สำนักงานการ

สำนักหอสมุด

การเตรียมน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

Glucose production from cellulose by enzymatic treatment

นางสาวชุลีนารถ ฝั้นเครือ รหัส 55361601

นางสาวกัลยา ประมาณเมือง รหัส 55362608

ท 43963

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 27 ส.ค. 2561
เลขทะเบียน 1723627
เลขเรียกหนังสือ ปร
ชั้นวาก
2559

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีการศึกษา 2558

ใบรับรองปริญญานิพนธ์

ชื่อหัวข้อโครงงาน	การเตรียมน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลสด้วยเอนไซม์
ผู้ดำเนินโครงงาน	นางสาวชุลีนารถ ฝั้นเครือ รหัส 55361601
	นางสาวกัลยา ประมาณเมือง รหัส 55362608
ที่ปรึกษาโครงงาน	ผศ.ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
ภาควิชา	วิศวกรรมอุตสาหการ
ปีการศึกษา	2558

.....

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อนุมัติให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี

.....ที่ปรึกษาโครงงาน

(ผศ.ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์)

.....กรรมการ

(ดร.นพวรรณ โม้ทอง)

.....กรรมการ

(ดร.ปณัฐพงศ์ บุญนวล)

ชื่อหัวข้อโครงงาน	การเตรียมน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลสด้วยเอนไซม์
ผู้ดำเนินโครงงาน	นางสาวชุลีนารถ ฝั้นเครือ รหัส 55361601
	นางสาวกัลยา ประมาณเมือง รหัส 55362608
ที่ปรึกษาโครงงาน	ผศ.ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
ภาควิชา	วิศวกรรมอุตสาหการ
ปีการศึกษา	2558

.....

บทคัดย่อ

การทดลองนี้ศึกษาการเตรียมน้ำตาลรีดิวซ์และกลูโคสจากเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ โดยมีตัวแปรที่ศึกษา คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลายที่ 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส ค่า pH 4 5 และ 6 ปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลส เป็น 1:20 2:20 3:20 และ 4:20 มิลลิกรัมเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมเซลลูโลส โดยใช้เวลาการย่อยสลาย 48 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิและ pH ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสส่งผลต่อร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวม อุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเซลลูโลสคือ 50 องศาเซลเซียส และค่า pH 4 นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสส่งผลต่อร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมเช่นกัน ซึ่งจากการทดลองพบว่าปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสที่เหมาะสมคือ 3:20 จากการทดลองนี้สามารถเตรียมน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งได้ร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมสูงสุดเท่ากับ 66 นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากสภาวะการย่อยสลายที่ดีที่สุด พบว่า ได้ร้อยละผลได้น้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 51.6

Title	Glucose production from cellulose by enzymatic treatment and pressurized technique
Author	Chuleenart Fankrue ID. 55361601 Kanlaya Pramanmuang ID. 55362608
Advisor	Dr.Aussarawut Prasertsang
Academic Paper	Thesis Bachelor of Engineering Program in Chemical Engineering, Naresuan University, 2015

Abstract

In this study, reducing sugar and glucose were prepared by hydrolysis of cellulose using enzymatic treatment. The invested parameters are temperature in the ranges of 45 to 60°C, pH of 4 to 6, and enzyme to substrate ratio of 1:20 to 4:20, respectively. The result showed that the total reducing sugar (%TRS) was significantly affected by temperature and pH. The suitable temperature and pH of enzymatic treatment of cellulose are 50°C and pH 4, respectively. We also found that the enzyme to substrate ratio affects the amount of total reducing sugar. The optimum enzyme to substrate ratio is 3:20. In addition, the %yield of glucose content was measured to be 51.6.

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือของหลายฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผศ.ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ที่ให้คำปรึกษาและวิธีการแก้ปัญหา รวมถึงข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนความดูแลเอาใจใส่ ติดตามการดำเนินโครงงานมาโดยตลอด และขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาวิศวกรรมเคมี อาจารย์ประจำภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่าน ที่ได้ให้วิชาความรู้ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

คุณค่าของปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ศึกษาหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะก่อให้เกิดประโยชน์ทางวิชาการแก่บุคคลทั่วไป นิสิต นักศึกษา ที่สนใจค้นคว้าและเพิ่มพูนความรู้เกี่ยวกับการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

สุดท้ายนี้ ผู้ดำเนินโครงงานใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การดูแล อบรม สั่งสอน และให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา ตลอดการดำเนินโครงงานจนสำเร็จกรศึกษา

ผู้ดำเนินโครงงาน

นางสาวชุลีนารถ ฝั้นเครือ

นางสาวกัลยา ประมาณเมือง

สารบัญ

เรื่อง หน้า

ใบรับรองวิทยานิพนธ์.....ก

บทคัดย่อ.....ข

กิตติกรรมประกาศ.....ค

สารบัญ.....ง

สารบัญตาราง.....จ

สารบัญรูป.....ฉ

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ที่มาและความสำคัญ.....1

1.2 วัตถุประสงค์.....2

1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 เซลลูโลส.....3

2.2 การย่อยสลายเซลลูโลส.....5

2.3 น้ำตาลรีดิวซ์.....12

2.4 น้ำตาลกลูโคส.....13

2.5 การวัดน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยเทคนิค DNS (Dinitrosalicylic colorimetric method).....14

2.6 หลักการทดสอบน้ำตาลกลูโคส (Mutarotase-GOD method).....13

2.7 แนวคิดของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....15

บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....21

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....21

3.2 วิธีการทดลอง.....22

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....23

บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิเคราะห์.....26

4.1.1 ผลของอุณหภูมิการเกิดปฏิกิริยาที่มีต่อร้อยละผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์.....26

4.1.2 ผลของค่า pH ในปฏิกิริยาที่มีต่อร้อยละผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์.....27

4.1.3 ผลของปริมาณเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่มีต่อร้อยละผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์.....29

4.1.4 ผลการเตรียมน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยสลายเซลลูโลสจากสภาวะที่ดีที่สุด.....31

4.1.5 เปรียบเทียบน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลส.....32

บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....33

5.1 สรุปผลการทดลอง.....33

5.2 ข้อเสนอแนะ.....33

เอกสารอ้างอิง.....34

ภาคผนวก.....39

ภาคผนวก ก การตรวจวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย.....40

ภาคผนวก ข ผลความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าที่อุณหภูมิและ pH ต่างๆ.....41

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงจุดเด่นและจุดด้อยของกระบวนการปรับสภาพด้วยกรด.....6

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์.....23

ตารางภาคผนวก ข-1 ผลความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าที่อุณหภูมิต่างๆ.....41

ตารางภาคผนวก ข-2 ผลความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าที่ค่า pH ต่างๆ.....41

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชชั้นสูง....3
รูปที่ 2.2 เส้นใยเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชชั้นสูง....4
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเซลลูโลส....4
รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของน้ำตาลแล็กโทส....12
รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคส....13
รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาของวิธี Dinitrosalicylic colorimetric method (DNS)....14
รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย....22
รูปที่ 3.2 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์....24
รูปที่ 4.1 ผลของอุณหภูมิการเกิดปฏิกิริยาต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์....26
รูปที่ 4.2 ผลของค่า pH ในปฏิกิริยาต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์....27
รูปที่ 4.3 ผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ ในปฏิกิริยาต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์....29
รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ ในปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์....30
รูปที่ 4.5 ผลของการเตรียมกลูโคสจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์....31
รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลส....32
ภาคผนวก ก-1 กราฟมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในการทดลอง....40
ภาคผนวก ก-2 กราฟมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสในการทดลอง....40

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันโลกมีอัตราการใช้พลังงานเชื้อเพลิงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง หลายๆประเทศทั่วโลกจึงแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่เพื่อเป็นหลักประกันความมั่นคงด้านพลังงานในระยะยาวทั้งยังเป็นการลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากการใช้พลังงานที่ได้จากฟอสซิล เช่น น้ำมัน และถ่านหิน อันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน จากการที่ประเทศไทยมีความต้องการใช้พลังงานของประเทศที่มีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และแหล่งพลังงานในประเทศมีอัตราการผลิตได้ไม่เพียงพอกับอัตราการใช้ ประกอบกับราคาน้ำมันซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญในตลาดโลกมีราคาแพง จึงต้องเร่งรัดค้นคว้าหาแหล่งพลังงานทดแทนซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด [1]

การผลิตเอทานอลในประเทศไทยปัจจุบันมีวัตถุดิบจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ มันสำปะหลัง กากน้ำตาล เป็นต้น แม้ว่าการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จะยังผลิตจากแป้งและน้ำตาล แต่ปัจจุบันประเทศไทยกำลังให้ความสนใจการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส ซึ่งในอนาคตในต่างประเทศจะเน้นการผลิตด้วยเซลลูโลสเป็นหลัก เนื่องจากแป้งและน้ำตาลเป็นพืชอาหารอาจผลิตได้ไม่เพียงพอสำหรับการบริโภค จึงต้องใช้วัสดุอื่นทดแทน [1]

เซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสซึ่งต่อกันเป็นสายยาว ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายตัดเซลลูโลสออกเป็นแต่ละยูนิตจะได้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งน้ำตาลกลูโคสสามารถนำไปหมักด้วยยีสต์เพื่อผลิตเป็นแอลกอฮอล์ การย่อยสลายเซลลูโลสสามารถทำได้โดยกระบวนการกรดหรือเอนไซม์ โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยการเติมโมเลกุลของน้ำเป็นกระบวนการเพื่อสลายพันธะเคมี [1] การเตรียมกลูโคสจากเซลลูโลสโดยใช้เอนไซม์นั้นถือว่าเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูง อย่างไรก็ตามจากการสำรวจงานวิจัยพบว่ายังไม่มีรายงานการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ ที่มีต่อร้อยละผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์และกลูโคส ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ร่วมเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมน้ำตาลรีดิวซ์และกลูโคส โดยตัวแปรที่ทำการศึกษาคือ อุณหภูมิของปฏิกิริยา ค่า pH และอัตราส่วนปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลส เซลลูโลสที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดและน้ำตาลกลูโคสต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษากระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของสภาวะการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสคือ ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสต่อเซลลูโลส อุณหภูมิของปฏิกิริยา และค่า pH ที่มีต่อผลิตภัณฑ์น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคส

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 เตรียมเซลลูโลส 2 %โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีตัวแปรที่ศึกษา ดังนี้

1.3.1.1 ปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลส คือ 1:20 2:20 3:20 และ 4:20 มิลลิกรัมเอนไซม์/มิลลิกรัมเซลลูโลส

1.3.1.2 อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส

1.3.1.3 ค่า pH ในการเกิดปฏิกิริยา 4 5 และ 6

1.3.2 ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธี DNS method

1.3.3 ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากปฏิกิริยาย่อยสลายเซลลูโลสด้วยการใช้ชุดทดสอบกลูโคส (Mutarotase-GOD method)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

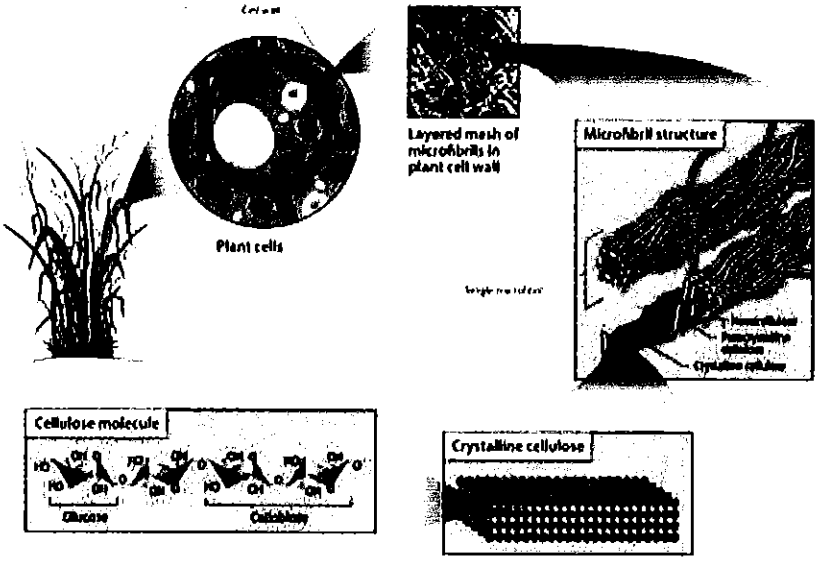
1.4.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมน้ำตาลรีดิวซ์กลูโคสจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

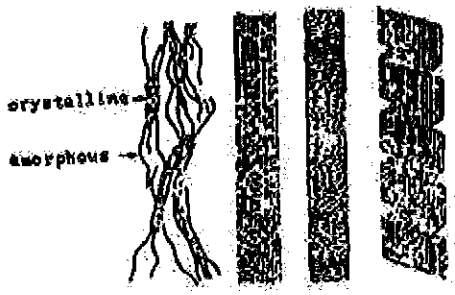
2.1 เซลลูโลส [3]

เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณ 45% ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่สะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ในพืชชั้นสูงทุกชนิด ซึ่งมีส่วนประกอบของเซลลูโลส มากกว่า 97-99% จัดว่าเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ ประกอบด้วย polymer chain เรียงขนานกันและยึดกันด้วย dispersion force และ hydrogen bond ภายในโมเลกุลเซลลูโลสจึงยึดติดกันแน่น ทำให้เซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ได้ช้า เซลลูโลสใน primary cell wall ประกอบด้วยกลูโคสยาวประมาณ 2,000 โมเลกุล และ ไม่ต่ำกว่า 14,000 โมเลกุลใน secondary cell wall โดยโมเลกุลของเซลลูโลสจะเกาะกันเป็นคู่ตามยาวและเรียงขนานกันเป็นกลุ่ม 40 คู่ เรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) เพื่อให้ความแข็งแรงกับผนังเซลล์ของพืช ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชชั้นสูง [4]

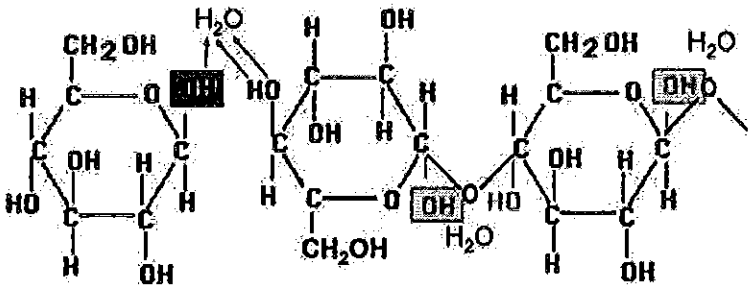
โครงสร้างของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชชั้นสูง มี 3 แบบ (ดังแสดงในรูปที่ 2.2) หมายเลข 1 คือ Fringe micelle ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) และส่วนที่เป็นอสัณฐาน (amorphous) หมายเลข 2 คือโครงสร้างของเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส และหมายเลข 3 คือโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นแบบริบบิ้นและม้วนเป็นเกลียว ซึ่งโครงสร้างที่แตกต่างกันทั้ง 3 แบบก่อให้เกิดช่องว่างระหว่างโมเลกุล ทำให้โมเลกุลไม่ต่อเนื่อง ในธรรมชาติจึงไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระ แต่มักรวมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลส เพนโตแซน กัม แทนนิน และ ไขมัน เป็นต้น



1 2 3

รูปที่ 2.2 เส้นใยเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชชั้นสูง [5]

