บทความวิจัย

การผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำด้วยกระบวนการหมักแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) และ Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF)

สุขุมาภรณ์ กระจ่างสังข์[1*], วัลลภา หล่อเหลี่ยม[1], ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย[1], สิริรักษ์ ศรวณียารักษ์[1], อรอนงค์ พริ้งศุลกะ[1] และ วิเชียร กิจปรีชาวนิช[2]

บทคัดย่อ

ปัจจุบันนี้เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญและมีการนำไปใช้กันอย่างแพร่หลาย การศึกษาเพื่อลดต้นทุนการผลิตจึงมีความสำคัญโดยเฉพาะกระบวนการผลิตและวัตถุดิบที่ใช้ควรมีราคาถูก มีปริมาณมาก ซึ่งวัชพืชน้ำเป็นสารประกอบจำพวกลิกโนเซลลูโลสชนิดหนึ่งซึ่งมีปริมาณมากในแหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศไทย สามารถนำมาเพิ่มมูลค่าได้แทนการนำไปทิ้งหรือเผาเพื่อกำจัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำวัชพืชน้ำมาใช้ในการผลิตเอทานอลโดยได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท OK1103 จากตัวอย่างดินซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดบนอาหาร CMC congo red agar และในอาหารเหลวที่มีวัชพืชน้ำเป็นสับสเตรท และเมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวโดยใช้การหาลำดับเบสของยีนบริเวณ 16S rRNA และการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากไอโซเลท OK1103 พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CMC broth ที่มีวัชพืชน้ำที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับเสตรท ใช้เคซีนที่ความเข้มข้น 1% (w/v) และทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 540 U/mL เมื่อทำการศึกษากระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล โดยใช้เชื้อไอโซเลท OK1103 และ *Saccharomyces cerevisiae* ภายใต้กระบวนการหมักแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) และ Separate hydrolysis and fermentation (SHF) พบว่าเมื่อใช้การหมักแบบ SSF สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 14 g/L เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่ากระบวนการหมักแบบ SHF ที่ผลิตได้ 10 g/L ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากระบวนการ SSF เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลได้และสามารถลดระยะเวลาในการหมักให้สั้นลงเหลือ 36 ชั่วโมง รวมทั้งลดการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าในขั้นตอนการไฮโดรไลซ์วัสดุจำพวกลิโนเซลลูโลสได้

คำสำคัญ: เอทานอล วัชพืชน้ำ กระบวนการหมักแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) และ Separate hydrolysis and fermentation (SHF)

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: sukhumaporn@g.swu.ac.th

Ethanol Production from Aquatic Weed under Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) and Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF)

Sukhumaporn Krajangsang[*a], Wanlapa Lorliam[a], Nuttika Suwannasai[a], Sirirak Sarawaneeyarak[a], Onanong Pringsulaka[a] and Vichien Kitpreechavanich[b]

ABSTRACT

Nowadays, ethanol is an important energy source and has been used in various applications. The study of ethanol production is mainly focused on reducing costs of production and material. Aquatic weed is lignocellulosic compound which could be collected from various water sources in Thailand. It can be utilized to value added product such as ethanol instead of burning or disposal to the environment. This present work, we aimed to utilize aquatic weed as substrate for ethanol production. Strain OK1103 was isolated from soil and showed the highest cellulase activity on CMC congo red agar plate and broth. This strain was identified as *Bacillus subtilis* based on 16S rRNA gene sequencing and morphological studies. The optimization of cellulase production was investigated. The maximum activity was achieved with 540 U/mL when using aquatic weed as substrate in CMC broth, casein as nitrogen source with 1% (w/v) and incubated at room temperature for 3 days. After that the fermentation process for ethanol production was studied by using strain OK1103 and *Saccharomyces cerevisiae* under simultaneous saccharification and fermentation (SSF) and separate hydrolysis and fermentation (SHF). The SSF could achieve ethanol concentration of 14 g/L by using aquatic weed as substrate for 36 h which higher than the SHF process of 10 g/L. This report demonstrates SSF is suitable for ethanol production because of it can reduce fermentation time to 36 h and decrease the utilization of commercial cellulase in hydrolysis step of lignocellulosic material.

Keywords: ethanol, aquatic weed, SSF, SHF

[a]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Watthana, Bangkok, 10110, Thailand
[b]Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Jatujak, Bangkok, 10900, Thailand
[*]Corresponding author, e-mail: sukhumaporn@g.swu.ac.th

