หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

อุตสาหกรรมการผลิตเยื่อและกระดาษนับวันยิ่งมีความสำคัญมากขึ้นทุกขณะ จากอดีตถึงปัจจุบันความต้องการใช้กระดาษมีปริมาณมากขึ้นทุกๆปีดังจะเห็นว่าปริมาณความต้องการกระดาษในปี 2540 เท่ากับ 3,635,600 ตัน (สำนักงานมาตราฐานอุตสาหกรรม,2540)และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆแต่กำลังการผลิตภายในประเทศมีไม่เพียงพอ ทั้งนี้เพราะอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษต้องใช้เทคโนโลยีและการลงทุนค่อนข้างสูงและจำเป็นต้องมีวัตถุดิบปริมาณมากพอและสม่ำเสมอเพื่อป้อนเข้าโรงงาน เมื่อกำลังการผลิตภายในประเทศมีไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงมีการนำเข้าเยื่อและกระดาษรวมทั้งเคมีภัณฑ์จากต่างประเทศ อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษนั้นอาจแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ๆคือ การผลิตเยื่อและการผลิตกระดาษ สำหรับขั้นตอนการผลิตเยื่อกระดาษนั้นประกอบด้วย กรรมวิธีการผลิตเยื่อ (pulping process) และการฟอกเยื่อ (bleaching) กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเส้นใยออกจากองค์ประกอบอื่นๆของไม้สามารถทำได้หลายวิธีทั้งวิธีทางเคมีและเชิงกล โดยชิ้นไม้จะถูกนำเข้าเครื่องบดซึ่งทำหน้าที่บดและตัดชิ้นไม้แยกละเอียดเป็นเยื่อไม้วิธีทางเชิงกลจะให้ผลผลิตมากกว่าร้อยละ 85 เยื่อที่ได้จะมีลักษณะหยาบกระด้างเส้นใยไม่ค่อยสมบูรณ์จะมีการขาดและถูกตัดเป็นท่อนๆนอกจากนี้ยังมีกลุ่มของเส้นใย ปนอยู่ด้วยเมื่อนำเยื่อชนิดนี้มาเป็นวัตถุดิบในการทำกระดาษจะให้คุณสมบัติด้านทึบแสง เส้นใยเดี่ยวซึ่งไม่ค่อยสมบูรณ์อาจมีการฉีกขาดและยังคงมีลิกนินตกค้างอยู่มากทำให้พันธะระหว่างเส้นใยต่ำไม่เหมาะที่จะนำไปทำกระดาษที่ต้องรับแรงดึงสูง มีราคาถูก เหมาะสำหรับใช้ทำกระดาษห่อของกล่องใส่ของ สำหรับการผลิตเยื่อโดยวิธีทางเคมีจะอาศัยพลังงานเคมีและพลังงานความร้อนในการทำให้เส้นใยแยกออกจากกันโดยส่งชิ้นไม้เข้าไปในหม้อต้มเยื่อ (digester) โดยใส่ sodium sulphite และ sodium hydroxide ซึ่งมีไอน้ำไหลผ่านเข้าหม้อต้มตลอดเวลาใช้เวลาประมาณ 3-4 ช.ม. เมื่อต้มเยื่อสุกแล้วจึงนำไปบด ล้าง เยื่อเคมีที่ได้มีหลายชนิดเรียกตามสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการอาทิเช่น เยื่อซัลไฟต์ เยื่อโซดา จะให้ผลผลิตของเยื่อประมาณร้อยละ 40 เยื่อที่ได้มีลักษณะนุ่ม สีค่อนข้างคล้ำ เส้นใยสมบูรณ์ เยื่อชนิดนี้มีปริมาณความต้องการสูงกว่าเยื่อที่ผลิตโดยวิธีเชิงกล เพราะสามารถพัฒนาศักยภาพของเส้นใยให้สามารถใช้งานได้อย่างกว้างขวาง

สำหรับขั้นตอนการฟอกเยื่อ (bleaching) มีจุดประสงค์เพื่อกำจัดลิกนินออกไปซึ่งจะทำให้เยื่อมีความขาวสว่างมากขึ้นโดยใช้สารเคมีทำปฏิกิริยากับลิกนินในเนื้อไม้ การฟอกเยื่อประกอบด้วยหลายขั้นตอน มีชื่อเรียกตามสารเคมีที่ใช้ในการฟอกและเรียงตามลำดับตัวอักษรตัวแรกของแต่ละขั้นตอน โดยสารเคมี สัญลักษณ์และชื่อขั้นตอนการฟอกต่างๆมีดังนี้

สารเคมี	สัญลักษณ์	ชื่อเรียกขั้นตอนการฟอก
คลอรีน	C	ขั้นคลอริเนชัน (chlorination stage)
โซเดียมไฮดรอกไซด์	E	ขั้นแอกแทรกชัน (extraction stage)
แคลเซียมไฮโปคลอไรต์	H	ขั้นไฮโปคลอไรต์ (hypochlorite stage)
คลอรีนไดออกไซด์	D	ขั้นคลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide stage)
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	P	ขั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide stage)
ออกซิเจน	O	ขั้นออกซิเจน (oxygen stage)
โอโซน	Z	ขั้นโอโซน (ozone stage)

ตัวอย่างของขั้นตอนการฟอกอาทิเช่น การฟอกแบบ CEH CEDED CEDEP CEOP ซึ่งทางโรงงานจะเลือกวิธีการฟอกโดยพิจารณาจากชนิดของกระดาษที่ต้องการผลิตมีความจำเป็นอย่างมากในการเลือกวิธีการฟอกให้เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อคุณภาพของเยื่อและลดต้นทุนการผลิตให้น้อยที่สุด (รุ่งอรุณ, 2532)

การผลิตเยื่อโดยกระบวนการทางเคมีนั้นถึงแม้จะมีข้อดีคือ ได้เยื่อที่มีคุณภาพสูงภายในระยะเวลาสั้นๆแต่ต้องอาศัยเงินทุนจำนวนมหาศาลในแง่ของเครื่องจักรและสารเคมี นอกจากนั้นจากกระบวนการข้างต้นจะสังเกตเห็นว่าในขั้นตอนของการสกัดเอาลิกนินออกมานั้น ลิกนินที่ถูกสกัดออกมาจะอยู่ในรูปของ chlorolignin และ chlorophenolic การฟอกเยื่อ 1 ตัน อาจทำให้เกิดสารกลุ่มนี้ถึง 5 กิโลกรัม สามารถวัดออกมาในหน่วยของ absorbable organic halide (AOX) สารดังกล่าวจะออกมากับน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกเยื่อและทางโรงงานจำเป็นต้องมีการบำบัดก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งหากไม่มีการบำบัดสารประกอบดังกล่าวอาจมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำ (Leatham,1986) และอาจก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางน้ำตามมาอีกด้วย จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษอาจมีแนวทางใหม่ให้เลือกอาทิ

เช่นการนำเทคโนโลยีทางชีวภาพมาใช้เช่น ในต่างประเทศได้มีการนำเชื้อรากลุ่ม white rot fungi บางชนิดที่สามารถย่อยสลายลิกนินในเยื่อกระดาษได้ (Lundquist และ Kirk,1978) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อรา *Phanerocheate chrysosporium* สามารถย่อยสลายลิกนินทำให้ค่า Kappa number ในเยื่อกระดาษที่ยังไม่ได้ผ่านการฟอกขาวลดลงได้ถึง 75% (Kirk และ Yang , 1979) สำหรับในประเทศไทยได้เริ่มมีการศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาถึงแนวทางการนำเชื้อราในกลุ่ม white rot fungi มาใช้ในการย่อยสลายลิกนินในเยื่อกระดาษ (Punnapayak,1995)

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาถึงแนวทางการฟอกเยื่อกระดาษโดยวิธีการทางชีวภาพด้วยเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Phanerocheate chrysosporium* และ *Ganoderma lucidum* โดยได้ศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมที่ก่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการฟอกเยื่อกระดาษด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ตลอดจนการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการฟอกเยื่อด้วย crude เอนไซม์ ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ซึ่งแนวทางการศึกษาของงานวิจัยนี้ นับว่าเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการฟอกเยื่อกระดาษโดยวิธีการทางชีวภาพในประเทศ ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายในเรื่องของสารเคมีและพลังงานในกระบวนการผลิต นอกจากนี้แล้วยังช่วยลดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อมลงได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อรากลุ่ม white rot fungi 2 ชนิด คือ *Phanerocheate chrysosporium* และ *Ganoderma lucidum* มาใช้ในการฟอกเยื่อโดยการนำมาใช้โดยตรงหรือนำมาใช้ในรูปของเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และเปรียบเทียบคุณภาพของเยื่อกระดาษได้แก่ค่าคัปปานัมเบอร์และค่าความขาวสว่างของเยื่อที่ผ่านการฟอกทั้ง 2 วิธี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการนำเชื้อราหรือเอนไซม์จากเชื้อราไปใช้โดยตรงหรืออาจนำมาเสริมกระบวนการฟอกโดยวิธีการทางเคมี ซึ่งถือเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีการฟอกเยื่อโดยวิธีทางชีวภาพในประเทศ ซึ่งถ้าทำได้จะเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตในแง่ของการใช้พลังงาน สารเคมีและลดปัญหาทางมลพิษลงได้อีกด้วย

ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพการฟอกเยื่อกระดาษโดยเชื้อรา 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Phanerocheate chrysosporium* และ เชื้อรา *Ganoderma lucidum* โดยได้ทำการศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมได้แก่ สูตรอาหาร ภาวะความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิที่เหมาะสมและระยะเวลาในการฟอกเยื่อ ที่ให้ผลตอบสนองต่อการสร้างเอนไซม์ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส ค่าความขาวสว่างและค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อ ตลอดจนศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของการฟอกเยื่อโดยใช้ crude เอนไซม์ ได้แก่ อุณหภูมิ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง ระยะเวลาในการฟอกเยื่อ และการหาอัตราส่วนของการใช้เอนไซม์ต่อเยื่อที่เหมาะสม แนวทางการนำเอาเทคโนโลยีการฟอกเยื่อด้วยวิธีการทางชีวภาพเข้ามาเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการฟอกเยื่อด้วยวิธีการทางเคมี นับว่าเป็นประโยชน์อย่างมาก เพราะสามารถลดต้นทุนการผลิตและไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

การตรวจเอกสาร

ลิกนิน (lignin)

ลิกนินเป็นสารประกอบที่พบได้ในส่วนของผนังเซลล์ของพืชชั้นสูงทั้ง gymnosperm และ angiosperms fern และ club moss นอกจากนี้ยังพบในส่วนของ vascular tissue แต่ลิกนินไม่พบในพืชพวก mosses lichens และ algae ลิกนินถูกสังเคราะห์โดยกระบวนการที่เรียกว่า lignification โดยที่โมเลกุลของลิกนินจะแทรกอยู่ในช่องว่างระหว่าง cellulose fibrils และสายของ hemicellulose ลิกนินที่พบในส่วนของผนังเซลล์จะทำหน้าที่เสมือนเกราะป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ ลิกนินเป็นสารประกอบโพลิเมอร์โครงสร้างโมเลกุลส่วนใหญ่เป็นวงแหวนไม่มีโครงสร้างโมเลกุลที่แน่นอนตายตัว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการรวมตัวของ phenylpropane unit กระบวนการสังเคราะห์ลิกนินในธรรมชาตินั้นอาศัยสารประกอบของ alcohol 3 ชนิดเป็น precursors ได้แก่ 1) p- hydroxycinnamyl (coumaryl) alcohol ซึ่งจะให้ p- hydroxyphynyl unit ในโครงสร้างของโพลิเมอร์ 2) 4-hydroxy-3-methocinnamyl (coniferyl) alcohol จะให้ quaiacyl unit และ 3) 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamyl (sinapyl) alcohol ให้ syringyl unit (รูปที่ 1) สามารถแบ่งลิกนินออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆโดยพิจารณาจากสัดส่วนของ precursors แต่ละชนิดที่ถูกนำมาใช้สร้างได้แก่ 1) softwood lignin 2) hardwood lignin และ 3) grass lignin (Higuchi,1986) ลิกนินที่พบในไม้เนื้ออ่อน (softwood lignin) พบได้ในไม้พวก gymnosperms โครงสร้างส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้น

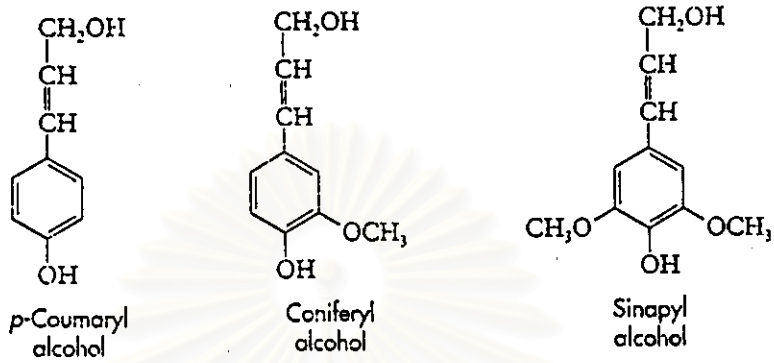
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ด้วย coniferyl alcohol องค์ประกอบรองลงมาคือ coumaryl alcohol ส่วน sinapyl alcohol จะไม่ถูกนำมาใช้เลย ส่วนลิกนินที่พบในไม้เนื้อแข็ง (hardwood lignin) พบมากในพวก angiosperm จะใช้ coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol อย่างละ 46% องค์ประกอบรองลงมาคือ p-hydroxyphenylpropane unit สำหรับลิกนินที่พบในพืชจำพวกหญ้า (grass lignin) จะประกอบไปด้วย coniferyl sinapyl และ p-hydroxyphenylpropane unit นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบอื่นๆอีก เช่น p- coumaric acid

กระบวนการสังเคราะห์ลิกนิน (Biosynthesis of lignin)

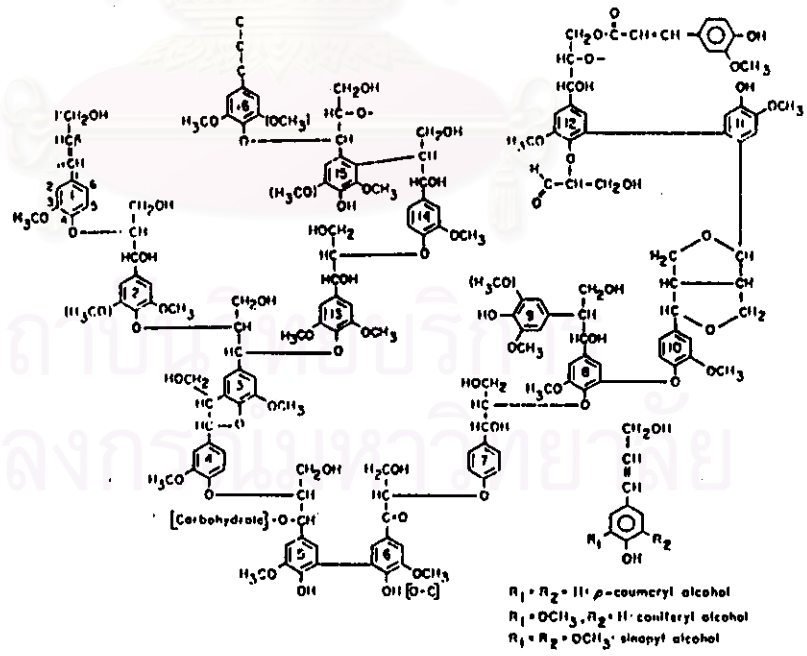
กระบวนการสังเคราะห์ลิกนินถูกสร้างโดยผ่าน shikimic acid pathway ของกรดอะมิโน โดยใช้ phenylalanine และ tyrosine ถูกนำไปใช้ในการสร้าง precursors ของลิกนิน precursors แต่ละชนิดถูกสร้างที่ endoplasmic reticulum ลำเลียงผ่าน vesicle ไปยังผนังเซลล์ (Glazer และ Nikaido, 1995) precursors จะรวมตัวกันเกิดโครงสร้างโพลิเมอร์โดยปฏิกิริยา dehydrogenation reaction ซึ่งมีเอนไซม์ peroxidase ช่วยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา precursors จะถูกเปลี่ยนไปเป็น phenoxy radicals อนุมูลอิสระเหล่านี้จะมารวมตัวกันแบบสุ่มและยังไม่มีความเสถียร เมื่อรวมตัวกับน้ำจะได้เป็นโพลิเมอร์สายสั้นๆหรือ oligomeric ภายในโมเลกุล จะประกอบไปด้วยส่วนของ nucleophilic ซึ่งชอบรวมตัวกับน้ำหรือ phenolic hydroxy group ทำให้ได้โมเลกุลของลิกนินที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และเมื่อ nucleophilic รวมตัวกับหมู่ hydroxy group ของน้ำตาลซึ่งได้จากการย่อยสลายของ polysaccharide ทำให้ลิกนินที่เกิดขึ้น crosslinks กับ hemicellulose นอกจากนี้ลิกนินยังสามารถสร้างพันธะ covalent กับ glycoprotein ที่บริเวณผนังเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 Precursors **ที่ใช้ในการสังเคราะห์ลิกนินซึ่งได้แก่**

p-coumaryl alcohol coniferyl alcohol sinapyl alcohol

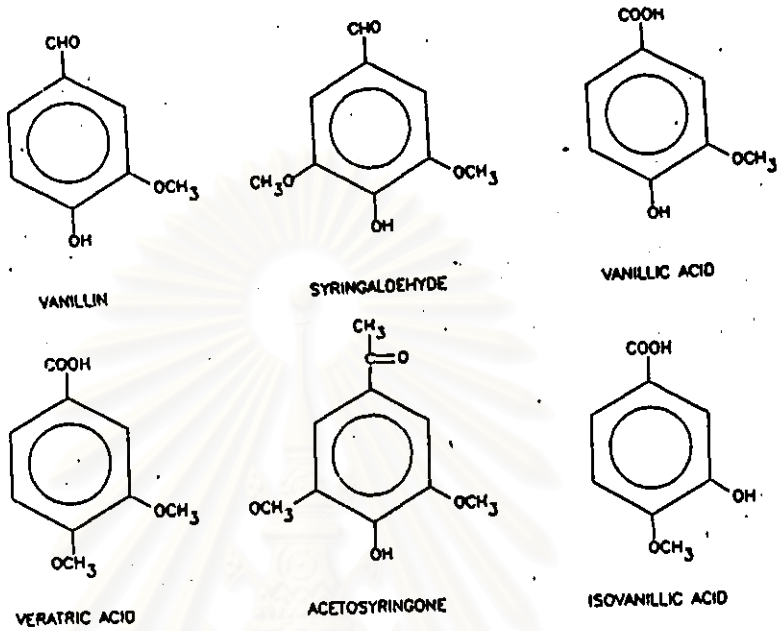


รูปที่ 2 โครงสร้างที่ซับซ้อนของลิกนิน (Adler,1977)