ในด้านโครงสร้างทางเคมี เซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส (glucose) จำนวน 1,000-10,000 โมเลกุลต่อกันเป็นโพลิเมอร์ (polymer) เชื่อมกันด้วย β -1,4-glycosidic bond ระหว่าง alcoholic hydroxyl groups โดยโมเลกุลสายยาวของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส 2,000-15,000 โมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000-2,400,000 ดาลตัน (Dalton) การเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีแขนงย่อยมีสูตรเคมีทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เมื่อ n คือ จำนวนหน่วยกลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง (ดังแสดงในรูปที่ 2.3) [5]



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเซลลูโลส [6]

ชนิดของเซลลูโลสแบ่งตามความสามารถในการละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เป็น 3 ชนิด [7] คือแอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) คือเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% เบต้า-เซลลูโลส (β-cellulose) คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% ที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด และแกมม่า-เซลลูโลส (γ-cellulose) คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 17.5% และสารละลายกรด แต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์

2.2 การย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose hydrolysis) [3]

เซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นผลึกหรือเป็น linear homopolymer ของกลูโคสที่จับกันด้วย β-1,4-glucosidic linkage ซึ่งยากต่อการย่อยสลาย นอกจากนี้โดยธรรมชาติของเซลลูโลสจะมี lignin จับอยู่ ซึ่งเป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยาการย่อยสลายในปัจจุบันการย่อยสลายเซลลูโลสสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีการทางเคมีหรือการย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง (acid hydrolysis) เช่น กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งต้องทำภายใต้อุณหภูมิสูง วิธีนี้มีข้อจำกัด คือให้ปริมาณกลูโคสต่ำและเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการด้วย และวิธีการทางชีวภาพหรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) ที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์จะทำให้ปฏิกิริยาการย่อยเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง คือที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ความดันบรรยากาศ เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารประกอบเซลลูโลสมาก ทำให้ไม่สูญเสียกลูโคสระหว่างเกิดปฏิกิริยาและไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ

2.2.1 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกระบวนการใช้กรด

การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้กรด (Acid pretreatment) กระบวนการปรับสภาพโดยการใช้กรดนั้นมีจุดประสงค์ คือ เพื่อให้ได้น้ำตาลในปริมาณที่สูงจากวัสดุชีวมวล ชนิดของกรดที่นำมาปรับสภาพมีมากมายหลายประเภท ได้แก่ กรดซัลฟิวริก ไฮโดรคลอริก ไนตริก หรือ ฟอสฟอริก ในกระบวนการแปลงสภาพสามารถใช้ได้ทั้งกรดเข้มข้นและเจือจางเพื่อเพิ่มการทำงานของกระบวนไฮโดรไลซีส [8] ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบการใช้กรดเจือจางเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความสนใจศึกษากันมากและแพร่หลายที่สุด [9] การใช้กรดเจือจางเพื่อปรับสภาพวัสดุที่อุณหภูมิที่เหมาะสมโดยใช้กรดซัลฟิวริกหรือกรดฟอสฟอริกมักจะถูกใช้สำหรับการเปลี่ยนวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลที่ละลายได้ตามด้วยการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อให้เกิดเป็นกลูโคส [10] ในการใช้กรดเจือจางจะมีอยู่ 2 รูปแบบที่ใช้คือ ปริมาณสารตั้งต้นน้อย (ร้อยละ5-10 โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิสูง (T> 433 องศาเคลวิน) และปริมาณสารตั้งต้นมาก (ร้อยละ10-40 โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิต่ำ (T< 433 องศาเคลวิน)

โดยทั่วไปแล้วพบว่าเมื่อทำการปรับสภาพที่อุณหภูมิสูงและเวลาที่ใช้น้อยกว่าจะมีผลทำให้พบปริมาณไซโลสสูงและการทำงานของเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีกว่า ที่อุณหภูมิสูงการใช้กรดเจือจางพบว่ามีผลต่อการเพิ่มการย่อยเซลลูโลส ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นและความเข้มข้นที่ใช้ โดยส่วนใหญ่ร้อยละ 80 และ 95 ของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลสสามารถได้คืนมา โดยการใช้กรดเจือจางในการปรับสภาพจากการใช้วัสดุลิกโนเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้น นอกจากนั้นความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิที่ใช้เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดสารที่เป็นพิษ อุณหภูมิที่เหมาะสม (น้อยกว่า 160 องศาเซลเซียส) ได้มีการพิสูจน์ว่าเพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเฮมิเซลลูโลส ในอีกด้านหนึ่งเมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 160 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อเซลลูโลสมากกว่าซึ่งพบว่าจะมีการเกิดปริมาณน้ำตาลที่สูงและมีการสลายส่วนประกอบของลิกนิน [11] การทำงานของกรดเจือจางในการแปลงสภาพจะมีผลไปยังกระบวนการไฮโดรไลซิสขององค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสที่สามารถผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว การมีอยู่ของเซลลูโลสเพื่อให้เกิดการทำปฏิกิริยาโดยเอนไซม์โดยที่มีการ

กำจัดเฮมิ เซลลูโลสและส่วนที่เป็นลิกนิน โดยทั่วไปแล้วการใช้กรดเจือจางผสมกับวัสดุชีวมวลและทำที่อุณหภูมิสูงที่ 160- 220 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาสั้นที่ไปไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสให้เป็นไซโลสและน้ำตาลตัวอื่นและจากนั้นจะมีการทำลายไซโลสให้เป็นเฟอฟูรัล กระบวนการไฮโดรไลซีสโดยไม่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนพบว่าผลผลิตที่ได้มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 20 ในขณะที่เมื่อผ่านกระบวนการปรับสภาพแล้วได้ผลผลิตมากกว่าร้อยละ90 [12]

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงจุดเด่นและจุดด้อยของกระบวนการปรับสภาพด้วยกรด

	จุดเด่น	จุดด้อย
กรดความเข้มข้นสูง	- ให้ผลผลิตกลูโคสสูง	- ค่าใช้จ่ายสูงและการจัดการต้องอยู่ภายใต้การควบคุม
	- เกิดปฏิกิริยาในสภาวะปกติ	- เกิดสารพิษเจือปนสูง
กรดความเข้มข้นเจือจาง	- ลดปัญหาการกัดกร่อนเมื่อเปรียบเทียบกับกรดความเข้มข้นสูง	- ผลผลิตค่อนข้างหลากหลาย
	- เกิดองค์ประกอบของสารอื่นที่เป็นพิษต่ำ	- ให้ผลผลิตน้ำตาลต่ำ

2.2.2 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยการใช้เอนไซม์ [13]

เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์ เป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) จัดเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ดีที่สุด เนื่องจากสะดวกต่อการสกัดสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ต้นทุนการผลิตต่ำ ทั้งนี้พบว่าสภาพการเพาะเลี้ยงมีผลต่อชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่สร้างขึ้น เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ชนิดและปริมาณของเซลลูโลสที่ใช้ ปริมาณเกลือของโลหะต่าง ๆ สภาพความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และออกซิเจน เป็นต้น

2.2.2.1 องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส [3]

เซลลูเลส ประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์ (complex enzyme) ที่ทำงานร่วมกัน คือ

1. เอนไซม์ C1 หรือ hydrogen bondase ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแตกสลายเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสม คือทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลง เพื่อเป็นสารตั้งต้นของเซลลูเลส

2. เอนไซม์ Cx หรือ β-1, 4 glucanase เป็นเซลลูเลสที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ กลุ่มนี้มี 3 ชนิด คือ

2.1 Endo-β-glucanase (β-D-glucan glucanohydrolase EC.3.2.1.4) จะทำหน้าที่ย่อย β-1, 4-glycosidic linkage แบบสุ่ม ผลจากการย่อยทำให้สายโมเลกุลของเซลลูโลสสั้นลง

อย่างรวดเร็ว ขณะที่หมู่รีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ได้ผลผลิต คือกลูโคส และ cellotriose เอนไซม์นี้ไม่ย่อย cellobiose แต่ย่อย cellodextrin, เซลลูโลสที่เกิดการพองตัว (swollen cellulose), carboxymethylcellulose (CMC) และ hydroxyl-ethyl cellulose (HEC) ได้ และปฏิกิริยาจะลดลงเมื่อสายโมเลกุลเซลลูโลสสั้นลง ในการตรวจสอบเอนไซม์นี้จะใช้ CMC และ HEC เป็นสารตั้งต้น

2.2 Exo-β-glucanase (1, 4-β-D-glucan cellobiohydrolase EC.3.2.3.91) หรือ cellobiohydrolase ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้าน non-reducing end เอนไซม์นี้สามารถย่อยเซลลูโลสในรูปผลึก (crystalline cellulose) หรือเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble cellulose) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น cellodextrin และ cellobiose สามารถตรวจสอบเอนไซม์นี้โดยการใช้ฝ้ายอวิเซล (avicel) และ amorphous cellulose เป็นสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อขนาดของสารตั้งต้นสั้นลง นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อย crystalline cellobiose ได้และจะเกิดปฏิกิริยาต้านการทำงานเมื่อมี endoglucanase ผสมอยู่

2.3 β-glucosidase (β-D-glucohydrolase EC.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อย cellobiose และ cello-oligosaccharide ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสหรือ cellodextrin ได้ ทดสอบเอนไซม์นี้โดยใช้ cellobiose, *p*-nitrophynyl-β-d-glucoside หรือ salicin เป็นสารตั้งต้น

2.2.2.2 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส [3]

กลไกการสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็น prohydrolytic step คือสายโซ่ anhydroglucose จะถูกทำให้บวมขึ้น ขั้นที่สอง เกิด hydrolytic cleavage ของสายโพลีเมอร์ กลไกการทำงานเริ่มจากเซลลูโลสจะเกิดบวมตัว (swelling) พร้อมกับมีการสลายพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของ endoglucanase และ exoglucanase จะย่อยสลายเซลลูโลสได้ปลายอิสระ ส่วน exoglucanase จะดึงโมเลกุลของ cellobiose ออกจากปลายซึ่งถูกย่อยสลายต่อไปโดย β-glucosidase จนได้น้ำตาลกลูโคสอิสระ

2.2.2.3 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส [3]

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจะถูกยับยั้งเมื่อ

1. β-glucosidase จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีการสะสมของ cellobiose ซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ endoglucanase และ exoglucanase ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและยุติในที่สุด จากการศึกษาของ Selby and Maitland [14] พบว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ต้องทำงานร่วมกันจึงจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดี แต่เมื่อแยกชนิดใดชนิดหนึ่งออกไปจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง

2. สารที่มี configuration คล้ายสารตั้งต้นจะยับยั้งการรวมตัวของเอนไซม์กับสารตั้งต้นได้ เช่น methyl cellulose และ gluconolactones เป็นต้น โดยจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ทำให้การย่อยเซลลูโลสเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์

3. สารพวก polyols และ erythritol จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glucosidase และ galactosidase โดย erythritol จะรวมตัวกับเอนไซม์ตรงจุด C_3-C_6 ของ D-glucose

4. โปรตีนของเอนไซม์ถูกทำให้เสียสภาพโดยสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับ SH-group เช่น mercuric ions แต่อาจแก้ไขโดยใช้ cysteine และ chloride ions

5. เอนไซม์ endopeptidase สามารถลดการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสได้ แต่เอนไซม์ exopeptidase ไม่สามารถย่อยเอนไซม์ exocellulase ที่อยู่ในสภาพปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลลูเลสสามารถคงทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป

6. การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นกับโครงสร้างทางเคมีของเอนไซม์ ซึ่งแล้วแต่ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์

7. เอนไซม์เซลลูเลสอาจถูกยับยั้งโดย melanin ซึ่งเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด และอาจถูกยับยั้งโดยสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน หรือคอลลอยด์ต่างๆในดิน

8. Clay minerals อาจเป็นอุปสรรคต่อการย่อยเซลลูโลสในดินได้ เพราะสามารถดูดซับเซลลูโลส และสารผลิตภัณฑ์บางชนิดได้ ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสที่สังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ไม่สามารถทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ

2.2.2.4 การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

Goksoyr และ Eriksen ได้แบ่งการทำงานของเอนไซม์เป็น 2 วิธี ตามความซับซ้อนของลักษณะเอนไซม์ คือ

1. Physical assay เป็นการวัดความสามารถในการทำงานของ complex enzyme ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ประกอบด้วย 2 วิธี คือ

1.1 การสลายให้ได้น้ำตาล (saccharolytic method) เป็นการวัดปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง โดย Mandels [15] ได้รวบรวมวิธีการวัดน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้ dinitrosalicylic acid reagent (DNS reagent) เป็นสารทดสอบ ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสารตั้งต้น ดังนี้

1.1.1 Filter paper assay เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากกระดาษกรองสามารถเตรียมได้ง่าย วิธีการคือ ใช้กระดาษกรองขนาด 1×6 เซนติเมตร ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีส่วนผสมของเอนไซม์และบัฟเฟอร์ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์

1.1.2 Cotton assay คล้ายกับ filter paper assay แต่ใช้เส้นใยฝ้าย50 มิลลิกรัมเป็นสารตั้งต้น ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์และบัฟเฟอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม DNS reagent และหาปริมาณของ reducing sugar

1.1.3 CMC assay เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวัดการทำงานของเซลลูเลส เนื่องจาก CMC เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ดี จึงสะดวกต่อการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ในการวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะบ่ม 1% CMC ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 กับเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม DNS reagent เพื่อหาปริมาณของ reducing sugar

1.1.4 Amorphous cellulose assay วิธีนี้จะวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์โดยบ่ม 1% walseth cellulose ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 กับเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนใส (supernatant) ไปหาปริมาณ reducing sugar โดยการทำปฏิกิริยากับ DNS reagent

1.2 การตรวจสอบโครงสร้างของเซลลูโลสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังเกิดการย่อย ในกรณีที่การย่อยสลายเซลลูโลสไม่สมบูรณ์หรือไม่เกิดน้ำตาลขึ้นจะตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส วิธีการที่ใช้คือ การวัดความเหนียวของเส้นใยฝ้ายก่อนและหลังทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในเวลาที่กำหนด ซึ่งต้องใช้เครื่องมือและความละเอียดสูง นอกจากนี้ยังอาจตรวจสอบเส้นใยอิสระที่เกิดจากการย่อยสลายกระดาษกรอง และการหาน้ำหนักของสารตั้งต้นที่หายไป การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสอาจทำได้โดยศึกษาการย่อยสลายในอาหารวุ้น Hankin and Anagostakis [16] วัดความสามารถการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธี solid media containing carboxymethycellulose โดยเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร CMC agar วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี จากนั้นเทราดผิวหน้าอาหารด้วย 1% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) aqueous hexadecyltrimethyl ammonium bromide ซึ่ง reagent นี้จะทำให้เกิดการตกตะกอนของ CMC ที่ไม่ถูกย่อยสลาย ทำให้เกิดวงใสของ CMC จากนั้นจึงวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสแล้วหาอัตราส่วนกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

นอกจากนี้ Apun [17] ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ Trichoderma reesei บนอาหาร CMC agar บ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วย 0.1% congo red เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วย 1 M NaCl ก่อนตรวจสอบบริเวณใสที่ไม่ติดสีของ congo red ที่เกิดจากการย่อยสลาย CMC โดยเอนไซม์เซลลูเลส วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ตรวจสอบการวัดการทำงานของเซลลูเลสเบื้องต้น เนื่องจากทำได้ง่าย สะดวก และเห็นผลรวดเร็ว

