลลูโลสติกย่อยวัสดุโดย Solid state fermentation (SSF) บนรำข้าวสาลี เซลลูเลสและบีต้ากลูโคซิเดสโดยใช้ *Trichoderma reesei* RUT C30 และ *Aspergillus niger* MTCC 7956 ตามลำดับ ในกระบวนการย่อยจะใช้ สามสับสเตรตคือ ชานอ้อย ฟางข้าวและ ผักตบชวา ที่ใช้ในการศึกษาเอนไซม์ ใช้ 50 เปเปอร์ฟิเลตอร์ยูนิตของเซลลูเลส และ 10 ยูนิต บีต้ากลูโคซิเดสต่อกรัมในการ pretreat วัสดุเหลือทิ้ง ฟางข้าวให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 26.3 กรัมต่อลิตร ตามด้วย ชานอ้อย 17.79 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงใช้ฟางข้าวเป็นสับสเตรตในการผลิตเอทานอลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ได้เอทานอล 0.0093 กรัมต่อกรัมฟางข้าว

Mingjie *et al.* (2010) ตรวจสอบการผลิตเอทานอลโดยใช้ switchgrass (*Panicum virgatum*) เป็นวัสดุ ลิกโนเซลลูเลสที่ใช้เป็นสับสเตรต โดยกระบวนการเริ่มจากขั้นตอน Pretreatment ด้วย Ammonia Fiber Expansion (AFEX) และใช้ทั้งเอนไซม์ทางการค้า และ *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) ในการผลิตเอทานอล กระบวนการผลิตใช้มีสองวิธีคือ two-step Simultaneous saccharification และ co-fermentation (SSCF). แต่ละกระบวนการจะส่งเสริมการใช้ไสโลสซึ่งส่งผลให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ SSCF ดั้งเดิม SSCF ดั้งเดิมหลังจากย่อยความเข้มข้นของกลูโคสและไสโลสเป็น 30.7 และ 25.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากเติมยีสต์ความเข้มข้นของกลูโคสลดลง 1.3 กรัมต่อลิตร ใน 14 ชม. ความเข้มข้นสุดท้ายของไสโลสและเอทานอลประมาณ 25 กรัมต่อลิตร และ 22 กรัมต่อลิตร สำหรับกระบวนการ two step SSCF ความเข้มข้นของกลูโคสและไสโลสเป็น 8.1 และ 25.1 กรัมต่อลิตร หลังจาก 8 ชม. ของการ prehydrolysis. ในขั้นที่หนึ่งของวิธี SSCF ความเข้มข้นของกลูโคสและไสโลสลดลง 0.6 และ 18.7 กรัมต่อลิตร

ตามลำดับ ขั้นที่สองความเข้มข้นของไซโลสประมาณ 19 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นถึง 15 กรัมต่อลิตรใน 36 ชม. อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของกลูโคสลดลงถึง 0.9 กรัมต่อลิตร ที่ 128 ชม. ความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 26.3 กรัมต่อลิตร

Sree และคณะ (1999) พบว่า การผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (VS3) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถทำงานได้ในที่มีอุณหภูมิสูงร่วมกับเชื้อ *Bacillus sp.* (VB9) ในกระบวนการหมักแบบ Solid Substrate Fermentation (SSF) ที่ใช้วัตถุดิบผสมระหว่างข้าวฟ่างและมันเทศจะสามารถผลิตเอทานอลได้ 5 กรัม/100 กรัมวัตถุดิบ และ 3.5 กรัม/100 กรัมวัตถุดิบ ที่อุณหภูมิในกระบวนการหมัก 37 °C และ 42 °C ตามลำดับ

Chen และ Jin (2006) ศึกษาผลของเอทานอลต่อเอนไซม์เซลลูเลสจากยีสต์ในการย่อยสลายเซลลูโลส พบว่าในสภาวะที่มีเอทานอลความเข้มข้นระหว่าง 1%-9% ไม่มีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และ ปีต้ากลูโคซิเดสที่ผลิตจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

Swangkeaw และคณะ (2006) รายงานการคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากผลไม้ พบว่าสามารถคัดเลือกยีสต์ได้ 365 ไอโซเลต ที่ผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส โดยพบว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่สะสมอยู่ใน periplasmic space

Swangkeaw และคณะ (2008) รายงานการผลิต extracellular beta-glucosidase จากเชื้อ *Pichia anomala* MDD24 พบว่าที่พีเอช 5-7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150-200 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต beta-glucosidase เมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย 50% (V/V) acetone และนำมาศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีแอลกอฮอล์ (4-20% V/V)

## บทที่ 3

### วัสดุและอุปกรณ์

#### 3.1 อุปกรณ์

1. Water bath
2. Incubator shaker
3. Autoclave
4. Microscope
5. Hot air oven
6. Laminar flow
7. pH meter
8. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
9. เตาแก๊ส
10. micro centrifuge tube
11. Micropipette
12. Flask

13. Duran bottle

14. หลอดทดลอง

15. ลูกแก้ว

### 3.2 สารเคมี

1. Carboxymethyl cellulose

2. 3, 5-dinitrosalicylic acid

3.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

4. Citric acid

5.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

6. pNPG

7. 0.004% (w/v) MUG (4-methylumbelliferyl-  $\beta$ -glucoside)

### 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract –malt extract (YM ) agar

2. carboxymethylcellulose agar (CMC agar)

3. Yeast extract peptone dextrose (YPD broth)

4. Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (YNB) agar plate

## บทที่ 4

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 4.1 ทดสอบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อยีสต์

ทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสยีสต์ จาก stock มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร YM agar plate เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้น point inoculation เชื้อลงบนอาหาร CMC agar บ่มที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการสร้าง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยวาด congo red ลงบริเวณผิวหน้าอาหารที่มีเชื้ออยู่ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นดูโซนใสที่เกิดขึ้น ยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้าง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ จะเห็นโซนใส รอบ ๆ โคโลนีวัดขนาดโซนใส และขนาดของเซลล์ยีสต์

ทดสอบการสร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส นำเชื้อยีสต์จาก YM slant stock มา streak บนอาหาร YM agar plate บ่มที่  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้น point inoculation เชื้อลงบนอาหาร Yeast Nitrogen Base ที่ไม่มี amino acids (YNB) agar plate ที่มี 0.004%(w/v) MUG(4-methylumbelliferyl-  $\beta$ -glucoside) บ่มที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้าง บีต้ากลูโคซิเดส โดยเชื้อที่สามารถ บีต้ากลูโคซิเดส ได้จะเรืองแสงรอบโคโลนี เมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกผล วัดขนาดโซนของแสง และขนาดของเซลล์

#### 4.2 การจัดจำแนกประเภทยีสต์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2

##### 4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เชื้อเชื้อที่เป็นเซลล์ยีสต์มาละลายใน lysis buffer 200 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด 15 นาที เติม 2.5M Potassiumacetate pH 7.5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและแช่ในน้ำแข็ง 1 ชม นำไปปั่น

เหวี่ยงที่ 13000 rpm 5 นาที 4 องศาเซลเซียส จากนั้นก็ดูดส่วนใสมาใส่ในหลอดอันใหม่ เติม  $\text{CHCl}_3$ -isoamylalchol (24:1) 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยง 13000 rpm 5 นาที 4 องศาเซลเซียส จากนั้นก็ดูดส่วนใสมาใส่ใน eppendorf อันใหม่ เติม 1 เท่าของ cold-isopropanal ผสมให้เข้ากันและแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส 20 นาทีและ ต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14500 rpm 16 นาที และ จากนั้นนำส่วนใสทิ้งไป ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากันปั่นเหวี่ยงที่ 14500 rpm 5 นาที และ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอ แห้งจากนั้นเติมน้ำ (sterilized nanopure water) 20-30 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

#### 4.2.2 ขั้นตอนการหาความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสม

การเตรียมสารสำหรับ PCR (100 ไมโครลิตร )

|                                       |                |
|---------------------------------------|----------------|
| 10X Taq buffer                        | 10.0 ไมโครลิตร |
| $\text{MgCl}_2$ (25mM)                | 8.0 ไมโครลิตร  |
| dNTP mixture ( 2.5 mM)                | 8.0 ไมโครลิตร  |
| Primer : F63 (10 pM)                  | 3.0 ไมโครลิตร  |
| : LR3 (10 pM)                         | 3.0 ไมโครลิตร  |
| Sterilized nano pure water            | 57.5 ไมโครลิตร |
| Taq Polymerase ( 5U / $\mu\text{l}$ ) | 0.5 ไมโครลิตร  |

ผสม Reaction mixture ให้เข้ากันและใส่ใน PCR 9 ไมโครลิตร เติมดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตรต่อหลอด สำหรับการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นโดยใช้เวลาสั้นๆ จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR ที่ 30 รอบ ตรวจสอบผลด้วย Gel electrophoresis หยดสารละลายสี 1.3 ไมโครลิตร ลงในแผ่นพาราฟิล์ม เติมตัวอย่างที่เข้าเครื่อง PCR แล้ว 3 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายดีเอ็นเอ ลงใน agarose gel Run gel โดยใช้ 100 โวลต์ 35 นาที

#### 4.2.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ บริเวณ D1/D2 ของ 26s rDNA

การเตรียมสารสำหรับ PCR (100 ไมโครลิตร )

|                                       |                |
|---------------------------------------|----------------|
| 10X Taq buffer                        | 10.0 ไมโครลิตร |
| $\text{MgCl}_2$ (25mM)                | 8.0 ไมโครลิตร  |
| dNTP mixture ( 2.5 mM)                | 8.0 ไมโครลิตร  |
| Primer : F63 (10 pM)                  | 3.0 ไมโครลิตร  |
| : LR3 (10 pM)                         | 3.0 ไมโครลิตร  |
| Sterilized nano pure water            | 57.5 ไมโครลิตร |
| Taq Polymerase ( 5U / $\mu\text{l}$ ) | 0.5 ไมโครลิตร  |

ผสม Reaction mixture ให้เข้ากันและใส่ใน PCR 90 ไมโครลิตร เติมดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร ต่อหลอด จากนั้นเมื่อเข้าเครื่อง PCR แล้วนำไป gel electrophoresis

#### 4.2.4 การทำดีเอ็นเอของผลผลิตของ PCR ให้บริสุทธิ์

##### 1. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

- 1.1 นำดีเอ็นเอ จาก PCR product 100  $\mu\text{l}$  ใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่
- 1.2 เติม DF buffer ปริมาตร 5 เท่าของดีเอ็นเอ ตัวอย่าง และผสมให้เข้ากัน

##### 2. ขั้นตอนการจับกันของดีเอ็นเอ

- 2.1 ดูดสาร DF buffer และเติมน้ำดีเอ็นเอ ลงใน DF column
- 2.2 ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 30 วินาที

2.3 ดึง DF column ออก และเทสารที่อยู่ข้างล่างทิ้งไป

### 3. ขั้นตอนการล้าง

3.1 เติมน้ำที่เติม ethanol 600 µl ลงในตรงกลางของ DF column

3.2 ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 30 วินาที เทสารทิ้งอีกที

3.3 ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 3 นาที

#### 4.2.5 การชะดีเอ็นเอ

ย้ายคอลัมน์ไปบน หลอด microcentrifuge เติม Elution buffer หรือน้ำ 15-50 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ column ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที เพื่อละลายดีเอ็นเอบนเมมเบรน ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 2 นาที

#### 4.2.6 Gel electrophoresis

การเตรียม Agarose 0.8 เปอร์เซ็นต์ Agarose ผสมใน 1X TAE buffer ( 50X TAE buffer : Tris base 242 กรัม glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร Na<sub>2</sub>EDTA 37.2 กรัม) หยดสารละลายสี 1.3 ไมโครลิตร ลงในแผ่นพาราฟิล์ม เติมตัวอย่างที่เข้าเครื่อง PCR แล้ว 3 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายดีเอ็นเอลงในเจล agarose Run gel โดยใช้ 100 โวลต์ 35 นาที

#### 4.2.7 Sequencing reaction โดยวิธี PCR

การเตรียมสารสำหรับ Sequencing reaction

**Primer F63 ( 5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG- 3')**

|                           |                                                   |
|---------------------------|---------------------------------------------------|
| 5X buffer                 | 1.0 ไมโครลิตร                                     |
| BigDye                    | 2.0 ไมโครลิตร                                     |
| Primer F63 ( 1.6 pmol)    | 1.0 ไมโครลิตร                                     |
| Sterilized nanopure water | ..... ไมโครลิตร (ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 µl) |
| DNA template              | 1-3 ไมโครลิตร                                     |

**Primer LR3 (5' – GGTCCGTGTTTCAAGACG- 3')**

|                           |                                                           |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 5X buffer                 | 1.0 ไมโครลิตร                                             |
| BigDye                    | 2.0 ไมโครลิตร                                             |
| Primer LR3 ( 1.6 pmol)    | 1.0 ไมโครลิตร                                             |
| Sterilized nanopure water | ... ไมโครลิตร<br>(ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร) |
| DNA template              | 1-3 ไมโครลิตร                                             |

ผสมให้เข้ากันและใส่ใน PCR 7- 9 µl เติมดีเอ็นเอ 1-3 ไมโครลิตรต่อหลอด สำหรับการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นโดยใช้เวลาสั้นๆจากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR ที่ 25 รอบ

#### 4.2.8 การเตรียมดีเอ็นเอหลังจาก sequencing

เมื่อนำดีเอ็นเอ เข้าเครื่อง PCR แล้วย้ายลงใส่หลอดอันใหม่ เติม ethanol-acetate solution 80 ไมโครลิตร สำหรับตัวอย่าง 10-20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เพื่อให้มีการรวมตัวกันของดีเอ็นเอ นำหลอดไปปั่นที่ 15,000 rpm 20 นาที ค่อยๆดูดสารที่เป็นส่วนใสทิ้งไป เติม 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่ 15,000 rpm 5 นาที ดูดสารที่เป็นส่วนใสทิ้งไป ทำให้ดีเอ็นเอแห้งโดยใช้ heat box ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 1 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปวิเคราะห์โดย Automate DNA Sequencer วิเคราะห์ sequences เทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยวิธี BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/))

#### 4.3 ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลล์ในอาหารเหลว

นำยีสต์สร้างเอนไซม์ในกลุ่มเซลล์จากคัดเลือกลูกอาหารแข็งซึ่งแยกได้จากบริเวณป่าภูตาคา เชื้อนจุฬารักษ์ เชื้อนอุบลรัตน์ มาเพาะเลี้ยงในอาหาร YPD broth (yeast extract 10 กรัม, peptone 20 กรัม และ glucose 20 กรัม น้ำ 1 ลิตร พีเอช 5) บ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาศึกษาการเจริญของยีสต์โดยวิธี direct count และ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มเซลล์

#### 4.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

การกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์ ศึกษาโดยใช้ carboxymethyl cellulose และ Filter paper เป็น substrate โดยนำสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ 0.1 M carboxymethyl cellulose หรือ Filter paper (เตรียมใน 0.1 M citrate phosphate buffer, pH 5.0) บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดปริมาณ reducing sugar โดยวิธี DNS (Miller, 1959) กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เซลล์ หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ย่อย carboxymethyl cellulose หรือ Filter paper แล้วทำให้เกิด reducing sugar 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส นำสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ 0.002 M *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside (pNPG) (เตรียมใน 0.1 M citrate phosphate buffer, pH 5.0) 0.2 มิลลิลิตร บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยากับ 0.25 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ย่อย *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside แล้วทำให้เกิด *p*-nitrophenol 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที (Rodriguez และคณะ, 2004)

#### 4.5 ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์

ผลิตเอนไซม์เซลล์และบีต้ากลูโคซิเดสจากจะยีสต์ จากนั้นนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ สับสเตรต น้ำตาล พีเอช อุณหภูมิ เอทานอล ที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์

4.1.4.1 แหล่งคาร์บอนในสับสเตรตที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงยีสต์ โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YPD, YPC, ฟางข้าว และชานอ้อย เก็บตัวอย่างเพื่อทำการทดสอบหาปริมาณ Reducing sugar ที่วันที่ 0, 1, 3, 5, 7 ทำการเตรียมเอนไซม์และทดสอบเอนไซม์ดังวิธีข้อ 4.1.3

4.1.4.2 pH ที่เหมาะสม เลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YPD ที่ pH 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 เก็บตัวอย่างเพื่อทำการทดสอบหาปริมาณ Reducing sugar ที่วันที่ 0, 1, 3, 5, 7 ทำการเตรียมเอนไซม์และทดสอบเอนไซม์

4.1.4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม เลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YPD ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35° C เก็บตัวอย่างเพื่อทำการทดสอบหาปริมาณ Reducing sugar ที่วันที่ 0, 1, 3, 5, 7 ทำการเตรียมเอนไซม์และทดสอบเอนไซม์ -  $\beta$ -D-glucopyranoside แล้วทำให้เกิด *p*-nitrophenol 1 nmol ต่อนาที ในสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

## 5.1 การสร้างเอนไซม์ของเชื้อยีสต์

ตารางที่ 5.1 ยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

5.2 การ  
ประเภท  
สร้าง  
เซลลูเลส

| ไอโซเลต  | บริเวณวงใส (มิลลิเมตร) | สถานที่เก็บตัวอย่าง         |
|----------|------------------------|-----------------------------|
| C2-4     | 1                      | เหมือดแอ่ เชื้อนอบลรัตน์    |
| C6-3     | 1                      | มะกอก เชื้อนอบลรัตน์        |
| F14-3    | 1                      | ดอกไม้เชื้อนอบลรัตน์        |
| F4-3     | 1                      | หนามวัวซึ่งผาเชื้อนอบลรัตน์ |
| F5-1     | 1                      | ดอกไม้เชื้อนอบลรัตน์        |
| F5-2     | 1                      | ดอกไม้เชื้อนอบลรัตน์        |
| S5-5     | 4***                   | ดินจากหน้าผาเชื้อนอบลรัตน์  |
| 101-1    | 2*                     | น้อยหน้า เชื้อนอบลรัตน์     |
| 101-3    | 2*                     | น้อยหน้า เชื้อนอบลรัตน์     |
| 106-1    | 1                      | ชาดเชื้อนอบลรัตน์           |
| 108-4    | 1                      | ดิวหม่อน เชื้อนอบลรัตน์     |
| 109-1    | 3**                    | ลูกฮัมบัว เชื้อนอบลรัตน์    |
| 109-3    | 2*                     | ลูกฮัมบัว เชื้อนอบลรัตน์    |
| 111-1    | 2*                     | ลูกตานกกรดเชื้อนอบลรัตน์    |
| 112-2    | 1                      | ยอป่าเชื้อนอบลรัตน์         |
| 112-3    | 1                      | ยอป่า เชื้อนอบลรัตน์        |
| 202-3    | 1                      | กะบก เชื้อนอบลรัตน์         |
| 203-1    | 1                      | ด่างไก่อ เชื้อนอบลรัตน์     |
| 204-1    | 3**                    | ใบไม้ เชื้อนอบลรัตน์        |
| 204-2    | 2*                     | ใบไม้ เชื้อนอบลรัตน์        |
| 210-1    | 1                      | แก่นเทา เชื้อนอบลรัตน์      |
| 214-1    | 1                      | ใบไม้ เชื้อนอบลรัตน์        |
| 216-1    | 1                      | หญ้าหักฉิมเชื้อนอบลรัตน์    |
| S11-1    | 5****                  | ดินเชื้อนอบลรัตน์           |
| S13-1    | 2*                     | ดินเชื้อนอบลรัตน์           |
| CHD-FW10 | 0.1                    | เชื้อนจุฬารักษ์             |
| CHD-FW1  | 0.05                   | เชื้อนจุฬารักษ์             |
| PM-PS40  | 3 (โซนใส)**            | ดิน, ป่าภูตากา              |
| PM-PF47  | 2 (โซนใส)*             | ผลมะกอกเกลือ ป่าภูตากา      |

จัดจำแนก  
ยีสต์ที่  
เอนไซม์  
โดย

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2

ตารางที่ 5.2 การจัดจำแนกยีสต์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณD1/D2

| Strain | Closest species<br>(Accession number)     | nucleotides identity<br>/Total nucleotides | %<br>identity | Sub-<br>stitution | Gap | Remark    |
|--------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------|-------------------|-----|-----------|
| FW10   | <i>Candida</i> sp. AS2. 3483EU284105.1    | 504/521                                    | 96            | 15                | 5   | New sp.   |
| PM34   | <i>Torulaspora delbrueckii</i> U72156     | 564/572                                    | 98            | 4                 | 4   | New sp.   |
| PM47   | <i>Candida ponderosae</i> EF550345        | 539/592                                    | 91            | 36                | 17  | New sp.   |
| F5-1   | <i>Candida</i> sp. EN28S10 FJ527133.1     | 550/557                                    | 98            | 5                 | 2   | New sp.   |
| S2-1-2 | <i>Kluyveromyces africanus</i> AY048159.1 | 572/572                                    | 100           | 0                 | 0   | Known sp. |
| S1-1   | <i>Candida tropicalis</i> U45749(T)       | 570/576                                    | 99            | 0                 | 6   | Known sp. |
| 214-1  | <i>Candida orthopsilosis</i> FJ746063.1   | 570/570                                    | 100           | 0                 | 0   | Known sp. |
| 204-1  | <i>Pichia fabianii</i> U73573.1           | 578/578                                    | 100           | 0                 | 0   | Known sp. |

0-1bp = know species

2-5 bp= Sister species

≥6bp = New species

### 5.3 การผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส บนอาหารแข็ง

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ในอาหารแข็ง CMC เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ราดด้วย congo red และสังเกตดูโซนใสที่เกิดขึ้น โดยที่ congo red จะติดกับกับพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นสับสเตรท คือ carboxymethyl cellulose แล้วจะเห็นเป็นสีแดงของ congo red ถ้าหากยีสต์ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสซึ่งจะสามารถย่อยสับสเตรทได้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ ทำให้ congo red ไม่สามารถติดกับกับสับสเตรทได้ จึงเห็นเป็นโซนใส จากการทดสอบพบว่าเชื้อเกิดโซนใส 10 สายพันธุ์ คือ *Torulaspora* sp.PM34 (New sp.), *Candida* sp.PM47(New sp.), *Candida fructus* PM05, *Candida* sp. FW10 (New sp.), *Kluyveromyces africanus* S2-1-2, *Candida tropicalis* S1-1, *Candida orthopsilosis* 109-1, *Candida orthopsilosis* 214-1, *Candida* sp. F5-1 (New sp.) , 201-2, 203-1

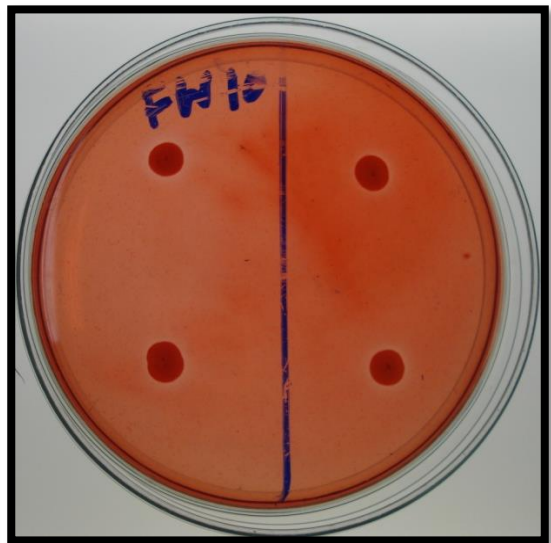
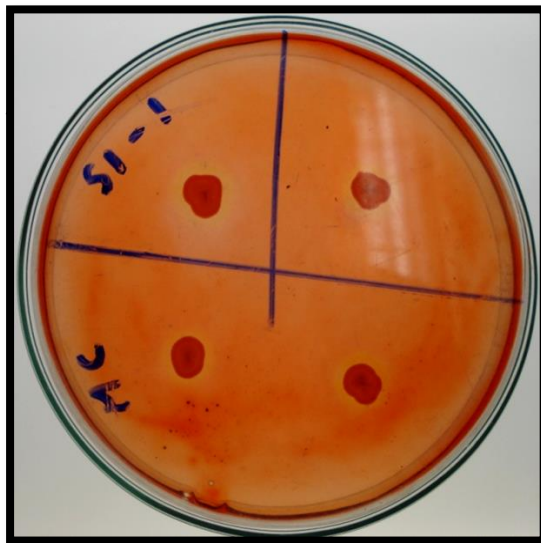


A

B

รูปที่ 5.1 การสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสบนอาหารแข็งของเชื้อ *Candida tropicalis* S1-1 (A) และ *Candida* sp. FW10 (New sp.) (B).

าก  
การ  
คัดเลือ  
อก  
เชื้อ  
ยีสต์ที่  
ผลิต  
คาร์  
บอกซี

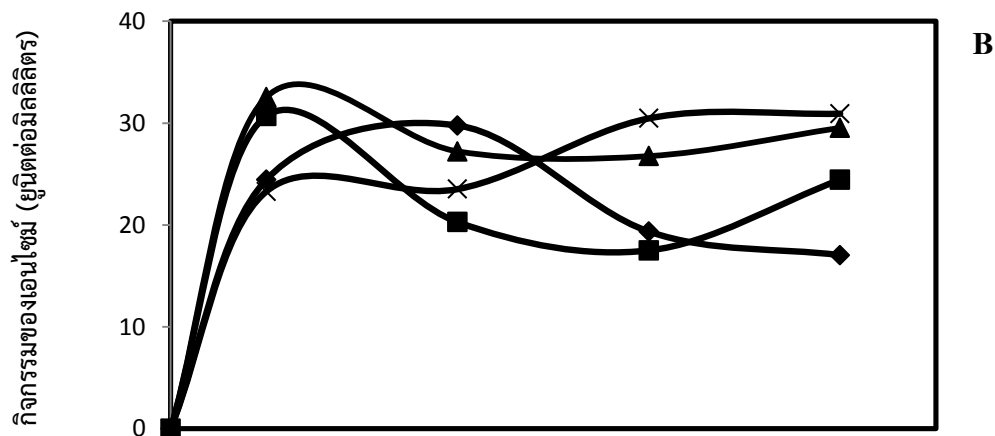


เมทิลเซลลูเลสได้ 10 ไอโซเลต 8 สายพันธุ์ที่การสร้างเอนไซม์สูงคือ

1. รหัสเชื้อ 204-1, ชื่อเชื้อ *Pichia fabianii*  
แหล่งที่มา ใบไม้ เชื้อนอบลรัตน์
2. รหัสเชื้อ 214-1, ชื่อเชื้อ *Candida orthopsilosis*  
แหล่งที่มา ใบไม้ เชื้อนอบลรัตน์
3. รหัสเชื้อ PM 34, ชื่อเชื้อ *Torulaspora* sp. (New sp.)  
แหล่งที่มา ดินแปลงที่ 3 เชื้อนจุฬารณย์
4. รหัสเชื้อ PM 47, ชื่อเชื้อ *Candida* sp. (New sp.)

- แหล่งที่มา ผลมะกอกเกลื่อน ป่าโคกภูตากา
5. รหัสเชื้อ S2-1-2, ชื่อเชื้อ *Kluyveromyces africanus*  
แหล่งที่มา เชื้อนจุฬารักษ์
  6. รหัสเชื้อ S1-1, ชื่อเชื้อ *Candida tropicalis*  
แหล่งที่มาดิน เชื้อนอุบลรัตน์
  7. รหัสเชื้อ F5-1, ชื่อเชื้อ *Candida* sp. (New sp.)  
แหล่งที่มา ดอกไม้เชื้อน อุบลรัตน์
  8. รหัสเชื้อ FW10, ชื่อเชื้อ *Candida* sp. (New sp.)  
แหล่งที่มา ดอกไม้ เชื้อนจุฬารักษ์

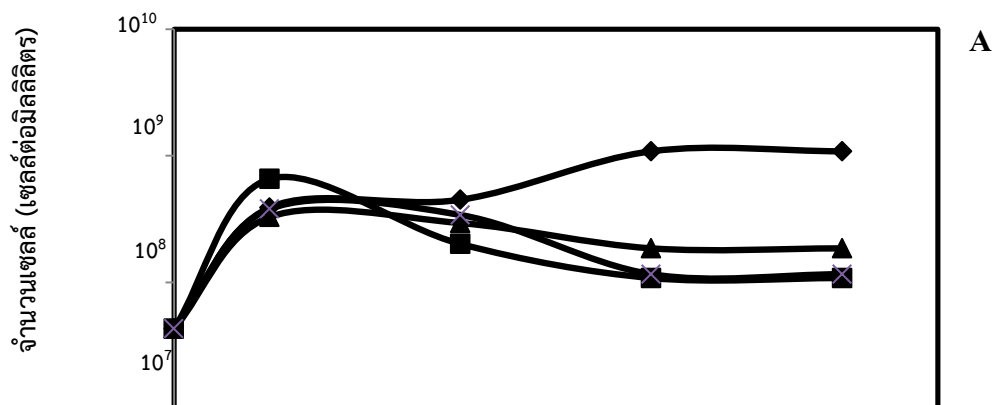
จากนั้นจึงทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสม ทั้ง แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสม และ pH ที่เหมาะสม



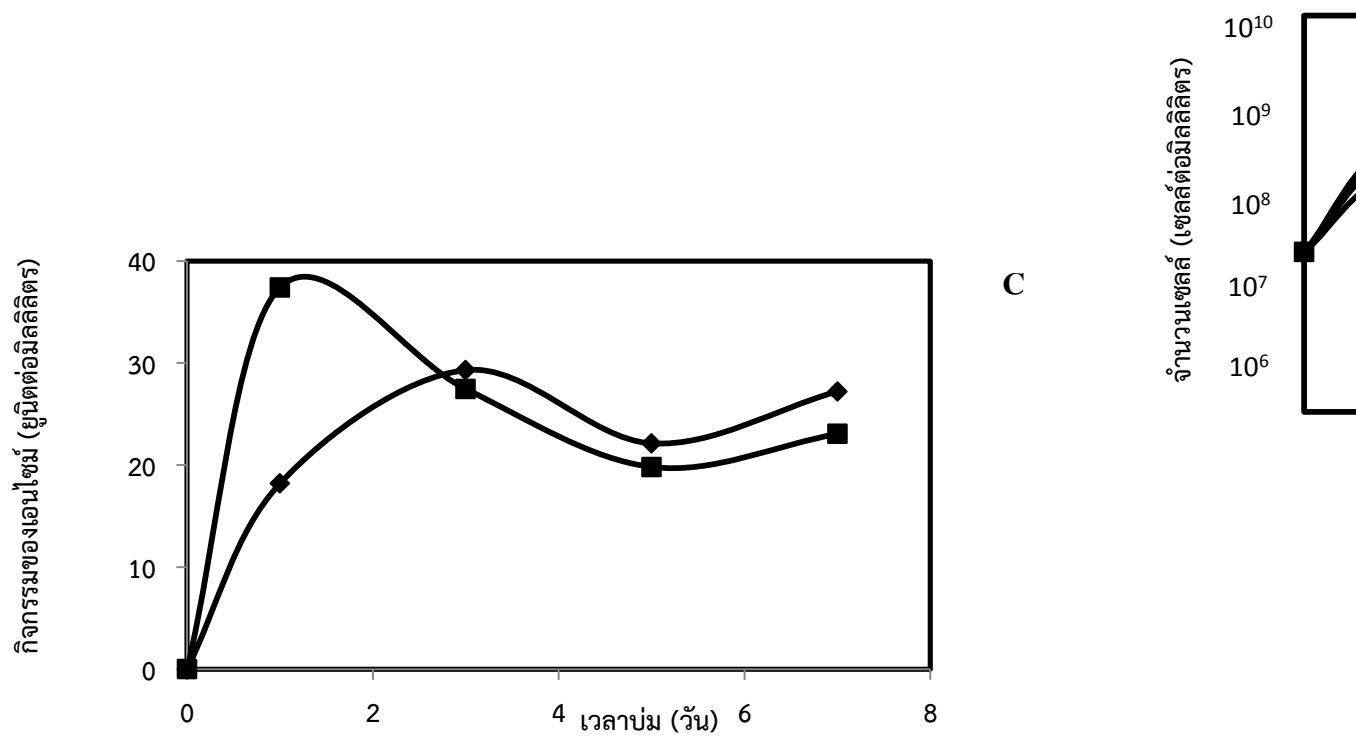
#### 5.4 คุณลักษณะของเอนไซม์

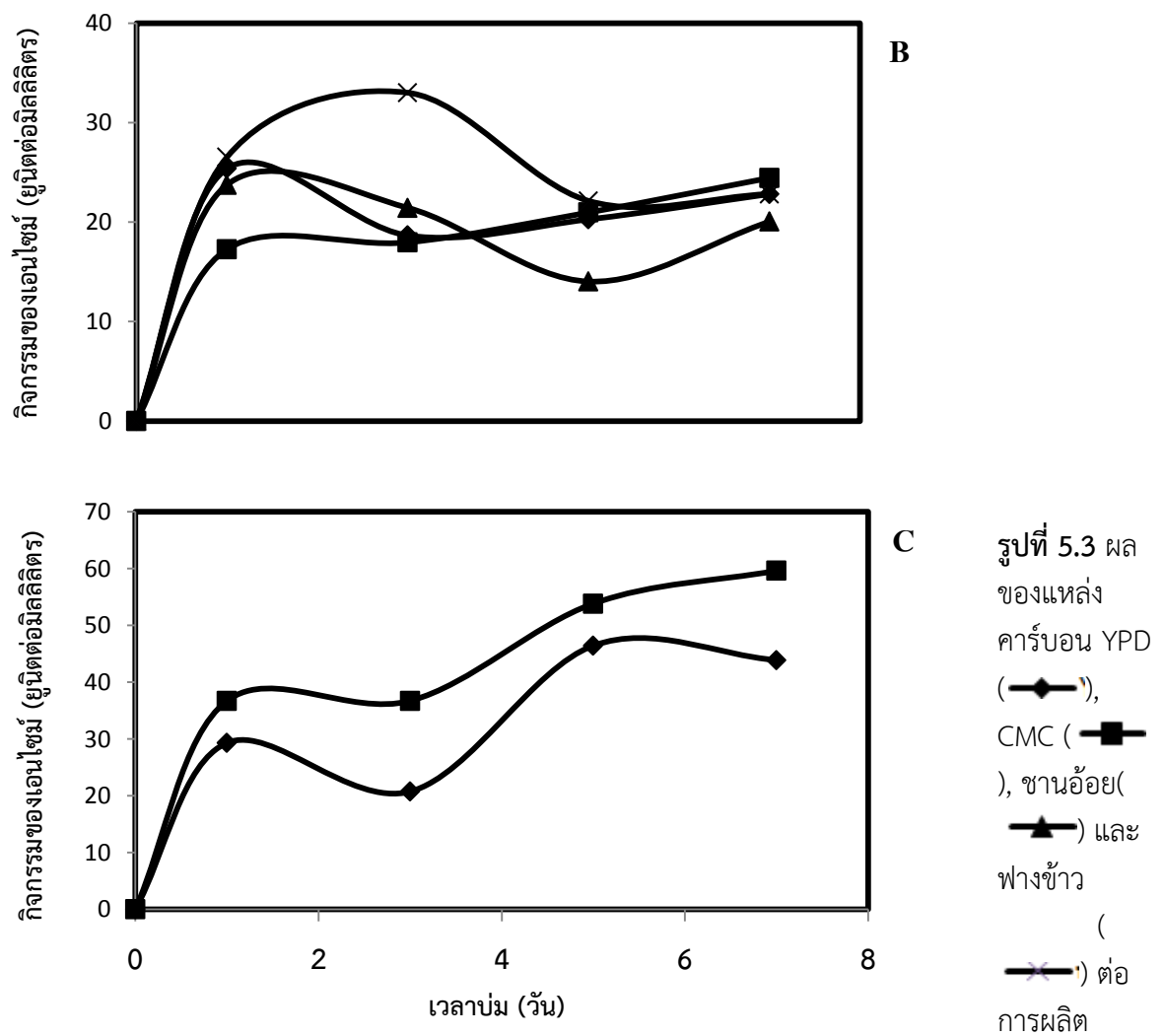
##### 5.4.1 คุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส

##### 5.4.1.1 ผลของแหล่งคาร์บอนเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

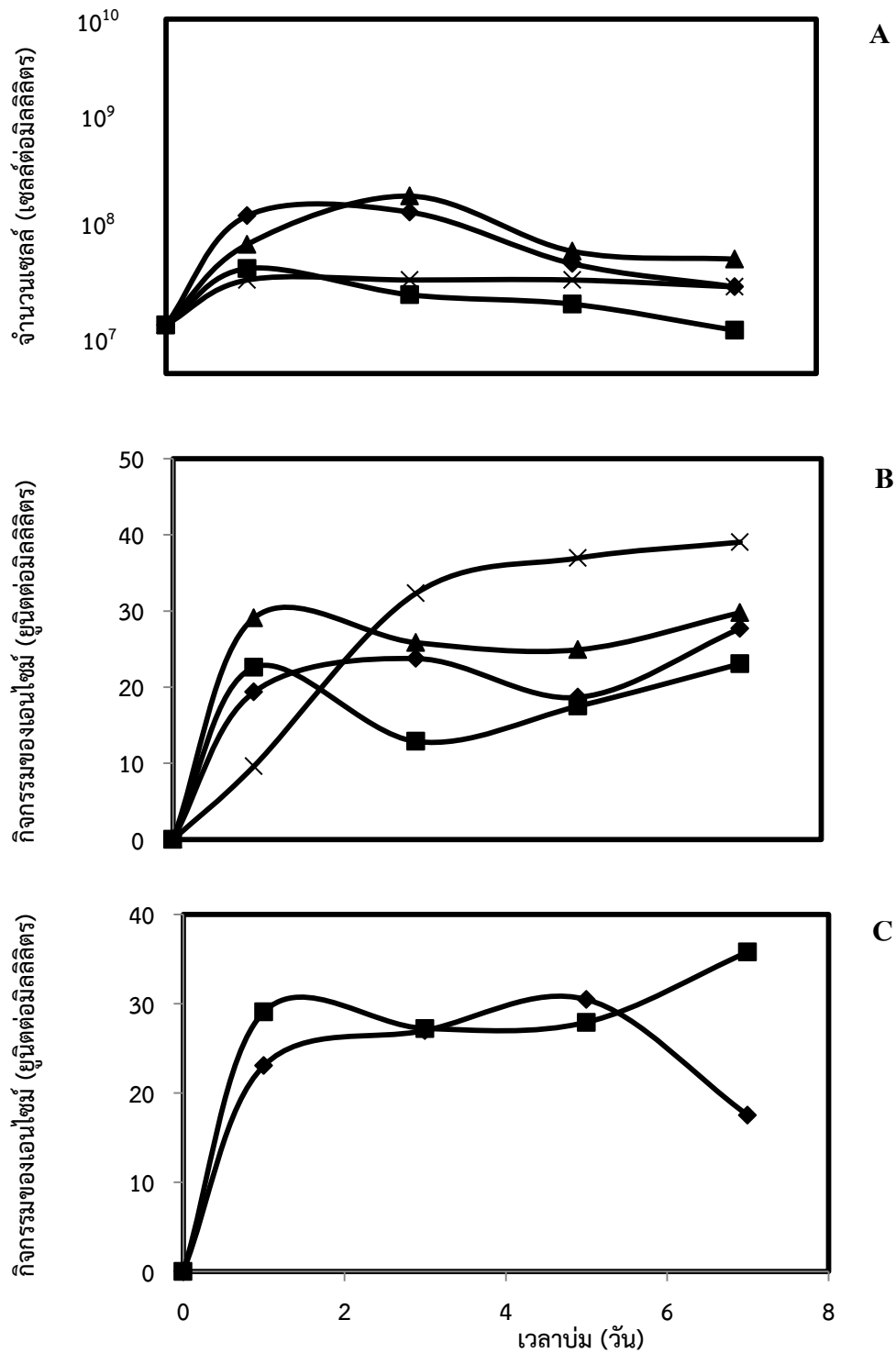


รูปที่ 5.2 ผลของแหล่งคาร์บอน YPD (—◆—), CMC (—■—), ชานอ้อย (—▲—) และฟางข้าว (—✕—) ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Pichia fabianii* 204-1: การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).