เชื้อรากลุ่ม white rot fungi

White rot fungi คือกลุ่มของเชื้อราซึ่งในสภาพธรรมชาติเป็นปาราสิตของไม้ส่วนใหญ่อยู่ใน order Aphyllophorales จัดอยู่ใน class Basidiomycetes เมื่อเข้าทำลายเนื้อไม้จะทำให้เกิดการผุพังเนื่องจากเชื้อราเข้าทำลายองค์ประกอบของเนื้อไม้ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน สมาชิกของรากลุ่มนี้อาทิเช่น *Phanerocheate* sp. *Ganoderma* sp. *Trametes versicolor* *Pleurotus* sp. ความสำคัญของรากลุ่มนี้คือ มีศักยภาพในการย่อยสลายลิกนินได้ ในระยะเริ่มแรกของการศึกษาค้นคว้าได้มีความพยายามที่จะมีการคัดแยกตลอดจนการพัฒนาเพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ๆเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ (biopulping) หรือการฟอกเยื่อกระดาษ (biobleaching) ตลอดจนนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยให้ง่ายยิ่งขึ้นในอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง การที่เชื้อรากลุ่มนี้สามารถย่อยสลายพวก ลิกโนเซลลูโลส ได้นั้นเพราะเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิดอาทิเช่น lignin peroxidase (LIP) manganese peroxidase (MnP) และเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์โมเลกุลของลิกนินตรงตำแหน่งของหมู่ฟีนอล เช่นเอนไซม์ laccase (Kirk และ Shimada,1985) เอนไซม์ดังกล่าวสามารถออกซิไดซ์ โมเลกุลของลิกนินทำให้ขนาดโมเลกุลของลิกนินเล็กลง จะเห็นได้ว่าเชื้อรากลุ่มนี้มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Phanerocheate chrysosporium* ได้มีการศึกษาและพัฒนานำมาใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษอย่างแพร่หลายจึงได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ *P. chrysosporium* กันมาก เชื้อรา *P. chrysosporium* เดิมจัดอยู่ใน class Deuteromycetes เพราะพบว่ามีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (imperfect stage) เท่านั้น ต่อมา Burdshall และ Eslyn (1974) ได้พบระยะ perfect stage ของเชื้อรา *Sporotrichum pulverulentum* โดยได้มีการสร้าง clamp connection เพื่อสร้าง fruiting body จึงได้จัดให้เชื้อรา *P.chrysosporium* อยู่ใน class Basidiomycetes เชื้อรา *P.chrysosporium* สามารถย่อยสารประกอบพวก ลิกโนเซลลูโลส โดยสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดดังกล่าวข้างต้นแต่เอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายลิกนินได้มากที่สุดคือ lignin peroxidase เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นแล้วขับออกนอกเซลล์ และเป็นสาร secondary metabolite มีคุณสมบัติในการ oxidize phenolic unit ให้เป็น aryl cation radical มีผลทำให้พันธะ C-C และ C-O แตกหักออกจากกัน (Datta และคณะ,1991) และสามารถ oxidize กลุ่มของ arylpropane ซึ่งเป็น side chain ในโมเลกุลลิกนินทำให้พันธะ C-C แตกหักออกตรงตำแหน่ง C_α- C_β โมเลกุลวงแหวนของลิกนินเปิดออก อิเล็กตรอนจะถูกปล่อยออกมาแล้วมารวมตัวกับอนุมูลอิสระซึ่งมีประจุเป็นบวก (cation radical) ยังไม่มีความเสถียร อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถเกิดปฏิกิริยา hydroxylation กับโมเลกุลของน้ำหรือ O_2 (Higuchi,1990) ทำให้

เกิดผลิตภัณฑ์หลายชนิดอาทิเช่น vanillin syringaldehyde isovanillic acid vanillic acid และอื่นๆ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 สาร derivatives ที่เกิดจากการย่อยสลายโมเลกุลของลิกนิน

นอกจากเชื้อรากลุ่ม white rot fungi แล้วยังมีเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆที่สามารถย่อยสลายลิกนิน ได้แก่พวก brown rot fungi ในสภาพธรรมชาติ มีรายงานว่าเชื้อรา *Poria placenta* สามารถย่อยสลายลิกนินได้ (Antai และ Crawford, 1982) Savory และ Pinion (1958) ยังได้รายงานถึงเชื้อราที่ย่อยสลายลิกนินได้อีกเช่น *Gloeophyllum trabeum* Crawford และ Sutherland (1979) ได้รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียในชั้นแอคติโนไมซิติสซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกสามารถย่อยสลายลิกนินได้ดีกว่าพวก brown rot fungi โดยเฉพาะในสกุล Streptomyces และยังมีเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่มีศักยภาพในการย่อยสลายลิกนินได้เช่น *Micromonosporai Microbispora Thermomonospora Nocardia Rhodococcus* และ *Arthrobacter* เป็นต้น

ในระยะแรกของการศึกษาได้มีการนำเอา DHP (dehydrogenated polymer) ซึ่งเตรียมมาจาก coniferyl alcohol มาติดฉลากด้วย $^{14}CO_{12}$ ตรงบริเวณของ aromatic ring เช่นที่ตำแหน่งของ methoxy group แล้วนำมาต่อกับลิกนินจากธรรมชาติ (Haider และ Trojannowski, 1975) ลิกนินในธรรมชาติที่ถูกนำมาศึกษาได้แก่ kraft lignin lignin sulfonates และ poplar wood lignin (Hatakka, 1983) ความสามารถในการย่อยสลายลิกนินดูจากปริมาณของ $^{14}CO_{12}$ ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากกระบวนการ decarboxylation (Alder และ Eriksson,1987) เชื้อรา *P.chrysosporium*

สามารถผลิต H_2O_2-requiring enzyme แล้วถูกขับออกนอกเซลล์ เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการใช้ 2-keto-4-thiomethyl butyric acid (KTBA)ให้เปลี่ยนไปเป็น ethylene ได้และสามารถ oxidize ลิกนินที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน เช่น 1-(4' ethoxy 3' - methoxyphenyl) ß-ether diner 1 – (4 '- ethoxy - 3' - methoxyphenyl) glycerol- ß -guaiacyl ether olefin 1-(4'-ethoxy-3'-methoxyphenyl) 1,2-propane การทำงานของเอนไซม์ที่สร้างจากเชื้อรา *P.chrysosporium* ในสภาพที่มีความเข้มข้นของลิกนินต่ำการทำงานของเอนไซม์จะเป็นแบบไม่มีความจำเพาะเจาะจง (Jeffrey,1983) Harvey และคณะ (1986) พบว่า *P. chrysosporium* สร้างเอนไซม์ ligninase ไป oxidize ซับเตรตที่เป็น dimethoxylated (veratryl alcohol)ได้ดีกว่า monomethoxelated (anisylate) โดยการวัดหาปริมาณ aldehyde ที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ ligninase สามารถ oxidize ซับเตรตโดยตรงและเมื่อใช้ 4- methoxymandelic acid ซึ่งเป็น monomethoxelated substrate และมี veratryl alcohol เป็นตัวกลาง (mediator) พบว่าผลผลิตของการเกิด anisaldehyde เพิ่มเป็น 15 เท่า เมื่อเทียบกับภาวะที่ไม่มี veratryl alcohol ภาวะดังกล่าวประกอบด้วย monomethoxelated substrate 800 มิลลิโมล : เอนไซม์ ligninase 0.06 unit: H_2O_2 230 มิลลิโมล : veratryl alcohol 20 มิลลิโมล ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวพบว่า veratryl alcohol ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนไป 1 ตัว (one electron oxidant) ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนและ veratryl alcohol ยังทำหน้าที่เป็นตัวกลางทำให้เอนไซม์สามารถจับกับ substrate ได้ดีขึ้นในภาวะที่มีออกซิเจน

เชื้อรากลุ่ม white rot fungi ในแต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินที่แตกต่างกันแต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประกอบของสารที่พบในเนื้อไม้ นอกจากนี้แล้วปัจจัยอื่นๆ เช่น ปริมาณความชื้นของภาวะแวดล้อม ปริมาณออกซิเจนและความเข้มข้นของปริมาณไนโตรเจนที่มีอยู่ในเนื้อไม้ก็มีผลต่ออัตราการย่อยสลายสารที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อไม้ (Alder และ Eriksson,1990) จากการทดลองของ Boominathan และ Reddy (1992) สามารถนำมาสนับสนุนได้โดยพบว่าเชื้อ *P.chrysosporium* ที่อยู่ในระยะการเจริญช่วงทุติยภูมิมีการสร้าง extracellular peroxidase ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินโดยมีไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ร่วมในปฏิกิริยา และ ยังพบอีกว่า H_2O_2-requiring enzyme บางตัว สามารถย่อยลิกนินที่ติดฉลากด้วย C-14 เอนไซม์กลุ่มนี้จะไม่ถูกสร้างในภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนสูงๆ และในสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์มาแล้ว Keyser และคณะ (1978) ได้รายงานเกี่ยวกับระบบ ligninolytic enzyme ของเชื้อรา *P.chrysosporium* ส่วนใหญ่จะถูกชักนำให้เกิดในภาวะที่ขาดไนโตรเจนและในภาวะเดียวกันนี้เองเชื้อราจะมีการสร้าง veratryl alcohol Leisola และคณะ (1982) และ Eriksson และคณะ (1986) ได้รายงานเกี่ยวกับการควบคุมการย่อยสลายของลิกนินโดย

เชื้อรา *P.chrysosporium* สามารถทำได้โดยการปรับแหล่งของโพลีแซคคาไลด์จากภายนอกเซลล์ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปกลูโคสภายใต้ภาวะที่ขาดไนโตรเจน

Leatham (1986) เลี้ยงเชื้อรา *P.chrysosporium* และ *Lentinus edodes* ในอาหารเหลว โดยศึกษาถึงแอคติวิตี้ของกลุ่มเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพวกลิกโนเซลลูโลส ของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ซึ่งดูจากความสามารถในการย่อยสลายลิกนินสังเคราะห์ที่มีการติดฉลากที่ ^{14}C สำหรับกลไกการสร้าง ligninolytic activity ของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ต้องการปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญได้แก่ ออกซิเจนและแหล่งคาร์บอนจากภายนอกเช่น กลูโคส โดยเชื้อรา *P.chrysosporium* จะสร้างเอนไซม์ ligninase ก็ต่อเมื่อการเจริญในระยะ vegetative growth ได้สิ้นสุดลงเท่านั้นและพบว่าเชื้อรา *P.chrysosporium* มีศักยภาพในการย่อยสลายลิกนินได้มากกว่าเชื้อรา *Lentinus edodes* เพราะรา *Lentinus edodes* จะอิ่มตัวด้วยปริมาณลิกนินที่น้อยมากเมื่อเทียบกับรา *P.chrysosporium* ซึ่งจะอิ่มตัวได้ยากกว่าและยังพบว่าเชื้อรา *P.chrysosporium* ต้องการธาตุอาหารที่จำเป็นซึ่งได้แก่ Fe^{2+} Ca^{2+} และMo^{6+}จะไปช่วยในการกระตุ้นการสร้าง ligninase ให้สูงยิ่งขึ้น สำหรับ *Lentinus edodes* การย่อยลิกนินจะเกิดในช่วง vegetative growth เท่านั้นทำให้การย่อยลิกนินได้ในปริมาณเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่า *Lentinus edodes* ไม่มีการสร้างเอนไซม์ ligninase แต่จะสร้างเอนไซม์ laccase endocellulase exocellulase และ ligninolytic activity ที่เกิดขึ้นจำเป็นต้องมีธาตุ Mn^{2+} อยู่ด้วยแต่สำหรับ Ca^{2+} ไม่จำเป็น

Jeffries Choi และ Kirk (1981) รายงานว่าเมื่อให้คาร์โบไฮเดรตในรูปของกลูโคสและเซลโลไบโอสในระดับที่พอเหมาะ จะทำให้ ligninolytic activity เกิดได้รวดเร็วขึ้นโดยจะไปมีผลทำให้ระยะการเกิด primary metabolism ใช้เวลาน้อยลงทำให้การย่อยสลายลิกนินเกิดได้มากขึ้น ผลของไนโตรเจนที่ใช้ในรูปของ NH_4NO_3 L-asparagine NH_4Cl เมื่อมีการให้อย่างจำกัดการย่อยสลายของลิกนินจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยดูได้จากการเกิดของ $^{14}CO_2$ และระดับของ veratryl alcohol ที่เกิดขึ้น ไนโตรเจนไม่ได้ถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตเพราะน้ำหนักแห้งของเส้นใยไม่ได้เพิ่มขึ้นและเมื่อทำการปรับภาวะโดยมีการให้ไนโตรเจนในระดับที่พอเหมาะและมีการเติมคาร์โบไฮเดรตมากเกินพอจากนั้นทำการเติมไนโตรเจนลงไปอีกจะทำให้ ligninolytic activity ลดลง ส่วนฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์ไม่มีผลต่อการย่อยลิกนิน Reid (1983) รายงานว่าเชื้อรา *P. chrysosporium* ย่อยไม้สน ในภาวะที่มีการเติมแร่ธาตุ ซึ่งประกอบด้วย KH_2PO_4 $MgSO_4$ $CaCl_2$ พบว่าจะไปช่วยเร่งให้ aspen wood เน่าเปื่อยเร็วขึ้นในระยะแรกทั้งนี้เพราะเกิดจากการย่อยสลายของลิกนินส่วนแหล่งไนโตรเจนเช่น NH_4Cl asparagine และ casein hydrolysate มีผลในการยับยั้งการย่อยลิกนินอย่างรุนแรงซึ่งให้ผลตรงกันข้ามกับ peptone และ yeast extract ซึ่งเป็น complex N_2-souce มีผลในการกระตุ้นการย่อยสลายลิกนินเมื่อเปรียบเทียบความแรงในการยับยั้ง

การย่อยสลายของลิกนินสามารถเรียงลำดับได้ดังนี้ urea > asparagine > NH_4Cl > peptone > yeast extract

Kirk และคณะ (1978a) รายงานว่าเชื้อรา *P. chrysosporium* สามารถย่อย DHP (dehydrogenated polymer) ไปเป็น $^{14}CO_2$ ได้ในปริมาณที่มากเมื่อมีการให้ออกซิเจนในระดับความเข้มข้น 100% โดยเปรียบเทียบกับการให้ออกซิเจนที่ระดับความเข้มข้น 21% Bar-Lev และ Kirk (1981) พบว่าสาเหตุที่ระดับความเข้มข้นของออกซิเจนสูง ทำให้ย่อย DHP ได้ดีทั้งนี้เพราะว่าออกซิเจนจะไปทำหน้าที่เป็นตัวชักนำให้เกิด ligninolytic activities Shimada และคณะ (1981) ได้รายงานว่าความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจนมีอิทธิพลมากต่อปริมาณการสร้าง veratryl alcohol โดยเชื้อรา *P.chrysosporium* Gold และคณะ (1984) ได้รายงานว่าเชื้อรา *P.chrysosporium* สายพันธุ์ ME-446 สามารถย่อยสลายลิกนินเกิดได้ดีในภาวะที่มีการกวน และเชื้อรา *P.chrysosporium* สายพันธุ์เดียวกันนี้ยังสามารถย่อยสลายทั้งลิกนินที่เป็น DHP และลิกนินธรรมชาติจากไม้สน ซึ่งจะทำให้เกิด CO_2 มากที่สุดในภาวะที่มีการกวนอย่างสม่ำเสมอ (Reid และคณะ,1985) Pellinen และ Chang (1989) พบว่าการย่อยสลายลิกนินในเยื่อคราฟท์ เยื่อเคมี และเยื่อกึ่งเคมี โดยใช้เชื้อรา *P.chrysosporium* ภายใต้ภาวะการเขย่าจะให้ผลดีกว่าภาวะที่ไม่มีการเขย่า