2. Biochemical assay เป็นการวัดความสามารถในการทำงานของ complex cellulose เฉพาะแต่ละองค์ประกอบเท่านั้น

2.1 Endoglucanase นิยมใช้ CMC และ hydroxyethyl cellulose เป็นสารตั้งต้นโดยวัดจากค่าความหนืดที่เปลี่ยนไป ซึ่งมีค่าลดลงเมื่อเวลาของปฏิกิริยาเปลี่ยนไป เป็นวิธีที่ยุ่งยาก จึงใช้วิธีวัดปริมาณ reducing sugar จากการทำปฏิกิริยากับ DNS reagent ที่เกิดขึ้นแทน

2.2 Exoglucanase วิธีนี้ยังไม่มีสารตั้งต้นที่จำเพาะต่อ exoglucanase ดังนั้น การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์นี้จึงจำเป็นต้องสกัดให้ได้ exoglucanase ที่บริสุทธิ์ก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นซึ่งจะใช้เซลลูโลสที่มีอัตรา polymerization ต่ำ เช่น avicel หรือเซลลูโลสที่ผ่านการแช่ด้วยกรดฟอสฟอริก

2.3 β-glucosidase นิยมใช้ cellobiose และ p-nirophenyl-β-D-glucoside (pNPG) เป็นสารตั้งต้น โดยหากใช้ cellobiose เป็นสารตั้งต้น นิยมวัดปริมาณของกลูโคสที่ได้จากการย่อย แต่หากใช้ pNPG จะมีการเติมโซเดียมคาร์บอเนตหลังจากการบ่มกับเอนไซม์ จากนั้นวัดปริมาณreducing sugar ที่ปลดปล่อยออกมา

2.2.2.5 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดอาจมีคุณสมบัติเหมือนหรือต่างกัน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ โครงสร้างของเอนไซม์ ชนิดและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ประกอบด้วย

1. น้ำหนักโมเลกุล โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปตามชนิดและแหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิต

2. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเนื่องจากเอนไซม์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ อัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่า ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน (optimum temperature) เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ (denaturation) หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส

3. pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส การเปลี่ยนแปลงของ pH มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อ pH เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยอาจทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ เนื่องจากโมเลกุลของเอนไซม์มีการแตกตัวตรงหมู่อะมิโน และหมู่คาร์บอกซิลหรือ side chain ได้ต่างกัน ในสภาวะที่ pH แตกต่างกันจะมีผลให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนไป เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH ค่าหนึ่งเรียกว่า ค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงาน ณ จุดที่ pH มีค่าสูงหรือต่ำกว่าค่านี้ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จะลดลง เอนไซม์เซลลูเลสจะทำงานได้ดีที่สุดใน pH ช่วง 5.0 ถึง 9.0 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและลดช้าลงเมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูงขึ้น จนในที่สุดอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นอีก

4. ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้ง สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibitor) เป็นตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการอธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น และลักษณะของfunctional group ที่บริเวณ active site ทำให้เข้าใจและสามารถควบคุมกระบวนการที่เกิดขึ้นได้ Hudson et al. [18] พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อที่แยกจาก New Zealand hot

spring ถูกยับยั้งเมื่อเติม $CaCl_2.2H_20$ และ Iwashita [19] พบว่า β-glucosidase จาก Aspergillus kawachii ถูกยับยั้งโดย $AgNO_3$ และ $HgCl_2$ ส่วน $FeCl_3$ มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ส่วนรายงานของ Lee[20] พบว่า Hg^{2+}, EDTA, Mn^{2+}, N-bromosuccinimide, Ni^{2+}, Pb^{2+}, Sr^{2+}, Co^{2+}, และ K^{+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก Bacillus amyloliquefaciens DL-3 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Singh and Kumar[21] ที่พบว่า Hg^{2+} และ Ag^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก Bacillus brevis VS-1 เช่นเดียวกับ Thomas and Zeikus [22] ที่รายงานว่า Ag^{2+} และ Hg^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก Clostridium thermocellum LQRI แต่ Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก Trichoderma reesei QM9414 ส่วน Cu^{2+}, Zn^{2+} และ ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether) -N, N-tetraacetic acid มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก Trichoderma reesei QM9414 และ Clostridium thermocellum LQRI

ข้อดีของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คือ สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ จึงเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องให้ความร้อนทำให้ประหยัดต้นทุนในการผลิต และปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งจะเกิดได้เร็วกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ไปลดพลังงานอิสระของการกระตุ้นของปฏิกิริยาทำให้ปฏิกิริยาถึงภาวะสมดุลได้เร็วเอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะมีความบริสุทธิ์มากจึงไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงเนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น นอกจากนี้เอนไซม์สามารถย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงได้ตามที่ต้องการ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น และสามารถทำการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยเซลลูโลสได้ โดยกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์นี้ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน [23]

2.2.3 แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส

ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถย่อยเซลลูโลสมีดังนี้

1. แบคทีเรียในกระเพาะอาหารของสัตว์กินพืช เช่น วัว ควาย ในดิน เช่น Bacillus sp. และในทะเล เช่น Cytophaga sp. [24]

2. แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาพทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เช่น Cellvibrio sp. และ Cellulomonas sp. เป็นต้น

3. แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจน เช่น Clostridium thermophilum และ Ruminococcus albus เป็นต้น

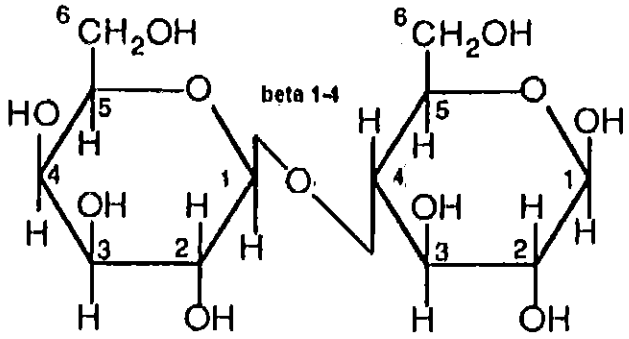
4. Myxobacteria เช่น Sporocytophaga sp. [25]

5. จุลินทรีย์ที่เป็นปรสิตในพืช มีทั้งพวกย่อยเซลลูโลสอย่างเดียว หรือก่อโรคในพืชด้วย เช่น Pseudomonas solanacearum (ปัจจุบันคือ Ralstonia solanacearum) ทำให้เกิดโรคเหี่ยวในพืช [26] จุลินทรีย์ย่อยไม้ ได้แก่ แอคติโนไมซีส เป็นต้น [27] แบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนจะย่อยเซลลูโลสได้ผลิตภัณฑ์หลัก 2 ชนิด คือ CO_2 และ สารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ส่วนราและแอคติโนไมซีส จะได้ CO_2 เป็นผลิตภัณฑ์หลักและเกิดกรดอินทรีย์ในปริมาณน้อย อัตราการย่อยเริ่มต้นจะถูกจำกัดด้วย

กระบวนการ oxidationของคาร์โบไฮเดรต เพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของสารตัวกลาง ซึ่งจะเกิดขึ้นขณะมีการใช้น้ำตาล ส่วน mesophilic และ thermophilic anaerobe ไม่สามารถย่อยสารตั้งต้นอย่างสมบูรณ์ได้ สารอินทรีย์หลายชนิดจึงถูกขับออกมาเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเกิดการสะสมของ CO_2, H_2, ethanol และกรดอินทรีย์ เช่น acetic acid, lactic acid และ succinic acid เป็นต้น [28] การย่อยเซลลูโลสขั้นต้นเกิดจากการที่โมเลกุลถูก hydrolyze โดยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเอนไซม์จะเข้าทำการย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ แต่ข้อจำกัดในการทำงานของเอนไซม์เกิดจากการที่สารตั้งต้นละลายน้ำได้น้อย จากนั้น cellulose derivative ที่เกิดขึ้นก็จะถูกย่อยต่อได้เป็น monosaccharide หรือ disaccharide ผลผลิตขั้นตอนต่อมาของการย่อยจะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ และเนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงต้องขับเอนไซม์ออกสู่นอกเซลล์เพื่อย่อยเซลลูโลสจนได้น้ำตาลที่ละลายน้ำ จากนั้นจึงดูดซึมสู่ภายในเซลล์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป [29]

2.3 น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) [30]

คือ น้ำตาลที่มีกลุ่มแอลดีไฮด์ (aldehyde) หรือคีโตน (ketone) ที่เป็นอิสระ เกิดจากการรวมตัวกันของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของ anomeric carbon (C1) ของน้ำตาลตัวหนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของคาร์บอนอะตอมอื่นที่ไม่ใช่ anomeric carbon ของน้ำตาลอีกตัวหนึ่ง ทำให้มี reducing group เหลืออยู่ ซึ่งสามารถถูกออกซิไดส์ได้ง่ายตัวออกซิไดส์ (oxidizing agent) อย่างอ่อน อาจตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้โดยอาศัยคุณสมบัติของน้ำตาลรีดิวซ์ที่สามารถรีดิวซ์โลหะอิออน เช่น Cu^{2+} หรือ Ag^{+} ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำ ตัวอย่างของน้ำตาลเหล่านี้ ได้แก่ น้ำตาล โมเลกลุเดี่ยว (monosaccharide) ทุกชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแลคโทส น้ำตาลฟรุกโทส และน้ำตาลโมเลกุลคู่(disaccharide) บางชนิด เช่น น้ำตาลแล็กโทส (ดังแสดงในรูปที่ 2.4) น้ำตาลมอลโทส ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์จะมีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์และสามารถรีดิวซ์คอปเปอร์ (II) ไอออนในสารละลายเฟห์ลิ่ง (Fehling's solution) เป็นคอปเปอร์ (I) ไอออน ซึ่งปฏิกิริยานี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ได้



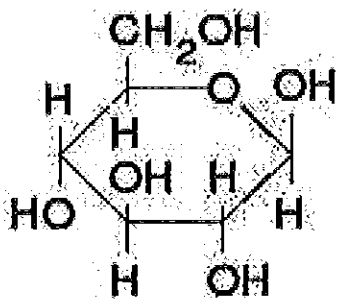
รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของน้ำตาลแล็กโทส [30]

2.4 น้ำตาลกลูโคส (glucose) [31]

$C_6H_{12}O_6$ เป็น คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ประเภทน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) มีคาร์บอน 6 อะตอม (hexose) ชนิดแอลโดส (aldose) น้ำตาลกลูโคสที่พบอยู่ในรูป D-glucose ซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) น้ำตาลกลูโคส อาจเรียกว่า dextrose (หมายถึง D-glucose) น้ำตาลกลูโคสมีลักษณะเป็นผลึกของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว (melting point) ที่ 146 องศาเซลเซียส น้ำตาลกลูโคสพบมากในผลไม้ที่มีรสหวาน เช่น องุ่น (อาจเรียกน้ำตาลกลูโคสว่า grape sugar) เชอร์รี่ และน้ำผึ้ง เป็นน้ำตาลที่พบอยู่ในเลือด (blood sugar) คาร์โบไฮเดรตที่มนุษย์และสัตว์กินเข้าไปจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของกลูโคสซึ่งร่างกายนำเอาไปใช้ได้ทันที กลูโคสมีความหวานน้อยกว่าน้ำตาลทรายแต่จะให้จำนวนพลังงาน (แคลอรี) เท่าๆกัน

น้ำตาลกลูโคส (glucose) เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวที่มีความสำคัญ เพราะเป็นน้ำตาลพื้นฐานของคาร์โบไฮเดรตทุกตัว หรือเป็นสารตั้งต้นของการผลิตพลังงาน น้ำตาลเชิงเดี่ยวทุกตัวจะต้องเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสที่ตับก่อนจึงจะนำไปใช้ได้ ด้วยเหตุนี้น้ำตาลกลูโคสจึงเป็นน้ำตาลที่พบมากในร่างกายโดยเฉพาะในเลือดบางครั้งจึงเรียกว่า บลัด ชูการ์ (blood sugar) ระดับน้ำตาลหรือน้ำตาลกลูโคสในเลือดปกติจะประมาณ 70-110 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร เซลล์ในสมองใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งพลังงาน สมองจึงต้องได้รับกลูโคสจากเลือดตลอดเวลา

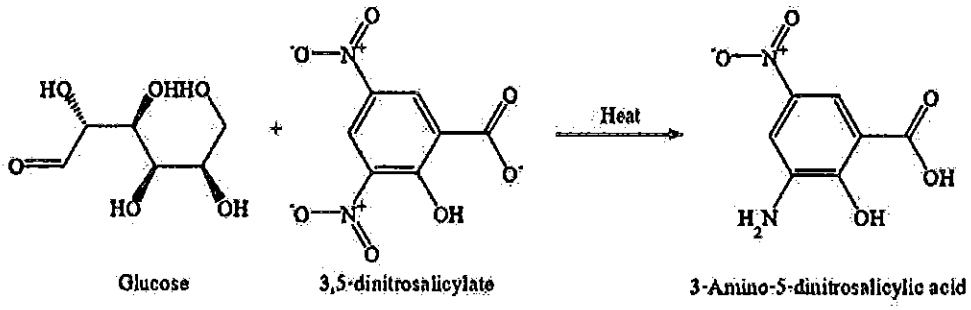
โครงสร้างของน้ำตาลกลูโคสมีหลายแบบ เช่น โครงสร้างแบบโซ่เปิด (open-chain structure) หรือ Fischer projection โครงสร้างสร้างแบบวง (cyclic หรือ ring structure) หรือ Haworth projection กลูโคสมีโครงสร้างแบบวง ที่มีขนาดของวง 6 อะตอม (เรียกว่า six-membered ring) ซึ่งเกิดจากการปิดวงโดยหมู่ไฮดรอกซิลทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอนิลของแอลดีไฮด์ ให้อะซิตัล (acetal) [32]



รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคส [32]

2.5 การวัดน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยเทคนิค DNS (Dinitrosalicylic colorimetric method) [33]

การวิเคราะหหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซโดยวิธี DNS method จะอาศัยการทำปฏิกิริยาระหวางน้ำตาลรีดิวซ กับสารละลาย dinitrosalicylic reagent ซึ่งสารละลาย dinitrosalicylic reagent ซึ่งมีหมู่ไนโตร 2 หมู่ มีลักษณะสีเหลือง เมื่อหมู่ไนโตร 1 หมู่ถูกรีดิวซ์โดยหมู่แอลดีไฮด์ของน้ำตาล โดยมีความร้อนและสารละลายด่างเป็นตัวเร่งจะทำให้สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid กลายเป็น 3-amino,5-nitrosalicylic acid ที่มีสีส้มแดง (แสดงดังรูปที่ 2.7) และสามารถวัดคาการดูดกลืนแสงได้ในช่วง 520-540 นาโนเมตร วิธีนี้เหมาะกับตัวอยางที่มีน้ำตาลรีดิวซปริมาณต่ำ ซึ่งในการวิเคราะห์หาปริมาณสารเรามักสร้างกราฟมาตรฐาน โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมแล้วเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน เพื่อให้หาค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างชนิดเดียวกัน โดยการนำสารละลายตัวอย่างนั้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันแล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน



รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาของวิธี Dinitrosalicylic colorimetric method (DNS) [34]

2.6 หลักการทดสอบน้ำตาลกลูโคส (Mutarotase-GOD method)[35]

α-D-Glucose และ β-D-glucose ในสารละลายที่รักษาสมดุลด้วยอัตราส่วนคงที่ โดย Glucose oxidase จะทำปฏิกิริยากับ β-D-glucose เท่านั้น จะไม่ทำปฏิกิริยากับ α-D-glucose ดังนั้น α-D-Glucose จะถูกแปลงเป็น β-Dglucose โดยใช้ mutarotase

