บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสจากก้านเครือกล้วย

การคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้นั้นสามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยม คือ การคัดแยกบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นเพียงเซลลูโลสเท่านั้น เนื่องจากเชื้อรามีความต้องการแหล่งคาร์บอนในการสร้างพลังงานในการเจริญเติบโต ดังนั้นถ้าเชื้อราสามารถเจริญบนแหล่งคาร์บอนที่เป็นเซลลลูโลสได้แสดงว่ามีการผลิตเอนไซม์ ซึ่งก็คือ เซลลูเลสมาย่อยเซลลูโลสให้เป็นกลูโคสเพื่อใช้เป็นพลังงานในการเจริญเติบโตได้ สูตรอาหารที่นิยมใช้แยกเชื้อราด้วยวิธีนี้ ได้แก่ Czapex 's dox medium (Mandel and Sternberg, 1976) ซึ่งใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 เป็นแหล่งคาร์บอน ถ้าเชื้อราที่คัดแยกสามารถผลิตเซลลูเลสได้จะเจริญอยู่บนกระดาษกรองทำให้สามารถนำเชื้อราแยกให้บริสุทธิ์และตรวจสอบในขั้นต่อไปได้ ข้อดีของวิธีนี้คือ สารเคมีเตรียมง่ายและคัดแยกเชื้อราได้ง่ายแต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเชื้อราที่คัดแยกมานั้นตัวใดมีการผลิตเซลลูเลสดีกว่ากัน และเชื้อรา บางชนิดที่ไม่มีการผลิตเซลลูเลสก็สามารถเจริญบนกระดาษกรองได้เนื่องจากอาศัยสารอาหารบางอย่างและความชื้น ดังนั้นจึงต้องนำไปตรวจสอบในขั้นต่อไปโดยการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร CMC agar (Hankin and Anagnostakis ,1977) เชื้อราที่มี การผลิตเซลลูเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์จะทำปฏิกิริยากับ Carboxymethylcellulose ที่เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร เมื่อย้อมด้วยสี Congo red 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 10 นาที เทสีทิ้งและล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ และดูวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น (Suyama *et al.*, 1993) เชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสจะสังเกตเห็นได้โดยดูวงใสที่เกิดขึ้น เมื่อนำขนาดของวงใสมาเปรียบเทียบกับขนาดของโคโลนี ถ้ามีอัตราส่วนมากกว่า 1.0 มาก แสดงว่าเชื้อรามีการผลิตเซลลูเลสมาก เนื่องจากแม้มีการเจริญน้อยแต่สามารถหลั่งเซลลูเลสออกมานอกเซลล์ได้ดี ในทางกลับกันถ้าอัตราส่วนที่ได้มีค่าเข้าใกล้ 1.0 ย่อมแสดงว่ามีการผลิตเซลลูเลสน้อยเพราะขนาดของวงใสมีค่าใกล้เคียงกับขนาดของโคโลนี วิธีการตรวจสอบการเกิดวงใสมีผู้นำไปใช้อย่างกว้างขวาง เช่น Yamanobe และคณะ (1987) ทำการคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสจากดิน ศิริพงษ์ เปรมจิต (2534) และ Punnapayak และคณะ (1999) ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลสจากดินบริเวณที่ปลูกป่านศรนารายณ์ เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังให้ผลการทดลองที่ไม่ชัดเจนนัก เนื่องจาก เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ประกอบไปด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม ทำงานร่วมกัน คือ เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส (Xiemenes *et al.*,1996, Wike *et al.*,1983 และ Domingues *et al.*, 2000) ดังนั้นการเกิดวงใสบนอาหาร CMC agar จึงบอก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไม่ได้ว่ามีเซลลูเลสในแต่ละกลุ่มในสัดส่วนและปริมาณเท่าใด ดังนั้นจึงต้องนำไปทดสอบต่อไป โดยการนำเชื้อราไปผลิตเซลลูเลสในอาหารเหลวที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ เช่น Production medium (Punnapayak *et al.*,1999) และนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาวัดค่าแอคติวิตีของเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม จึงจะสามารถบอกได้ว่าเชื้อราที่คัดแยกได้มีการผลิตเซลลูเลสแต่ละชนิดในสัดส่วนเท่าไร