Paice และคณะ (1989) ได้ทดลองใช้เชื้อรา *Trametes (Coriolus versicolor)* มาใช้ในการฟอกเยื่อกระดาษพบว่าสามารถเพิ่มความขาวสว่างของเยื่อที่ทำมาจากไม้เนื้อแข็งโดยทำการเลี้ยงเชื้อราในภาวะที่มีการกวนใช้เวลานาน 5 วันเชื้อรา *T. versicolor* สามารถทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์ (kappa number) ลดลงจากเริ่มต้น 12 เป็น 8 และค่าความขาวสว่างเพิ่มจาก 38% เป็น 48% และเมื่อนำเยื่อดังกล่าวมาทำการฟอกต่อด้วยคลอรีนไดออกไซด์จะได้ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 82 % เยื่อที่ได้ยังมีความแข็งแรงมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากเส้นใยของเชื้อราเป็นตัวประสานระหว่างเส้นใยของเยื่อกระดาษ (Reid และคณะ, 1990) Kirk และคณะ (1978a) ได้รายงานว่าภาวะการกวนจะทำให้เส้นใยของเชื้อรามาเกาะกลุ่มรวมกันเป็นเม็ดเล็กๆซึ่งจะมีผลในการยับยั้งการย่อยสลายลิกนิน และยังพบความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายของลิกนินกับปริมาณของออกซิเจน จากการทดลองพบว่าหากระดับออกซิเจนต่ำๆ การย่อยลิกนินจะเกิดขึ้นช้า

Rosenberg และ Wilk (1979) รายงานว่าการรวมตัวกันของเส้นใยและเยื่อกระดาษในภาวะการเขย่าจะมีข้อดีคือจะทำให้เกิดการสัมผัสกันระหว่างเส้นใยกับเยื่อกระดาษได้ดียิ่งขึ้นซึ่งจะเป็นผลให้การฟอกมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีในปริมาณที่น้อย ได้แก่การนำเนื้อไม้ไปแช่น้ำพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 5-6 เดือนลิกนินจะถูกย่อยสลายไปในปริมาณที่น้อยมากหรือแทบไม่มีการย่อยสลายเกิดขึ้น Oider และ Monties (1983) Benner และ Hodson (1985) Olberg และ Young (1985a) เชื้อรา *P.chrysosporium* สามารถย่อยสลายลิกโนซัลโฟเนตได้ดีเมื่ออยู่ใน

ภาวะที่มีการให้ออกซิเจน 100% ซึ่งดีกว่าในภาวะที่มีการให้เฉพาะอากาศโดยวิธีการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร (Kern, 1983b)

Tran และ Chambers (1987) ได้ทดลองใช้เยื่อที่ผลิตจากไม้เนื้อแข็ง ซึ่งยังไม่ได้ผ่านกระบวนการฟอกและมีปริมาณของลิกนินในเยื่อ 24% พบว่าที่ภาวะความเป็นกรดด่างที่ pH 3.5 อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เชื้อรา *P.chrysosporium* สามารถย่อยสลายลิกนินออกจากเยื่อได้ดี Yang และคณะ (1980) Bar lev และคณะ (1982) และ Kirk และ Yang (1979) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการใช้เชื้อรา *P.chrysosporium* โดยใช้ลิกนินจากแหล่งต่างๆกันเช่นลิกนินที่ได้จากชิ้นไม้สับ ลิกนินจากเยื่อคราฟท์ตลอดจนลิกนินสังเคราะห์ เพื่อดูประสิทธิภาพการย่อยลิกนิน Buswell และ Odier (1987) Buswell (1991) Kirk และ Ferrell (1987) ได้ศึกษาโดยนำเชื้อรากลุ่ม white rot fungi ในการฟอกเยื่อกระดาษจะทำให้ความแข็งแรง (strength) ของกระดาษเพิ่มมากขึ้น ถึงแม้ว่าลิกนินจะเป็นแหล่งของคาร์บอนที่มีอยู่อย่างมากมายในสภาพธรรมชาติ แต่เชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายลิกนินได้จะนำลิกนินมาใช้ในการเจริญเติบโตต่อเมื่อแหล่งอาหารอื่นๆที่มีอยู่หมดลง เชื้อราส่วนใหญ่ใช้ลิกนินเพียงแต่เป็นแหล่งของพลังงานหรือแหล่งคาร์บอนเสริมมิใช่แหล่งคาร์บอนหลัก ดังนั้นอาจถือได้ว่ากระบวนการย่อยสลายลิกนินเป็นเพียง โคเมตาโบลิซึม (cometabolism) ซึ่งเกิดขึ้นร่วมกับการใช้แหล่งพลังงานหรือแหล่งคาร์บอนอื่นๆเช่น เฮมิเซลลูโลส เซลโลไบโอสและคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน การย่อยสลายลิกนินโดยเชื้อรา *P.chrysosporium* พบว่าไม่สามารถให้พลังงานได้เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ (Kirk Higuchi และ Chang (1978) Crawford (1981)และ Pelczar Gottleib และ Day (1950) ในกรณีศึกษาของเชื้อรา *Polyporus versicolor* ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (Leisola และคณะ,1983) Schmidt และ Fiechter (1983) พบว่าลิกนินไม่ได้เป็นแหล่งของพลังงานที่ใช้ในการเจริญเติบโตอย่างแท้จริง

Fujita และคณะ. (1991) นำเชื้อรา 4 สายพันธุ์ได้แก่ white rot fungi strain IZU - 154 *Coriolus versicolor* *P.chrysosporium* และ *C. hirsutus* ซึ่งเจริญบนอาหาร PDA มาเตรียมสารละลายของสปอร์ใส่ลงไปบนเยื่อโดยไม่มีการเติมสารอาหารจากนั้นนำไปบ่มในภาวะอยู่นิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เยื่อ 4 กรัม (แห้ง) : น้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร : ละลายสปอร์ 8 มิลลิลิตร พบว่าค่าความขาวสว่าง (brightness) ของเยื่อเพิ่มขึ้นจาก 28% ไปเป็น 52% ค่า kappa number ลดลงจาก 20.90 เหลือ 8.5 ภายในเวลา 7 วันและในวันที่ 11 ความขาวสว่างของเยื่อเท่ากับ 63% ค่า kappa number เท่ากับ 5.70 เมื่อใช้เชื้อราฟอก (FCED) ร่วมกับขั้นตอน CED ค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้นเป็น 88% นอกจากนี้ยังพบว่าขั้นตอน FCED สามารถลดปริมาณการใช้คลอรีนและสารเคมีที่ทำให้เกิดมลภาวะได้อีกด้วย

Bourbomais และ Paice (1996) ศึกษาถึงประสิทธิภาพการฟอกเยื่อกระดาษโดยมีการใช้เอนไซม์แทรกสลับกับขั้นตอนการฟอกเยื่อด้วยด่าง เอนไซม์ที่นำมาใช้ในการทดลองคือเอนไซม์ laccase ซึ่งผลิตได้จากเชื้อรา *Trametes versicolor* (ATCC 20869) เอนไซม์ laccase ได้ถูกนำมาทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นบางส่วน นำมาใช้ในการฟอกเยื่อ softwood kraft pulp ซึ่งเป็นเยื่อที่ผ่านกระบวนการฟอกในขั้นตอนของการใช้ออกซิเจนมีค่าคัมปานัมเบอร์เริ่มต้นเท่ากับ 17.1 ค่าความขาวสว่างเท่ากับ 34.2% ใช้เอนไซม์ laccase 5 unit ต่อ กรัมของเยื่อและมีการเติมตัว mediator คือ ABTS [2,2′-azinobis- (3-ethylbenzthaizoline-6-sulfonate)] ความเข้มข้น 1% ปรับเยื่อให้มีความข้น (consistency) เท่ากับ 10% จากการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ระยะเวลาในการฟอกและค่าความดันของออกซิเจนที่ใช้ในการทดลองพบว่าที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 อุณหภูมิ 60 °C และใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 2 ชั่วโมง ใช้ค่าความดันออกซิเจนเท่ากับ 300 Kpa สามารถลดค่าคัมปานัมเบอร์ของเยื่อเหลือ 12.8 และหลังจากนำเยื่อที่ผ่านการฟอกด้วยเอนไซม์มาต้มสกัดต่อด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์ นาน 90 นาที ที่อุณหภูมิ 70 °Cสามารถลดค่าคัมปานัมเบอร์ของเยื่อเหลือเพียง 7.8

Baipai และ Pramod (1996) ได้นำเอนไซม์ซึ่งผลิตเพื่อการค้ามาทดลองใช้ในขั้นตอนของการทำ pretreatment ก่อนจะนำเยื่อเข้าสู่กระบวนการทางเคมีแบบ CDEHD เอนไซม์ทั้ง 12 ชนิดถูกนำมาใช้กับเยื่อซึ่งได้จากการใช้ไม้ไผ่เป็นวัตถุดิบมีค่าความขาวสว่างเริ่มต้นเท่ากับ 22-24% ค่าคัปปานัมเบอร์เท่ากับ 19.5-23.3 ปรับให้เยื่อมีความข้นเท่ากับ 10% พบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดต้องการภาวะของความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ระยะเวลาที่ใช้ฟอกและปริมาณของเอนไซม์ต่อเยื่อมีความแตกต่างกันซึ่งเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการฟอกดีที่สุดมี 2 ชนิดคือ Bleachzyme F และ Irgazyme 40S เป็นเอนไซม์ที่มีผลทำให้ค่าความขาวสว่างเพิ่มมากที่สุดถึง 89% ซึ่ง Bleachzyme F ต้องการภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 6.0-6.5 อุณหภูมิ 45-50 °Cโดยใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อเยื่อเท่ากับ 6 unit ต่อกรัมของเยื่อใช้ระยะเวลาในการฟอกนาน 3 ชั่วโมง ในขณะที่ Irgazyme 40S ทำงานได้ดีที่ภาวะความเป็นด่างได้ดีกว่าคือที่ระดับ pH เท่ากับ 7.0-8.0 อุณหภูมิ 50-60 °C ใช้เอนไซม์ 7.5 unit ต่อกรัมเยื่อ ระยะเวลาฟอก 3 ชั่วโมง การนำเอนไซม์มาใช้ในขั้นตอนของการทำ pretreament ยังมีข้อดีคือสามารถลดการใช้คลอรีนในขั้นตอนแรกลงได้ถึง 20% และลดการใช้คลอรีนไดออกไซด์ในขั้นตอนสุดท้ายถึง 4 กิโลกรัมต่อเมตริกตันของเยื่อ

การนำ crude เอนไซม์จากเชื้อรามาใช้ในกระบวนการผลิตเยื่อก็ได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายเช่นการนำ crude เอนไซม์ซึ่งผลิตจากเชื้อรา *Lentinus edodes* strain SC 495 มาทำการหมักร่วมกับฟางข้าว โดยใช้ลักษณะการหมักแบบ solid-state fermentation ในถังหมักขนาด 3.5 ลบ.ม ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30 °C ความเข้มข้นของ CO_2 เท่ากับ 5% ใช้ระยะเวลาในการหมักนาน 11 วัน

จากนั้นจึงใช้เครื่องไฮโดรลิกกดลงไปบนฟางข้าวเพื่อบีบเอาเอนไซม์ออกมา จากการวิเคราะห์ชนิดของเอนไซม์ที่เชื้อรา *L. edodes* ผลิตขึ้นพบเอนไซม์ 5 ชนิด ได้แก่ phenoloxides laccase endoxylanase endocellulase exocellulase crude เอนไซม์ที่ได้ถูกนำมาสเปรย์ลงบนฟางข้าวซึ่งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดความยาว 10 เซนติเมตร อัตราส่วนการใช้ crude เอนไซม์เท่ากับ 5 ลิตรต่อฟางข้าว 1 กิโลกรัม ในถังหมัก (bioreactor) ซึ่งมีแกนหมุนตลอดเวลา เพื่อให้เอนไซม์สามารถสัมผัสกับฟางข้าวได้อย่างทั่วถึง ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 40 °C นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเยื่อที่ผ่านการหมักด้วยเอนไซม์สามารถลดค่า freeness ลงได้ 20% ในขณะที่ค่า burst index ยังคงมีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าการนำ crude เอนไซม์มาใช้สามารถช่วยลดพลังงานในกระบวนการฟอกได้ถึง 50% และยังช่วยย่นระยะเวลาให้เร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการ pretreatment ด้วยเส้นใยของเชื้อรา (Giovamozzi-Sermanni และคณะ, 1997)

Camarero และคณะ (1998) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบศักยภาพการย่อยสลายลิกนินในฟางข้าวของเชื้อรา 3 ชนิดคือ *Pleurotus eryngii* *Trametes versicolor* และ *Phanerocheate chrysosporium* โดยนำเชื้อรา 3 ชนิดซึ่งเลี้ยงในอาหาร 2% malt extract agar ตัดเป็นชิ้นขนาด 1x1 เซนติเมตร ไปเลี้ยงบนฟางข้าวในสภาวะการหมักแบบ solid state fermentation ใช้ระยะเวลาในการบ่มนาน 60 วัน หลังจากนั้นนำฟางข้าวมาศึกษาปริมาณของลิกนิน (lignin content) น้ำหนักของฟางข้าวที่สูญหายไป (weight loss) หลังการหมักและศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยภายใต้กล้อง scanning electron microscopy (SEM) พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่มีศักยภาพทำให้ปริมาณของลิกนินลดลงมากที่สุดเรียงจากน้อยไปหามากได้แก่ *P. chrysosporium* *T. versicolor* และ *Pleurotus. erygii* และผลจากการศึกษาเรื่องน้ำหนักที่สูญหายไปก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ปริมาณของเยื่อที่สูญหายไปมีปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับเยื่อที่ผลิตจากกระบวนการทางเคมีซึ่งมีการสูญหายไปของเยื่อถึง 10% (Leatham และคณะ,1990) แต่เมื่อดูลักษณะโครงสร้างของเส้นใยแล้วพบว่าโครงสร้างของเส้นใยที่ได้จากการหมักบ่มด้วยเชื้อรา *P. erygii* จะมีความสมบูรณ์มากกว่าเส้นใยที่หมักด้วยเชื้อรา *P.chrysosporium* และ *Trametes versicolor* เมื่อนำเยื่อดังกล่าวมาต้มร่วมกับ 7% โซเดียมไฮดรอกไซด์โดยใช้อัตราส่วนของเยื่อต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15:1 (V/W) พบว่าสามารถลดการใช้พลังงานในกระบวนการผลิตได้ถึง 40% และใช้ระยะเวลาเพียง 1 ชั่วโมงซึ่งโดยปกติในระดับอุตสาหกรรมจะใช้ระยะเวลานาน 3 ชั่วโมง (Akhtar และคณะ,1993) ได้มีการนำเอนไซม์มาใช้ในการทำ pretreatment กันอย่างแพร่หลาย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการฟอกเยื่อและลดการใช้พลังงานเมื่อเทียบกับการใช้กระบวนการทางเคมีหรือเชิงกลเพียงอย่างเดียว (Tolan และ Canovas,1992) ดังจะเห็นได้ว่ามีการนำเอนไซม์หลายชนิดมาใช้กับการผลิตเยื่อเชิงกลอาธิเช่นเอนไซม์ lignin peroxidase manganese peroxidases และ laccase (Kirk และ Chang,1990) สำหรับเอนไซม์ xylanase ได้มีการ

ผลิตเพื่อการค้า โดยเอนไซม์จะไปมีผลทำให้ขั้นตอนของการใช้สารเคมีสกัดแยกลิกนินออกมานั้น สามารถเกิดได้ง่ายขึ้นเป็นการลดการใช้สารเคมีให้น้อยลงและยังช่วยลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

Arbeloa และคณะ (1992) ได้ศึกษาโดยการใช้เยื่อชานอ้อยที่ได้จากกรรมวิธีการผลิตเยื่อเชิงกลเมื่อนำมาผ่านการทำ pretreatment ด้วย crude เอนไซม์ซึ่งผลิตจากเชื้อรา white rot fungi 2 สายพันธุ์คือ TNLP 193 และ TNLP 293 ซึ่งให้ค่า specific activity ของเอนไซม์ ligninase เท่ากับ 5.0 อัตราส่วนของการใช้เอนไซม์ต่อเยื่อเท่ากับ 2:1 (V/W) โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 30 °C สภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 4.0 ซึ่งเอนไซม์ ligninase ทำงานได้ดีในภาวะเป็นกรด (Skerker และคณะ, 1991) ใช้ระยะเวลาในการฟอกเยื่อนาน 16 ชั่วโมง พบว่าค่าความขาวสว่างของเยื่อเพิ่มขึ้นจาก 47% เป็น 50% และเมื่อนำเยื่อมาฟอกต่อด้วยเอนไซม์ xylanase ค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้นเป็น 54% Ruel และคณะ(1990) ได้รายงานว่าการนำเอนไซม์ ligninase และ laccase มาใช้ในขั้นตอนของการ pretreatment จะมีข้อดีมากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้สารเคมี ทั้งนี้เพราะว่าเอนไซม์จะมีบริเวณที่ทำงานค่อนข้างจำเพาะเจาะจงมากกว่า เช่น เอนไซม์ ligninase และ laccase จะเข้าทำลายโครงสร้างของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสที่บริเวณผนังเซลล์ได้ดี ทั้งลิกนินและเฮมิเซลลูโลสจะขัดขวางการเข้าทำลายของสารเคมี

Setliff และคณะ (1990) นำเชื้อรา *Poria subvermipora* L-6332 และ *P. chrysosporium* ME-461 ซึ่งเลี้ยงบน malt agar ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเจริญอยู่มาผสมคลุกเคล้ากับเยื่อไม้สน (*Populus tremuloides* Michx) และเยื่อยูคาลิปตัส (*Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden) ใส่ในขวดโหล ปรับให้เยื่อมีความชื้น 70%-80% จากนั้นนำชิ้นวุ้น 32 ชิ้นต่อเยื่อ 50 กรัม (น้ำหนักแห้ง) นำไปบ่มไว้ในที่มืด โหลที่บ่มด้วยเชื้อรา *P. subvermispora* บ่มที่อุณภูมิ 30 °C ส่วนเชื้อรา *P. chrysoporium* บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C และมีการนำเยื่อออกมาผสมคลุกเคล้าทุกๆ 4-5 วัน เพื่อให้เส้นใยของเชื้อราสัมผัสกับเยื่อได้ทั่วถึงกันหลังจากใช้เวลาในการบ่มนาน 30 วัน พบว่าปริมาณลิกนินในเยื่อไม้สนลดลง 16% ส่วนในไม้ยูคาลิปตัสปริมาณลิกนินในเยื่อลดลงเท่ากับ 10% และเมื่อนำเยื่อมาทำการฟอกต่อด้วย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3% ทำให้ค่าความขาวสว่างเพิ่มจาก 44.8% เป็น 72.6% ช่วยประหยัดพลังงานลงได้ 20% เมื่อเทียบกับกระบวนการผลิตด้วยวิธีเชิงกล

เชื้อรา *Trametes versicolor* PPRIC 52 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย D-glucose 8 กรัม และ soytone 1 กรัม ปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อเยื่อไม้สน 10 กรัม (น้ำหนักแห้ง) เป็นเวลา 5 วัน นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °C หลังจากใช้เวลาในการฟอกเยื่อนาน 14 วัน พบว่าค่าคัมป่านัมเบอร์ลดลงจาก 30 เหลือ 16 ส่วนค่าความสว่างเพิ่มจาก 32% เป็น 37% เมื่อนำเยื่อมาฟอกต่อด้วย 1โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 75 °C นาน 1 ชั่วโมง

โดยปรับให้เยื่อมีความข้นเท่ากับ 1% ทำให้ค่าคัมปานัมเบอร์ลดลงเหลือเพียง 6.3 ส่วนค่าความขาวสว่างเพิ่มเป็น 47% ซึ่งเชื้อรา *T. versicolor* สามารถลดปริมาณลิกนินในเยื่อลงได้ถึง 2 ใน 3 ส่วน นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มความสามารถในการฟอกให้กับกระบวนการทางเคมีในขั้นตอนถัดต่อมาให้ง่ายขึ้นอีกด้วย โดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายของเส้นใยเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญในเยื่อกระดาษ (Reid และคณะ,1990)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย