การคัดเลือกและการระบุชนิดของเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

Screening and identification of cellulase producing fungi from agricultural wastes

พัชราภรณ์ นาคเทวัญ[1*] และ วลัยพร มัฆพาน[1]

Patcharaporn Narkthewan[1*] and Walaiporn Makkapan[1]

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในพื้นที่จังหวัดชุมพร โดยคัดแยกเชื้อราจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จำนวน 35 ตัวอย่าง และคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร Carboxymethylcellulose agar (CMC agar) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน พบว่ามีเชื้อราจำนวน 22 ไอโซเลต สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC agar ซึ่งเชื้อราไอโซเลต P19.1 มีประสิทธิภาพในการย่อย CMC สูงที่สุด โดยวัดจากอัตราส่วนขนาดวงใสต่อขนาดโคโลนีสูงที่สุด เมื่อจัดจำแนกเชื้อราด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) พบว่าเชื้อรา P19.1 มีความใกล้ชิดกับเชื้อรา *Penicillium oxalicum* ร้อยละ 99 เมื่อเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารแข็ง โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ชานอ้อย ทะลายปาล์ม กากกาแฟ เปลือกสับปะรด เปลือกกล้วยเล็บมือนาง เปลือกทุเรียน ฟางข้าว และรำข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นร้อยละ 50 และพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 เลี้ยงเชื้อรา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนรำข้าว เมื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (CMCase และ FPase) โดยเลี้ยงบนรำข้าวที่สภาวะเดิมเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าเมื่อเชื้อราเจริญบนรำข้าว เป็นเวลา 4 วัน ให้กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase สูงที่สุด เท่ากับ 0.67 U/ml และให้กิจกรรมของเอนไซม์ FPase สูงที่สุดเท่ากับ 0.58 U/ml เมื่อเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Penicillium* sp. ควรได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ เพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงขึ้น

คำสำคัญ:เซลลูเลส, เชื้อรา, รำข้าว

ABSTRACT: The aim of the present study was isolation and identification of cellulase producing fungi from agricultural wastes in Chumphon province. Thirty-five samples were collected for fungal isolation. Fungi were then grown on Carboxymethylcellulose agar (CMC agar) at 30°C for 3-7 days to screen the cellulase producing fungi. It found that twenty-two isolates produced cellulase on CMC agar. The highest hydrolysis capacity on CMC agar examined from the ratio of clear zone to colony size was obtained from fungal isolate named P19.1. The fungus was identified by molecular techniques and its nucleotide sequence of internal transcribed spacer (ITS) was 99% similarity to *Penicillium oxalicum* . Subsequently, cellulase production was carried out under solid state fermentation. Agricultural wastes (bagasse, oil palm empty fruit brunch, coffee grounds, pineapple peel, banana peel, durian peel, rice straw and rice bran) were used as the sole carbon source with 50% initial moisture content and pH of substrate was adjusted to 5.0. The result showed that rice bran was the best substrate for cellulase production at 30°C

[1] หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพภาควิชาพื้นฐานทั่วไป สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ Biotechnology Program, General Science and Liberal Arts, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Prince of Chumphon Campus

* Corresponding author: kpapatch@hotmail.com

for 5 days. In addition, the fungus was cultivated in the same conditions for 10 days to study the effect of time period on cellulase production (CMCase and FPase). The results showed that the maximum CMCase activity of 0.67 U/ml and FPase activity of 0.58U/ml were obtained after 4 days and 7 days of cultivation, respectively . The results indicate that *Penicillium* sp. should be performed for strain improvement and optimization to enhance cellulase production.
Keywords: Cellulase, Fungi, Rice bran

