บทที่ 4

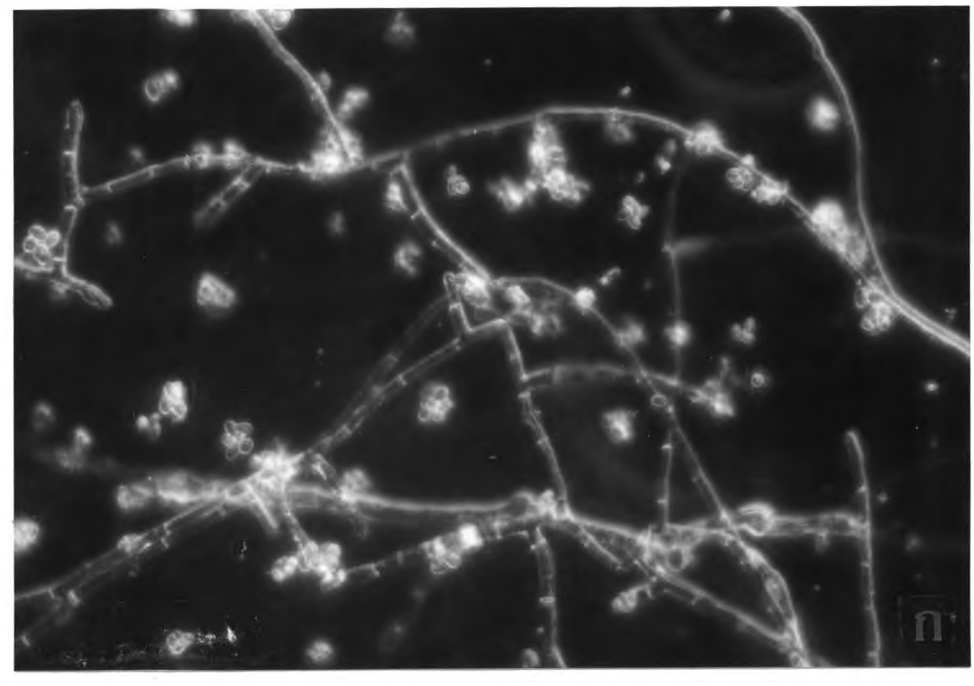
ผลการทดลอง

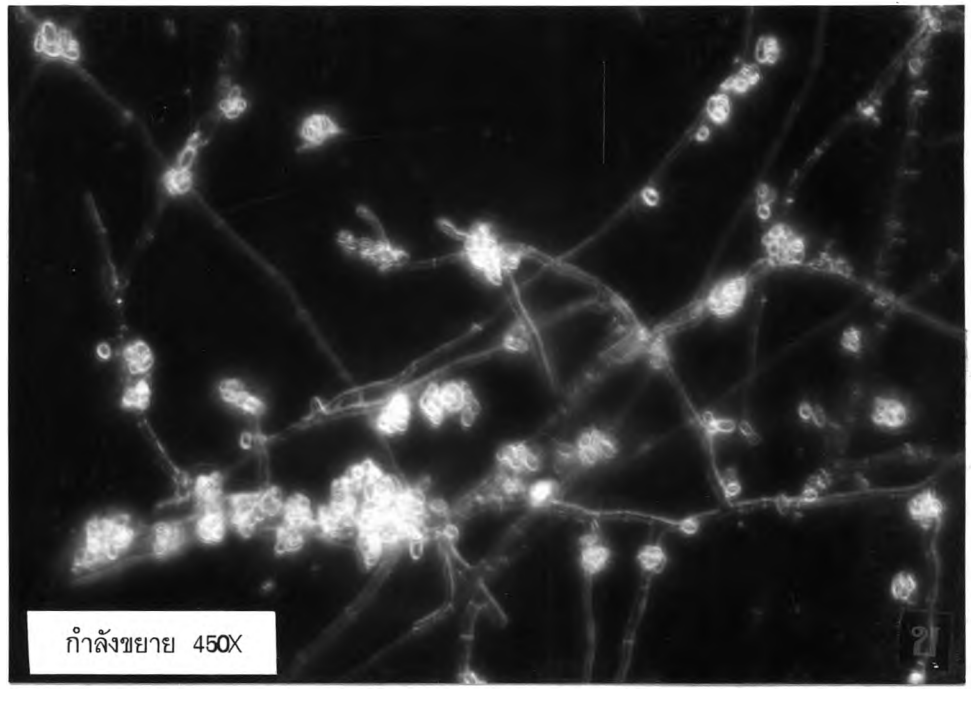
การทดสอบเชื้อราเพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อนำเชื้อรามาเลี้ยงบนสไลด์เพื่อดูลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อราในกลุ่มของ T. reesei เส้นใยและ conidiophore มีผนังกั้น เส้นใยแตกกิ่งก้านสาขามากมาย sterigma ก้านสุดท้ายทำหน้าที่สร้างคอนิเดียรูปไข่ มีสีเขียว มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายรูปดาว (ภาพที่ 10 ก. และ ข.) ส่วนเชื้อรา Aspergillus. sp N o. 3335 เส้นใยมีผนังกั้นแตกกิ่งก้านสาขามากมาย conidiophore ไม่มีผนังกั้น คอนิเดียมีลักษณะกลมสีน้ำตาลจนถึงสีดำ อยู่เป็นกลุ่ม เมื่อคอนิเดียแก่ก็จะหลุดออกกระจายอยู่บริเวณใกล้เคียง (ภาพที่ 11) ซึ่งเชื้อราทั้ง 2 ชนิดอยู่ใน Class Deuteromycetes การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร production m edium เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ activity ของ endoglucanase โดยใช้ CMCase method และวิเคราะห์ cellulase activity ด้วย FPA method ที่ช่วงอายุการเลี้ยง 3 6 9 12 และ 15 วัน

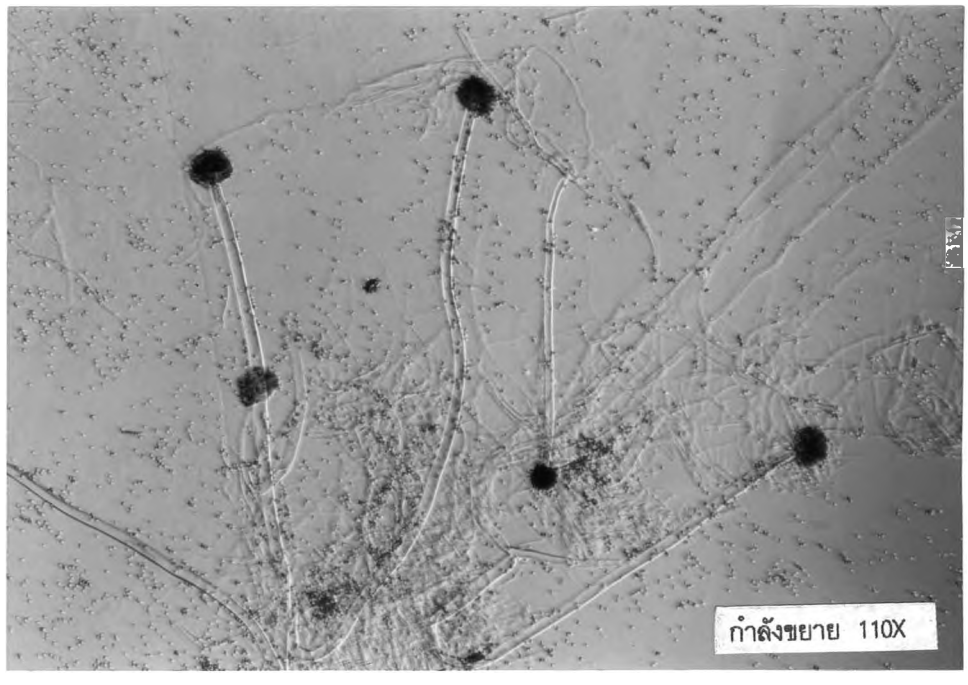
จากตารางที่ 2 การทดสอบ activity ของ endoglucanase จากเชื้อราทั้ง 2 ชนิด 3 สายพันธุ์ ด้วย CMCase method (ตารางที่ 2 และภาพที่ 12) พบว่า เชื้อรา T. reesei QM 9414 มี activity สูงสุดเท่ากับ 3.5635 หน่วย/มล. ที่อายุ 6 วัน หลังจากนั้น activity เริ่มลดลงเป็น 3.4743, 3.3403 และ 3.3083 หน่วย/มล. ที่อายุ 9 วัน 12 วัน และ 15 วัน ตามลำดับ เชื้อรา T. reesei QM 6a มี activity สูงสุดเท่ากับ 3.6973 หน่วย/มล. ที่อายุ 9 วัน หลังจากนั้น activity เริ่มลดลงเป็น 3.4995 และ 3.2958 หน่วย/มล. ที่อายุ 12 วันและ 15 วัน ตามลำดับ ส่วนเชื้อรา Aspergillus sp. No. 3335 พบว่ามี activity ของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 2.2453 หน่วย/มล. ที่อายุ 9 วัน หลังจากนั้น activity เริ่มลดลงเป็น 2.1383 และ 2.1415 หน่วย/มล. ที่อายุ 12 และ 15 วัน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ย

I16758882





ภาพที่ 10 ก. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ T. reesei QM 9414
ข. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ T. reesei QM 6a



ภาพที่ 11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา Aspergillus sp. No.3335

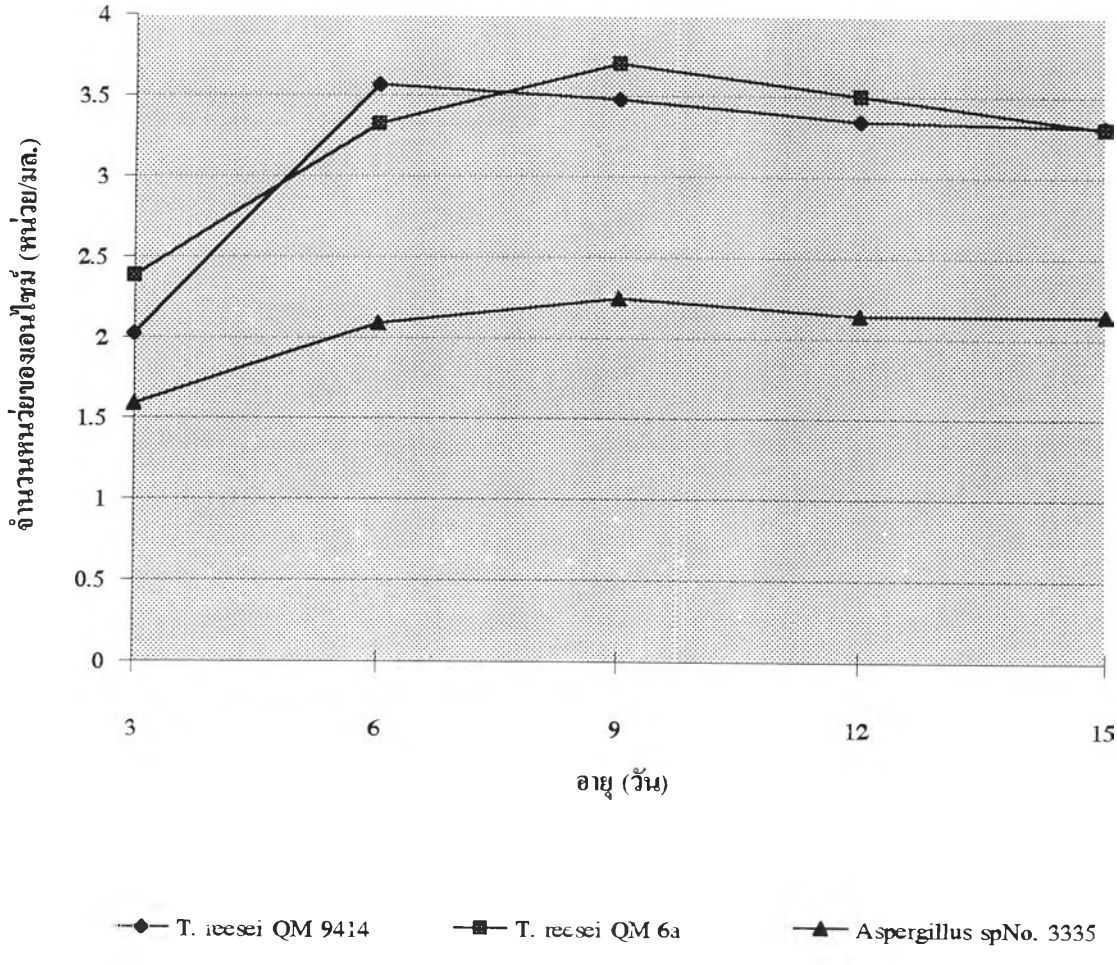
activity ของ endoglucanase จากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อรา T. reesei QM 6a มีค่าสูงสุดเท่ากับ 2.2390 หน่วย/มล. ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์

การทดสอบ cellulase activity ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด 3 สายพันธุ์ด้วย FPA method (ตารางที่ 2 และภาพที่ 13) พบว่า เชื้อรา T. reesei QM 9414 มี activity สูงสุดเท่ากับ 0.5728 หน่วย/มล. ที่อายุ 12 วัน จากนั้น activity ลดลงเป็น 0.5450 หน่วย/มล. ที่อายุ 15 วัน เชื้อรา T. reesei QM 6a มี activity สูงสุดเท่ากับ 0.8525 หน่วย/มล. ที่อายุ 9 วัน หลังจากนั้น activity เริ่มลดลงเป็น 0.6220 และ 0.6948 หน่วย/มล. ที่อายุ 12 และ 15 วัน ตามลำดับ ส่วนเชื้อรา Aspergillus sp. No. 3335 มี activity สูงสุดเท่ากับ 0.2905 หน่วย/มล. ที่อายุ 15 วัน และเป็นค่าที่ต่ำกว่าเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อดูจากค่าเฉลี่ยของ cellulase activity จากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อรา T. reesei QM 6a มีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.5771 หน่วย/มล. ซึ่งสูงกว่าเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์