บทนำ

สารลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) เป็นชีวมวลที่พบมากที่สุดในโลกซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช โครงสร้างของสารชนิดนี้ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ในส่วนของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสนั้นเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาล เมื่อผ่านการไฮโดรไลซ์แล้วสามารถนำน้ำตาลเหล่านี้ไปใช้ในกระบวนการหมักเพื่อเปลี่ยนเป็นสารต่างๆ ที่เพิ่มมูลค่าได้ เช่น เอทานอล และกรดแลกติก เป็นต้น [1] ในขั้นตอนการผลิตน้ำตาลสำหรับใช้ในการหมักสารชีวมวลส่วนใหญ่มี 2 ขั้นตอน คือ กระบวนการปรับสภาพ (pre-treatment) สารลิกโนเซลลูโลสเพื่อกำจัดลิกนินหรือทำลายโครงสร้างภายในทำให้เอนไซม์ย่อยสลายได้ง่ายขึ้น และกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้น้ำตาลชนิดต่างๆ แล้วนำไปใช้ในกระบวนการหมักได้ กระบวนการ pretreatment สารลิกโนเซลลูโลสนั้นทำได้หลายวิธี เช่น กระบวนการทางกายภาพโดยใช้การบด การฉายรังสี การใช้แรงดันสูงเพื่อเพิ่มพื้นที่และขนาดรูพรุนลด ปริมาณการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชั่น เพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น [2-4] กระบวนการทางเคมี เช่น ใช้กรด เบส แก๊ส oxidizing agent หรือการสกัดด้วยตัวทำละลาย [5] เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล โดยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์เป็นแหล่งที่สำคัญซึ่งปัจจุบันสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางอุตสาหกรรม เช่น ทางด้านอาหาร เส้นใย สารซักฟอก อาหารสัตว์ กระดาษ ยา การกำจัดของเสีย และที่สำคัญคือใช้ในการผลิตพลังงานชีวภาพ [6] การศึกษาการใช้สารลิกโนเซลลูโลสและเอนไซม์จากจุลินทรีย์เพื่อการผลิตพลังงานชีวภาพนั้นได้มีผู้ศึกษากันอย่างกว้างขวาง เช่น Kurakake และคณะ [7] นำฟางข้าวมาผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดแล้วนำไปหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อผลิตเอทานอล ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ผลผลิตประมาณ 80% ด้วยวิธีการหมักแบบ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ต่อมา Laver และคณะ [8] รายงานว่า สามารถผลิตเอทานอล จากวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส (ฟางข้าวสาลี) โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* ผ่านกระบวนการหมักแบบแห้ง และนำ crude enzyme ที่ได้ไปทำการย่อยและผลิตเอทานอลแบบขั้นตอนเดียว ทำให้สามารถประหยัดการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าและเอนไซม์ที่ใช้ไม่ต้องการกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้ และในปี 2011 [9] ได้มีผู้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวด้วยการหมักแบบ co-culture โดยการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* และ *Pichia stipitis* ซึ่งสามารถหมักน้ำตาล hexose และ pentose ได้ทำให้สามารถผลิตเอทานอลได้ 12 g/L และมีผลผลิต 95% ในปีเดียวกัน Delgenes และคณะ [10] ประสบความสำเร็จในการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ 4 ชนิด คือ *S. cerevisiae, P. stipitis, Zymomonas mobilis* และ *Candida shehatae* โดยใช้สารลิกโนเซลลูโลสเป็นสับสเตรท ในปัจจุบันได้มีการนำสารลิกโนเซลลูโลสมาใช้ผลิตเป็นเอทานอลกันอย่างกว้างขวางรวมทั้งมีการเพิ่มกำลังการผลิตมากขึ้น เช่น ประเทศแคนาดามีการผลิตเอทานอลจาก ฟางข้าวสาลี ข้าวบาร์เล่ย์ และข้าวโอ๊ตในระดับอุตสาหกรรมโดยมีผลผลิตสูงถึง 70,000 ตันเอทานอลต่อเอเคอร์ นอกจากนี้ในประเทศอื่นๆ เช่น สเปน เดนมาร์ก สหรัฐอเมริกา และสวีเดนได้มีแนวคิดก่อตั้งโรงงานผลิตเอทานอล จากสารจำพวกลิกโนเซลลูโลสด้วยเช่นกัน ซึ่งจากผลงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าส่วนใหญ่แล้วการผลิตเอทานอลจะใช้ลิกโนเซลลูโลสจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว แกลบ รำข้าว เป็นต้น แต่เมื่อพิจารณาสารลิกโนเซลลูโลสชนิดอื่นจำพวกวัชพืชน้ำ เช่น จอก แหน หรือผักตบชวานั้น สามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้อีกมากมาย วัชพืชน้ำเหล่านี้มีองค์ประกอบที่เป็น

เซลลูโลสประมาณ 30% นอกจากนี้ยังพบว่ามีปริมาณโปรตีนประมาณ 10-20% ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และยังสามารถนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลได้อีกด้วย โดยในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ประโยชน์จากวัชพืชน้ำ จากเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกับยีสต์เพื่อผลิตเอทานอล

