บทคัดย่อ

การขาดแคลนพลังงานเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยและโลกปัจจุบัน เนื่องจากนับวันจะหมดไปและส่งผลให้ราคาแพงขึ้น ไบโอเอทานอลเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจาก ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมและยังสามารถผลิตได้จากวัสดุทางการเกษตร เซลลูโลไลติกเอนไซม์เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส จึงได้มีการพัฒนานำมาใช้ประโยชน์ทางด้านผลิตไบโอเอทานอล จากคัดเลือกยีสต์และราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลไลติกเอนไซม์ โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างใบไม้ ดอกไม้ ผลไม้ และดิน รวมทั้งหมด 48 ตัวอย่าง จากจังหวัดชัยภูมิ คัดแยกยีสต์สายพันธุ์ *Pichia fabianii* 204-1 สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูเลส และยีสต์ *Candida glabrata* S1-1 สามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูง ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ *Penicillium oxalicum* HS1-3 สามารถผลิตเอนไซม์เอนไซม์คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูเลส และเบต้ากลูโคซิเดสได้สูง เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเซลลูโลไลติกเอนไซม์จาก *P. fabianii* 204-1, *C. glabrata* S1-1 และ *P. oxalicum* HS1-3 โดยใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *P. fabianii* 204-1 สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ได้สูงสุดคือ 32.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตร *Candida glabrata* S1-1 สามารถผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคสิเดสสูงที่สุด คือ 17.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ *P. oxalicum* HS1-3 ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุด เบต้ากลูโคซิเดสได้ 217.59 U/ml และ 23.64 U/ml ตามลำดับ จากปรับสภาพชานอ้อยวิธีทางเคมีโดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับความร้อน 121°C เป็นเวลา 60 นาที ได้น้ำตาล 28.01 กรัมต่อลิตร เมื่อนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยวิธีทางเคมีมาแล้ว มาย่อยสลายด้วยเซลลูโลไลติกเอนไซม์จากยีสต์และรา ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 0.513 กรัมต่อกรัมชานอ้อย หลังจากนั้นหมักร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* ได้เอทานอลสูงสุด คือ 0.290 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เมื่อเลี้ยงยีสต์เป็นเวลานาน 10 วัน ดังนั้นการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ประเภทชานอ้อย เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับนำมาใช้ในการผลิตพลังงานทดทนประเภทไบโอเอทานอลได้

คำสำคัญ: คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส บีต้ากลูโคซิเดส ชานอ้อย ไบโอเอทานอล

Abstract

Insufficient energy is a major problem of Thailand and almost country in the world. Energy source is decline that result to high market price. Bioethanol is an environmentally friendly and renewable energy that can be produced from agricultural feed stocks. Cellulosic material is hydrolyzed to glucose by synergistically of carboxymethyl cellulase and β–glucosidase. Cellulolytic enzymes are industrially important hydrolytic enzyme and production economic of bioethanol. In this study, *Pichia fabianii* 204-1 which produced high carboxymethylcellulase, *Candida glabrata* S1-1 which high β-glucosidase and *Penicillium oxalicum* HS1-3 which high both carboxymethylcellulase and β-glucosidase were isolated from leaf, flower, fruit and soil samples. The cellulolytic enzyme productions were studied by using bagasse as substrate, carboxymethyl cellulase and β–glucosidase production from *P. fabianii* 204-1 and *C. glabrata* S1-1 was 32.55 and 17.98 units/ml, respectively. Both carboxymethyl cellulase and β–glucosidase production from *P. oxalicum* HS1-3 was 217.59 and 23.64 units/ml, respectively. After pretreatment of bagasse with 1% H_2SO_4 at 121°C, 60 min, reducing sugar was found 28.01 g/L. After cellulosic pretreatment, cellulolytic enzymes were added and incubated at 50°C for 72 h and then reducing sugar was found 0.513 g/g bagasse. The reducing sugar was fermented by *Saccharomyces cerevisiae* and bioethanol was detected 0.290 % (v/v) after 10 days of fermentation. Therefore, bioethanol could be produce as alternative energy from bagasse.

Key words: carboxymethyl cellulase, β–glucosidase, bagasse, bioethanol

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณาจารย์ และบุคลากรของภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนการวิจัยเป็นอย่างดี ขอขอบคุณ นางสาวสมพร สาระวัน นางสาวคัทลียา ยุรยาตร์ นางสาวดวงเพ็ญ บุตรสุวรรณ์ และ นางสาวดวงดาว คำประเสริฐ นักศึกษาช่วยงานวิจัย ที่ช่วยให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 มหาวิทยาลัยขอนแก่น

จุฑาพร แสวงแก้ว
พฤศจิกายน 2555

สารบัญ

เรื่อง	**หน้า**
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค

สารบัญ ง
สารบัญตาราง จ
สารบัญรูป ฉ
บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 วรรณกรรมเกี่ยวข้อง 5
บทที่ 3 วัสดุและอุปกรณ์ 29
บทที่ 4 วิธีดำเนินงานวิจัย 31
บทที่ 5 ผลการทดลอง 35
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย 59
เอกสารอ้างอิง 62
ภาคผนวก 65