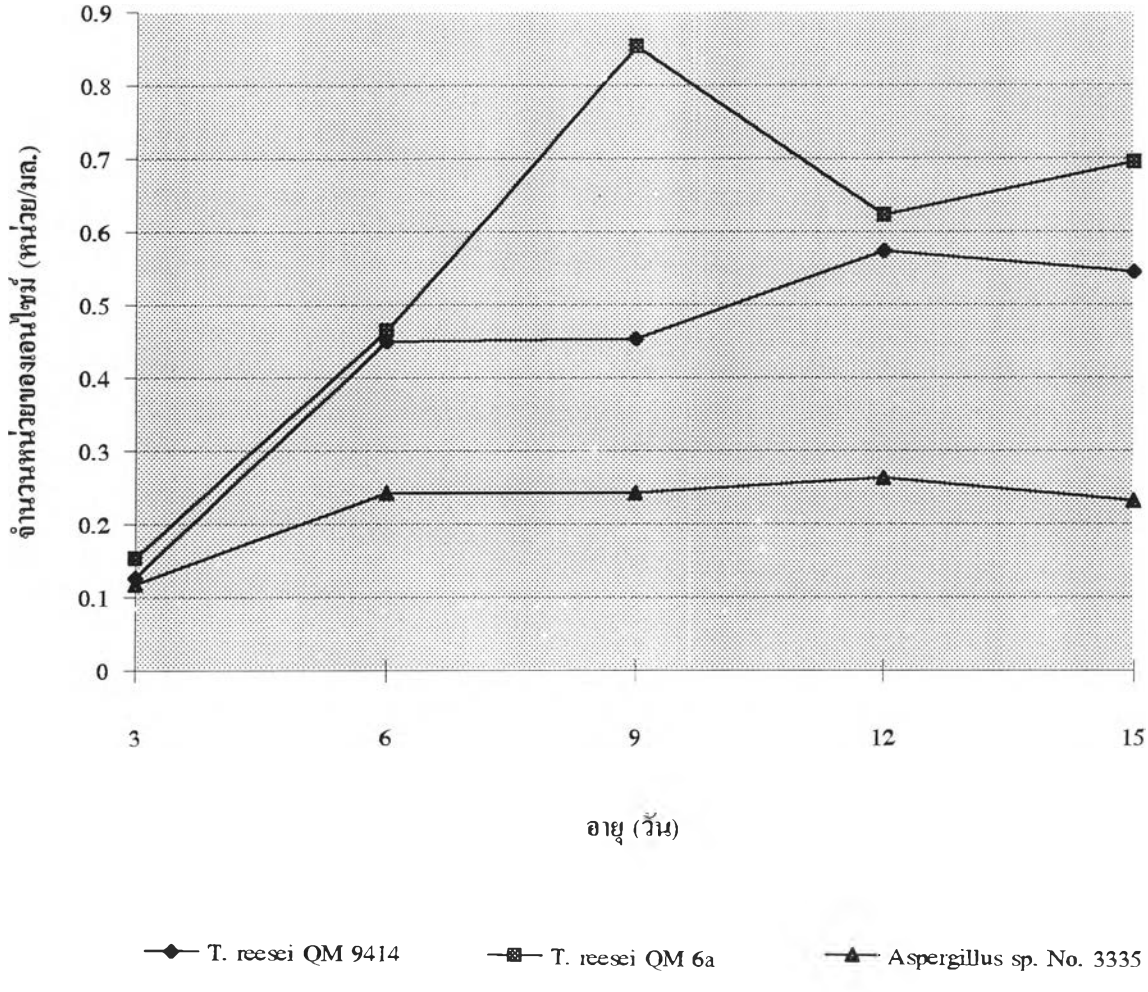
การทดสอบ activity ของเอนไซม์ทั้ง 2 วิธีการ ให้ผลที่สอดคล้องกัน คือ เชื้อรา T. reesei QM 6a มี activity สูงกว่าเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อดูการเปลี่ยนแปลงของ pH (ตารางที่ 2 และภาพที่ 14) เชื้อรา T. reesei QM 9414 ที่มี activity ของเอนไซม์สูงสุด มีค่า pH เป็น 3.9 เมื่อวิเคราะห์ด้วย CMCase method ที่อายุ 9 วัน และ มีค่า pH เป็น 4.8 เมื่อวิเคราะห์ด้วย FPA method ที่อายุ 12 วัน ส่วนที่อายุ 15 วัน pH เพิ่มขึ้นเป็น 7.1 activity ของเอนไซม์ลดลง ในเชื้อรา T. reesei QM 6a ที่มี activity สูงสุดเมื่อวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีการ ที่อายุ 9 วัน pH เท่ากับ 4.3 จากนั้น pH เพิ่มขึ้นเป็น 6.8 และ 7.2 ที่อายุ 12 และ 15 วัน activity ของเอนไซม์ก็ลดลงเช่นเดียวกัน ส่วนเชื้อรา Aspergillus sp. No. 3335 ที่มี activity ของเอนไซม์สูงสุด pH เท่ากับ 5.1 เมื่อวิเคราะห์ด้วย CMCase method ที่อายุ 9 วัน และ pH เท่ากับ 5.4 เมื่อวิเคราะห์ด้วย FPA method ที่อายุ 15 วัน การเปลี่ยนแปลงของ pH ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราทั้ง 3 ชนิดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งค่า pH ที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง โดยเห็นได้ชัดในกลุ่มของเชื้อรา T. reesei ทั้ง 2 สายพันธุ์ ส่วนเชื้อรา Aspergillus sp. เห็นได้ในการผลิต endoglucanase

ตารางที่ 2 การทดสอบ activity ของเอนไซม์จากเชื้อรา T. reesei QM 9414, T. reesei QM 6a และ Aspergillus sp. No. 3335 ด้วย CMCase และ FPA method เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร production medium ที่อายุ 3 6 9 12 และ 15 วัน

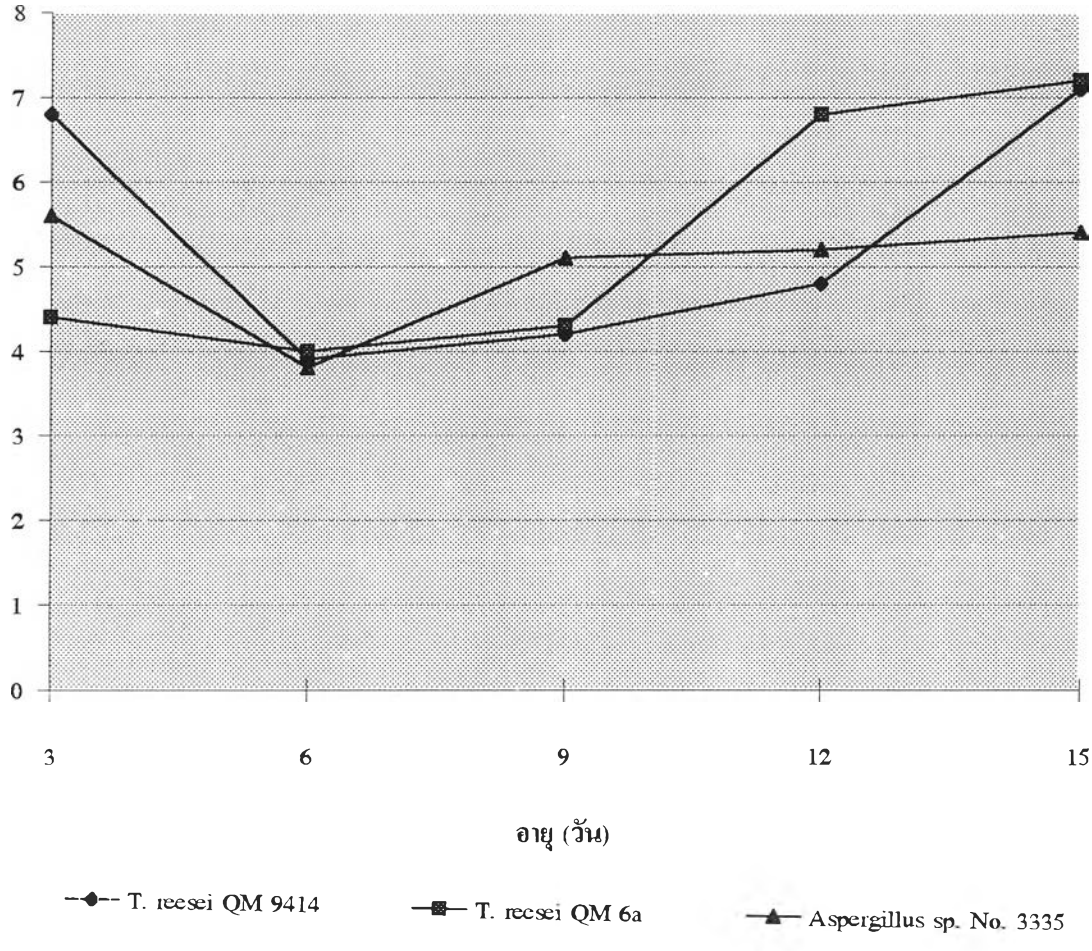
วิธีการวิเคราะห์/ เชื้อรา/pH	จำนวนหน่วยของเอนไซม์ (หน่วย/มล.) / pH ที่อายุ (วัน)					ค่าเฉลี่ยของเชื้อรา
	3	6	9	12	15	
CMCase						
T. reesei QM 9414	2.0223	3.5635	3.4743	3.3403	3.3083	3.1417
T. reesei QM 6a	2.3815	3.3210	3.6973	3.4995	3.2958	3.2390
Aspergillus sp.	1.5878	2.0878	2.2453	2.1383	2.1415	2.0401
FPA						
T. reesei QM 9414	0.1258	0.4493	0.4523	0.5728	0.5450	0.4290
T. reesei QM 6a	0.1523	0.4640	0.8525	0.6220	0.6948	0.5571
Aspergillus sp.	0.1173	0.2420	0.2418	0.2628	0.2305	0.2309
pH						
T. reesei QM 9414	6.8	3.9	4.2	4.8	7.1	5.4
T. reesei QM 6a	4.4	4.0	4.3	6.8	7.2	5.3
Aspergillus sp.	5.6	3.8	5.1	5.2	5.4	5.0



ภาพที่ 12 activity ของ endoglucanase จากเชื้อรา T. reesei QM 9414 T. reesei QM 6a และ Aspergillus sp. No. 3335 เมื่อวิเคราะห์ด้วย CMCase method ที่อายุ 3 6 9 12 และ 15 วัน



ภาพที่ 13 cellulase activity จากเชื้อรา T. reesei QM 9414 T. reesei QM 6a และ Aspergillus sp. No. 3335 เมื่อวิเคราะห์ด้วย FPA method ที่อายุ 3 6 9 12 และ 15 วัน



ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา T. reesei QM 9414, T. reesei QM 6a และ Aspergillus sp. No. 3335 ที่อายุ 3 6 9 12 และ 15 วัน

การคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราทั้ง 2 ชนิด 3 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อรา T. reesei QM 6a มี activity ของเอนไซม์สูงสุด เมื่อวิเคราะห์ด้วย CMCase และ FPA methods ดังนั้นจึงนำไปทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a

จากการเปรียบเทียบเชื้อราทั้ง 3 ชนิด พบว่า T. reesei QM 6a มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ในสภาวะที่ทดลองนี้ จากนั้นจึงนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์เพื่อเลือกอายุการผลิตที่เหมาะสม โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมที่มี microcrystalline cellulose เป็นสับสเตรท โดยเพิ่มปริมาณเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ สภาพแวดล้อมเดียวกัน และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ผลที่ช่วงอายุ 3 6 9 12 วัน และ 15 วัน