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

นำตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณที่มีการทับถมของเศษซากพืช ในจังหวัด นครนายก ปราจีนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ จำนวนทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 กรัม มาทำการเจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมจากนั้นนำไป spread plate บนอาหาร carboxymethyl cellulose congo red agar ซึ่งปรับปรุงจาก Shaikh และคณะ [11] (K_2HPO_4, 0.5 g/L; $MgSO_4$, 0.25 g/L; CMC Sodium salt, 1.88 g/L; Congo red, 0.001 g/L; Gelatin, 2 g/L; Soil extract, 66.7 g/L; Agar; 15 g/L) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เลือกโคโลนีที่สามารถสร้างบริเวณใสรอบโคโลนีมาทำให้บริสุทธิ์และเก็บเชื้อไว้ใช้ศึกษาต่อไป เมื่อได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดแล้วนำไปทำการจัดจำแนกโดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา การย้อมสีแกรม และการหาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene โดยใช้ Universal primer 27F และ 1492R (5′ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3′ และ 5′ TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3′) ตามลำดับ นำลำดับเบสที่ได้มา Blast โดยใช้ฐานข้อมูลจาก National Center of Biotechnology Information (NCBI)

2. ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ในอาหาร CMC broth

นำเชื้อที่แยกได้แต่ละไอโซเลทมาศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร carboxymethyl cellulose congo red agar โดยสังเกตจากการสร้างบริเวณใสรอบโคโลนี ทำได้โดยนำแต่ละไอโซเลทมาจุดลงบนอาหารดังกล่าวจากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วันจากนั้นสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ โคโลนี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างบริเวณใสบนอาหารสูงที่สุด จำนวน 6 ไอโซเลทมาศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลว โดยนำเชื้อแต่ละไอโซเลทเลี้ยงในอาหาร CMC broth (Carboxymethyl cellulose CMC, 10 g/L; Yeast extract, 2.40 g/L; Peptone, 5.10 g/L; NaCl, 5.10 g/L; $CaCl_2$, 1.50 g/L) ปริมาตร 50 mL ในฟลาสก์ขนาด 250 mL บ่มที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามวิธีของ Sethi และคณะ [12] นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°C เก็บของเหลวที่อุณหภูมิ 44°C เพื่อนำไปวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

สารตั้งต้นที่ใช้คือ 1% (w/v) CMC ใน Sodium acetate buffer pH 4.6 ปริมาตร 0.5 mL จากนั้นผสมกับเอนไซม์ 0.5 mL ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย Dinitrosalisalicylic acid (DNS) ปริมาตร 0.5 mL นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นทันที เติมน้ำกลั่น 2.5 mL และนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ตามวิธีของ Sethi และคณะ [12] โดยทำกราฟมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 100-2000 μg/mL ซึ่ง 1 หน่วยของเอนไซม์คือปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย CMC และปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคส 1 μg/mL ต่อนาทีภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

4. การศึกษากระบวนการปรับสภาพวัชพืชน้ำเพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

นำวัชพืชน้ำคือ จอก แหน ที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการต่างๆ โดยปรับจากวิธีการของ Taherzadeh และคณะ [5] ดังนี้ วิธีที่ 1 นำวัชพืชน้ำที่อบแห้งปริมาณ 100 กรัมเติม 1% (v/v) H_2SO_4 100 mL นำไปไฮโดรไลซ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิธีที่ 2 นำวัชพืชน้ำที่อบแห้งมาเติม 1% (v/v) H_2SO_4 นำไปไฮโดรไลซ์ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที วิธีที่ 3 นำวัชพืชน้ำที่อบแห้งมาเติม 1% (w/v) NaOH นำไปไฮโดรไลซ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิธีที่ 4 นำวัชพืชน้ำที่อบแห้งมาเติม 1% (w/v) NaOH นำไปไฮโดรไลซ์ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที วิธีที่ 5 นำวัชพืชน้ำที่อบแห้งผสมน้ำในอัตราส่วน 1:4 นำไปไฮโดรไลซ์ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากกระบวนการทั้ง 5 นั้น แยกส่วนที่เป็นของเหลวออก แล้วปรับ pH ของส่วนที่เป็นตะกอนให้เป็นกลาง อบให้แห้งแล้วนำไปใช้เป็นสับสเตรทโดยใช้แทน carboxymethyl cellulose ในอาหาร CMC broth เตรียมเชื้อตั้งต้นโดยการเลี้ยงไอโซเลท OK1103 ในอาหาร NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าที่ 150 rpm จากนั้นเติมเชื้อตั้งต้นลงในอาหารที่มีสับเสตรทแตกต่างกันปริมาณ 5% (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าที่ 150 rpm ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเก็บเอนไซม์นำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธีข้างต้น ในการทดลองนี้ได้ใช้ CMC และวัชพืชน้ำที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับเสตรทเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยนำฟลาสก์ที่บรรจุอาหาร CMC broth ซึ่งมีวัชพืชน้ำเป็นสับเสตรทปริมาตร 50 mL เติมเชื้อตั้งต้นที่เตรียมไว้ปริมาณ 5% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ อุณหภูมิห้อง (32°C), 35, 40 และ 45°C จากนั้นทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยแหล่งไนโตรเจนดังนี้ คือ การทดลองควบคุม (สารสกัดจากยีสต์และเปปโตนร่วมกันที่ความเข้มข้น 0.75%, w/v) เจลาติน สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อ เปปโตน เคซีน และระดับความเข้มข้นที่ศึกษา คือ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0% (w/v) ทำการเก็บตัวอย่างหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน เก็บเอนไซม์และนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ด้วยวิธีข้างต้น

6. การผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ

6.1 การผลิตเอทานอลโดยวิธี Simutaltaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลคือ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ B1-1:1 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดิน และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง วิธีการเตรียมหัวเชื้อยีสต์โดยเขี่ย *S. cerevisiae* ที่เจริญบนอาหาร PDA ลงในอาหาร YM broth เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะเดียวกันทำการเตรียมหัวเชื้อไอโซเลท OK1103 โดยเขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหาร NA ลงใน NB broth เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย ไอโซเลท OK1103 มาเลี้ยงร่วมกันในอาหาร CMC broth และ basal medium ที่มีวัชพืชน้ำที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับเสตรท โดยแบ่งเป็น 2 สภาวะคือเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้อง และไม่ทำการเขย่าบ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เปรียบเทียบแต่ละสภาวะที่ทำการทดลอง

6.2 การผลิตเอทานอลโดยวิธี Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF)

เตรียมหัวเชื้อไอโซเลท OK1103 โดยเขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหาร NA ลงใน NB broth เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นลงหัวเชื้อ 10% ลงในอาหาร CMC broth และ basal medium ที่มีวัชพืชน้ำเป็นสับเสตรท เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 2 วันที่อุณหภูมิห้อง เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ supernatant ที่ได้ไปทำการเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเอทานอลต่อไป โดยแบ่งเป็น 2 สภาวะคือ เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm บ่มที่อุณหภูมิห้องและไม่ทำการเขย่า บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เปรียบเทียบแต่ละสภาวะที่ทำการทดลอง

7. การวัดปริมาณเอทานอลโดยวิธี Flash distillation

ทำการวัดปริมาณเอทานอลด้วยวิธี Flash distillation ตามวิธีของ Pavia และคณะ [13] นำตัวอย่าง 1 มล. ใส่ในหลอดฝาเกลียว เติมสารละลาย 0.1 M $K_2Cr_2O_7$ ซึ่งละลายใน 0.5N HCl ปริมาตร 2 มล. เติมน้ำ 2 มล. ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา วัดค่า OD. 600 nm เทียบผลที่ได้กับกราฟมาตรฐาน เอทานอล (0-100 g/L)

8. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey โดยใช้โปรแกรม PASW Statistic 18, SPSS Inc. และใช้ t-test เปรียบเทียบความแตกต่างของ 2 การทดลอง

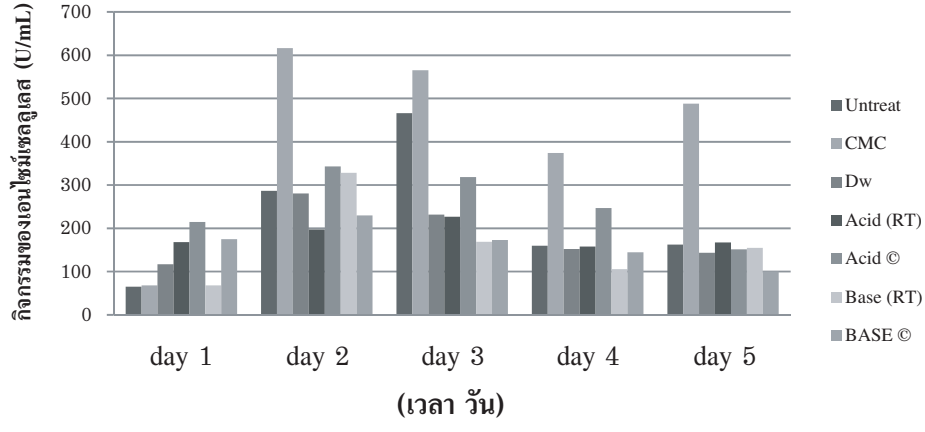
ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกและจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากจำนวนตัวอย่างดิน 50 ตัวอย่างสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดบนอาหาร CMC congo red agar ทั้งสิ้น 6 ไอโซเลทคือ KJ3204, LB8102, LB4101, OK1103, OK1101, LB7302 เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทไปศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหาร CMC broth และใช้ CMC เป็นสับเสตรท และนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า ไอโซเลท OK1103 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 565 U/mL รองลงมาคือไอโซเลท OK1101 เท่ากับ 395 U/mL และไอโซเลท KJ3204 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 360 U/mL จากนั้นทำการจัดจำแนกไอโซเลท OK1103 พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ และเมื่อหาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* เท่ากับ 100% similarity ดังนั้นจึงระบุได้ว่าเป็นเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ OK1103

2. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากไอโซเลท OK 1103 โดยใช้อาหาร CMC broth ที่มีวัชพืชน้ำที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับสเตรท

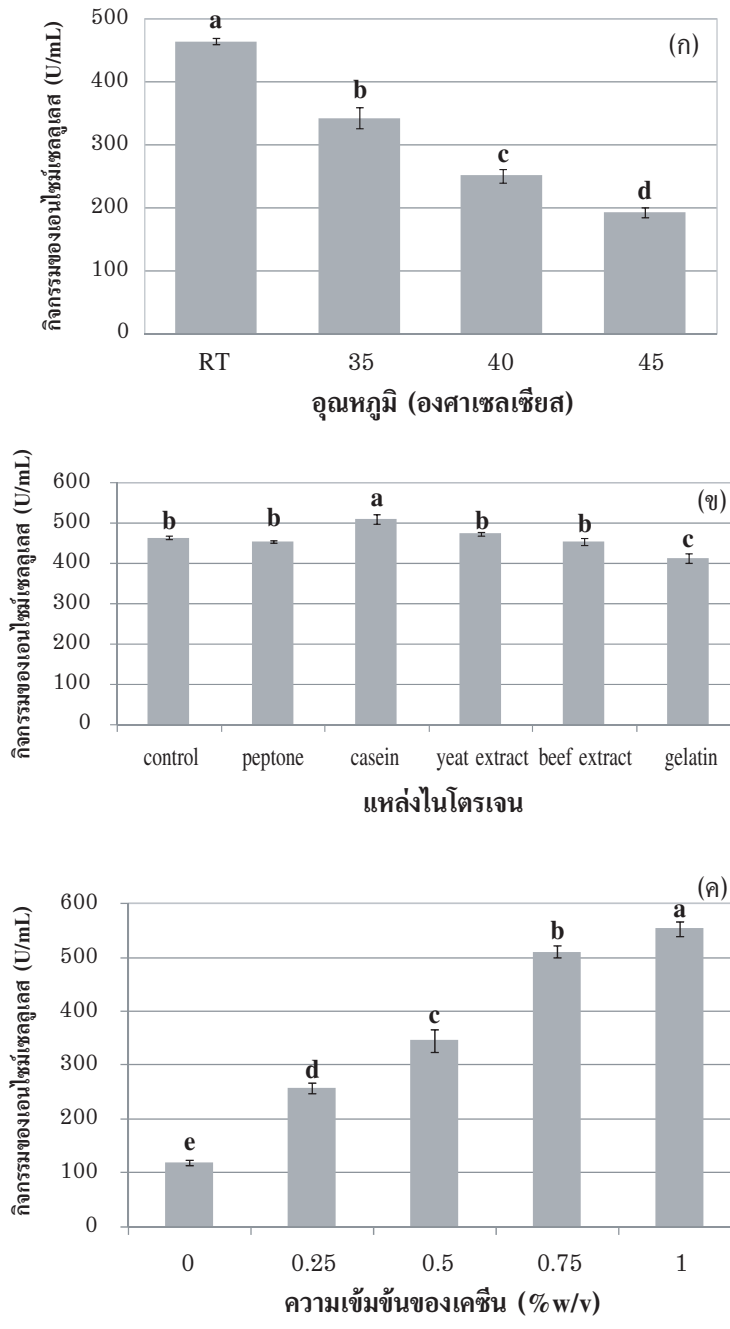
การศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้สับสเตรทเป็นวัชพืชน้ำที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการต่างๆ จากรูปที่ 1 พบว่าเมื่อเลี้ยงไอโซเลท OK1103 เป็นเวลา 3 วันในอาหารที่มีวัชพืชน้ำที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับเสตรท ไอโซเลท OK1103 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 466 U/mL ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวัชพืชน้ำนั้นไม่จำเป็นต้องนำวัชพืชน้ำมาทำการปรับสภาพก่อนการนำไปเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการนำวัชพืชน้ำไปใช้ประโยชน์นั้นสะดวก รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการปรับสภาพ แต่เชื้อจุลินทรีย์ก็สามารถนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการปรับสภาพอาจจะส่งผลให้เกิดสารประกอบที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์เช่น การปรับสภาพด้วยกรดจะทำให้เกิดสารประกอบ Furfural และ hydroxymethyl furfural (HMF) [11]



รูปที่ 1 แสดงการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อไอโซเลท OK1103 โดยใช้สับเสตรทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการต่างๆ

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้วัชพืชน้ำที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับเสตรท

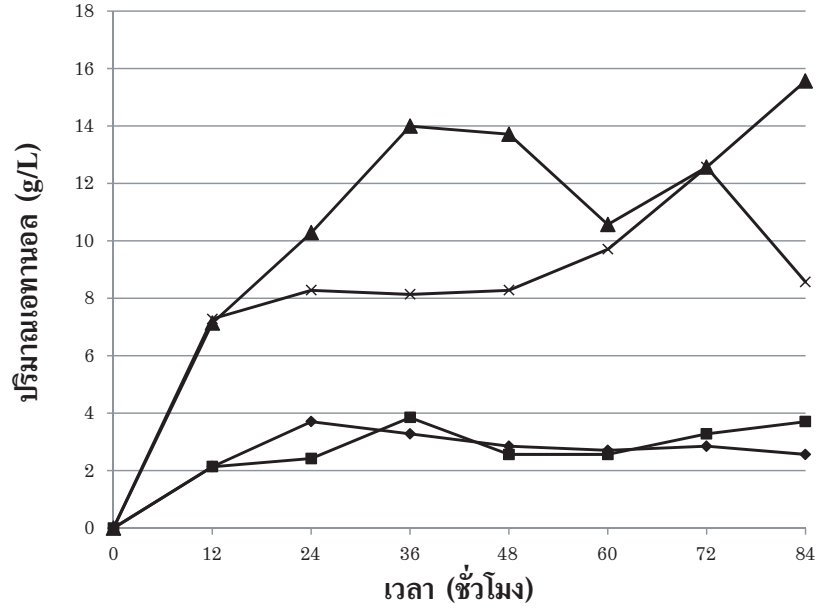
จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยไอโซเลท OK1103 (รูปที่ 2) พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CMC broth ที่มีวัชพืชน้ำที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับเสตรท ที่อุณหภูมิห้อง (32°C) ไอโซเลท OK1103 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 465 U/mL ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการใช้อุณหภูมิ 35 40 และ 45°C ซึ่งเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้น้อยกว่า (รูปที่ 2ก) จากนั้นทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมพบว่าเมื่อใช้เคซีนเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ไอโซเลท OK1103 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 512 U/mL รองลงมาเป็น การทดลองควบคุม (ใส่ทั้งสารสกัดจากยีสต์และเปปโตนร่วมกันที่ความเข้มข้น 0.75%, w/v) สารสกัดจากยีสต์เพียงอย่างเดียว และเปปโตนเพียงอย่างเดียว ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและการทดลองสุดท้ายได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของเคซีนที่เหมาะสม พบว่าที่ความเข้มข้น 1% (w/v) เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 540 U/mL ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยมีสภาวะที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ อาทิเช่น งานวิจัยของ Banoa และคณะ [14] ได้รายงานสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *B. subtilis* KIBGE HAS โดยใช้ชานอ้อยเป็นสับเสตรท พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีชานอ้อยที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 2.0% (w/v) ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน และบ่มที่ 40°C *B. subtilis* จะสามารถสร้างเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 290 U/mL นอกจากนี้ Sethi และคณะ [12] พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสคือ ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และทำการบ่มที่ 40°C pH 10 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 0.9 U/mL



รูปที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากไอโซเลท OK1103 (ก) อุณหภูมิ (ข) แหล่งไนโตรเจน และ (ค) ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

4. การผลิตเอทานอลโดยวิธี Simutaltaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

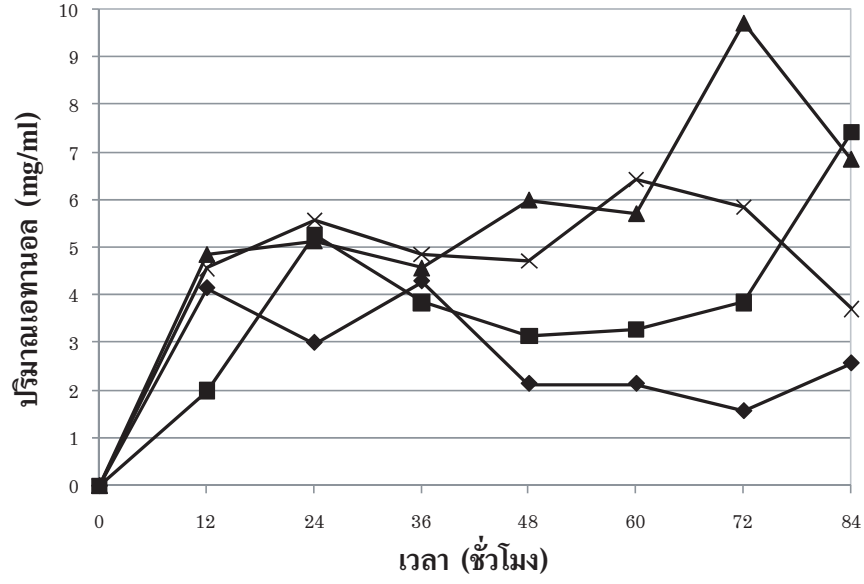
จากการเปรียบเทียบสภาวะในการผลิตเอทานอลด้วยวิธี SSF (รูปที่ 3) พบว่าเมื่อทำการหมักโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ B1-1:1 พร้อมกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ OK1103 ในอาหาร CMC broth โดยการเขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 14 g/L คิดเป็น productivity ได้เท่ากับ 0.39 g/L.h และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับทฤษฎีได้เท่ากับ 70% รองลงมาคืออาหาร CMC broth แต่ไม่ทำการเขย่าสามารถผลิตเอทานอลได้ 12.5 g/L เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็น productivity ได้เท่ากับ 0.17 g/L.h และจากรูปที่ 3 พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร basal medium สามารถผลิตเอทานอลได้น้อยกว่าแต่ทั้ง 2 สภาวะคือเขย่าและไม่เขย่านั้นได้ปริมาณ เอทานอลใกล้เคียงกัน และเมื่อวัดการเจริญพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ OK1103 จะเจริญเพิ่มจำนวนในอาหาร CMC broth ก่อนยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล เนื่องมาจากแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายวัชพืชน้ำให้เป็นน้ำตาลจากนั้นยีสต์จึงเพิ่มจำนวนมากขึ้นและใช้น้ำตาลที่เกิดขึ้นในการผลิตเอทานอลในลำดับต่อไป