บทนำ

การแปรรูปผลิตผลจากการเกษตรในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นอาหารของคนและสัตว์ ทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรและจากกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เป็นจำนวนมาก เช่น เปลือกกล้วย และเปลือกทุเรียน ที่เหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์กล้วยฉาบและทุเรียนทอด เปลือกสับปะรดจากกระบวนการผลิตผลไม้กระป๋อง รำข้าวจากกระบวนการสีข้าว และทะลายปาล์มจากกระบวนการแปรรูปน้ำมันปาล์ม เป็นต้น วัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้มีองค์ประกอบหลักเป็นสารประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ที่ประกอบไปด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เอนไซม์เซลลูเลส (cellulases) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรทจำพวกเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดในพืช และเซลลูโลสจัดเป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่ประกอบด้วยโมเลกุลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวแบบไม่มีกิ่งก้านและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (β-1,4-glycosidic linkage) เอนไซม์เซลลูเลสประกอบไปด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ร่วมกันในการสลายเซลลูโลส สามารถจำแนกคุณสมบัติตามกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 3 กลุ่ม คือ endoglucanases (CMCases), exoglucanases (cellobiohydrolases) และ β-glucosidases (Jiang et al., 2011) ในธรรมชาติมีจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสิท เช่น *Chaetomium globosum* (Umikalsom et al.1997) *Trichoderma koningii* D-64 (Wang et al. 2012) *Paenibacillus terrae* ME27-1(Liang et al. 2014) *Streptomyces* DSK59 (Budihal et al., 2016) เป็นต้น ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสปล่อยออกมานอกเซลล์ ทำให้สะดวกต่อการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายเซลลูโลสและสะดวกต่อการนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ในการเกษตรและในระดับอุตสาหกรรม ในปัจจุบันมีการจัดการกับของเสียจำพวกเซลลูโลสที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นทุกปี โดยนำวัสดุเหลือทิ้งที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักมาใช้ประโยชน์อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราโดยใช้ทะลายปาล์มน้ำมัน (Wang et al. 2012) ใบกล้วย (Shah et al., 2015) ฟางข้าว (Liao et al., 2015) และชานอ้อย (Santos et al., 2017) เป็นสับสเตรทเป็นต้น จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะคัดแยกและระบุชนิดของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากของเหลือทิ้งทางเกษตรในจังหวัดชุมพร เช่น ทะลายปาล์มน้ำมัน เปลือกกล้วยเล็บมือนาง เปลือกทุเรียน และเปลือกสับปะรด เป็นต้น หากได้สายพันธุ์เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดสารประเภทเซลลูโลสได้ดี จะมีแนวโน้มที่นำเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ใช้เป็นหัวเชื้อในการทำปุ๋ยหมักชีวภาพ ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ได้ต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เก็บตัวอย่างวัสดุเหลือทิ้ง ทางการเกษตร จำนวนตัวอย่าง 35 ตัวอย่าง ในพื้นที่จังหวัดชุมพร เช่น เปลือกกล้วย เปลือกสับปะรด เปลือกส้มจี๊ด ทะลายปาล์มน้ำมัน ทางปาล์มน้ำมัน เมล็ดกาแฟ ซังข้าวโพด เป็นต้น มาคัดแยกเชื้อราบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) โดยเลี้ยงเชื้อรา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน จากนั้นนำเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้มาเลี้ยงบน Carboxymethylcellulose agar (CMC agar) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย PDA และ 1%

Carboxymethylcellulose (CMC) และเพาะเลี้ยงเชื้อราที่สภาวะเดิม ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสโดยเทสี 1% Congo Red ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเทออก เติม1 M NaCl ลงไป แช่ทิ้งไว้อีก 20 นาที แล้วเทออก (Teather and Wood, 1982) ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสังเกตุจากการเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อรา ส่วนบริเวณอื่นจะเห็นเป็นสีแดง คำนวณประสิทธิภาพในการย่อยสลาย CMC จากอัตราส่วนของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราแต่ละไอโซเลต โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและโคโลนีเชื้อราแต่ละไอโซเลท จำนวน 3 ซ้ำ เชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดจะถูกเลือกไปใช้ในการทดลองต่อไป