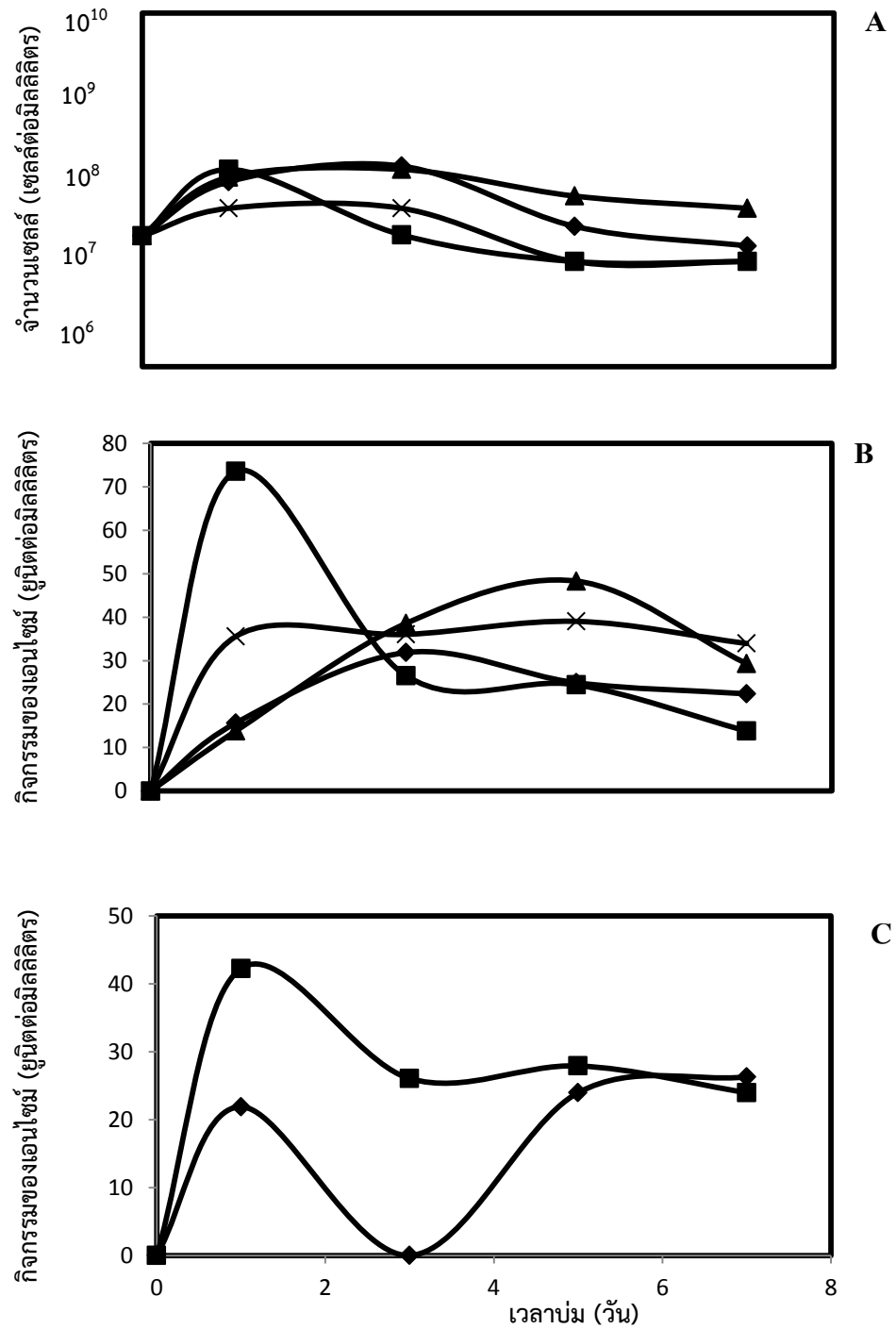




เอนไซม์เซลล์ของ *Candida orthopsilosis* 214-1: การเจริญ (A),  
กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลล์ (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์  
เซลล์ (C).



รูปที่ 5.4 ผลของแหล่งคาร์บอน YPD (◆), CMC (■), ชานอ้อย (▲) และฟางข้าว (✕) ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Torulaspora* sp. PM 34: การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).

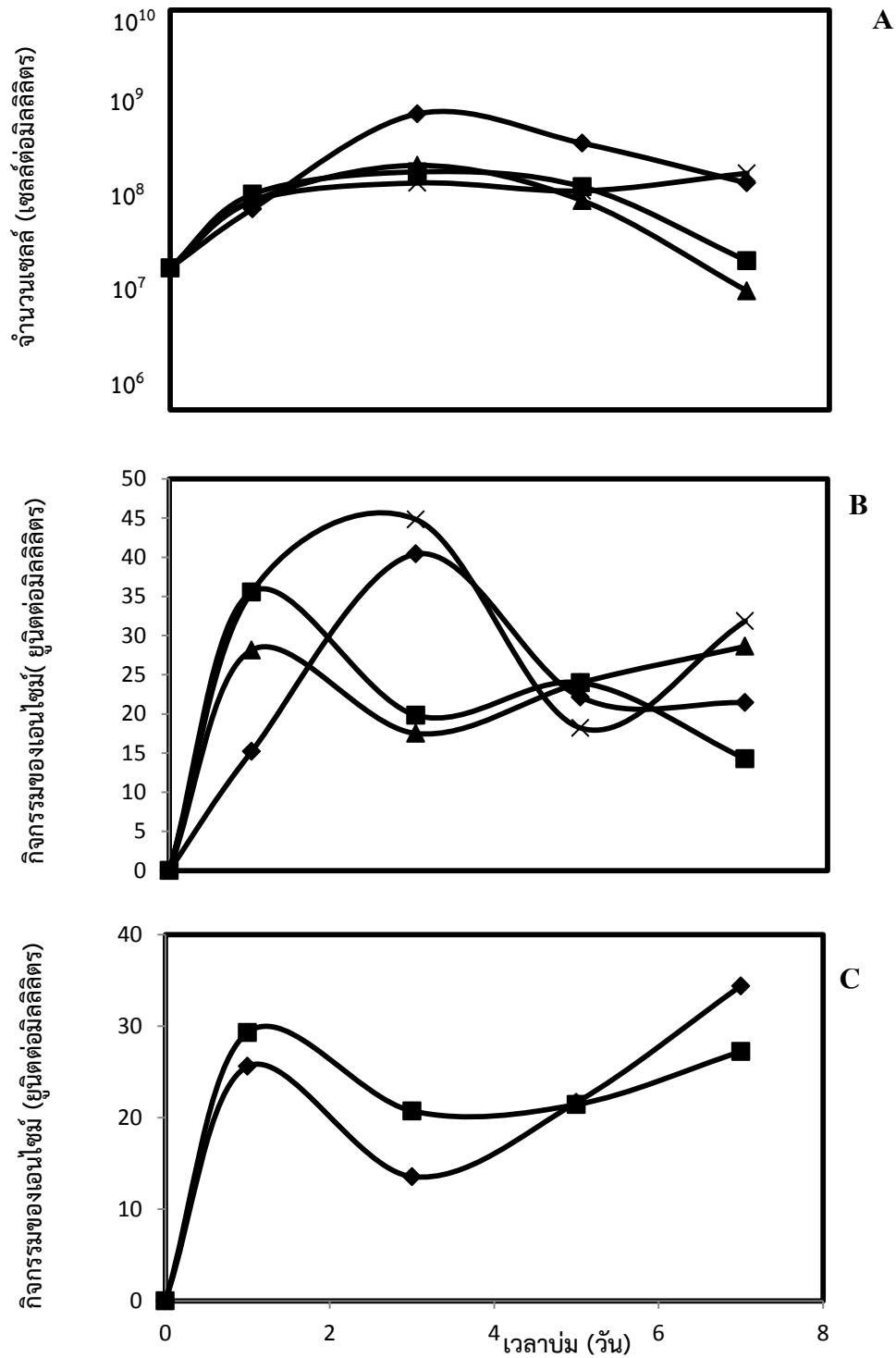


รูปที่ 5.5 ผล

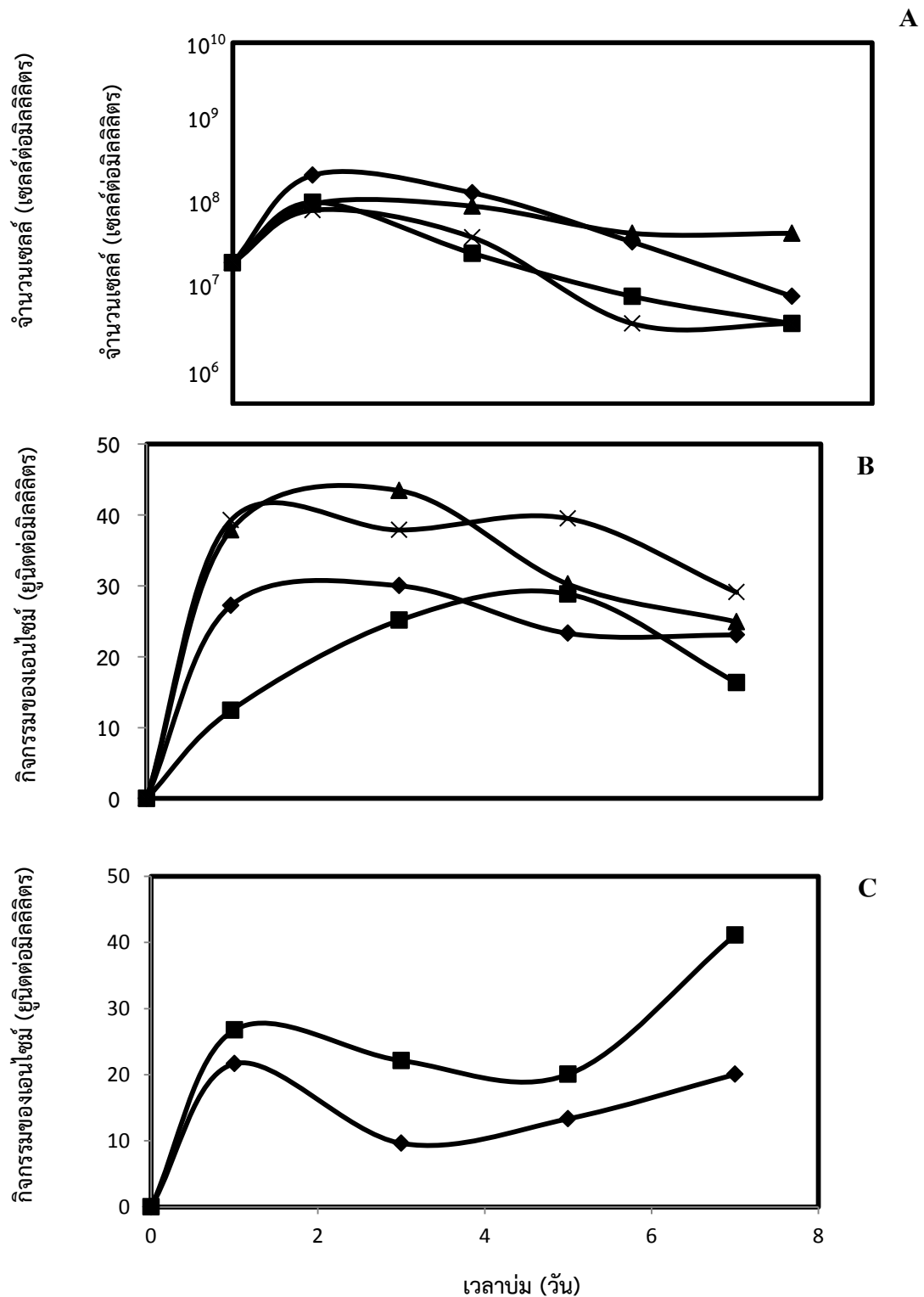
ของแหล่งคาร์บอน YPD (◆), CMC (■), ชานอ้อย (▲) และฟางข้าว

(×) ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Candida ponderosa* PM 47;: การเจริญ (A),

กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).

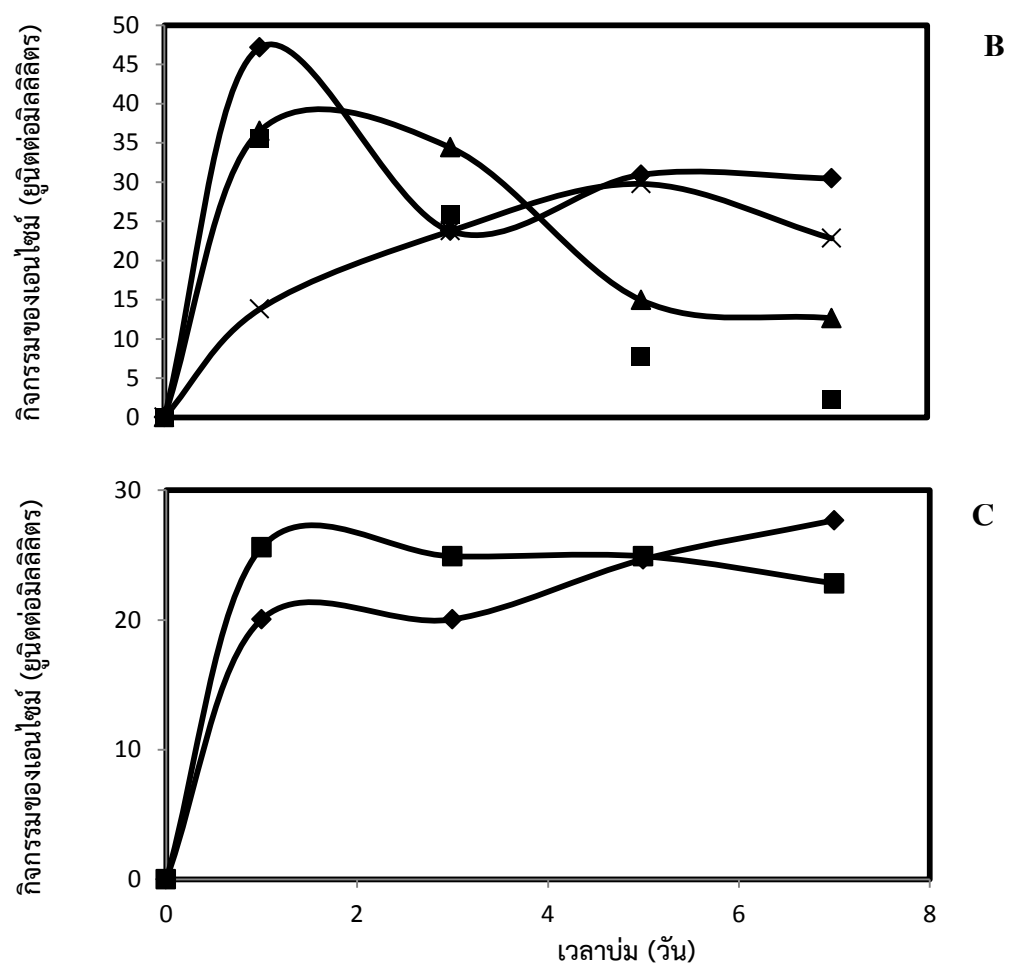


รูปที่ 5.6 ผลของแหล่งคาร์บอน YPD (◆), CMC (■), ชานอ้อย (▲) และฟางข้าว (✕) ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Kluyveromyces africanus* S2-1-2: การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).



รูปที่ 5.7 ผลของแหล่งคาร์บอน YPD (—◆—), CMC (—■—), ขานอ้อย(—▲—) และฟางข้าว (—×—) ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Candida tropicalis* S1-1; การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).

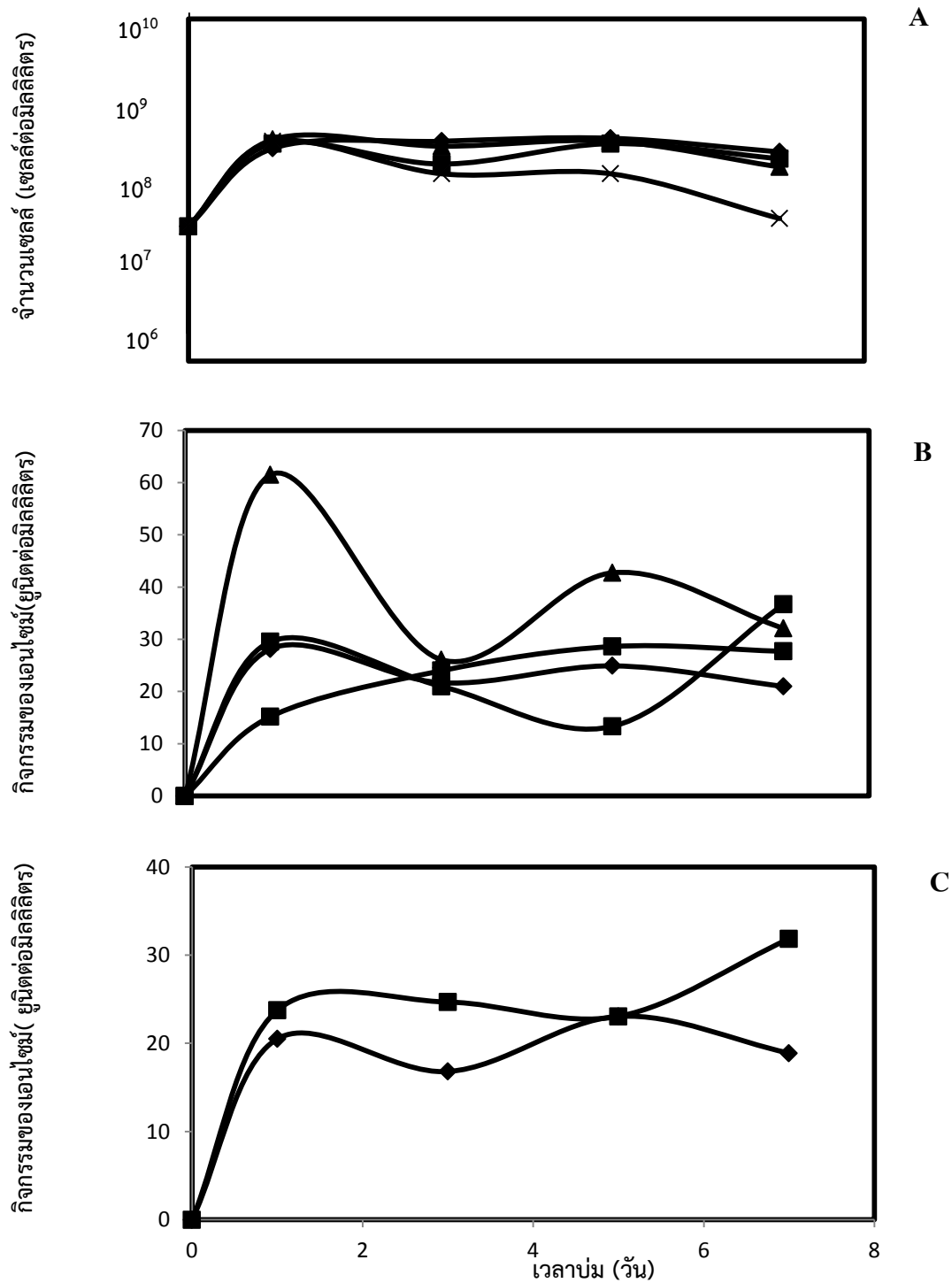




รูปที่

5.8 ผลของแหล่งคาร์บอน YPD (◆), CMC (■), ขานอ้อย(▲) และฟางข้าว

(×) ต่อการการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Candida* sp. F5-1. (New sp.) : การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).



รูปที่ 5.9 ผลของแหล่งคาร์บอน YPD (◆), CMC (■), ชานอ้อย (▲) และฟางข้าว (✕) ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Candida* sp. FW10 (New sp.): การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).

จากรูปที่ 5.2 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Pichia fabianii* 204-1 เจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือประมาณ  $10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี CMC, ฟางข้าว และชาน

อ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ รูปที่ 5.2B เชื้อ *Pichia fabianii* 204-1 สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ขานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 32.55 U/ml และมีฟางข้าว, CMC และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ รูปที่ 5.2C เชื้อ *Pichia fabianii* 204-1 สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 7 คือเท่ากับ 37.41 U/ml กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา

จำนวนเซลล์ของ *Candida orthopsilosis* 214-1 ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน จากรูปแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Candida orthopsilosis* 214-1 เจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนดังรูปที่ 5.3A เจริญสูงสุดในวันที่ 1 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี ขานอ้อย, ฟางข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ รูปที่ 5.3B เชื้อ *Candida orthopsilosis* 214-1 สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 33.01 U/ml และมีกลูโคส, CMC และขานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ รูปที่ 5.3C เชื้อ *Candida orthopsilosis* 214-1 สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 7 คือเท่ากับ 59.63 U/ml กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา

*Torulaspora* sp. PM 34 (New sp.) ที่มีการเจริญในแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กันรูปที่ 5.4A เจริญได้ดีในอาหารที่มี ขานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดในวันที่ 3 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี YPD, CMC และ ฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ รูปที่ 5.4B เชื้อ *Torulaspora* sp. PM 34 (New sp.) สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 7 คือเท่ากับ 39.03 U/ml และมีขานอ้อย, กลูโคส และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ รูปที่ 5.4C เชื้อ *Torulaspora* sp. PM 34 (New sp.) สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 7 คือเท่ากับ 35.79 U/ml กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา

PM 47, *Candida ponderosae* มีจำนวนเซลล์ของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน และพบว่าเจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดในวันที่ 3 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี CMC, ขานอ้อยและ ฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ ดังรูปที่ 5.5A เชื้อ PM 47, *Candida ponderosae* สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 1 คือเท่ากับ 73.52 U/ml ดังรูปที่ 5.5B และมีขานอ้อย, ฟางข้าว และ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ รูปที่ 5.5C เชื้อ PM 47, *Candida ponderosae* สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 1 คือเท่ากับ 42.27 U/ml กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา

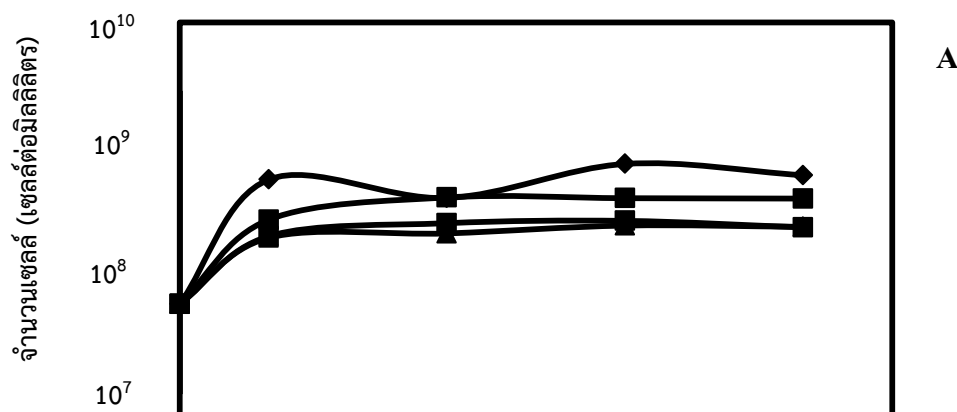
*Kluyveromyces africanus* S2-1-2 เจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดในวันที่ 3 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี ขานอ้อย, ฟางข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับดังรูปที่ 5.6A และสามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ ฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนดังรูปที่ 5.6B ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 44.81 U/ml และมีกลูโคส, CMC และ ขานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ นอกจากนี้ สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 7 คือเท่ากับ 34.40 U/ml CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา (รูปที่ 5.6C)

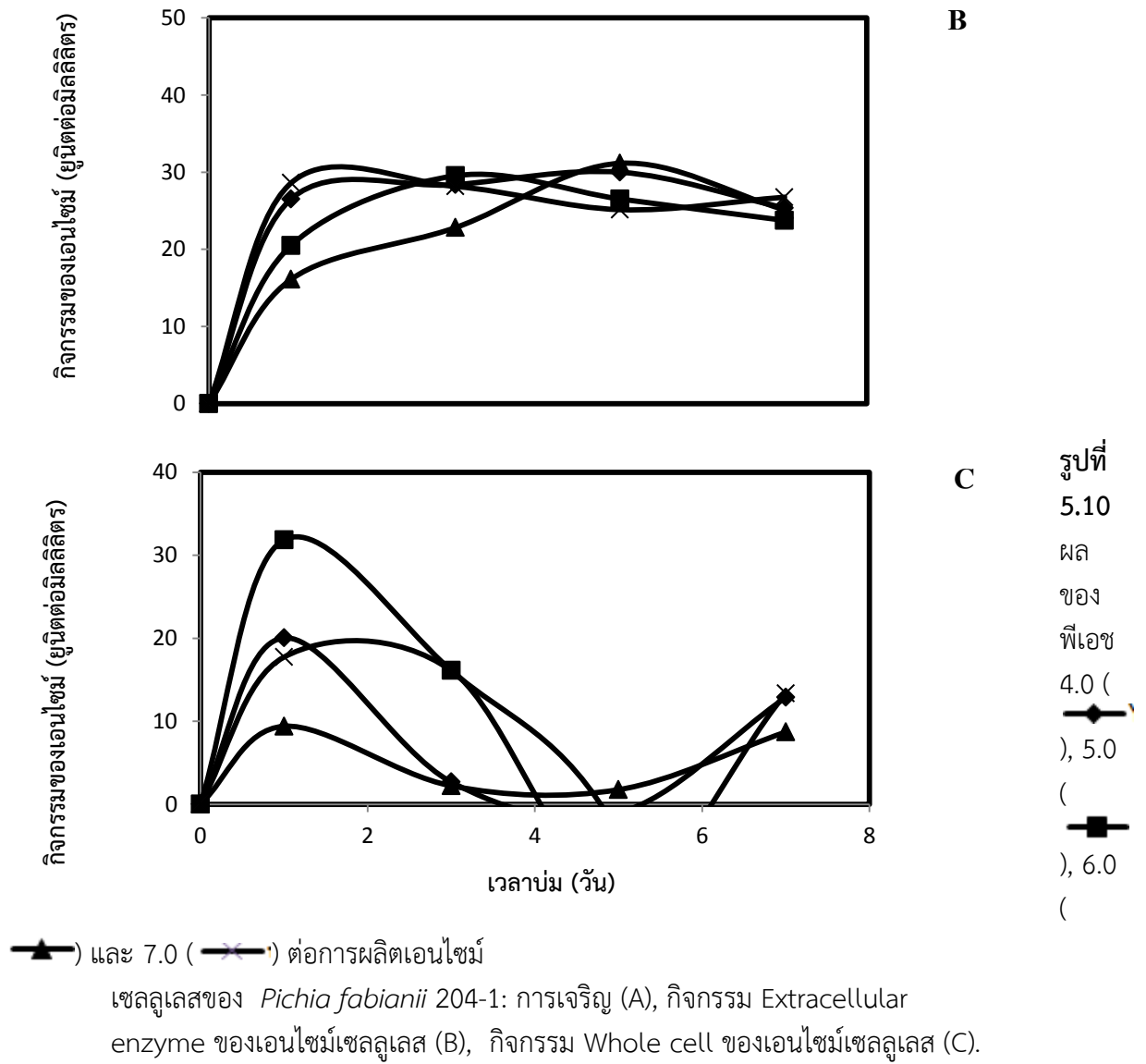
*Candida tropicalis* S1-1 เจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดในวันที่ 5 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิตร และอาหารที่มี ชานอ้อย, ฟางข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ (รูปที่ 5.7A) สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ ชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 43.43 U/ml และมีฟางข้าว, กลูโคส และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ (รูปที่ 5.7B) และสามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 7 คือเท่ากับ 41.11 U/ml กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา (รูปที่ 5.7B)

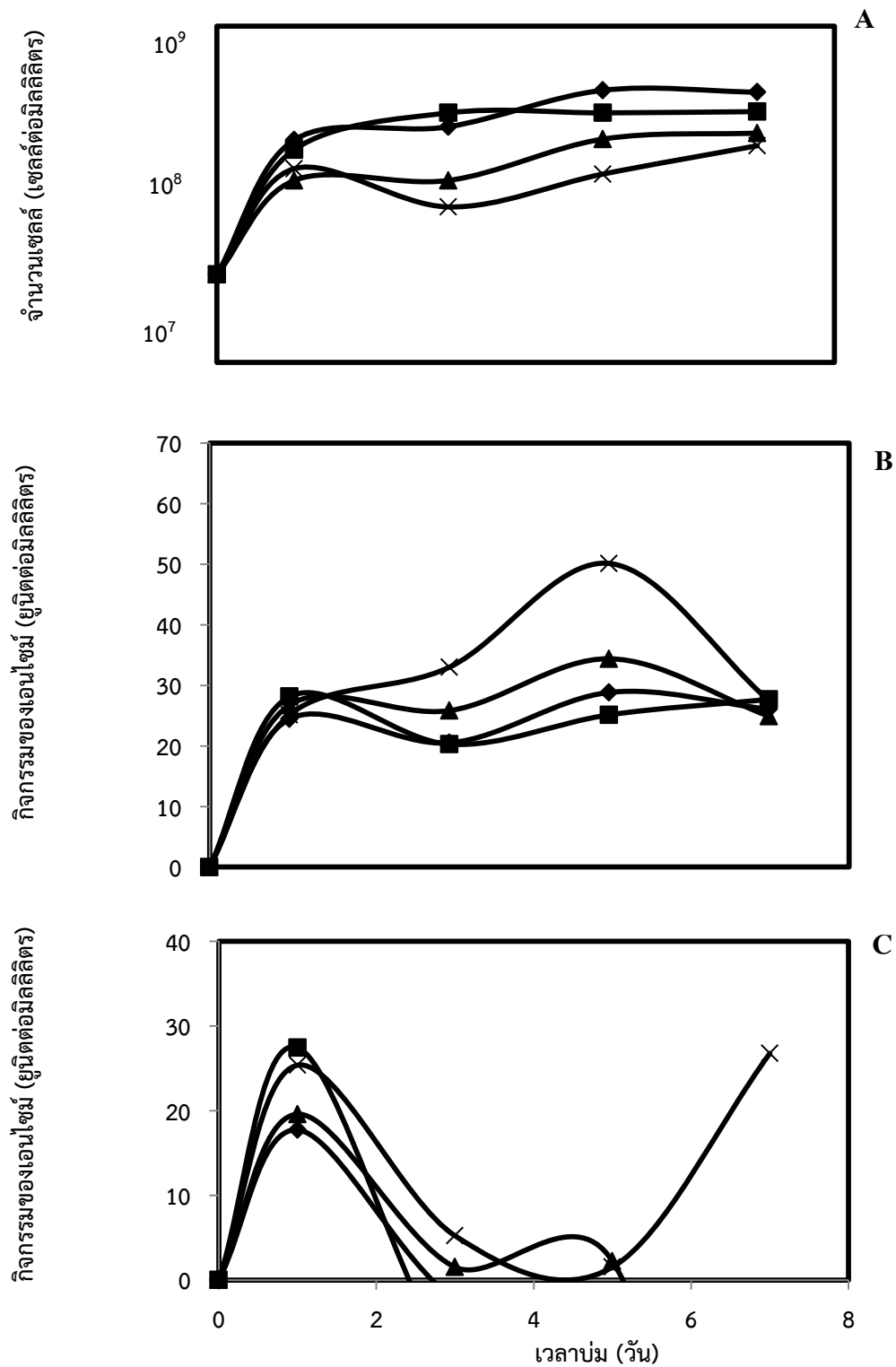
*Candida* sp F5-1. (New sp.) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน (รูปที่ 5.8A) เจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดในวันที่ 1 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิตร และอาหารที่มี ชานอ้อย, ฟางข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 1 คือเท่ากับ 47.14 U/ml (รูปที่ 5.8B) และมีชานอ้อย, CMC และ ฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ และสามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 7 คือเท่ากับ 26.69 U/ml CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา (รูปที่ 5.8C)

*Candida* sp. FW10 (New sp.) ที่เจริญได้ดีในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 5.9A) เจริญสูงสุดในวันที่ 5 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิตร และอาหารที่มี ชานอ้อย, CMC และ ฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ (รูปที่ 5.9B) เชื้อ *Candida* sp. FW10 (New sp.) สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ ชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 1 คือเท่ากับ 61.48 U/ml และมี CMC, กลูโคสและ ฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ และ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 7 คือเท่ากับ 31.85 U/ml กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา (รูปที่ 5.9C)