LabAssay™ Glucose เป็นชุดทดสอบสำหรับการตรวจสอบน้ำตาลกลูโคสตามมาตรฐานของเอนไซม์ที่มีการรวมตัว กันของ mutarotase และ glucose oxidase ชุดทดสอบนี้ใช้สำหรับการหาปริมาณน้ำตาล

กลูโคสในเซรั่ม พลาสมา และปัสสาวะของหนู ซึ่งจะเป็นการทดลองในรูปแบบหลายๆตัวอย่างพร้อมกัน โดยใช้ microplate แต่ในการวัดก็สามารถทำโดยใช้หลอดทดลองเพื่อรักษาความสมดุล

หลักการทดสอบ

เมื่อสารตัวอย่างถูกนำไปผสมกับ Choromogen Reagent α-D-Glucose ในสารตัวอย่างจะถูกแปลงเป็น β-D-glucose โดย mutarotase จากนั้น β-D-glucose จะถูกออกซิไดซ์และผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดย glucose oxidase (GOD) ซึ่งการปรากฏตัวของ peroxidase (POD) ในรูปแบบของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะผลิตเม็ดสีแดงโดยการควบแน่นออกซิเดชันเชิงปริมาณด้วยฟีนอลและ 4-aminoantipyrine ความเข้มข้นของกลูโคสจะได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเม็ดสีแดง ซึ่งแสดงดังสมการต่อไปนี้

$$\alpha\text{-D-Glucose} \xrightarrow{\text{Mutarotas}} \beta\text{-D-Glucose}$$

$$\beta\text{-D-Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{GOD}} H_2O_2 + \text{Gluconic acid}$$

$$2H_2O_2 + \text{4-Aminoantipyrine} + \text{Phenol} \xrightarrow{\text{POD}} \text{[Red pigment]} + 4H_2O$$

2.7 แนวคิดของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2013 Saikat Chakraborty และคณะ [34] ได้ศึกษาผลกระทบของการกวนผสมในการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ โดยจะทดลองแบบทั้งไม่มีการกวน กวนที่ 1-8 ชั่วโมงแรกของปฏิกิริยา และกวนอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดปฏิกิริยา ใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 2%โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นจะใช้เวลาการกวนผสมที่ดีที่สุดไปศึกษาผลกระทบของปริมาณสารตั้งต้นตั้งแต่ 2-6%โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยสภาวะอื่นๆคงที่ ผลการทดลองพบว่า ในช่วงต้นของปฏิกิริยาการกวนผสมอย่างต่อเนื่องให้ผลผลิตมากกว่าแต่เมื่อเวลาดำเนินไปอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะลดลง โดยในช่วงท้ายของปฏิกิริยาการไม่กวนผสมจะให้ผลผลิตที่มากกว่า และพบว่าการกวนผสมที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมงแรกของปฏิกิริยาหลังจากนั้นไม่มีการกวนอีกจนสิ้นสุดปฏิกิริยาจะให้ผลผลิตสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นมากขึ้น ระยะเวลาในการกวนผสมช่วงต้นของปฏิกิริยาก็จะมากขึ้นไปด้วย จากการศึกษางานวิจัยนี้ได้ข้อสรุปว่า ในช่วงเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยาการกวนผสมจะช่วยให้เกิดการถ่ายโอนเอนไซม์ไปยังพื้นผิวของสารตั้งต้นได้ดีขึ้น เนื่องจากยังไม่มีกลูโคสและเซลโลไบโอสในระบบ จึงไม่มีการยับยั้งปฏิกิริยา แต่เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปเกิดผลิตภัณฑ์มากขึ้น

และเริ่มสะสมในปฏิกิริยามีการยับยั้งปฏิกิริยาทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาและการผลิตลดลงอย่างมาก จึงยุติการกวนผสมเพื่อป้องกันการถ่ายโอนมวลของกลูโคสและเซลโลไบโอสซึ่งจะทำให้เกิดการยับยั้ง

ปี ค.ศ. 2015 Fubao Fuebiol Sun และคณะ [35] ได้ศึกษาถึงความสำคัญของส่วนประกอบเอนไซม์ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดยการเปรียบเทียบการเตรียมเซลลูเลส Novozymes มาใช้ในการย่อยลิกโนเซลลูโลสจากชีวมวลธรรมชาติบนพื้นผิวที่แตกต่างกัน ในปริมาณเอนไซม์เสริมแต่ละตัวที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองพบว่าการเตรียมเซลลูเลสที่ต่างกัน จะส่งผลต่อศักยภาพในการย่อยสลายบนพื้นผิวของชีวมวลที่ต่างกัน โดยส่วนประกอบเอนไซม์จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบนพื้นผิวที่แตกต่างกันในระดับที่แตกต่างกัน จากการศึกษางานวิจัยนี้สรุปได้ว่า ส่วนประกอบเอนไซม์มีบทบาทในการเตรียมเซลลูเลสที่ส่งผลต่อการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส และเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดความแตกต่างของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ระหว่างสารตั้งต้นที่หลากหลายและเซลลูเลสที่ต่างกันออกไป

ปี ค.ศ. 2015 Chun Chang และคณะ [36] ได้ศึกษาปฏิกิริยาของเซลลูโลสในเอทานอลที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจะพิจารณาการละลายของเซลลูโลสในเอทานอลจากอัตราการเปลี่ยนแปลงมวลของของแข็งที่อุณหภูมิ 170-210 องศาเซลเซียส ทั้งแบบใช้และไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา โดยใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และศึกษาผลของการเติมน้ำลงไปในปฏิกิริยา ผลการทดลองพบว่าเมื่อไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา อัตราการเปลี่ยนแปลงมวลในเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาและอุณหภูมิของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น และยังพบว่าการเติมน้ำในปฏิกิริยาในอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 1 สามารถช่วยละลายเซลลูโลสในเอทานอลได้ดีขึ้น ในกรณีที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าอัตราการเปลี่ยนแปลงมวลมีค่าสูงกว่าปฏิกิริยาแบบไม่มีตัวเร่งมาก โดยที่อุณหภูมิ 170 และ 190 องศาเซลเซียสอัตราการเปลี่ยนแปลงมวลในเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลามากขึ้น ส่วนที่อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียสพบว่ามีอัตราการเปลี่ยนแปลงมวลสูงที่สุดในช่วงต้นปฏิกิริยา แต่เมื่อระยะเวลามากขึ้นจะมีค่าลดลง และเมื่อเติมน้ำเข้าไปในปฏิกิริยาพบว่าอัตราการเปลี่ยนแปลงมวลกลับมีค่าน้อยลง จากการศึกษางานวิจัยนี้ได้ข้อสรุป คือในกรณีที่ไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา น้ำสามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของเซลลูโลสได้เนื่องจากโมเลกุลของน้ำสามารถทำลายพันธะไฮโดรเจนของเซลลูโลสได้และความสามารถในการละลายจะมากขึ้นที่เวลาและอุณหภูมิของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าที่อุณหภูมิสูงและการเติมน้ำในปฏิกิริยาจะทำให้ความสามารถในการละลายลดลง เมื่อระยะเวลาผ่านไปจะมีการตกค้างของของแข็งในปฏิกิริยามากขึ้น เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงตัวเร่งในปฏิกิริยาเอทาโนไลซิสของเซลลูโลสจะสร้างสารประกอบฮิวมินขึ้น และการเติมน้ำเข้าไปในปฏิกิริยาจะส่งผลให้เกิดการสะสมของฮิวมินมากขึ้น

ปี ค.ศ. 2012 Yoshitoshi Nakamura และคณะ [37] ได้ศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคสด้วยการระเบิดไอน้ำที่อุณหภูมิและความดันสูง โดยใช้ตัวอย่างจากชีวมวล 2 ชนิด คือ microcrystalline cellulose powder (MC) และ cup ammonium rayon fiber (BEMCOT) ในการทดลองจะศึกษาผลของแรงดันไอน้ำที่ 50-62 atm และ steaming time ตั้งแต่ 0.5-5 นาที ที่มีต่ออัตราการผลิตกลูโคสจากเซลลูโลส จากผลการทดลองพบว่าความดันที่ทำให้ได้ปริมาณกลูโคสสูงสุดสำหรับ MC และ BEMCOT คือ 62 และ 60 atm ตามลำดับ ส่วนผลของการเปลี่ยนแปลง steaming time พบว่าที่เวลา 1 นาที จะได้ปริมาณกลูโคสสูงสุดสำหรับ MC และ BEMCOT จากการศึกษางานวิจัยนี้สรุปได้ว่าวิธีการระเบิดไอน้ำที่อุณหภูมิสูงด้วยความดันสูงจะสามารถย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นกลูโคสได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับการระเบิดไอน้ำที่ความดัน เนื่องจากความดันสูงจะส่งผลทำให้เกิดการแยกเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกจากกันได้ดี และระยะเวลาหรือ steaming time ที่นานขึ้นไม่ส่งผลให้ปริมาณกลูโคสที่ได้มากขึ้น เนื่องจากเวลานานทำให้มีเซลลูโลสส่วนที่ไม่ละลายน้ำมากกว่า

ปี ค.ศ. 2014 R. Eric Berson และคณะ [40] ได้ศึกษาอัตราการย่อยสลายของเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ โดยมีปัจจัยที่ส่งผลต่อการย่อยสลาย เช่น อุณหภูมิของปฏิกิริยา ระยะเวลา และ พื้นที่ผิวของสารตั้งต้น ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลลูโลส โดยเปรียบเทียบกับแบบจำลองของการใช้การดูดซับของเซลลูเลส ซึ่งเซลลูโลสถูกย่อยสลาย โดยใช้เครื่อง incubator shaker ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร และมีค่าความเป็นกรด เท่ากับ 4.8 โดยใช้บัฟเฟอร์ citrate เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ที่อุณหภูมิที่ต่างกันคือ 50 35 และ 20 องศาเซลเซียส อัตราการย่อยสลายที่สูงสุดอยู่ที่ประมาณ 7 เท่า เมื่อเวลาที่ 2 ชั่วโมง อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีอัตราการย่อยสลายมากกว่าอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส และมากกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสถึงสองเท่า จะเห็นได้ว่าอัตราการย่อยสลายที่ทำให้เกิดน้ำตาลกลูโคสจะเกิดอัตราการย่อยสลายในช่วงเวลาแรกๆ คือ 2-3 ชั่วโมง ดังนั้นจึงไม่แนะนำให้การย่อยสลายเซลลูโลสเป็นเวลานาน (เช่นเป็นเวลาหลายสัปดาห์) เนื่องจากประสิทธิภาพการย่อยสลายจะลดลงอย่างมากหลังจากเริ่มมีปฏิกิริยาของการย่อยสลาย และปัจจัยอีกอย่างคือพื้นที่ผิวสัมผัสและขนาดรูพรุนของพื้นผิวเซลลูโลส ถูกวัดโดยการดูดซับของแก๊สไนโตรเจนและไอโซเทอมการคายซับ โดยใช้เครื่องดูดซับ (Micromeritics Instrument Corporation, Tristar 3000) ในการวัดพื้นที่ผิวที่สามารถเข้าถึงได้โดยการดูดซับก๊าซไนโตรเจนได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการดูดซับเอนไซม์และการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ และจะเห็นได้ว่าพื้นที่ผิวที่ได้รับการปรับสภาพในการดูดซับส่งผลกับการย่อยสลาย โดยอัตราการย่อยสลายและมีข้อจำกัดในการย่อยสลายก็คือการยับยั้งของเอนไซม์ในการดูดซับหรือความเฉื่อยชาของเอนไซม์จากพื้นผิว ทำ

ให้ได้มีการศึกษาค้นหาสารลดแรงตึงผิว หรือโปรตีน BSA ที่นำมาใช้ในการปรับสภาพก่อนการย่อยสลายเซลลูโลส

ปี ค.ศ. 2015 Jianghai Lin และคณะ [39] ได้ศึกษาการเพิ่มผลผลิตของไซโลสจากเฮมิเซลลูโลสของกากอ้อย โดยมีตัวแปร คือปริมาณของกลูโคสออกซิเดส 4-34 ยูนิตต่อกรัม ค่า pH 4.8-7.5 และอุณหภูมิในปฏิกิริยา 35-50 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่า การเติมกลูโคสออกซิเดสเข้าไปในปฏิกิริยาจะได้ผลผลิตไซโลสมากขึ้น และได้ผลิตภัณฑ์สูงสุดเมื่อใช้กลูโคสออกซิเดสปริมาณ 28 ยูนิตต่อกรัม เมื่อเพิ่มอุณหภูมิพบว่ากลุ่มที่ไม่มีการเติมกลูโคสออกซิเดสได้ผลิตภัณฑ์สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่สูงขึ้นมากกว่า 40 องศาเซลเซียสผลิตภัณฑ์ที่ได้จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนกลุ่มตัวอย่างที่มีการเติมกลูโคสออกซิเดสจะได้ผลิตภัณฑ์สูงสุดที่ 42.5 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่าลดลง และการเปลี่ยนแปลงค่า pH จาก 4.8 ไปจนถึง 7.5 นั้น พบว่าปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุดที่ได้จากกลุ่มที่ไม่มีการเติมและมีการเติมกลูโคสออกซิเดสอยู่ที่ pH เท่ากับ 4.8 และ 5.1 ตามลำดับ โดยเมื่อเพิ่มค่า pH ให้สูงขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่าลดลง จากการศึกษางานวิจัยนี้สรุปได้ว่า การเพิ่มกลูโคสออกซิเดสเข้าไปในปฏิกิริยาสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไซโลสได้ โดยทั้งนี้ผลผลิตที่ได้จะขึ้นอยู่กับตัวแปรต่างๆ คือ ปริมาณของกลูโคสออกซิเดส ค่า pH และอุณหภูมิในปฏิกิริยา

ปี ค.ศ. 2015 Xianxiang Liu และคณะ [42] ได้ศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพสำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยตัวเร่งปฏิกิริยากรดแม่เหล็ก ที่เกิดการรวมตัวของ Fe_3O_4 @ C กับ Fe_3O_4 เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งแกนแม่เหล็กสามารถสร้างตัวเร่งปฏิกิริยากรดแม่เหล็ก (Fe_3O_4 @ C-SO_3H) ในการย่อยสลายเซลลูโลสเกิดภายใต้สภาวะหลายๆประการ โดยการย่อยสลายของเซลลูโลสในของเหลวไอออนิก 1-butyl-3-methyl imidazolium chloride ([BMIM]Cl) ซึ่งปริมาณของน้ำมีผลต่อการย่อยสลาย นำเซลลูโลส 100 มิลลิกรัม เติมลงใน ([BMIM]Cl) 2.0 กรัม ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสและมีการกวนความเร็วสูง จากนั้นจึงเติมตัวเร่งปฏิกิริยา Fe_3O_4 @ C-SO_3H 60 มิลลิกรัม และน้ำ 100 มิลลิกรัม ลงในสารละลายเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 110 120 และ 140 องศาเซลเซียสตามลำดับและระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากปฏิกิริยาเสร็จแล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำ และจะนำไปหาอัตราผลตอบแทนของน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งใช้วิธี Imoto ได้ผลผลิตสูงสุดของน้ำตาลรีดิวซ์และ glucose selectivity คือ 72.1% และ 82.5% ตามลำดับที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราส่วนน้ำหนัก ([BMIM]Cl) โดยตัวเร่งปฏิกิริยายังมีเสถียรภาพในการทำปฏิกิริยาจึงสามารถนำกลับมาใช้ได้อีก แต่ในทางกลับกันเมื่ออุณหภูมิของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเป็น 140 องศาเซลเซียสพบว่าผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์จะได้ 60.9% หลังจากการทำปฏิกิริยาระยะเวลาสั้น ๆใน 1 ชั่วโมง จากการทดลองทำให้ทราบว่าผลของอุณหภูมิในการย่อยสลายเซลลูโลสสามารถช่วยเร่งการย่อยสลายได้แต่เมื่อ