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 5.1	ราไอโซเลตที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง	37
ตารางที่ 5.2	ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสบนอาหารแข็ง	39
ตารางที่ 5.3	ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสโดยยีสต์ในอาหารเหลวเมื่อเลี้ยงเชื้อ	43
ตารางที่ 5.4	จำนวนเซลล์ของ *P. fabianii* 204-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ	48
ตารางที่ 5.5	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของไอโซเลต *Pichia fabianii* 204-1	49
ตารางที่ 5.6	จำนวนเซลล์ของ *C. tropicalis* S1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ	50
ตารางที่ 5.7	ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสไอโซเลต S1-1 ในอาหารวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	51
ตารางที่ 5.8	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเมื่อย่อยสลายด้วยเซลลูไลติกเอนไซม์จากเชื้อรา *P. oxalicum* HS1-3 ยีสต์ *Pichia fabianii* 204-1 และ *Candida glabrata* S1-1	56

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
รูปที่ 1.1	พลังงานทดแทน	3
รูปที่ 2.1	โครงสร้างของเซลลูโลส ก) โครงสร้างโมเลกุล ข) ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	5
รูปที่ 2.2	เส้นใยเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชชั้นสูง	6
รูปที่ 2.3	โครงสร้างของเซลลูโลส	7
รูปที่ 2.4	องค์ประกอบของเซลลูโลสในพืช	8
รูปที่ 2.5	กระบวนการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส	9
รูปที่ 2.6	โครงสร้างผนังเซลล์พืช	10
รูปที่ 2.7	การ pretreatement เพื่อทำลายโครงสร้างลิกนินออกจากเซลลูโลส	12
รูปที่ 2.8	กระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเซลลูโลไลติกเอนไซม์	14
รูปที่ 2.9	กระบวนการทำงานของ ball mill	15
รูปที่ 2.10	*เชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูโลไลติกเอนไซม์*	*16*
รูปที่ 2.11	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแบบ submerged culture และแบบ solid substrate cultivation	18
รูปที่ 2.12	โครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลส	19
รูปที่ 2.13	ปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์เซลลูเลส	20
รูปที่ 2.14	โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล	22
รูปที่ 2.15	กระบวนการหมักเอทานอล	24
รูปที่ 2.16	วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	25
รูปที่ 2.17	รูปร่างของยีสต์	28
รูปที่ 5.1	การสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสบนอาหารแข็งของเชื้อ *C. tropicalis* S1-1	35
รูปที่ 5.2	การสร้างเอนไซม์ บีต้ากลูโคซิเดส บนอาหารแข็งของเชื้อ *C. tropicalis* S1-1	36
รูปที่ 5.3	ราไอโซเลต HS1-3 ที่ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ตรวจสอบโดยการราดด้วย congo red	37
รูปที่ 5.4	ราไอโซเลต HS1-3 ที่ผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ตรวจสอบโดยส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต	39
รูปที่ 5.5	จำนวนเซลล์ของ *P. fabianii* 204-1 ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆกัน	41
รูปที่ 5.6	กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก extracellular enzyme ของ *P. fabianii* 204-1	42

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
รูปที่ 5.7	กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ whole cell จากเชื้อ *P. fabianii* 204-1	42

รูปที่ 5.8	จำนวนเซลล์ของ *C. tropicalis* S1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน	43
รูปที่ 5.9	การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดย *P. oxalicum* HS1-3	45
รูปที่ 5.10	การผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสโดย *P. oxalicum* HS1-3	46
รูปที่ 5.11	การเจริญของเชื้อรา *P. oxalicum* HS1-3 โดยการหาน้ำหนักแห้ง	47
รูปที่ 5.12	จำนวนเซลล์ของ *Pichia fabianii* 204-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างกัน	48
รูปที 5.13	กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *Pichia fabianii* 204-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างกัน	49
รูปที่ 5.14	จำนวนเซลล์ของ *Candida tropicalis* S1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างกัน ต่างกัน	50
รูปที่ 5.15	กิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส ของ *Candida tropicalis* S1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 15 วัน	51
รูปที่ 5.16	กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เมื่อเลี้ยง *P. oxalicum* HS1-3 ในอาหารที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในสภาวะการหมักแบบแห้ง	52
รูปที่ 5.17	กิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูโคสิเดส เมื่อเลี้ยง *P. oxalicum* HS1-3 ในอาหารที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในสภาวะการหมักแบบแห้ง	53
รูปที่ 5.18	ปริมาณของโปรตีน เมื่อเลี้ยง *P. oxalicum* HS1-3 ในอาหารที่มีชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะการหมักแบบแห้ง	54
รูปที่ 5.19	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟิวริก	55
รูปที่ 5.20	ลักษณะของชานอ้อยเมื่อถูกย่อยด้วยกรดซัลลฟิวริกและความร้อน	56
รูปที่ 5.21	การผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* เมื่อเลี้ยงในชานอ้อยที่ผ่านการ pretreatment และ enzyme hydrolysis	57