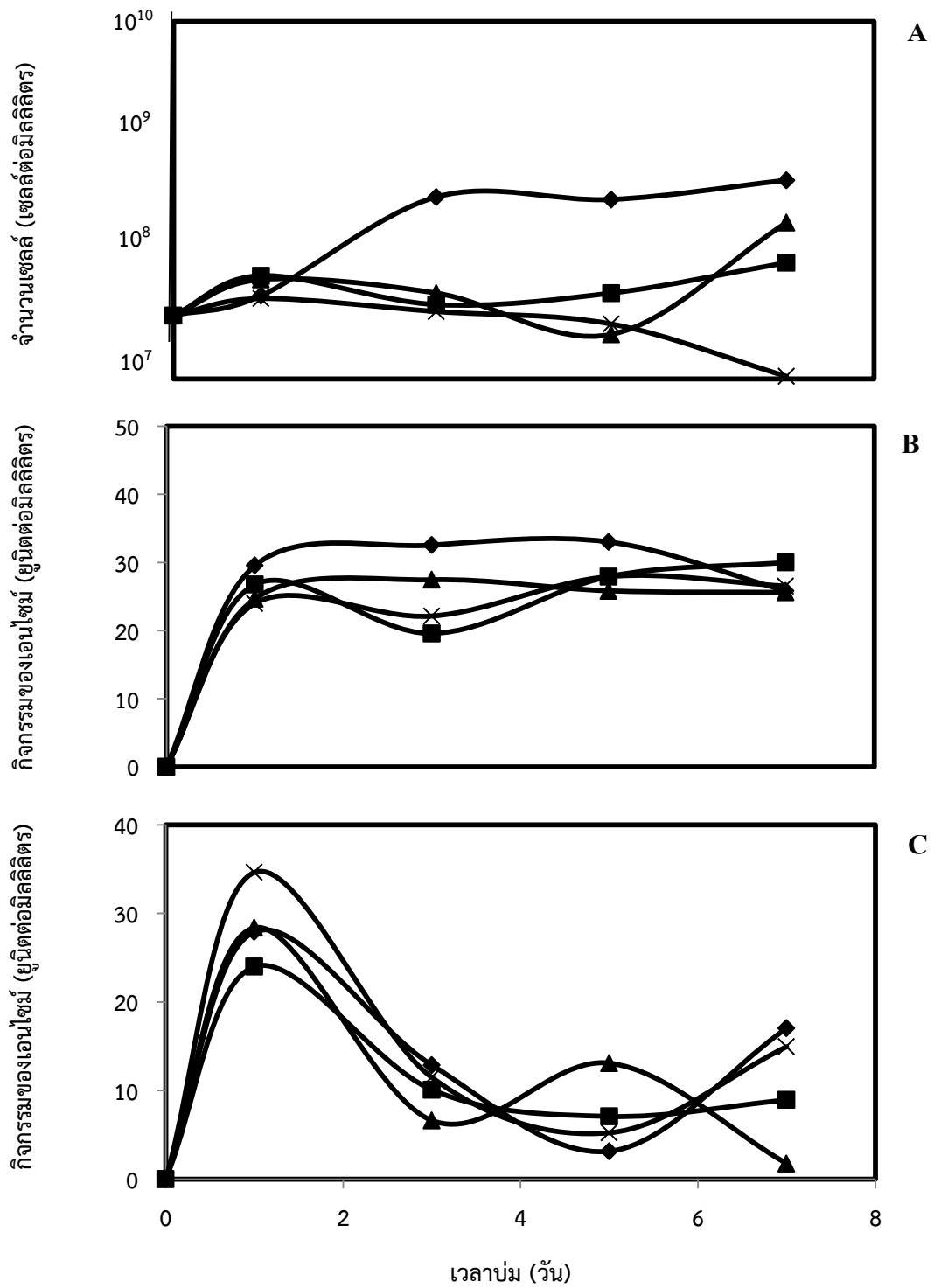
#### 5.4.1.2 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส



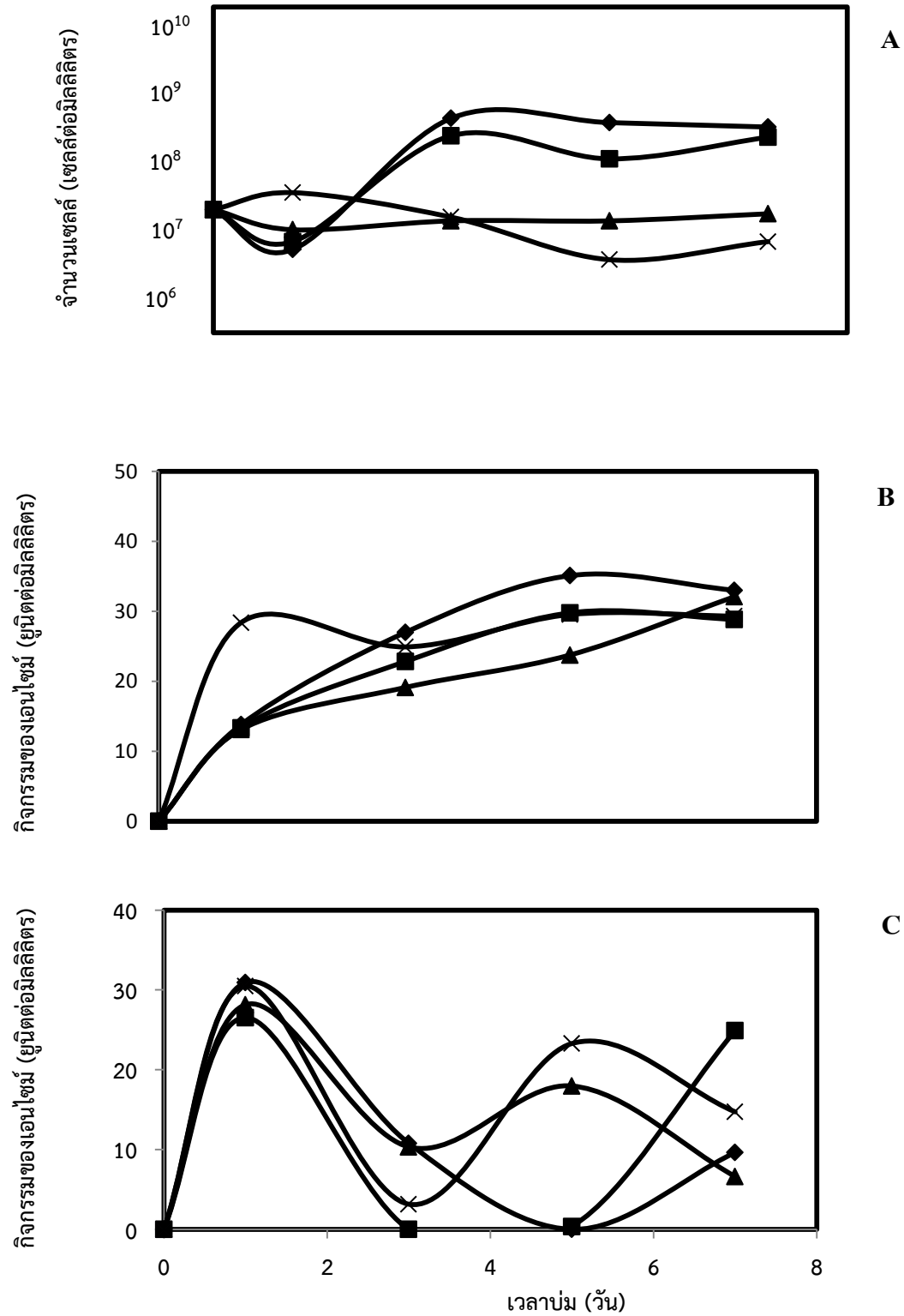




รูปที่ 5.11 ผลของพีเอช 4.0 (◆), 5.0 (■), 6.0 (▲) และ 7.0 (×) ต่อการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสของ *Candida orthopsilosis* 214-1: การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).

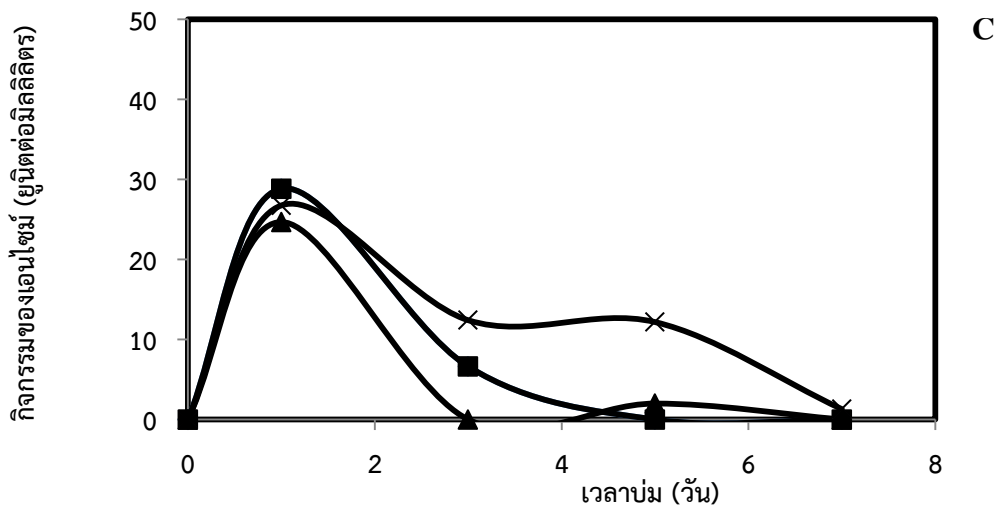
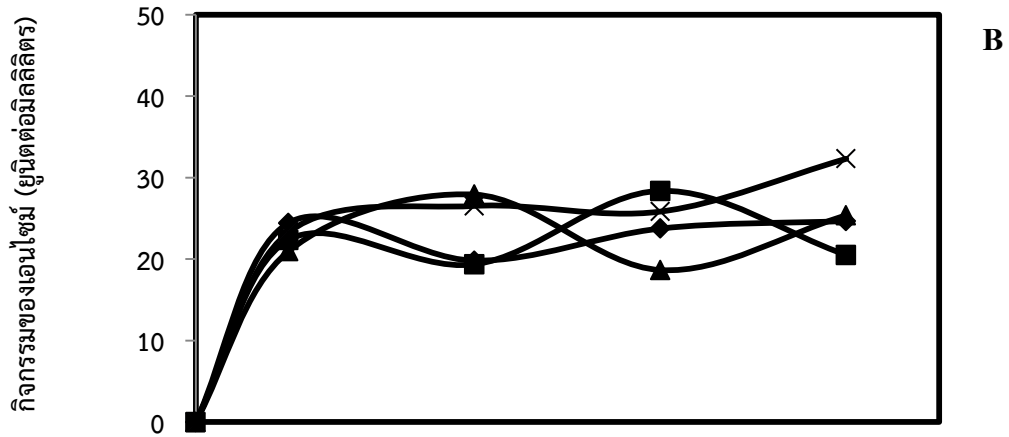


รูปที่ 5.12 ผลของพีเอช 4.0 (◆), 5.0 (■), 6.0 (▲) และ 7.0 (✕) ต่อการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสของ *Torulaspora* sp. PM 34 (New sp.): การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme เอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).



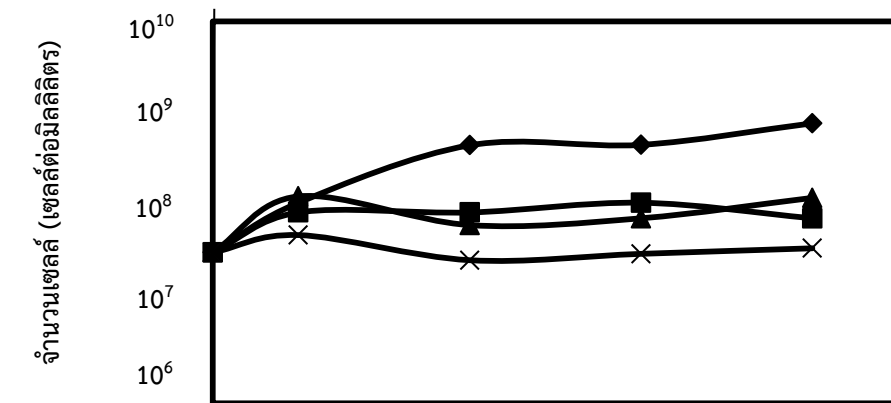
ผลของพีเอช 4.0 (◆), 5.0 (■), 6.0 (▲) และ 7.0 (×) ต่อการผลิตเอนไซม์  
เซลล์ของ *Candida* sp. PM 47 (New sp.): การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular  
enzyme เอนไซม์เซลล์ (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลล์ (C).



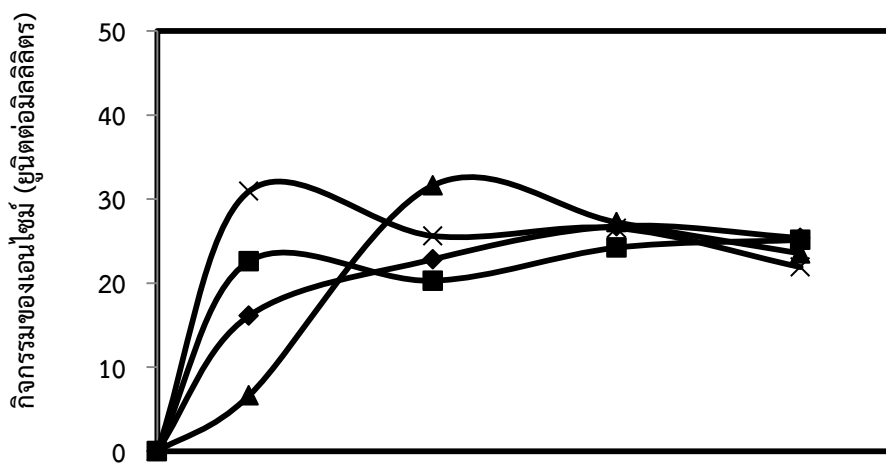
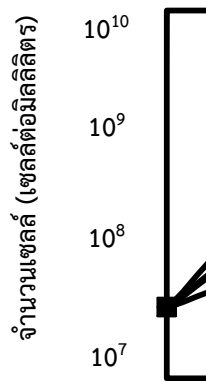


●), 5.0 (■), 6.0 (▲) และ 7.0 (×) ต่อการผลิตเอนไซม์  
 เซลลูเลสของ *Kluyveromyces africanus* S2-1-2: การเจริญ(A), กิจกรรม Extracellular  
 enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส(B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).

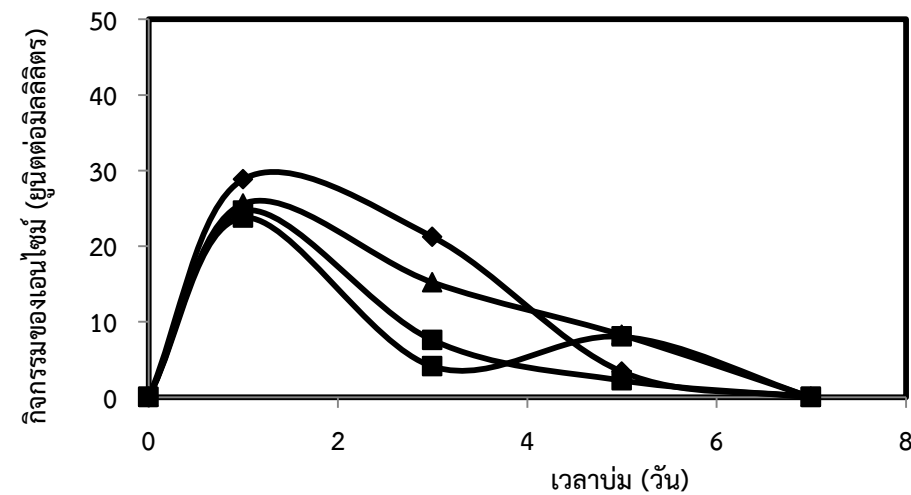
รูปที่  
 5.14  
 ผล  
 ของ  
 พีเอช  
 4.0 (



A



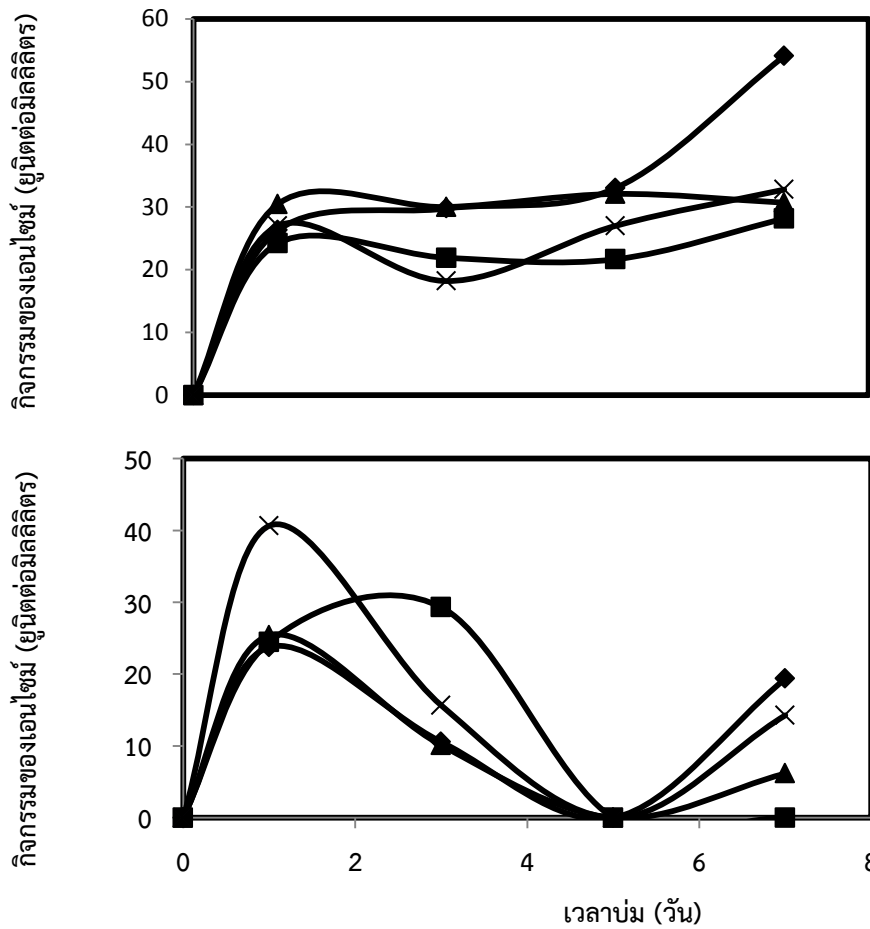
B



C

รูปที่  
5.15  
ผล

ของพีเอช 4.0 (◆), 5.0 (■), 6.0 (▲) และ 7.0 (×) ต่อการผลิตเอนไซม์  
เซลล์ของ *Candida tropicalis* S1-1: การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme  
ของเอนไซม์เซลล์ (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลล์ (C).

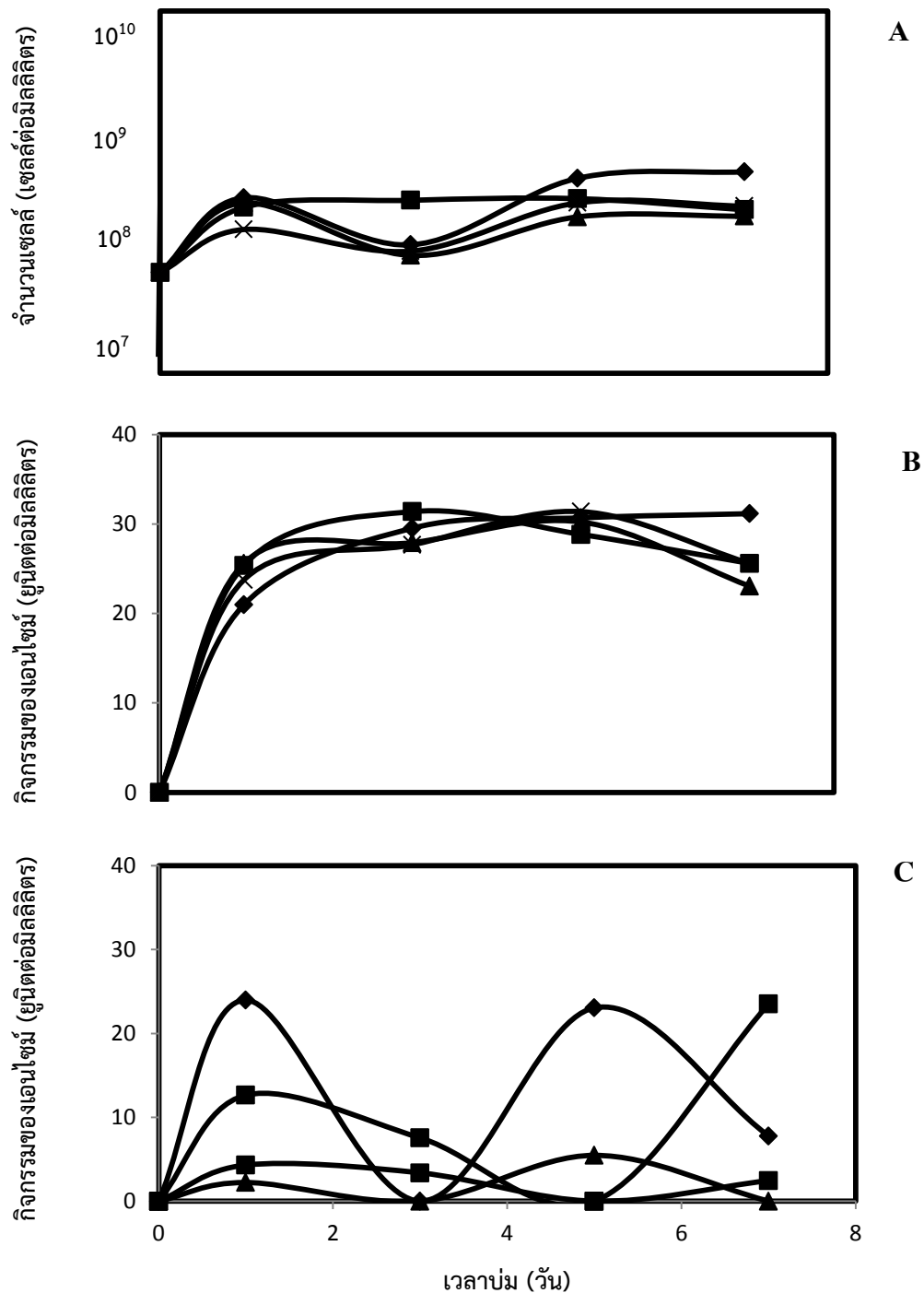


B

C

รูป  
ที่  
5.1

6 ผลของพีเอช 4.0 (◆), 5.0 (■), 6.0 (▲) และ 7.0 (×) ต่อการ  
ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Candida* sp F5-1.: การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular  
enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).



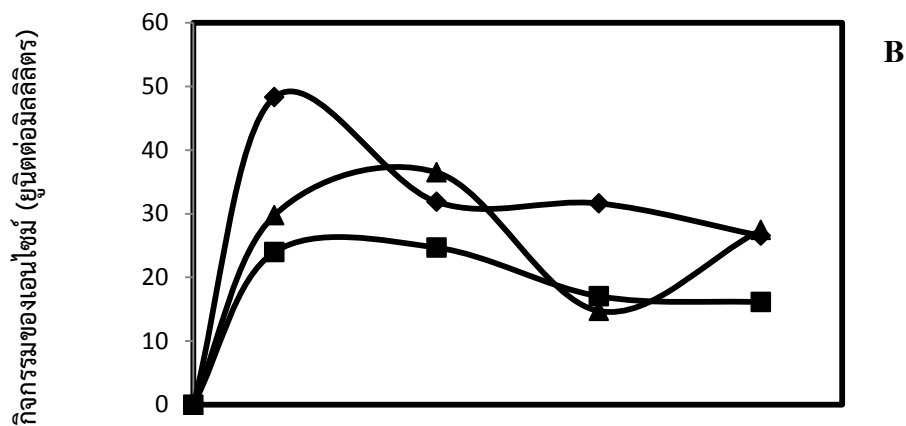
รูปที่ 5.17 ผลของพีเอช 4.0 (◆), 5.0 (■), 6.0 (▲) และ 7.0 (×) ต่อการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสของ *Candida* sp FW10 (New sp.) : การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).

ผลของ pH ต่อการเจริญของ *Pichia fabianii* 204-1 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี pH 4.0 และเจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิตร และอาหารที่มี pH 5.0, 7.0 และ 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ (รูปที่ 5.10A) สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 6.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 5 คือเท่ากับ 31.16 U/ml และอาหารที่มี pH 4.0,

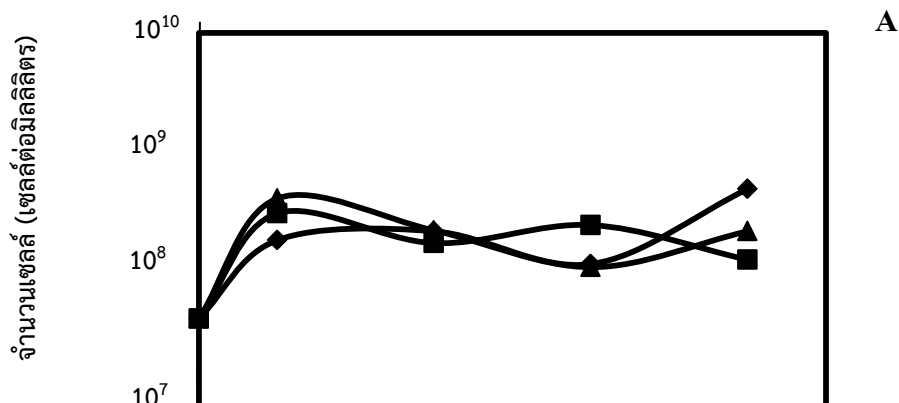


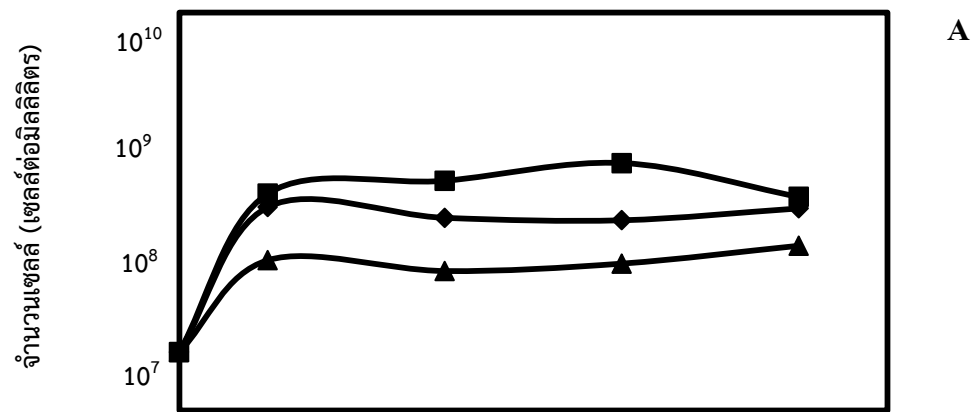
วันที่ 7 คือเท่ากับ 54.07 U/ml และอาหารที่มี pH 6.0, 7.0 และ 5.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ และสามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 7.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 1 คือเท่ากับ 40.65 U/ml และอาหารที่มี pH 5.0, 5.0 และ 4.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ รูปที่ 5.16

*Candida* sp. FW10 (New sp.) เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี pH 4.0 และเจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร และอาหารที่มี pH 6.0, 5.0 และ 7.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ ผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 5.0 และ 7.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 3 กับ 5 คือเท่ากับ 31.39 U/ml และอาหารที่มี pH 4.0 และ 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ และผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 4.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 1 คือเท่ากับ 23.96 U/ml และอาหารที่มี pH 7.0, 6.0 และ 5.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ รูปที่ 5.17

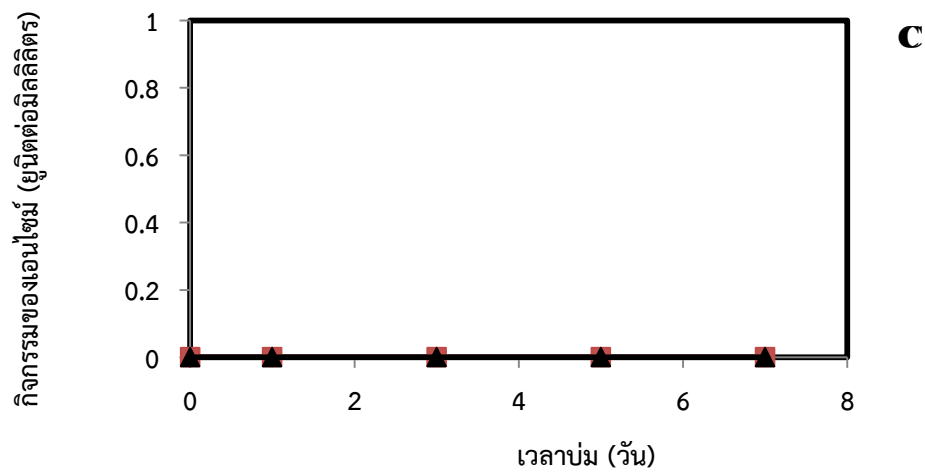


#### 5.4.1.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงยีสต์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส



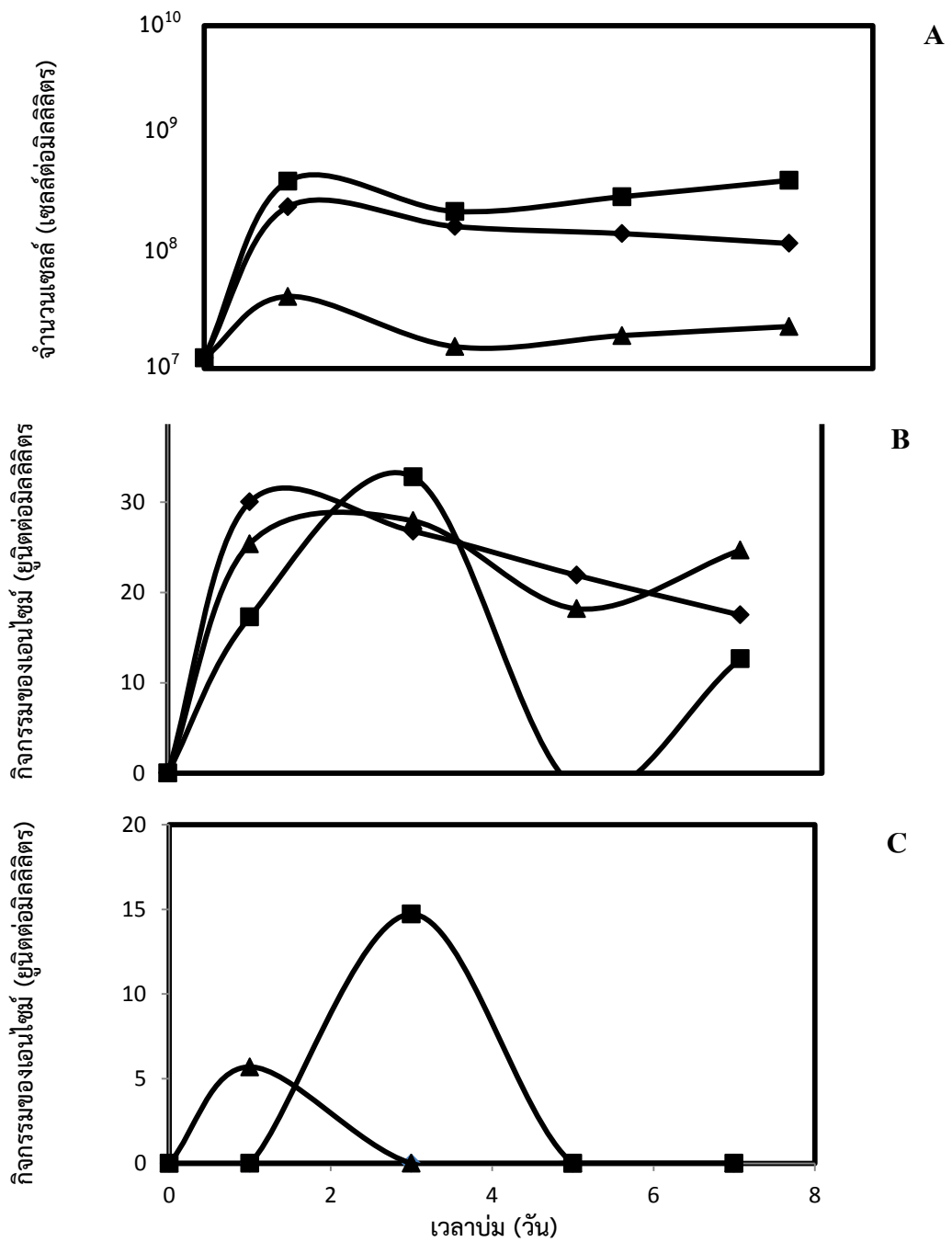


รูปที่ 5.18 ผลของอุณหภูมิ 25°C (◆), 30°C (■) และ 35°C (▲) ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Pichia fabianii* 204-1: การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).