การระบุชนิดของเชื้อรา

นำเชื้อราที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษาลักษณะต่างๆ เช่น ลักษณะโคโลนี เส้นใย และสปอร์ของเชื้อรา และระบุชนิดของเชื้อราด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล โดยการจัดส่งเชื้อราไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และระบุชนิดของเชื้อรา ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ซึ่งในขั้นตอนการวิเคราะห์เริ่มต้นจากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อราที่เจริญบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตามวิธีการของ Marmur (1961) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ในช่วง 18S และ 5.8S rRNA genes โดยใช้ universal primers คือ ITS1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3') และ ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามวิธีการของ Miller et al. (2001) แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) และโปรแกรม CLUSTAL X (version 1.83) (Thompson et al., 1997) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ และจัดจำแนกเป็นกลุ่มต่างๆ และจัดกลุ่มความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยวิธี Neighbor-Joining โดยใช้ชุดโปรแกรม MEGA 7.0 (Saitou and Nei, 1987)

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง และการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้แก่ รำข้าว ชานอ้อย ทะลายปาล์ม ฟางข้าว เปลือกสับปะรด เปลือกกล้วย เล็บมือนาง กากกาแฟ และเปลือกทุเรียน ที่ผ่านการอบแห้ง จะนำมาใช้เป็นวัสดุหมัก สำหรับวัสดุหมักบางชนิด เช่นชานอ้อย และเปลือกทุเรียน จะกำจัดสารประกอบลิกนิน โดยนำมาแช่ในสารละลาย 0.1 M Sulfuric acid จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที แล้วปรับพีเอชให้เป็นกลาง ส่วนทะลายปาล์มกำจัดสารประกอบลิกนินตามวิธีการของ Ariffin et al .(2008) จากนั้นนำวัสดุหมักแต่ละชนิด 10 กรัม ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 50 โดยใช้สารละลายแร่ธาตุ (พีเอช 5.0) (Mandels and Weber, 1969) และใช้เชื้อเริ้มต้นเป็นสปอร์ที่มีความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จะนำสับสเตรทที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดมาเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็ง เป็นเวลา 10 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 2, 4, 6, 7, 8 และ 10 วัน จากนั้นทำการสกัดเอนไซม์เซลลูเลสด้วยสารละลาย 0.2 M acetate buffer (พีเอช 5.0) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อแยกเอาส่วนใสมาวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ Carboxymethylcellulase (CMCase) และ Filter paper cellulase (FPase) ตามวิธีการของ Wood and Bhat (1988) วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยสับสเตรทตามวิธีการของ Miller (1959) กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 1 ยูนิต (Unit) หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสับสเตรทแล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากการคัดแยกเชื้อราจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำนวน 35 ตัวอย่าง และคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร Carboxymethylcellulose agar (CMC agar) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7วัน พบว่ามีเชื้อราจำนวน 22 ไอโซเลต สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ และ ไอโซเลต P19.1 (Figure 1) ให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด พิจารณาจากประสิทธิภาพในการย่อยสลาย CMC ซึ่งให้อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีค่ามากที่สุด เท่ากับ 1.60±0.04 และเชื้อรานี้แยกได้จากทางปาล์มน้ำมันที่ทิ้งในบริเวณสวนปาล์ม

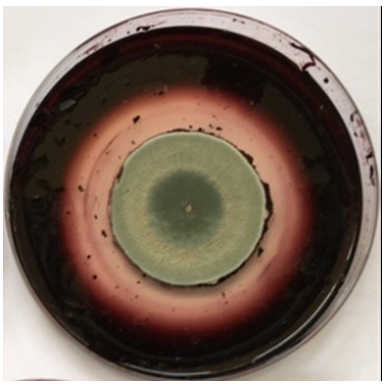

Figure 1 Cellulase activity from fungal isolate (P19.1) on CMC agar at 30°C for 7 days

การระบุชนิดของเชื้อราที่แยกได้

ในการระบุชนิดของเชื้อราตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต P19.1 บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าลักษณะโคโลนีเป็นสีเขียวเข้ม มีรูปร่างคล้ายแปรง มีสปอร์แบบโคนิเดีย (conidia) เมื่อระบุชนิดของเชื้อราด้วยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ในช่วง 18S และ 5.8S rRNA genes กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความคล้ายกับเชื้อรา *Penicillium oxalicum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. asturianum* และ *P. funiculosum* ร้อยละ 99 และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าเชื้อราไอโซเลต P19.1 มีความใกล้ชิดกับ *Penicillium oxalicum* มากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 2