ในการทดลองนี้เมื่อใช้อาหาร Czapex 's dox medium (Mandel and Sternberg, 1976) สามารถคัดแยกเชื้อราที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จำนวน 2 สายพันธุ์เมื่อนำมาทดสอบบนอาหาร CMC agar (Hankin and Anagnostakis ,1977) มีเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสโดยดูจากการเกิดวงใสได้ 7 สายพันธุ์ และเมื่อนำมาผลิตเซลลูเลสในอาหารสูตร Production medium (Punnapayak *et al.*,1999) ทำการเก็บเอนไซม์และวัดค่าแอคติวิตี สามารถคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสโดยเฉพาะเอนโดกลูคาเนสและไซแลนเนสได้ดี คือ

สายพันธุ์ B305 เนื่องจากให้แอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนส และเอนโดกลูคาเนสในปริมาณมากเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ B301.1

สายพันธุ์ BII เนื่องจากให้แอคติวิตีเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม คือ เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส และมีปริมาณของไซแลนเนสในปริมาณที่มากเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ B401 และ 401

สายพันธุ์ B451 เนื่องจากให้แอคติวิตีเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม คือ เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส และมีปริมาณของไซแลนเนสในปริมาณที่มากเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ B452

5.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่ใช้ในงานวิจัย

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่ใช้ในงานวิจัยเพื่อใช้ในการจัดจำแนกเชื้อรานั้นมีหลายวิธี เช่น การดูลักษณะของการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารชนิดต่างๆ ลักษณะโคโลนี โครงสร้าง ชนิด และสีของสปอร์ เป็นต้น ซึ่งได้มีผู้ศึกษาและรวบรวมลักษณะของเชื้อราในแต่ละชนิดเพื่อเป็นแบบมาตรฐานไว้เปรียบเทียบและจัดจำแนก เช่น Barnett (1967) และ Kitch และ Pitt (1988) เป็นต้น

ในการทดลองนี้ใช้หลักการจำแนกเชื้อราตามวิธีของ Barnett (1967) และจำแนกเชื้อรา *Aspergillus* ในระดับชนิด ตามวิธีของ Kitch และ Pitt (1988) ทำให้สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา B305 BII และ 451 ได้ดังนี้ คือ สายพันธุ์ B305 ได้แก่ เชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ BII ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ B451ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus terreus*

5.3 การผลิตเซลลูเลส

5.3.1 การศึกษาองค์ประกอบของแหล่งเซลลูโลส

ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวล ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้าของพืชชนิดต่างๆ สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการคัดเลือกวัสดุทางการเกษตรเพื่อเป็นแหล่งเซลลูโลสในการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราได้ โดยปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลของพืชแต่ละชนิดอาจมีค่าที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชสภาพแวดล้อม อายุของพืช เป็นต้น ในการทดลองนี้ค่าองค์ประกอบของชีวมวลของพืชที่ได้มีความแตกต่างกัน พบว่าก้านใบกล้วยและก้านเครือกล้วยมีปริมาณเซลลูโลสมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ คือเท่ากับ 39.3165 และ 39.2959 กรัมต่อน้ำหนักแห้งตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ ใบอ้อย และซังข้าวโพด คือ 33.1489 และ 33.1267 กรัมต่อน้ำหนักแห้งตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาองค์ประกอบอื่นๆ ของก้านใบกล้วย ก้านเครือกล้วย ใบอ้อย และซังข้าวโพด พบว่าก้านใบกล้วยมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสน้อยที่สุด ในขณะที่ลิกนินและเถ้ามีปริมาณใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงได้คัดเลือกก้านใบกล้วยเป็นแหล่งเซลลูโลสเพื่อใช้ในการผลิตเซลลูเลสในการทดลองต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงายการทดลองของ วารุณี พานิชผล และ วลัยกานต์ เจียมเจตจรูญ (2541) Fermor (1993) และ Aiello และคณะ (1996) คือ ในองค์ประกอบของชีวมวลของพืช จะมีปริมาณของเซลลูโลสมากที่สุด ประมาณ 30 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือเฮมิเซลลูโลส ประมาณ 25 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อน้ำหนักแห้ง และลิกนินมีปริมาณน้อยที่สุด คือ 5 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อน้ำหนักแห้ง

5.3.2 การศึกษาผลแหล่งเซลลูโลสชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเซลลูเลส

ในการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อรานั้นวัสดุที่ใช้เป็นแหล่งเซลลูโลสนั้นมีความสำคัญมากเพราะเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญที่เชื้อราจะนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต ในการทดลองนี้เมื่อใช้ *T. reesei* ทำการผลิตเซลลูเลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ก้านใบกล้วย ก้านเครือกล้วย ซังข้าวโพด และใบอ้อย พบว่า ก้านใบกล้วยให้ค่าการผลิตเซลลูเลสดีที่สุด สอดคล้องกับค่าชีวมวลของก้านใบกล้วยเพราะมีปริมาณเซลลูโลสมากที่สุดแต่มีเฮมิเซลลูโลสน้อยที่สุด และอาจเกิดเนื่องมาจากแร่ธาตุบางชนิดที่มีอยู่ในก้านใบกล้วย เช่น N P_2O_5 K_2O CaO หรือ MgO (Simmons, 1959) ช่วยเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อราและการผลิตเซลลูเลสดีขึ้น นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง ดังนั้นการใช้วัสดุที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบมากแต่มีส่วนของเฮมิเซลลูโลสน้อยย่อมน่าจะทำให้มีการผลิตเซลลูเลสได้มาก

5.3.3 การปรับสภาพแหล่งเซลลูโลสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตเซลลูเลส

ในการนำวัสดุทางการเกษตรมาเป็นแหล่งเซลลูโลสนั้น เนื่องจากวัสดุทางการเกษตรไม่ได้มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบเพียงอย่างเดียว แต่จะประกอบไปด้วยองค์ประกอบอื่นๆ อีกมาก เช่น เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า เป็นต้น ดังนั้นในการนำมาเป็นแหล่งเซลลูโลสเพื่อทำการผลิตเซลลูเลสนั้นการกำจัดองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกเพื่อเป็นการลดปัญหาเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการที่จะเกิดขึ้นระหว่างการผลิต เช่น ถ้ามีเฮมิเซลลูโลสอยู่มาก จะทำให้เกิดไซโลสและเกิดเป็นสารพิษ เช่น ฟูเฟอรัล ได้ การกำจัดสารประกอบที่ไม่ต้องการซึ่งทำได้โดยการนำวัสดุนั้นๆ มาปรับสภาพ ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้กรด เช่น HNO_3 (Dahot and Noomrio, 1996) หรือด่าง เช่น $Ca(OH)_2$ (Chang *et al.*, 1998) เนื่องจากกรดและด่างเหล่านี้จะไปย่อยสลายส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างลิกโนเซลลูโลส

การผลิตเซลลูเลสมักมีต้นทุนสูงเนื่องจากมักใช้เซลลูโลสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น แอลฟา-เซลลูโลส Avicell และ Microcrystalline cellulose เป็นต้น ดังนั้นถ้ามีการหาวัสดุทดแทน เช่น ก้านใบกล้วยซึ่งมีเซลลุโลสเป็นองค์ประกอบสูงถึง 39.3165 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งจะช่วยในการลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ลงได้มาก และยังเป็นการช่วยในการกำจัดขยะที่เกิดขึ้นจากการเกษตรด้วย

จากผลการทดลองใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น ต่างๆ คือ 5 10 15 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร มาปรับสภาพแหล่งก้านกล้วย เนื่องจากมีรายงานว่าสารละลายจำพวกด่างสามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้ดี โดยเฉพาะ alkali lignin ซึ่งละลายได้ดีในด่าง (Bungay, 1981) พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มากขึ้นจะทำให้น้ำหนักแห้งของก้านใบกล้วยคงเหลือหลังการปรับสภาพลดลง

เมื่อนำก้านกล้วยที่ถูกปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาเป็นแหล่งเซลลูโลสเพื่อผลิตเซลลูเลสโดยเฉพาะในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส พบว่าเชื้อราแต่ละชนิด ได้แก่ *Acrophialophora* sp. *T. reesei Penicillium* sp. *A. flavus* และ *A. terreus* มีการใช้เซลลูโลสที่ถูกปรับสภาพในการผลิตเซลลูเลสโดยเฉพาะเอนโดกลูคาเนสที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา เช่น *T. reesei* เป็นเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีองค์ประกอบของเอกโซกลูคาเนสและไซแลนเนสมาก (Wike *et al.*,1983) ดังนั้นการปรับสภาพแหล่งเซลลูโลสจึงอาจไม่มีผลต่อการผลิตเซลลูเลสมากนัก เนื่องจากเอกโซกลูคาเนสมีส่วนสำคัญในการย่อยสลายบริเวณที่เป็น crystalline ของสายเซลลูโลส (Ghose, 1987) ในขณะที่ *A. flavus* และ *A. terreus* เป็นเชื้อราที่มีองค์ประกอบของเอกโซกลูคาเนสน้อย ดังนั้นการปรับสภาพวัสดุทางการเกษตรเล็กน้อยจึงเป็นการช่วยใช้เชื้อราใช้แหล่งเซลลูโลสนั้นๆ และผลิตเซลลูเลสได้ดีขึ้นเนื่องจากการปรับสภาพจะช่วยลด