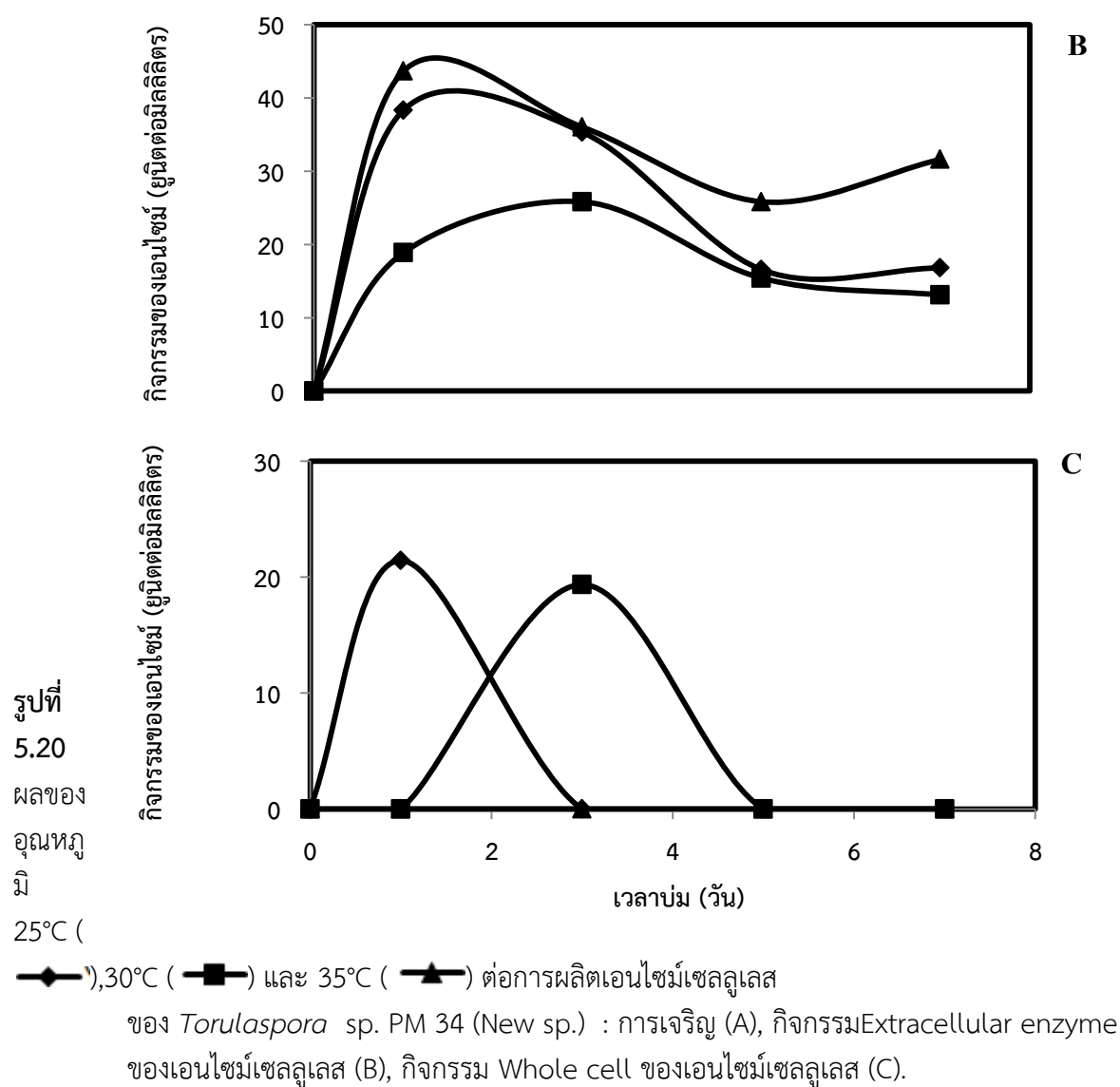
รูปที่  
5.19

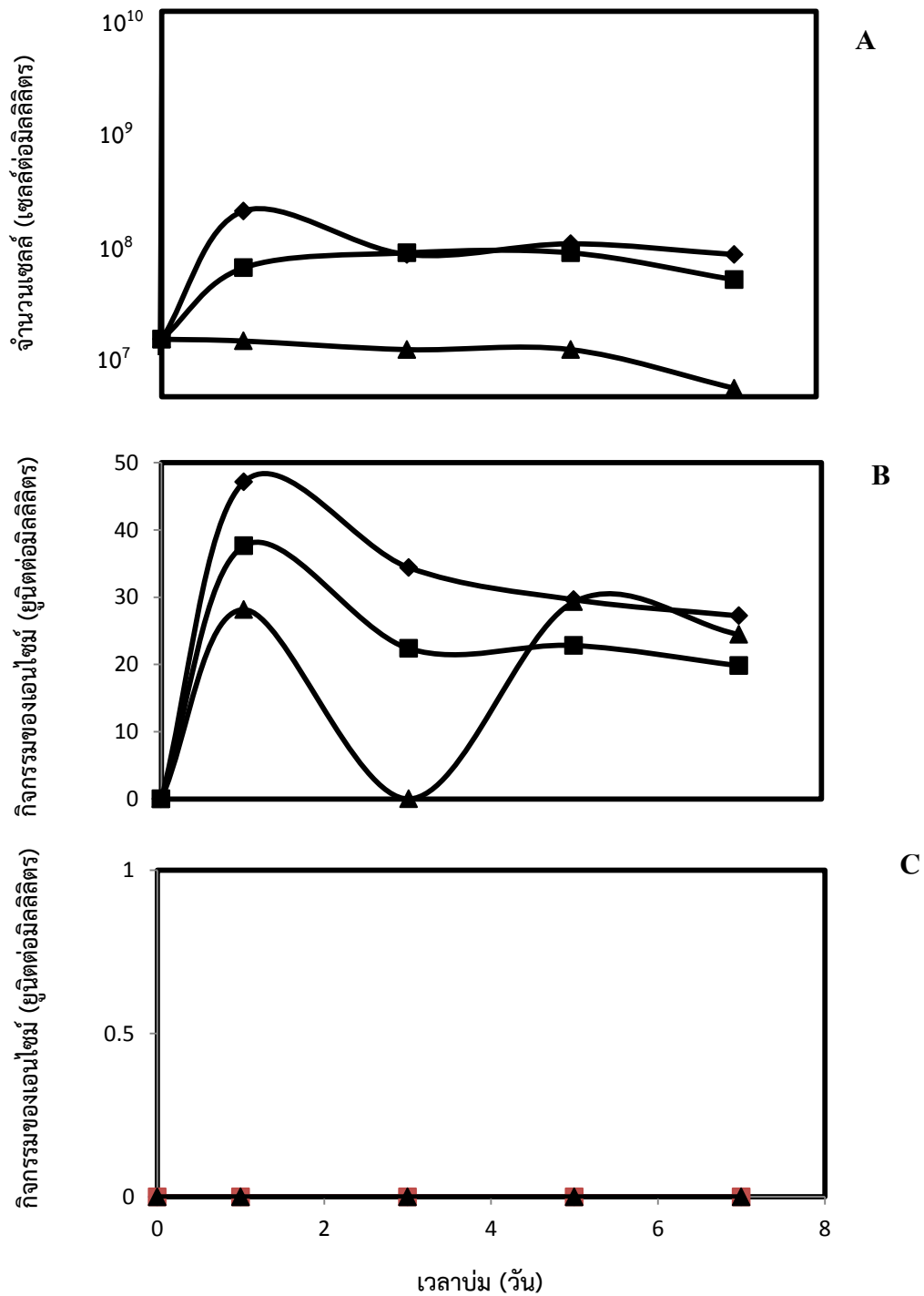
ผล  
ของ  
อุณหภูมิ  
25°C  
(  
), 30°  
C (  
)  
และ  
35°C  
(  
) ต่อ  
การ  
ผลิต  
เอนไ  
ซม์  
เซลลู  
เลส



ของ *Candida orthopsilosis* 214-1: การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของ  
เอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C)

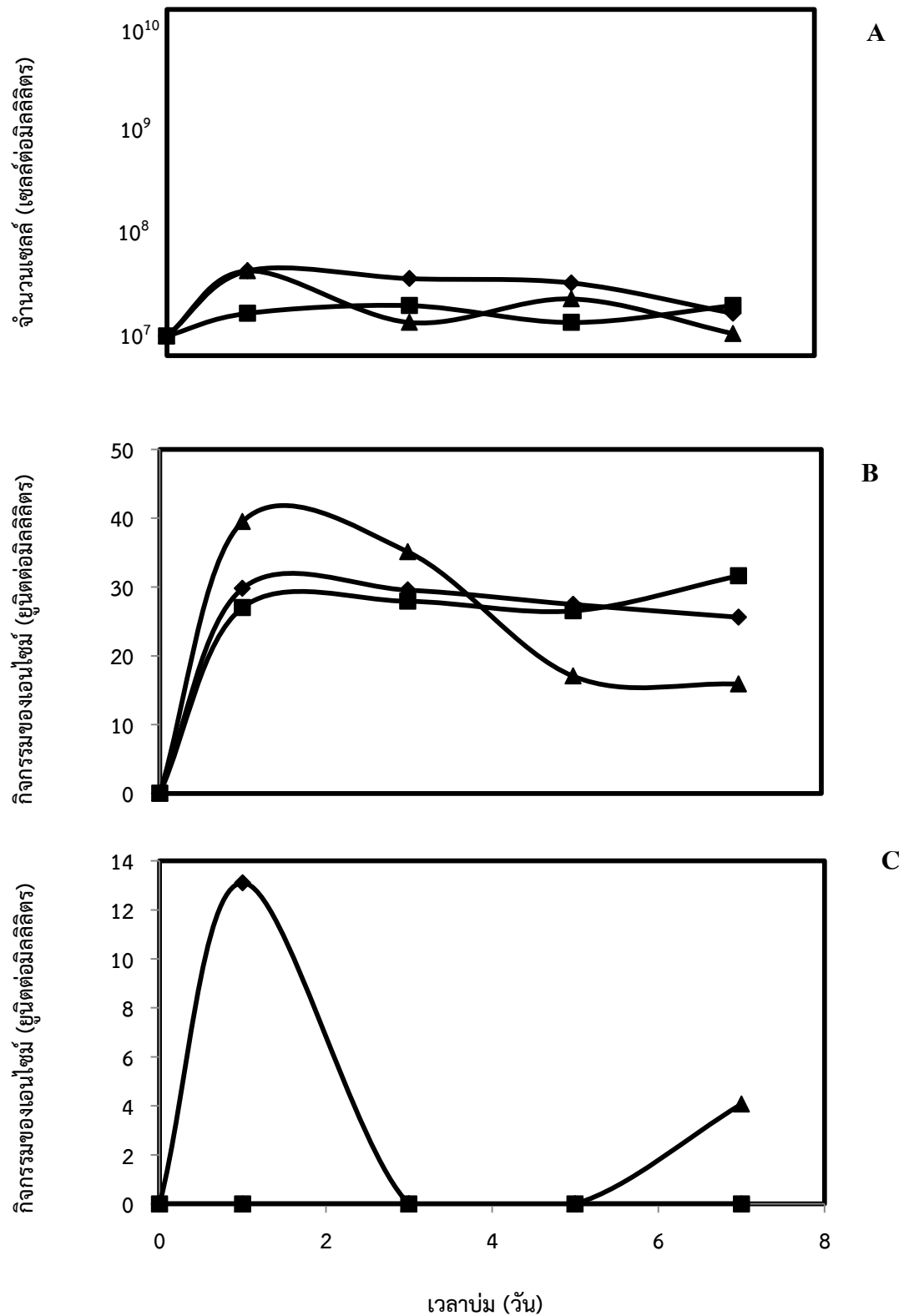




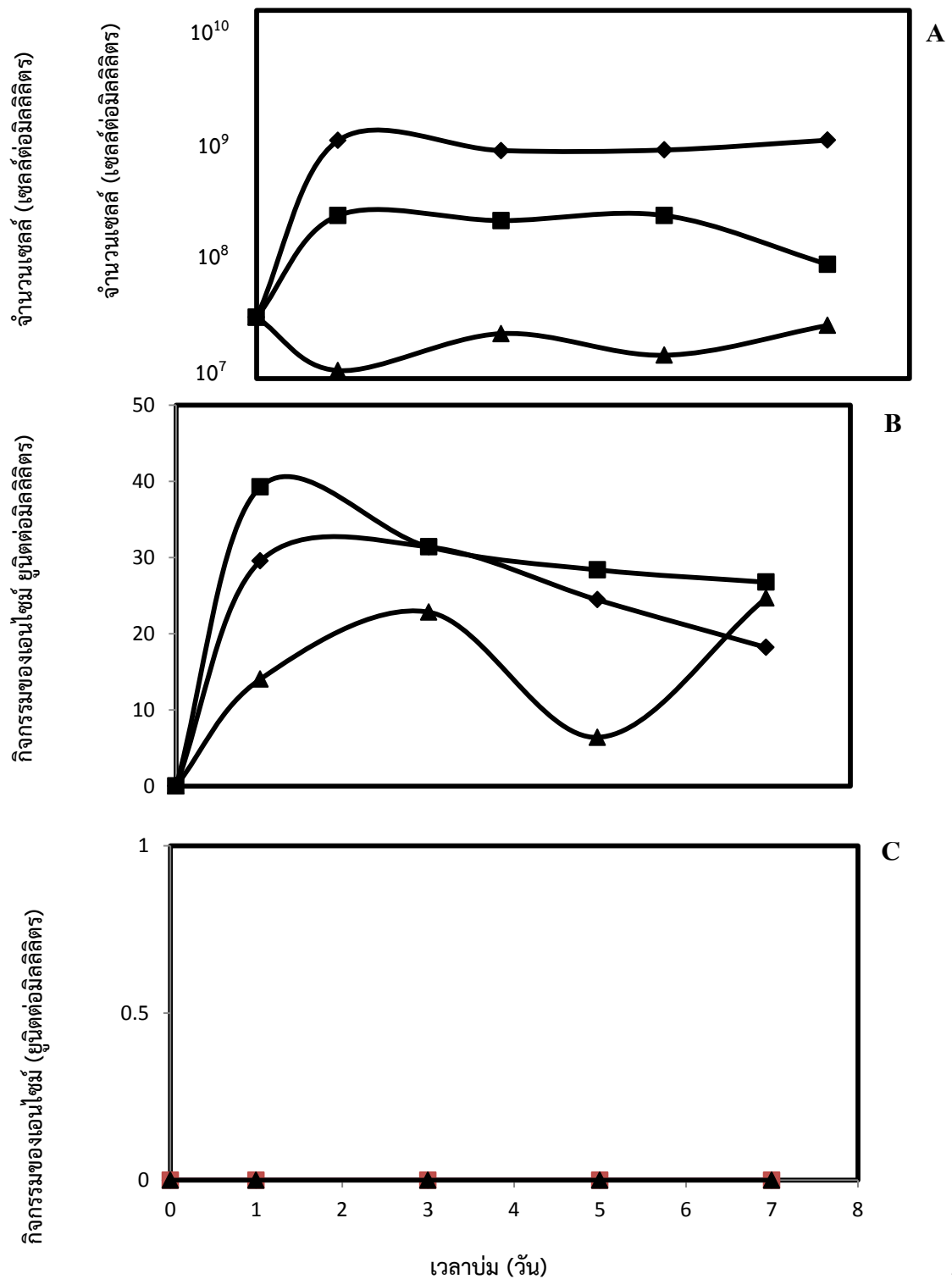


รูปที่  
5.21

ผลของอุณหภูมิ 25°C (◆), 30°C (■) และ 35°C (▲) ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Candida* sp. PM 47 (New sp.): การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).



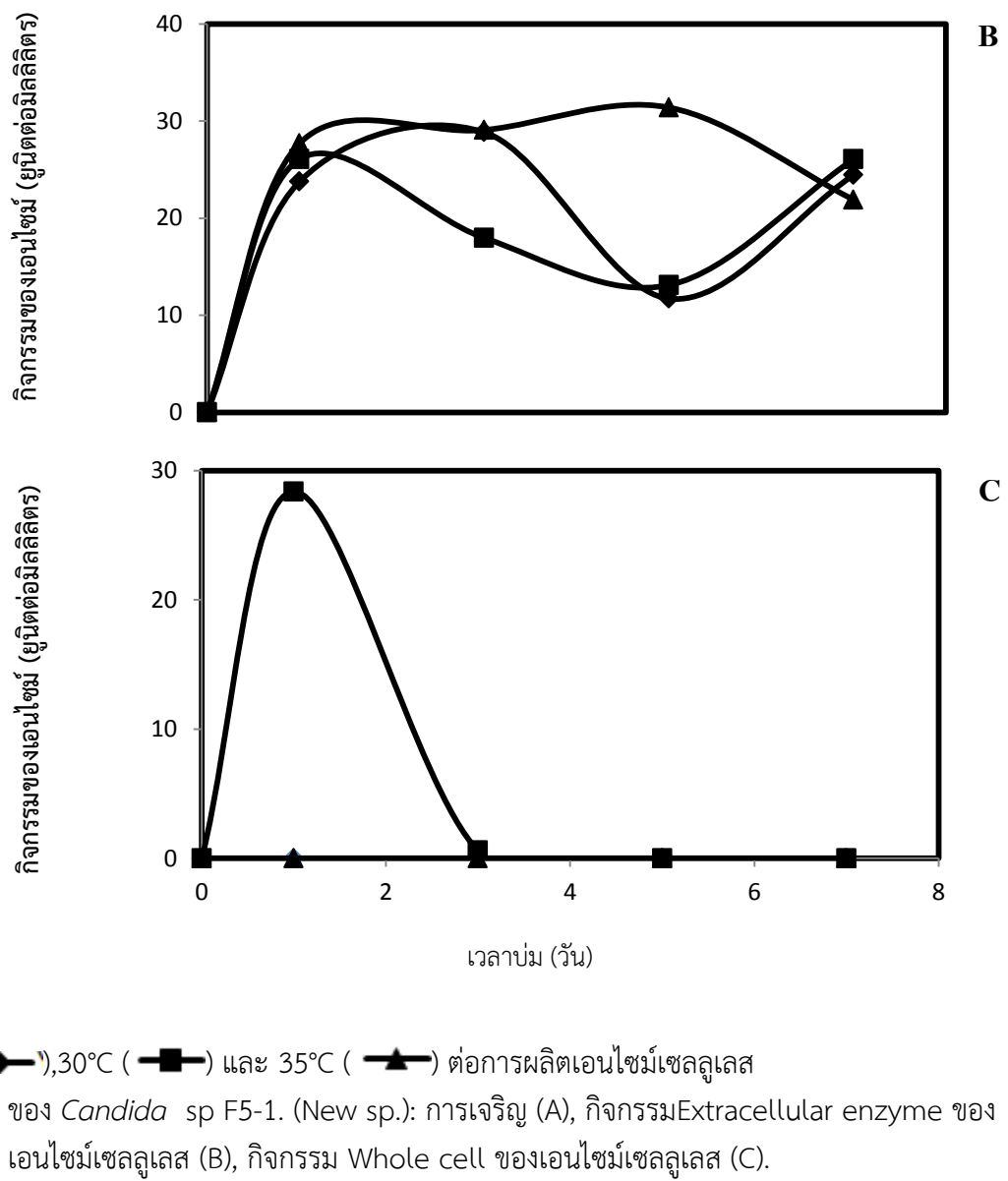
รูปที่ 5.22 ผลของอุณหภูมิ 25°C (◆), 30°C (■) และ 35°C (▲) ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Kluyveromyces africanus* S2-1-2 : การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).

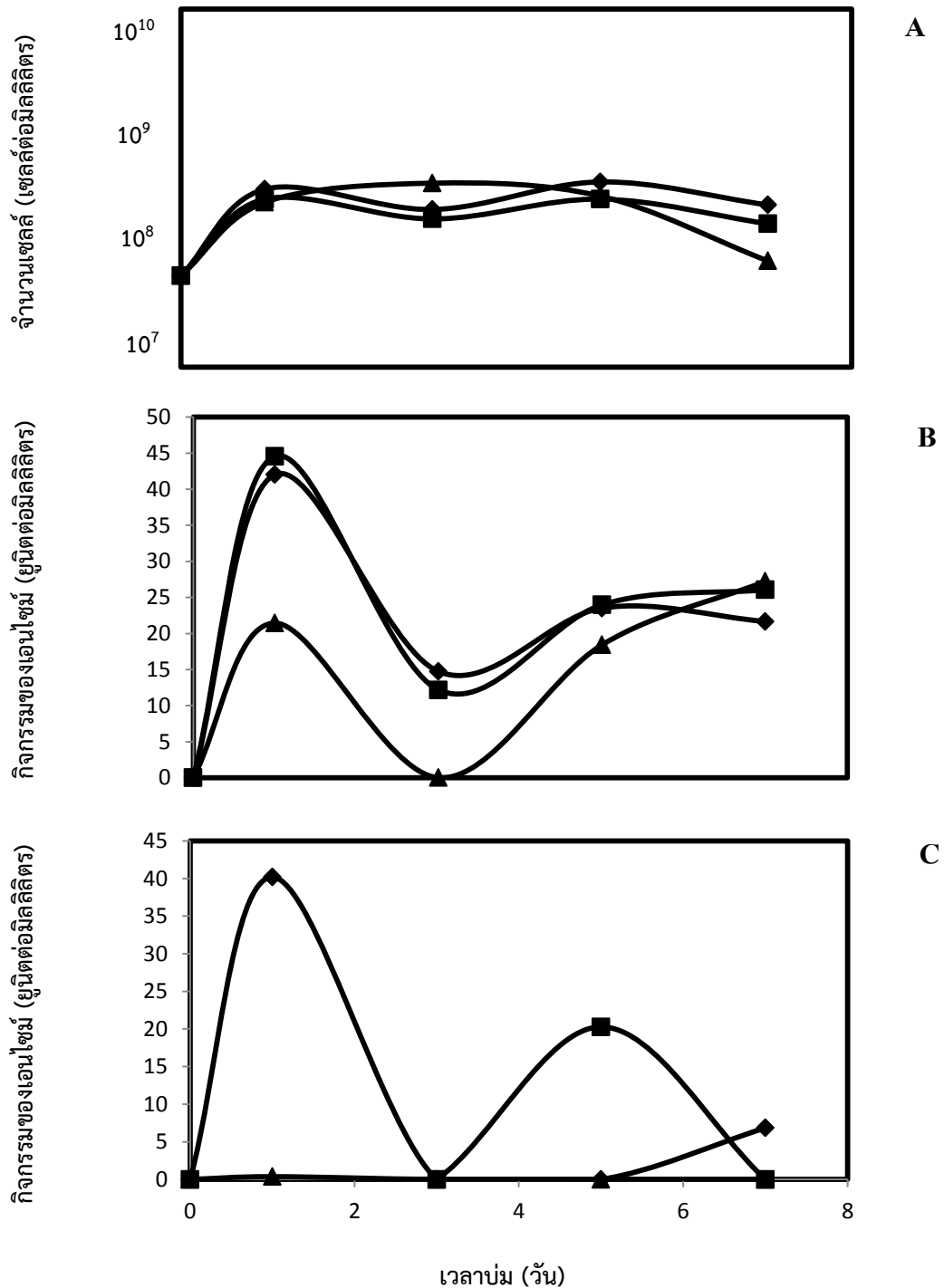


5.23 ผลของอุณหภูมิ 25°C (—◆—), 30°C (—■—) และ 35°C (—▲—) ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Candida tropicalis* S1-1: การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลลูเลส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลลูเลส (C).

รูปที่

รูปที่  
5.24  
ผล  
ของ  
อุณหภูมิ





รูปที่ 5.25 ผลของอุณหภูมิ 25°C (◆), 30°C (■) และ 35°C (▲) ต่อการผลิตเอนไซม์เซลล์ของ *Candida* sp. FW10 (New sp.) : การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เซลล์ (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เซลล์ (C).

*Pichia fabianii* 204-1 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีอุณหภูมิ 25 °C และเจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือประมาณ 10<sup>8</sup> เซลล์ต่อมิลลิเมตร และอาหารที่มี อุณหภูมิ 35 °C และ 30 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม

*Candida* sp F5-1. (New sp.) เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีอุณหภูมิ 25 °C และเจริญสูงสุดในวันที่ 1 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี อุณหภูมิ 30 °C และ 35°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม ตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี

อุณหภูมิ 35 °C และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 5 คือเท่ากับ 31.39 U/ml อุณหภูมิ 25 °C และ 30 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมตามลำดับ และสามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี อุณหภูมิ 30 °C และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 1 คือเท่ากับ 13.10 U/ml อุณหภูมิ 35 °C และ 25 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมตามลำดับ รูปที่ 5.24

*Candida* sp. FW10 (New sp.) เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีอุณหภูมิ 25 °C และเจริญสูงสุดในวันที่ 3 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี อุณหภูมิ 35 °C และ 30°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี อุณหภูมิ 30 °C และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 1 คือเท่ากับ 44.58 U/ml อุณหภูมิ 25 °C และ 35 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมตามลำดับ และผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี อุณหภูมิ 25 °C และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 1 คือเท่ากับ 40.19 U/ml อุณหภูมิ 30 °C และ 35 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมตามลำดับ รูปที่ 5.25

## 5.5 การสร้างเอนไซม์ปัสต้ากลูโคซิเดส

ตารางที่ 5.3 ยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ปัสต้ากลูโคซิเดส

| ไอโซเลต | Visualize zone<br>(มิลลิลิตร) | สถานที่เก็บตัวอย่าง      |
|---------|-------------------------------|--------------------------|
| C2-4    | 9                             | เหมือดแอ่เขื่อนอุบลรัตน์ |
| F12-6   | 6                             | จัวป่าเขื่อนอุบลรัตน์    |
| F1-5    | 15*                           | สาบเสือเขื่อนอุบลรัตน์   |
| 101-1   | 9                             | น้อยหน้าเขื่อนอุบลรัตน์  |
| S1-1    | 16**                          | ดินเขื่อนอุบลรัตน์       |
| F14-2   | 19****                        | ดอกไม้เขื่อนอุบลรัตน์    |



5.6 การจัด  
ประเภท  
เอนไซม์  
โดย  
นิวคลีโอ  
ไทด์

ตาราง  
จัดจำแนก  
เอนไซม์  
โดย  
นิวคลีโอไทด์

|            |       |                           |
|------------|-------|---------------------------|
| F5-1       | 16**  | ดอกไม้เชื่อมอุบลรัตน์     |
| F5-2       | 9     | ดอกไม้เชื่อมอุบลรัตน์     |
| 104-1      | 4     | สรเชื่อมอุบลรัตน์         |
| 106-1      | 9     | ชาเชื่อมอุบลรัตน์         |
| 103-1      | 3     | ข้าขาวเชื่อมอุบลรัตน์     |
| 111-2      | 4     | ลูกตานกกรดเชื่อมอุบลรัตน์ |
| 107-1      | 13    | ลูกฮัมบัวเชื่อมอุบลรัตน์  |
| 108-1      | 7     | ตัวหม่อน เชื่อมอุบลรัตน์  |
| 201-2      | 11    | เชื่อมอุบลรัตน์           |
| 202-3      | 15*   | กะบกเชื่อมอุบลรัตน์       |
| 203-1      | 18*** | ต้างไก่เชื่อมอุบลรัตน์    |
| 206-2      | 15*   | รอกเชื่อมอุบลรัตน์        |
| S12-2      | 10    | ดินเชื่อมอุบลรัตน์        |
| S22-1      | 13    | ดินเชื่อมอุบลรัตน์        |
| 216-1      | 13    | หญ้าหักเชื่อมอุบลรัตน์    |
| 215-2      | 9     | ต้นตังเชื่อมอุบลรัตน์     |
| 215-3      | 9     | ต้นตังเชื่อมอุบลรัตน์     |
| ใบไม้214-1 | 18*** | เชื่อมอุบลรัตน์           |
| CHD-S3-1-2 | 1.9   | เชื่อมจุฬารณ์             |
| CHD-S2-1-2 | 2.0   | เชื่อมจุฬารณ์             |
| CHD-FR5-1  | 1.4   | เชื่อมจุฬารณ์             |
| CHD-L3     | 1.7   | เชื่อมจุฬารณ์             |
| CHD-S3-9   | 1.5   | เชื่อมจุฬารณ์             |
| CHD-S1-6   | 0.6   | เชื่อมจุฬารณ์             |
| CHD-S4-2-1 | 0.7   | เชื่อมจุฬารณ์             |
| CHD-FW1    | 1.1   | เชื่อมจุฬารณ์             |
| PM47       | 2     | มะกอกเกลือ ป่าภูตากา      |
| PM05       | 6     | ดอกยางเชื่อมจุฬารณ์       |
| PM34       | 7     | ดินแปลงที่3 เชื่อมจุฬารณ์ |

จำแนก  
ยีสต์ที่สร้าง  
ปีศาจโคสิ  
เทียบลำดับ  
ไทด์บริเวณ

ที่ 5.4 การ  
ยีสต์ที่สร้าง  
ปีศาจโคสิ  
เทียบลำดับ  
บริเวณ

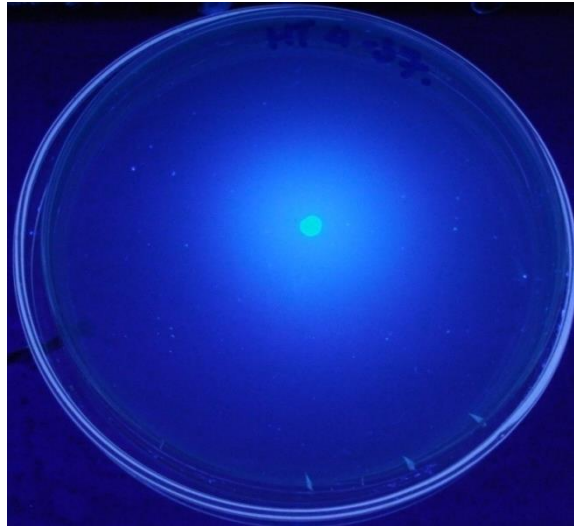
| Strain  | Closest species<br>(Accession number)        | nucleotides identity<br>/Total nucleotides | %<br>identity | Sub-<br>stitution | Gap | Remark     |
|---------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------|-------------------|-----|------------|
| HFr2-24 | <i>Candida natalensis</i> CBS 2935T (U45818) | 563/566                                    | 99            | 3                 | 0   | Sister sp. |
| HT4-37  | <i>Wickerhamomyces anomalus</i> CBS 5759T    | 570/573                                    | 99            | 3                 | 0   | Sister sp. |
| PM05    | <i>Candida</i> sp. ST-451 DQ404526           | 539/556                                    | 96            | 14                | 3   | New sp.    |
| PM34    | <i>Torulaspora delbrueckii</i> U72156        | 564/572                                    | 98            | 4                 | 4   | New sp.    |
| PM47    | <i>Candida ponderosae</i> EF550345           | 539/592                                    | 91            | 36                | 17  | New sp.    |
| S11-1   | <i>Debaryomyces polymorphus</i> U45836       | 530/576                                    | 92            | 26                | 20  | New sp.    |
| L3      | <i>Hanseniaspora occidentalis</i> U84225     | 569/569                                    | 100           | 0                 | 0   | Known sp.  |
| HS1-8   | <i>Lindnera subsufficiens</i> U75960         | 573/574                                    | 99            | 1                 | 0   | Known sp.  |

0-1bp = know species  
 2-5 bp= Sister species  
 ≥6bp = New species

### 5.7 การผลิตเอนไซม์ สบนอาหารแข็ง

การทดสอบการสร้าง  
 บนอาหารแข็ง YNB ที่มี  
 methylumbelliferyl-  
 48 ซม. สังเกตการณ์เรือง  
 UV โดย MUG จะถูกย่อย

ได้เป็น 4-methylumbelliferone ซึ่งเป็นสารเรืองแสง จากการส่องภายใต้แสงยูวี พบเชื้อ 3 สายพันธุ์ที่  
 เกิดการเรืองแสง คือ *Wickerhamomyces* sp. HT4-37 (sister sp.), *Candida* sp. HFr2-24 (sister sp.),  
*Candida natalensis* HS1-26



### การผลิตบีต้ากลูโคซิเดส

เอนไซม์ บีต้ากลูโคซิเดส  
 0.004%(w/v) MUG(4-  
 $\beta$ -glucoside) ที่ 24 -  
 แสงเมื่อส่องภายใต้แสง  
 ด้วยเอนไซม์ บีต้ากลูโคซิ

**รูปที่ 5.26** การสร้างเอนไซม์ บีต้ากลูโคซิเดส บนอาหารแข็ง YNB ของเชื้อ *Wickerhamomyces* sp.  
 HT4-37 (sister sp.)

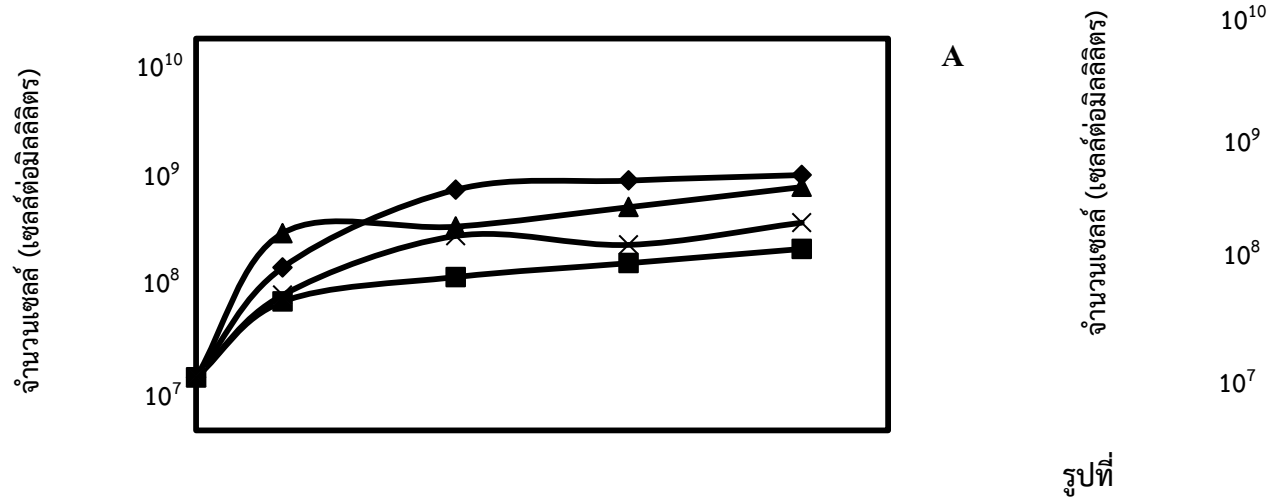
จากการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิต บีต้ากลูโคซิเดส ได้สูงที่สุด 8 ตัวคือ

1. รหัสเชื้อ S11-1, ชื่อเชื้อ *Debaryomyces* sp. (New sp.) แหล่งที่มา ดินเขื่อนอุบลรัตน์
2. รหัสเชื้อ HT4-37, ชื่อเชื้อ *Wickerhamomyces* sp. (sister sp.), แหล่งที่มา เขื่อนห้วยกุ่ม
3. รหัสเชื้อ L3, ชื่อเชื้อ *Hanseniaspora occidentalis*, แหล่งที่มา เขื่อนจุฬาภรณ์
4. รหัสเชื้อ HFr2-24, ชื่อเชื้อ *Candida* sp. (sister sp.), แหล่งที่มา มะหวด เขื่อนห้วยกุ่ม
5. รหัสเชื้อ HS1-8, ชื่อเชื้อ *Lindnera subsufficiens* แหล่งที่มา ดินเขื่อนห้วยกุ่ม
6. รหัสเชื้อ PM05, ชื่อเชื้อ *Candida* sp. (New sp.), แหล่งที่มา ดอกยาง เขื่อนจุฬาภรณ์
7. รหัสเชื้อ PM34, ชื่อเชื้อ *Torulaspora* sp. (New sp.), แหล่งที่มา ดินแปลงที่ 3 เขื่อนจุฬาภรณ์
8. รหัสเชื้อ PM47, ชื่อเชื้อ *Candida* sp. (New sp.), แหล่งที่มา ผลมะกอกเกลื่อนเขื่อนภูตากา

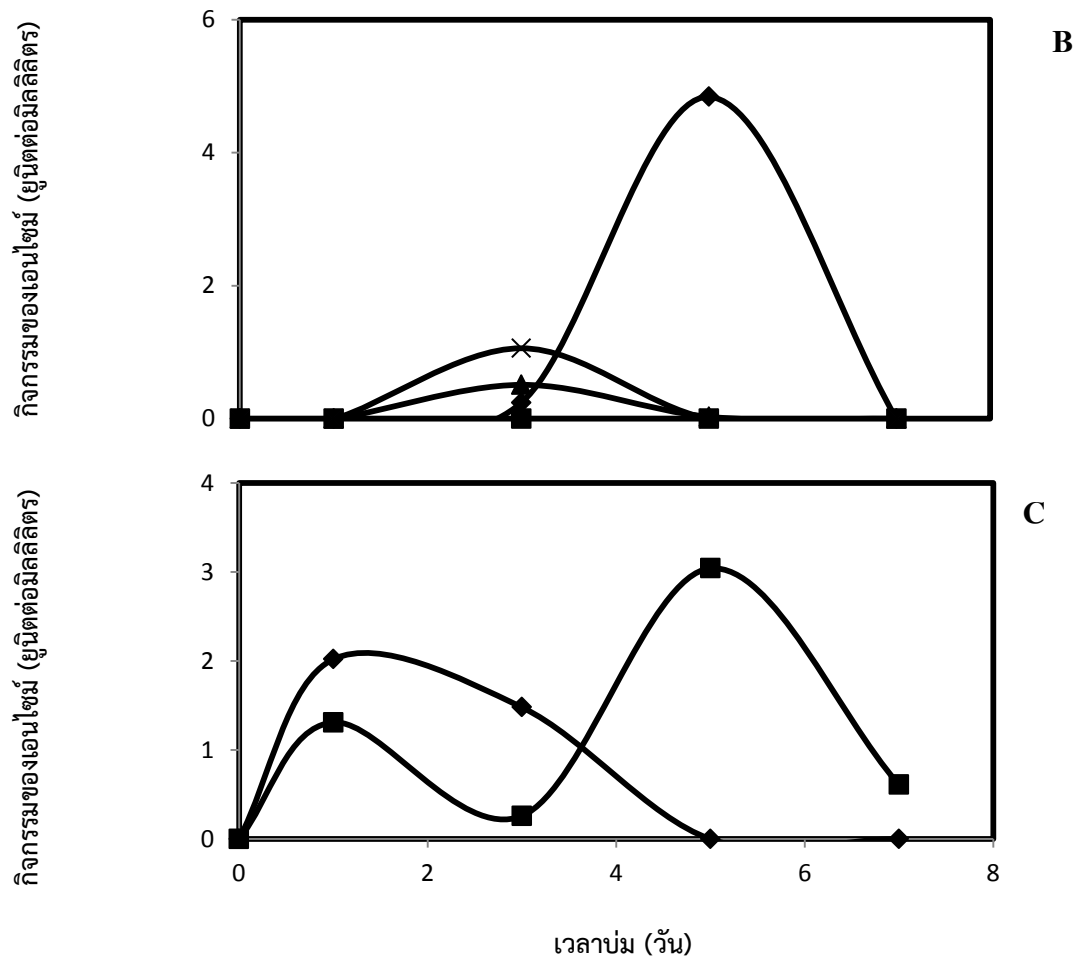
จากนั้นจึงทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสม ทั้ง แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสม และ pH ที่เหมาะสม