ปฏิกิริยาดำเนินไปผลผลิตจะลดลง เป็นเหตุผลที่เป็นไปได้คือเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้โมเลกุลเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระทำให้เกิดการสัมผัสของพันธะ b-1, 4-glycosidic ของเซลลูโลสกับตัวเร่งปฏิกิริยา และในขณะเดียวกัน อุณหภูมิของปฏิกิริยาที่สูงส่งผลให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าสูงสุดจะลดลงในเวลาต่อมา นั่นหมายความว่าการย่อยสลายน้ำตาลลดลงอย่างมากที่อุณหภูมิปฏิกิริยาสูงกว่า และจะเกิดผลพลอยได้จากการย่อยสลาย ปัจจัยสุดท้ายคือปริมาณของน้ำ การละลายเซลลูโลสเป็นปัจจัยสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสและความสามารถในการละลายของเซลลูโลสในของเหลวไอออนิกได้รับผลกระทบจากปริมาณน้ำ โดยที่น้ำจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับของเหลวไอออนิก เมื่อของเหลวไอออนิกประกอบด้วยแอนไอออนและแคทไอออนสามารถละลายเซลลูโลสด้วยการทำลายพันธะไฮโดรเจนในเซลลูโลส ดังนั้นของเหลวไอออนิกจึงเป็นตัวทำละลายที่สมบูรณ์ในการย่อยสลายเซลลูโลส ถ้ามีปริมาณน้ำในปฏิกิริยามากเกินไปก็จะลดความสามารถในการละลายของเซลลูโลสในของเหลวไอออนิกและส่งผลทำให้เกิดการย่อยสลายเซลลูโลสมีประสิทธิภาพต่ำลง

ปี ค.ศ. 2015 M. Blanca Roncero และคณะ [43] ได้ทำการศึกษาการเพิ่มผลผลิตด้วยปรับสภาพเซลลูโลส Nanocrystalline cellulose (NCC) ด้วยเซลลูเลส ซึ่ง NCC ใช้กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 62 และ 64 %โดยน้ำหนัก และเอนไซม์ CMC (carboxymethilcellulose) ในการย่อยสลาย ใช้กระดาษซับใยฝ้าย (เซลลูโลส 97.7 ± 0.3%) ปริมาณของเอนไซม์ CMC (carboxymethilcellulose) ที่ใช้ย่อยสลาย 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ acetate buffer เพื่อปรับค่า pH เป็น 5 โดยนำกระดาษซับใยฝ้ายมาอบแห้งก่อนย่อยสลายและทำให้เย็นในเครื่องดูดความชื้นจากนั้นชั่งกระดาษซับใยฝ้ายมา 2.5 กรัมและย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 62 และ 64 % (โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นเวลา 45 นาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผลจากการปรับสภาพด้วยเซลลูเลสทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้นถึง 12% และลดปริมาณกรดซัลฟิวริกใน NCC ได้ถึง 0.8% งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพกระดาษซับใยฝ้ายด้วยเซลลูเลสนี้เป็นตัวเลือกที่น่าสนใจมากเนื่องจากมีปริมาณผลผลิตที่เพิ่มมากขึ้นและลดปริมาณสารเคมีในกระบวนการ แทนที่จะนำสารเคมีมาใช้ในการย่อยสลาย NCC

ปี ค.ศ. 2014 Marcia Maria de Souza Moretti และคณะ [44] ได้เสนอกระบวนการที่เป็นการปรับสภาพชานอ้อยโดยการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟกับการใช้กลีเซอรอลช่วยในการหมัก เพื่อให้ได้น้ำตาลจำนวนมากที่หมักได้ในระหว่างการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ชานอ้อยจะถูกฉายรังสีด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 5 นาที โดยใช้น้ำกลั่น กรดซัลฟิวริก pH 3 และกลีเซอรอล 100% จากนั้นจะถูกนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์โดยใช้สารสกัดเซลลูเลส Myceliophthora thermophila M.7.7และเอนไซม์ Celluclast cocktail 1.5 ลิตร ชานอ้อยแห้งที่เป็นผง 10 กรัม แช่อยู่ในน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร เจือจางด้วยกรดซัลฟิวริก หรือกลีเซอรอล 100% เป็นเวลา 24 ชม และย้ายไปใส่ไว้ที่ flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อยู่ภายในเตาอบไมโครเวฟ ตัวอย่างถูกฉาย

รังสีที่ 2450 เมกกะเฮิร์ต เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิแบบอินฟราเรด เมื่อสิ้นสุดการทดลองแล้ว นำน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ชะล้างชานอ้อย โดยกรองเพื่อแยกของเหลวและของแข็ง และนำของเหลวไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และสารประกอบฟีนอล ส่วนชานอ้อยที่เป็นของแข็งจะถูกทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และใช้ในการตรวจวิเคราะห์เส้นใยที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีโดยการวิเคราะห์พื้นผิว และกระบวนการ PAD-HPLC นำมาใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของชานอ้อยก่อนการปรับสภาพ จากการวิเคราะห์พบว่าชานอ้อยที่ถูกฉายรังสีไมโครเวฟและนำกลีเซอรอลมาใช้ในการหมักมีความเสถียรทางความร้อนสูงกว่าเมื่อเทียบกับชานอ้อยที่ไม่ได้ปรับสภาพ ซึ่งผลการทดลองจะทราบว่าเมื่อมีการย่อยสลายชานอ้อยที่ปรับสภาพด้วยไมโครเวฟด้วยการให้ความร้อนจะมีปริมาณของ lignin 5.4%โดยน้ำหนัก และ xylan 11.3%โดยน้ำหนัก และพบว่ามีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดของเฮมิเซลลูโลสคือ 22.4%โดยน้ำหนัก และเซลลูโลส 40.2%โดยน้ำหนัก เห็นได้ว่าในปฏิกิริยาที่มีการย่อยสลายที่มีการผสมกันระหว่างเอนไซม์ Celluclast cocktail และสารสกัดเซลลูเลส Myceliophthora thermophila M.7.7 ที่ใช้ในการปรับสภาพชานอ้อยด้วยการฉายรังสีไมโครเวฟและกลีเซอรอลที่ใช้ในการหมัก ซึ่งเป็นวิธีใหม่ที่เป็นทางเลือกในการสลายโครงสร้าง lignocellulose ดังนั้นการปรับสภาพชานอ้อยด้วยไมโครเวฟซึ่งมีการนำกลีเซอรอลมาใช้ในการหมักตัวอย่าง จะช่วยในการกำจัดลิกนินและทำให้การย่อยสลายชานอ้อยด้วยเอนไซม์มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น

ปี ค.ศ. 2015 L.Aldous และคณะ [45] ได้ศึกษาเกี่ยวกับสารละลาย tetrabutylphosphonium hydroxide(TBPH) ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับแกลบก่อนย่อยสลายด้วยกรดซัลฟิวริกหรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟิวริก 60%โดยน้ำหนัก ทำให้ได้ปริมาณกลูโคสมีค่าสูงสุด และสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่อุณหภูมิห้อง ได้ถึง 20%โดยน้ำหนัก ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารละลาย TBPH มีประสิทธิภาพในการปรับสภาพแกลบ ซึ่งกรดซัลฟิวริกที่มีส่วนประกอบมากกว่าหรือเท่ากับ 10%โดยน้ำหนัก จะมีประสิทธิภาพในการละลายซิลิกาและลิกนินได้ ส่วนสารละลาย TBPH ที่มีส่วนประกอบ 40-60%โดยน้ำหนัก อาจจะสามารถละลายเซลลูโลสได้ แต่จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งของโครงสร้างที่เป็นสิ่งสำคัญที่สุดในการสลายโครงสร้างของชีวมวล และทำให้ผลผลิตของการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟิวริกที่ค่ามากสุด ถึง 325 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมแกลบ เมื่อเทียบกับแกลบที่ยังไม่ได้ปรับสภาพได้ผลผลิตเพียง 172 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมแกลบ และการปรับสภาพแกลบที่อุณหภูมิห้องและนำ TBPH มาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะช่วยเพิ่มผลผลิตของกลูโคสได้มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีการย่อยสลายด้วยกรดจะทำให้เพิ่มขึ้นผลผลิตกลูโคสอีกด้วย

บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์ :

3.1.1 เครื่องชั่งสาร

3.1.2 เครื่อง UV –VIS Spectroscopy

3.1.3 หลอดทดลอง

3.1.4 บีกเกอร์

3.1.5 Autopipettes

3.1.6 Hot plate and magnetic stirrer

3.1.7 Micropipettes

3.1.8 Cuvette

3.1.9 Microtubes

3.1.10 เทอร์โมมิเตอร์

สารเคมี :

3.1.11 Potassium sodium tartrate

3.1.12 Sodium hydroxide

3.1.13 Sodium sulfite

3.1.14 Dinitrosalicylic acid

3.1.15 Phenol

3.1.15 ผงเซลลูโลส บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. ประเทศอินเดีย

3.1.17 เอนไซม์เซลลูเลส จาก Trichoderma longibrachiatum บริษัท Sigma-Alorich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.18 Glucose buffer

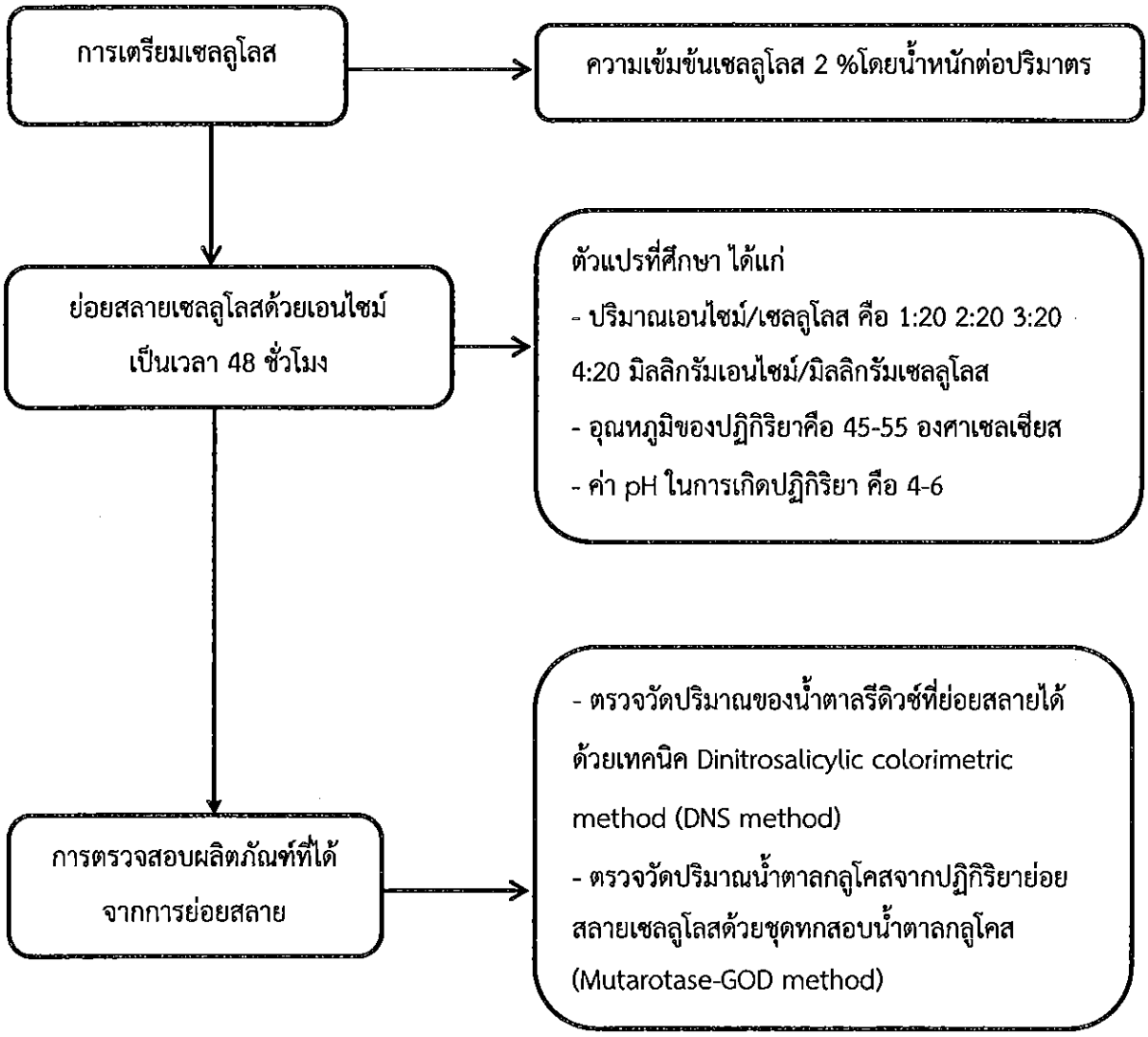
3.1.19 Chomogen reagent

3.1.20 Glucose standard I

3.1.21 Glucose standard II

3.1.22 น้ำกลั่น

3.2 วิธีการทดลอง



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

ในการศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ สามารถสรุปขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยได้ดังรูปที่ 3.1 โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

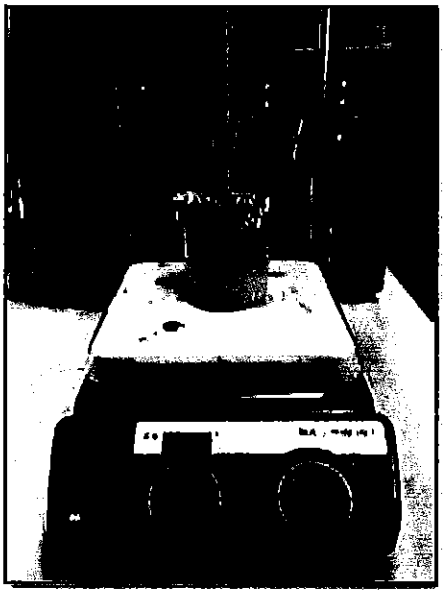
3.3.1 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

การเตรียมเซลลูโลส ในการดำเนินงานวิจัยนี้จะเตรียมเซลลูโลสที่ความเข้มข้น 2%โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำกลั่นโดยใช้ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร โดยการชั่งเซลลูโลส 4 กรัม แล้วเจือจางและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสจะใช้ปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลส เป็น 1:20 2:20 3:20 และ 4:20 มิลลิกรัม ดังนั้น จะต้องเตรียมเอนไซม์ในการทดลองนี้เป็นปริมาณ 200 400 600 และ 800 มิลลิกรัม นำเซลลูโลสที่เตรียมมาปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 4 5 และ 6 โดยใช้สารละลาย Acetate buffer ซึ่งวิธีการเตรียมจะใช้ 0.1M acetic acid และ 0.1M sodium acetate (tri-hydrate) ผสมรวมกันในอัตราส่วนดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

pH	Vol. of 0.1M acetic acid	Vol. of 0.1M sodium acetate
4	847 มิลลิลิตร	153 มิลลิลิตร
5	357 มิลลิลิตร	643 มิลลิลิตร
6	52.2 มิลลิลิตร	947.8 มิลลิลิตร