ส่วนที่เป็น crystalline และช่วยปรับสภาพบริเวรดังกล่าวทำให้เอนไซม์จากเชื้อราเข้าทำปฏิกิริยาได้งายขึ้น

5.3.4 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน

เนื่องจากจุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 8 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งเซลล์ (อรพิน ภูมิภมร,2526 และ สมใจ ศิริโภค,2544) ดังนั้นจุลินทรีย์แต่ละชนิดจึงมีความต้องการไนโตรเจนแตกต่างกันไป บางชนิดเจริญได้ดีในอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น ยูเรีย เปปโตน และบางชนิดเจริญได้ดีในอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมฟอสเฟต เป็นต้น ในการทดลองนี้ ทำการแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมฟอสเฟต ยูเรีย และ เปปโตน ต่อการผลิตเซลลูเลสโดยเฉพาะเอนโดกลูคาเนสจากเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนในองค์ประกอบของสารเคมีมีผลต่อการผลิตเซลลูเลสโดยเฉพาะเอนโดกลูคาเนสจากเชื้อราแต่ละชนิด ในการทดลองนี้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสโดยเฉพาะเอนโดกลูคาเนสคือแอมโมเนียมไนเตรท เนื่องจากถ้าใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อ NH_4^+ ถูกใช้หมดไป จะเกิด SO_4^{-2} ขึ้นทำให้เกิดภาวะเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรดและด่างของอาหารจึงลดลง แต่ถ้าเป็นแอมโมเนียมไนเตรท เมื่อ NH_4^+ ถูกใช้หมดไปจะเกิดภาวะเป็นกรดในช่วงแรก และเมื่อจุลินทรีย์ใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้ค่าความเป็นกรดและด่างเพิ่มขึ้น (สมใจ ศิริโภค,2544) โดยค่าความเป็นกรดและด่างนี้มีผลต่อความเสถียรของเซลลูเลส เพราะเซลลูเลสมักไม่ค่อยเสถียรและมีค่าแอคติวิตีต่ำในสารละลายที่มีความเป็นกรดมาก (Grajek, 1987 และ Castellanos *et al.*, 1995) นอกจากนี้ปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ใช้อาจมีผลต่อการผลิตเซลลูเลส คือถ้ามีการให้ไนโตรเจนมากเกินไปอาจเกิดกระบวนการยับยั้งเนื่องจากมีปริมาณไนโตรเจนสูง (Malhotra *et al.*, 2000) เช่น ในการทดลองนี้ใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลการผลิตเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่มและไซแลนเนสในปริมาณที่ต่ำ อาจเป็นเพราะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ในเนื้อสารในปริมาณมากคือ 46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ แอมโมเนียมไนเตรท (ปริมาณไนโตรเจนในองค์ประกอบ 35 เปอร์เซ็นต์) แอมโมเนียมซัลเฟต (ปริมาณไนโตรเจนในองค์ประกอบ 21 เปอร์เซ็นต์) และ แอมโมเนียมฟอสเฟต (ปริมาณไนโตรเจนในองค์ประกอบ 21 เปอร์เซ็นต์)

5.3.5 แหล่งอาหารเสริม

การใช้แหล่งอาหารเสริมได้แก่ถั่วเหลืองและเคซีน เสริมลงไปเพื่อชักนำให้มีการผลิตเซลลูเลสพบว่า ไม่มีผลต่อการผลิตเซลลูเลสโดยเฉพาะเอนโดกลูคาเนสมากนัก เนื่องจากใส่ในปริมาณที่น้อยมาก และแหล่งอาหารเสริมที่ใช้มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งเชื้อราได้รับเพียงพออยู่แล้วในสูตรอาหารหลักที่ใช้ แต่อาจมีส่วนช่วยเสริมเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตให้ดี

ยิ่งขึ้น โดยเฉพาะการใช้ถั่วเหลืองซึ่งเป็นสารอินทรีย์ ทำให้เชื้อราสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย แต่ถ้าใส่มากเกินไปอาจทำให้การผลิตเซลลูเลสลดลง เนื่องจากสารอาหารบางชนิดในถั่วเหลืองมีผลต่อการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อรา