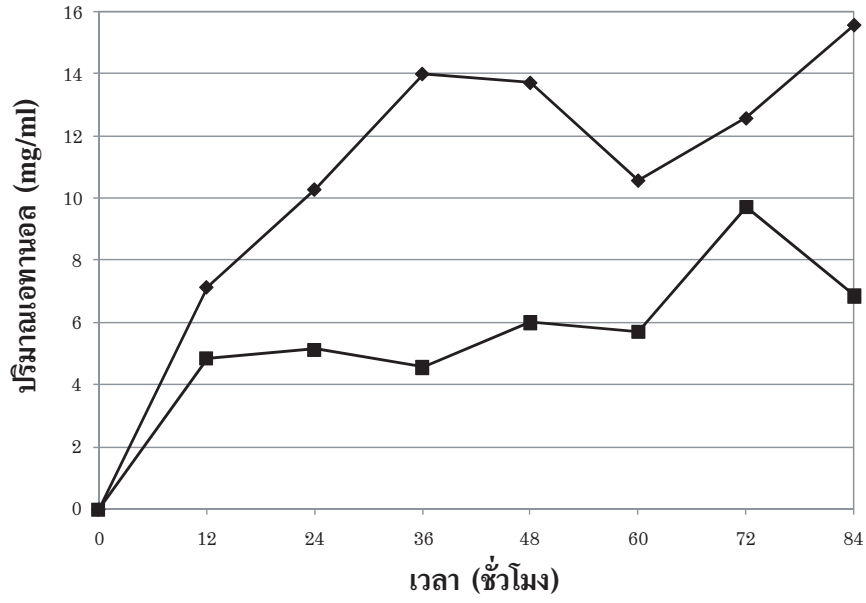
รูปที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากอาหารและสภาวะที่แตกต่างกัน ◆, Basal medium และทำการเขย่า: ■, Basal medium และไม่เขย่า; ▲, CMC broth และทำการเขย่า; ×, CMC broth และไม่เขย่า โดยทุกการทดลองใช้กระบวนการหมักแบบ SSF

5. การผลิตเอทานอลโดยวิธี Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF)

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยวิธี SHF (รูปที่ 4) พบว่าเมื่อทำการเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ OK1103 ในอาหาร CMC broth เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจากนั้นทำการแยกน้ำเลี้ยงเชื้อออกเพื่อนำไปหมักเอทานอลด้วยยีสต์ พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ 10 g/L คิดเป็น 0.14 g/L.h เปอร์เซ็นต์เทียบกับทฤษฎีได้เท่ากับ 50% เมื่อทำการหมักด้วยยีสต์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำการเขย่าที่ 150 rpm ซึ่งสภาวะอื่นๆ นั้นพบว่าได้ปริมาณเอทานอลต่ำกว่า



รูปที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากอาหารและสภาวะที่แตกต่างกัน ◆, Basal medium และทำการเขย่า: ■, Basal medium และไม่เขย่า; ▲, CMC broth และทำการเขย่า; ×, CMC broth และไม่เขย่า โดยทุกการทดลองใช้กระบวนการหมักแบบ SHF



รูปที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมัก SSF; ◆ และ SHF; ■ จาก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ B1-1:1 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ OK1103 เมื่อใช้ CMC broth เป็นอาหารและทำการเขย่าที่ 150 rpm

จากรูปที่ 5 สามารถสรุปได้ว่า เมื่อทำการหมักเพื่อผลิตเอทานอลด้วยวิธี SSF นั้นสามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าการหมักแบบ SHF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากการหมักแบบ SSF นั้นเป็นกระบวนการย่อยสลายควบคู่กับการหมัก ซึ่งสามารถลดระยะเวลาในการผลิตเอทานอลให้น้อยลงเหลือเพียงแค่ 36 ชั่วโมง และเพิ่มค่า productivity ได้เป็น 0.39 g/L.h รวมทั้งยังสามารถลดการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าในการไฮโดรไลซ์วัสดุจำพวกสารประกอบลิกโนเซลลูโลสได้ในขณะที่การหมักแบบ SHF ซึ่งเป็นการหมักแยกกับการเปลี่ยนสารประกอบลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล ทำให้ใช้ระยะเวลาในการหมักมากกว่า โดยในงานวิจัยที่ผ่านมา Sovorawet และคณะ [15] ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการหมักเอทานอล ด้วยวิธี SSF และ SHF โดยใช้ต้นมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบพบว่า เมื่อใช้กระบวนการหมักแบบ SSF จะทำให้ลดระยะเวลาการหมักลงเหลือเพียง 24-32 ชั่วโมง และสามารถผลิตเอทานอลได้ 5.42-6.22 g/L และต่อมา Rocha และคณะ [16] พบว่า สามารถผลิตเอทานอล ผ่านกระบวนการหมักแบบ SSF และ SHF โดยใช้ *Aspergillus niger* ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากหางนมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตชีส และจากกระบวนการ SSF นี้สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 11.7 g/L