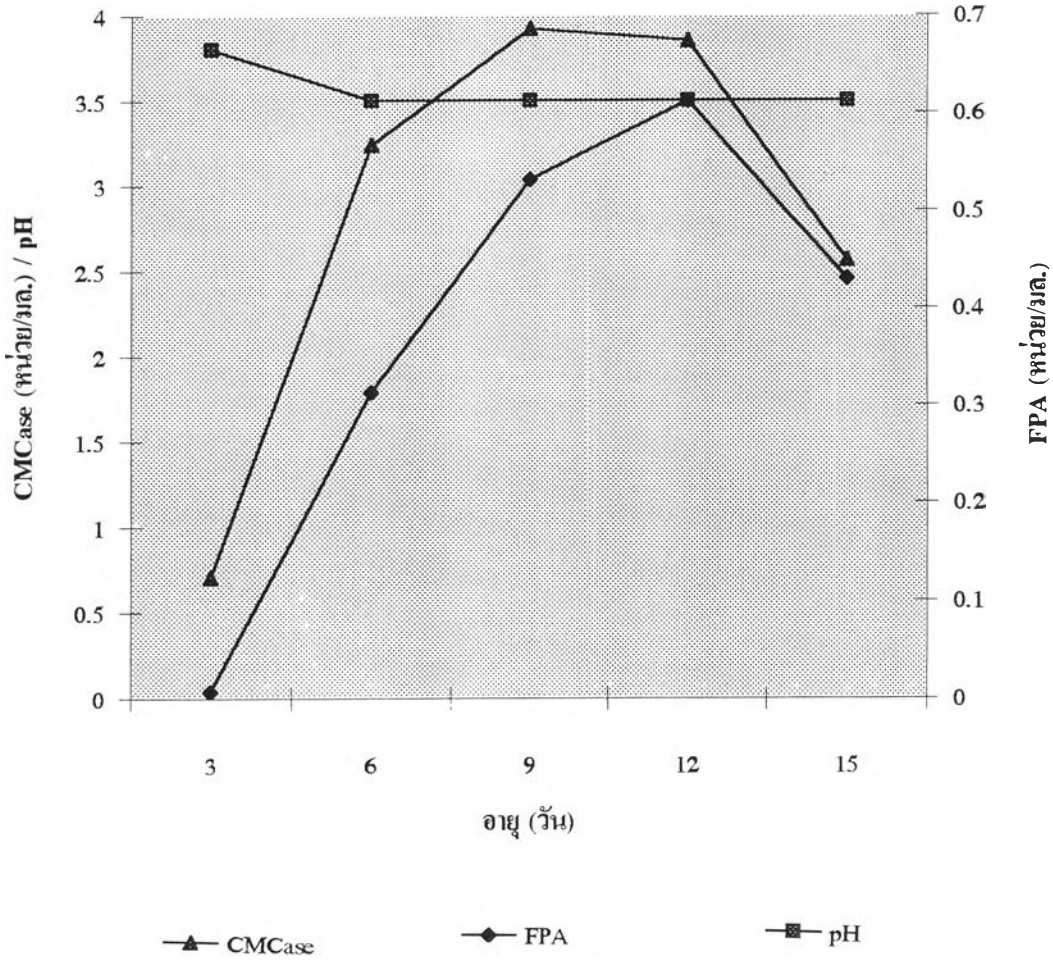
จากตารางที่ 3 และภาพที่ 15 อายุ 3 วัน activity ของเอนไซม์จากเชื้อรา T. reesei QM 6a เมื่อวิเคราะห์ด้วย CMCase และ FPA method มีค่าเท่ากับ 0.706 และ 0.007 หน่วย/มล. อายุ 6 วัน การวิเคราะห์ด้วย CMCase และ FPA ให้ผลเท่ากับ 3.238 และ 0.313 หน่วย/มล. ที่อายุ 9 วัน การวิเคราะห์ด้วย CMCase และ FPA ให้ผลเท่ากับ 3.920 และ 0.531 หน่วย/มล. ตามลำดับ อายุ 12 วัน การวิเคราะห์ด้วย CMCase และ FPA ให้ activity ของเอนไซม์ 3.825 และ 0.612 หน่วย/มล. ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่อายุการเลี้ยง 15 วัน การวิเคราะห์ด้วย CMCase และ FPA ให้ activity ของเอนไซม์ 2.564 และ 0.430 หน่วย/มล.

การวิเคราะห์ด้วย CMCase ตั้งแต่วันที่ 3-15 ให้ค่าเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกันโดยที่อายุ 9 วันให้ค่าที่สูงที่สุดคือ 3.920 หน่วย/มล. และลดลงมาเป็น 3.825 และ 2.564 หน่วย/มล. ในวันที่ 12 และ 15 ตามลำดับ การวิเคราะห์ด้วย FPA activity ของเอนไซม์ที่อายุ 3-15 วัน มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 12 คือ 0.612 หน่วย/มล.

การทดสอบเพื่อเลือกอายุการผลิตเอนไซม์ในครั้งนี้ พบว่าอายุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a อยู่ในช่วง 12 วัน ซึ่งให้ activity ของเอนไซม์สูงสุดเมื่อวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีการ ดังนั้นจึงใช้เป็นแนวทางสำหรับเพิ่มขนาดการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในถังหมักต่อไป

ตารางที่ 3 activity ของเอนไซม์เซลลูเลสจาก T. reesei QM 6a เมื่อวิเคราะห์ด้วย CMCase และ FPA methods ที่อายุการเลี้ยง 3 6 9 12 และ 15 วัน ในอาหารเหลวสูตร production medium ที่มี microcrystalline cellulose 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรท

อายุ (วัน)	pH	จำนวนหน่วยของเอนไซม์/มล.	
		CMCase	FPA
3	3.8	0.706	0.007
6	3.5	3.238	0.313
9	3.5	3.920	0.531
12	3.5	3.825	0.612
15	3.3	2.564	0.430



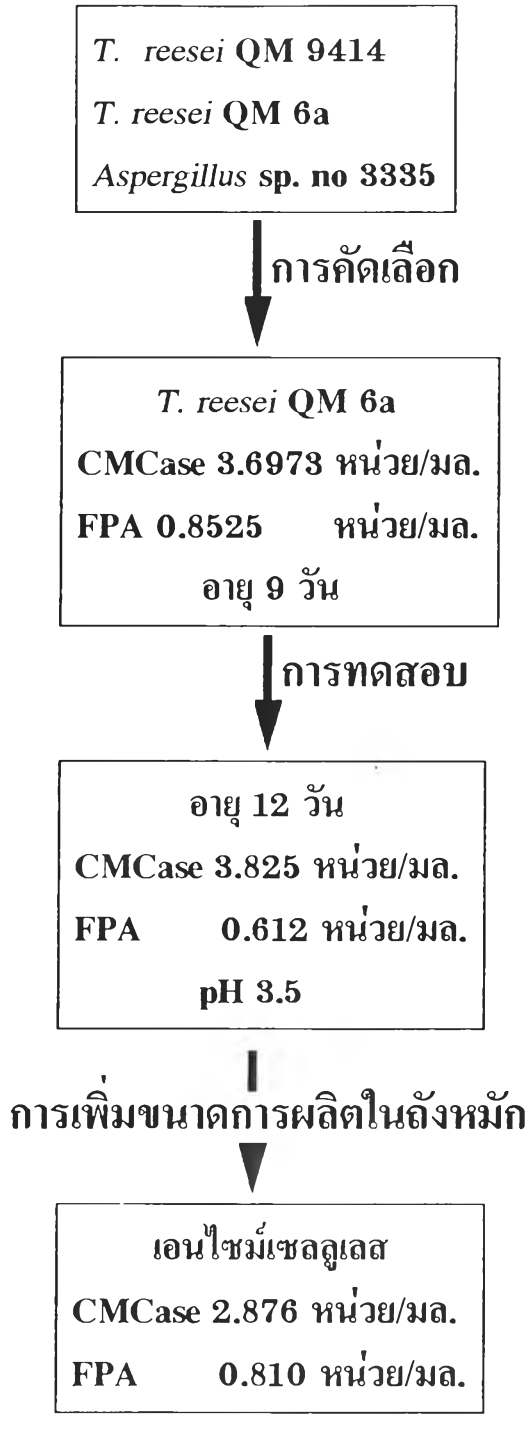
ภาพที่ 15 การทดสอบอายุการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา T. reesei QM 6a ในอาหารเหลวสูตร production medium ที่มี microcrystalline cellulose 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรท ที่อายุ 3 6 9 12 และ 15 วัน

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a ในระดับขยายขนาด

จากการคัดเลือกเชื้อราในขั้นตอนที่ 1 เมื่อได้เชื้อรา T. reesei QM 6a ที่อายุการเลี้ยง 12 วัน ก็นำมาสู่ขั้นตอนของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในถังหมักขนาด 5,000 มล. จนครบ 12 วัน เก็บตัวอย่างบางส่วนวิเคราะห์ปริมาณของ endoglucanase และ cellulase activity ควบคู่ไปด้วย (ตารางที่ 4) ข้อมูลจากตารางที่ 4 จะเห็นว่า activity ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็นลำดับที่อายุการเลี้ยงนานขึ้น และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่อายุ 12 วัน ปริมาณเอนไซม์ให้ผลสูงสุดทั้ง 2 วิธีการ คือ activity ของ endoglucanase ได้ 2.876 หน่วย/มล. และ cellulase activity ได้ 0.810 หน่วย/มล. ซึ่งเป็น activity ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในการทดลองครั้งนี้ต่อไป

ตารางที่ 4 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a โดยใช้ถังหมักที่อายุ 3 6 9 วัน และ 12 วัน เมื่อวิเคราะห์ด้วย CMCase และ FPA method

อายุ (วัน)	pH	จำนวนหน่วยของเอนไซม์/มล.	
		CMCase	FPA
3	4.1	1.927	0.235
6	3.7	1.957	0.237
9	3.7	2.259	0.327
12	3.6	2.876	0.810



ภาพที่ 16 แผนภูมิการคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส การทดสอบประสิทธิภาพ และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อเพิ่มขนาดในถังหมัก

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสและการปรับสภาพ (pretreatment)

จากตารางที่ 5 ฟางข้าวน้ำหนักแห้ง 2.14 กรัมเมื่อผ่านการปรับสภาพน้ำหนักแห้งลดลงเป็น 1.86 กรัม ซึ่งลดลงจากน้ำหนักก่อนปรับสภาพ 0.28 กรัม เมื่อใช้น้ำหนักแห้งของฟางข้าวหลังการปรับสภาพ 10 กรัม จะต้องใช้น้ำหนักเปียกก่อนอบ 53.76 กรัม ซังข้าวโพดน้ำหนักแห้ง 2.50 กรัม เมื่อผ่านการปรับสภาพน้ำหนักแห้งลดลงเป็น 1.78 กรัม ซึ่งลดลงจากน้ำหนักก่อนปรับสภาพ 0.72 กรัม เมื่อใช้ซังข้าวโพดหลังการปรับสภาพ 10 กรัมน้ำหนักแห้ง จะต้องใช้น้ำหนักเปียกก่อนอบ 56.17 กรัม ชานอ้อยน้ำหนักแห้ง 1.85 กรัม เมื่อผ่านการปรับสภาพน้ำหนักแห้งลดลงเป็น 1.51 กรัม ซึ่งลดลงจากน้ำหนักก่อนการปรับสภาพ 0.34 กรัม เมื่อใช้ชานอ้อยหลังการปรับสภาพ 10 กรัมน้ำหนักแห้งจะต้องใช้น้ำหนักเปียกก่อนอบ 66.23 กรัม ต้นมันสำปะหลังน้ำหนักแห้ง 1.79 กรัม เมื่อผ่านการปรับสภาพ น้ำหนักแห้งลดลงเป็น 1.74 กรัม ซึ่งลดลงจากน้ำหนักก่อนการปรับสภาพ 0.04 กรัม เมื่อใช้ต้นมันสำปะหลังหลังการปรับสภาพ 10 กรัมน้ำหนักแห้ง จะต้องใช้น้ำหนักเปียกก่อนอบ 57.47 กรัม จะเห็นได้ว่าน้ำหนักที่ลดลงจากขั้นตอนการปรับสภาพของต้นมันสำปะหลังลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับฟางข้าว ซังข้าวโพดและต้นมันสำปะหลัง

ตารางที่ 5 น้ำหนักแห้งของฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย และมันสำปะหลัง ก่อนและหลังการปรับสภาพ

ชนิดของวัตถุดิบ	นน. ก่อนปรับสภาพ (กรัม)		นน. หลังปรับสภาพ (กรัม)		
	ก่อนอบ	หลังอบ	ก่อนอบ	หลังอบ	นน. เปียกต่อ 10 ก.นน.แห้ง
ฟางข้าว	10	2.14	10	1.86	53.76
ซังข้าวโพด	10	2.50	10	1.78	56.17
ชานอ้อย	10	1.85	10	1.51	66.23
ต้นมันสำปะหลัง	10	1.79	10	1.74	57.47

กระบวนการแยกน้ำตาลจากวัสดุที่เหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้า

นำวัสดุที่ผ่านขั้นตอนของการปรับสภาพใส่ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. จำนวน 10 กรัมน้ำหนักแห้งไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเติมเอนไซม์เพื่อการค้าโดยใช้ 2 ชนิด คือ celluclast และ novozyme ปริมาตรที่เติมคือ 0.5 มล. และ 0.3 มล./3 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง บ่มในสภาพเขย่าเมื่อครบ 7 วัน นำมาปั่นแยกเอาตะกอนออก นำส่วนที่เป็นน้ำใสไปวัด pH วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคส (ตารางที่ 6 และภาพที่ 18) น้ำตาลที่แยกได้แสดงในภาพที่ 17

จากตารางที่ 6 การย่อยสลายเซลลูโลส 20 กรัมน้ำหนักแห้งโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้า ที่ระยะเวลาการย่อย 7 วัน ทั้งปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้แตกต่างกันตามชนิดของวัตถุดิบที่เป็นแหล่งของเซลลูโลส โดยฟางข้าวได้น้ำตาลรีดิวซ์ 14.4 กรัม และน้ำตาลและกลูโคส 7.05 กรัม ซังข้าวโพดได้น้ำตาลรีดิวซ์ 13.86 กรัม และน้ำตาลกลูโคส 6.90 กรัม ชานอ้อยได้น้ำตาลรีดิวซ์ 10.50 กรัม และน้ำตาลกลูโคส 5.52 กรัม ส่วนต้นมันสำปะหลังไม่เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลาย ซึ่งเป็นผลมาจากวิธีการปรับสภาพก่อนการย่อยสลายไม่เหมาะสม เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตจากการย่อยสลายตามภาพที่ 17 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคสในฟางข้าวสูงกว่าซังข้าวโพดและ ชานอ้อย ส่วน pH ที่เกิดขึ้นมีค่าใกล้เคียงกัน คือ 5.2 5.2 และ 5.4 ในฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อย ตามลำดับ ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายโดยน้ำหนักแห้งของวัตถุดิบเริ่มต้น พบว่า ฟางข้าว 1 กรัม เมื่อย่อยสลายได้น้ำตาลรีดิวซ์ 0.720 กรัม โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบ 0.353 กรัม ซังข้าวโพด 1 กรัม เมื่อย่อยสลายได้น้ำตาลรีดิวซ์ 0.693 กรัม โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบ 0.345 กรัม และชานอ้อย 1 กรัม เมื่อย่อยสลายได้น้ำตาลรีดิวซ์ 0.525 กรัม โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบ 0.276 กรัม จะเห็นได้ว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิดนี้ สามารถใช้เป็นแหล่งผลิตน้ำตาลกลูโคสได้

