บทคัดย่อ

T163719

ในการทดลองนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดแยกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่เจริญที่อุณหภูมิสูงจากแหล่งธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสำหรับการผลิตเอทานอลต่อไป

จากการเก็บตัวอย่างดินและเศษซากพืชที่เกิดการย่อยสลายมาทั้งหมด 160 ตัวอย่าง สามารถทำการคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิสูงโดยสังเกตจากความสามารถในการใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1 เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารทดสอบ Czapex's dox medium ได้ 377 ไอโซเลต ในการย่อยสลาย Carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) เพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในขั้นตอนที่ 2 โดยสังเกตจากวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น พบว่ามีเชื้อราที่เกิดวงใส 359 ไอโซเลต คิดเป็น 95.22 เปอร์เซ็นต์ จากเชื้อราทั้งหมดและคัดแยกเชื้อรา 11 ไอโซเลตมาทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในขั้นตอนการคัดแยกขั้นสุดท้ายในระดับฟลาสก์ด้วยอาหารสูตร production medium พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ D2 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ β-glucosidase ที่อุณหภูมิ 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส สูงสุด 0.3034, 0.3122 และ 0.3228 U/ml ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์มาตรฐาน *Trichoderma reesei* QM 9414 และจากการคำนวณทางสถิติพบว่าสายพันธุ์ D2 มีค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ β-glucosidase ไม่แตกต่างที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ผู้วิจัยจึงคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ D2 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ β-glucosidase สูงสุด คือ 0.3044 U/ml เข้าสู่ขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งพบว่าแหล่งไนโตรเจนและpHที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ แอมโมเนียมไนเตรท และ pH4 ซึ่งให้ค่า unit of enzyme ของเอนไซม์ β-glucosidase สูงสุด คือ

0.3526 U/ml และ เชื้อรา D2 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดในวันที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ จากการจัดจำแนกสายพันธุ์พบว่า เชื้อรา D2 จัดอยู่ในจีนัส *Penicillium* sp.

จากการผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (SSF) ซึ่งอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์จากเชื้อราที่คัดเลือกไว้ (*Penicillium* sp.) กับเชื้อยีสต์ *Candida krusei* NBRC1664 และเอนไซม์จากเชื้อรา *T. reesei* QM9414 กับเชื้อยีสต์ *C. krusei* NBRC1664 โดยมี microcrystalline cellulose และปอสาเป็นวัสดุหมักซึ่งใช้หัวเชื้อยีสต์เริ่มต้น $3X10^9$ cell/ml พบว่า การผลิตเอทานอลจากเอนไซม์ของเชื้อรา *Penicillium* sp. กับเชื้อยีสต์ *C. krusei* NBRC1664 โดยมีmicrocrystalline cellulose และปอสาเป็นวัสดุหมักสามารถให้ผลผลิตเอทานอลได้ 0.0298% (0.0099 g/g substrate) และ 0.0328 (0.0109 g/g substrate) ตามลำดับ ส่วนการผลิตเอทานอลจากเอนไซม์จากเชื้อรา *T. reesei* QM9414 กับเชื้อยีสต์ *C. krusei* NBRC1664 โดยมีmicrocrystalline cellulose และปอสาเป็นวัสดุหมักสามารถให้ผลผลิตเอทานอลได้ 1.6282% (0.5427 g/g substrate) และ 1.3766%(0.4588 g/g substrate) ตามลำดับ

Abstract

TE 163719

The objectives of studies were to screen the natural thermotolerant cellulolytic fungi for cellulase production and ethanol production.

Thermotolerant cellulolytic fungi had been isolated from 160 samples with lignocellulolytic materials collected from various places. Primary screening test had been done by culturing in Czapex'dox medium. The 377 isolates were then cultured on Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC agar) for secondary screening. The results shown 359 isolates were thermotolerant cellulolytic fungi, which are 95.22% of the total isolates. Among 359 isolates, 11 isolates which produced higher cellulolytic enzyme, were selected for culturing in a shake flask culture system. The yield of β-glucosidase produced from D2 isolate cultured at the temperature of 40, 45, and 50 °C were 0.3044, 0.3122, and 0.3228 U/ml, respectively. These values were found to be higher than the *Trichoderma reesei* QM9414 which is used as a standard control. Howerever, the statistical analysis of unit of enzyme showed no significanily different when cultured at 40, 45, and 50 °C. The condition at 40 °C were then selected for optimization experiments for cellulase production. Nitrogen source and pH optimum for cellulase production were ammoniumnitrate and pH4, which showed highest unit of β-glucosidase

enzyme 0.3526 U/m. The D2 isolate produced the maximum activity of cellulase on the 15th day of enzyme production and had the maximum growth rate on the 7th day of culturing. The D2 isolate was identified as *Penicillium* sp.

The ethanol production by using the method of Simulteneous Saccharification and Fermentation (SSF) involving *Penicillium* sp. with *Candida krusei* NBRC1664 and *T. reesei* QM9414 with *C. krusei* NBRC1664 , which was used microcrystalline cellulose and Paper Mulberry as fermented material, 3×10^9 cell/ml yeast inoculum.The results showed that ethanol production by using SSF involving *Penicillium* sp. with *C. krusei* NBRC1664 which was used microcrystalline cellulose and Paper Mulberry as fermented material gave the ethanol yield of 0.0298% (0.0099 g/g substrate) and 0.0328 (0.0109 g/g substrate), respectively. The ethanol production by using SSF involving *T. reesei* QM9414 with *C. krusei* NBRC1664 , which was used microcrystalline cellulose and Paper Mulberry as fermented material gave the ethanol yield of 1.6282% (0.5427 g/g substrate) and 1.3766%(0.4588 g/g substrate), respectively.