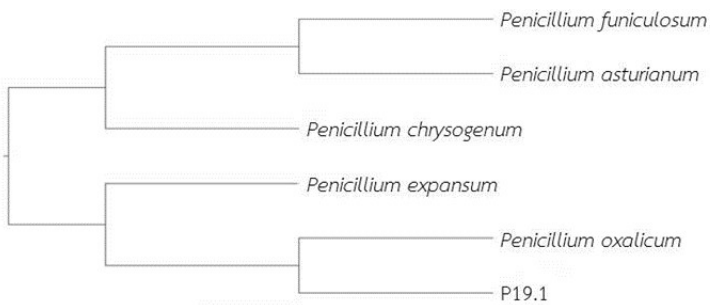

Figure 2 Phylogenetic tree derived from internal transcribed spacer (ITS) of fungal isolate (P19.1) and sequences obtained by NCBI BLAST analysis

ผลของสับสเตรทและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. บนอาหารแข็งโดยใช้สับสเตรทที่แตกต่างกัน พบว่าเชื้อราเจริญได้ดีที่สุดเมื่อใช้รำข้าวเป็นสับสเตรท ในขณะที่สับสเตรทชนิดอื่นเชื้อรามีการเจริญเพียงเล็กน้อยหรือไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา ดังนั้นจึงเลือกใช้รำข้าวเป็นสับสเตรทเพื่อเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. และเมื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โดยเลี้ยงเชื้อราเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase สูงที่สุด เท่ากับ 0.67 U/ml เมื่อเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ FPase เพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง และสูงที่สุด เท่ากับ 0.58 U/ml เมื่อเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง (Figure 3) จะเห็นว่าการผลิตเอนไซม์ CMCase ซึ่งเป็น endoglucanase จะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงในช่วงแรก โดยจะย่อยโมเลกุลเซลลูโลสที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น CMC ขณะที่เอนไซม์ FPase ซึ่งเป็น exoglucanase ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing sugar) จะผลิตออกมามากที่สุดในช่วงที่กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ลดลง และหลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว

เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ FPase จากเชื้อรา *Penicillium* sp. กับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่เลี้ยงในสภาพอาหารแข็ง

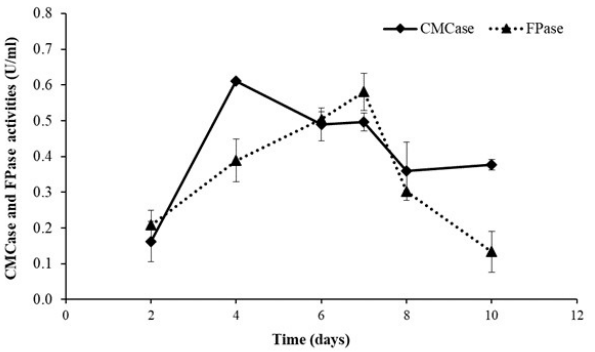

Figure 3 Time period on CMCase and FPase activities from *Penicillium* sp . cultivated in rice bran with 50% moisture content and pH 5.0 at 30°C for 10 days

พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase จากรา *Penicillium* sp. ต่ำกว่าเชื้อรา *Chaetomium globosum* ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ FPase เท่ากับ 30.80 U/ml และ 1.40 U/ml ตามลำดับ (Umikalsom et al.1997) และ *Trichoderma viride* ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์มาแล้วให้กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ FPase สูงที่สุดในวันที่ 7 เท่ากับ 16.46 IU/ml และ 2.19 IU/ml ตามลำดับ (Jiang et al., 2011) ต่อมา Wang et al. (2012) พบว่าการเลี้ยง *T. koningii* D-64 โดยใช้เซลลูโลส ร้อยละ 1 ผสมกับรำข้าวสาลี ร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน จะให้กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ FPase เท่ากับ 40.30 U/ml และ 3.80 U/ml ตามลำดับ ในกรณีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเลี้ยงราในสภาพอาหารเหลว พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ FPase จากเชื้อ *P. oxalicum* เท่ากับ 3.06 IU/ml และ 0.55 IU/ml ตามลำดับ (Shah et al., 2015) และกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ FPase จาก *P. oxalicum* GZ-2 เท่ากับ 2.00 U/ml และ 1.40 U/ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า *Penicillium* sp.จากงานวิจัยนี้ ให้กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ FPase ต่ำกว่าเชื้อรา *P. oxalicum* และเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงควรหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์รวมทั้งพัฒนาปรับปรุงพันธุ์เชื้อราเพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงขึ้น

สรุป

เชื้อราที่แยกได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 22 ไอโซเลต และเชื้อรา *Penicillium* sp.ให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด และเมื่อระบุชนิดของเชื้อราโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลพบว่าเชื้อรานี้มีความใกล้ชิดกับเชื้อรา *Penicillium oxalicum* มากที่สุด การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งพบว่าชนิดของสับสเตรทและระยะ

เวลามีผลต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase และ FPase

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากแหล่งทุนงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร

เอกสารอ้างอิง

Ariffin, H., Hassan, M.A., Shah, U.K, Abdullah, N., Ghazali, F.M., and Shirai, Y. 2008. Production of bacterial endoglucanase from pretreated oil palm empty fruit bunch by *Bacillus pumilus* EB3. J. Biosci. Bioeng. 106: 231-236.

Budihal, S.R., Agsar, D., and Patil, S.R. 2016. Enhanced production and application of acidothermophilic *Streptomyces* cellulase. Bioresour. Technol. 200: 706–712.

Jiang, X., Geng, A., He, N., and Li, Q. 2011. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. J. Biosci. Bioeng. 111: 121–127.

Liang, Y.L., Zhang, Z., Wu, M., Wu, Y., and Feng, J.X. 2014. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of china and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. Biomed Res. Int . 1-13.

Liao H., Fan, X.T., Mei, X., Wei, Z., Raza, W., Shen, Q., and Xu, Y. 2015. Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. Biomass Bioenergy. 74: 122-134.

Mandels, M. and Weber, J. 1969. The production of cellulases. Adv. Chem. 95: 391-414.

Marmur, J. 1961. A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organism. J. Mol. Biol. 3: 208-218.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.

Miller, S.L., McClean T.M., Walker J.F., and Buyck B. 2001. A molecular phylogeny of the Russulales including agaricoid, gasteroid and pleurotoid taxa. Mycologia. 93: 344-354.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.

Santos, D.A., Oliveira, M.M., Curvelo, A.A.S., Fonseca, L.P., and Porto, A.L.M. 2017. Hydrolysis of cellulose from sugarcane bagasse by cellulases from marine-derived fungi strains. Int. Biodeterior. Biodegradation: 121: 66-78.

Shah, S.P., Kalia, K.S., and Patel, J.S. 2015. Optimization of cellulase production by *Penicillium oxalicum* using banana agrowaste as a substrate. J. Gen. Appl. Microbiol. 61: 35–43.

Teather, R.M. and Wood, P.J. 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 43: 777-780.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL X windows interface flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25: 4876-4882.

Umikalsom M.S., Ariff A.B., Shamsuddin Z.H., Tong C.C., Hassan M.A., and Karim M.I.A. 1997. Production of cellulase by a wild production of cellulase by a wild strain of *Chaetomium globosum* using delignified oil palm empty-fruit-bunch fibre as substrate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 590-595.

Wang, Z., Ong, X.H., and Geng, A. 2012. Cellulase production and oil palm empty fruit bunch saccharification by a new isolate of *Trichoderma koningii* D-64. Process Biochem. 47: 1564-1571.

Wood, T.M. and Bhat, K.M. 1988. Method for measuring cellulose activities. P 87-112. In: Wood, W.A. and J.A. Kellogg (Eds.). Methods in Enzymology Cellulose and Hemicellulose. Academic Press, New York.