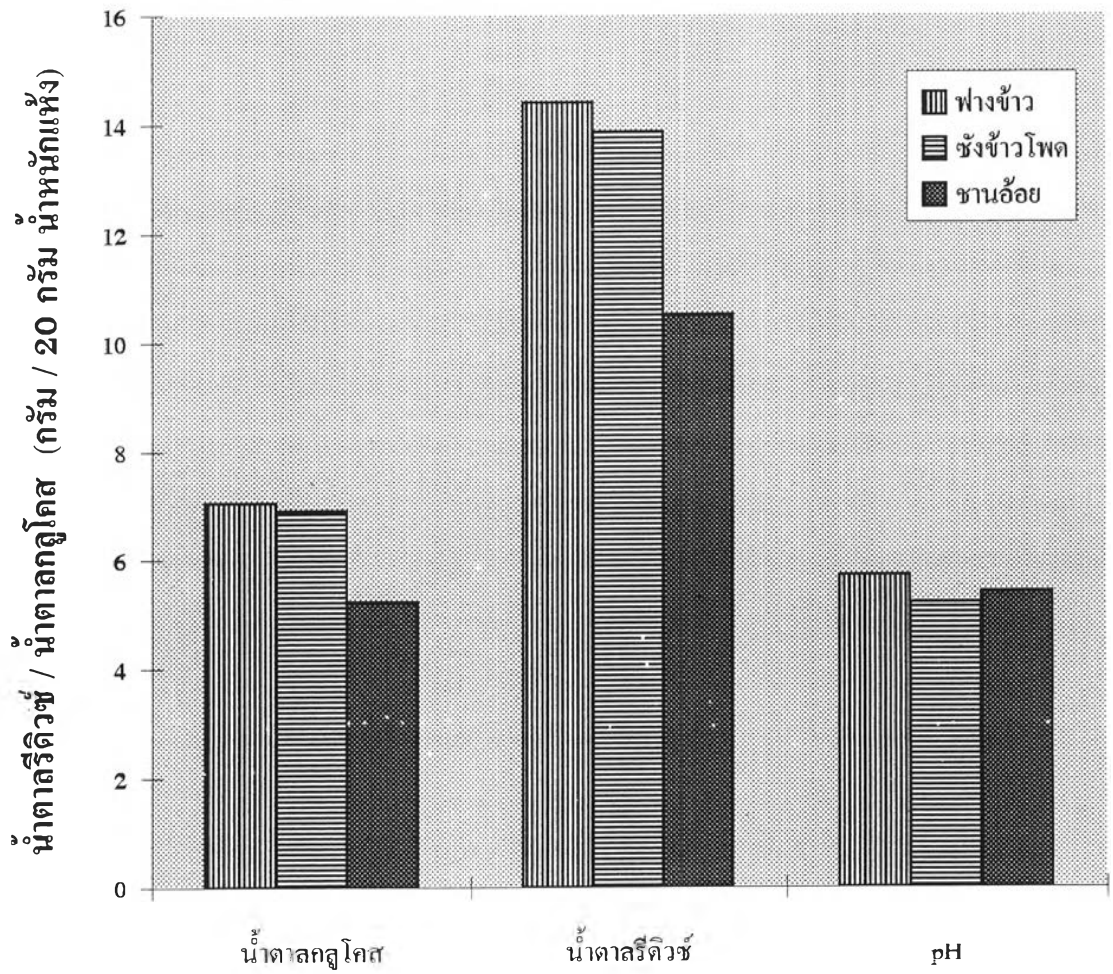
ตารางที่ 6 การย่อยสลายฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย และต้นมันสำปะหลัง 20 กรัมน้ำหนักแห้ง ด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า

ชนิดของวัตถุดิบ	pH	ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลาย (กรัม/20 กรัมน้ำหนักแห้ง)		(กรัม/กรัมสับสเตรท)	
		น้ำตาลรีดิวซ์	น้ำตาลกลูโคส	น้ำตาลรีดิวซ์	น้ำตาลกลูโคส
ฟางข้าว	5.7	14.40	7.05	0.720	0.353
ซังข้าวโพด	5.2	13.86	6.90	0.693	0.345
ชานอ้อย	5.4	10.50	5.22	0.525	0.276
ต้นมันสำปะหลัง	ND	NA	NA	NA	NA

NA = Non activity

ND = Not determined

ภาพที่ 17 น้ำตาลที่แยกได้จากชานอ้อย



ภาพที่ 18 กราฟเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลกลูโคส และ pH ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อยโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้า

พระบรมราชูปถัมภ์ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระบวนการแยกน้ำตาลจากวัสดุที่เหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อรา T. reesei QM 6a

นำวัสดุที่ผ่านขั้นตอนของการปรับสภาพใส่ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. จำนวน 10 กรัมน้ำหนักแห้งไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำมาเติมเอนไซม์ที่ผลิตได้ตามขั้นตอนที่ 2 จำนวน 100 มล. (อัตราส่วนระหว่างวัสดุกับเอนไซม์เท่ากับ 1:10) จากนั้นนำไปบ่มในสภาพแวดล้อมเดียวกับการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า การเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกัน ผลจากการย่อยสลายแสดงในตารางที่ 7 และ ภาพที่ 19

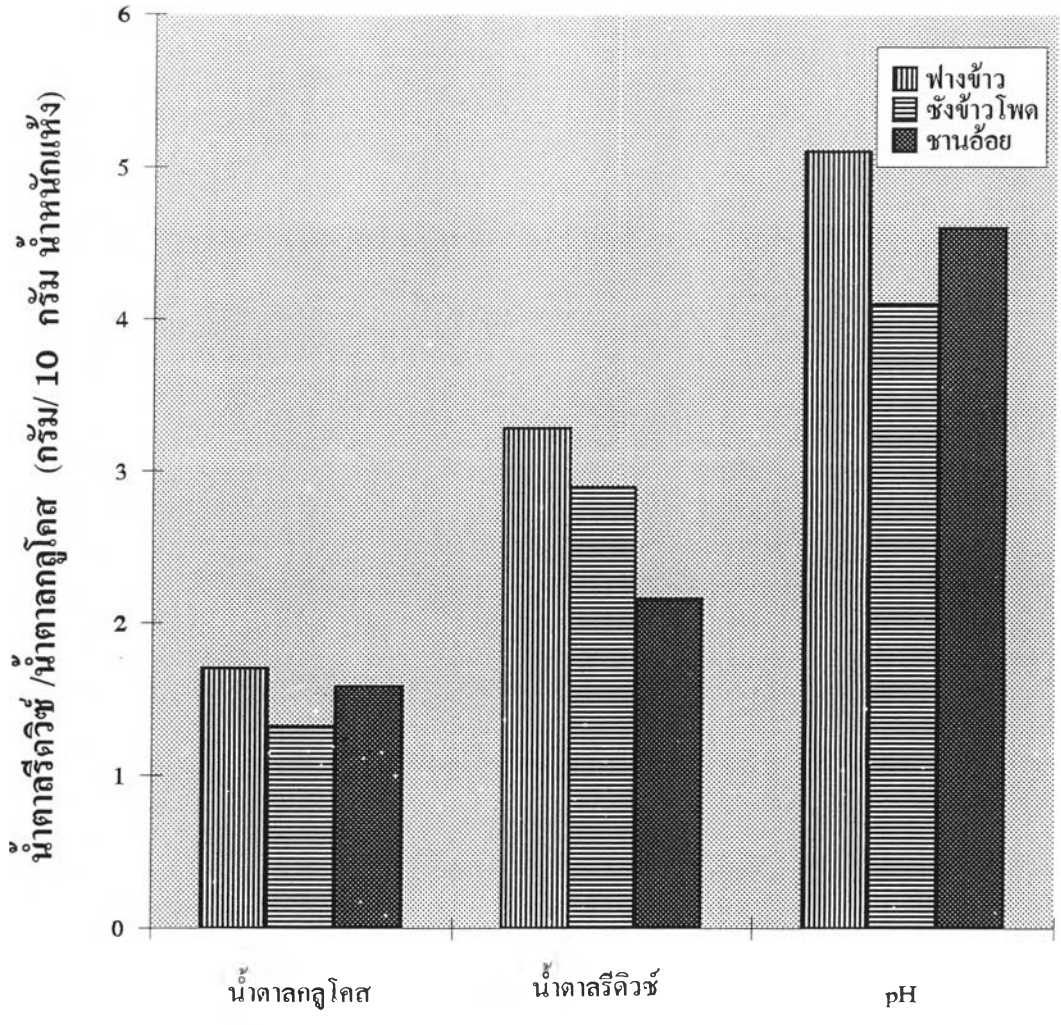
จากตารางที่ 7 การย่อยสลายเซลลูโลส 10 กรัมน้ำหนักแห้งโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่ผลิตได้ที่ระยะเวลาการย่อย 7 วัน ทั้งปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้แตกต่างกันตามชนิดของวัตถุดิบที่เป็นแหล่งของเซลลูโลส โดยฟางข้าวได้น้ำตาลรีดิวซ์ 3.28 กรัม และน้ำตาลกลูโคส 1.70 กรัม ซังข้าวโพดได้น้ำตาลรีดิวซ์ 2.89 กรัม และน้ำตาลกลูโคส 1.32 กรัม ชานอ้อยได้น้ำตาลรีดิวซ์ 2.16 กรัม และน้ำตาลกลูโคส 1.58 กรัม ส่วนต้นมันสำปะหลัง พบว่าไม่มีปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดขึ้นเช่นเดียวกับการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า ซึ่งเป็นผลมาจากวิธีการปรับสภาพก่อนการย่อยสลายไม่เหมาะสม เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตจากการย่อยสลายตามภาพที่ 18 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคสในฟางข้าวสูงกว่าซังข้าวโพดและชานอ้อย ส่วน pH ที่เกิดขึ้นมีค่าแตกต่างกัน คือ 5.1 4.1 และ 4.6 ในฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อย ตามลำดับ ผลผลิตที่ได้โดยน้ำหนักแห้งของวัตถุดิบเริ่มต้น พบว่าฟางข้าว 1 กรัม เมื่อย่อยสลายจะได้น้ำตาลรีดิวซ์ 0.328 กรัม ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 0.170 กรัม ซังข้าวโพด 1 กรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อย่อยสลายแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์ 0.289 กรัม ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 0.132 กรัม ส่วนชานอ้อย 1 กรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อย่อยสลายแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์ 0.216 กรัมและมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 0.158 กรัม ซึ่งจะเห็นได้ว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิดเมื่อนำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นเองในห้องปฏิบัติการจะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคสเช่นเดียวกับการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า

ตารางที่ 7 การย่อยสลายฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย และต้นมันสำปะหลัง 10 กรัมน้ำหนักแห้ง ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T. reesei* QM 6a

ชนิดของวัตถุดิบ	pH	ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลาย (กรัม/20 กรัมน้ำหนักแห้ง)		(กรัม/กรัม สับสเตรท)	
		น้ำตาลรีดิวซ์	น้ำตาลกลูโคส	น้ำตาลรีดิวซ์	น้ำตาลกลูโคส
ฟางข้าว	5.1	3.28	1.70	0.328	0.170
ซังข้าวโพด	4.1	2.89	1.32	0.289	0.132
ชานอ้อย	5.6	2.16	1.58	0.216	0.158
ต้นมันสำปะหลัง	ND	NA	NA	NA	NA

NA = Non activity

ND = Not determined



ภาพที่ 19 กราฟเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลกลูโคส และ pH ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a

การหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาลที่ย่อยสลายจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า

นำน้ำตาลที่ย่อยจากฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อยด้วยเอนไซม์เพื่อการค้ามาเตรียมเป็น molasses medium ตามขั้นตอนที่ 4 (ภาพที่ 20) เพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการหมัก เตรียมหัวเชื้อตามขั้นตอนที่ 5.1 (ภาพที่ 21 ก.และ ข.) เติมหัวเชื้อยีสต์ปริมาตร 5 มล. นำไปหมักในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างของการหมักที่อายุ 1 2 3 และ 4 วัน วิเคราะห์ผลตามขั้นตอนที่ 5.2

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 20 molasses medium ใช้เป็น substrate ในการหมักเอทธานอล

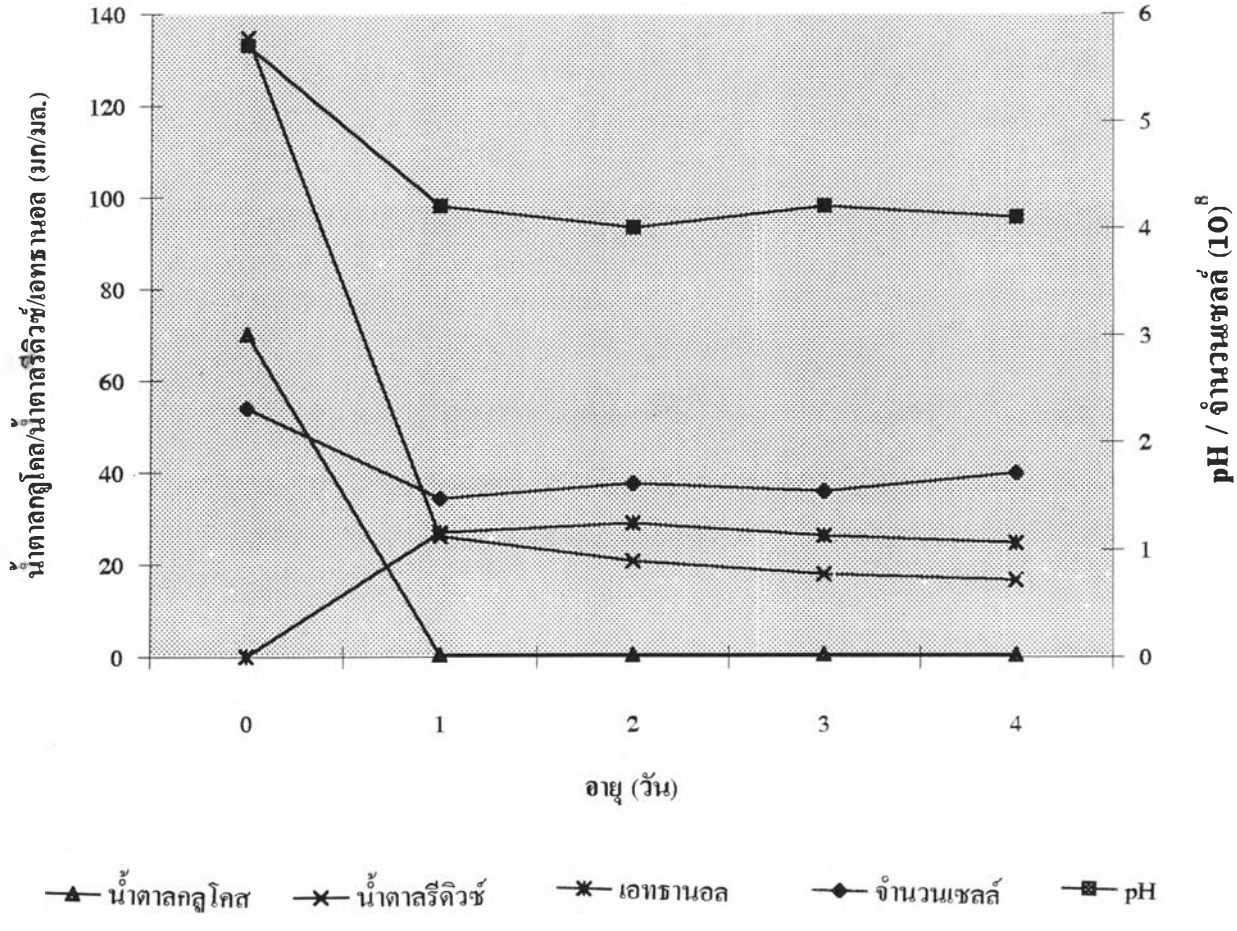
ภาพที่ 21

ก. เชื้อยีสต์ S. cerevisiae ที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร YMA