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท OK1103 ได้จากตัวอย่างดินซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว และเมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *B. subtilis* จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากไอโซเลท OK1103 พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CMC broth ที่มีวัชพืชน้ำที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นสับเสตรท ที่อุณหภูมิห้อง ใช้เคซีนเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด 540 U/mL จากนั้นทำการศึกษากระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล พบว่าเมื่อทำการหมักด้วยวิธี SSF สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 14 g/L คิดเป็น productivity ได้เท่ากับ 0.39 g/L.h และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับทฤษฎีได้เท่ากับ 70% ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าการหมักแบบ SHF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าการหมักแบบ SSF สามารถลดระยะเวลาให้น้อยลงเหลือเพียงแค่ 36 ชั่วโมง รวมทั้งยังสามารถลดการใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าในการไฮโดรไลซ์วัสดุจำพวกสารประกอบลิกโนเซลลูโลสได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากทุนวิจัยงบประมาณรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2556

เอกสารอ้างอิง

1. Harmsen, P. F. H., Huijgen, W. J. J., Bermudez L. M., Bakker, R. R. C. 2010. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. *Biosynergy.* 1-49.
2. Mais, U., Esteghlalian, A. R., Saddler, J. N., Mansfield, S. D. 2002. Enhancing the Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials using Simultaneous Ball Milling. *Applied Biochemical and Biotechnology.* 98, 815-832.
3. Kumakura, M., Kojima, T., Kaetsu, I. 1982. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes by Combination of Irradiation and Mechanical Crushing. *Biomass.* 2, 299-308.
4. Negro, M. J., Manzanares, P., Ballesteros, I., Oliva, J. M., Cabanas, A., Ballesteros, M. 2003. Hydrothermal Pretreatment Conditions to Enhance Ethanol Production from Poplar Biomass. *Applied Biochemical Biotechnology.* 105, 87-100.
5. Taherzadeh, M. J., Karimi, K. 2007. Acid-based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials: A Review. *Bioresources Technology.* 2, 472-499.
6. Taherzadeh, M., Keikhosro, K. 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Science.* 9, 1621-1651.

7. Kurakake, M., Ide, N., Komaki, T. 2007. Biological Pretreatment with Two Bacterial Strains for Enzymatic Hydrolysis of Office Paper. *Current Microbiology.* 54, 424-428.
8. Lever, M., Ho, G., Cord-Ruwisch, R. 2010. Ethanol from Lignocellulose using Crude Unprocessed Cellulase from Solid-state Fermentation. *Bioresources Technology.* 101(18), 7094-7098.
9. Yadav, K. S., Nasseeruddin, S., Prashanthi, S., Sateesh, L., Rao, L.V. 2011. Bioethanol Fermentation of Concentration Rice Straw Hydrolysate using Co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis. Bioresources Technology.* 102: 6473-6478.
10. Delgenes, J. P., Moletta, R., J. M. N. 2011. Effects of Lignocellulose Degradation Products on Ethanol Fermentations of Glucose and Xylose by *Saccharomyces cerevisiae, Zymomonas mobilis, Pichia stipitis, and Candida shehatae. Enzyme and Microbial Technology.* 19, 220-225.
11. Shaikh, N. M., Patel, A. A, Mehta, S.A., Patel, N.D. 2013. Isolation and Screening of Cellulolytic Bacteria Inhabiting Different Environment and Optimization of Cellulase Production. *Universal Journal of Environmental Research and Technology.* 3(1): 39-49.
12. Sethi, S., Datta, A., Gupta, B.L., Gupta, S. 2013. Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. Hindawi Publishing Corporation ISRN Biotechnology. ID 985685, 7 pages.
13. Pavia, D.L, Lampman, G.M., Kriz, J. 1982. Introduction to Organic Laboratory Techniques: a Contemporary approach, 2nd Eds., Saunders: Philadelphia, PA. p. 194-200.
14. Banoa, S., UlQaderb, S.A., Amanb, A., Syedc, M.N., Durrania, K. 2013. High Production of Cellulose Degrading endo-1,4-β-d-Glucanase using Bagasse as a Substrate from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Carbohydrate Polymers.* 91, 300-304.
15. Sovorawet, B., Kongkiattikajorn, J. 2012. Bioproduction of Ethanol in SHF and SSF from Cassava Stalks. *KKU Research Journal.* 17(4), 565-572.
16. Rocha, N.R.A.F., Barros, M.A., Fischer, J., Filho, U.C., Cardoso, V.L. 2013. Ethanol Production from Aagroindustrial Biomass using a Crude Enzyme Complex Produced by *Aspergillus niger. Renewable Energy.* 57, 432-435.

ได้รับบทความวันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2558
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 15 พฤษภาคม 2558