ในการย่อยสลายจะควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลายที่ 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส จากนั้น เติมเอนไซม์ที่เตรียมไว้ ลงไปเพื่อย่อยสลายบนเครื่อง hot plate และใช้ Magnetic drive ในการปั่นกวน โดยจะใช้เวลาในการย่อยสลาย 0-48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 1 ชั่วโมงใน 13 ชั่วโมงแรกของการทดลอง หลังจากนั้นจะเก็บตัวอย่างทุกๆ 5 ชั่วโมง จนกระทั่งครบ 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และกลูโคสต่อไป



รูปที่ 3.2 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

3.3.2 ตรวจสอบสมบัติของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ย่อยสลายได้ด้วยเทคนิค Dinitrosalicylic colorimetric method

ในการตรวจสอบสมบัติของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ย่อยสลายได้ในงานวิจัยนี้ จะทำการตรวจวัดปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ย่อยสลายได้ด้วยเทคนิค Dinitrosalicylic colorimetric method (DNS method) ทำได้โดยการใช้สารตัวอย่างมาตรฐานมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ดังนี้

3.3.2.1 การเตรียม DNS ทำได้ดังนี้ เตรียมสารละลาย Potassium sodium tartrat 30 กรัม Sodium hydroxide 1 กรัม Sodium sulfite 0.05 กรัม Dinitrosalicylic acid 1 กรัม และ Phenol 0.2 กรัม จากนั้นนำสารละลายข้างต้นมาละลายให้เข้ากันในบีกเกอร์โดยการให้ความร้อน แล้วจึงเติม Phenol ลงไปหลังจากที่สารละลายทั้ง 4 ละลายเข้ากันแล้ว ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดเก็บสาร โดยเก็บให้พ้นแสง

3.3.2.2 เตรียมสารตัวอย่างมาตรฐานคือ กลูโคส ดังนี้ ชั่งกลูโคส 0.05 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วเจือจางกลูโคสด้วยน้ำกลั่นในหลอดทดลอง 10 หลอด ให้ได้ความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 60 70 80 และ 90 %โดยปริมาตรต่อปริมาตร ทำการปิเปตสารละลายที่เตรียมไว้ออกมาหลอดละ 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง แล้วเติม DNS ลงไปหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาทีแล้วพักในน้ำเย็นให้สารละลายอยู่ในอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นลงไปอีก 5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปใส่ Cuvette 3 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ในการคำนวณร้อยละผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์สามารถคำนวณได้ดังสมการ

1923639
25
สำนักหอสมุด
27 มี.ค. 2561

$$\text{ร้อยละผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์}}{\text{ปริมาณเซลลูโลสทั้งหมด}} \times 100$$

3.3.2 ตรวจสอบสมบัติของน้ำตาลกลูโคสที่ย่อยสลายได้ด้วยชุดทดสอบกลูโคส (Mutarotase-GOD method)

ในการตรวจสอบสมบัติของน้ำตาลกลูโคสที่ย่อยสลายได้ในงานวิจัยนี้ จะทำการตรวจวัดปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่ย่อยสลายได้ด้วยชุดทดสอบกลูโคส (Mutarotase-GOD method) ทำได้โดยการใช้สารตัวอย่างมาตรฐานมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ดังนี้

3.3.2.1 เตรียมกราฟมาตรฐานโดยการเจือจาง Glucose standard ด้วยน้ำกลั่นใน Microtubes 6 หลอด ดังนี้

หลอดที่ 1 : Glucose standard I 50 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 150 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นเป็น 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

หลอดที่ 2 : Glucose standard I 100 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นเป็น 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

หลอดที่ 3 : Glucose standard I undiluted จะได้ความเข้มข้นเป็น 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

หลอดที่ 4 : Glucose standard II 150 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นเป็น 300 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

หลอดที่ 5 : Glucose standard II 200 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นเป็น 400 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

หลอดที่ 6 : Glucose standard II undiluted จะได้ความเข้มข้นเป็น 500 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

จากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมไว้ออกมาหลอดละ 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วเติม Chomogen reagent ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปใส่ Cuvette 3 มิลลิลิตร เพื่อวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยใช้ Chomogen reagent เป็น Blank จากนั้นนำมาพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสง ในการคำนวณร้อยละผลได้ของน้ำตาลกลูโคสมารถคำนวณได้ดังสมการ

$$\text{ร้อยละผลได้ของน้ำตาลกลูโคส} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส}}{\text{ปริมาณเซลลูโลสทั้งหมด}} \times 100$$

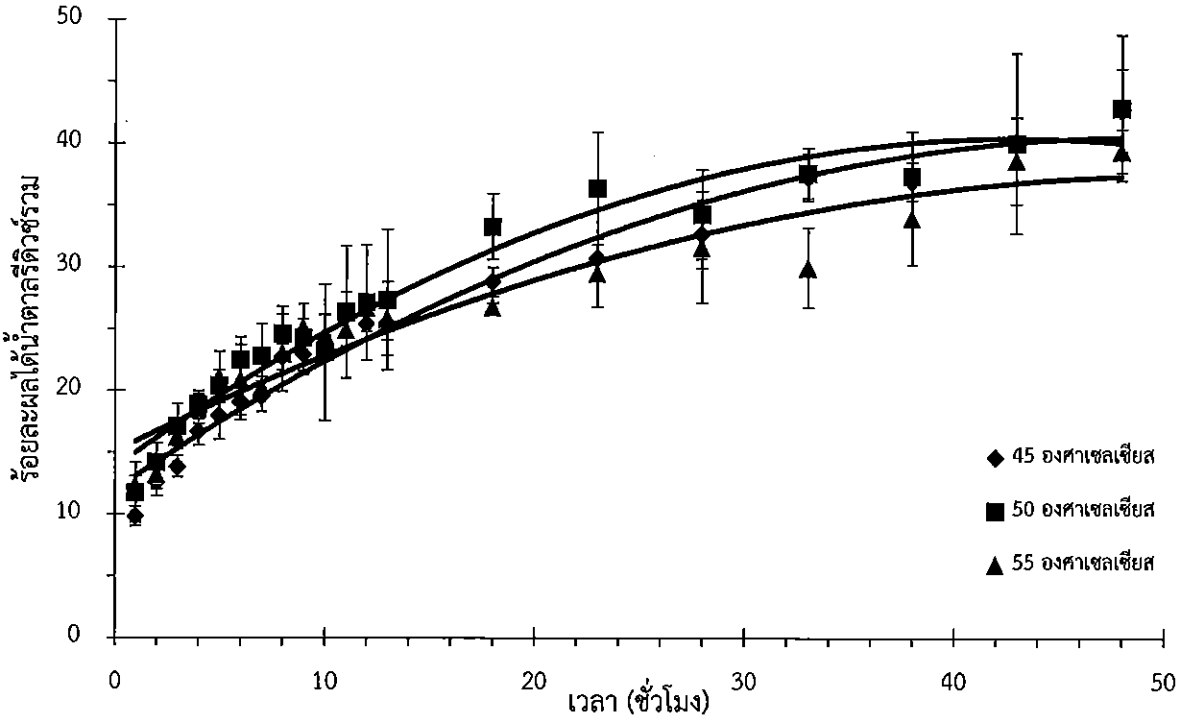
บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิเคราะห์

4.1 การย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์

4.1.1 ผลของอุณหภูมิการเกิดปฏิกิริยาที่มีต่อร้อยละผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์รวม

จากการทดลองผลของอุณหภูมิที่มีต่อร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด โดยการเพิ่มอุณหภูมิจาก 45 เป็น 50 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ผลของอุณหภูมิการเกิดปฏิกิริยาต่อ TRS yield จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์
หมายเหตุ : ย่อยสลายที่ pH 5 และปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสเป็น 1:20 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากกราฟรูปที่ 4.1 พบว่าที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา 45 องศาเซลเซียส ร้อยละผลได้จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา โดยในช่วงเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยาจะให้ค่าร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ในชั่วโมงที่ 43 ร้อยละผลได้สูงสุดคือ 42.7 จากนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียส พบว่าร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยในช่วง 1 ชั่วโมงแรกของการย่อยสลายมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ที่เวลา 38 ชั่วโมง และได้ร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์แรวมสูงสุด 42.9 อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 55 องศาเซลเซียส ส่งผลทำให้ร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมมีแนวโน้มลดลง โดยที่ 1

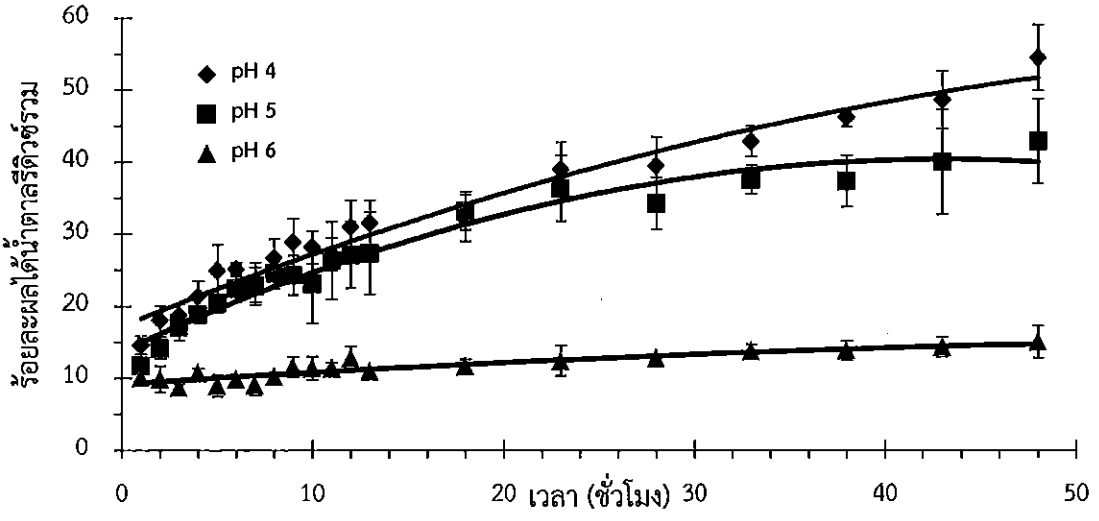
ชั่วโมงแรกของการย่อยสลายมีอัตราการเพิ่มของร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และได้ร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมสูงสุดคือ 39.4

ผลการทดลองบ่งบอกว่าการเพิ่มอุณหภูมิทำให้โมเลกุลของซับสเตรตมีพลังงานมากพอที่จะทำให้กลายเป็นสารที่ถูกกระตุ้นแล้วมีพลังงานสูงและอยู่ในสภาพที่จะเปลี่ยนไปเป็นผลิตผลอย่างรวดเร็วหรือเป็นการเพิ่มพลังงานที่เพียงพอให้กับโมเลกุลในการเข้าปฏิกิริยานั่นเอง [48] แต่อุณหภูมิที่สูงจนเกินไปจะทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนเสื่อมสภาพและเปลี่ยนรูปร่าง กล่าวคือ โมเลกุลเอนไซม์ที่ได้รับความร้อนจะคลายตัวเหยียดออก และ active site เปลี่ยนรูปร่างไป ส่งผลให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้ เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิหนึ่งที่ทำงานได้ดีที่สุดเรียกว่า Optimum temperature ซึ่งกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางภาคผนวก ค-1 [49] ดังนั้นที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ เนื่องจากเอนไซม์ถูกทำลายโครงสร้างส่งผลให้เกิดการย่อยสลายของซับสเตรตได้น้อยลง [50]

นอกจากนั้นแล้วผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Antje และคณะ [48] ที่พบว่าอุณหภูมิจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ คือจะสูญเสียเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส

4.1.2 ผลของค่า pH ในปฏิกิริยาที่มีต่อร้อยละผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์รวม

ค่า pH เป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลาย เนื่องจากจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของกิจกรรมเอนไซม์ รูปที่ 4.2 แสดงผลของค่า pH ในการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส



รูปที่ 4.2 ผลของค่า pH ในปฏิกิริยาต่อ TRS yield จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

หมายเหตุ : ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสเป็น 1:20 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

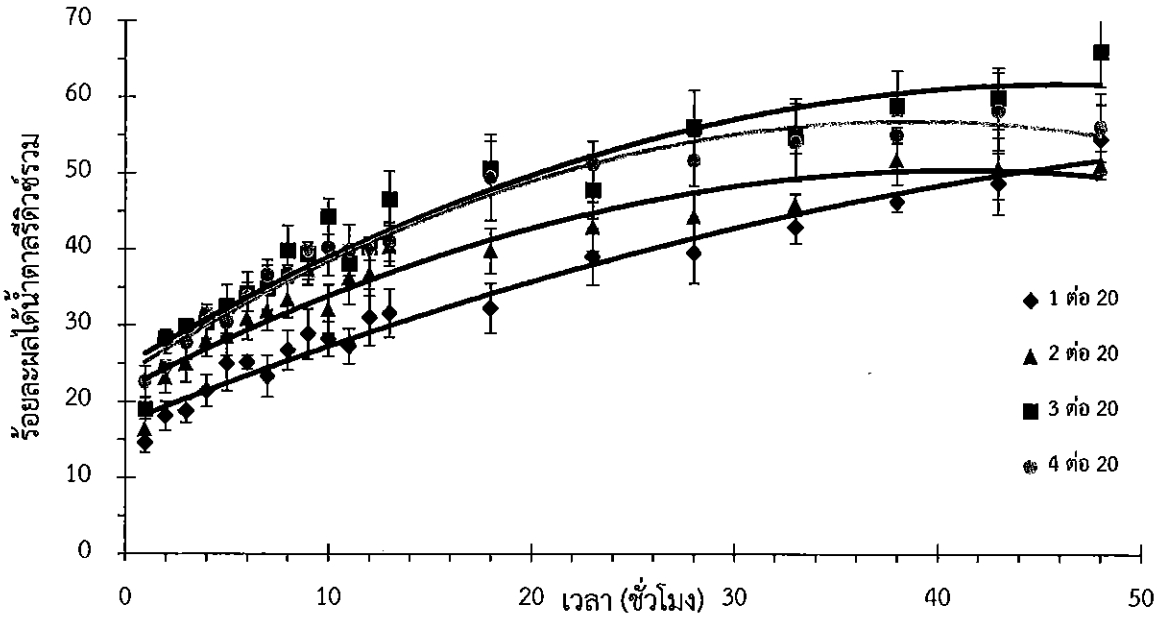
จากกราฟรูปที่ 4.2 พบว่าที่ pH เท่ากับ 6 มีอัตราการย่อยสลายและร้อยละผลได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายมากขึ้น โดยมีค่าร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวม คือ 15.1 เมื่อปรับค่า pH เป็น 5 จะสังเกตเห็นว่าร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 1 ชั่วโมงแรกของการย่อยสลายและเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ โดยเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ที่เวลา 38 ชั่วโมง มีร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมสูงสุด คือ 42.9 จากนั้นเพิ่มค่าความเป็นกรดไปจน pH 4 พบว่าในช่วง 1 ชั่วโมงแรกของการย่อยสลาย อัตราการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมมีค่าสูงเมื่อเทียบกับที่ pH 5 และ pH 6 หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นลดลง อย่างไรก็ตามร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมยังคงมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อปฏิกิริยาดำเนินต่อไปมากกว่า 48 ชั่วโมง และได้ร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมสูงสุดคือ 54.5

ร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมที่แตกต่างกันเมื่อ pH ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสต่างกัน เนื่องจากเอนไซม์จะมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดเรียกว่า Optimum pH และพบว่าในช่วง pH เป็น 4 5 และ 6 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสมีค่าสูงสุดที่ค่า pH เป็น 4 ดังแสดงในตารางภาคผนวค ค-2 [49] โดยความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับซับสเตรต และในการเร่งปฏิกิริยาอาจขึ้นอยู่กับความสมดุลของประจุของหมู่ต่างๆ ในบริเวณเร่งและบริเวณจับของเอนไซม์ รวมทั้งประจุของซับสเตรตเองด้วย ที่ pH ต่ำหรือสูงเกินไปมักทำให้ประจุเปลี่ยนไปจนไม่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยากัน และอาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียรูปร่างสามมิติไปจนทำงานไม่ได้ [46] ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงค่า pH ไปจาก Optimum pH จะส่งผลทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงได้

จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดสูง ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ จุฑามาศ รถา [50] โดยทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนโดกลูคาเนส พบว่าค่าของ pH ต่างๆ จะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสและทำหน่าที่ย่อย β -1, 4-glycosidic bond โดยทำปฏิกิริยาภายในโมเลกุลเซลลูโลสแบบสุ่ม และได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งได้ผลการวิจัยคือ ที่ pH เท่ากับ 4 เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสมากที่สุด

ทั้งนี้ กรดอะซิติกที่ใช้ในสารละลายบัฟเฟอร์จะไม่ส่งผลต่อปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส เนื่องจากเซลลูโลสไม่สามารถละลายได้ในกรดอ่อน อีกทั้งในการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรดเจือจางนั้น ในสภาวะที่ปริมาณสารตั้งต้นน้อยจะต้องใช้อุณหภูมิสูง คือมากกว่า 433 องศาเคลวิน หรือ 160 องศาเซลเซียส แต่ในการทดลองนี้ใช้อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส [12]

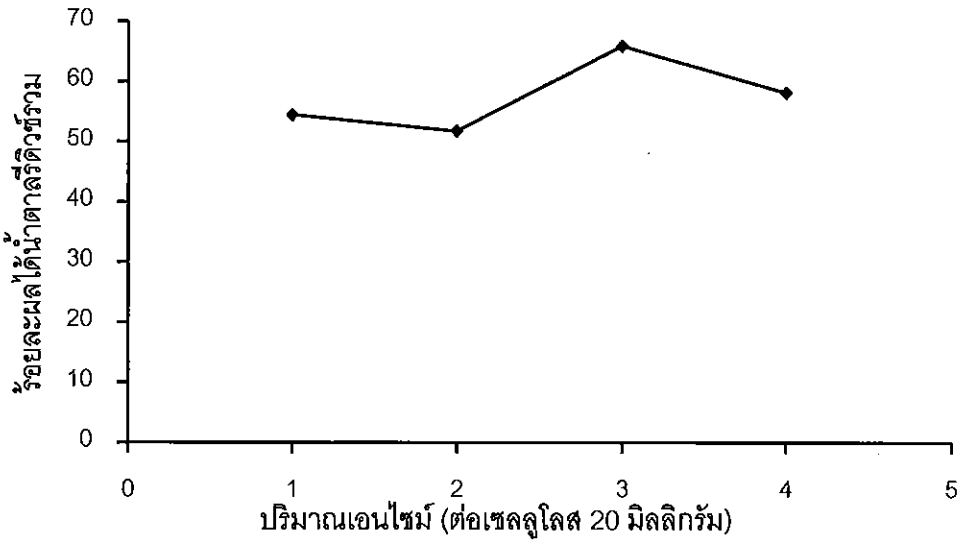
4.1.3 ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสที่มีต่อร้อยละผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์รวม



รูปที่ 4.3 ผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ ในปฏิกิริยาต่อ TRS yield จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์
หมายเหตุ : ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่า pH เท่ากับ 4 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากกราฟรูปที่ 4.3 พบว่าที่ปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณเซลลูโลสเป็น 1:20 มีอัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 1 ชั่วโมงแรกของการย่อยสลาย โดยร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องหากปฏิกิริยาดำเนินต่อไปมากกว่า 48 ชั่วโมง โดยร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมสูงสุดคือ 54.5 เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณเซลลูโลสเป็น 2:20 พบว่าในช่วง 1 ชั่วโมงแรกของการย่อยสลายอัตราการเกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นของเกิดปฏิกิริยาจะช้าลง และเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ที่เวลา 36.5 ชั่วโมง ร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมสูงสุดคือ 51.2 จากนั้นเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณเซลลูโลสเป็น 3:20 ก็จะเห็นว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาและร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มเหมือนผลการทดลองที่ปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณเซลลูโลสเป็น 2:20 แต่อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ช้ากว่าที่เวลา 43 ชั่วโมง ร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 66 อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณเซลลูโลสเป็น 4:20 พบว่าในช่วง 1 ชั่วโมงแรกของการย่อยสลายอัตราการเกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน โดยจะสังเกตเห็นว่าร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมในช่วงเวลา 17.5 ชั่วโมงแรกของการย่อยสลายมีค่าใกล้เคียงกับที่ปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณเซลลูโลสเป็น 3:20 หลังจากนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นน้อยกว่า และเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่เร็วกว่าที่เวลา 34 ชั่วโมง ร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 56.1

ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสที่มีค่าน้อยทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆและต่อเนื่อง อาจเข้าใกล้สมดุลในช่วงหลังชั่วโมงที่ 48 การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสจะทำให้อัตราการปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงต้นของปฏิกิริยา แต่เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไประยะเวลาหนึ่ง อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะช้าลง โดยที่ปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณเซลลูโลสเป็น 2:20 มีร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมน้อยกว่าที่ปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสเป็น 1:20 อาจเพราะเมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นเร็วกว่าทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มากขึ้นจึงส่งผลทำให้เกิดตัวยับยั้งปฏิกิริยาและปริมาณเอนไซม์อาจไม่เพียงพอต่อปริมาณเซลลูโลสทำให้เอนไซม์เป็นตัวจำกัดการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้นปฏิกิริยาจึงเข้าใกล้สมดุลเร็วขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณเซลลูโลสเป็น 3:20 ร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมมีค่ามากขึ้นและเป็นผลการทดลองที่ดีที่สุด ทำให้สามารถสรุปผลการทดลองได้ว่าที่ปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณเซลลูโลสเป็น 3:20 เอนไซม์มีความเหมาะสมกับปริมาณสารตั้งต้นมากที่สุด เนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณเซลลูโลสเป็น 4:20 ร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมจะมีค่าลดลง วิเคราะห์ได้ว่าปริมาณเอนไซม์มีมากเกินไปจนทำให้สารตั้งต้นกลายเป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้และอีกสาเหตุหนึ่งคือเกิดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ที่มีมากขึ้น จากผลการทดลองข้างต้นสามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสและร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวม ได้ดังรูปที่ 4.4 ดังนี้



รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ ในปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

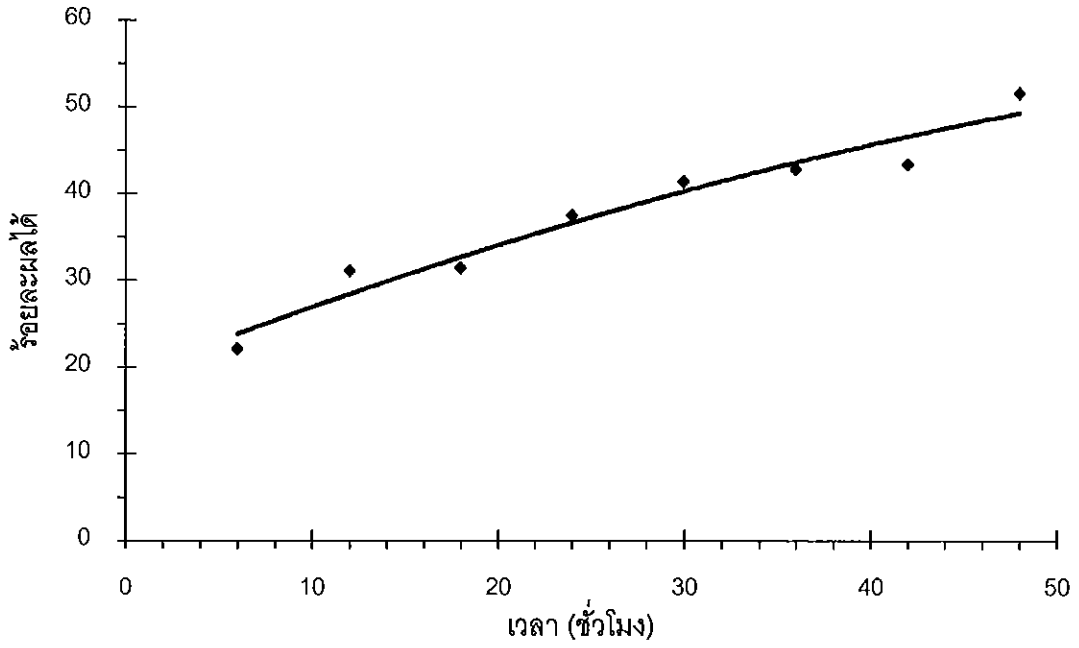
หมายเหตุ : ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่า pH เท่ากับ 4 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

กราฟรูปที่ 4.4 เป็นการสรุปผลจากการทดลองของปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสที่มีต่อร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมสูงสุด ซึ่งสามารถสรุปผลการทดลองและวิเคราะห์ได้ว่า ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเกิดการรวมตัวกันของเอนไซม์และสารตั้งต้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับจำนวนการชนกันของโมเลกุลทั้งสองถ้ามีสารตั้งต้นเพียงพอ เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสจะทำให้อัตราเร็วเพิ่มขึ้นไปด้วย แต่เมื่อมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากจนเกินไป อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเป็นแนวระนาบเพราะสารตั้งต้นเริ่มหมดไป

ทำให้สารตั้งต้นกลายเป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ [51] และอีกสาเหตุหนึ่งคือ เมื่อมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสมากขึ้น จะทำให้มีการสะสมของเซลโลไบโอส ซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ endoglucanase และ exoglucanase ทำให้กิจกรรมเอนไซม์บางส่วนไม่เกิดปฏิกิริยา ส่งผลให้ปฏิกิริยาช้าลงและยุติในที่สุด [3]

4.1.4 ผลการเตรียมน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

จากการทดลองการเตรียมน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยสลายเซลลูโลส ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.5



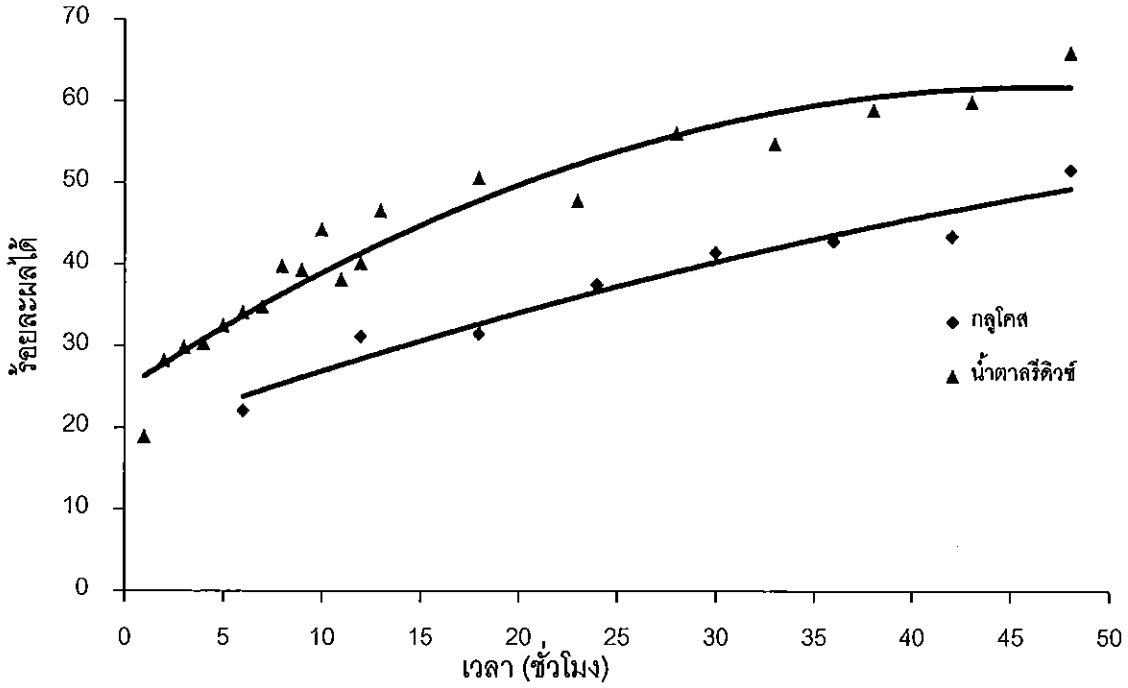
รูปที่ 4.5 ผลของการเตรียมกลูโคสจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

หมายเหตุ : ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสค่า pH เท่ากับ 4 และปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสคือ 3 ต่อ 20 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากกราฟรูปที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอีกหากปฏิกิริยาดำเนินต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากเซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เกิดจากกลูโคสหลายๆ โมเลกุลมาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาว และในการทดลองนี้ ใช้เอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเป็นเอนไซม์จำเพาะที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ดังนั้น ผลการทดลองจึงได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกว่ากระบวนการย่อยสลายจะสิ้นสุดลง ในการทดลองนี้ ใช้ระยะเวลาในการย่อยสลาย 48 ชั่วโมง และมีร้อยละผลได้ของน้ำตาลกลูโคสคือ 51.6

4.1.5 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์รวมและน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

เมื่อนำปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายจากสภาวะที่ดีที่สุดมาเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์รวมที่สภาวะเดียวกัน ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.6 ดังนี้



รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์
หมายเหตุ : ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่า pH เท่ากับ 4 และปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสคือ 3 ต่อ 20 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากกราฟรูปที่ 4.6 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์รวมมีค่ามากกว่าน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากในน้ำตาลรีดิวซ์รวมประกอบด้วยทั้งน้ำตาลโมเลกุลคู่และโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งกลูโคสเป็นองค์ประกอบหนึ่งของน้ำตาลรีดิวซ์เท่านั้น ร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมจึงมีค่ามากกว่า นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่าเส้นกราฟของร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมในช่วงแรกมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไประยะเวลาหนึ่ง อัตราการเกิดปฏิกิริยาช้าลงดังอธิบายไว้ในหัวข้อ 4.1.3 ซึ่งต่างจากเส้นกราฟของกลูโคสที่ยังคงมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในช่วงท้ายของการเกิดปฏิกิริยา น้ำตาลรีดิวซ์ที่เป็นโมเลกุลคู่ถูกย่อยสลายต่อเป็นน้ำตาลกลูโคสจึงส่งผลให้ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสยังคงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่น้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มคงที่

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

จากการทดลองการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณเซลลูโลสเป็น 1:20 2:20 3:20 และ 4:20 ที่อุณหภูมิ 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส สภาวะความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4 5 และ 6 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยไม่มีขั้นตอนการปรับสภาพก่อนการย่อยสลาย พบว่าทั้งสามตัวแปรส่งผลต่อร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวม คือ เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีสภาวะที่สามารถทำงานได้ดีที่สุด และจากผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เอนไซม์เซลลูเลสทำงานได้ดีที่สุดคือ ที่อุณหภูมิปฏิกิริยา 50 องศาเซลเซียส และค่า pH เป็น 4 โดยปริมาณเอนไซม์ต่อเซลลูโลสที่เหมาะสมคือ 3:20 ซึ่งเป็นสภาวะปริมาณเอนไซม์มีความพอดีกับสารตั้งต้นมากที่สุด จากสภาวะการทดลองที่ดีที่สุดนี้มีร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมเท่ากับ 66 นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากสภาวะการย่อยสลายที่ดีที่สุดข้างต้น พบว่ามีร้อยละผลได้น้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 51.6 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์รวมเล็กน้อย