#### 5.4.2 คุณสมบัติของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส

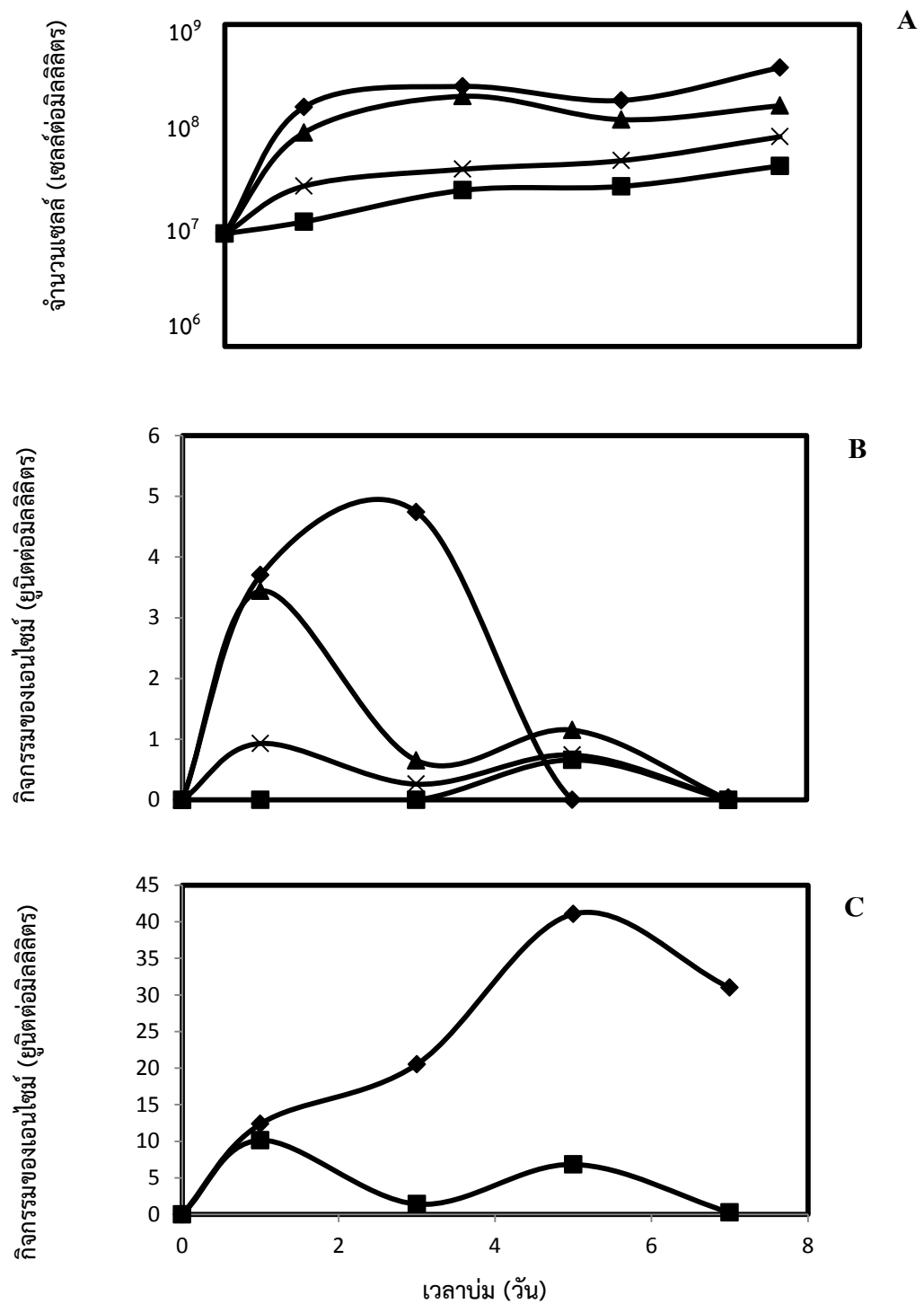
##### 5.4.2.1 แหล่งคาร์บอนเหมาะสมต่อการเลี้ยงยีสต์ที่สร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส



5.27 ผลของแหล่งคาร์บอน YPD (◆), CMC (■), ขานอ้อย(▲) และฟางข้าว (×) ต่อการผลิตเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Debaryomyces* sp. S11-1 (New sp.): การเจริญ (A),

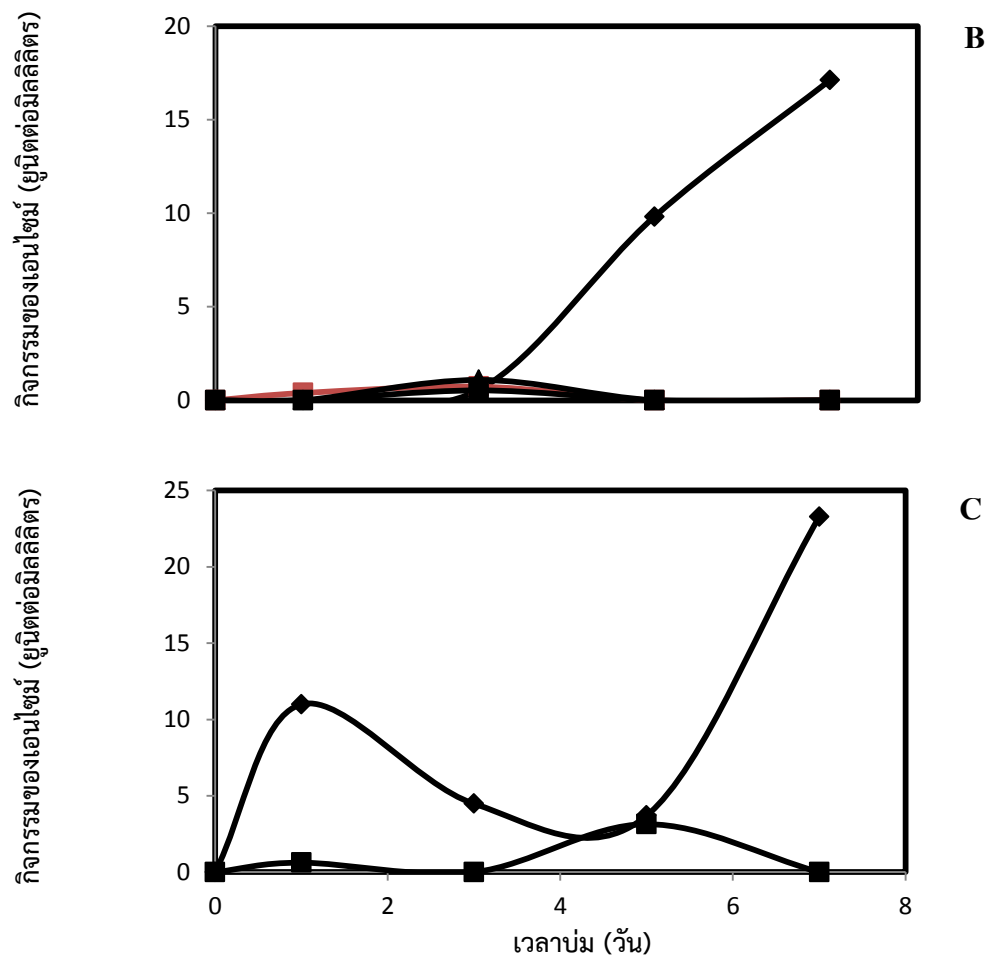


กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส(C).

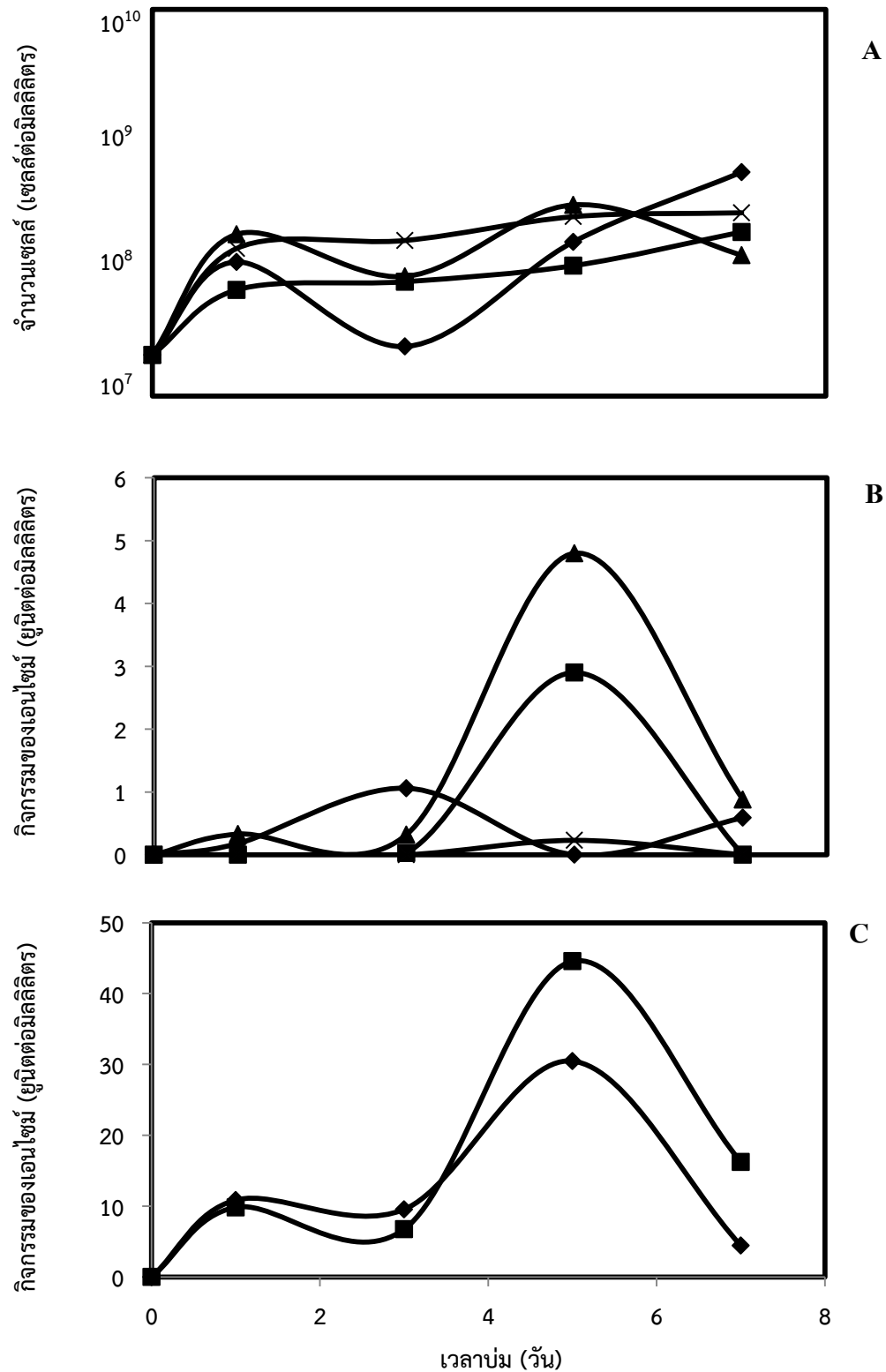


รูปที่  
5.28  
ผล

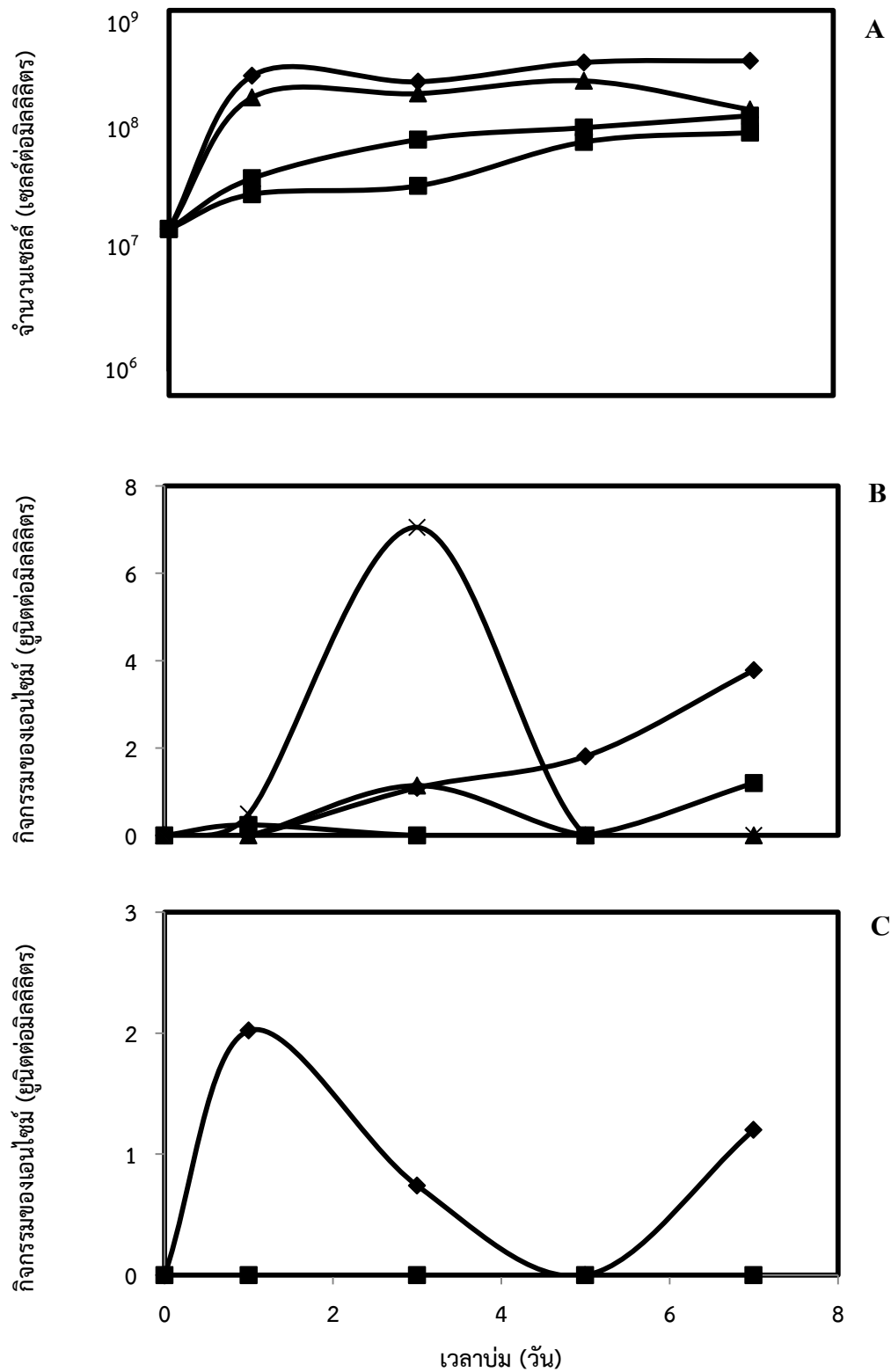
ของแหล่งคาร์บอน YPD (◆), CMC (■), ขานอ้อย (▲) และฟางข้าว (×)  
ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสของ *Wickerhamomyces* sp. HT4-37 (sister sp.):  
การเจริญ(A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม  
Whole cell ของ เอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส(C).



รูปที่ 5.29 ผลของแหล่งคาร์บอน YPD (◆), CMC (■), ขานอ้อย (▲) และฟางข้าว (✕) ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสของ *Hanseniaspora occidentalis* L3: การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส (C).



รูปที่ 5.30 ผลของแหล่งคาร์บอน YPD (◆), CMC (■), ขานอ้อย (▲) และฟางข้าว (×) ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสของ *Candida sp.* HFr2-24 (sister sp.) : การเจริญ(A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม Whole cell ของ เอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส(C).

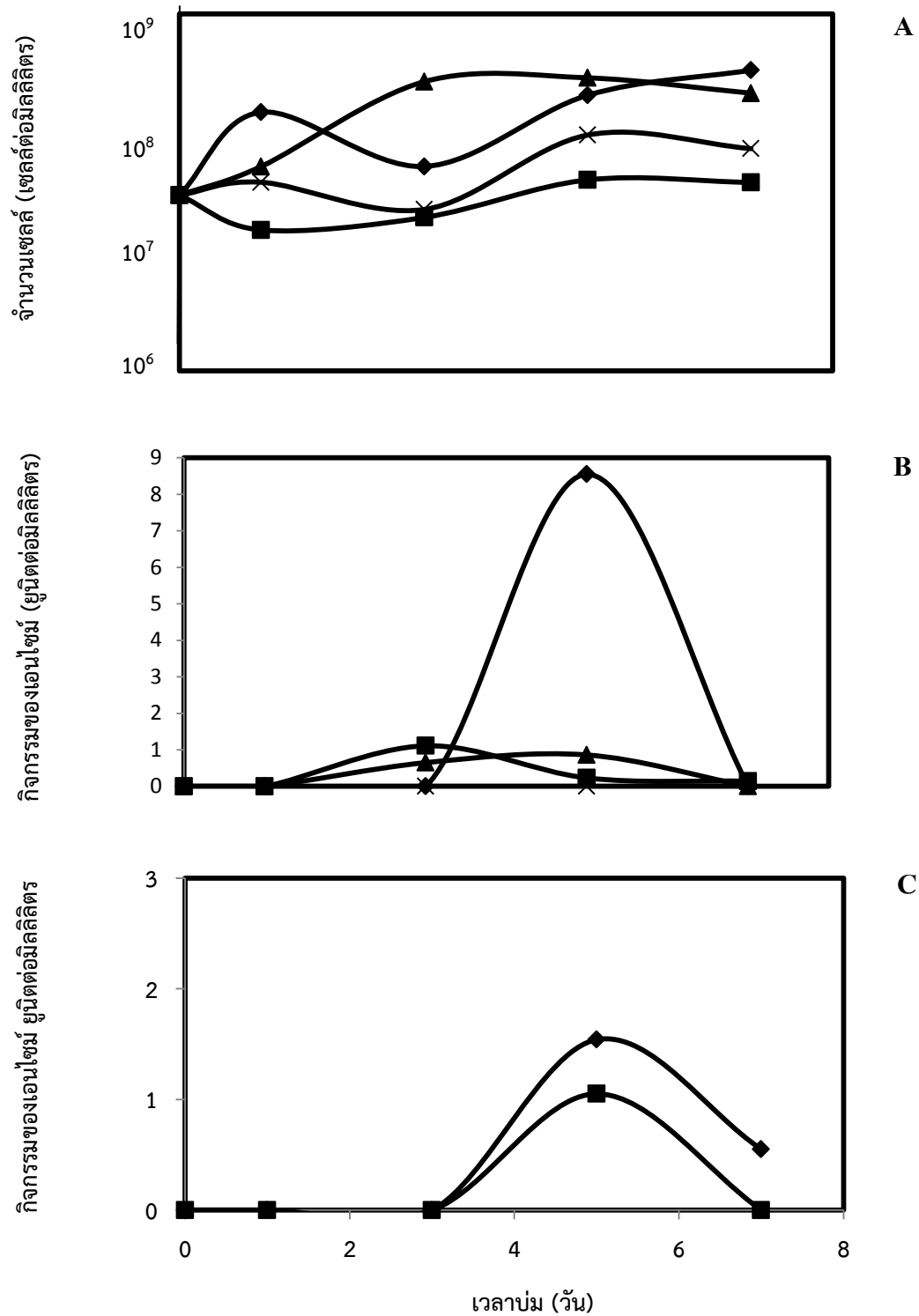


รูปที่  
5.31  
ผลของ

แหล่งคาร์บอน YPD (◆), CMC (■), ชานอ้อย (▲) และฟางข้าว

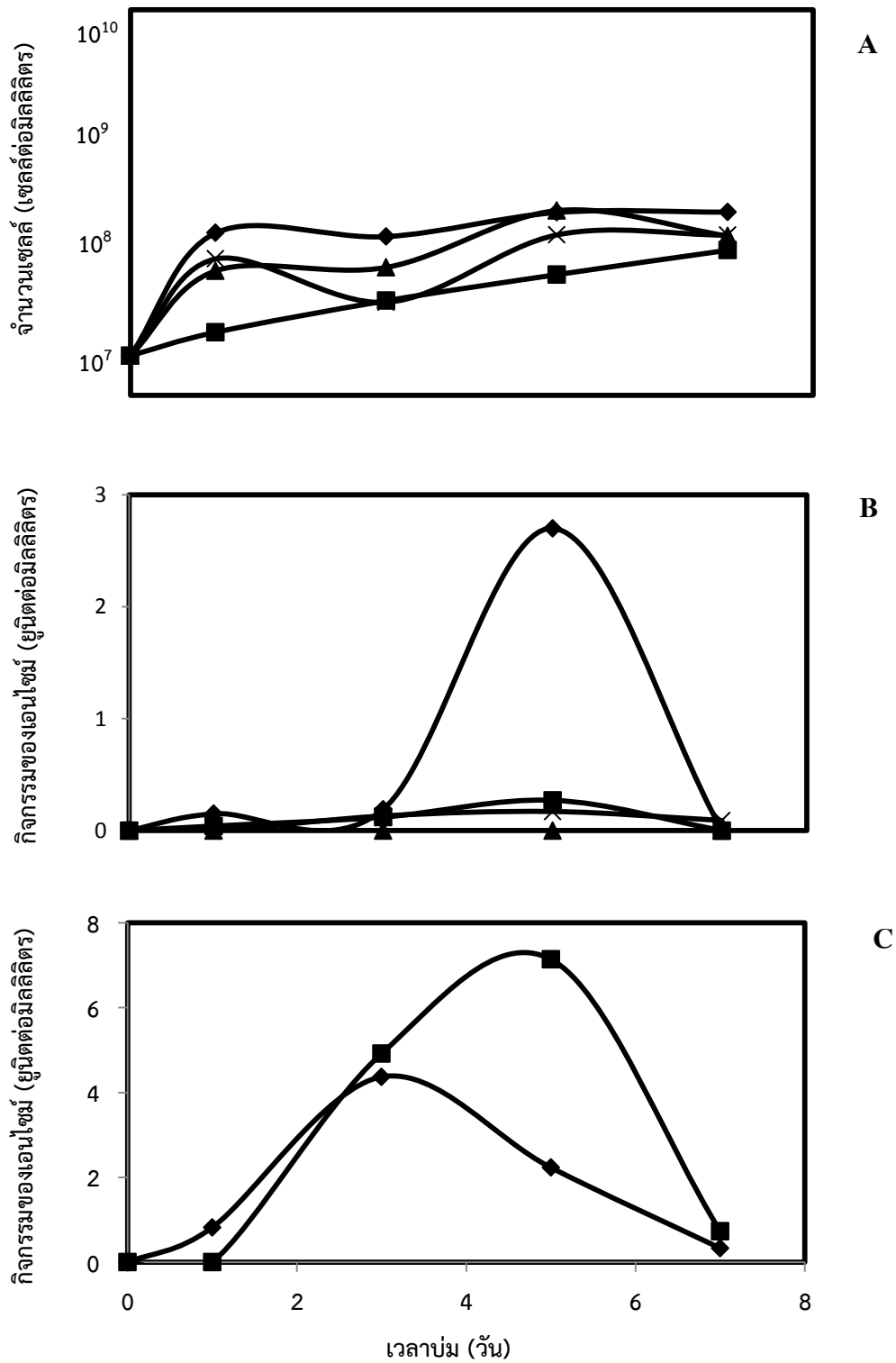
(×) ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสของ *Lindnera subsufficiens* HS1-8: การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส(C).





รูปที่

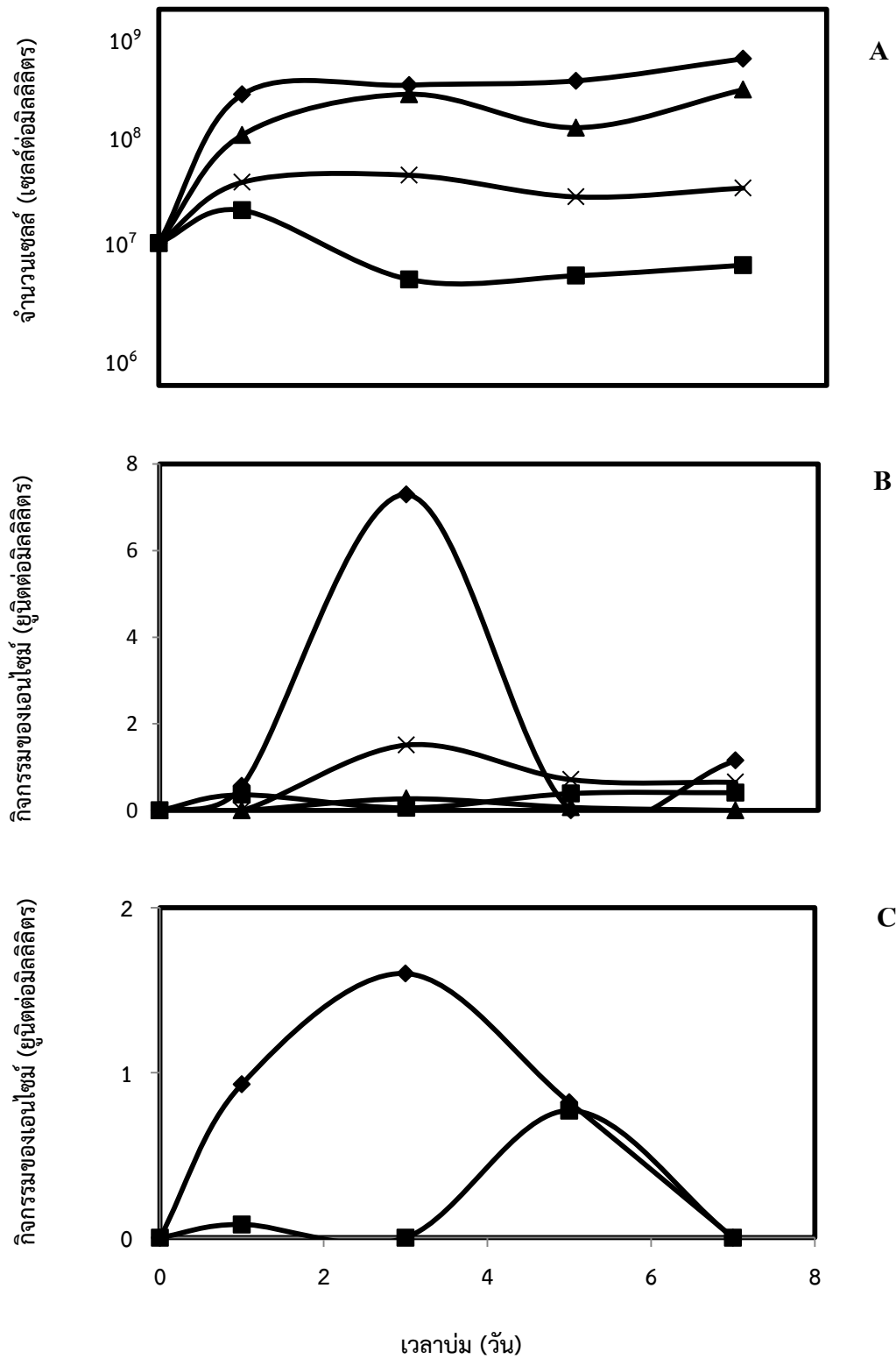
5.32 ผลของแหล่งคาร์บอน YPD (◆), CMC (■), ชานอ้อย (▲) และฟางข้าว (×) ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสของ *Candida* sp. PM05 (New sp.): การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส(C).



รูปที่

### 5.33 ผลของแหล่งคาร์บอน YPD (◆), CMC (■), ขานอ้อย(▲) และฟางข้าว

(—×—) ต่อการผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสของ *Torulaspora* sp. PM34 (New sp.): การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส(C).



รูปที่ 5.34 ผลของแหล่งคาร์บอน YPD (◆), CMC (■), ขาน้อย (▲) และฟางข้าว (×) ต่อการผลิตเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Candida* sp. PM47 (New sp.): การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส(C).

จำนวนเซลล์การเจริญของ *Debaryomyces* sp. S11-1 (New sp.) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน จากรูปที่ 5.27 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Debaryomyces* sp. S11-1 (New sp.) เจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี ชานอ้อย, ฟาง ข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 5 คือเท่ากับ 4.48 U/ml และมี ฟางข้าว, ชานอ้อยและ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ และผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 5 คือเท่ากับ 3.04 U/ml กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา

*Wickerhamomyces* sp. HT4-37 (sister sp.) เจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือ ประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี ชานอ้อย, ฟางข้าว และ CMC เป็น แหล่งคาร์บอนตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 4.74 U/ml และมี ชานอ้อย, ฟางข้าวและ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ และผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้ มากที่สุด เมื่อมี กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 5 คือเท่ากับ 41.06 U/ml CMC เป็นแหล่ง คาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา รูปที่ 5.28

*Hanseniaspora occidentalis* L3 เจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดใน วันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี ชานอ้อย, ฟางข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ กลูโคส เป็น แหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 7 คือเท่ากับ 17.11 U/ml และมี ชานอ้อย, CMC และ ฟางข้าวเป็นแหล่ง คาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ และผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มาก ที่สุด เมื่อมี กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 7 คือเท่ากับ 23.27 U/ml CMC เป็นแหล่ง คาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา รูปที่ 5.29

*Candida* sp. HFr2-24 (sister sp.) เจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดใน วันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี ชานอ้อย, ฟางข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ ชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 5 คือเท่ากับ 4.80 U/ml และมี CMC, กลูโคสและ ฟางข้าวเป็นแหล่ง คาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาและสามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 5 คือเท่ากับ 44.57 U/ml กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ เหมาะสมน้อยลงมา รูปที่ 5.30

จำนวนเซลล์ของ *Lindnera subsufficiens* HS1-8 ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน เจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี ชานอ้อย, ฟางข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 7.05 U/ml และมี กลูโคส, CMC และ ชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ และผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิ เดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 1 คือเท่ากับ 2.02 U/ml CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา รูปที่ 5.31

*Candida* sp. PM05 (New sp.) เจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดใน วันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี ชานอ้อย, ฟางข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ กลูโคสเป็น

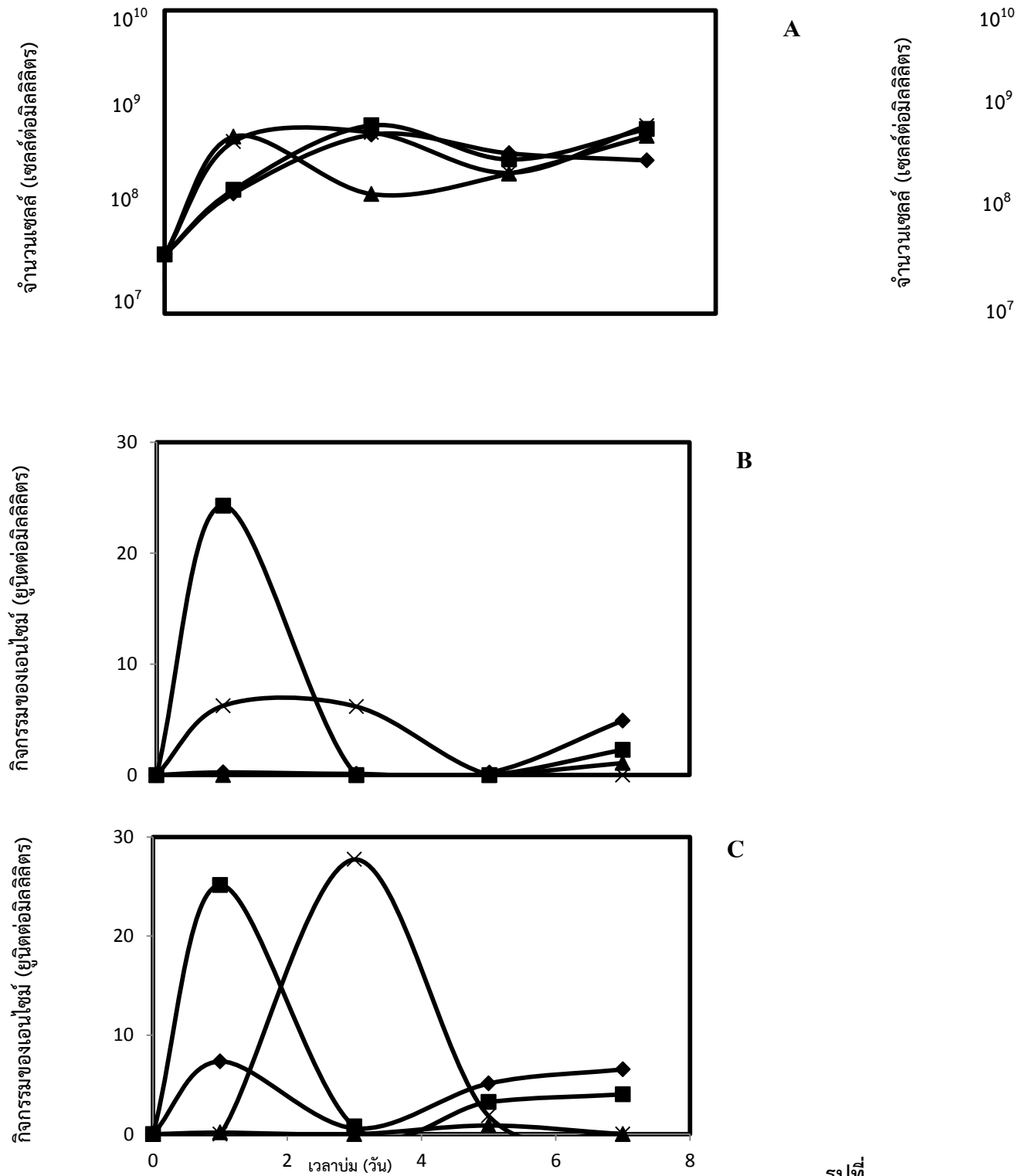
แหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 5 คือเท่ากับ 8.55 U/ml และมี CMC, ชานอ้อย และ ฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ และสามารถผลิตเอนไซม์ บีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 5 คือเท่ากับ 1.54 U/ml CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลง รูปที่ 5.32

*Torulaspora sp.* PM34 ( New sp.) เจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี ชานอ้อย, ฟางข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ บีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 5 คือเท่ากับ 2.70 U/ml และมี CMC, ฟางข้าว และ ชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา และผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตมากวันที่ 5 คือเท่ากับ 7.14 U/ml กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน รูปที่ 5.33

*Candida sp.* PM47 ( New sp.) เจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี ชานอ้อย, ฟางข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ บีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อใช้ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสูงที่สุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 7.29 U/ml และมี ฟางข้าว, CMC และ ชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับรูปที่ 5.34

