การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสและผลิตเอทธานอลที่อยู่ร่วมกับป่านศรนารายณ์ Agave sisalana Perrine

นายศิริพงษ์ เปรมจิต

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาพฤกษศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2534

ISBN 974-578-837-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

i17352782

Screening of Cellulase-producing and Ethanol-producing Microbes Associated with Agave sisalana Perrine

Mr.Siripong Premjet

A Thesis is Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Botany
Graduate School
Chulalongkorn University
1991

ISBN 974-578-837-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสและผลิตเอทธานอลที่อยู่ร่วมกับป่านศรนารายณ์ Agave sisalana Perrine
โดย	นายศิริพงษ์ เปรมจิต
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์ สาขา พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

---------- คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

---------- ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิพนธ์ พันธผลไพบูลย์)

---------- อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ)

---------- อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

---------- กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุมิตรา คงชื่นสิน)

---------- กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ศิริพงษ์ เปรมจิต : การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสและผลิตเอทธานอลที่อยู่ร่วมกับป่านศรนารายณ์ Agave sisalana Perrine อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ , 113 หน้า. ISBN 974-578-837-6

การเก็บรวบรวมและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสจากดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ เศษใบแห้งของป่านศรนารายณ์และเศษต้นป่านที่ตายแล้วได้แบคทีเรีย จำนวน 26 isolates รา จำนวน 23 isolates และจุลินทรีย์ที่สร้างแอลกอฮอล์จากน้ำคั้นใบสดและน้ำที่ขังอยู่ตามพื้นดินของโรงงานผลิตเชือก ได้แบคทีเรียจำนวน 13 isolates และยีสต์ จำนวน 14 isolatesจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส แบ่งเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกคือ เชื้อรา เชื้อราที่สำคัญจำแนกได้คือ Botryotrichum sp. สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 0.74 หน่วย/มล. ที่อุณหภูมิ 37 ° C กลุ่มที่สองคือ แบคทีเรีย แบคทีเรียตัวอย่างที่จำแนกได้คือ Bacillus sp. สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เพียง 0.033 หน่วย ที่อุณหภูมิ 37 °C จุลินทรีย์ที่ผลิตแอลกอฮอล์แบ่งได้สองกลุ่ม กลุ่มแรกคือ แบคทีเรีย แบคทีเรียตัวอย่าง เช่น Enterobacter sp. สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้เพียง 2.37 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 37 °C กลุ่มที่สองคือ ยีสต์ ยีสต์ที่สำคัญจำแนกได้คือ Candida sp. สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงถึง80.57 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อนำจุลินทรีย์มาหมักแอลกอฮอล์ด้วยกระบวนการ SSF โดยใช้กากเส้นใยป่านศรนารายณ์เป็นวัสดุหมัก เอนไซม์เซลลูเลสจาก Botryotrichum sp. และยีสต์ Candida sp. พบว่าในระยะเวลา การหมัก 7 วัน ให้ปริมาณแอลกอฮอล์ 5.79 มก./มล.

ภาควิชา ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต ศิริพงษ์ เปรมจิต

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา มุกดา คูหิรัญ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม หรรษา ปุณณะพยัคฆ์

SIRIPONG PREMJET : SCREENING OF CELLULASE-PRODUCING AND ETHANOL-PRODUCING MICROBES ASSOCIATED WITH AGAVE SISALANA PERRINE. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. MAKDA KUHIRUN , ASSIST. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK Ph.D. , 113pp. ISBN.974-578-837-6

Samples from soil in the sisal plantation, dried sisal leaves and residues were collected and screened for microorganisms that produce enzyme cellulase. Twenty six isolates of bacteria and 23 isolates of fungi were obtained. Leave juice and waste water from rope manufacturing revealed 13 bacterial isolates and 14 isolates with activities for alcoholic fermentation. The cellulase-producing microorganism are divided into two groups. The first group belongs to fungi with one important isolate identified as Botryotrichum sp. having cellulase activity of 0.74 Unit/ml. at 37 °C. The second group belongsto bacteria with one sample identified as Bacillus sp. having the cellulase activity of 0.033 Unit/ml. at 37 °C.