5.3.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเซลลูเลส

เชื้อราถ้าแบ่งตามการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ เชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophilic fungi) สามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิ 40 ถึง 45 องศาเซลเซียสหรือมากกว่า เชื้อราที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic fungi) สามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิ 25 ถึง 37 องศาเซลเซียส และ เชื้อราที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic fungi) สามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ในการทดลองนี้พบว่าเชื้อราทุกสายพันธุ์เจริญดีที่สุดและผลิตเซลลูเลสดีที่สุดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีเพียง *Acrophialophora* sp. และ *A. flavus* ที่สามารถเจริญและผลิตเซลลูเลสได้ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ *A. terreus* ที่สามารถเจริญและผลิตเซลลูเลสได้ 45 องศาเซลเซียส แต่จะมีค่าแอคติวิตีของเซลลูเลสน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับรายงานการทดลองหลายการทดลอง เช่น Xiao-Bin และคณะ (1998) ผลิตเซลลูเลสจาก *T. reesei* Rut C30 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส Jorgensen และคณะ (2003) ผลิตเซลลูเลสจาก *Penicillium brasilianum* IBT 20888 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส Punnapayak และคณะ (1999) ผลิตเซลลูเลสจาก *Acrophialophora* sp. พบว่าสามารถผลิตเซลลูเลสได้ที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส Prasertsan และ Oi (1992) ผลิตเซลลูเลสจากเชื้อรา *A. niger* ATTC 6275 โดยใช้ภาวะการผลิตแบบ solid state พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนโดกลูคาเนส (CMCase) คือ 30 องศาเซลเซียส และ Bastawde (1992) ผลิตเซลลูเลส (เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส) จากเชื้อรา *A. terreus* ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

5.3.7 การศึกษาการขยายขนาดส่วนของการผลิตเอนไซม์

การขยายปริมาตรของการผลิตเอนไซม์เป็นกระบวนการเพื่อทดสอบดูว่าภาวะที่ใช้ในการผลิตในปริมาตรน้อยๆในห้องปฏิบัติการมีแนวโน้มที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในปริมาณมากๆ เช่นในระดับอุตสาหกรรมหรือไม่ ซึ่งจากการทดลองพบว่าภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตเซลลูเลสโดยเฉพาะ เอนโดกลูคาเนสจากเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ มีแนวโน้มที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้เนื่องจากมีแนวโน้มที่ให้ค่าแอคติวิตีของเซลลูเลสเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากเมื่อใช้ภาชนะที่ใหญ่ขึ้นในการผลิตเอนไซม์จะทำให้เพิ่มพื้นผิวสัมผัสของอาหารกับอากาศทำให้อากาศละลายสู่อาหารได้ดีกว่าในภาชนะที่เล็กกว่า โดยเฉพาะการผลิต

ในถังหมักซึ่งสามารถควบคุมภาวะต่างๆ ในการผลิตได้ เช่น อัตราเร็วในการกวน การให้อากาศ และการควบคุมค่าความเป็นกรดและด่าง เป็นต้น เช่น Vlaev และคณะ (1997) ใช้ *Trichoderma* sp. ผลิตเซลลูเลสโดยใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตร และ Dijkerman และคณะ (1996) ผลิตเซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อราโดยใช้ถังหมักขนาด 10 ลิตร เป็นต้น

5.4 การศึกษาสมบัติบางประการของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

5.4.1 การศึกษาค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมและค่าความเสถียรของค่าแอคติวิตีของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

ค่าความเป็นกรดและด่างมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากมีผลต่อการแตกตัวของกรดอะมิโนบริเวณเร่ง (Active site) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดและด่างในการทำปฏิกิริยาอาจทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง ซึ่งเมื่อวาดกราฟระหว่างค่าความเป็นกรดและด่างกับอัตราเร็วในการทำปฏิกิริยามักได้กราฟรูปโค้งระฆังคว่ำ (Bell-shaped curve) ซึ่งจะมีจุดที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยาดีที่สุด แต่ถ้าอยู่ในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดและด่างที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้เนื่องจากโครงสร้างตติยภูมิถูกทำลายไป (พัชรา วีระกะลัส, 2543) สำหรับการทดลองนี้เอนโดกลูคาเนสจากเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ทำงานได้ดีที่สุดและมีความเสถียรที่ภาวะค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยังสามารถคงค่าแอคติวิตีได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจลดลงได้ถ้าเวลาผ่านไปมากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยหลายๆ งานคือ Coral และคณะ (2002) ศึกษาการทำงานของเอนโดกลูคาเนส (Crude carboxymethyl cellulase) จาก *A. niger* Z10 พบว่ามีค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5 ถึง 7.5 Castellanos และคณะ (1995) ศึกษาการทำงานของเซลลูเลส (FPase) จาก *Penicillium* sp. พบว่ามีค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5 ถึง 5.0 และเมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมงค่าแอคติวิตียังคงไม่เปลี่ยนแปลง Busto และคณะ (1996) ศึกษาการทำงานของเซลลูเลส (CMCase) จาก *Trichoderma reesei* พบว่ามีค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5 ถึง 5-5 และค่าแอคติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อค่าความเป็นกรดและด่างมากกว่า 5.5 และ Gomes และคณะ (2000)ศึกษาการทำงานของเอนโดกลูคาเนสและเบตา-กลูโคซิเดสจาก *Thermoascus aurantiacus* พบว่ามีค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5 และ 5.0 ตามลำดับ