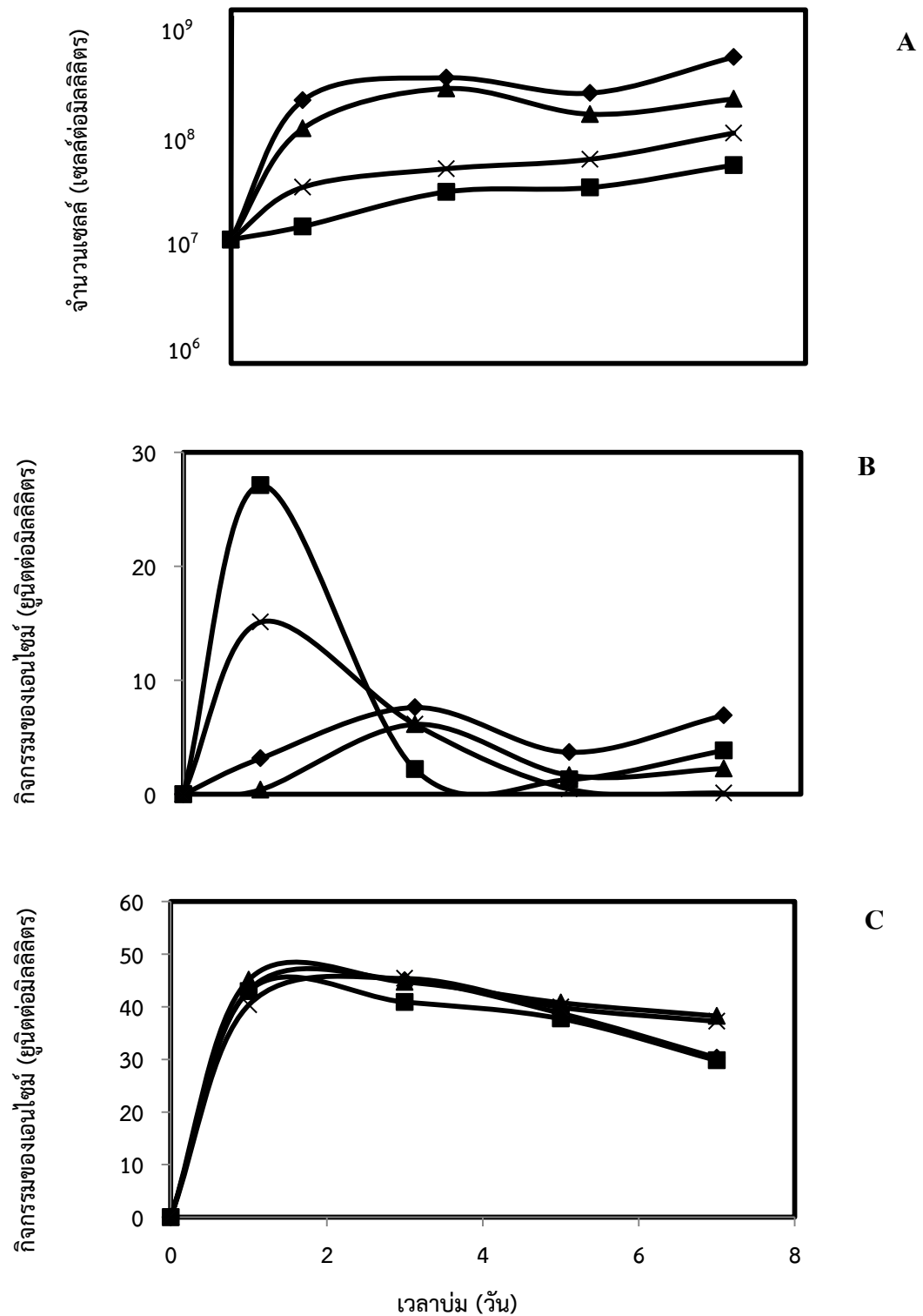
นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ บีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตได้มากในวันที่ 3 คือเท่ากับ 1.60 U/ml CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลง

#### 5.4.2.2 พืชที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงยีสต์ที่สร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส



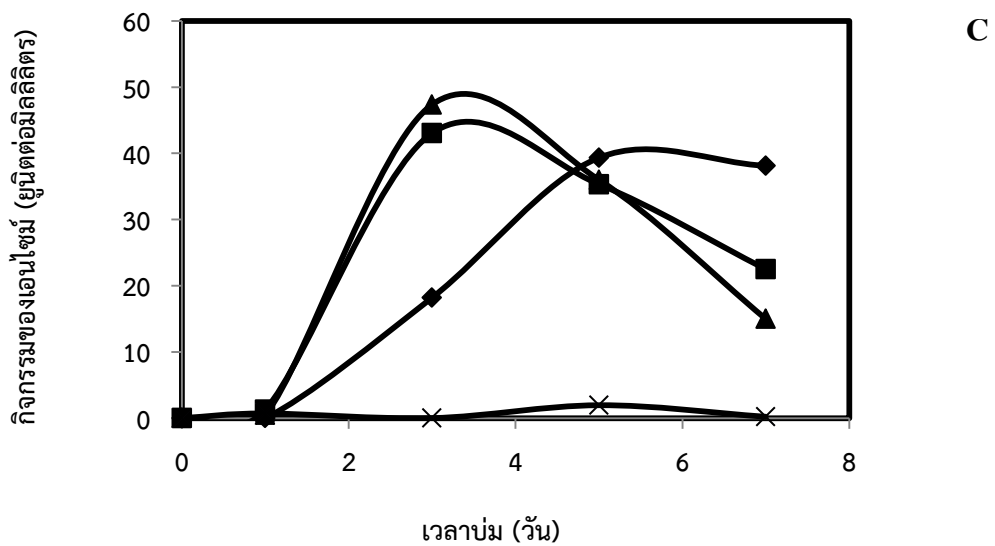
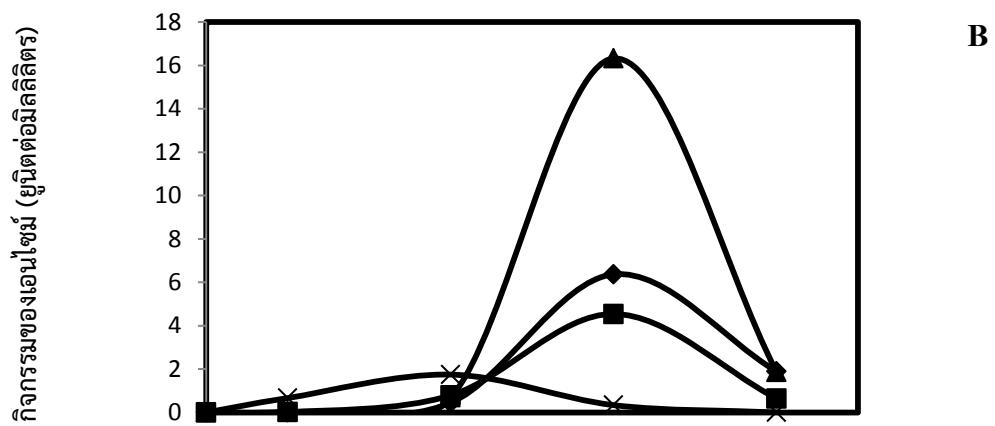
รูปที่  
5.35 ผล

ของพีเอช 4.0 (—◆—), 5.0 (—■—), 6.0 (—▲—) และ 7.0 (—×—) ต่อการ  
ผลิตเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Debaryomyces* sp. S11-1 (New sp.): การเจริญ (A),  
กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (B), กิจกรรม Whole cell ของ  
เอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (C).



รูปที่

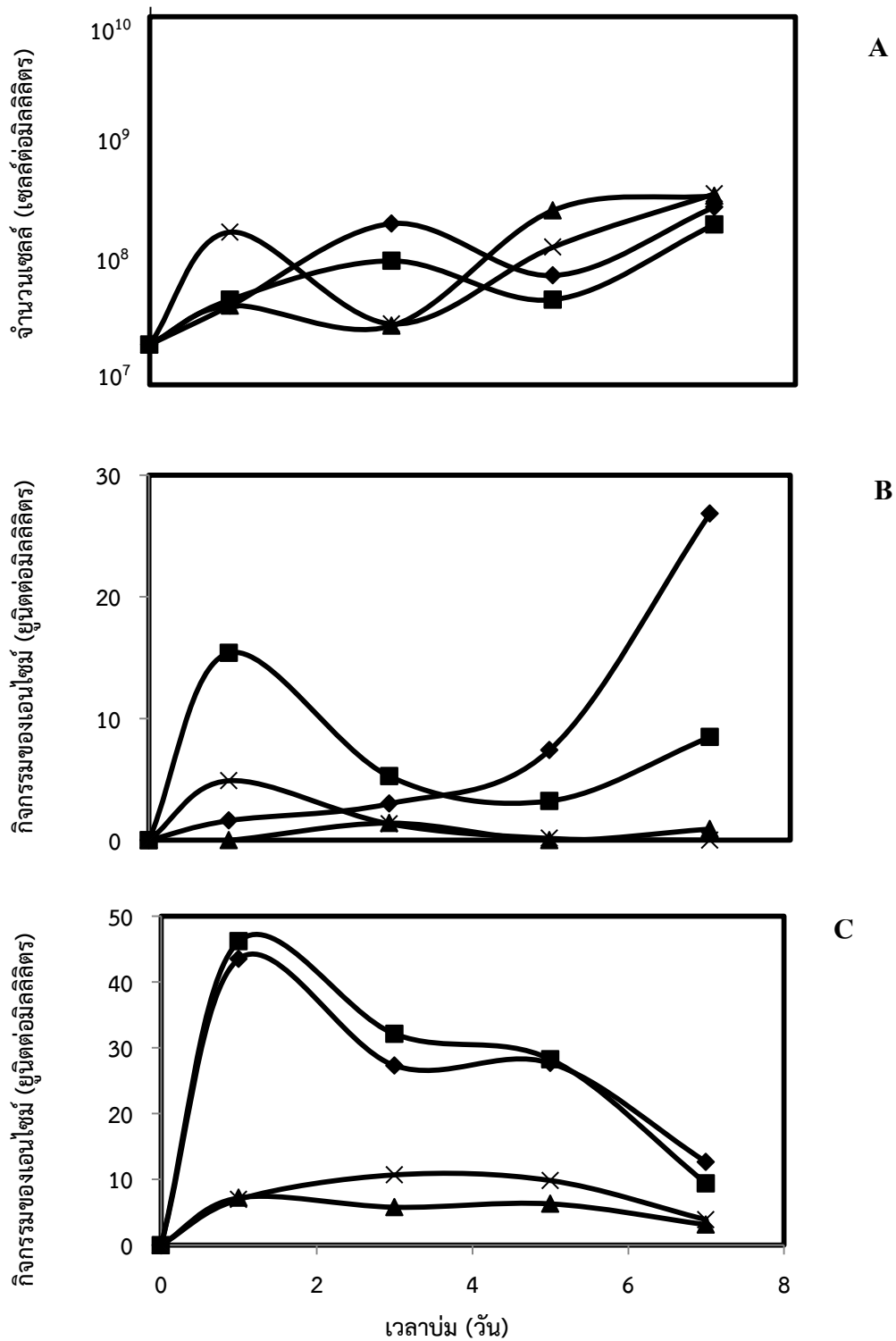
5.36 ผลของพีเอช 4.0 (—◆—), 5.0 (—■—), 6.0 (—▲—) และ 7.0 (—×—) ต่อการผลิตเอนไซม์ เป็ด้ากลูโคซิเดสของ *Wickerhamomyces* sp. HT4-37 (sister sp.): การเจริญ(A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เป็ด้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ เป็ด้ากลูโคซิเดส(C).



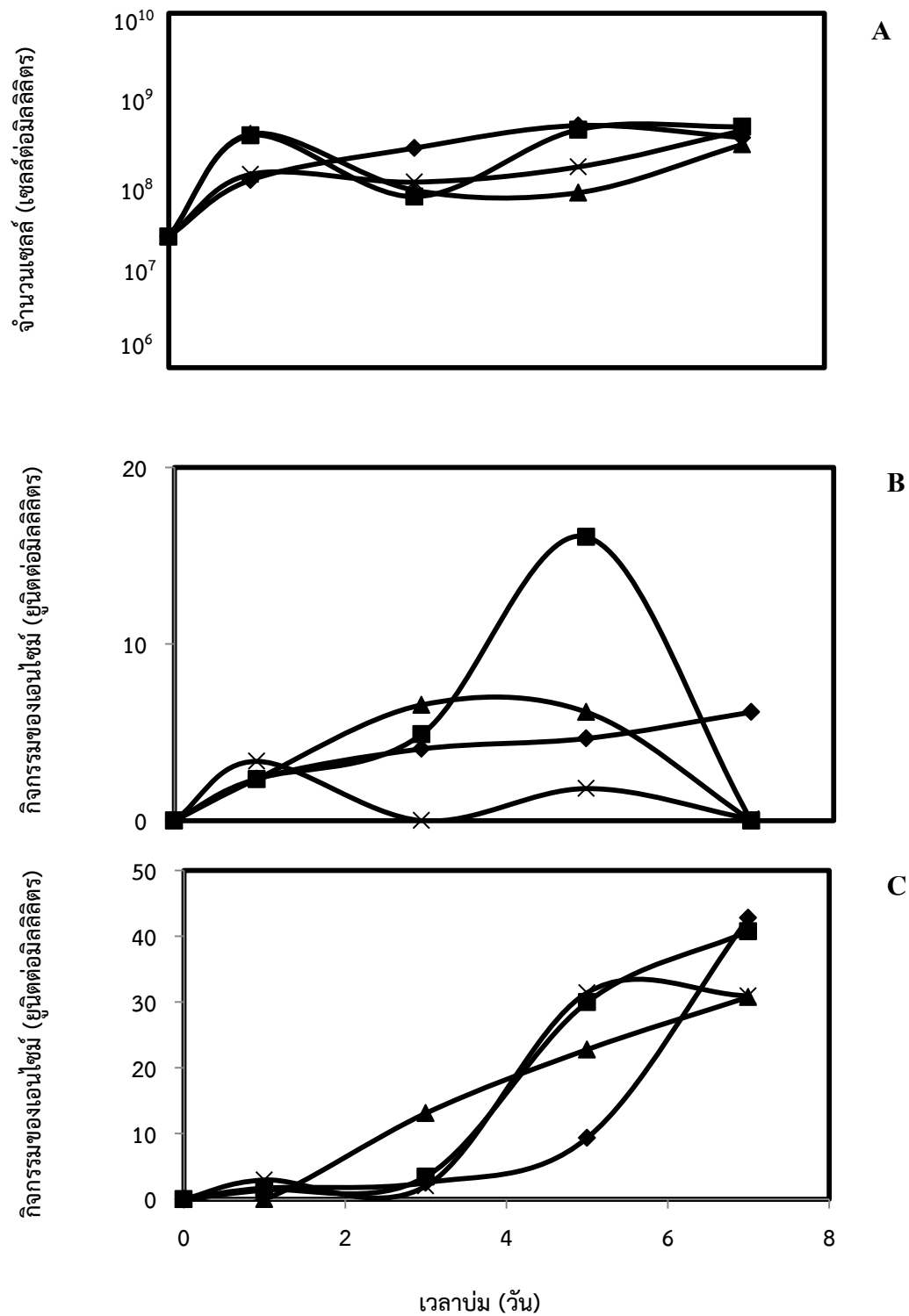
◆), 5.0 (■), 6.0 (▲) และ 7.0 (×) ต่อการผลิตเอนไซม์

ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Hanseniaspora occidentalis* L3: การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส(C).



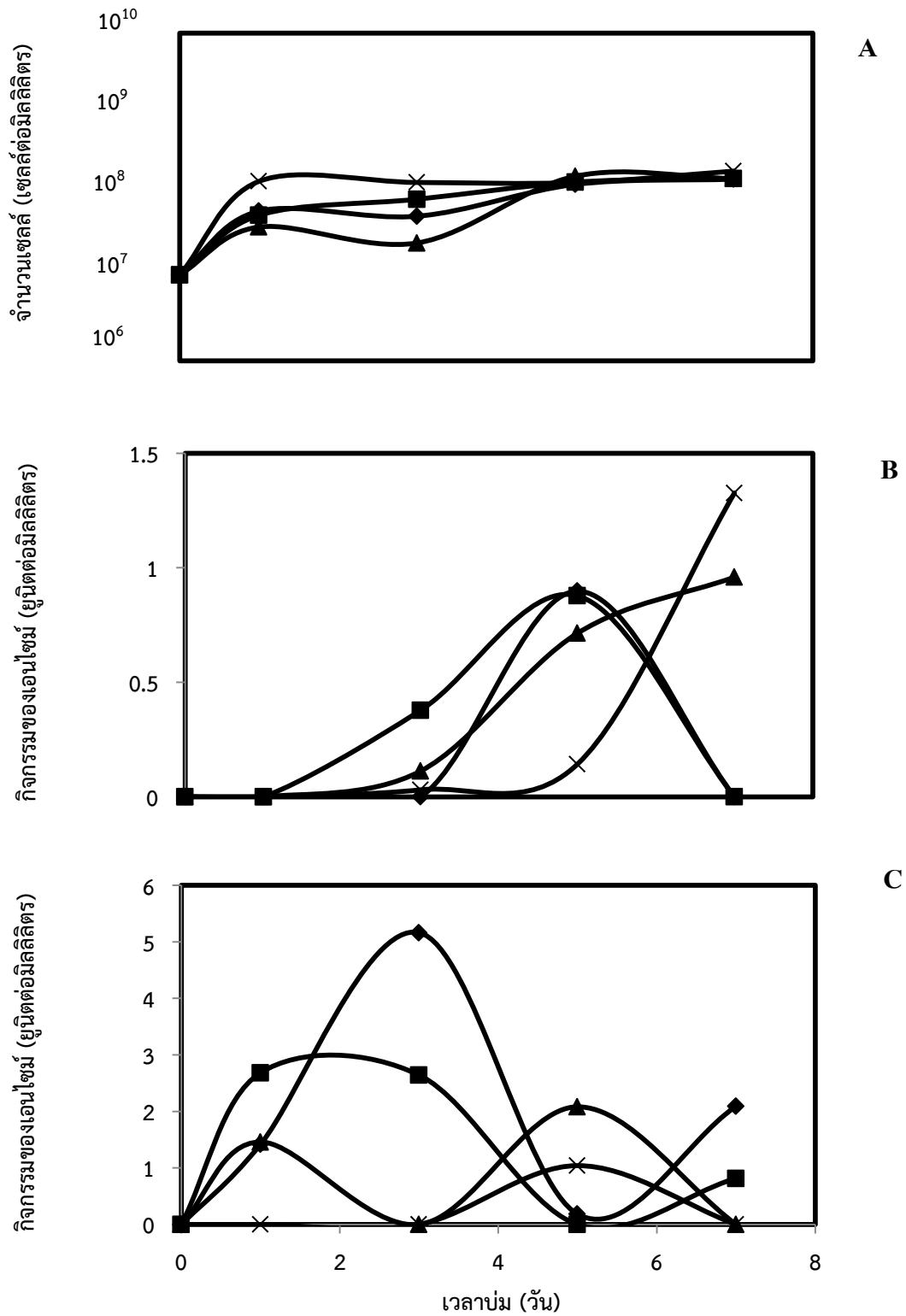


รูปที่ 5.38 ผลของพีเอช 4.0 (◆), 5.0 (■), 6.0 (▲) และ 7.0 (×) ต่อการผลิตเอนไซม์ เป็ด้ากลูโคซิเดสของ *Candida sp.* HFr2-24 (sister sp.) : การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เป็ด้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เป็ด้ากลูโคซิเดส(C).

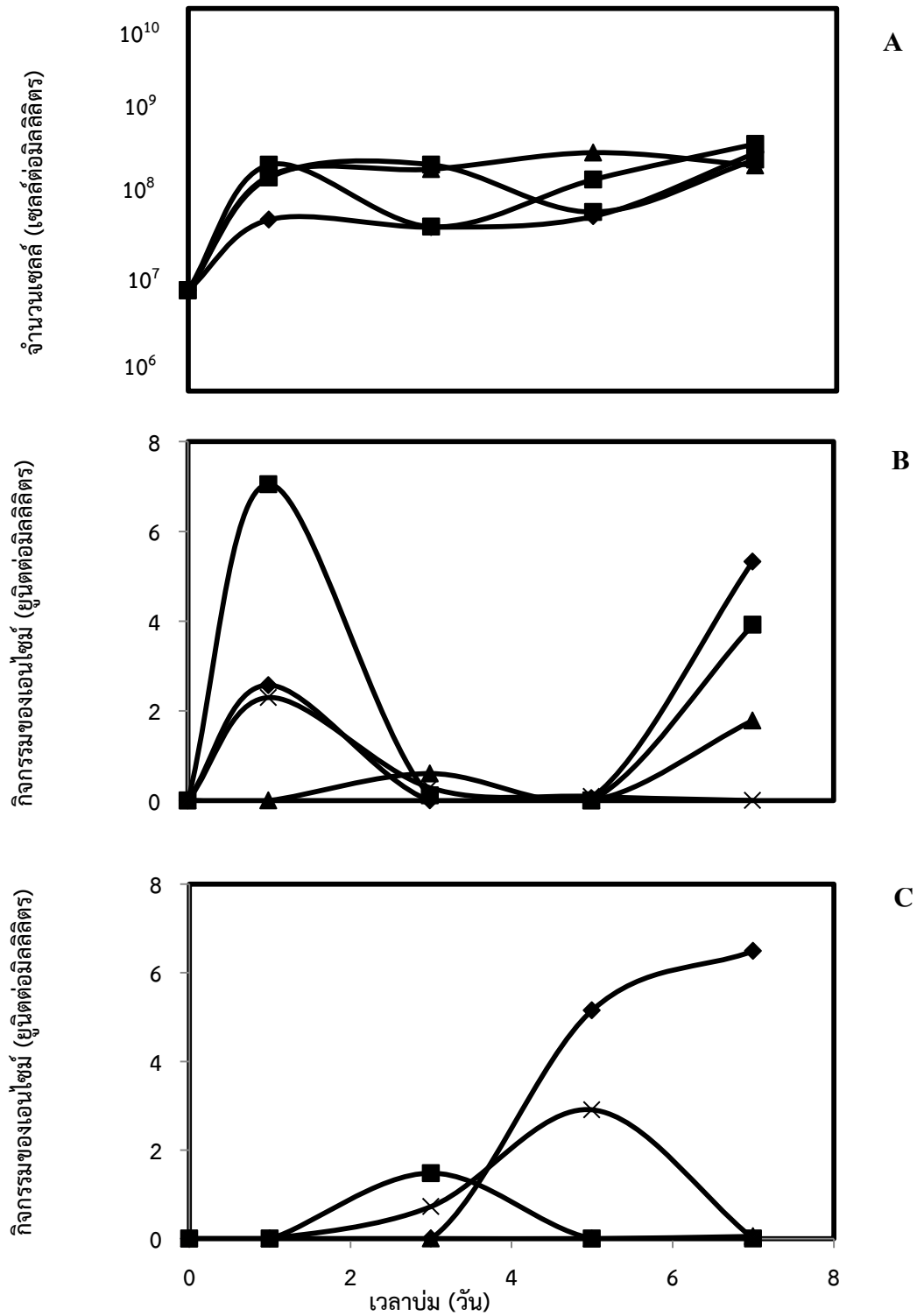


รูปที่  
5.39

ผลของพีเอช 4.0 (◆), 5.0 (■), 6.0 (▲) และ 7.0 (×) ต่อการผลิตเอนไซม์  
 ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Lindnera subsufficiens* HS1-8: การเจริญ(A), กิจกรรม Extracellular  
 enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส(C).



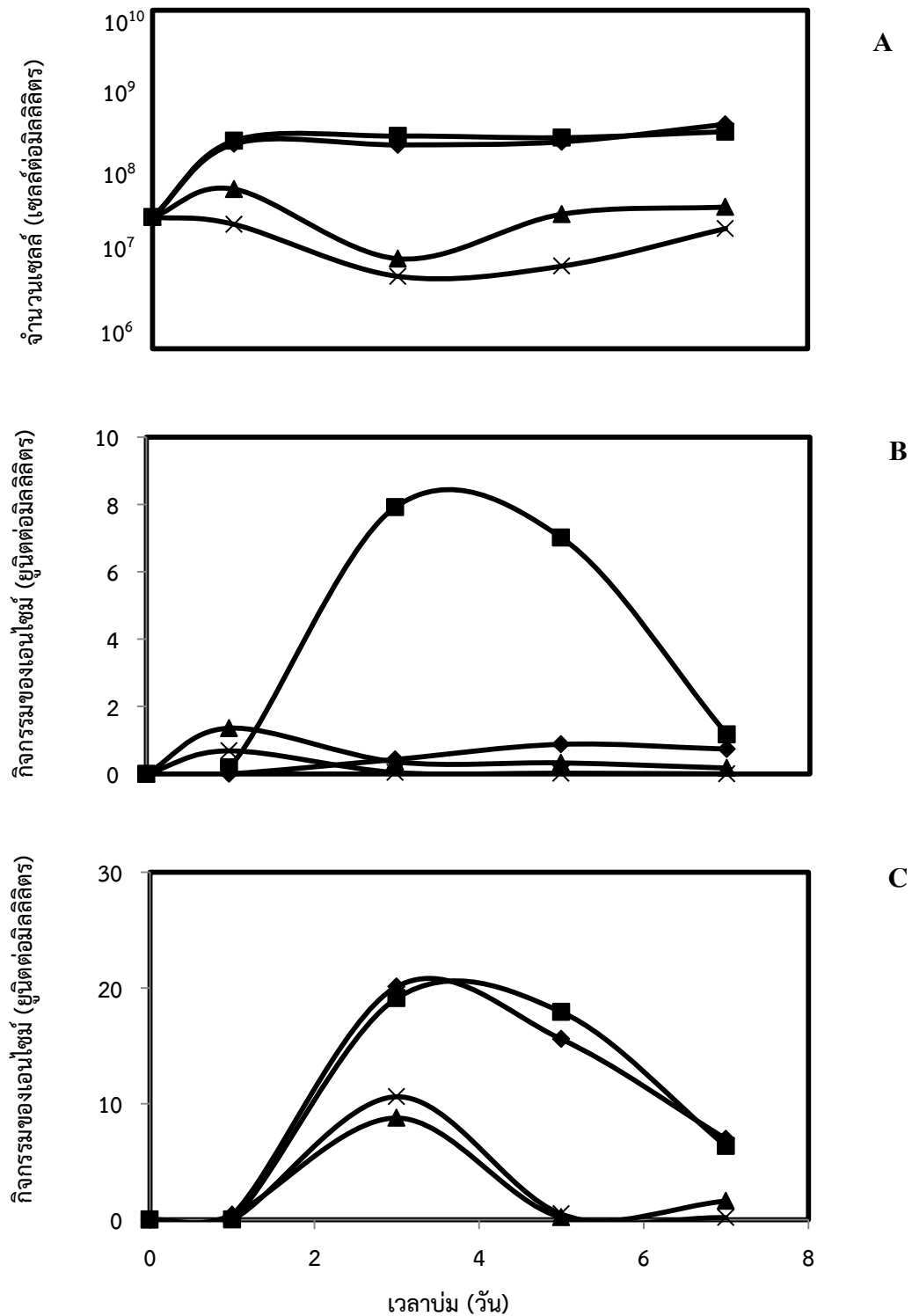
รูปที่ 5.40 ผลของพีเอช 4.0 (◆), 5.0 (■), 6.0 (▲) และ 7.0 (×) ต่อการผลิตเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Candida* sp. PM05 (New sp.): การเจริญ(A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส(C).



5.41 ผลของพีเอช 4.0 (◆), 5.0 (■), 6.0 (▲) และ 7.0 (×) ต่อการผลิตเอนไซม์

ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Torulaspora* sp. PM34 (New sp.): การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (C).

รูปที่



รูปที่ 5.42 ผลของพีเอช 4.0 (◆), 5.0 (■), 6.0 (▲) และ 7.0 (×) ต่อการผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Torulaspora* sp. PM34 (New sp.): การเจริญ(A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส(B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (C).

การเจริญของ *Debaryomyces* sp. S11-1 (New sp.) ที่มี pH ต่าง ๆ กัน จากรูปที่ 5.35 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Debaryomyces* sp. S11-1 (New sp.) เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี pH 7.0 และเจริญสูงสุดใน

วันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี pH 6.0, 5.0 และ 4.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 5.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 1 คือเท่ากับ 23.37 U/ml และอาหารที่มี pH 7.0, 4.0 และ 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ และผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 7.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 27.73 U/ml และอาหารที่มี pH 5.0, 4.0 และ 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ

*Wickerhamomyces* sp. HT4-37 (sister sp.) เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี pH 5.0 และเจริญสูงสุดในวันที่ 3 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี pH 7.0, 4.0 และ 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 5.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 1 คือเท่ากับ 27.10 U/ml และอาหารที่มี pH 7.0, 4.0 และ 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ และ สามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 7.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 45.37 U/ml และอาหารที่มี pH 6.0, 4.0 และ 5.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ รูปที่ 5.36

*Hanseniaspora occidentalis* L3 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี pH 5.0 และเจริญสูงสุดในวันที่ 3 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี pH 4.0, 6.0 และ 7.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 6.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 5 คือเท่ากับ 16.33 U/ml และอาหารที่มี pH 4.0, 5.0 และ 7.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ และ *Hanseniaspora occidentalis* L3 ยังสามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 6.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 47.37 U/ml และอาหารที่มี pH 5.0, 4.0 และ 7.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ รูปที่ 5.37

*Candida sp.* HFr2-24 (*sister sp.*) เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี pH 7.0 และเจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี pH 6.0, 4.0 และ 5.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 4.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 7 คือเท่ากับ 26.84 U/ml และอาหารที่มี pH 5.0, 7.0 และ 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ และผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 5.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 1 คือเท่ากับ 46.16 U/ml และอาหารที่มี pH 4.0, 7.0 และ 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ รูปที่ 5.38

*Lindnera subsufficiens* HS1-8 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี pH 4.0 และเจริญสูงสุดในวันที่ 5 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี pH 5.0, 7.0 และ 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 5.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 5 คือเท่ากับ 16.06 U/ml และอาหารที่มี pH 6.0, 4.0 และ 7.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ และผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 4.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 7 คือเท่ากับ 42.80 U/ml และอาหารที่มี pH 5.0, 7.0 และ 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ รูปที่ 5.39

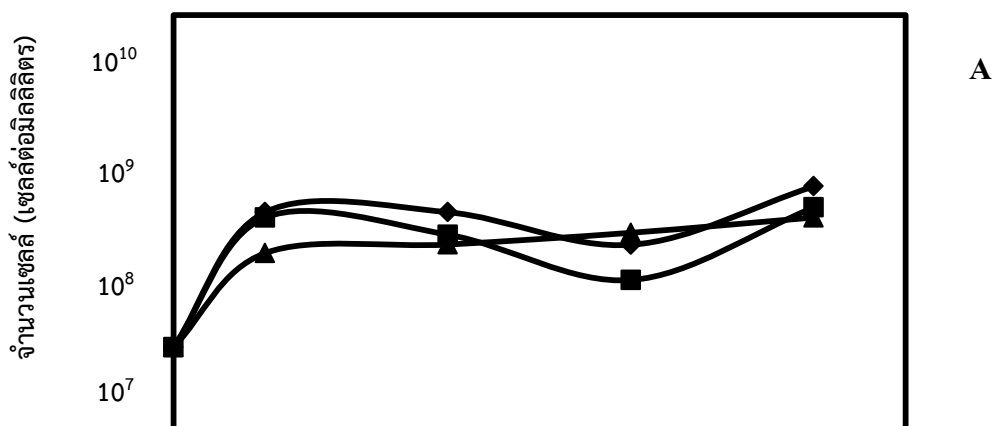
*Candida* sp. PM05 ( New sp.) ที่มี pH ต่าง ๆ กัน จากรูปที่ 5.40 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Candida* sp. PM05 ( New sp.) เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี pH 7.0 และเจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี pH 6.0, 5.0 และ 4.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ปัสต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 7.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 7 คือเท่ากับ 1.33 U/ml และอาหารที่มี pH 6.0, 4.0 และ 5.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ และผลิตเอนไซม์ปัสต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 4.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 5.16 U/ml และอาหารที่มี pH 5.0, 6.0 และ 7.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ

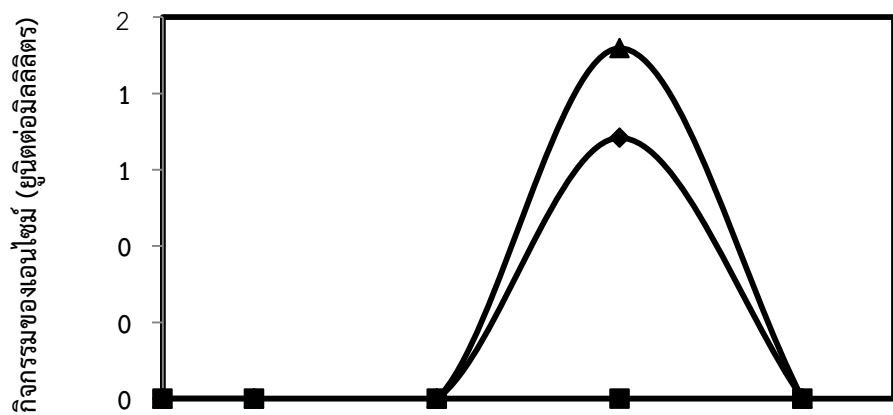
*Torulaspora* sp. PM34 ( New sp.) เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี pH 5.0 และเจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี pH 6.0, 7.0 และ 4.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 5.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 1 คือเท่ากับ 7.05 U/ml อาหารที่มี pH 4.0, 7.0 และ 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ และสามารถผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 4.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 7 คือเท่ากับ 6.49 U/ml อาหารที่มี pH 7.0, 5.0 และ 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ รูปที่ 5.41

*Candida* sp. PM47 ( New sp.) เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี pH 4.0 และเจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี pH 5.0, 6.0 และ 7.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 5.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 7.92 U/ml และอาหารที่มี pH 6.0, 4.0 และ 7.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ

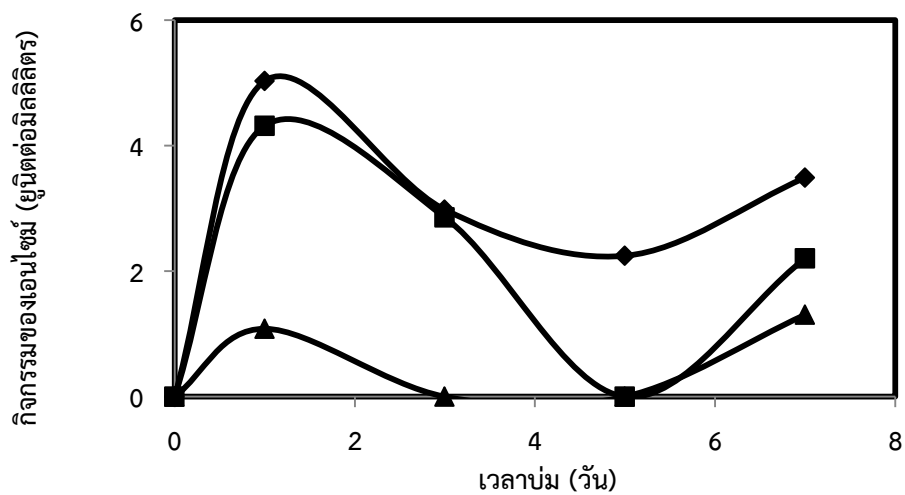
นอกจากนี้ยังผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี pH 4.0 และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 20.12 U/ml และอาหารที่มี pH 5.0, 7.0 และ 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมตามลำดับ รูปที่ 5.42