The ethanol-producing microorganisms were also divided into two groups, with one being bacteria having an isolate identified as Enterobacter sp. which produced 2.37 mg./ml. of ethanol at 37 °C. The second group is yeast with one important isolate, identified as Candida sp. ,having capability to produce 80.57 mg./ml. of ethanol at 37 °C. When Candida sp. and the enzyme cellulase from Botryotrichum sp. were used together in the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process, the ethanol yield was 5.79 mg./ml within 7 days.

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา พันธุศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือจากหลายท่านขอกราบขอบพระคุณ รศ.มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้ความดูแลเอาใจใส่ช่วยเหลือลูกศิษย์มาตลอดและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องมากขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ในความกรุณาแนะนำวิธีการดำเนินงานทดลองต่างๆ จนกระทั่งสำเร็จ กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน ที่ช่วยเหลือให้แนวทางในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย และแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ขึ้น กราบขอบพระคุณ อาจารย์ ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ สถาบันอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำในการตรวจสอบยีสต์ กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.พิมพันธ์ พัฒนผลไพบูลย์ และ ผศ.สุมิตรา คงชื่นสิน ที่ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีคุณค่ามากขึ้น กราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อรุณี จันทรสนิท ที่ช่วยตรวจสอบเชื้อรา ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนการศึกษาบางส่วน ขอบคุณส่วนโครงการมหาวิทยาลัยสนับสนุนโครงการอีสานเขียวที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยบางส่วน กราบขอขอบพระคุณ คุณบุญเลิศ เปรมจิต พี่ชายที่แสนดีที่ได้ช่วยสนับสนุนทุนการศึกษามาตลอด ขอขอบคุณเพื่อนและน้องแผนกทุกๆ คนที่ได้ช่วยเหลือในงานบางสิ่งบางอย่าง ขอบคุณ คุณดวงพร เจียมอมรรัตน์ เป็นอันมากที่ได้ช่วยเหลือและให้กำลังใจอย่างใกล้ชิดมาตลอด ท้ายนี้กราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และหลวงพ่อ ที่เคารพรักอย่างสูงของผู้เขียน ที่ได้ค่อยให้กำลังใจตลอด และที่จะลืมมิได้เลยคือพระมหากรุณาธิคุณของพระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัวที่ได้ก่อตั้งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแห่งนี้ เพื่อเป็นสถานศึกษาของประชาชนทุกคน

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบาญตาราง..... ช

สารบาญรูป..... ซ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. การตรวจเอกสาร..... 4

3. อุปกรณ์และวิธีการศึกษา..... 13

4. ผลการศึกษา..... 20

5. อภิปรายผลการศึกษา..... 80

เอกสารอ้างอิง..... 96

ภาคผนวก..... 104

ประวัติผู้เขียน..... 113

สารบาญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ผลการทดลองคัดแยกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากดินใต้ต้นปาน อ.โนนสูง..... 24

4.2 ผลการทดลองคัดแยกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากเศษใบแห้ง อ.โนนสูง..... 25

4.3 ผลการทดลองคัดแยกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากต้นปานที่ตายแล้ว อ.โนนสูง..... 26

4.4 ผลการทดลองคัดแยกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากดินใต้ต้นปาน อ.หัวหิน..... 27

4.5 ผลการทดลองคัดแยกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากเศษใบแห้ง อ.หัวหิน..... 28

4.6 ผลการทดสอบเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 30 °C, 37 °C และ 45 °C..... 31

4.7 ผลการทดลองคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากดินใต้ต้นปาน อ.โนนสูง..... 33

4.8 ผลการทดลองคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากเศษใบแห้ง อ.โนนสูง..... 34

4.9 ผลการทดลองคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากเศษต้นปานที่ตายแล้ว อ.โนนสูง..... 35

4.10 ผลการทดลองคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากดินที่อยู่โคนต้นปาน อ.หัวหิน..... 36

4.11 ผลการทดลองคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากเศษใบแห้ง อ.หัวหิน..... 37

4.12 ผลการทดสอบแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 30 °C, 37 °C และ 45 °C..... 41

4.13 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์จากน้ำที่ขังอยู่ตามพื้นดินโรงงานผลิตเชือก อ.หัวหิน..... 43

4.14 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์จากน้ำคั้นใบปานสด อ.หัวหิน..... 44

สารบาญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.15 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์จากน้ำคั้นใบปานสด อ.โนนสูง..... 45
4.16 ผลการทดสอบแบคทีเรียที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์ ที่อุณหภูมิ 30 °C, 37 °C และ 45 °C..... 49
4.17 ผลการคัดแยกยีสต์ที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์จากน้ำคั้นใบปานสด อ.โนนสูง..... 50
4.18 ผลการคัดแยกยีสต์ที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์จากน้ำคั้นใบปานสด อ.หัวหิน..... 51
4.19 ผลการคัดแยกยีสต์ที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์จากน้ำที่ขังอยู่บนพื้นดินโรงงานผลิตเชือก อ.หัวหิน..... 52
4.20 ผลการทดสอบยีสต์ที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์ ที่อุณหภูมิ 30 °C, 37 ° และ 45 °C. 55
4.21 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย isolate ที่ 74 และ 65 56
4.22 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์..... 63
4.23 ผลการจำแนกยีสต์ที่สามารถหมักแอลกอฮอล์..... 69
4.24 ผลการทดลองหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ microcrystalline cellulose เป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664..... 70
4.25 ผลการทดลองหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ กากเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664... 71
4.26 ผลการทดลองหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ กากเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา isolate 13 (Botryotrichum sp.) และใช้ยีสต์ isolate ที่ 4 (Candida sp.)..... 72
4.27 ผลการทดลองหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ กากเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T.reesei QM 9414 และใช้ยีสต์ isolate ที่ 4 (Candida sp.) 73
4.28 ผลการทดลองหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ กากเส้นใยปานเป็นวัสดุหมักกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา isolate 13 (Botryotrichum sp.) และใช้ยีสต์ C.brassicae IFO 1664..... 74

สารบาญรูป

รูปที่		หน้า
4.1	ก. เศษดินจากบริเวณโคนต้นปาหนันศรนารายณ์	21
	ข. เศษใบแห้งของปาหนันศรนารายณ์	21
	ค. เศษลำต้นปาหนันศรนารายณ์ที่ตายแล้ว	21
4.2	ก. น้ำคั้นจากใบสด	22
	ข. น้ำที่ขังอยู่ตามพื้นดิน	22
4.3	Czapex's dox medium ใช้แยกเชื้อรา	23
4.4	ก. ลักษณะของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบน CMC medium อายุ 3 วัน ก่อนราดทับด้วย Congo red	29
	ข. แสดงให้เห็นวงใสหลังจากราดทับด้วยสี Congo red	29
4.5	Production medium ใช้ทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส	30
4.6	Mineral salt medium ใช้แยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส.	38
4.7	ก. แบคทีเรียที่เจริญบน CMC medium อายุ 3 วัน	39
	ข. ลักษณะของวงใสหลังจากราดทับด้วย Congo red	39
4.8	Enriched medium ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	40
4.9	การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างแอลกอฮอล์ โดยใช้อาหารสูตร detection medium	46
4.10	ลักษณะโคโลนีเดียวของแบคทีเรีย ที่มีสีเขียวบน differential medium	47
4.11	Fermentation medium ใช้ทดสอบการสร้างแอลกอฮอล์	48
4.12	Molasses medium ใช้แยกยีสต์	53
4.13	Basal medium ใช้ทดสอบการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์	54
4.14	เชื้อรา isolate 13 ที่ใช้ทดสอบการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์	57
4.15	แบคทีเรีย isolate ที่ 74 ใช้ทดสอบการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์	58
4.16	แบคทีเรีย isolate ที่ 65 ใช้ทดสอบการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์	59
4.17	ก. แสดงสปอร์ของแบคทีเรีย isolate ที่ 74	60
	ข. แสดงสปอร์ของแบคทีเรีย isolate ที่ 65	60
4.18	แบคทีเรีย isolate ที่ 9	61
4.19	แบคทีเรีย isolate ที่ 25	62
4.20	โคโลนียีสต์ isolate ที่ 4	64
4.21	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์	65

สารบาญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.22	โคโลนีของยีสต์ isolate ที่ 6.....	66
4.23	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ isolate ที่ 6.....	67
4.24	แสดงเส้นใยปานศรนารายณ์.....	68