

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสจากยีสต์ที่ได้คัดเลือกแล้วจาก ป่าภูตาคา เชื้อนจุฬารักษ์ และ เชื้อนอุบลรัตน์

พลังงานเป็นปริมาณพื้นฐานอย่างหนึ่งของกระบวนการในระบบทางกายภาพชนิด พลังงานในระบบเหล่านี้ ที่สภาวะหนึ่งๆจะทำให้ได้งาน ที่ต้องใช้ในการเปลี่ยนจากสภาวะแรกเริ่ม ไปยังสภาวะต่าง ๆ และปัจจุบันพลังงานหลักที่มนุษย์นำมาใช้ ได้มาจากฟอสซิล (น้ำมันปิโตรเลียม แก๊สธรรมชาติ และถ่านหิน) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลก ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต อีกทั้งยังมีราคาแพงและกำลังจะหมดสิ้นไป ดังนั้นการพัฒนาพลังงานทดแทนที่เราสามารถผลิตได้เองมาใช้ทดแทนพลังงานที่กำลังจะหมดไป จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการบรรเทาปัญหาและแก้ปัญหาต่างๆ ที่เป็นผลมาจากการใช้พลังงานฟอสซิล รวมทั้งช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อภาวะโลกร้อน และยกระดับคุณภาพชีวิตของประชาชน พลังงานสะอาดเป็นทางเลือกหนึ่งของการใช้พลังงานที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

จากโครงการวิจัยการกระจายตัวของยีสต์บริเวณป่าภูตาคา เชื้อนจุฬารักษ์ เชื้อนอุบลรัตน์ โครงการย่อยภายใต้ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้ศึกษาและเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของยีสต์ที่มีคุณสมบัติพิเศษต่างๆ ที่น่าสนใจเพื่อจะนำมาใช้ประโยชน์จากการศึกษาดังกล่าวสามารถแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสได้จำนวนหลายสายพันธุ์และเป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย เปลือกมันสำปะหลัง ให้ได้เป็นน้ำตาล จากนั้นน้ำตาลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์โดยกระบวนการหมักโดยยีสต์ ทำให้ต้นทุนในการผลิตเอทานอลต่ำลงประกอบกับมีแหล่งพลังงานทดแทนเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการทำให้ผลผลิตทางการเกษตรที่มีราคาต่ำของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาใช้ในการเกิดประโยชน์ และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้ผลผลิตดังกล่าวอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และ บีต้ากลูโคซิเดส จากยีสต์ที่คัดแยกได้จาก จากเชื้อนภูตาคา เชื้อนจุฬารักษ์ เชื้อนอุบลรัตน์ และเชื้อนห้วยกุ่ม

วิธีดำเนินการวิจัย ทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสยีสต์ จาก stock มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร YM agar plate เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้น point inoculation เชื้อลงบนอาหาร CMC agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการสร้าง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยวาด congo red ลงบริเวณผิวหน้าอาหารที่มีเชื้ออยู่ จากนั้นดูโซนใสที่เกิดขึ้นยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ได้จะเห็นโซนใส รอบๆ โคลนี วัดขนาดโซนใส และขนาดของเซลล์ยีสต์ การทดสอบการสร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส นำเชื้อยีสต์มา point inoculation เชื้อลงบนอาหาร Yeast Nitrogen Base ที่ไม่มี amino acids (YNB) agar plate ที่มี 0.004%(w/v) MUG(4-methylumbelliferyl- β -glucoside) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้าง บีต้ากลูโคซิเดส โดยเชื้อที่สามารถ บีต้ากลูโคซิเดส ได้จะเรืองแสงรอบโคโลนี เมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต การจัดจำแนกประเภทยีสต์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 โดยการสกัดดี

เอนเอ จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ บริเวณ D1/D2 ของ 26s rDNA โดยใช้ PCR และ ทำดีเอ็นเอของผลผลิตของ PCR ให้บริสุทธิ์ และเตรียมดีเอ็นเอหลังจาก sequencing และนำไปวิเคราะห์โดย Automate DNA Sequencer วิเคราะห์ sequences เทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยวิธี BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลล์ในอาหารเหลว โดยนำยีสต์สร้างเอนไซม์ในกลุ่มเซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหาร YPD broth บ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาศึกษาการเจริญของยีสต์โดยวิธี direct count และ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มเซลล์การศึกษาคุณลักษณะของ เอนไซม์ ผลิตเอนไซม์เซลล์และปฏิกูลโคซิเดสจากจะยีสต์ จากนั้นนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสับสเตรต น้ำตาล ฟิเอช อุณหภูมิ ที่มีผลการผลิตเอนไซม์

ผลการวิจัย งานวิจัยครั้งนี้ได้คัดเลือกยีสต์มาทำการศึกษา 16 สายพันธุ์ คือ ยีสต์ที่สร้าง คาร์บอกซีเมทิล เซลลูเลส 8 ชนิด และ ปฏิกูลโคซิเดส 8 ชนิด โดยทำการศึกษาแหล่งคาร์บอน, ฟิเอช และอุณหภูมิเริ่มต้นของ อาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมต่อการสร้าง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และ ปฏิกูลโคซิเดส โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ใน อาหารเหลว YP (1% yeast extract, 2% peptone, pH 5.0) ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันคือ 1% กลูโคส, 1% CMC, 1% ฟางข้าว และ 1% ชานอ้อย , มี pH ที่แตกต่างกันในช่วง 4-7 , อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต เอนไซม์แตกต่างกันคือ 25 , 30, 35 °C เมื่อศึกษาการเจริญและสร้าง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ผลจากการศึกษา พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ เจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้กลูโคสและ CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 25 °C โดยเชื้อ *Candida* sp. (New sp.) สามารถสร้าง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ได้มากที่สุดคือ 73.52 U/ml เมื่อศึกษาการเจริญและสร้าง ปฏิกูลโคซิเดส พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ เจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 25 °C โดยเชื้อ *Wickerhamomyces* sp. (sister sp.) สามารถ สร้าง ปฏิกูลโคซิเดส ได้มากที่สุดคือ 52.78 U/ml ซึ่งจะนำเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ ไปใช้ในการพัฒนาการผลิตไบโอเอทานอลต่อไป

ข้อเสนอแนะการวิจัย ควรมีการต่อยอดงานวิจัยทางด้านการผลิตเอนไซม์และนำไปย่อยสลายวัสดุทาง การเกษตรเพื่อให้ได้น้ำตาลสำหรับหมักการผลิตไบโอเอทานอล และ ควรมีการต่อยอดงานวิจัยทางด้านคุณสมบัติ ของเอนไซม์และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำวิจัยต่อไป