#### 5.4.2.3 ผลของแหล่งคาร์บอนเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส





B



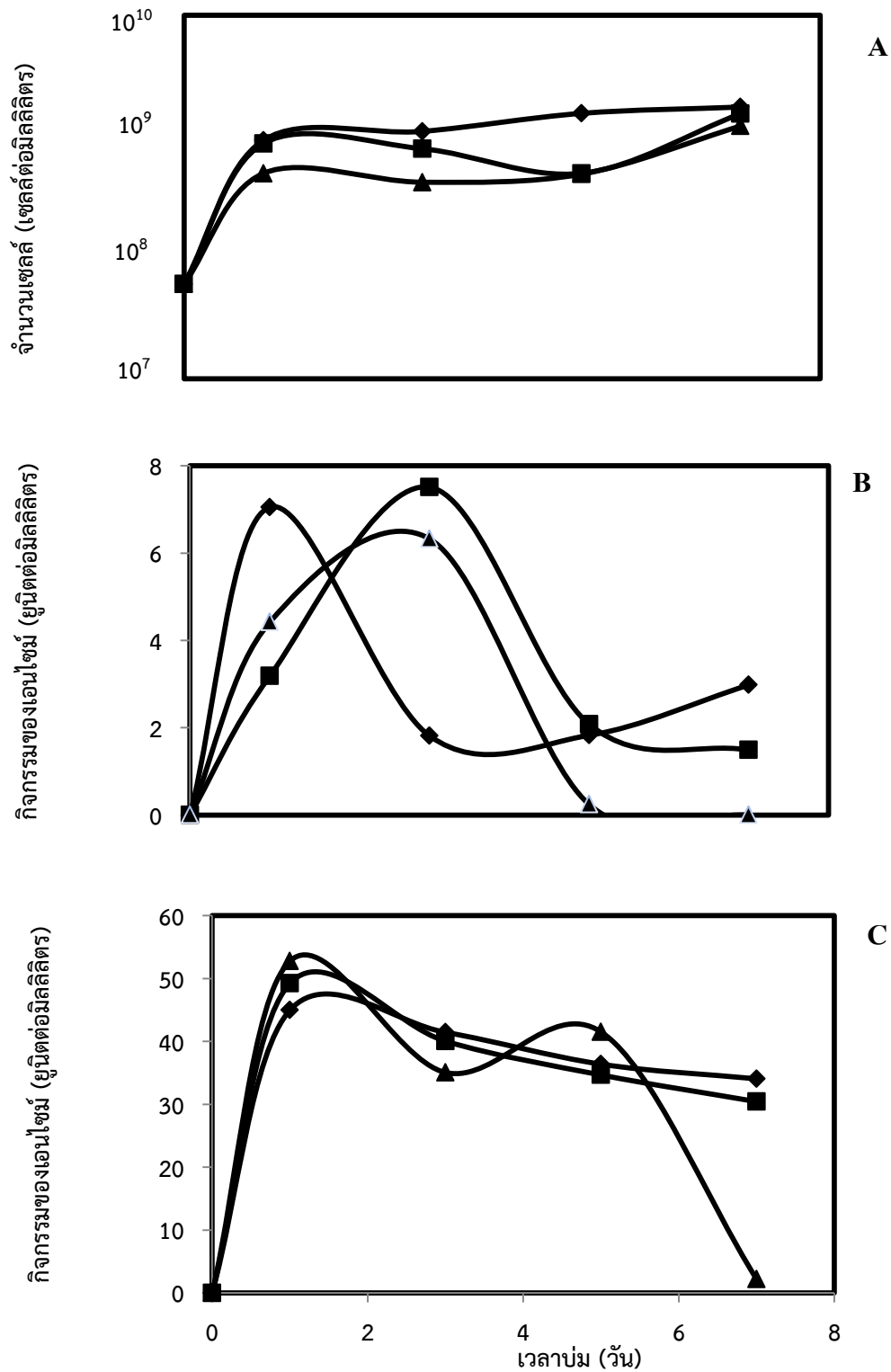
C

รูปที่  
5.43  
ผล  
ของ  
อุณหภูมิ  
25°C  
(  
,30°  
C (  
—■—

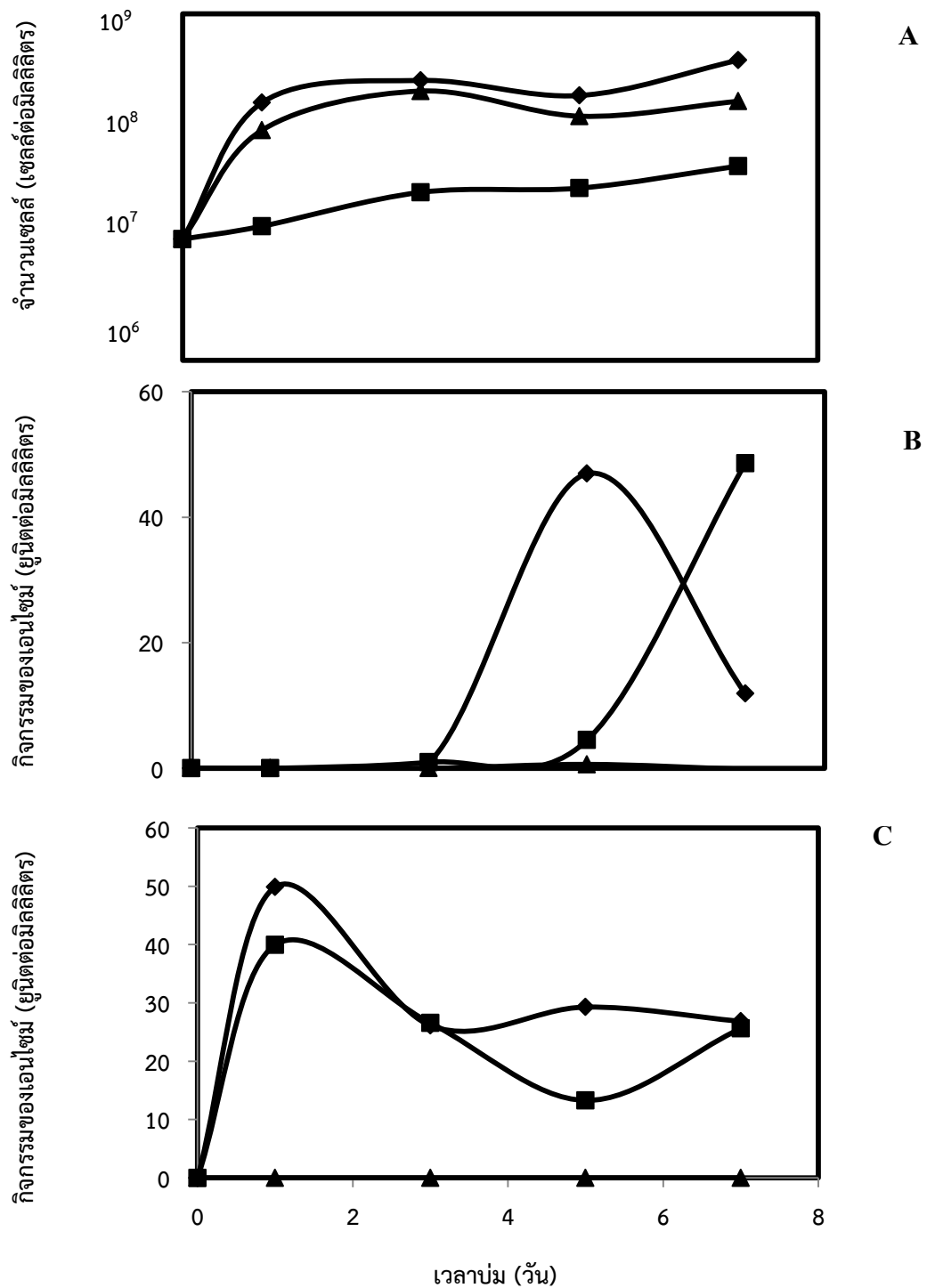
) และ 35°C ( —▲— ) ต่อการผลิตเอนไซม์

ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Debaryomyces* sp. S11-1 (New sp.): การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (C).



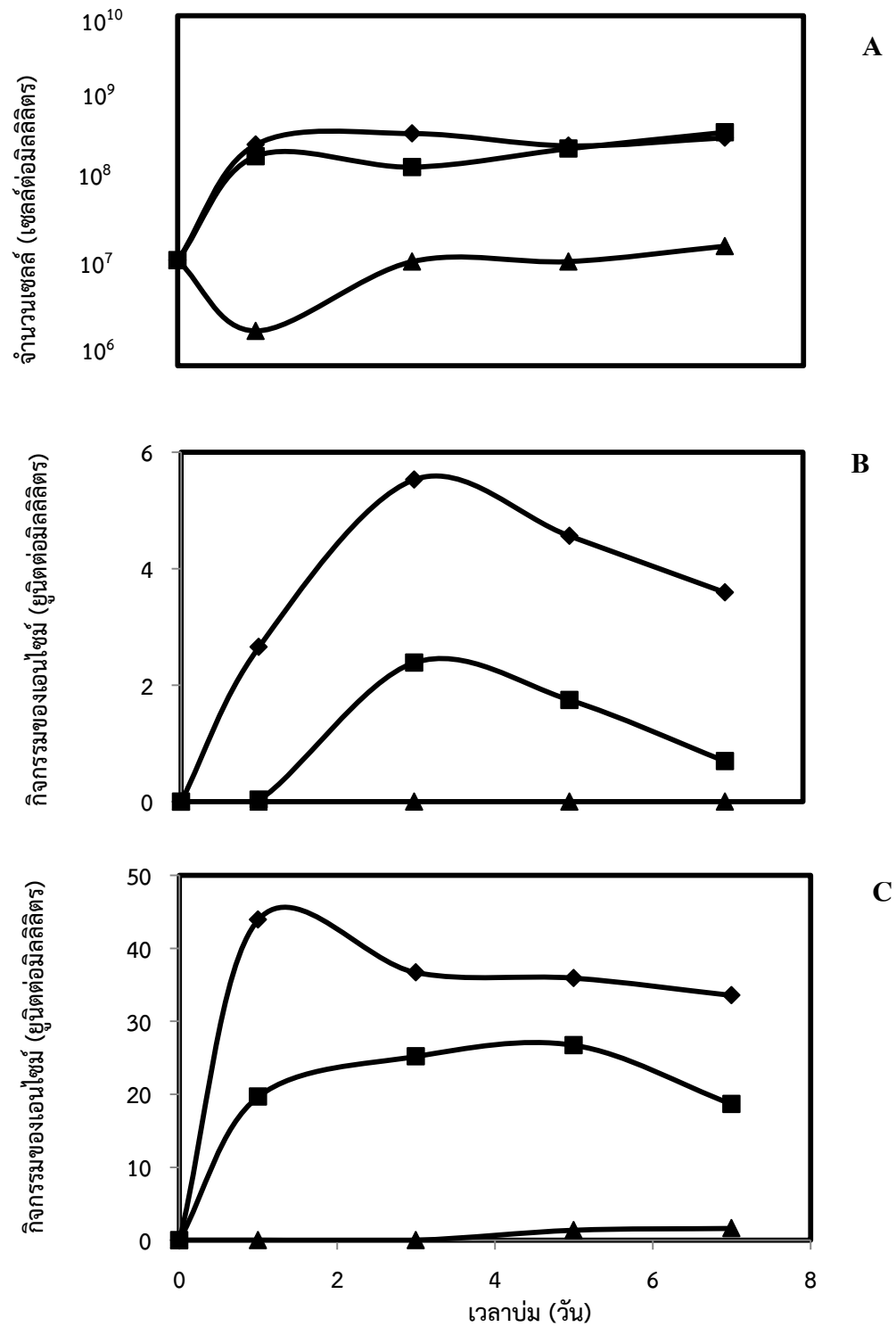


รูปที่ 5.44 ผลของอุณหภูมิ 25°C (◆), 30°C (■) และ 35°C (▲) ต่อการผลิตเอนไซม์  
 ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Wickerhamomyces* sp. HT4-37 (sister sp.): การเจริญ (A), กิจกรรม  
 Extracellular enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์  
 ปีต้ากลูโคซิเดส (C).

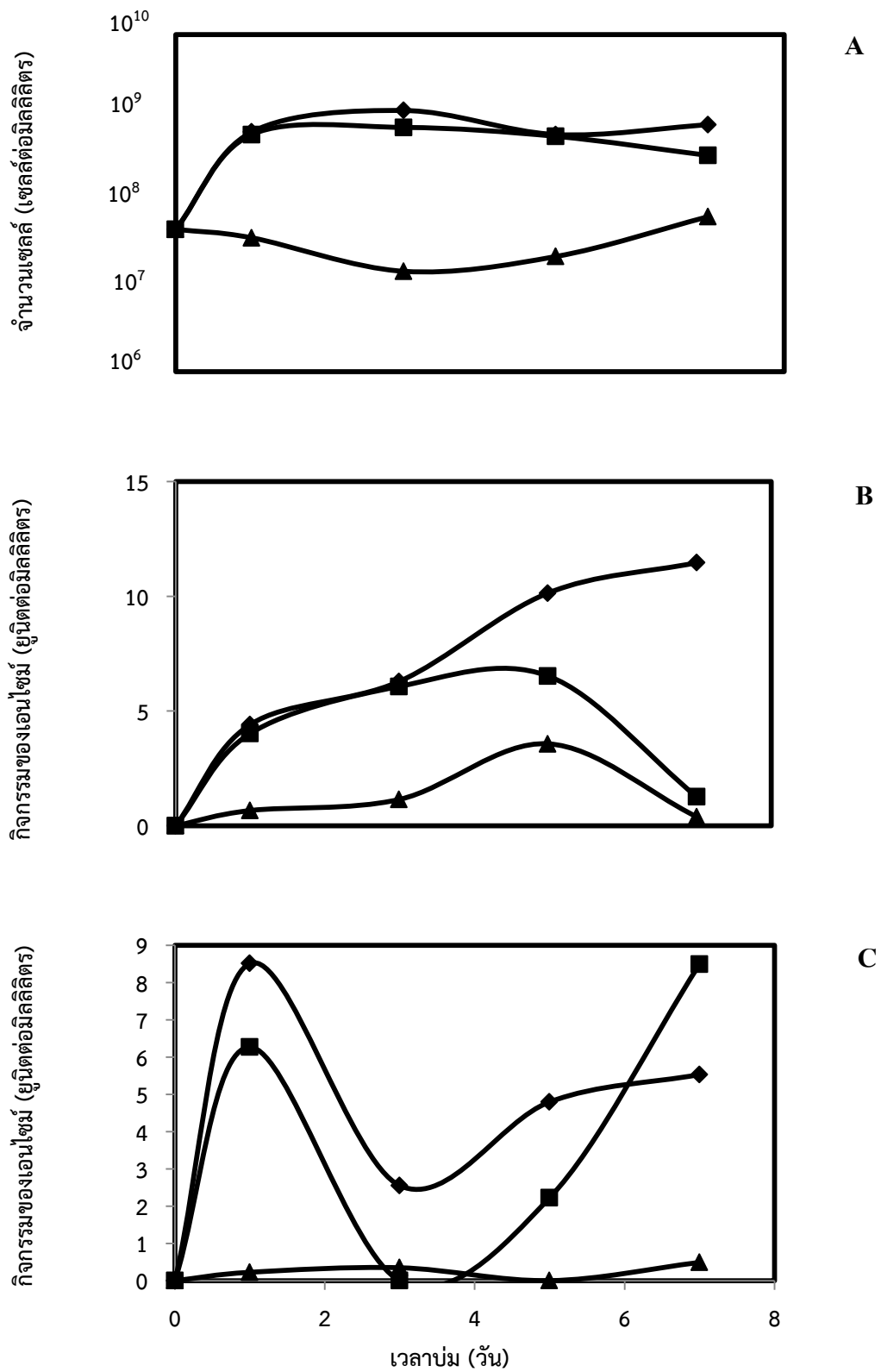


รูปที่

5.45 ผลของอุณหภูมิ 25°C (◆), 30°C (■) และ 35°C (▲) ต่อการผลิตเอนไซม์  
 ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Hanseniaspora occidentalis* L3. : การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular  
 enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (C).

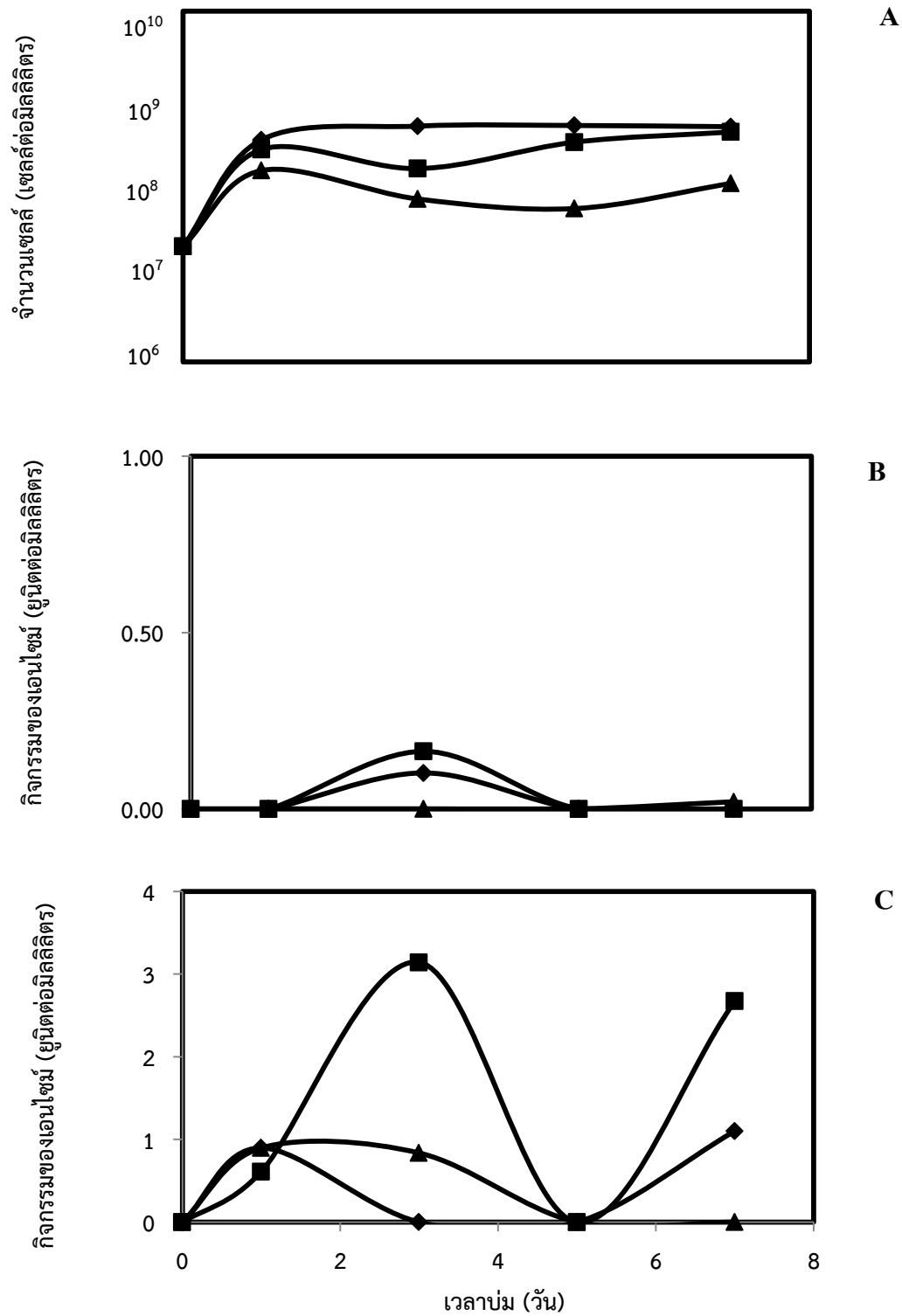


รูปที่ 5.46 ผลของอุณหภูมิ 25°C (◆), 30°C (■) และ 35°C (▲) ต่อการผลิตเอนไซม์ เป็ด้ากลูโคซิเดสของ *Candida sp.* HFr2-24 (*sister sp.*): การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เป็ด้ากลูโคซิเดส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ เป็ด้ากลูโคซิเดส (C).

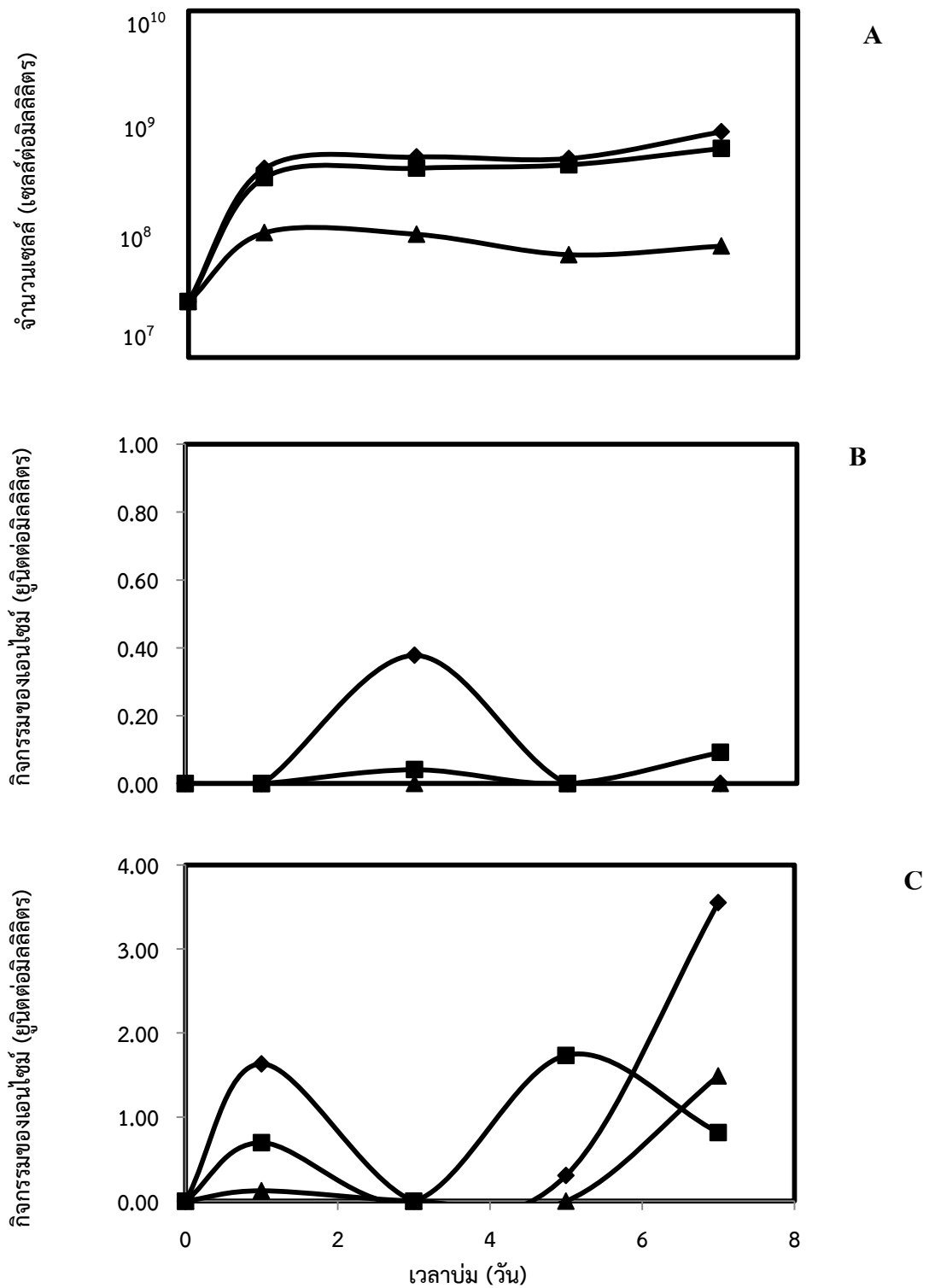


รูป  
ที่  
5.4

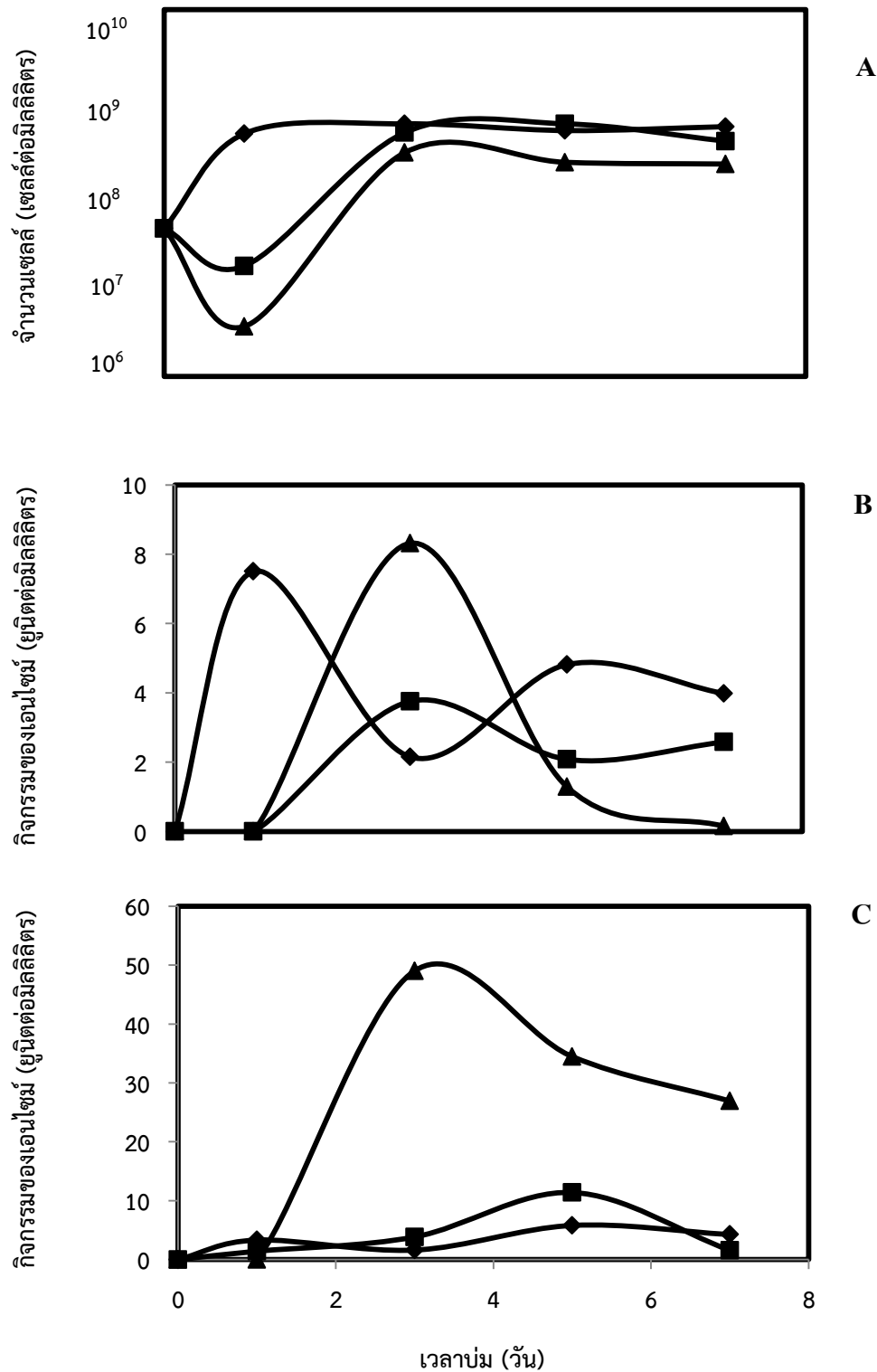
7 ผลของอุณหภูมิ 25°C (◆), 30°C (■) และ 35°C (▲) ต่อการผลิตเอนไซม์  
 ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Lindnera subsufficiens* HS1-8 : การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular  
 enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (C).



รูปที่ 5.48 ผลของอุณหภูมิ 25°C (◆), 30°C (■) และ 35°C (▲) ต่อการผลิตเอนไซม์ เป็ด้ากลูโคซิเดสของ *Candida* sp. PM05 (New sp.): การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์เป็ด้ากลูโคซิเดส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์เป็ด้ากลูโคซิเดส (C).



รูปที่ 5.49 ผลของอุณหภูมิ 25°C (—◆—), 30°C (—■—) และ 35°C (—▲—) ต่อการผลิตเอนไซม์  
 ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Torulaspora* sp. PM34 (New sp.): การเจริญ (A), กิจกรรม Extracellular  
 enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (C).



รูปที่ 5.50 ผลของอุณหภูมิ 25°C (◆), 30°C (■) และ 35°C (▲) ต่อการผลิตเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดสของ *Candida* sp. PM47 (New sp.): จำนวนเซลล์ (A), กิจกรรม Extracellular enzyme ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (B), กิจกรรม Whole cell ของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (C).

จำนวนเซลล์ของ *Debaryomyces* sp. S11-1 (New sp.) ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน จากรูปแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Debaryomyces* sp. S11-1 (New sp.) เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีอุณหภูมิ 25 °C และเจริญ





30 °C และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 3.14 U/ml อุณหภูมิ 25 °C และ 35 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมตามลำดับ รูปที่ 5.48

จำนวนเซลล์ของ *Torulaspora sp.* PM34 (New sp.) ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีอุณหภูมิ 25 °C และเจริญสูงสุดในวันที่ 7 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี อุณหภูมิ 30 °C และ 35 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ปัสต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี อุณหภูมิ 25 °C และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 0.38 U/ml อุณหภูมิ 30 °C และ 35 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมตามลำดับ และสามารถผลิตเอนไซม์ปัสต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี อุณหภูมิ 25 °C และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 7 คือเท่ากับ 3.55 U/ml อุณหภูมิ 30 °C และ 35 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมตามลำดับ รูปที่ 5.49

จำนวนเซลล์ของ *Candida sp.* PM47 (New sp.) ที่มี อุณหภูมิต่าง ๆ กัน เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีอุณหภูมิ 25 °C และเจริญสูงสุดในวันที่ 3 คือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี อุณหภูมิ 30 °C และ 35 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมตามลำดับ สามารถผลิตเอนไซม์ปัสต้ากลูโคซิเดส Extracellular enzyme ได้มากที่สุด เมื่อมี อุณหภูมิ 35 °C และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 8.32 U/ml อุณหภูมิ 25 °C และ 30 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมตามลำดับ

นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ปัสต้ากลูโคซิเดส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี อุณหภูมิ 35 °C และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 3 คือเท่ากับ 49.02 U/ml อุณหภูมิ 25 °C และ 30 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมตามลำดับ รูปที่ 5.50

## บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัย การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสร้างเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ของยีสต์ รวมทั้งหมด 16 ตัว สามารถสรุปแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม, pH ที่เหมาะสม และอุณหภูมิที่เหมาะสม

### ตารางที่ 6.1 สรุปสภาวะที่เหมาะสมของยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 8 สายพันธุ์

| รหัสเชื้อ | แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม(กลูโคส 1%, CMC 1%, ขานอ้อย1%, ฟางข้าว1%) |                  |            | pH ที่เหมาะสม(4.0, 5.0, 6.0, 7.0) |                  |            | อุณหภูมิที่เหมาะสม(25, 30, 35 °C) |                  |            |
|-----------|-----------------------------------------------------------------|------------------|------------|-----------------------------------|------------------|------------|-----------------------------------|------------------|------------|
|           | extracellular enzyme                                            | Whole cell assay | จำนวน cell | extracellular enzyme              | Whole cell assay | จำนวน cell | extracellular enzyme              | Whole cell assay | จำนวน cell |

|        |         |        |         |     |     |     |    |    |    |
|--------|---------|--------|---------|-----|-----|-----|----|----|----|
| 204-1  | ชานอ้อย | CMC    | กลูโคส  | 6.0 | 5.0 | 4.0 | 25 | -  | 25 |
| 214-1  | ฟางข้าว | CMC    | กลูโคส  | 7.0 | 5.0 | 4.0 | 30 | 30 | 30 |
| PM34   | ฟางข้าว | CMC    | ชานอ้อย | 4.0 | 7.0 | 4.0 | 35 | 25 | 30 |
| PM47   | CMC     | CMC    | กลูโคส  | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 25 | -  | 25 |
| S2-1-2 | ฟางข้าว | กลูโคส | กลูโคส  | 7.0 | 5.0 | 4.0 | 35 | 25 | 25 |
| S1-1   | ชานอ้อย | CMC    | กลูโคส  | 6.0 | 4.0 | 4.0 | 30 | -  | 35 |
| F5-1   | กลูโคส  | กลูโคส | กลูโคส  | 4.0 | 7.0 | 4.0 | 35 | 30 | 25 |
| FW10   | ชานอ้อย | CMC    | กลูโคส  | 7.0 | 4.0 | 4.0 | 30 | 25 | 25 |

เมื่อทำการทดสอบ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม pH ที่เหมาะสมและ อุณหภูมิที่เหมาะสม พบว่าเชื้อ *Pichia fabianii* 204-1 เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส ชานอ้อย และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 4.0 และ 5.0 อุณหภูมิ 25 °C

เชื้อ *Candida orthopsilosis* 214-1 เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส ฟางข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 4.0 และ 7.0 อุณหภูมิ 30 °C

เชื้อ *Torulaspora* sp. PM 34 (New sp.) เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ ชานอ้อย ฟางข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 4.0 และ 7.0 อุณหภูมิ 30 °C และ 35 °C

เชื้อ *Candida* sp. PM 47 (New sp.) เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 25 °C

เชื้อ *Kluyveromyces africanus* S2-1-2 เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส และ ฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 4.0 7.0 และ 5.0 อุณหภูมิ 25 °C และ 35 °C

เชื้อ *Candida tropicalis* S1-1 เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส ชานอ้อยและ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 4.0 และ 7.0 อุณหภูมิ 30 °C และ 35 °C

เชื้อ *Candida* sp. F5-1 (New sp.) เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 4.0 และ 7.0 อุณหภูมิ 25 °C และ 35 °C

เชื้อ *Candida* sp. FW10. (New sp.) เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส ชานอ้อย และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 4.0 5.0 และ 7.0 อุณหภูมิ 25 °C เชื้อส่วนใหญ่ เจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดีเมื่อใช้กลูโคสและ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 25 °C

## ตารางที่ 6.2 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ บีต้ากลูโคซิเดส จำนวน 8 ตัวคือ

| รหัสเชื้อ | แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม(กลูโคส 1%, CMC 1%, ชานอ้อย1%, ฟางข้าว1%) |                  |            | pH ที่เหมาะสม(4.0, 5.0, 6.0, 7.0) |                  |            | อุณหภูมิที่เหมาะสม(25, 30, 35 °C) |                  |            |
|-----------|-----------------------------------------------------------------|------------------|------------|-----------------------------------|------------------|------------|-----------------------------------|------------------|------------|
|           | extracellular enzyme                                            | Whole cell assay | จำนวน cell | extracellular enzyme              | Whole cell assay | จำนวน cell | extracellular enzyme              | Whole cell assay | จำนวน cell |
| S11-1     | กลูโคส                                                          | CMC              | กลูโคส     | 5.0                               | 7.0              | 7.0        | 35                                | 25               | 25         |
| HT4-37    | กลูโคส                                                          | กลูโคส           | กลูโคส     | 5.0                               | 7.0              | 5.0        | 30                                | 35               | 25         |
| L3        | กลูโคส                                                          | กลูโคส           | กลูโคส     | 6.0                               | 6.0              | 5.0        | 30                                | 25               | 30         |

|         |         |        |        |     |     |     |    |    |    |
|---------|---------|--------|--------|-----|-----|-----|----|----|----|
| HFr2-24 | ชานอ้อย | CMC    | กลูโคส | 4.0 | 5.0 | 7.0 | 25 | 25 | 30 |
| HS1-8   | ฟางข้าว | กลูโคส | กลูโคส | 5.0 | 4.0 | 4.0 | 25 | 25 | 25 |
| PM05    | กลูโคส  | กลูโคส | กลูโคส | 7.0 | 4.0 | 7.0 | 30 | 30 | 25 |
| PM34    | กลูโคส  | CMC    | กลูโคส | 5.0 | 4.0 | 5.0 | 25 | 25 | 25 |
| PM47    | กลูโคส  | กลูโคส | กลูโคส | 5.0 | 4.0 | 4.0 | 35 | 35 | 25 |

เมื่อทำการทดสอบ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม pH ที่เหมาะสมและ อุณหภูมิที่เหมาะสม พบว่า เชื้อ *Debaryomyces* sp. S11-1 (New sp.) เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 5.0 และ 7.0 อุณหภูมิ 25 °C และ 35 °C

เชื้อ *Wickerhamomyces* sp. HT4-37 (sister sp.) เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 5.0 และ 7.0 อุณหภูมิ 30 °C และ 35 °C

เชื้อ *Hanseniaspora occidentalis* L3 เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 5.0 และ 6.0 อุณหภูมิ 25 °C และ 30 °C

เชื้อ *Candida* sp. HFr2-24 (sister sp.) เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส ชานอ้อย และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 7.0 4.0 และ 5.0 อุณหภูมิ 25 °C และ 30 °C

เชื้อ *Lindnera subsufficiens* HS1-8 เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส และ ฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 4.0 และ 5.0 อุณหภูมิ 25 °C

เชื้อ *Candida* sp. PM05 (New sp.) เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 4.0 และ 7.0 อุณหภูมิ 25 °C และ 30 °C

เชื้อ PM34, *Torulaspora pretoriensis* เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 4.0 และ 5.0 อุณหภูมิ 25 °C

เชื้อ *Torulaspora* sp. PM47 (New sp.) เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน และ ที่ pH 4.0 และ 5.0 อุณหภูมิ 25 °C และ 35 °C

เชื้อยีสต์ส่วนใหญ่ สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และ บีต้ากลูโคซิเดส ได้ดีสุดเมื่อใช้กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 5.0 และอุณหภูมิ 25 °C เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ สามารถนำไปใช้ในการเลี้ยงยีสต์เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งเอนไซม์ของยีสต์ทั้งสองนี้สามารถนำไปใช้ในการย่อยสลายเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ที่ประกอบด้วยเซลลูโลสต่างๆ ให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสออกมา และผลผลิตที่ได้ คือ กลูโคสไปใช้ในผลิตไบโอเอทานอลต่อไปในอนาคต ซึ่งเป็นการนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนที่สำคัญ ทำการส่งเสริมและเผยแพร่การผลิตไบโอเอทานอลที่สามารถผลิตได้อย่างง่าย ไม่ซับซ้อน ทำให้ประชาชนสามารถผลิตพลังงานทดแทนขึ้นมาใช้ได้เอง และทำให้ประชาชนสามารถพึ่งพาตัวเองได้จากการผลิตพลังงานทดแทนขึ้นมาใช้เอง สามารถเพิ่มรายได้และแก้ปัญหาเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีอยู่มากมาย ยังช่วยลดการนำเข้าพลังงานปิโตรเลียมจากต่างประเทศได้เป็นจำนวนมาก ช่วยแก้ปัญหาภาวะทางสิ่งแวดล้อมเพราะพลังงานทดแทนเป็นพลังงานที่สะอาด ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม

การใช้ยีสต์ในการผลิตเอนไซม์เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และต้องการพื้นที่น้อย เจริญได้ดีในทุกฤดูกาล

### เอกสารอ้างอิง

- บุญแสน เตียนบุญธรรม.2547.เรื่องสิ่งมีชีวิตในดิน.[Online]. Available: <http://www.nsrui.ac.th> วันที่สืบค้น 14 มกราคม 2555.
- พะยอม เอกศิริ และ ภัททิรา จันทร์รุ่งเรือง.2541. การศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในดินจากพื้นที่โคกภูตากา อ.ภูเวียง จ.ขอนแก่น. รายงานวิจัย. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. [www1.mod.go.th/.../etanol%20home%20](http://www1.mod.go.th/.../etanol%20home%20) สืบค้นวันที่ 2 มีนาคม 2555.
- ภัชราพร วงศ์วิฑูรยาพร.2543.การตรวจสอบเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมจากเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในประเทศไทย: <http://www.biotec.or.th/rdereport/prjbiotec.asp?id=380>. สืบค้นวันที่ 1 มีนาคม 2555.
- สาวิตรี ลิ้มทอง.2549. ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ.1. กรุงเทพฯ ฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Barbosa Aneli M, Giese Ellen C., Dekker Robert F.H., Borsato Dionísio, Ana I. Briones Pérez, Juan F. Ubeda Iranzo.2010.  $\beta$ -glucosidase production by the yeast *Debaryomyces pseudopolymorphus* UCLM-NS7A: optimization using response surface methodology. New Biotechnology 27: 374-381.
- Chen M, Qin Yuqi, Liu Ziyong, Liu Kai, Wang Fengshan, Qu Yinbo. 2010. Isolation and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. Enzyme and Microbial Technology 46 :444-449.
- Dongyang, L., Zhang, R., Yang, X., Wu, H., Xu, D., Tang, Z., Shen, O. 2011. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. International Biodeterioration & Biodegradation 65 : 717-725.
- Hsu, C., Chang, K., Lai, M., Chang, T., Chang, Y., Jang, H. 2011. Pretreatment and hydrolysis of cellulosic agricultural wastes with a cellulase-producing *Streptomyces* for bioethanol production. Biomass and Bioenergy 35 : 1878 – 1884.

- Mahesh, C., Alok, K., Sharma Pradeep K., Kumar Hirdesh, Sangwan Rajinder S. 2010. **Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process.** Biomass and bioenergy 34 : 805 – 811.
- Menon, V., Rupesh, D., Rao, M. 2010. **Bioethanol production from renewable polymer lichenan using lichenase from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. and thermotolerant yeast.** Fuel Processing Technology : 401–406
- Peizhou, Y., Liqiong, G., Shujie, C., Nannan, L., Junfang, L. 2011. **Recombinant multi-functional cellulase activity in submerged fermentation of lignocellulosic wastes.** Renewable Energy 36 : 3268-3272
- Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Butzke, C. and Vichitphan, K. 2009. **The characterisation of a novel *Pichia anomala*  $\beta$ -glucosidase with potentially aroma enhancing capabilities in wine.** Annals of Microbiology. 59: 335-343.

### อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. Yeast extract –malt extract (YM ) agar pH 5.0

|               |         |
|---------------|---------|
| Glucose       | 10 g.   |
| Peptone       | 5 g.    |
| Yeast extract | 3 g.    |
| Malt extract  | 3 g.    |
| Agar          | 15 g.   |
| น้ำกลั่น      | 1000 ml |

#### 2. Yeast extract –malt extract (YM ) broth pH 5.0

|               |         |
|---------------|---------|
| Glucose       | 10 g.   |
| Peptone       | 5 g.    |
| Yeast extract | 3 g.    |
| Malt extract  | 3 g.    |
| น้ำกลั่น      | 1000 ml |

#### 3. Yeast extract peptone dextrose (YPD broth) pH 5.0

|               |         |
|---------------|---------|
| Glucose       | 20 g.   |
| Yeast extract | 20 g.   |
| Peptone       | 10 g.   |
| น้ำกลั่น      | 1000 ml |

#### 4. YNB agar (Yeast Nitrogen Base /W/O amino acids)

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Yeast Nitrogen Base | 1.7 g.  |
| Ammonium sulfate    | 5 g.    |
| Agar                | 20 g.   |
| น้ำกลั่น            | 1000 ml |

#### 5. Carboxymethylcellulose agar(CMC agar) pH 5.0

|               |         |
|---------------|---------|
| Glucose       | 5 g.    |
| Peptone       | 5 g.    |
| Yeast extract | 3 g.    |
| Malt extract  | 3 g.    |
| Agar          | 15 g.   |
| 0.5% CMC      | 5 g.    |
| น้ำกลั่น      | 1000 g. |

### ภาคผนวก ข

#### สารเคมี

#### การเตรียม congo red

|              |        |
|--------------|--------|
| Stock NaCl   |        |
| NaCl         | 30 gm. |
| 100% alcohol | 800 ml |
| น้ำกลั่น     | 200 ml |

|                                                                |  |          |
|----------------------------------------------------------------|--|----------|
| Stock working solution                                         |  |          |
| Stock NaCl                                                     |  | 50 ml    |
| 1% NaOH                                                        |  | 0.5 ml   |
| Congo red                                                      |  |          |
| Congo red                                                      |  | 0.1 g.   |
| Stock NaCl                                                     |  | 500 ml   |
| Citrate phosphate buffer                                       |  |          |
| 0.1 M citric acid                                              |  | 21 g/l   |
| 0.2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O      |  | 53.6 g/l |
| 1% Carboxymethylcellulose                                      |  |          |
| Carboxymethylcellulose                                         |  | 1 g.     |
| น้ำกลั่น                                                       |  | 100 ml   |
| Standards glucose                                              |  |          |
| D-glucose                                                      |  | 0.1 g.   |
| น้ำกลั่น                                                       |  | 100 ml   |
| DNS (Dinitrosalicylic )                                        |  |          |
| DNS                                                            |  | 2 g      |
| NaOH                                                           |  | 4 g      |
| NaPO <sub>4</sub> tritate                                      |  | 40 g     |
| น้ำกลั่น                                                       |  | 200 ml   |
| 0.004 % (w/v) MUG (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucoside) |  |          |

### ภาคผนวก ค

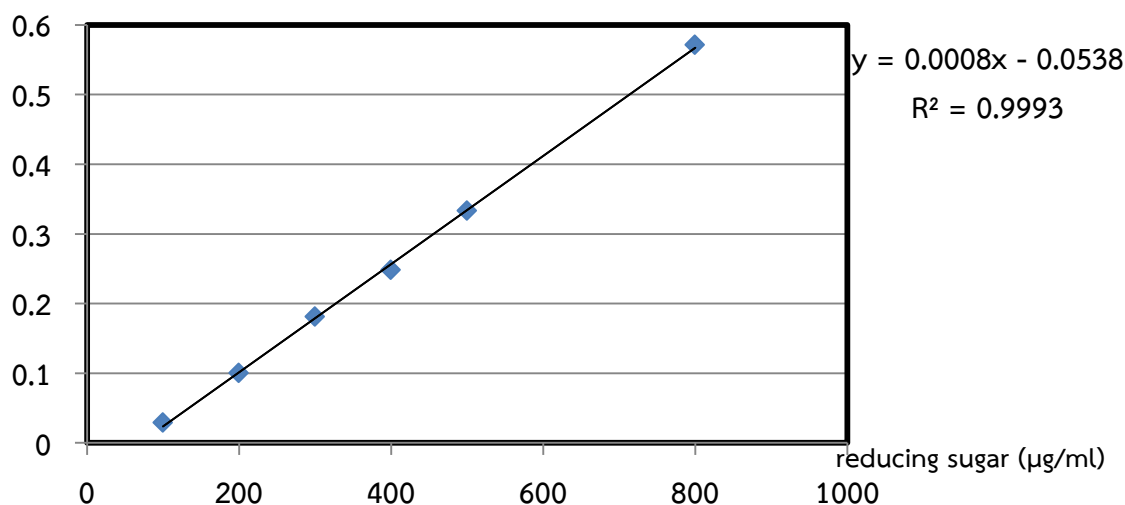
#### การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์

คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

ตารางภาคผนวกที่ 1 ตารางการทดสอบ Glucose มาตรฐาน เพื่อหาปริมาณ reducing sugar ของกราฟมาตรฐาน

| Glucose มาตรฐาน (ug/mL) | OD 540 (nm) |
|-------------------------|-------------|
| 100                     | 0.029       |
| 200                     | 0.100       |
| 300                     | 0.181       |
| 400                     | 0.248       |
| 500                     | 0.333       |
| 800                     | 0.571       |

OD 540 (nm)



รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของ reducing sugar

เปลี่ยนหน่วย reducing sugar mM =  $\frac{\text{reducing sugar} \times 1000}{\text{volume}}$

180

Activity of cellulase =  $\frac{\text{reducing sugar} \times V \times D}{\text{volume}}$

30 x 0.5

ตารางภาคผนวกที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และ คัดเลือกมา 8 ตัว

| เชื้อรหัส | ชื่อเชื้อ                                 | แหล่งที่เก็บ                   | Activity (วันที่ 1) |            | Activity (วันที่ 2) |            | Activity (วันที่ 3) |            |
|-----------|-------------------------------------------|--------------------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
|           |                                           |                                | Extra cellular      | Whole cell | Extra cellular      | Whole cell | Extra cellular      | Whole cell |
| PM40      | <i>Pichia guilliermondii</i>              | ดินเขื่อนภูตากา                | ไม่พบ               | 2.69       | 90.65               | 8.24       | 92.50               | 45.28      |
| PM47      | <i>Candida</i> sp.( New sp.)              | มะกอกเกลือ<br>ป่าภูตากา        | 184.63              | 20.74      | 222.13              | 7.78       | 109.17              | 36.94      |
| FW10      | <i>Candida</i> sp. (New sp.)              | เขื่อนจุฬาภรณ์                 | 285.56              | 36.94      | 226.30              | ไม่พบ      | 92.96               | 57.31      |
| PM05      | <i>Candida</i> sp. ( New sp.)             | ดอกยางเขื่อน<br>จุฬาภรณ์       | 41.57               | 32.31      | 34.63               | 36.02      | 32.31               | 17.50      |
| PM34      | <i>Torulaspora</i> sp.<br>( New sp.)      | ดินแปลงที่ 3<br>เขื่อนจุฬาภรณ์ | 249.44              | 11.02      | 36.48               | 9.17       | 45.74               | ไม่พบ      |
| S2-1-2    | <i>Kluyveromyces africanus</i> AY048159.1 | เขื่อนจุฬาภรณ์                 | ไม่พบ               | 39.72      | 72.59               | ไม่พบ      | 103.15              | 64.26      |
| S3-9      | <i>Kluyveromyces africanus</i> NRRLY8276, | เขื่อนจุฬาภรณ์                 | 171.67              | 21.67      | 81.39               | 72.59      | ไม่พบ               | 41.11      |



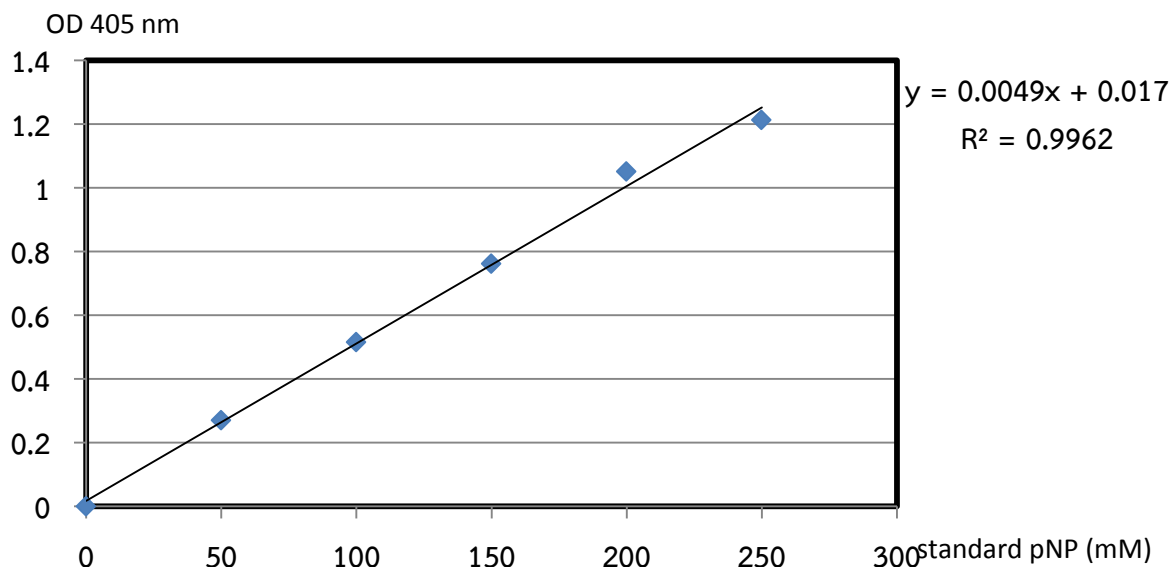
|        |                                            |                              |        |       |        |       |        |       |
|--------|--------------------------------------------|------------------------------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
| 109-1  | <i>Candida orthopsilosis</i>               | ลูกฮัมบัวเชื่อม<br>อุบลรัตน์ | 92.50  | 25.83 | 29.54  | ไม่พบ | 115.19 | ไม่พบ |
| 201-2  |                                            | เชื่อมอุบลรัตน์              | 161.48 | 30.46 | 111.02 | 29.54 | 36.94  | 71.67 |
| 204-1  | <i>Pichia fabianii</i>                     | ใบไม้เชื่อม<br>อุบลรัตน์     | 21.20  | 26.76 | NT     | NT    | 44.81  | 24.91 |
| 214-1  | <i>Candida orthopsilosis</i>               | ใบไม้เชื่อม<br>อุบลรัตน์     | 386.48 | 21.20 | 91.11  | 22.13 | 81.39  | 85.09 |
| F5-1   | <i>Candida</i> sp. (New sp.)               | ดอกไม้เชื่อม<br>อุบลรัตน์    | 19.81  | 28.15 | NT     | NT    | 44.35  | 28.15 |
| S1-1   | <i>Candida tropicalis</i>                  | ดินเชื่อม<br>อุบลรัตน์       | 20.28  | ไม่พบ | NT     | NT    | 45.28  | 47.13 |
| HFr1-3 | <i>Candida nitrativorans</i>               | ผลต้นเชือก<br>เชื่อมห้วยกุ่ม | ไม่พบ  | 18.43 | 184.63 | 20.28 | 55.93  | 67.96 |
| HS1-26 | <i>Candida</i> sp.(sister sp.)             | ดินเชื่อมห้วยกุ่ม            | 53.61  | 17.50 | 42.50  | 27.69 | 23.06  | 19.35 |
| HT4-37 | <i>Wickerhamomyces</i> sp.<br>(sister sp.) | เชื่อมห้วยกุ่ม               | ไม่พบ  | 15.65 | 31.39  | 22.13 | 16.57  | 12.87 |

\*\*\*NT = not test

### บิต้ากลูโคซิเดส

#### ตารางภาคผนวกที่ 3 การทดสอบ standard pNP

| standard pNP (mM) | OD 405 nm |
|-------------------|-----------|
| 0                 | 0         |
| 50                | 0.27      |
| 100               | 0.515     |
| 150               | 0.761     |
| 200               | 1.051     |
| 250               | 1.212     |



รูปภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส

$$\text{Activity of } \beta\text{-glucosidase} = \frac{\text{pNP} \times 0.3 \times 10 \times D}{\text{Volume}}$$

30

ตารางภาคผนวกที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ ปีต้ากลูโคซิเดส

| เชื้อรหัส | ชื่อเชื้อ                          | แหล่งที่เก็บ              | Activity (วันที่ 1) |                | Activity (วันที่ 2) |                | Activity (วันที่ 3) |                |
|-----------|------------------------------------|---------------------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|
|           |                                    |                           | Extra cellular      | Intra cellular | Extra cellular      | Intra cellular | Extra cellular      | Intra cellular |
| PM47      | <i>Candida</i> sp.( New sp.)       | มะกอกเกลื้อน เชื้อนภูตากา | 0.1                 | 3.5            | 0.6                 | 4.7            | 0.7                 | 2.3            |
| L3        | <i>Hanseniaspora occidentalis</i>  | เชื้อนจุฬารณ              | ไม่พบ               | 6.1            | ไม่พบ               | ไม่พบ          | 2.1                 | 2.1            |
| S2-1-2    | <i>Kluyveromyces africanus</i>     | เชื้อนจุฬารณ              | 0.5                 | 0.5            | 0.3                 | 0.5            | ไม่พบ               | ไม่พบ          |
| 214-1     | <i>Candida orthopsilosis</i>       | ใบไม้เชื้อน อุลรัตน์      | 2.6                 | 2.1            | 0.6                 | ไม่พบ          | 0.4                 | ไม่พบ          |
| F14-2     | <i>Candida</i> sp.                 | ดอกไม้เชื้อน อุลรัตน์     | 0.4                 | ไม่พบ          | 0.6                 | 1.6            | ไม่พบ               | 10.2           |
| S11-1     | <i>Debaryomyces</i> sp. ( New sp.) | ดินเชื้อนอุบลรัตน์        | ไม่พบ               | 0.4            | NT                  | NT             | 0.4                 | 12.6           |

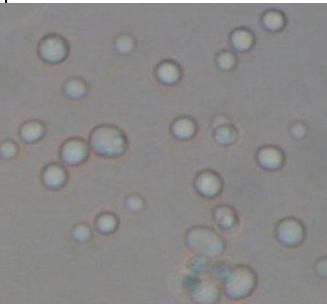
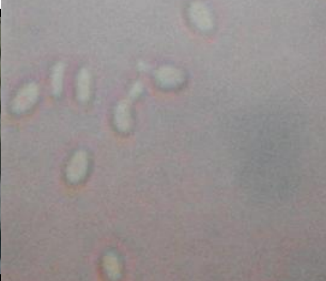
|         |                                                         |                                |       |       |       |      |       |      |
|---------|---------------------------------------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|------|-------|------|
| HFr1-5  | <i>Williopsis saturnus</i><br><i>var. subsufficiens</i> | ผลตันเชื้อ<br>เขื่อนห้วยกุ่ม   | 0.4   | 1.8   | 1.3   | 4.6  | 0.6   | 2.6  |
| HT1-9   | <i>Scheffersomyces</i> sp.<br>( New sp.)                | เปลือกตะแบก<br>เขื่อนห้วยกุ่ม  | ไม่พบ | ไม่พบ | ไม่พบ | 0.6  | ไม่พบ | 2.0  |
| HFr2-24 | <i>Candida</i> sp. (sister sp.)                         | มะหาด<br>เขื่อนห้วยกุ่ม        | 17.6  | 25.7  | NT    | NT   | 43.5  | 12.7 |
| HS1-8   | <i>Lindnera subsufficiens</i>                           | ดินเขื่อนห้วยกุ่ม              | 7.8   | ไม่พบ | NT    | NT   | 9.5   | 26.3 |
| HS1-26  | <i>Candida</i> sp. (sister sp.)                         | ดินเขื่อนห้วยกุ่ม              | ไม่พบ | 1     | 0.1   | 0.2  | ไม่พบ | 2.2  |
| HT1-6   | <i>Candida nitratorans</i>                              | ชายผ้าสีดา<br>เขื่อนห้วยกุ่ม   | ไม่พบ | 13.3  | ไม่พบ | 1.2  | ไม่พบ | 9.1  |
| HT4-37  | <i>Wickerhamomyces</i> sp.<br>(sister sp.)              | เขื่อนห้วยกุ่ม                 | 8.1   | 23.1  | 8.4   | 25.6 | 7.2   | 19.8 |
| PM05    | <i>Candida</i> sp. ( New sp.)                           | ดอกยางเขื่อน<br>จุฬาภรณ์       | 0     | 0     | NT    | NT   | 0     | 0    |
| PM34    | <i>Torulaspora</i> sp.<br>( New sp.)                    | ดินแปลงที่ 3<br>เขื่อนจุฬาภรณ์ | 0.15  | 0.82  | NT    | NT   | 0.19  | 4.37 |

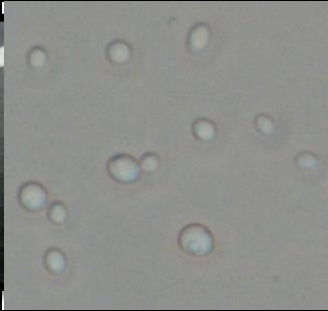
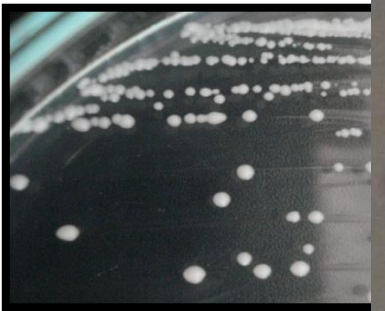
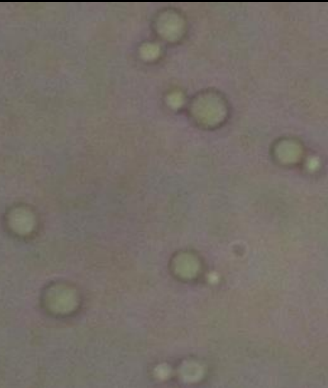
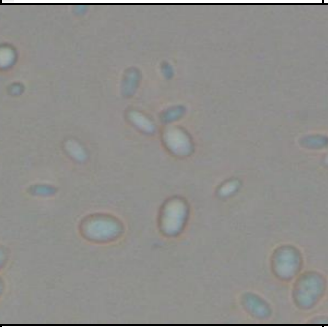
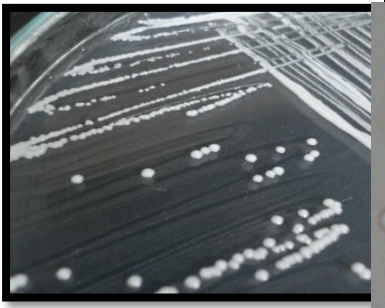
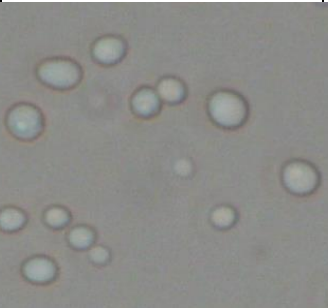
\*\*\* NT = not test

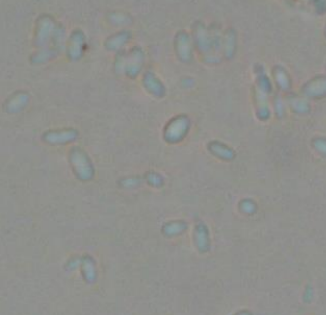
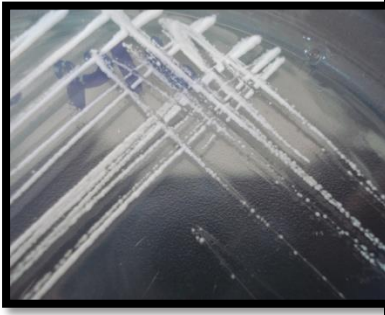
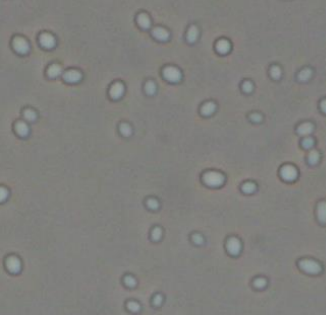
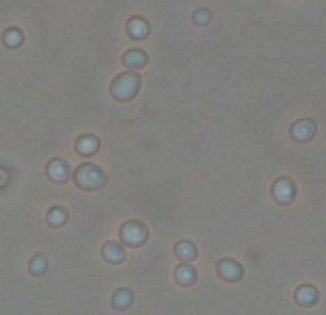
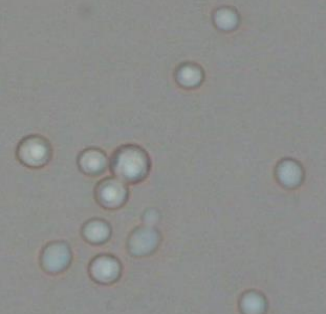
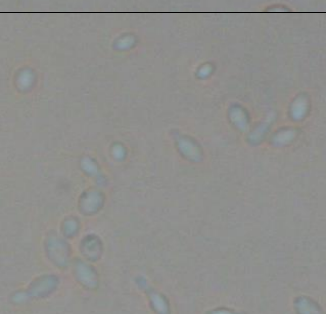
### ภาคผนวก ง

#### ลักษณะต่าง ๆ ของยีสต์

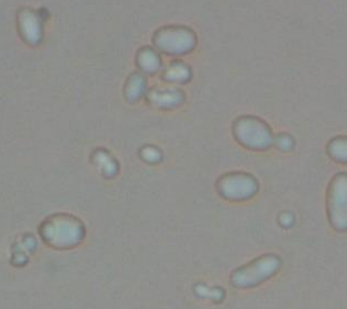
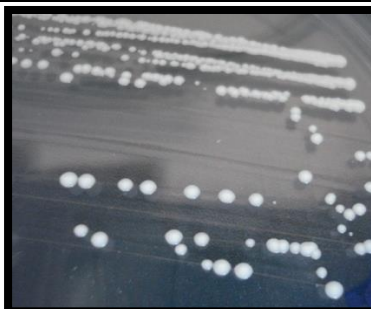
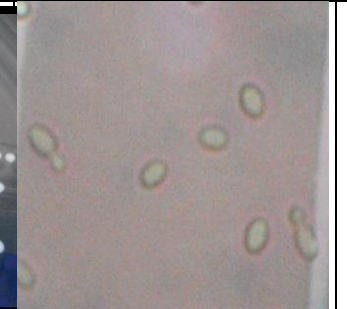
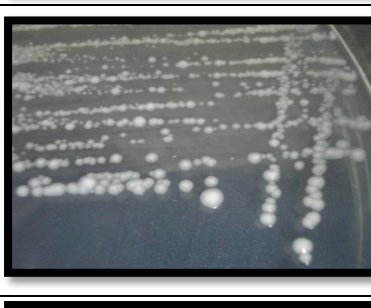
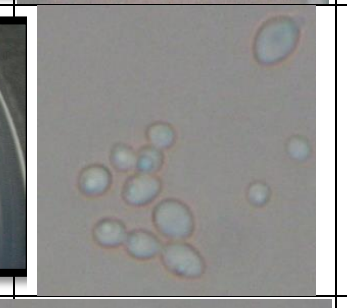
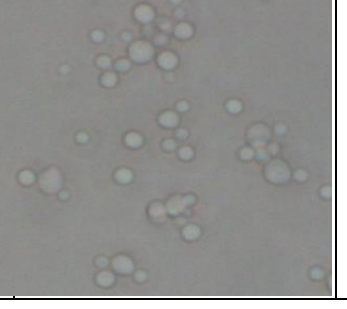
#### ตารางภาคผนวกที่ 5 ลักษณะโคโลนีและรูปร่างเซลล์ยีสต์

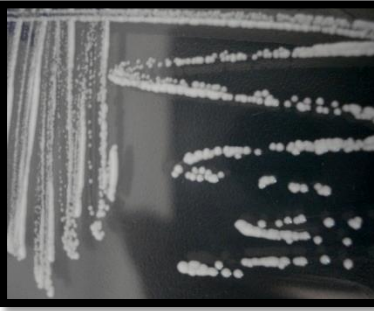
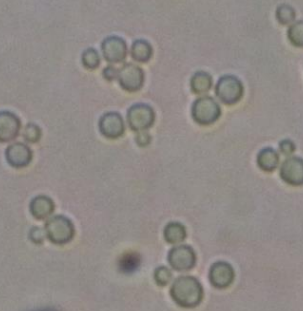
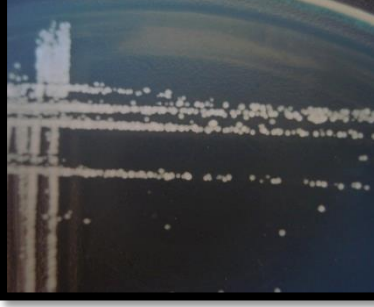
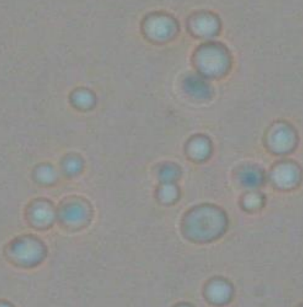
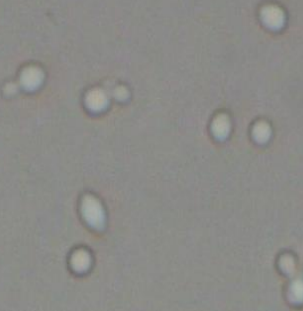
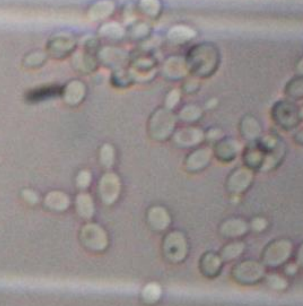
| Isolate                                     | โคโลนี                                                                              | เซลล์                                                                                | ลักษณะโคโลนีที่พบ                          |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <i>Pichia</i><br><i>guilliermondii</i> PM40 |  |  | โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br>กลม โค้งนูน มันวาว |
| <i>Candida</i> sp PM47<br>( New sp.)        |  |  | โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br>กลม โค้งนูน มันวาว |

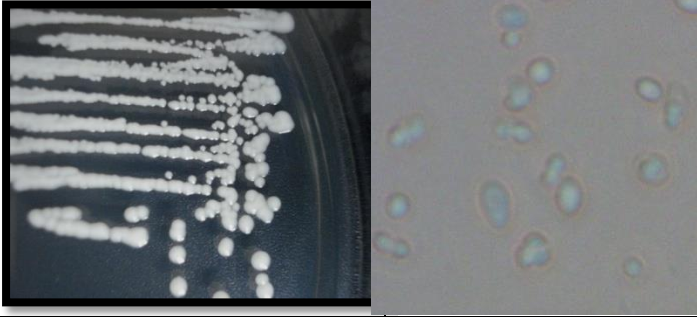
|                                                          |                                                                                     |                                                                                      |                                                    |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <p><i>Candida</i> sp. FW10</p> <p>( New sp.)</p>         |    |    | <p>โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br/>กลม โค้งนูน มันวาว</p> |
| <p><i>Candida</i> sp. PM05</p> <p>( New sp.)</p>         |    |    | <p>โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br/>กลม โค้งนูน มันวาว</p> |
| <p><i>Torulaspora</i> sp.<br/>PM34</p> <p>( New sp.)</p> |   |   | <p>โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br/>กลม โค้งนูน มันวาว</p> |
| <p><i>Kluyveromyces</i><br/><i>africanus</i> S2-1-2</p>  |  |  | <p>โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br/>กลม โค้งนูน มันวาว</p> |
| <p><i>Candida</i><br/><i>orthopsilosis</i> 109-1</p>     |  |  | <p>โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br/>กลม โค้งนูน มันวาว</p> |

|                                      |                                                                                     |                                                                                      |                                                                       |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 201-2                                |    |    | โคโลนีใหญ่ สีขาวขุ่น<br>กลม โค้งนูน ผิวด้าน<br>ขอบหยัก ตรงกลาง<br>ขาว |
| <i>Pichia fabianii</i> 204-1         |    |    | โคโลนีใหญ่ สีขาวขุ่น<br>กลม โค้งนูน มันวาว                            |
| <i>Candida orthopsilosis</i> 214-1   |   |   | โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br>กลม โค้งนูน มันวาว                            |
| <i>Candida</i> sp. F5-1<br>(New sp.) |  |  | โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br>กลม โค้งนูน ผิวด้าน                           |
| <i>Candida tropicalis</i><br>S1-1    |  |  | โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br>กลม โค้งนูน ไม่มัน<br>วาว                     |



|                                                      |                                                                                     |                                                                                      |                                             |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Candida<br/>nitrativorans</i> HFr1-3              |    |    | โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br>กลม โค้งนูน มันวาว  |
| <i>Candida</i> sp. HS1-26<br>(sister sp.)            |    |    | โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br>กลม โค้งนูน ผิวด้าน |
| <i>Wickerhamomyces</i><br>sp. HT4-37 (sister<br>sp.) |   |   | โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br>กลม โค้งนูน มันวาว  |
| <i>Hanseniaspora<br/>occidentalis</i> L3             |  |  | โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br>กลม โค้งนูน มันวาว  |
| <i>Candida</i> sp. F14-2                             |  |  | โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br>กลม โค้งนูน มันวาว  |

|                                                                            |                                                                                     |                                                                                      |                                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| <p><i>Debaryomyces</i> sp.<br/>S11-1 ( New sp.)</p>                        |    |    | <p>โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br/>กลม โค้งนูน มันวาว</p>               |
| <p><i>Williopsis saturnus</i><br/>var. <i>subsufficiens</i><br/>HFr1-5</p> |    |    | <p>โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br/>กลม โค้งนูน ผิวด้าน</p>              |
| <p><i>Scheffersomyces</i> sp.<br/>HT1-9 ( New sp.)</p>                     |   |   | <p>โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br/>กลม โค้งนูน มันวาว</p>               |
| <p><i>Candida</i> sp. HFr2-24<br/>(sister sp.)</p>                         |  |  | <p>โคโลนีใหญ่ สีขาวขุ่น<br/>กลม โค้งนูน ขอบ<br/>หยัก ผิวด้าน</p> |
| <p><i>Lindnera</i><br/><i>subsufficiens</i> HS1-8</p>                      |  |  | <p>โคโลนีใหญ่ สีขาวขุ่น<br/>กลม โค้งนูน ผิว<br/>ขรุขระ</p>       |

|                                                          |                                                                                    |                                                   |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <p>HT1-6<br/><i>Candida</i><br/><i>nitrativorans</i></p> |  | <p>โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น<br/>กลม โค้งมน มันวาว</p> |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|