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) เพิ่มระยะเวลาในการทดลองการเตรียมกลูโคสจากการย่อยสลายเซลลูโลสให้มากขึ้น เพื่อดูอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลกลูโคสว่ามีปริมาณสูงสุดที่ระยะเวลาการย่อยสลายเท่าไร

2) หาสภาวะที่เหมาะสมโดยอาศัยการออกแบบการทดลอง Central composite design (CCD) เพื่อหาสภาวะการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เพื่อเตรียมน้ำตาลกลูโคส

เอกสารอ้างอิง

[1] บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. (2009)

[2] archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2552/biol0352sk_ch2.pdf

[3] Fan, L. T., Gharpuray, M. M., Lee, Y-H. Cellulose hydrolysis. Springer-Verlag berlin Heidelberg. London. (1987)

[4] Jacquot, J. E., and Angeles, L. The (Long) road to cellulosic ethanol. Zymetic takes another step with bacterial enzyme mixes. [Online]. Available. (2008)

[5] Goksoyr, J. and Eriksen, J. Cellulase in economic microbiology. Academic Press. New York. (1980)

[6] Anonymous. Cellulose structure. [Online]. Available. (2008)

[7] Anonymous. Mechanism of cellulose hydrolysis. [Online]. Available. (2007)

[8] Palmqvist, E. and Hahn-Hagerdal, B. Fermentation of Lignocel-lulosic Hydrolysates.I. Inhibition and Detoxification. Bioresource Tech.74; (2002): 17-24

[9] Mussatto, S.I., G. Dragone and I.C. Roberto. Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by Candida guilliermondii. Process Biochem. 40; (2005): 3801–3806

[10] Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D., Osborne, J. A comparison of chemical pre-treatment methods for improving saccharification of cotton stalks. Bioresource Technology. 98; (2007): 3000-3011

[11] McMillan, J.D., M.E., Baker, J.O., Overend, R.P., Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. American Chemical Society, Washington, DC. (1994): 292–324

[12] Hamelinck, C. N., van Hooijdonk, G., & Faaij, A. P. Ethanol from lignocellulosic biomass. Techno-economic performance in short, middle, and long term. Biomass and Bioenergy. 28(4); (2005): 384-410

[13] Alexander, M. Introduction to soil microbiology. Toppan Printing Co(S) Pte. Ltd. Singapore. (1967) 169-181

[14] Selby, K. and Maitland, C. C. The cellulase of Trichoderma viridae. Separation of the components involved in the solubilization of cotton. Biochemical Journal. 104(3); (1967): 716-724

[15] Mandels, M. Laboratory procedures in growth, enzyme measurement and related analytical procedure. Unpublished papers, International Courge-Cum-symposium. (1977)

[16] Hankin, L and Anagostakis, S. L. Solid media containing carboxymethycellulose to detect Cx cellulase activity of microorganism. Journal of General Microbiology. 98; (1977):109-115

[17] Apun, K. Cellulase production. National center of biotechnology education. Sarawak. (1995)

[18] Hudson, J. A., Morgan, H. W. and Daniel, R. M. The cellulose activity of an extreme thermopile. Applied Microbiology and Biotechnology. 35; (1991): 270-273

[19] Iwashita, K., Todoroki, K., Kimura, H., Shimoi, H. and Ito, K. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β-glucosidases from Aspergillus kawachii. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 62(10); (1998): 1938-1946

[20] Lee, Y. J., Kim, B. K., Lee, B. H., Jo, K. I. and Lee, N. K. Purification and characterization of cellulase produced by Bacillus amyloliquefaciens DL-3 utilizing rice hull. Bioresource Technology. 99; (2008): 378-386.

[21] Sigh, V. K. and Kumar, A. Production and purification of an extracellular cellulase from Bacillus brevis VS-1. Biochemistry and Molecular Biology International. 45(3); 1998: 443-452

[22] Thomas, K. and Zeikus, J. G. Comparison of extracellular cellulase activites of Clostridium thermocellum LQRI and Trichoderma reesei QM9414. Applied and Environmental Microbiology. 42(2); (1981) :231-240

[23] Goksoyr, J. and Eriksen, J. Cellulase in economic microbiology. Academic Press. New York. (1980)

[24] Larry, T., Bernard, H., Pedro, C., Nathan, E., Steven, H. and Ronald, W. Complete cellulase system in the marine bacterium Saccharophaus degradans strain 2-40T. Journal of Bacteriology. 188(11); (2006) :3849-3861

[25] ระพีพรรณ อินปั๋น. แบคทีเรียในกระเพาะหมักของโคพื้นเมืองและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่แก้ว. (1993)

[26] Huang, J., Sukordhaman, M. and Schell, M. A. Excretion of the egl gene product of Pseudomonas solanacearum. Journal of Bacteriology. 171(7); (1989): 3767-3774

[27] Fergus, C. L. The cellulolytic activity of themophilic fungi and actinomycetes. Mycologia. 61; (1969): 120-129

[28] Bisaria, V. S. and Ghose, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substrate, microorganism, enzyme and product. Enzyme and Microbial Technology. 3(2); (1981): 90-140

[29] ยุพดี ชัยสุขสันต์. เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราTrichoderma viridae สายพันธุ์ TISTR 3161. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. (1984)

[30] พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์.สารานุกรมอาหารออนไลน์เพื่อเสริมสร้างสมรรถนะการเรียนรู้. สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์,สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. (2012)

[31] รัชฎา แก่นเสาร์.ชีวเคมี.สถาบันพระบรมราชนก. (2005):107

[32] ไวยุด๊ะ เหตุเหล๊าะ. สารชีวโมเลกุล (biomolecule): 2009

[33] มนตรี จุฬาวัฒนทล, ยงยุทธ ยุทธวงศ, มรว.ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน, ประหยัด โกมารทัต, ประพนธ วิไลรัตน, สกล พันธุยิ้ม และภิญโญ พานิชพันธ. 2530. ชีวเคมี. ศ.ส.การพิมพ. กรุงเทพมหานคร.

[34] Plumer, D.T. 1987. Biochemistry Analytical. McGraw-Hill Book Company.

[35] LabAssay™ Glucose (Mutarotase-GOD method) . F. LabAssay™ Series of -Biochemical Test Kits. Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Code No. 298-65701

[36] Ramendra Kishor Pal, Chakraborty S. A novel mixing strategy for maximizing yields of glucose and reducing sugar in enzymatic hydrolysis of cellulose. Bioresource Technology 148; (2013): 611–614

[37] Fubao Fuebiol Sun., Hong J., Hu J., Jack N Saddler, Zhang Z., Shen S. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. Enzyme and Microbial Technology. 79–80; (2015): 42–48

[38] Xu G., Chang C., Fan S., Ma X. Cellulose reactivity in ethanol at elevate temperature and the kinetics of one-pot preparation of ethyl levulinate from cellulose. Renewable Energy. 78; (2015): 583-589

[39] Sasaki C., Sumimoto K., Asada C., Nakamura Y. Direct hydrolysis of cellulose to glucose using ultra-high temperature and pressure steam explosion. Carbohydrate Polymers. 89; (2012): 298–301

[40] Ye Z., R. Eric Berson. Factors affecting cellulose hydrolysis based on inactivation of adsorbed enzymes. Bioresource Technology. 167; (2014): 582–586

[41] Gong Y., Zhang C., Yan O., He W., Xiao W., Lin J., Liu Z. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse hemicelluloseusing recombinant glucose oxidase expressed by Pichia pastoris. Industrial Crops and Products. 77; (2015): 458–466

[42] Liu X., Xu Q., Liu J., Yin D., Su S., Ding H. Hydrolysis of cellulose into reducing sugars in ionic liquids. Fuel. 164; (2016): 46–50

[43] Beltramino F., M. Blanca Roncero., Vidal T., Antonio L. Torres., Valls C. Increasing yield of nanocrystalline cellulose preparation process by a cellulase pretreatment. Bioresource Technology. 192; (2015): 574–581

[44] Marcia Maria de Souza Moretti, Daniela Alonso Bocchini-Martins, Christiane da Costa Carreira Nunes, Maria Arvalo Villena, Olavo Micali Perrone, Roberto da Silva, Maurcio Boscolo, Eleni Gomes. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. Applied Energy. 122; (2014): 189–195

[45] B.B.Y. Lau, E.T. Luis, M.M. Hossain, W.E.S. Hart, B. Cencia-Lay, J.J. Black, T.Q. To, L. Aldous. Facile, room-temperature pre-treatment of rice husks with tetrabutylphosphonium hydroxide: Enhanced enzymatic and acid hydrolysis yields. Bioresource Technology. 197; (2015): 252–259

[46] ภิญโญ พานิชพันธ์ และคณะ. เอนไซม์น่ารู้. สถาบันนวัตกรรมการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยมหิดล.

[47] คลังความรู้สู่ความเป็นเลิศทางวิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์และเทคโนโลยี. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์. สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2011)

[48] P. Engel, R. Mladenov, H. Wulfhorst, G. Jäger, A.C. Spiess. Point by point analysis: how ionic liquid affects the enzymatic hydrolysis of native and modified cellulose. Green Chemistry. 12; (2010): 1959–1966

[49] รุสนี โตะกีเล. คุณสมบัติเพื่อการประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมของเอนไซม์ผสมที่ผลิตจากจุลินทรีย์สารเร่ง พด.1 โดยใช้ชานอ้อยและเปลือกถั่วลิสงเป็นแหล่งคาร์บอน. สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (2009)

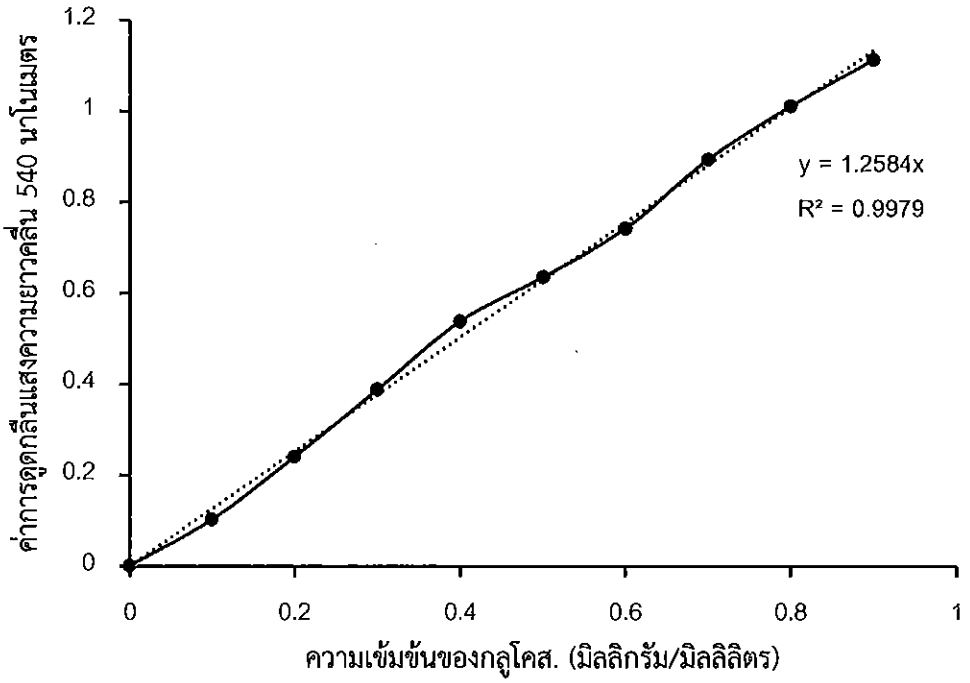
[50] จุฑามาศ รถา. การผลิตเอนโดกลูคาเนสโดยเชื้อราที่แยกจากดิน. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร. (2010): 115-117

[51] ดนัย บุณยเกียรติ. สรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

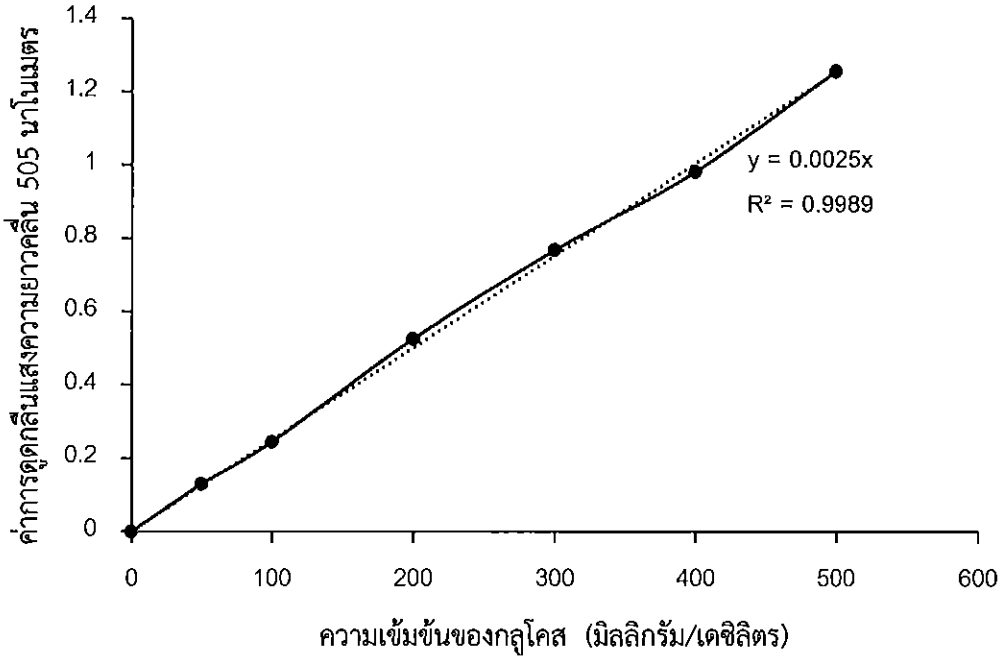
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การตรวจวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย

ภาคผนวก ก-1 กราฟมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในการทดลอง



ภาคผนวก ก-2 กราฟมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสในการทดลอง



ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวก ข-1 ผลความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าที่อุณหภูมิต่างๆ

ระยะเวลาบ่ม(นาที)	30	60	90
อุณหภูมิ	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า (ยูนิต/ลิตร)		
50	264±5.1	222±17	109±0.53
60	252.1±7.6	124±4.41	97.73±1.53
70	243.5±5.25	54.2±1.12	42.9±0.47
80	82.37±0.12	48.1±1.87	38.1±0.76
90	69.8±5.75	36.5±1.15	32.3±0.15
100	30.9±0.51	28.1±0.1	21.1±1.09

ตารางภาคผนวก ข-2 ผลความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าที่ค่า pH ต่างๆ

ระยะเวลาบ่ม(นาที)	30	60	90
พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า (ยูนิต/ลิตร)		
3	257±29.5	233.8±3.87	111±0.22
4	247±2.27	208±5.52	98±1.02
5	243±5.25	109±0.52	91.7±3.41
6	93.6±0.36	80.7±1.58	76.9±2.8
7	56±3.19	51.2±0.6	47.5±1.65
8	42.8±0.36	37±3.33	34.4±1.08
9	31±0.31	28.1±0.9	24.57±0.29
10	27±0.49	21.7±0	20.7±4.23