5.4.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนสและความเสถียรของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส ณ ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เวลาต่างๆ

การเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ คือเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้การทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้ดีนั้นมีข้อจำกัด เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนถ้าเพิ่มอุณหภูมิขึ้นในช่วงแรกการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจนถึงจุดๆ หนึ่งการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเนื่องจากเอนไซม์เสียสภาพเพราะความร้อน (พัชรา วีระกะลัส, 2543) ดังนั้นการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและค่าความเสถียรของเอนไซม์จึงมีความสำคัญ ในการทดลองนี้พบว่าเอนโดกลูคาเนสจากเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แต่ มีความเสถียรของเอนไซม์แตกต่างกัน คือ *T. reesei* และ *A. terreus* สามารถคงความเสถียรของเอนไซม์ได้มากที่สุด คือ เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที มีค่าแอคติวิตีจำเพาะคงเหลือเท่ากับ 1.820 และ 0.902 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 79.55 และ 74.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ *Acrophialophora* sp. *Penicillium* sp. และ *A. flavus* คงความเสถียรของเอนไซม์ได้น้อยกว่า โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 90 นาที สามารถคงความเสถียรได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.522 0.278 และ 0.337 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ สอดคล้องกับการวิจัยหลายๆ งาน เช่น Freire และคณะ (1999) ศึกษาช่วงอุณหภูมิต่างๆ ต่อความเสถียรของเอนโดกลูคาเนสจาก *Curvularia pallescens* พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรมากที่สุดที่อุณหภูมิ 45 ถึง 60 องศาเซลเซียส Kvesitadze และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ พบว่ามีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาต่อเอนโดกลูคาเนส คือ 50 ถึง 70 องศาเซลเซียส George และคณะ (2001) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาต่อเอนโดกลูคาเนสจากแอคติโนมัยซีสทนร้อน *Thermomonospora* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และสามารถคงค่าความเสถียรได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ใน 72 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 และ 70 องศาเซลเซียส ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ลดลงเหลือ 6 และ 3 ชั่วโมงตามลำดับ และ เปลี่ยนแปลง Busto และคณะ (1996) ศึกษาการทำงานของเซลลูเลส (CMCase) จาก *Trichoderma reesei* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 50 ถึง 70 องศาเซลเซียส โดยมากที่สุดที่ 60 องศาเซลเซียส ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 และ 60 องศาเซลเซียส เท่ากับ 9.4 และ 4.3 ชั่วโมงตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.5 การศึกษาจลนศาสตร์ของเซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส

การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์มีความสำคัญคือจะเป็นสิ่งที่ช่วยบอกได้ว่าปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา ตัวยับยั้ง และตัวกระตุ้น มีผลต่ออัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อย่างไร ซึ่งอาจทำให้นำไปประมาณค่าและทิศทางการเกิดปฏิกิริยาของการเกิดปฏิกิริยาได้ สำหรับการทดลองนี้เมื่อศึกษาจลนศาสตร์ของเอนโดกลูคาเนสจากเชื้อราทั้ง 5 ชนิด พบว่าความเข้มข้นของค่าแอคติวิตีของเอนโดกลูคาเนสมีผลต่อการทำงานของเซลลูเลส คือ ถ้ามีความเข้มข้นของเอนไซม์มากจะทำให้ค่าความเร็วของการเกิดปฏิกิริยา (V_{max}) มากตามไปด้วย เนื่องจากความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ สอดคล้องกับงานวิจัยหลายงาน เช่น วันทนา พินัยกุล (2544) ศึกษาค่าจลนศาสตร์ของอะไมเลสโดยใช้ความเข้มข้นต่างๆ คือ 125 250 และ 500 ยูนิต พบว่าเมื่อใช้อะไมเลส 500 ยูนิต จะมีค่าความเร็วของการเกิดปฏิกิริยามากที่สุด สำหรับความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (K_m) นั้นในการทดลองนี้ใช้ Carboxymethylcellulose เนื่องจากมีความเหมาะสมต่อเอนโดกลูคาเนสสูง (Tolan and Foody, 1999) และพบว่าเอนโดกลูคาเนสจากเชื้อราแต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อสารตั้งต้นที่เป็น Carboxymethylcellulose แตกต่างกัน ถ้าค่า K_m ยิ่งน้อยแสดงว่ามีความเหมาะสมต่อสารตั้งต้นมาก ทั้งนี้ค่าอาจแตกต่างกันไป K_m เนื่องมาจากความแตกต่างของชนิดของเชื้อราและค่าแอคติวิตีที่ใช้ เช่น Busto และคณะ (1996) ทำการผลิตเซลลูเลสจาก *T. reesei* พบว่ามีค่า K_m เท่ากับ 1.32 เปอร์เซ็นต์กรัม CMC ต่อปริมาตร และ V_{max} เท่ากับ 405.5 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง และ Castellanos และคณะ (1995) ศึกษาการทำงานของเซลลูเลส (FPase) จาก *Penicillium* sp. พบว่ามีค่า K_m เท่ากับ 50 กรัม Microcrystaline cellulose (MCC) ต่อลิตร และ V_{max} เท่ากับ 330 ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัมโปรตีน

5.6 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน

จากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนกับแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตให้สูงขึ้นในระดับหนึ่งจะทำให้เอนโดกลูคาเนสตกตะกอนมากขึ้น จากการทดลองความเข้มข้นของแอมโมเนียมที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนเอนโดกลูคาเนสจากเชื้อราทั้ง 5 ชนิด อยู่ในช่วง 40 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร คือ *Trichoderma reesei* ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 40 เปอร์เซ็นต์ *Acrophialophora* sp. และ *A. terreus* ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 50 เปอร์เซ็นต์ *Penicillium* sp. และ *A. flavus* ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 60 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการทดลองของ Xiao-Bin และคณะ (1999) ที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อปริมาตร ในการตกตะกอนเซลลูเลสจาก *T. reesei* Rut C30 เป็นต้น แต่การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตตกตะกอนเอนไซม์ก็มีข้อเสีย คือ จะทำให้โปรตีนอื่นๆ ที่

ไม่ใช่เอนไซม์ หรือเอนไซม์ที่ไม่ต้องการตกตะกอนปนมาด้วย เช่น ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 50 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์สามารถตกตะกอนไซแลนเนสได้ (Takagaki *et al.*, 1990) ถ้าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีไซแลนเนสปนอยู่ก็จะทำให้ได้ไซแลนเนสปนออกมาด้วย ดังนั้นถ้าต้องการทำให้เอนไซม์ที่ต้องการมีความบริสุทธิ์ไม่มีโปรตีนอื่นเจือปนควรจะนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม เช่น ใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตรกราฟี เป็นต้น

5.7 การศึกษาน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในก้านใบกล้วย

ในระหว่างการนำก้านใบกล้วยมาเป็นแหล่งเซลลูโลสสำหรับผลิตเซลลูเลส และเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายเซลลูโลส น้ำตาลชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบจะถูกปลดปล่อยออกมาซึ่งบางชนิดสามารถเป็นตัวกระตุ้นให้มีการผลิตเซลลูเลสเพิ่มขึ้นได้ เช่น Thirumale และคณะ (2001) ผลิตเซลลูเลสจาก *Clostridium papyrosolvens* CFR-703 พบว่าน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น เทฮาโลส แลคโตส เซลโลไบโอส ซอฟอโรส และมอลโทส เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการผลิต เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส ได้ดี Hrmova และคณะ (1989) ศึกษาการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นตัวกระตุ้นให้ผลิตเซลลูเลสจาก *A. terreus* พบว่าลามินาริไบโอส ซอฟอโรส เจนติโอไบโอส และเซลโลไบโอส เป็นตัวกระตุ้นที่ดีต่อการผลิตเอนโดกลูคาเนส และ ไซโลสและไซโลไบโอสเป็นตัวกระตุ้นที่ดีต่อการผลิตไซแลนเนส จากการทดลองนี้การใช้วิธีการตรวจสอบชนิดน้ำตาลจาก ก้านใบกล้วยยังไม่สามารถระบุชนิดของน้ำตาลได้แม่นยำเนื่องจากวิธีการที่ใช้ยังไม่เหมาะสมพอ หรือปฏิกิริยาการย่อยสลายก้านใบกล้วยให้เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ไม่สมบรูณ์ แต่อาจคาดการได้ว่าน่าจะประกอบไปด้วยกลูโคส ไซโลส เซลโลไบโอสและอะราบิโรส โดยดูจากค่า R_f และสีของน้ำตาลที่เกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Cordeiro และคณะ (2004) ซึ่งศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในต้นกล้วย *Musa acuminata* Colla พบว่าประกอบไปด้วยกลูโคส 74.0 เปอร์เซ็นต์ ไซโลส 13.1 เปอร์เซ็นต์ กาแลคโตส 2.5 เปอร์เซ็นต์ อะราบิโนส 9.1 เปอร์เซ็นต์ และแมนโนส 1.3 เปอร์เซ็นต์