ข. เชื้อยีสต์ S. cerevisiae ที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร YMA และ YM medium เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักเอทธานอล

ตารางที่ 8 การหมักเอทธานอลจากฟางข้าวที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้าที่อายุการหมัก 1 2 3 และ 4 วัน

อายุ (วัน)	pH	จำนวนเซลล์ (10^8)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.)	น้ำตาลกลูโคส (มก./มล.)	เอทธานอล (มก./มล.)	เอทธานอล (มก./มล. น้ำตาลกลูโคส)	เอทธานอล (ก./ก. สับสเตรท)
0	5.7	2.31	134.71	70.10	0	0	0
1	4.2	1.47	26.10	0.48	27.00	0.385	0.135
2	4.0	1.61	20.75	0.48	28.90	0.412	0.145
3	4.2	1.54	17.90	0.54	26.20	0.374	0.131
4	4.1	1.71	16.58	0.47	24.70	0.352	0.126



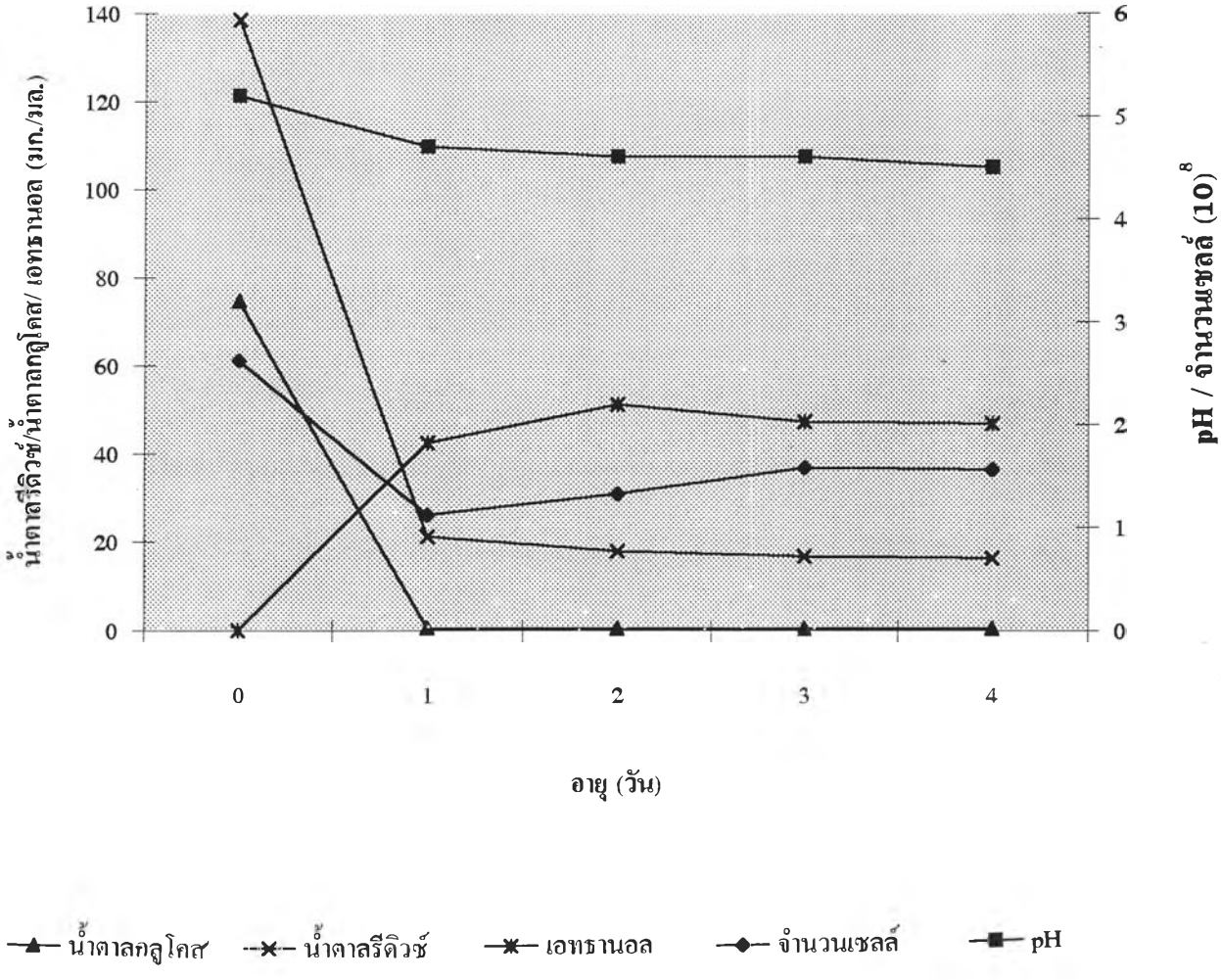
ภาพที่ 22 กราฟแสดงการหมักเอทธานอลจากฟางข้าวที่ย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้าที่อายุการหมัก 1 2 3 และ 4 วัน

การหมักเอทธานอลจากฟางข้าว (ตารางที่ 8 และภาพที่ 22) ฟางข้าวที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้าโดยมีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 134.71 มก./มล. และน้ำตาลกลูโคส 70 มก./มล. pH เริ่มต้นที่ 5.7 และจำนวนเซลล์ของเชื้อยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 2.31×10^{8} เซลล์/มล. ผลของการหมักพบว่าปริมาณของเอทธานอลในวันที่ 1 เท่ากับ 27.0 มก/มล. จำนวนเซลล์ลดลงเป็น 1.47×10^{8} เซลล์/มล. pH ลดลงเป็น 4.2 น้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 26.10 มก./มล. และน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือ 0.48 มก./มล. วันที่ 2 ของการหมักปริมาณเอทธนอลสูงสุดคือ 28.9 มก./มล. จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 1.61×10^{8} เซลล์/มล. pH ลดลงเป็น 4.0 ส่วนวันที่ 3 และวันที่ 4 ปริมาณของเอทธานอลเริ่มลดลงเหลือ 26.2 และ 24.7 มก./มล. ตามลำดับ จะเห็นว่าตลอดช่วงอายุของการหมัก 1-4 วัน ค่าของ pH อยู่ในช่วง 4.0-4.2 ซึ่งยังเป็นค่า pH ที่เหมาะกับการเจริญของยีสต์ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดไปในวันที่ 1 และได้ปริมาณของเอทธานอลสูงสุดในวันที่ 2 น้ำตาลกลูโคส 1 มก. เปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลได้สูงสุด 0.412 มก. ฟางข้าวที่ปรับสภาพแล้ว 1 กรัมน้ำหนักแห้ง เปลี่ยนเป็นเอทธานอลได้สูงสุด 0.145 กรัม ซึ่งเกิดขึ้นในวันที่ 2

การหมักเอทธานอลจากซังข้าวโพด (ตารางที่ 9 และภาพที่ 23) เมื่อนำน้ำตาลที่ผ่านการย่อยโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้ามาสู่ขั้นตอนของการหมัก โดยมีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 138.57 มก./มล. จำนวนเซลล์เริ่มต้น 2.62×10^{8} เซลล์/มล. และ pH เท่ากับ 5.2 ในวันที่ 1 ผลผลิตของเอทธานอลที่เกิดขึ้น 42.42 มก./มล. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 21.12 มก./มล. ส่วนน้ำตาลกลูโคสถูกใช้เกือบหมดเหลือเพียง 0.62 มก./มล. จำนวนเซลล์ลดลงเป็น 1.12×10^{8} เซลล์/มล. และ pH ลดลงเป็น 5.2 วันที่ 2 ของการหมัก ปริมาณเอทธานอลสูงสุดคือ 51.11 มก./มล. pH ลดลงเป็น 4.6 จำนวนเซลล์ลดลงเป็น 1.32×10^{8} เซลล์/มล. ส่วนในวันที่ 3 และวันที่ 4 ปริมาณเอทธนอลลดลงเหลือ 47.20 และ 46.78 มก./มล. ตามลำดับ ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคสก็ลดลงเล็กน้อย ในระหว่างการหมักตั้งแต่วันที่ 1-4 การเปลี่ยนแปลงของ pH อยู่ในช่วง 4.5-4.7 ซึ่งยังเป็นช่วงที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสถูกใช้ไปเกือบหมดตั้งแต่วันที่ 1 น้ำตาลกลูโคส 1 มก. เปลี่ยนเป็นเอทธานอลได้สูงสุด 0.684 มก. ซังข้าวโพดที่ปรับสภาพแล้ว 1 กรัมน้ำหนักแห้งเปลี่ยนเป็นเอทธานอลได้สูงสุด 0.251 กรัม ซึ่งเกิดขึ้นในวันที่ 2 ของการหมัก

ตารางที่ 9 การหมักเอทธานอลจากซังข้าวโพดที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้าที่อายุการหมัก 1 2 3 และ 4 วัน

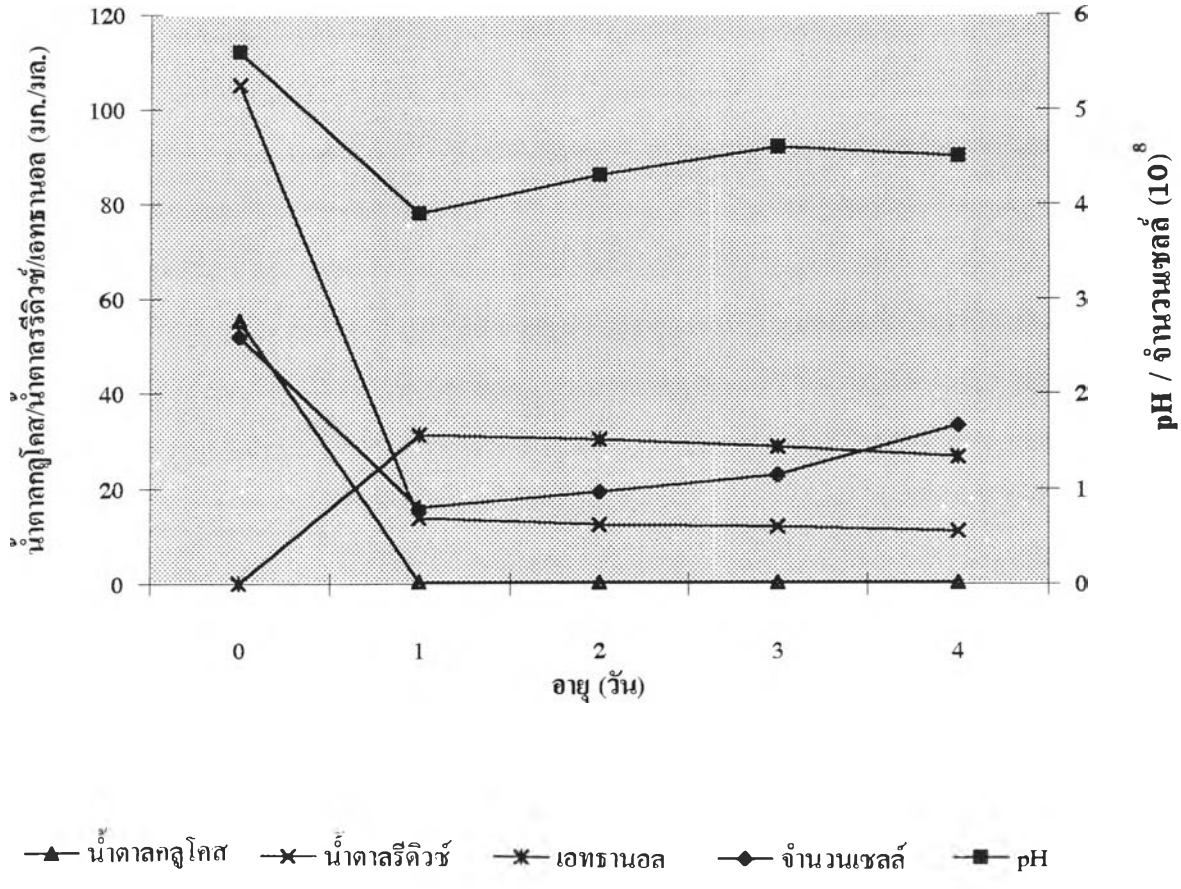
อายุ (วัน)	pH	จำนวนเซลล์ (10^8)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.)	น้ำตาลกลูโคส (มก./มล.)	เอทธานอล (มก./มล.)	เอทธานอล (มก./มล. น้ำตาลกลูโคส)	เอทธานอล (ก./ก. สับสเตรท)
0	5.2	2.62	138.57	74.70	0	0	0
1	4.7	1.12	21.12	0.62	42.42	0.568	0.212
2	4.6	1.32	17.82	0.48	51.11	0.684	0.251
3	4.6	1.58	16.61	0.46	47.20	0.632	0.236
4	4.5	1.56	16.30	0.37	46.78	0.626	0.234



ภาพที่ 23 กราฟแสดงการหมักเอทธานอลจากซังข้าวโพดที่ย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้าที่อายุการหมัก 1 2 3 และ 4 วัน

ตารางที่ 10 การหมักเอทธานอลจากชานอ้อยที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้าที่อายุการหมัก 1 2 3 และ 4 วัน

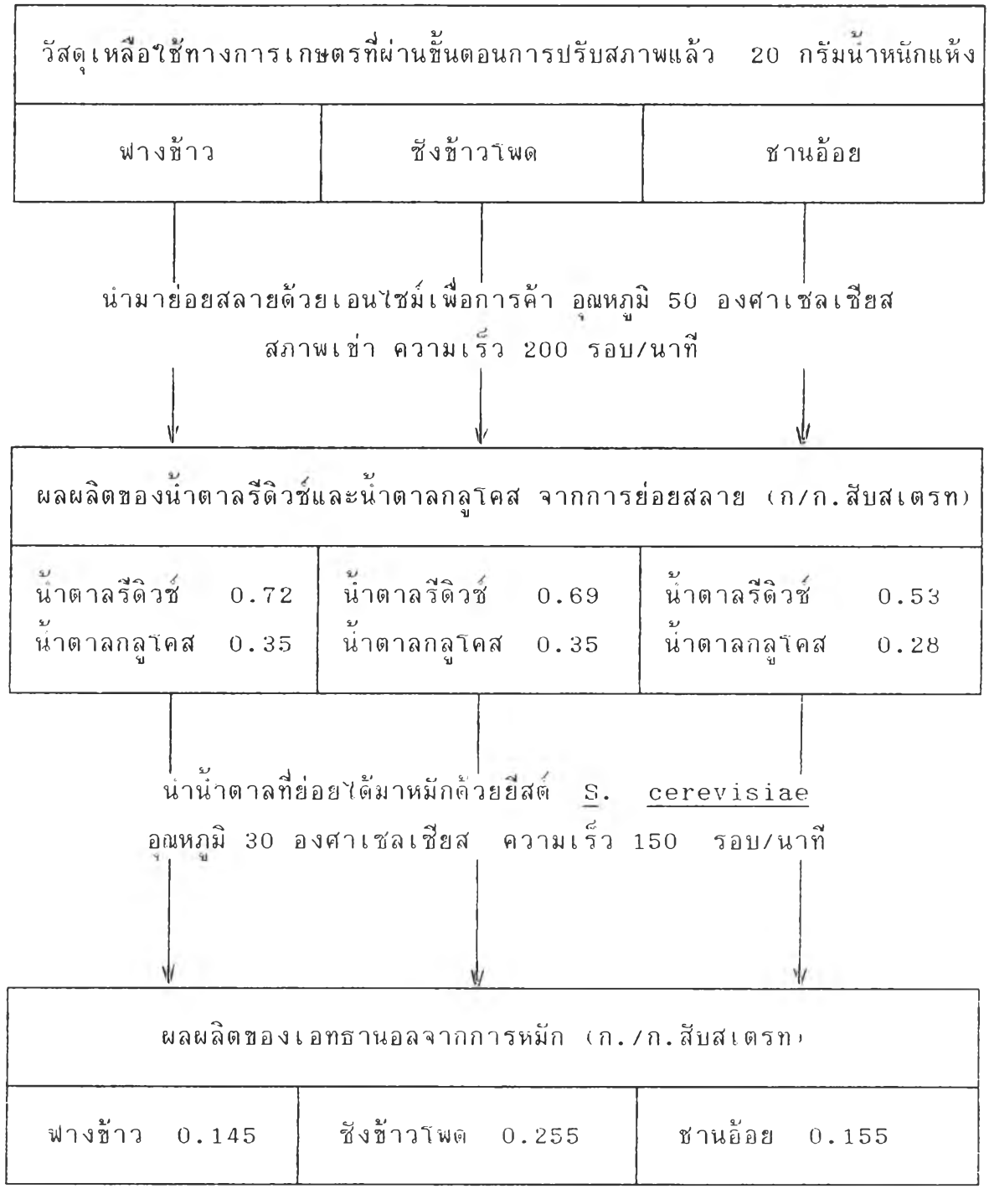
อายุ (วัน)	pH	จำนวนเซลล์ (10^8)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.)	น้ำตาลกลูโคส (มก./มล.)	เอทธานอล (มก./มล.)	เอทธานอล (มก./มล. น้ำตาลกลูโคส)	เอทธานอล (ก./ก. สับสเตรท)
0	5.6	2.59	105.00	55.20	0	0	0
1	3.9	0.80	13.74	0.35	31.20	0.565	0.156
2	4.3	0.96	12.33	0.34	30.23	0.548	0.151
3	4.6	1.14	11.92	0.34	28.78	0.521	0.144
4	4.5	1.66	11.02	0.31	26.73	0.484	0.134



ภาพที่ 24 กราฟแสดงการหมักเอทธานอลจากชานอ้อยที่ย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้าที่อายุการหมัก 1 2 3 และ 4 วัน

การหมักเอทธานอลจากชานอ้อย (ตาราง 10 และภาพที่ 24) เมื่อนำชานอ้อยที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้ามาสู่ขั้นตอนของการหมัก โดยมีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 105 มก./มล. น้ำตาลกลูโคส 55.20 มก./มล. pH 5.6 และจำนวนเชื้อเริ่มต้น 2.59 x 10^8 เซลล์/มล. ผลของการหมักพบว่า ที่อายุการหมัก 1 วัน จำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 8.0 x 10^7 เซลล์/มล. pH ลดลงเป็น 3.9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเป็น 13.74 มก./มล. น้ำตาลกลูโคสถูกใช้เกือบหมดเหลือ 0.35 มก./มล. และปริมาณของเอทธานอลสูงสุดคือ 31.20 มก./มล. ส่วนวันที่ 2-4 จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น 1.66 x10^8 เซลล์/มล. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเพียงเล็กน้อย ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ค่อนข้างคงที่ การเปลี่ยนแปลงของ pH อยู่ระหว่าง 3.9-4.6 ซึ่งยังเหมาะต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ น้ำตาลกลูโคส 1 มก. เปลี่ยนเป็นเอทธานอลได้สูงสุด 0.565 มก. ชานอ้อยที่ปรับสภาพแล้ว 1 กรัมน้ำหนักแห้ง เปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลได้สูงสุด 0.156 กรัม ซึ่งเกิดขึ้นที่อายุ 1 วัน

จากภาพที่ 25 เมื่อนำฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ที่ผ่านขั้นตอนการปรับสภาพแล้ว 20 กรัมน้ำหนักแห้งมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า ผลจากการย่อยสลายพบว่ามีปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.72 0.69 และ 0.53 กรัม/กรัมสับสเตรท ในฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ตามลำดับ ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.35 0.35 และ 0.28 กรัม/กรัมสับสเตรท ในฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ตามลำดับ จากนั้นนำมาเข้าสู่ขั้นตอนของการหมักโดยใช้ยีสต์ S. cerevisiae ผลผลิตของเอทธานอลสูงสุดเท่ากับ 0.145 0.255 และ 0.155 ในฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ตามลำดับ



ภาพที่ 25 แผนภูมิการหมักเอทธานอลจากฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อย ที่ปรับสภาพแล้ว 20 กรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้า

การหมักเอทธานอลจากน้ำตาลที่ย่อยสลายจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a

นำน้ำตาลจากฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ที่ย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการมาเตรียมเป็น molasses medium เพื่อใช้เป็น substrate ในการหมัก เติมหัวเชื้อที่เตรียมจากยีสต์ S. cerevisiae นำไปหมักในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ผลตามขั้นตอนที่ 5.2

การหมักฟางข้าวที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a (ตารางที่ 11 และภาพที่ 26) การหมักเริ่มต้นด้วยปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ 32.75 มก./มล. ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 17.03 มก./มล. จำนวนเชื้อยีสต์ 3.28 x 10^8 เซลล์/มล. และ pH 5.1 ที่อายุการหมัก 1 วัน ปริมาณของเอทธานอลสูงสุด 13.27 มก./มล. ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสถูกใช้ไปเกือบหมด ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 6.05 มก./มล. จำนวนเชื้อลดลงเป็น 2.30 x 10^8 เซลล์/มล. และ pH ลดลงเป็น 4.7 ปริมาณของเอทธานอลลดลงตั้งแต่วันที่ 2-4 เป็น 12.31, 11.20 และ 11.18 มก./มล. ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงของ pH ลดลงจนเป็น 4.0 ที่อายุ 4 วัน น้ำตาลกลูโคส 1 มก. เปลี่ยนเป็นเอทธานอลได้สูงสุด 0.799 มก. ฟางข้าวที่ปรับสภาพแล้ว 1 กรัม น้ำหนักแห้งเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลได้สูงสุด 0.133 กรัม ซึ่งเกิดขึ้นที่อายุการหมัก 1 วัน

การหมักเอทธานอลจากซังข้าวโพดที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a (ตารางที่ 12 และภาพที่ 27) การหมักเริ่มต้นด้วยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 41.11 มก./มล. ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 27.36 มก./มล. จำนวนเชื้อยีสต์ 3.08 x 10^8 เซลล์/มล. และะ pH เริ่มต้น 4.1 ที่อายุการหมัก 1 วัน ปริมาณของเอทธานอลสูงสุดคือ 14.5 มก./มล. ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสถูกใช้ไปเกือบหมดเหลือเพียง 0.19 มก./มล. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 12.80 มก./มล. จำนวนเชื้อลดลงเป็น 2.25 x 10^8 เซลล์/มล. pH ลดลงเป็น 3.5 ส่วนในวันที่ 2-4 ปริมาณของเอทธานอลเริ่มลดลงจากวันที่ 1 เป็น 14.3, 13.8 และ 12.9 มก./มล. ที่อายุ 2 วัน, 3 วันและ 4 วัน ตาม

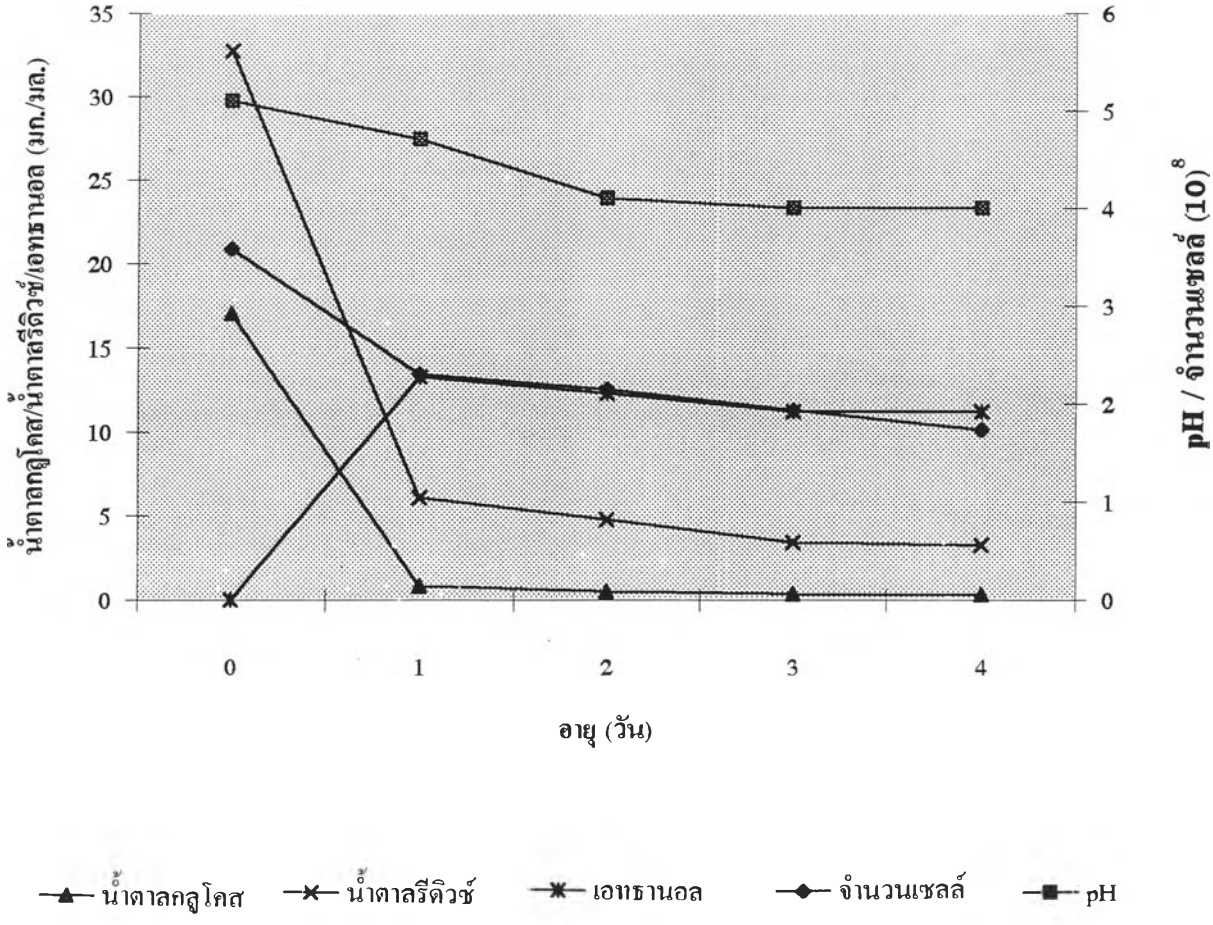
ลำดับ การเปลี่ยนแปลงของ pH ลดลงแต่ก็ยังอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อยีสต์ จำนวนเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย น้ำตาลกลูโคส 1 มก. เปลี่ยนเป็นเอทธานอลได้สูงสุด 0.530 มก. ซังข้าวโพดที่ปรับสภาพแล้ว 1 กรัม น้ำหนักแห้งเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลได้สูงสุด 0.145 กรัม ซึ่งเกิดขึ้นที่อายุการหมัก 1 วัน

การหมักเอทธานอลจากชานอ้อยที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a (ตารางที่ 13 และ ภาพที่ 28) โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 41.29 มก./มล. ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 33.90 มก./มล. จำนวนเซลล์เริ่มต้น 3.08 x 10^8 เซลล์/มล. และ pH ที่ 4.6 ที่อายุการหมัก 1 วัน พบว่าปริมาณของเอทธานอลที่เกิดขึ้นจากการหมักได้สูงสุด 17.30 มก./มล. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเป็น 12.20 มก./มล. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสถูกใช้เกือบหมดเหลือเพียง 0.17 มก./มล. pH ลดลงจากวันเริ่มต้นเป็น 3.7 และจำนวนเซลล์ลดลงเป็น 2.99 x 10^8 เซลล์/มล. อายุการหมัก 2-4 วัน ปริมาณของเอทธานอลลดลงตามลำดับจนเหลือ 15.40 มก./มล.ในวันที่ 4 จำนวนเซลล์ลดลงจากวันที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของ pH ที่อายุ 1-4 วัน ลดลงแต่ก็ยังอยู่ในช่วงที่ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ น้ำตาลกลูโคส 1 มก. เปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลได้สูงสุด 0.510 มก. ชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ 1 กรัม น้ำหนักแห้ง เปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลได้สูงสุด 0.173 กรัม ซึ่งเกิดขึ้นที่อายุการหมัก 1 วัน

จากภาพที่ 29 เมื่อนำฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ที่ผ่านขั้นตอนการปรับสภาพแล้ว 10 กรัมน้ำหนักแห้งมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา T. reesei QM 6a ผลจากการย่อยสลายพบว่ามีปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ 0.328 0.411 และ 0.413 ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.170 0.274 และ 0.339 กรัม/กรัมสับสเตรท ในฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ตามลำดับ จากนั้นนำมาเข้าสู่ขั้นตอนของการหมักโดยใช้ยีสต์ S. cerevisiae ผลผลิตของเอทธานอลสูงสุดเท่ากับ 0.133 0.145 และ 0.173 กรัม/กรัมสับสเตรท ในฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ตามลำดับ

ตารางที่ 11 การหมักเอทธานอลจากฟางข้าวที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a ที่อายุการหมัก 1 2 3 และ 4 วัน

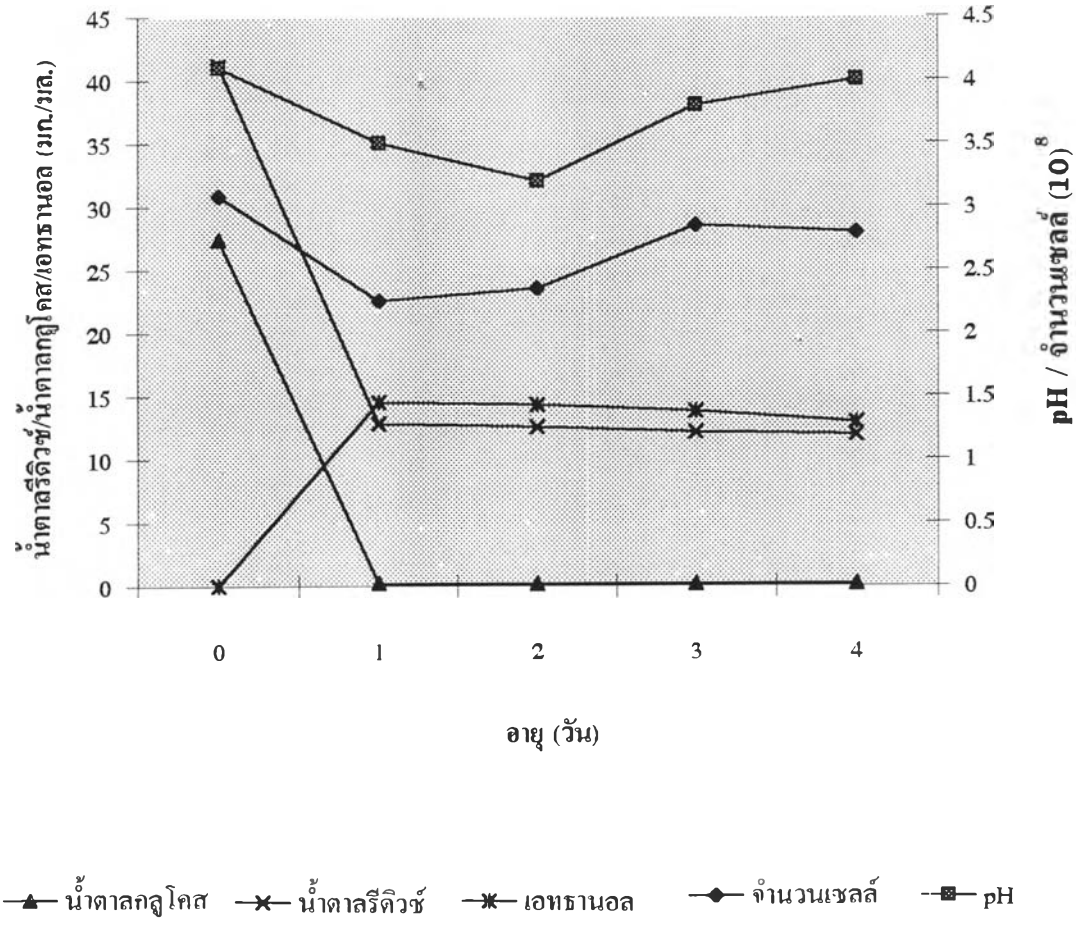
อายุ (วัน)	pH	จานวนเซลล์ (10^8)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.)	น้ำตาลกลูโคส (มก./มล.)	เอทธานอล (มก./มล.)	เอทธานอล (มก./มล. น้ำตาลกลูโคส)	เอทธานอล (ก./ก. สับสเตรท)
0	5.1	3.58	32.75	17.03	0	0	0
1	4.7	2.30	6.05	0.81	13.27	0.779	0.133
2	4.1	2.15	4.76	0.49	12.31	0.723	0.123
3	4.0	1.93	3.39	0.34	11.20	0.658	0.112
4	4.0	1.73	3.23	0.32	11.18	0.656	0.112



ภาพที่ 26 กราฟแสดงการหมักเอทธานอลจากฟางข้าวที่ย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a ที่อายุการหมัก 1 2 3 และ 4 วัน

ตารางที่ 12 การหมักเอทธานอลจากชังข้าวโพดที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a ที่อายุการหมัก 1 2 3 และ 4 วัน

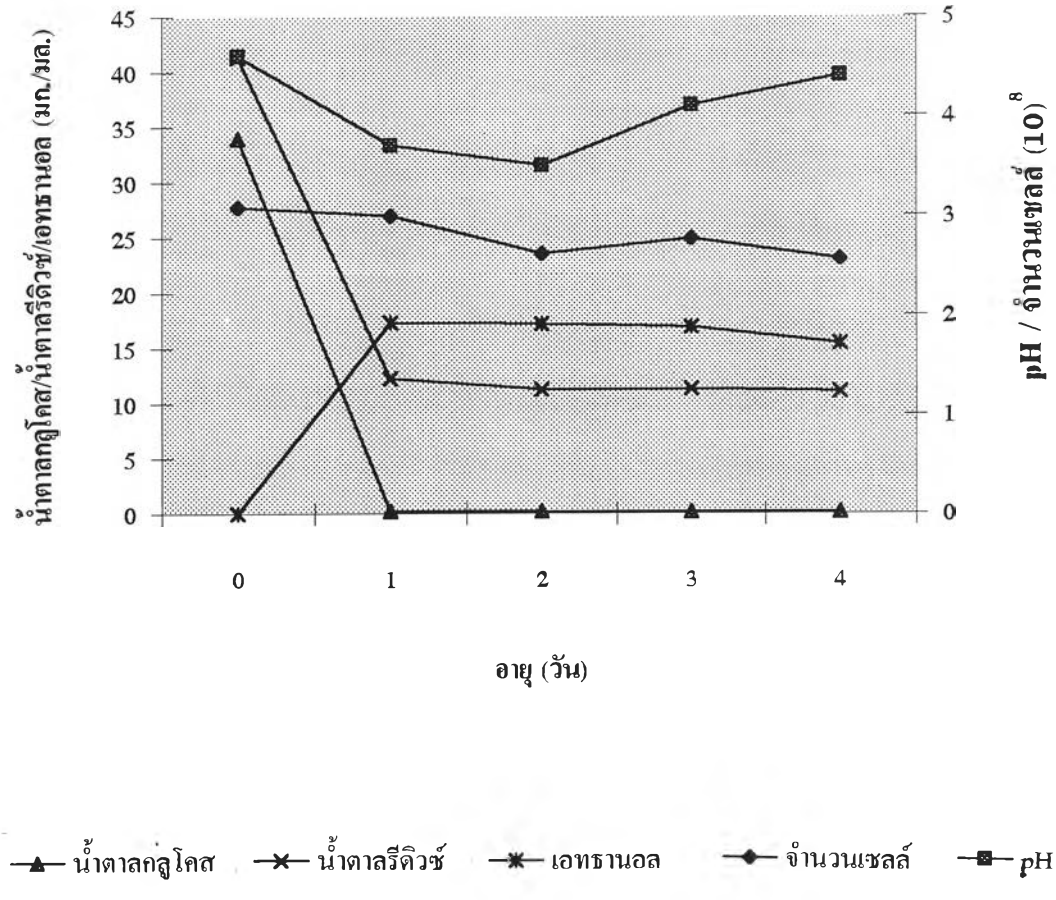
อายุ (วัน)	pH	จำนวนเซลล์ (10^9)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.)	น้ำตาลกลูโคส (มก./มล.)	เอทธานอล (มก./มล.)	เอทธานอล (มก./มล. น้ำตาลกลูโคส)	เอทธานอล (ก./ก. สับสเตรท)
0	4.1	3.08	41.11	27.36	0	0	0
1	3.5	2.25	12.08	0.19	14.50	0.530	0.145
2	3.2	2.35	12.56	0.18	14.30	0.523	0.143
3	3.8	2.85	12.14	0.17	13.80	0.504	0.138
4	4.0	2.79	11.93	0.16	12.90	0.471	0.129



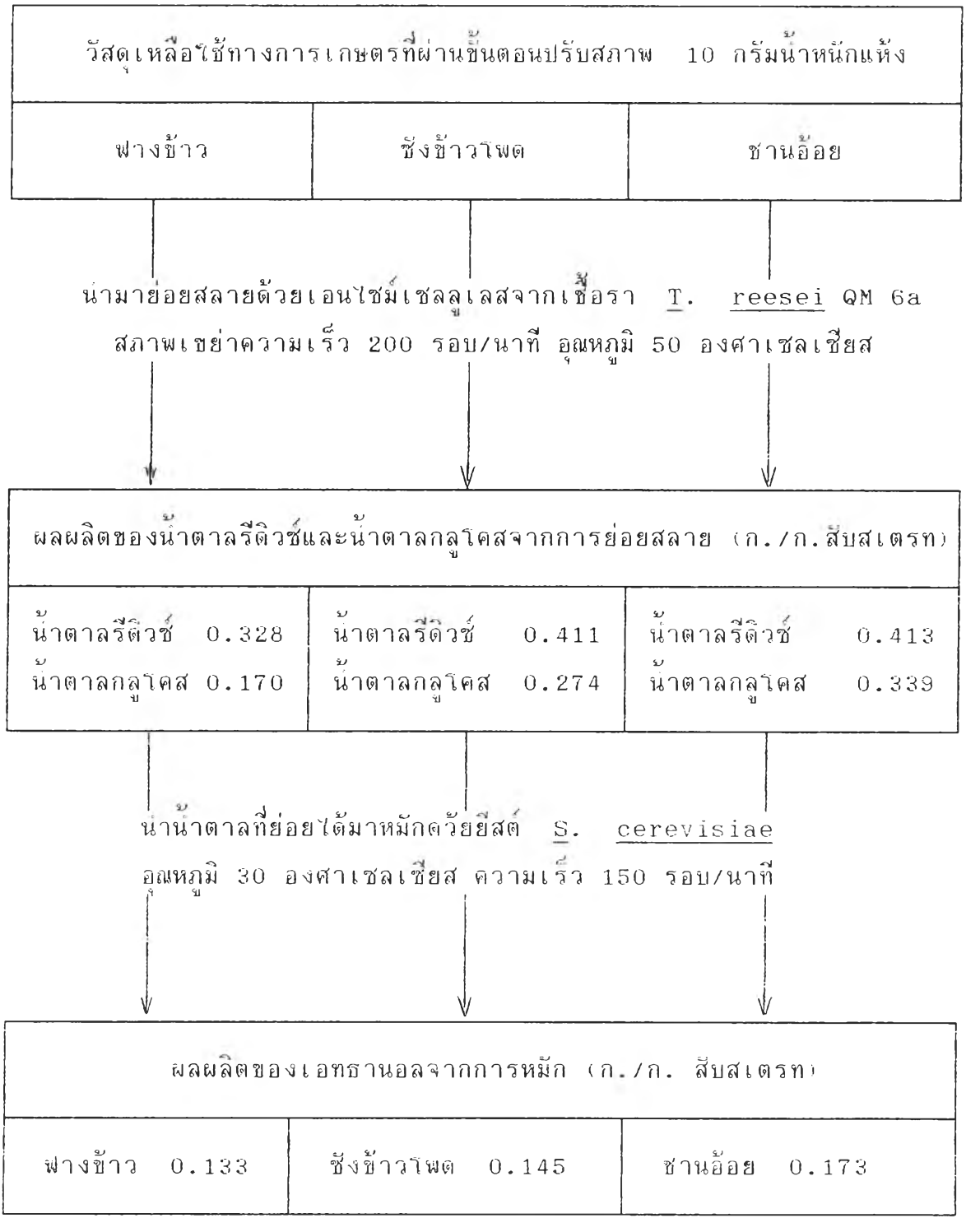
ภาพที่ 27 กราฟแสดงการหมักเอทธานอลจากซังข้าวโพดที่ย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a ที่อายุการหมัก 1 2 3 และ 4 วัน

ตารางที่ 13 การหมักเอทธานอลจากชานอ้อยที่ผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a ที่อายุการหมัก 1 2 3 และ 4 วัน

อายุ (วัน)	pH	จำนวนเซลล์ (10^8)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.)	น้ำตาลกลูโคส (มก./มล.)	เอทธานอล (มก./มล.)	เอทธานอล (มก./มล.น้ำตาลกลูโคส)	เอทธานอล (ก./ก. สับสเตรท)
0	4.6	3.08	41.29	33.90	0	0	0
1	3.7	2.99	12.20	0.17	17.30	0.510	0.173
2	3.5	2.61	12.24	0.15	17.20	0.507	0.172
3	4.1	2.76	11.30	0.14	16.90	0.499	0.169
4	4.4	2.56	11.07	0.12	15.40	0.454	0.154



ภาพที่ 28 กราฟแสดงการหมักเอทธานอลจากชานอ้อยที่ย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a ที่อายุการหมัก 1 2 3 และ 4 วัน



ภาพที่ 29 แผนภูมิการหมักเอทธานอลจากฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ที่ปรับสภาพแล้ว 10 กรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อผ่านขั้นตอนการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a

ตารางที่ 14 การหมักเอทธานอลจากน้ำตาลที่แยกได้จากฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อย โดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้าและเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a ที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ ที่อายุการหมัก 1 2 3 และ 4 วัน

ชนิดของวัตถุดิบ/อายุ (วัน)	การย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า			การย่อยด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา		
	รีดิวซ์	กลูโคส	เอทธานอล	รีดิวซ์	กลูโคส	เอทธานอล
ฟางข้าว						
0	0.675	0.350	0	0.328	0.170	0
1	0.131	0.003	0.135	0.061	0.008	0.133
2	0.103	0.003	0.145	0.048	0.005	0.123
3	0.090	0.003	0.131	0.048	0.003	0.112
4	0.083	0.003	0.124	0.032	0.002	0.112
ซังข้าวโพด						
0	0.685	0.375	0	0.411	0.274	0
1	0.106	0.003	0.212	0.128	0.002	0.145
2	0.090	0.003	0.255	0.126	0.002	0.143
3	0.083	0.003	0.236	0.121	0.002	0.138
4	0.082	0.002	0.234	0.119	0.002	0.129
ชานอ้อย						
0	0.525	0.261	0	0.413	0.339	0
1	0.069	0.002	0.156	0.122	0.002	0.173
2	0.062	0.002	0.151	0.113	0.002	0.172
3	0.060	0.002	0.145	0.113	0.001	0.169
4	0.060	0.002	0.134	0.111	0.001	0.154

หมายเหตุ

น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลกลูโคส และเอทธานอล มีหน่วยเป็น ก./ก. สับสเตรท

จากตารางที่ 14 การหมักน้ำตาลจากฟางข้าวที่ปรับสภาพแล้ว 20 กรัม น้ำหนักแห้ง ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นของการหมัก 0.675 น้ำตาลกลูโคส 0.350 ให้ผลผลิตของเอทธานอลสูงสุด 0.145 กรัม/กรัมสับสเตรท ซึ่งเกิดขึ้นในวันที่ 2 ของการหมัก ส่วนฟางข้าวที่ปรับสภาพแล้ว 10 กรัมน้ำหนักแห้งเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ มีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นของการหมัก 0.328 น้ำตาลกลูโคส 0.170 ให้ผลผลิตของเอทธานอลสูงสุด 0.133 กรัม/กรัมสับสเตรท เกิดขึ้นในวันที่ 1 ของการหมัก

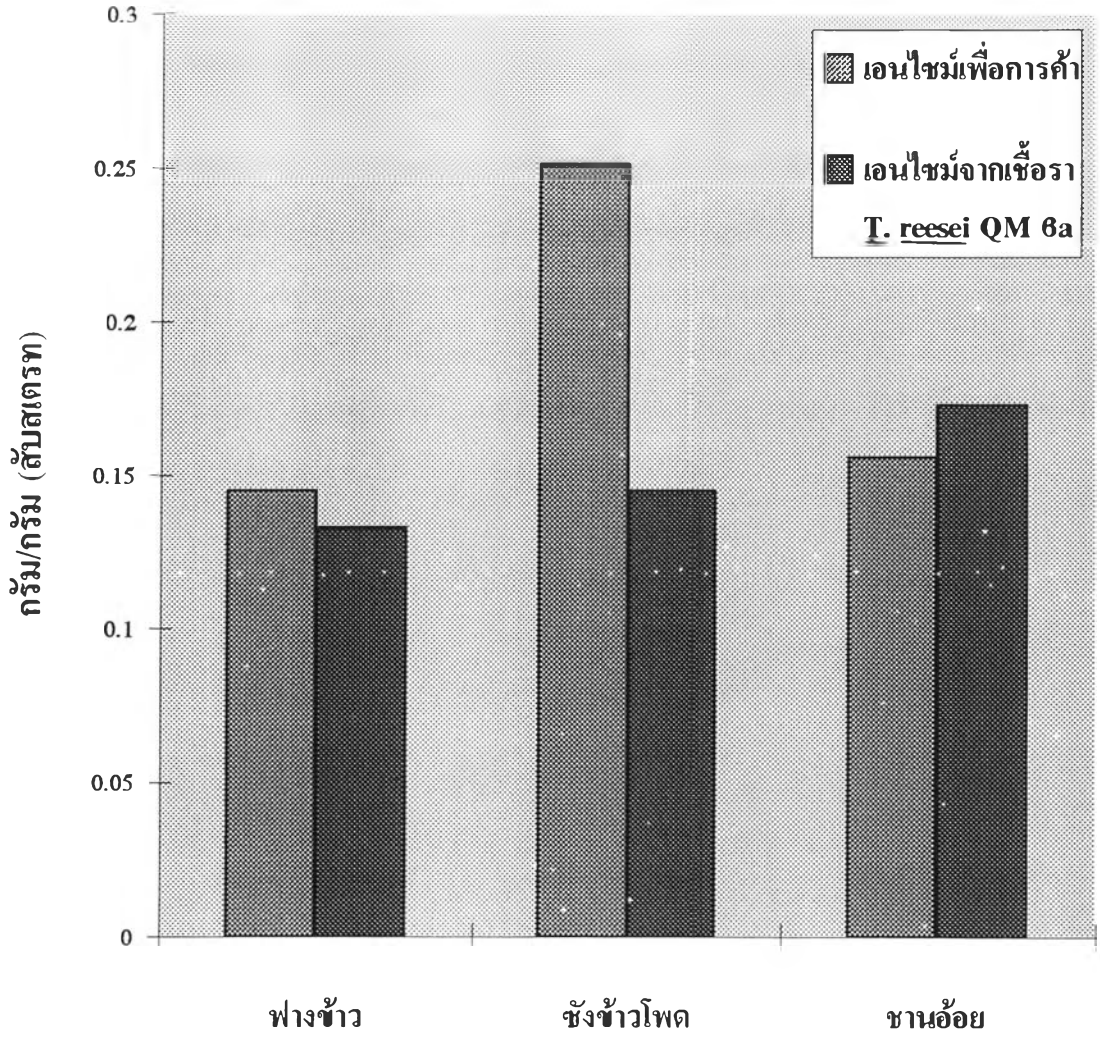
การหมักน้ำตาลจากซังข้าวโพดที่ปรับสภาพแล้ว 20 กรัมน้ำหนักแห้ง ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า มีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นของการหมัก 0.685 น้ำตาลกลูโคส 0.375 ให้ผลผลิตของเอทธานอลสูงสุด 0.255 กรัม/กรัมสับสเตรท เกิดขึ้นในวันที่ 2 ของการหมัก ส่วนซังข้าวโพดที่ปรับสภาพแล้ว 10 กรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ มีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นของการหมัก 0.411 น้ำตาลกลูโคส 0.274 ให้ผลผลิตของเอทธานอลสูงสุด 0.145 กรัม/กรัมสับสเตรท เกิดขึ้นในที่ 1 ของการหมัก

การหมักน้ำตาลจากชานอ้อยที่ปรับสภาพแล้ว 20 กรัม น้ำหนักแห้ง ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นของการหมัก 0.525 น้ำตาลกลูโคส 0.261 ให้ผลผลิตของเอทธานอลสูงสุด 0.156 กรัม/กรัมสับสเตรท เกิดขึ้นในวันที่ 2 ของการหมัก ส่วนชานอ้อยที่ปรับสภาพแล้ว 10 กรัมน้ำหนักแห้งเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นของการหมัก 0.433 น้ำตาลกลูโคส 0.339 ให้ผลผลิตของเอทธานอลสูงสุด 0.173 กรัม/กรัมสับสเตรท ซึ่งเกิดขึ้นในวันที่ 1 ของการหมัก

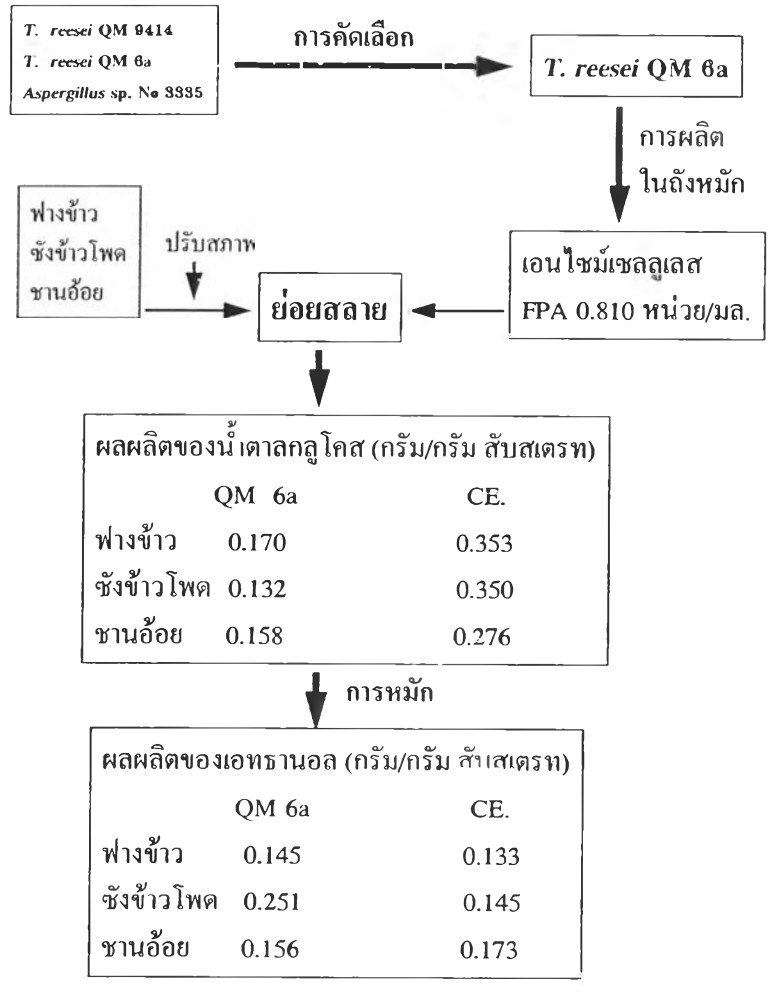
เมื่อพิจารณาถึงผลผลิตของเอทธานอลที่เกิดขึ้นต่อวัสดุที่ปรับสภาพแล้ว 1 กรัม (ตารางที่ 15) พบว่า ฟางข้าว 1 กรัม ย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า ให้ผลผลิตของเอทธานอล 0.145 กรัม ในขณะที่การย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้เองในห้องปฏิบัติการให้ผลผลิตของเอทธานอล 0.133 กรัม ซังข้าวโพด 1 กรัม ย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า ให้ผลผลิตของเอทธานอล 0.251 กรัม ในขณะที่ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้เองในห้องปฏิบัติการให้ผลผลิตของเอทธานอล 0.145 กรัม และชานอ้อย 1 กรัม ย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า ให้ผลผลิตของเอทธานอล 0.156 กรัม ในขณะที่ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการให้ผลผลิตของเอทธานอล 0.173 กรัม

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ไปเป็นเอทธานอล เมื่อย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้าและใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a

ชนิดของวัตถุดิบ	ปริมาณของเอทธานอล (กรัม/กรัม สับสเตรท)	
	เอนไซม์เพื่อการค้า	T. reesei QM 6a
ฟางข้าว	0.145	0.133
ซังข้าวโพด	0.251	0.145
ชานอ้อย	0.156	0.173



ภาพที่ 30 เปรียบเทียบปริมาณเอทธานอลจากฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อย ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า และเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a



QM 6a = *T. reesei* QM 6a CE. = Commercial enzyme

ภาพที่ 31 แผนภูมิการคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส การย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร และการหมักเอทธานอล