บทที่ 5

วิจารณ์ผลและสรุปผลการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้ได้เน้นถึงการหมักแอลกอฮอล์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ซึ่งเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาล การศึกษาในครั้งนี้จึงประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ที่ต่อเนื่องกัน เริ่มตั้งแต่การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ นำเชื้อราเหล่านี้มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่สภาพแวดล้อมเดียวกัน ดู activity ของเอนไซม์ที่ช่วงอายุการเลี้ยงที่สูงสุด จากนั้นจึงนำเชื้อราที่ได้รับการคัดเลือกมาเลี้ยงเพื่อให้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อให้เกิดน้ำตาล ซึ่งขั้นตอนของการย่อยสลายต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบให้อยู่ในสภาพที่ง่ายต่อการทำงานของเอนไซม์ การย่อยสลายต้องทำในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมทั้งอุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง จากนั้นนำน้ำตาลที่ผลิตได้ไปใช้ในการหมักโดยใช้ยีสต์ ซึ่งจะได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นเอทธานอล

การคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

แหล่งของเอนไซม์เซลลูเลสที่สำคัญคือเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งรวมถึงเชื้อราและแบคทีเรีย เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะผลิตเอนไซม์ที่แตกต่างกันมากมายหลายชนิดจึงนับว่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง (Prave et al., 1987) เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ เชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญได้บนลิกโนเซลลูโลสในธรรมชาติสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายวัสดุเหล่านั้น และนำผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายไปใช้ในการเจริญเติบโต จากหลักการนี้จึงพบเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ อาทิ เช่น *T. konogii* *T. reesei* (*T. viride*) *Fusarium solani* *Sporotichum pulverulentum* *Aspergillus niger* *Irpex lacteus* *Pynicularia oryzae* *Chaetomium themophile* *Mycrotheciun verrucaria* *Phanaerochaete chysosporium* (Coughlan, 1989; Wilka et al., 1983) ดังนั้นเชื้อรา

จึงนับว่าเป็นแหล่งของเอนไซม์เซลลูเลสที่สำคัญที่มีการผลิตเป็นการค้า โดยเฉพาะ Trichoderma sp. (Liese, 1975) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีและเป็นที่ยอมรับคือ T. reesei (Scragy, 1988)

การคัดเลือกเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้ microcrystalline cellulose เป็นสับสเตรท จากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ในครั้งนี้ พบว่า activity ของ endoglucanase เมื่อวิเคราะห์ด้วย CMCase เชื้อรา T. reesei QM 9414 ให้ activity สูงที่อายุ 6 วัน โดยมีค่าเท่ากับ 3.5635 หน่วย/มล. เชื้อรา T. reesei QM 6a ให้ activity สูงสุดที่อายุ 9 วัน โดยมีค่าเท่ากับ 3.6973 หน่วย/มล. ส่วนเชื้อรา Aspergillus sp. No. 3335 ให้ activity สูงสุดที่อายุ 12 วัน โดยมีค่าเท่ากับ 2.2453 หน่วย/มล. (ภาพที่ 12) ส่วน cellulase activity เมื่อวิเคราะห์ด้วย FPA เชื้อรา T. reesei QM 9414 ให้ activity สูงสุดที่อายุ 12 วัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.5728 หน่วย/มล. เชื้อรา T. reesei QM 6a ให้ activity สูงสุดที่อายุ 9 วัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.8525 หน่วย/มล. ส่วนเชื้อรา Aspergillus sp. No. 3335 ให้ activity สูงสุดที่อายุ 15 วัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.2905 หน่วย/มล. (ภาพที่ 13) การเปลี่ยนแปลงของ pH พบว่าเชื้อ T. reesei QM 9414 ให้ activity ของ endoglucanase สูงสุดที่ pH 3.9 และ cellulase activity สูงสุดที่ pH 4.8 เชื้อรา T. reesei QM 6a ให้ activity ของ endoglucanase และ cellulase activity สูงสุด ที่ pH 4.3 เชื้อรา Aspergillus sp. No. 3335 ให้ activity ของ endoglucanase สูงสุดที่ pH 5.1 และ cellulase activity สูงสุดที่ pH 5.4 อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของ pH ในช่วงที่ให้ activity ของเอนไซม์สูงสุดก็ยังอยู่ในช่วงที่ค่อนข้างเป็นกรด

การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ พอจะกล่าวได้ว่าแนวโน้มการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เชื้อรา T. reesei QM 6a สร้าง endoglucanase และ cellulase activity สูงสุดที่อายุ 9 วัน ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อพิจารณาถึงเชื้อราเฉพาะกลุ่มของ T. reesei ทั้ง 2 สายพันธุ์จะเห็นว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้ใกล้เคียงกันมากที่สุด จึงเป็นที่ยอมรับกันว่าเชื้อรา T. reesei QM 6a มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสจากธรรมชาติได้อย่างดี (Michael, 1979 ; Shin, 1978)

T. reesei เป็นเชื้อราที่แยกได้โดย U.S. Army Natic Research and Development Command และให้ชื่อว่า T. reesei QM 6a มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้อย่างสมบูรณ์ ต่อมาได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้มีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นและได้สายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงชื่อว่า T. reesei QM 9414 ซึ่งพบว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วย FPA มีการเพิ่ม activity ของเอนไซม์จากเดิม 0.5-0.7 เป็น 1.5-2.0 หน่วย/มล. เมื่อวิเคราะห์ด้วย FPA (Mandels and Sternberg, 1976) จากการคัดเลือกในครั้งนี้จะเห็นว่าเชื้อรา T. reesei QM 9414 ให้ผลผลิตของเอนไซม์ต่ำกว่า เชื้อรา T. reesei QM 6a เป็นเพราะว่าการปรับปรุงสายพันธุ์ดังกล่าวนั้นทำขึ้นที่ U.S. Army Natic Lab แต่การศึกษาครั้งนี้ได้นำเชื้อมาจากศูนย์บริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ ซึ่งได้นำเชื้อราดังกล่าวมาขยายเพื่อเพิ่มจำนวนก่อนที่จะบริการให้แก่สถาบันต่าง ๆ เพื่อการศึกษา การเพิ่มจำนวนอาจมีผลกระทบต่อ activity ของเชื้อทำให้ activity ลดลงและลดลงต่ำกว่าสายพันธุ์เดิม การลดลงของ activity เมื่อมีการถ่ายเชื้อหลายครั้งเป็นปัญหาที่พบทั้งที่ศูนย์บริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์และผู้ศึกษา ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกเชื้อรา T. reesei QM 6a ซึ่งมีความเสถียรของ activity มากกว่า จึงนำไปทดสอบการผลิตเอนไซม์เพื่อเลือกอายุที่ให้ผลผลิตสูงสุด จากการทดสอบพบว่า ที่อายุ 12 วัน activity ของ endoglucanase เท่ากับ 3.825 หน่วย/มล. ส่วน cellulase activity เท่ากับ 0.612 หน่วย/มล.

ดังนั้นอายุที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในระดับขยายขนาดคือ อายุ 12 วัน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบ/นาที pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.0 ขณะที่เลี้ยงเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์มีการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์ทุก ๆ 3 วัน โดยนำตัวอย่างมาทดสอบ activity ของ endoglucanase พบว่ามีค่าเท่ากับ 2.876 หน่วย/มล. ซึ่งลดลงจากขั้นตอนการคัดเลือกอันเป็นผลมาจากการลดลงของ activity ของเชื้อราเอง ส่วน cellulase activity มีค่าเท่ากับ 0.810 หน่วย/มล. ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านขั้นตอนของการปรับสภาพแล้ว

การย่อยสลายเซลลูโลสที่เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์นั้นจะได้น้ำตาลกลูโคสเป็นหลัก ซึ่งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องด้วยกันคือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ ชนิดของวัสดุเซลลูโลส และสภาพแวดล้อมตลอดจนระยะเวลาในการย่อยสลาย (Michael, 1979) จากการทดสอบเชื้อราและการผลิตเอนไซม์ก็ได้ activity ของเอนไซม์อยู่ในขั้นที่สูง

อันจะนำไปใช้ในการย่อยสลายได้ เมื่อสิ้นสุดอายุการเลี้ยง pH ลดลงเป็น 3.6 ซึ่งต่ำกว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นจึงมีการปรับสภาพของ pH ให้เป็น 5.0 อันจะทำให้การทำงานของเอนไซม์มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Ryu and Mandels, 1983) หลังจากนั้นจึงนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

การปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อการย่อยสลาย

ขั้นตอนของการปรับสภาพเป็นขั้นตอนเบื้องต้นที่สำคัญอันมีผลส่งเสริมการย่อยสลายให้เกิดได้อย่างสมบูรณ์ มีหลายวิธีด้วยกัน วิธีทางกายภาพ (physical pretreatment) เช่น การตัด การบด จะมีผลในการช่วยลดขนาดของอนุภาคให้เล็กลง เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวการสัมผัสกับเอนไซม์ (Acebal, 1986) จากนั้นปรับสภาพต่อด้วยการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งผลของโซเดียมไฮดรอกไซด์นั้นจะช่วยแยกส่วนประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากกันโดยสกัดลิกนินออก ทำให้เกิดการบวมพองของผลึกกลายเป็นโครงสร้างที่อ่อนแอที่เรียกว่า amourphous region ซึ่งบริเวณดังกล่าวจะเป็นจุดแรกที่เกิดการย่อยสลาย (Lyons, 1981; Mandels and Sternberg ,1976; Tsao, 1983) วัตถุดิบที่ผ่านการปรับสภาพก่อนนำมาใช้ในการย่อยสลายในครั้งนี้พบว่า มีน้ำหนักแห้งลดลงจากเดิม คือ ฟางข้าวก่อนการปรับสภาพน้ำหนักแห้ง 2.14 กรัม เมื่อผ่านขั้นตอนการปรับสภาพแล้วเหลือน้ำหนัก 1.86 กรัม ซังข้าวโพดน้ำหนักแห้งก่อนการปรับสภาพ 2.50 กรัม เมื่อผ่านขั้นตอนการปรับสภาพแล้วเหลือน้ำหนัก 1.78 กรัม ชานอ้อยน้ำหนักก่อนการปรับสภาพ 1.85 กรัม เมื่อผ่านขั้นตอนของการปรับสภาพแล้วเหลือน้ำหนัก 1.51 กรัม และต้นมันสำปะหลังน้ำหนักแห้งก่อนการปรับสภาพ 1.79 กรัม เมื่อผ่านขั้นตอนของการปรับสภาพแล้วเหลือน้ำหนัก 1.74 กรัม น้ำหนักลดลงจากเดิมเพียง 0.04 กรัม น้ำหนักของวัสดุทั้ง 4 ชนิดที่ผ่านขั้นตอนของการปรับสภาพแล้วจะเห็นได้ว่าลดลงจากเดิม ซึ่งพอจะกล่าวได้ว่าการปรับสภาพมีผลในการแยกบางส่วนอย่างออกไป เช่น มีการแยกลิกนิกออก และทำให้เกิดโครงสร้างที่ง่ายต่อการย่อยสลายได้ดีขึ้น (Michale, 1979) โดยในฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อยน้ำหนักลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อสัมผัสดูพบว่ามีความอ่อนนุ่ม ลักษณะภายนอกหลังจากการปรับสภาพค่อนข้างเละ สีอ่อนลงจากก่อนการปรับสภาพ ส่วนต้นมันสำปะหลังน้ำหนักที่ลดลงน้อยมาก ไม่มีความอ่อนนุ่ม สีไม่แตกต่างจากก่อนการปรับสภาพ ผลจากการปรับสภาพแสดงให้เห็นว่าการโดยใช้วิธีทางกายภาพและการ

ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มีผลส่งเสริมการย่อยสลายได้ดีขึ้น (Chatial et al., 1979; Han, 1978; Kirk, 1997; Kurakake et al., 1994) ซึ่งผลของการปรับสภาพด้วยการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์กับฟางข้าวสาลี ชานอ้อย ซังข้าวและเปลือกถั่วลิสงจะช่วยเพิ่มการย่อยสลายได้ โดยจะได้น้ำตาลสูงกว่าวัตถุดิบที่ไม่มีการปรับสภาพ (Singh et al., 1990) และวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมนั้นยังขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบ (Saddler, 1992) สำหรับต้นมันสำปะหลังเมื่อผ่านการปรับสภาพ น้ำหนักแห้งลดลงจากเดิมเพียงเล็กน้อย แสดงว่าการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทั้งความเข้มข้น และอุณหภูมิในการให้ความร้อนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีผลในการสกัดลิกนินออกซึ่ง Moo-Young (1986) รายงานไว้ว่า วิธีการปรับสภาพที่จะเพิ่มการใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของลิกโนเซลลูโลส

<u>การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส</u>

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เป็นปฏิกิริยาที่มีความเฉพาะเจาะจง โดยได้ผลผลิตคือน้ำตาลกลูโคสเป็นหลัก ปัจจัยที่เกี่ยวข้องนอกจากจะเป็นความเข้มข้นของเอนไซม์และชนิดของเซลลูโลสแล้วยังเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมของการย่อยสลายโดยเฉพาะอุณหภูมิและ pH การย่อยสลายเซลลูโลสในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำ 2 วิธีการ คือ การย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า Celluclast และ Novozyme วิธีที่ 2 การย่อยด้วยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดเลือกได้และผลิตเอนไซม์ในระดับขยายขนาดในห้องปฏิบัติการ ผลจากการย่อยสลายวัสดุที่ปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า พบว่า ฟางข้าว 20 กรัมน้ำหนักแห้งให้น้ำตาลรีดิวซ์ 14.40 กรัม ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคส 7.05 กรัม เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ การย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 72.00 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลกลูโคส 35.25 เปอร์เซ็นต์ pH เมื่อสิ้นสุดการย่อยสลาย 5.7 ซังข้าวโพด 20 กรัมน้ำหนักแห้ง ให้น้ำตาลรีดิวซ์ 13.86 กรัม ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคส 6.90 กรัม เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ การย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 69.30 เปอร์เซ็นต์ และเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 34.50 เปอร์เซ็นต์ pH เมื่อสิ้นสุดการย่อยสลาย 5.2 และชานอ้อย 20 กรัมน้ำหนักแห้งให้น้ำตาลรีดิวซ์ 10.50 กรัม ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคส 5.22 กรัม เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ การย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 52.50 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลกลูโคสได้ 26.1 เปอร์เซ็นต์

pH เมื่อสิ้นสุดการย่อยสลาย 5.4

การย่อยสลายวัตถุดิบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา T. reesei QM 6a ซึ่งมี activity ของ endoglucanase 2.876 และ cellulase activity 0.810 หน่วย/มล. ผลจากการย่อยสลายพบว่า ฟางข้าว 10 กรัมน้ำหนักแห้งให้น้ำตาลรีดิวซ์ 3.28 กรัม ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคส 1.70 กรัม เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ การย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 32.80 เปอร์เซ็นต์ และเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 17.0 เปอร์เซ็นต์ pH เมื่อสิ้นสุดการย่อยสลาย 5.1 ซังข้าวโพด 10 กรัมน้ำหนักแห้งให้น้ำตาลรีดิวซ์ 2.89 กรัม ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคส 1.32 กรัม pH เมื่อสิ้นสุดการย่อย เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ การย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 28.90 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลกลูโคสได้ 13.20 เปอร์เซ็นต์ pH เมื่อสิ้นสุดการย่อยสลาย 4.1 ชานอ้อย 10 กรัมน้ำหนักแห้งให้น้ำตาลรีดิวซ์ 2.16 กรัม ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคส 1.58 กรัม เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ การย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 21.6 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลกลูโคส 15.8 เปอร์เซ็นต์ pH เมื่อสิ้นสุดการย่อยสลาย 4.6

ผลจากการย่อยสลายเซลลูโลสได้เป็นน้ำตาล ความสมบูรณ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาการย่อยสลายนอกจากจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้แล้วยังขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ เนื่องจากวัตถุดิบแต่ละชนิดมีส่วนประกอบของเซลลูโลสในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่นในชานอ้อยพบว่ามีส่วนประกอบที่เป็นเซลลูโลสประมาณ 45-55 เปอร์เซ็นต์ การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพและการใช้สารเคมีที่เหมาะสมจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลที่เป็น monomeric sugar และ dimeric sugar ได้ ผลจากการย่อยสลายฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อยที่ได้จากการใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราในครั้งนี้ พอจะกล่าวได้ว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด สามารถนำมาใช้ผลิตน้ำตาลได้ ซึ่ง Sitton และคณะ (1979) ได้รายงานว่า ฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อยมี hexozan อยู่ 36.5 39.0 และ 41.3 ตามลำดับ ถ้ามีการปรับปรุงเทคนิคการย่อยสลายที่เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพก็จะได้ผลผลิตสูงเหมือนกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า การปรับปรุงวิธีในการย่อยสลายให้อยู่ในสภาวะเดียวกับการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า ทำได้คือการใช้เอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกัน เนื่องจากว่าเชื้อราแต่ละชนิดมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูไต้โดยมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน สำหรับเชื้อราในกลุ่มของ

T. reesei เป็นที่ยอมรับว่าผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้โดยมีองค์ประกอบที่สมบูรณ์ครบถ้วน ทั้ง endoglucanase exoglucanase และ B-glucosidase แต่จะพบว่ามีปริมาณของ B-glucosidase ค่อนข้างต่ำ ในขณะที่เชื้อราในกลุ่มของ Aspergillus sp. สามารถผลิต B-glucosidase ได้สูง (Drazic and Nozinic, 1984) การย่อยสลายด้วยการใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei เพียงอย่างเดียวจะได้ทั้งน้ำตาลเซลโลไบโอสและน้ำตาลกลูโคสด้วยกัน ถ้ามีการใช้เอนไซม์จากเชื้อราทั้ง 2 ชนิดในระบบการย่อยสลายจะเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ดียิ่งขึ้น ซึ่ง Drazic and NoZinic (1984) ได้ศึกษาการย่อยสลายซังข้าวโพดโดยใช้สภาวะเอนไซม์จากเชื้อราชนิดเดียว และใช้เอนไซม์จากเชื้อราทั้ง 2 ชนิดด้วยกัน พบว่าที่ระบบการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ร่วมกันจะได้น้ำตาลรีดิวซ์ 73.4 มก/มล. และน้ำตาลกลูโคส 34.15 มก/มล. เมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ปรับสภาพแล้ว 10 กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งคิดเป็นการเปลี่ยนแปลงถึง 88 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การย่อยสลายโดยใช้เชื้อราชนิดเดียวเกิดขึ้นเพียง 60 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการใช้การใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei ร่วมกับการใช้เอนไซม์จากเชื้อรา Aspergillus sp. มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสที่ปรับสภาพแล้วได้จริง

การผลิตเอนไซม์ในการศึกษาในครั้งนี้ได้ activity ของเอนไซม์สูงเมื่อมีการปรับปรุงปัจจัยที่เกี่ยวข้องตั้งแต่วิธีการปรับสภาพ สภาพแวดล้อมที่ใช้ย่อยสลายผลที่เกิดขึ้นจะสูงกว่านี้ (Prave, 1987) ปัจจัยเกี่ยวกับสภาพแวดล้อมที่สำคัญและควรคำนึงถึงคือ อุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง การย่อยสลายที่เริ่มต้นด้วย pH 5.0 เป็นการเริ่มต้นที่ดีที่สุด และจะมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นหรือลดลงบ้างเล็กน้อย การย่อยสลายชานอ้อยที่ปรับสภาพแล้วโดยใช้ pH เริ่มต้น 5.2 จะให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และจะให้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงเมื่อใช้ pH เริ่มต้นที่ 6.0 ขึ้นไป สภาพการย่อยสลายที่เหมาะสมในชานอ้อยคือ pH 5.5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Singh et al., 1990) ผลจากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้าและเอนไซม์ที่ผลิตได้เอง การเปลี่ยนแปลงของ pH ที่เกิดยังอยู่ในช่วงที่เอนไซม์ทำงานได้ดี และได้น้ำตาลเซลลโลไบโอสและน้ำตาลกลูโคสเป็นหลักโดยจะมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ ปัญหาที่พบในขั้นตอนนี้คือ เมื่อใช้เอนไซม์ที่มี activity ต่ำ (FPA) จะได้น้ำตาลรีดิวซ์เพียงเล็กน้อยและไม่มีองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคสอยู่ แต่เมื่อใช้เอนไซม์ที่มี activity สูง จะได้น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดโดยมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ

50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ B-glucosidase (Szajer and Targohski, 1977) ซึ่งการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราใน กลุ่มของ T. reesei จะได้น้ำตาลกลูโคสเพียงบางส่วนเพราะ B-glucosidase มีไม่เพียงพอ (Drazic and Nozinic, 1984)

ส่วนต้นมันสำปะหลังพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายเมื่อใช้เอนไซม์เพื่อการค้าและเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากวิธีการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ และการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ตอลดจนความร้อนที่ใช้ไม่เหมาะสม (Downing,1987)

การหมักเอทธานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส

การหมักเอทธานอลจากน้ำตาลกลูโคสเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้คือยีสต์ Saccharomyces cerevisiae ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกแล้วว่ามีความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดี เจริญเติบโตได้ดี มีความคงทนต่อน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูง (วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532) การหมักเริ่มต้นด้วยจำนวนเชื้อที่ 10^{8} เซลล์/มล. อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์

การหมักน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เพื่อการค้า พบว่าฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อย ที่มีปริมาณของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 70.10 74.70 และ 55.20 มก./มล. ปริมาณของเอทธานอลที่ได้สูงสุด คือ 28.90 51.11 และ 31.20 มก./มล. น้ำตาลกลูโคส 1 มก. เปลี่ยนเป็นเอทธานอลได้ 0.412 0.671 และ 0.565 มก. ในฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อย ตามลำดับ และวัสดุ 1 กรัมน้ำหนักแห้งเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลได้ 0.145 0.251 และ 0.156 กรัม ในฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ตามลาดับ หลังจากนั้นปริมาณของเอทธานอลก็ลงลง

การหมักน้ำตาลที่ได้จากการย่อยโดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อย ที่มีปริมาณของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 17.03 27.36 และ 33.60 มก./มล. ปริมาณของเอทธานอลที่ได้สูงสุดคือ

13.27 14.50 และ 17.30 มก./มล. น้ำตาลกลูโคส 1 มก. เปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลได้ 0.779 0.530 และ 0.510 มก. ในฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อย ตามลำดับ และวัสดุ 1 กรัมน้ำหนักแห้งเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลได้ 0.133 0.145 และ 0.173 กรัม ในฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณของเอทธานอลก็ลดลง

การหมักเอทธานอลจากน้ำตาลที่แยกได้ทั้ง 2 วิธีการในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ผลผลิตของเอทธานอลสูงสุดเกิดขึ้นที่อายุต่างกัน ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง ผลผลิตของเอทธานอลสูงสุดที่อายุการหมัก 2 วัน ส่วนการหมักที่เริ่มต้นด้วยน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่ำ ผลผลิตของเอทธานอลจะสูงสุดที่อายุการหมัก 1 วัน การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ในการหมักมีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน คือ จำนวนเซลล์และ pH จะเริ่มลดลงตั้งแต่อายุ 1 วัน การลดลงของ pH ก็ยังอยู่ในสภาพที่ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งอยู่ในช่วง 4.5-3.0 (Barbel et al., 1986) ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดตั้งแต่อายุ 1 วัน น้ำตาลที่เหลือคือปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณของเอทธานอลที่ให้ผลผลิตสูงสุดแล้วก็จะเริ่มลดลงตลอดอายุการหมัก ซึ่งจะลดลงไปพร้อมกับจำนวนเซลล์และ pH ที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะว่า เมื่อเซลล์ใช้น้ำตาลกลูโคสหมด เซลล์ขาดแคลนน้ำตาลเพื่อการเจริญและการสร้างผลผลิต ขณะเดียวกันผลผลิตที่มีอยู่สูงสุดก็มีการเปลี่ยนสภาพเป็นสารตัวอื่นต่อไป ปริมาณของเอทธานอลจึงลดลงเมื่ออายุการหมักนานขึ้น

สรุปผลการศึกษา

การคัดเลือกเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา 2 ชนิด 3 สายพันธุ์ คือ T. reesei QM 9414, T. reesei QM 6a และ Aspergillus sp. No 3335 โดยใช้อาหารเหลวสูตร production medium ผลจากการคัดเลือกพบว่าเชื้อรา T. reesei QM 6a ที่มีอายุ 9 วัน ให้ activity ของ endoglucanase 3.6973 หน่วย/มล. เมื่อวิเคราะห์ด้วย CMCase และให้ cellulase activity 0.8525 หน่วย/มล. เมื่อวิเคราะห์ด้วย FPA ซึ่งสูงกว่าเชื้อราอีก 2 ชนิด การทดสอบเพื่อเลือกอายุการเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์โดยใช้อาหารเหลวสูตรเดียวกัน อายุการเลี้ยงที่ผลิตเอนไซม์สูงสุด 12 วัน โดยมี activity ของ endoglucanase 3.825 หน่วย/มล. และ cellulase activity 0.612 หน่วย/มล. จากนั้นจึงนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกันเพื่อเพิ่มขนาดการผลิตในถังหมักขนาด 5,000 มล. เก็บตัวอย่างบางส่วนวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์ จนครบอายุ 12 วัน พบว่า activity ที่ได้คือ endoglucanase 2.876 หน่วย/มล. และ cellulase activity 0.810 หน่วย/มล. ซึ่งเป็น activity ของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายวัตถุดิบที่ปรับสภาพแล้ว ผลจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากเชื้อราที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการวัตถุดิบที่ปรับสภาพแล้ว 1 กรัมน้ำหนักแห้ง ให้น้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.170 0.132 และ 0.158 กรัม ในขณะที่การย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อการค้าวัตถุดิบ 1 กรัมน้ำหนักแห้งให้ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.353 0.345 และ 0.276 กรัม จากฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่ได้อยู่ในปริมาณที่จะนำไปหมักด้วยเชื้อยีสต์เพื่อให้เกิดเป็นเอทธานอลได้ ส่วนต้นมันสำปะหลัง พบว่าไม่เกิดปฏิกริยาการย่อยเมื่อใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ประเภท ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากวิธีการปรับสภาพที่ใช้ไม่เหมาะสม

การหมักน้ำตาลที่สกัดได้ด้วยด้วยเชื้อยีสต์ S. cerevisiae โดยใช้จำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ 10^8 เซลล์/มล. พบว่าน้ำตาลที่ย่อยได้จากฟางข้าว ซังข้าวโพด และชานอ้อยโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a ให้ผลผลิตของเอทธานอล 0.133 0.145 และ 0.173 กรัม/กรัมสับสเตรท ในฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ตามลำดับ ในขณะปริมาณเอทธานอลจากการหมักน้ำตาลที่ย่อยโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้าให้ผลผลิตของเอทธานอล 0.145 0.251 และ 0.156 กรัม/กรัมสับสเตรท ในฟางข้าว ซังข้าวโพดและชานอ้อย ตามลำดับ

จากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา เพื่อใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสในห้องปฏิบัติการสามารถทำได้ และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายก็เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งมีคุณสมบัติใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับหมักเอทธานอลหรือการผลิตเคมีภัณฑ์ชนิดอื่นได้ นอกจากนั้นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ปีนวัตถุดิบที่หาได้ง่ายในบ้านเรา เป็นผลที่เหลือจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตร การนำวัสดุเหล่านี้มาใช้ในการผลิตน้ำตาลกลูโคส เป็นผลดีต่อสภาพแวดล้อม ลดมลภาวะที่จะเกิดขึ้น เป็นการเพิ่มคุณค่าของวัสดุเหล่านั้น ผลการศึกษาในครั้งนี้น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ในแง่ของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสใช้เองในระดับห้องปฏิบัติการทดแทนการใช้เอนไซม์เพื่อการค้าที่มีราคาแพง เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องในการสกัดน้ำตาลจากเซลลูโลส และการหมักเอทธานอลเอทธานอลอันจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตเอทธานอลจากเซลลูโลสในอนาคตต่อไป