บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้พลาสมาพลังงานต่ำ (PIII) ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสเพื่อผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าวและต้นข้าวโพด *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการระดมยิงด้วยพลาสมาของอาร์กอนหรือไนโตรเจน โดยใช้แรงดันไบแอสในช่วงพลังงานที่ 2.5 kV และความหนาแน่นของไอออนในช่วง $1x10^{15}$ ถึง $1x10^{17}$ ions/cm^2 แบคทีเรียพันธุ์กลายที่แสดงความสามารถในการย่อยสารตั้งต้นมากกว่าแบคทีเรียชุดควบคุมถูกคัดเลือกโดยการย้อมด้วยสี Congo red และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ระหว่างแบคทีเรียพันธุ์กลายและแบคทีเรียชุดควบคุมด้วยการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นผลจากการย่อยสารตั้งต้นด้วยเอนไซม์ ทั้งนี้ได้โคลนยีนเซลลูเลส (*BglC*) และยีนไซลาเนส (*XynA*) ทั้งแบบปกติและที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จากนั้นส่งถ่ายชิ้นส่วนของยีนเซลลูเลสและไซลาเนสเข้าสู่เวคเตอร์ pETDuet-1 เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli strain* BL21 ทำการตั้งชื่อเซลล์ลูกผสมตามยีนที่ได้รับ ดังนี้ เซลล์ลูกผสมที่ได้รับยีน *BglC* และ *XynA* แบบปกติเรียก reBglC และ reXynA ส่วนเซลล์ลูกผสมที่ได้รับยีน *BglC* และ *XynA* ที่กลายพันธุ์ คือ reBglC_M and reXynA_M ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะต่างๆ พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม reBglC_M และ reXynA_M แสดงประสิทธิภาพการทำงานที่สูงกว่าเอนไซม์แบบปกติตลอดทุกช่วงอุณหภูมิและค่า pH การทำงานร่วมกันของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากเซลล์ลูกผสม reBglC_M และ reXynA_M ในการย่อยฟางข้าวและต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วให้ผลของน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดโดยให้ค่าถึง 22.16 และ 14.51 mg/ml ตามลำดับ จึงเลือกเงื่อนไขนี้ไปใช้ในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวและต้นข้าวโพดที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพและใช้ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* V1116 ในกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากฟางข้าวและต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วให้ผลเท่ากับ 3.50 % (ปริมาตร/ปริมาตร) และ 3.23 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ

Abstract

In this research, Plasma immersion ion implantation (PIII) was applied to induce mutation on bacteria for enhancing cellulase and xylanase activities for ethanol production from agriculture wastes such as rice straw and corn stover. Cellulase and xylanase producing bacterial cells of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* were treated by argon or nitrogen PIII at a bias voltage of -2.5 kV with various from 1×10^{15} to 1×10^{17} ions/cm^2 to induce mutation. The bacterial mutants exhibiting clear potentiality of enhanced hydrolysis activity were screened by Congo red assay. Comparison of hydrolysis activity from the bacterial mutants and non-mutants was investigated by measurement of reducing sugars liberate from substrates hydrolysis. In addition, the original and mutated genes of cellulase (*BglC*) and xylanase (*XynA*) were cloned into expression vector (pETDuet-1) and transformed into *E. coli* BL21 for overproduction of enzymes. The recombinant cells which contained the original *BglC* and *XynA* were named reBglC and reXynA, while the recombinant cells which contained the mutated *BglC* and *XynA* were named reBglC_M and reXynA_M, respectively. The hydrolysis activity between the mutants (reBglC_M and reXynA_M) and the control (reBglC and reXynA) was compared under the condition of various pH values and temperatures and the result showed that both of cellulase and xylanase activities of the mutants were clearly higher than the control. The combination of cellulase and xylanase which produced from reBglC_M and reXynA_M showed the highest hydrolysis activity on pretreated rice straw and corn stover by liberated reducing sugar at 22.16 and 14.51 mg/ml, respectively. Then combination of reBglC_M and reXynA_M was chosen for the hydrolysis of the agricultural wastes and then *Saccharomyces cerevisiae* V1116 was used in fermentation. Ethanol produced from pretreated rice straw and pretreated corn stover has yields of 3.50 % v/v and 3.23 % v/v, respectively.