5.8 การนำเซลลูเลสไปประยุกต์ในการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้าย

จากผลการทดลองเมื่อนำเอนไซม์ เช่น ไลเปส โปรตีเอส หรือเซลลูเลส ชนิดใดชนิดหนึ่งมากำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้าย พบว่าไม่สามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ดีขึ้น แต่เมื่อนำมาประยุกต์ร่วมกัน เช่น ไลเปสร่วมกับเซลลูเลส หรือโปรตีเอสร่วมกับเซลลูเลส จะทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ดีขึ้นเนื่องจากในองค์ประกอบของเส้นใยฝ้ายนอกเหนือจากเซลลูโลสแล้วจะประกอบไปด้วยองค์ประกอบอื่นๆ อีก เช่น ชั้น cuticle โปรตีน ไข และเพคติน เป็นต้น ถ้าใช้เซลลูเลสเพียงอย่างเดียวจะไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านชั้นดังกล่าวเข้าไปทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสได้ ดังนั้นถ้าใช้ไลเปสไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กำจัดส่วนที่เป็นไขออก หรือโปรตีเอสไปกำจัดชั้นโปรตีนออกจะทำให้เซลลูเลสทำงานได้ดีขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Jin และ Maekawa (2001) ศึกษากระบวนการเตรียมผ้าลินินและผ้า ramie โดยการใช้เอนไซม์ พบว่าถ้ามีการใช้เอนไซม์ผสมหลายชนิด เช่น เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส และ เพคติเนสจะสามารถกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าได้ดี และทำให้ผ้าขาวขึ้นกว่าการใช้เอนไซม์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง เนื่องจากผ้าดังกล่าวมีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลสน้อย แต่จะมีส่วนที่ไม่ใช่เซลลูโลสมาก เช่น เฮมิเซลลูโลส เพคติน ลิกนิน ไข และสี เป็นต้น

เมื่อเปรียบเทียบค่าความขาว ค่าความสว่าง และค่าความเหลืองพบว่าการใช้ไลเปสร่วมกับเซลลูเลสเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ผ้ามีค่าความขาวและค่าความสว่างเพิ่มขึ้น แต่ค่าที่ได้ยังน้อยกว่าการใช้เอนไซม์ทางการค้าและโซเดียมไฮดรอกไซด์ เนื่องจากการใช้สารเคมีจะเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงกว่าและโซเดียมไฮดรอกไซด์มีสมบัติในการฟอกขาวซึ่งจะช่วยให้ผ้าขาวขึ้น (Sarkar and Etters, 2001) นอกจากนี้เซลลูเลสที่ใช้อยู่ในรูปของสารละลายซึ่งมีสีเหลืองซึ่งอาจจะไปจับกับโมเลกุลของผ้าได้ อย่างไรก็ตามถึงแม้การใช้เอนไซม์ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้ายอาจมีประสิทธิภาพไม่เท่ากับการใช้สารเคมี แต่มีข้อดี คือ เอนไซม์ทำงานดีที่อุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส ทำให้ลดพลังงานที่ใช้เนื่องจากการใช้สารเคมีมักใช้อุณหภูมิ 80 ถึง 100 องศาเซลเซียสหรือมากกว่า น้ำเสียจากการใช้เอนไซม์ย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ เอนไซม์มีปฏิกิริยาที่จำเพาะและสามารถนำใช้ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆ เช่น อะไมเลส ได้ (Li and Hardin,1997) ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อลดปัญหามลภาวะในปัจจุบันได้อย่างมาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย