บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาการย่อยแกลบด้วยเอนไซม์

4.1.1 การทดลองย่อยแกลบที่ผ่านการต้มร่วมกับด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า

ทำการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยการต้มจากกรดไฮโดรคลอริกที่สัดส่วนกรด:น้ำ 1:4 ด้วยเซลลูเลสทางการค้าของบริษัทโนโวอินดัสตรี ประเทศเดนมาร์ก [เซลลูคลาสต์ 1.5 แอล (celluclast 1.5L)] เป็นเวลา 5 วัน (รูปที่ 10) พบว่าแอคติวิตีเอนไซม์มีค่าสูงสุดที่เวลาเริ่มต้น (วันที่ 0) โดยได้ปริมาณ 1.002 หน่วยต่อมล. จากนั้นจะลดลงอย่างต่อเนื่องและเกือบจะเป็นศูนย์ในวันที่ 4 สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะให้ค่าสูงสุดในวันที่ 1 คือ 0.552 มก.ต่อมล. แล้วลดลงอย่างมากและต่อเนื่อง ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับที่อุไรวรรณ ลีลาอดิศร ได้พบ ณ จุดนี้ ผู้วิจัยได้สันนิษฐานว่าการลดลงของแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสนี้อาจมีผลจาก

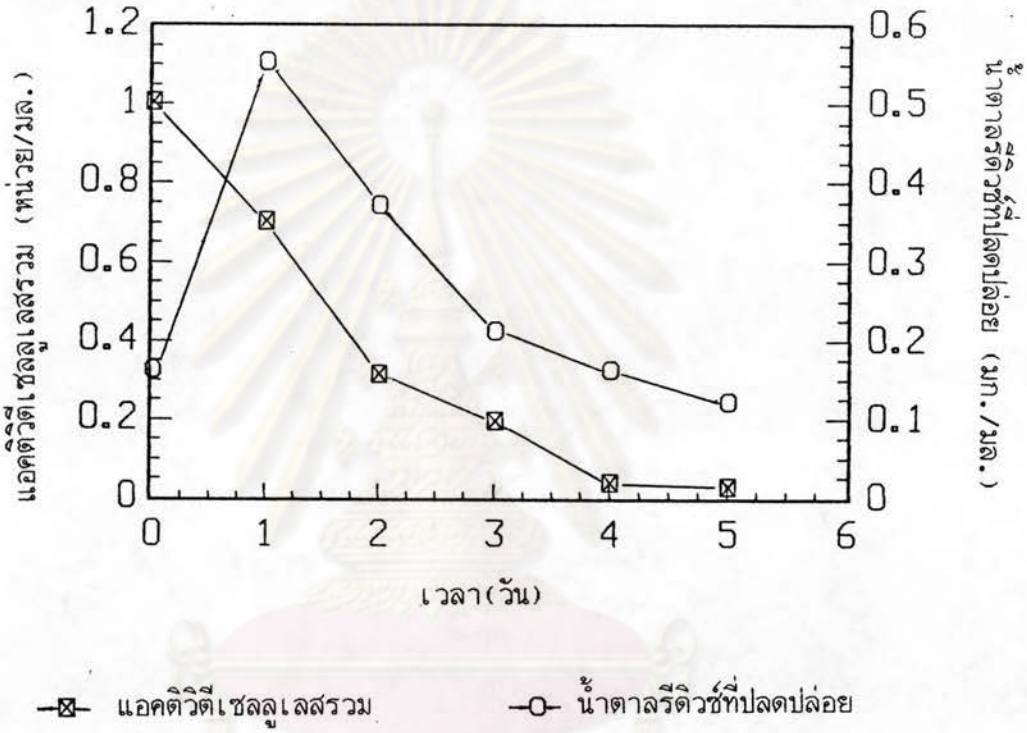
ก. เอนไซม์ เสื่อมสภาพไปตามธรรมชาติในสภาวะการทดลองนี้

ข. ซิลิกาอาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

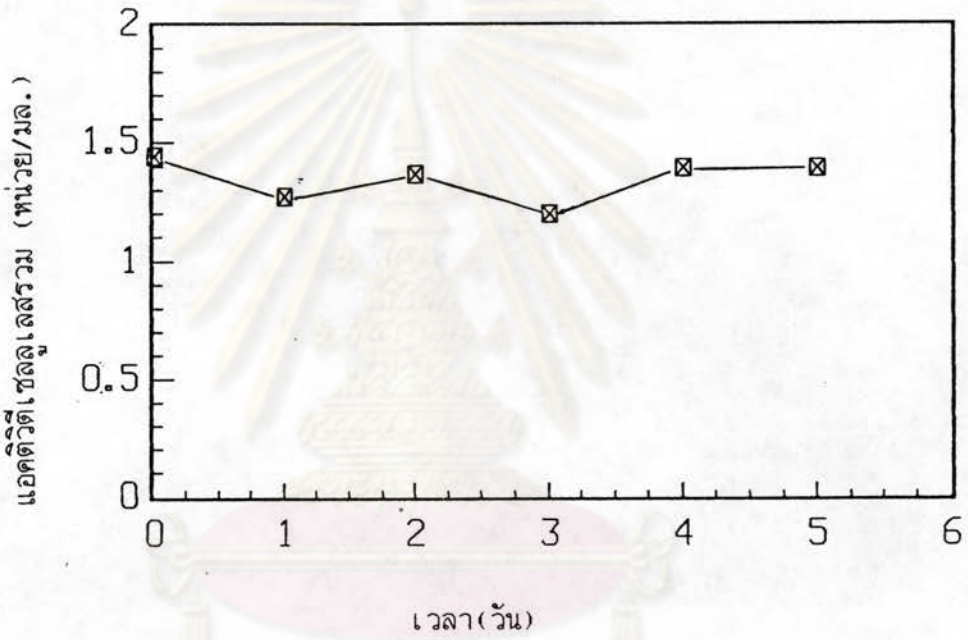
ค. กลไกอื่นมีผลยังยั้งการทำงานของเอนไซม์

4.1.2 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลส

เพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ของข้อสันนิษฐาน ก. ข้างต้น ได้ทำการทดสอบหาความเสถียรของเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะที่ไม่มีแกลบ ตรวจหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในระบบทุก ๆ วัน เป็นเวลา 5 วัน ผลพบว่า เอนไซม์มีความเสถียร โดยมีค่าเอนไซม์แอคติวิตีเกือบจะคงที่ตลอดเวลา 5 วัน (รูปที่ 11) ซึ่งแสดงว่าโดยสภาพปกติเซลลูเลสนี้ค่อนข้างเสถียรไม่เสื่อมสภาพไปได้ง่าย ดังนั้นสาเหตุที่ทำให้ค่าแอคติวิตีเอนไซม์ในระบบลดลง น่าจะมีสาเหตุมาจากปัจจัยอื่นที่ไม่ใช่การเสื่อมสภาพด้วยตัวเองของเอนไซม์



รูปที่ 10. การย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริก โดยใช้ระบบที่ประกอบด้วยแกลบ 4.5 กรัม ในขวดแก้วรูปกรวย ขนาด 250 มล. ปริมาณน้ำชจัดอิออน 50 มล. ความเป็นกรดด่างในช่วง 4.5-4.8 ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 32 หน่วย ที่อุณหภูมิห้อง (29-30°ซ) ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน



รูปที่ 11. แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่อยู่ในระบบและสภาวะเช่นเดียวกับรูปที่ 10 ยกเว้นไม่มีการเติมแกลบลงไป

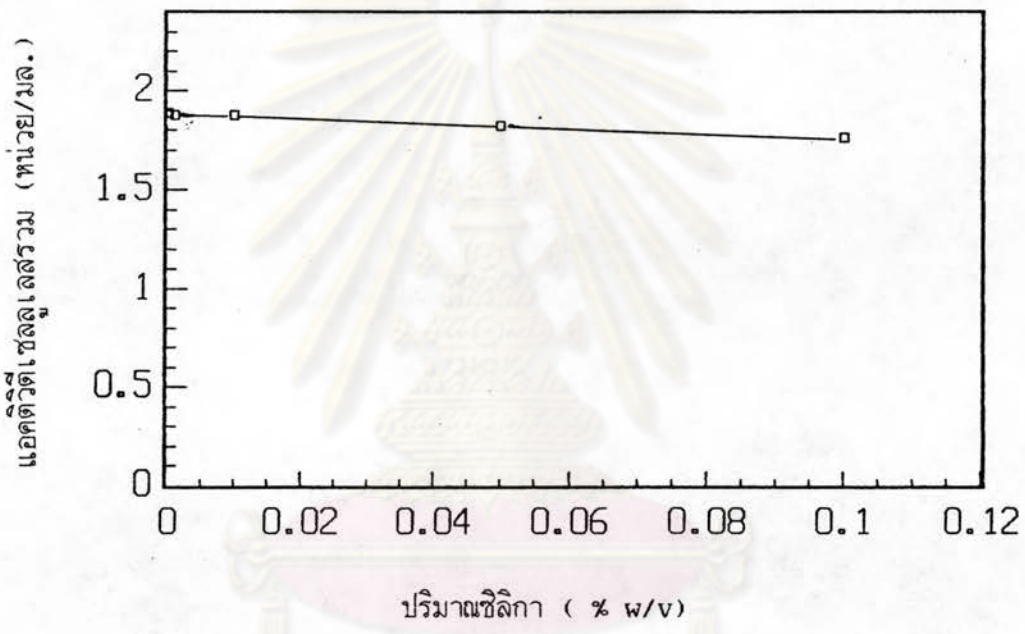
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.3 การศึกษาอิทธิพลของซิลิกาต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

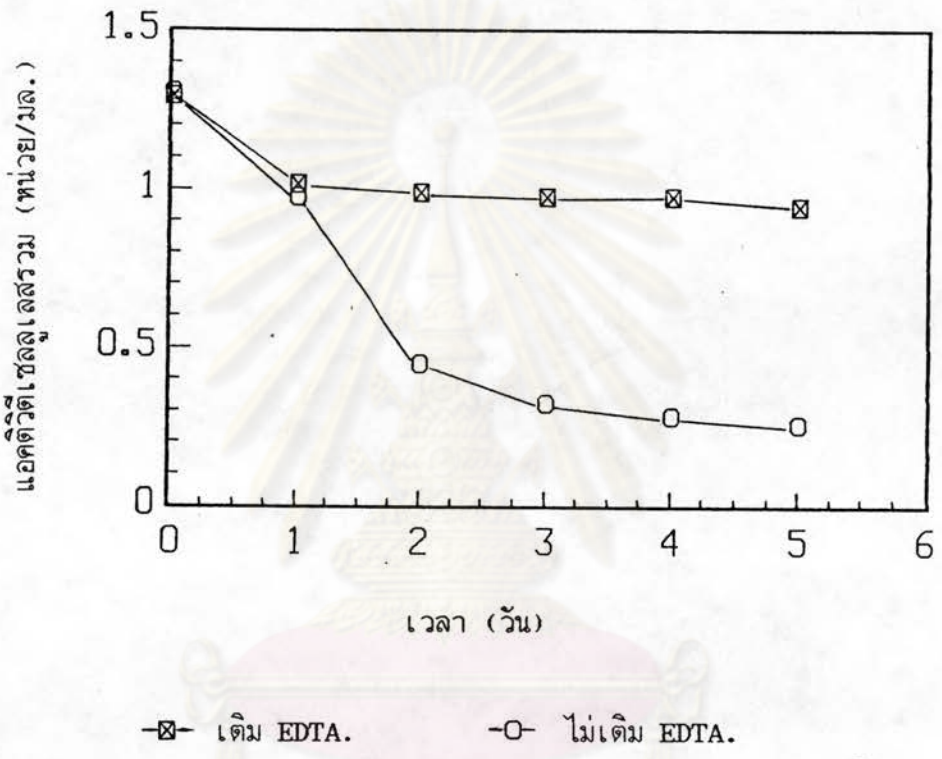
เพื่อทดสอบข้อสันนิษฐาน ข. ที่ว่าการลดลงของเซลลูเลสแอคติวิตี อาจเกิดจากการยับยั้งโดยซิลิกาที่ปลดปล่อยออกจากแกลบเมื่อถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเซลลูเลส การตรวจสอบข้อเท็จจริงนี้จึงทำโดยการเติมซิลิกาลงไปในระบบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และติดตามดูความเสถียรของเอนไซม์ในระบบ พบว่าปริมาณของซิลิกามีผลต่อการทำงานของเอนไซม์บ้างเล็กน้อย กล่าวคือ เมื่อปริมาณของซิลิกามีปริมาณสูงมาก คือ ปริมาณ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะทำให้ค่าแอคติวิตีเอนไซม์ลดลงบ้าง แต่ที่ปริมาณของซิลิกามีค่าต่ำ จะไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากนัก ดังแสดงในรูปที่ 12 ซึ่งระบบในการย่อยแกลบนั้น ซิลิกาที่อยู่ในแกลบจะไม่ละลายออกมาจากแกลบมาก มีบ้างก็เป็นปริมาณน้อย ทั้งนี้เนื่องจากซิลิกานั้นมีความสามารถที่ละลายน้ำได้ต่ำ ดังนั้นซิลิกาจึงไม่น่าเป็นปัจจัยหลักที่จะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

4.1.4 การศึกษาผลการเติมสาร chelating agent ลงในระบบการย่อยแกลบ

จากที่ได้กล่าวแล้วในบทนำว่าแกลบนั้นมีองค์ประกอบทางเคมีด้วยโลหะต่าง ๆ เช่น Fe_2O_3, MgO, Na_2O, Al_2O_3 ซึ่งโลหะหรือออออนเหล่านี้ อาจจะมีผลยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์ได้ข้อเท็จจริงนี้ จึงได้ทดลองเติมสาร chealating agent เพื่อขจัด divalent cation ในระบบ โดยทำการย่อยแกลบที่ผ่านการเตรียมด้วยกรด 2 ระบบ คือ ระบบที่เติมและไม่เติมสาร chelating agent [ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA.)] ลงไปในระบบ ผลการทดลองพบว่า ระบบทั้งสองจะมีค่าแอคติวิตีเอนไซม์ในวันที่ 1 ลดลงจากเวลาเริ่มต้น โดยลดลงมีค่าใกล้เคียงกัน แต่หลังจากวันที่ 1 ระบบที่มีการเติม EDTA. จะยังคงรักษาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไว้ได้โดยจะไม่ลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับระบบที่ไม่ได้เติมสาร EDTA. ลงไปในระบบและพบว่าหลังจากวันที่ 1 ค่าแอคติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 12. แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส ภายหลังเวลา 1 ชม. ในซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8, 10 มล. ที่มีซิลิกาอยู่ปริมาณ 0.001%, 0.01%, 0.1%, โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณเอนไซม์ 63 หน่วย



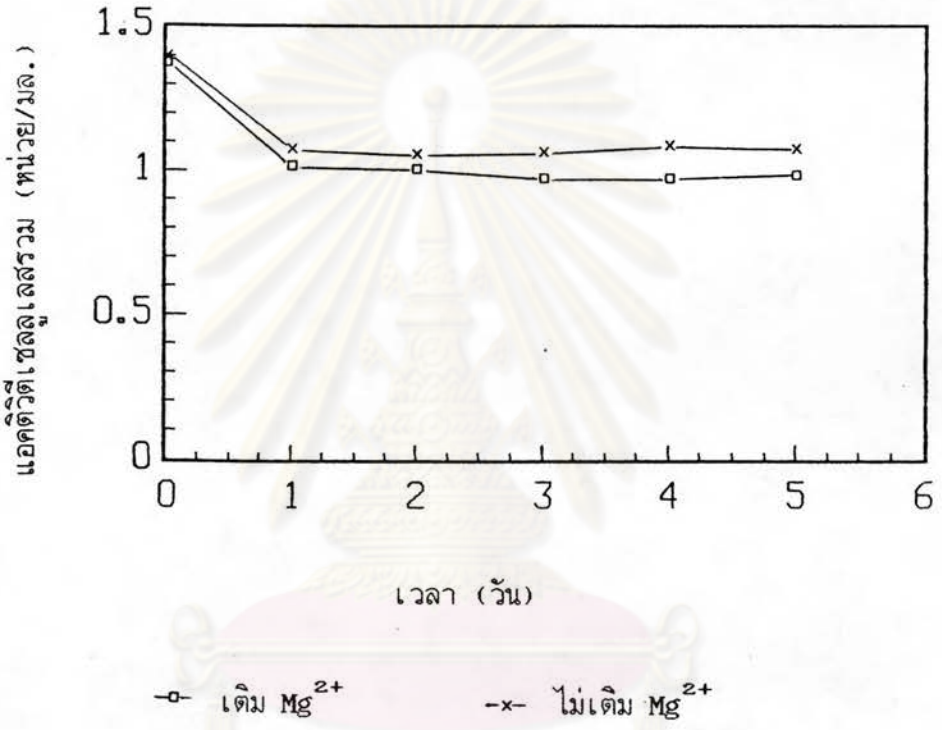
รูปที่ 13. แอคติวิตีเอนไซม์เซลลูเลส ในระบบการย่อยแกลบที่ไม่เติม EDTA. และเติม EDTA. ปริมาณ 0.02 กรัม ปริมาณแกลบ 4.5 กรัม ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. ปริมาณน้ำชจัดอิออน 50 มล. ความเป็นกรดด่างในช่วง4.5-4.8 ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย ในสภาวะอุณหภูมิห้อง (29-30°ซ) ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

4.1.5 การศึกษาผลการเติมแมกนีเซียมอิออน (Mg^{++}) ในระบบการย่อยแกลบภายหลังการเติมสาร chelating agent แล้ว

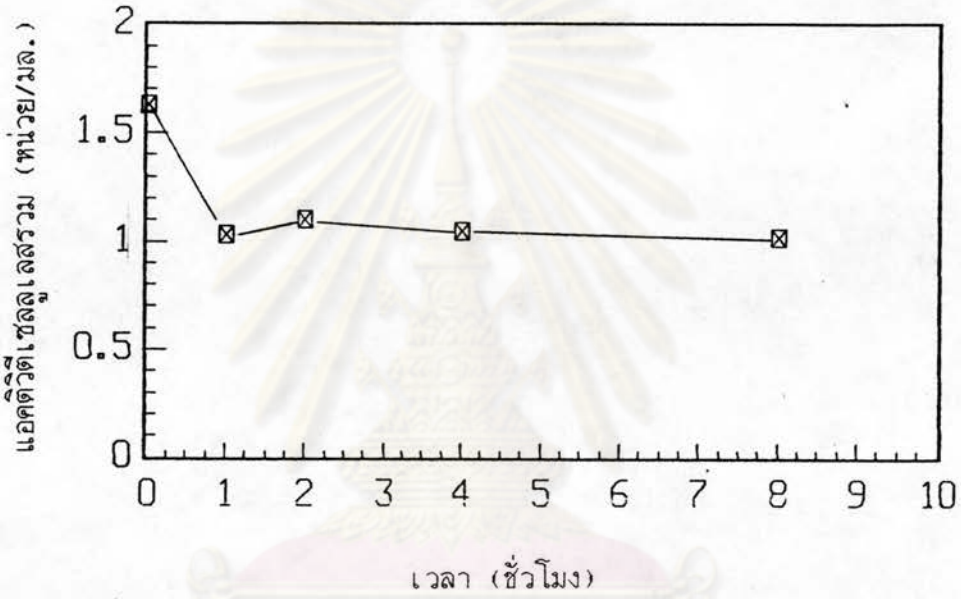
จากการทดลองย่อยแกลบร่วมกับ chelating agent คือ EDTA. ซึ่งทำหน้าที่จับสารไดวาเลนท์ แคทอิออนในสารละลายนั้น เป็นที่ทราบกันว่าไดวาเลนท์ แคทอิออนบางชนิด เช่น (Mg^{++}) มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้น หากธาตุดังกล่าวถูกจับหมดจะทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดี ดังนั้น หากมีการเสริมอิออนเหล่านี้ ลงไปในระบบการย่อยแกลบแล้วอาจทำให้ลดลง การทำงานของเอนไซม์ดีขึ้นได้ จึงได้ทดลองเติมแมกนีเซียมอิออนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปในระบบหลังจากเติม EDTA. เพื่อดูประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์. ผลการทดลองพบว่าระบบการย่อยแกลบทั้ง 2 ระบบ คือ ระบบที่เติมแมกนีเซียมอิออนกับระบบที่ไม่ได้เติมแมกนีเซียมอิออนลงไป ค่าแอคติวิตีเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงที่เหมือนกัน มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยค่าแอคติวิตีเอนไซม์ในระบบที่เติมแมกนีเซียมอิออนจะมีค่าที่ต่ำกว่าเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 14 ซึ่งแสดงว่าการเติมแมกนีเซียมอิออนลงไปในระบบไม่เพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์

4.1.6 การตรวจการเกิดการดูดซับ (adsorption) ของเอนไซม์กับแกลบ

จากการสังเกตในระบบการย่อยที่กระทำพบว่าเอนไซม์และสารต่าง ๆ อาจถูกดูดซับโดยแกลบ ซึ่งมีความสามารถอุ้มน้ำสูง ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการย่อยแบบนี้จะมีผลของการดูดซับเอนไซม์และน้ำตาลรีดิวซ์ ทำให้ค่าของน้ำตาลที่ได้อาจต่ำกว่าความเป็นจริง ส่งผลให้ประสิทธิ-ในการทำงานของเอนไซม์ลดลงด้วย เพื่อเป็นการทดสอบว่าปฏิกิริยาการดูดซับในระบบการย่อยแกลบนี้เกิดจริงหรือไม่ จึงได้ทำการทดลองย่อยแกลบและตรวจหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในช่วงเวลาต่าง ๆ จากการทดลองพบว่าค่าแอคติวิตีเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 1 โดยจากค่าแอคติวิตีเอนไซม์เริ่มต้น 1.61 หน่วยต่อ มล. ลดลงเหลือ 1.023 ในชั่วโมงที่ 1 และจะมีค่าค่อนข้างคงที่ไปในชั่วโมงที่ 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 15 ซึ่งแสดงว่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ลดลงนั้นมีผลจากการดูดซับ (adsorption) ของระหว่างเอนไซม์และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยโดยแกลบ ซึ่งผลลัพธ์อาจทำให้เกิดการบดบังประสิทธิ-ภาพในการทำงานของเอนไซม์ได้



รูปที่ 14 แอคติวิตีเอนไซม์เซลลูเลสที่อยู่ในระบบและสภาวะเช่นเดียวกับรูปที่ 13 เว้นแต่มีการเติมแมกนีเซียมอิออน (Mg^{++}) ปริมาณ 150 ppm ภายหลังการเติม EDTA.



รูปที่ 15. แอคติวิตีเอนไซม์เซลลูเลสในช่วงเวลาที่ 1, 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง ในการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรด ปริมาณ 4.5 กรัม ในขวดแก้วรูปกรวย ขนาด 250 มล. ปริมาณน้ำชจัดอิออน 50 มล. ความเป็นกรดด่างในช่วง 4.5-4.8 ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย ที่อุณหภูมิห้อง (29-30°ซ) ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที

4.1.7 การทดลองลดปริมาณการดูดซับ (adsorption) ของเอนไซม์กับแกลบ

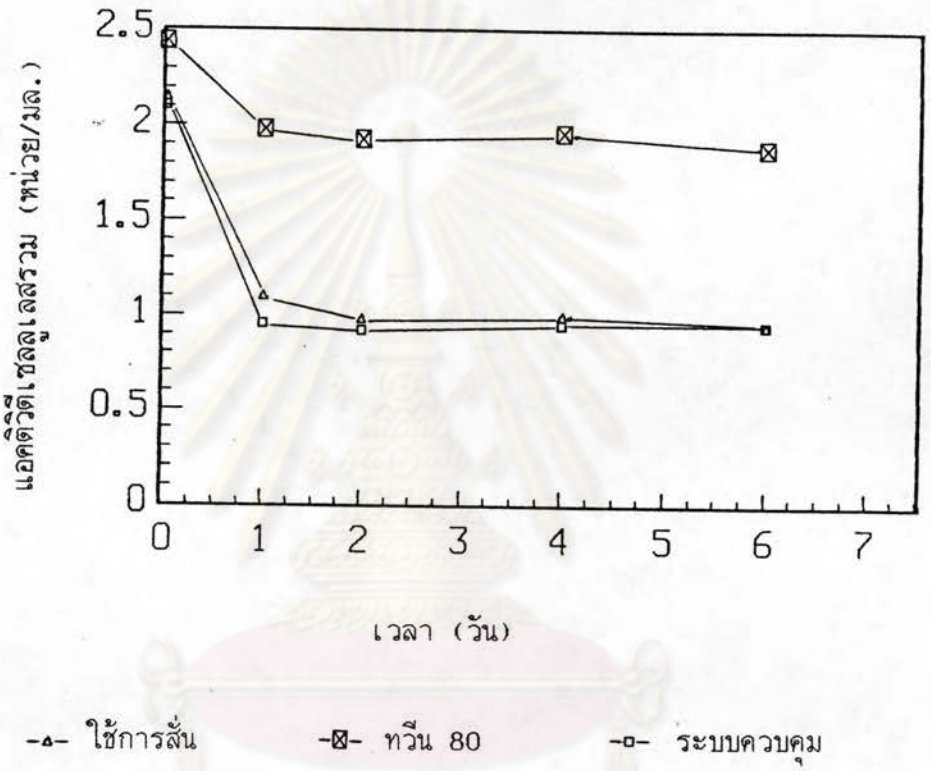
เพื่อลดปริมาณการดูดซับระหว่างเอนไซม์กับแกลบ จึงได้ทดลองเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) คือ ทวีน 80 (Tween 80) ลงไปในระบบ แล้วนำไปสั่นใน sonicatorn bath หลังจากการเติมเอนไซม์แล้วเป็นเวล 10 นาที เปรียบเทียบกับระบบควบคุม ที่ไม่เติมสารลดความตึงผิวและไม่ใช้การสั่น ผลการทดลองพบว่าระบบที่ใช้สารลดความตึงผิวค่าแอคติวิตีเอนไซม์ที่เวลาผ่านไปในช่วงเวลาสั้น ๆ ที่ 1, 2, 4 ชั่วโมง จะมีการลดลงของแอคติวิตีเอนไซม์น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับระบบที่ใช้การสั่นและระบบควบคุม โดยที่เวลาผ่านไป 1 ชม. ค่าแอคติ-วิตีเอนไซม์ลดลงจากเวลาเริ่มต้นชั่วโมงที่ 0 มีค่า 2.43หน่วยต่อมล. ลดลงไปเหลือ 1.97 หน่วยต่อมล.ลดลงไป 18.9% ในขณะที่ระบบการใช้การสั่นแอคติวิตีเอนไซม์ เวลาเริ่มต้นมีค่า 2.13 หน่วยต่อมล. ลดลงไปเหลือ 1.09 หน่วยต่อมล. ลดลงไป 48.8% และระบบควบคุมซึ่งไม่ได้เติมทวีน 80 และไม่ใช่การสั่น ค่าแอคติวิตีเอนไซม์เริ่มต้น 2.09 หน่วยต่อมล. ลดลงไปเหลือ 0.94 หน่วยต่อมล. ลดลงไป 55% และเมื่อเวลาผ่านไปถึง 24 ชั่วโมง. ค่าแอคติวิตีเอนไซม์มีเวลาค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง ดังแสดงในรูปที่ 16

4.1.8 การศึกษาผลของทวีน 80 ต่อการทำงานเซลลูเลส

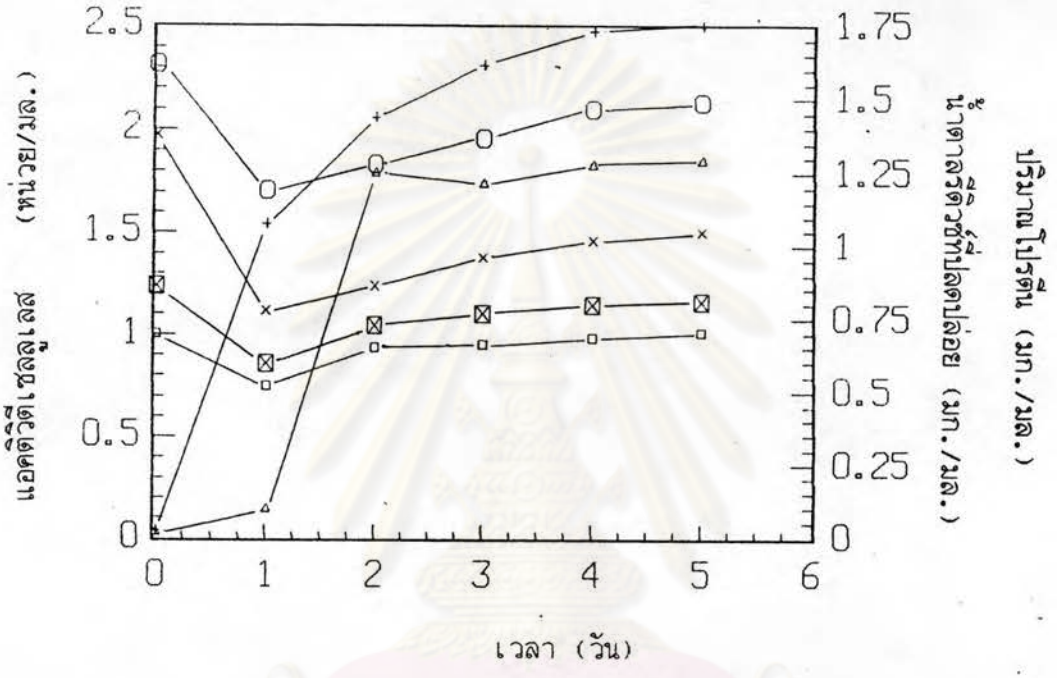
เมื่อเปรียบเทียบการเติมทวีน 80 ลงในระบบการย่อยแกลบด้วยเซลลูเลสกับระบบควบคุมที่ไม่ได้เติม (รูปที่ 17) พบว่าการเติมทวีน 80 ให้แอคติวิตีของเซลลูเลสโดยในวันที่ 5 ของการย่อยให้เซลลูเลสแอคติวิตี 2 หน่วย/มล. เมื่อเทียบกับ 1.45 หน่วยของระบบควบคุมและมีการปลดปล่อยน้ำตาลดิวซ์ที่ดีกว่าระบบควบคุม (1.75 มก./มล. เมื่อเทียบกับ 1.30 มก./มล.) สำหรับปริมาณโปรตีนในระบบทวีน 80 ก็พบสูงกว่า ในระบบควบคุม (0.8 มก./มล. เมื่อเทียบกับ 0.7 มก./มล.) แสดงว่า ทวีน 80 สามารถทำให้โปรตีนซึ่งส่วนหนึ่งคือ เอนไซม์เซลลูเลสปลดปล่อยออกจากการดูดซับได้

4.1.9 การศึกษาเพิ่มปริมาณน้ำต่อประสิทธิภาพในการย่อยแกลบ

เนื่องจากในระบบการย่อยแกลบ มีน้ำในระบบไม่มากนัก เมื่อทำการทดลองย่อยแกลบไปวันที่ 4 หรือ 5 สังเกตุพบว่าลักษณะของผสมของแกลบจะมีลักษณะที่ข้นขึ้นซึ่งอาจทำให้การกระจายตัวของเอนไซม์ในแกลบไม่ทั่วถึง จึงทดลองผันแปรปริมาณน้ำในระบบ โดยให้ปริมาณเอนไซม์คงที่ โดยทำการย่อยแกลบ 4.5 กรัม ในขวดแก้วรูปกรวย ขนาด 250 มล. ที่มีน้ำ



รูปที่ 16. แอคติวิตีเอนไซม์ของระบบการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรด 3 ระบบคือ เติม ทวีน 80, การใช้การสั่น, ระบบควบคุมไม่ได้เติมทวีน 80 และการสั่น ปริมาณแกลบ 4.5 กรัม ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. ปริมาณน้ำขจัดอิออน 50 มล. ความเป็นกรดด่างในช่วง 4.5-4.8 ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย ในสภาวะอุณหภูมิห้องภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที.



-O- เซลลูเลส ระบบทวีน 80
-⊠- โปรตีนระบบทวีน 80
-+- น้ำตาลรีดิวซ์ระบบทวีน 80
-×- เซลลูเลส ระบบควบคุม
-□- โปรตีนระบบควบคุม
-△- น้ำตาลรีดิวซ์ระบบควบคุม

รูปที่ 17 แอคติวิตีเอนไซม์, ค่าโปรตีน, น้ำตาลรีดิวซ์ ในการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดปริมาณ 4.5 กรัม ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. ปริมาณน้ำขจัดอิออน 50 มล. ปริมาณทวีน 0.02 มล. ความเป็นกรดด่างในช่วง 4.5-4.8 ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย ในสภาวะอุณหภูมิห้องภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที.

ชจัดอิออนปริมาณ 50, 60 และ 70 มล. ตามลำดับและเติมเอนไซม์ 42 หน่วย ลงในทุกระบบ ผลการทดลองในรูปที่ 18 พบว่า ค่าเอนไซม์แอคติวิตี ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อย มีความสอดคล้องกัน โดยที่ระบบที่มีน้ำน้อยจะมีเอนไซม์แอคติวิตีสูง และปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์สูงตามอย่างไรก็ตามเมื่อคำนวนถึงเอนไซม์แอคติวิตีและน้ำตาลรวมในระบบ (ตารางที่11) พบว่าให้ผลใกล้เคียงกันมากแสดงว่าการเจือจางระบบด้วยน้ำ ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

ตารางที่ 11 แสดงค่าแอคติวิตีเอนไซม์ และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากระบบการย่อยแกลบ ซึ่งใช้ปริมาณน้ำ 50, 60 และ 70 มล. ในระบบการย่อยแกลบ

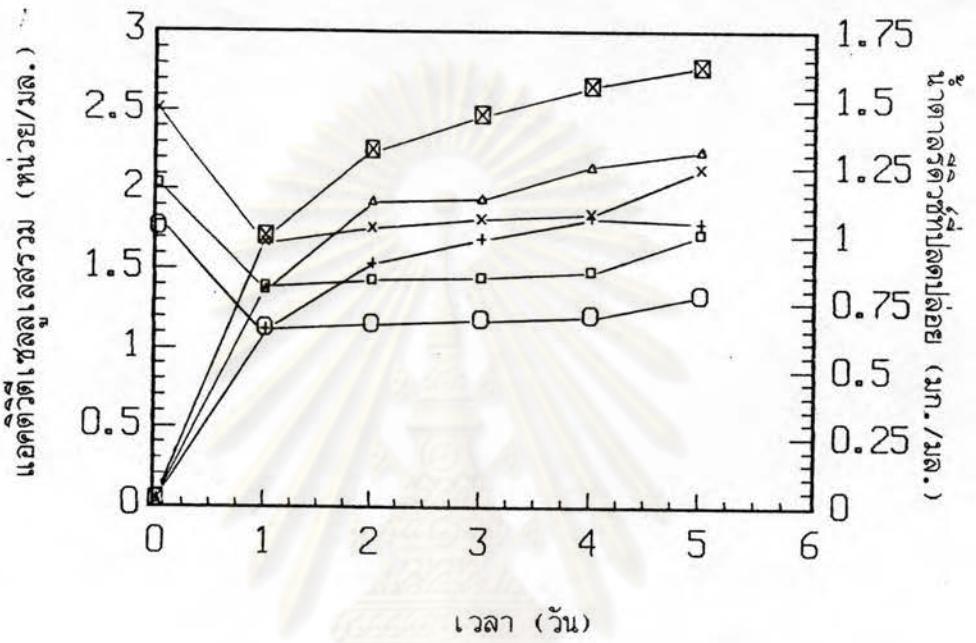
ปริมาณน้ำในระบบการย่อย (มล.)	น้ำตาลรีดิวซ์ในระบบ (มก. ต่อ มล.)	น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดในระบบ (มก.)	แอคติวิตีเอนไซม์ในระบบ (หน่วยต่อมล.)	แอคติวิตีเอนไซม์ทั้งหมดในระบบ (หน่วย)
50	1.619	80.95	2.50	125.0
60	1.038	78.83	2.03	121.8
70	1.039	72.73	1.76	123.2

4.1.10 ปริมาณของทวีน 80 ต่อการย่อยแกลบด้วยเซลลูเลส

ผลการทดลองศึกษาปริมาณของทวีน 80 ต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดที่เวลา 24 ชม. พบว่าที่ความเข้มข้นของทวีน 80 จาก 0.02 ถึง 0.10% (v/v) แอคติวิตีของเอนไซม์และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของทวีน 80 ที่ใช้ แต่เมื่อถึง 0.10% แล้วการเพิ่มของปริมาณ 80 ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อแอคติวิตีของเอนไซม์และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อย (รูปที่ 19)

4.1.11 ผลของปริมาณ EDTA. ต่อการย่อยแกลบโดยเซลลูเลส

ทำการทดลอง ผลของปริมาณ ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA.) ต่อการย่อยแกลบด้วยเซลลูเลส ใช้ EDTA. 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08%

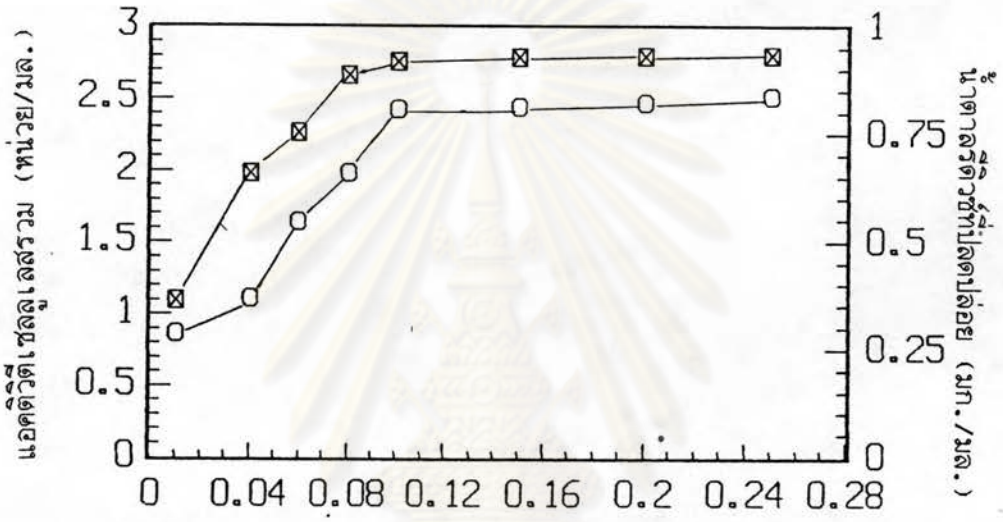


-x- เซลลูเลสระบบ 50 มล. -⊠- น้ำตาลรีดิวซ์ระบบ 50 มล.

-□- เซลลูเลสระบบ 60 มล. -△- น้ำตาลรีดิวซ์ระบบ 60 มล.

-○- เซลลูเลสระบบ 70 มล. -+- น้ำตาลรีดิวซ์ระบบ 70 มล.

รูปที่ 18. ผลการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรด 3 ระบบ คือ ปริมาณน้ำชจัดอิออน 50 มล., 60 มล. และ 70 มล. ปริมาณแกลบ 4.5 กรัม ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. ปริมาณทวีน 80, 0.02 มล. ความเป็นกรดและด่างในช่วง 4.5-4.8 ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย ในสภาวะอุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

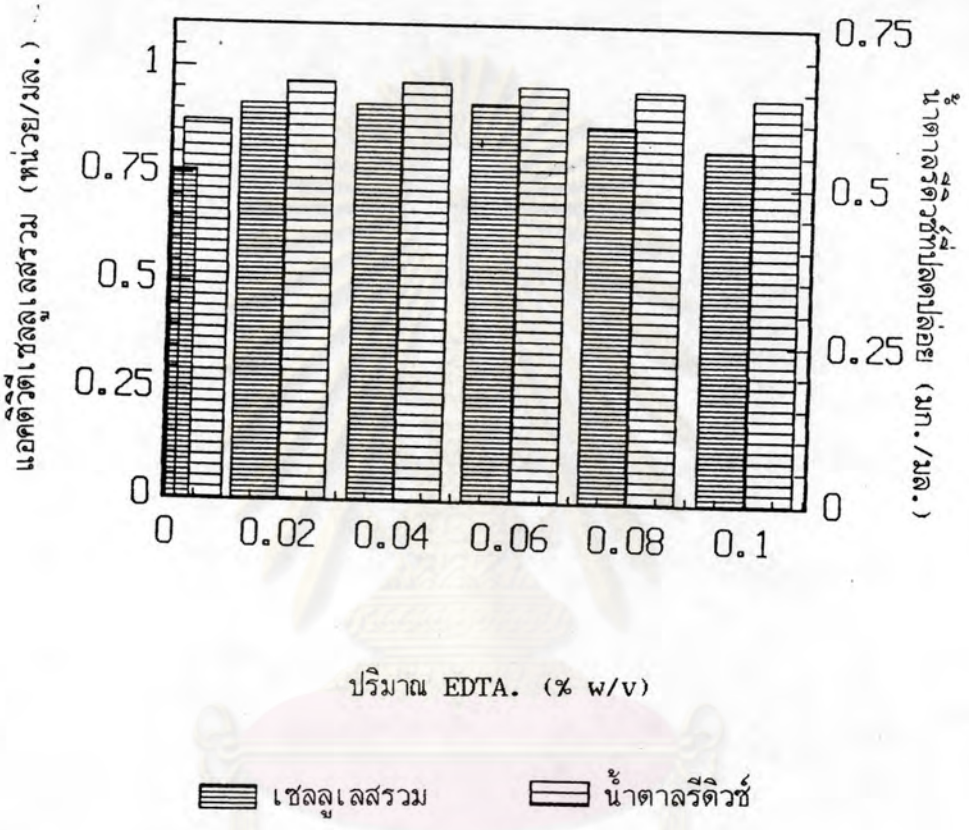


รูปที่ 19. แอคติวิตีเอนไซม์ลูเลสและน้ำตาลรีดิวซ์ในการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดปริมาณ 4.5 กรัม ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. ปริมาณน้ำชจัดอิออน 50 มล. ปริมาณทวีน 80 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08%, 0.1%, 0.15%, 0.2% และ 0.25% โดยปริมาตร ความเป็นกรดด่างในช่วง 4.5-4.8 ปริมาณเอนไซม์ 42 หน่วย ในสภาวะอุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

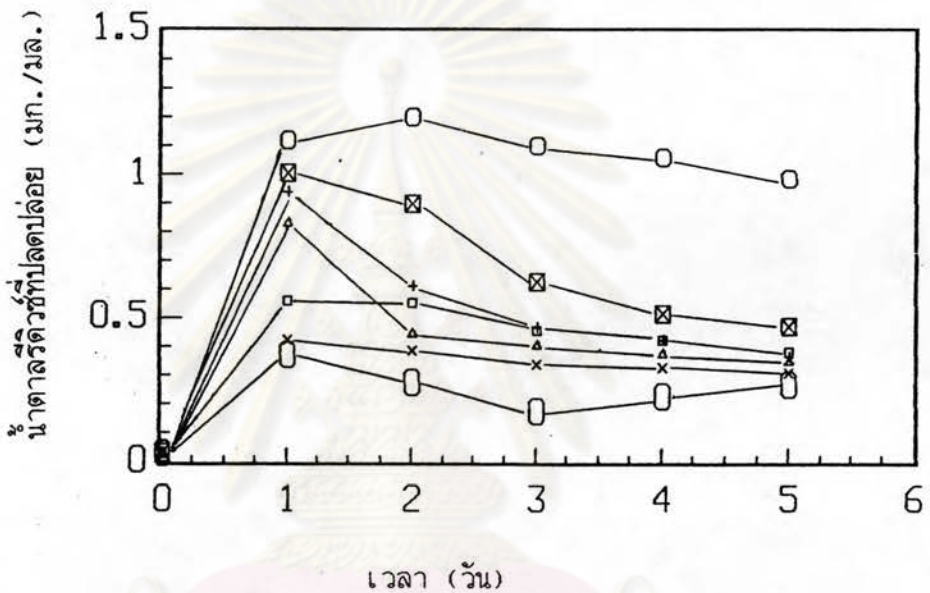
และ 0.1% น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าที่ความเข้มข้นของ EDTA. ที่ 0.02 % ทำให้เพิ่มค่าเอนไซม์แอคติวิตีสูงขึ้น 20.25 % จากระบบควบคุมที่ไม่ได้เติม EDTA. แต่เมื่อปริมาณ EDTA. เพิ่มขึ้น แอคติวิตีของเอนไซม์จะไม่เพิ่มขึ้นและลดลง โดยที่ปริมาณ EDTA. 0.02% และ 0.1% (w/v) มีค่าเอนไซม์แอคติวิตีเท่ากับ 0.916 และ 0.82 หน่วย/มล.ตามลำดับ (รูปที่ 20)

4.1.12 การย่อยแกลบที่เตรียมโดยไม่ใช้กรดเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้กรด

สืบเนื่องจากการปรับสภาพที่ใช้กรดนั้นในระดับอุตสาหกรรม จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ใช้เหล็กปลอดสนิม ซึ่งมีราคาแพง การศึกษาครั้งนี้จึงได้พยายามทดลองหาสภาพการเตรียมแกลบโดยไม่ต้องใช้กรด เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาข้างต้น ดังนั้นจึงทำการศึกษาโดยเริ่มด้วยการทดลองเตรียมแกลบ โดยวิธีต่าง ๆ ที่ไม่ได้ใช้กรดอันได้แก่ การต้มที่เวลาต่าง ๆ การ autoclave ที่เวลาต่าง ๆ แล้วย่อยต่อด้วยเซลลูเลส ผลการย่อยในรูปน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกได้แสดงไว้ในตารางที่ 12 พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้สูงสุดในการย่อยแกลบชนิดต่าง ๆ เรียงจากมากไปหาน้อย คือ แกลบที่เตรียมด้วยกรด, แกลบ autoclave 2 ชม., แกลบ autoclave 1 ชม. แกลบ autoclave 1/2 ชม., แกลบต้ม 6 ชม., แกลบต้ม 3 ชม., และระบบควบคุมคือแกลบดิบที่ไม่ได้เติม EDTA.และ ทวีน 80 โดยค่าน้ำตาลรีดิวซ์ในการย่อยแกลบที่เตรียมโดยไม่ใช้กรดจะมีค่าสูงสุดในวันที่ 1 และหลังจากนั้นจะมีค่าลดลง ส่วนแกลบที่เตรียมโดยกรดจะมีค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในวันที่ 2 จากนั้นจะมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 21 ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์ในระบบการย่อยแกลบที่เตรียมโดยไม่ใช้กรดจะมีค่าที่สูงกว่าในระบบการย่อยที่เตรียมด้วยกรด ทั้งนี้เนื่องจากการปรับสภาพแกลบด้วยกรด จะทำให้แกลบมีโครงสร้างที่เป็นรูพรุนมาก จึงเกิดการดูดซับของเอนไซม์ได้มากกว่าแกลบที่ใช้การปรับสภาพโดยไม่ใช้กรดซึ่งการเป็นรูพรุนน้อยกว่า ทำให้มีการดูดซับของเอนไซม์น้อยกว่า จึงมีปริมาณเอนไซม์ที่สูงกว่าสำหรับการปรับสภาพแกลบวิธีอื่น ก็ให้ผลที่สอดคล้องกันโดยหากใช้เวลาการปรับสภาพที่นาน จะทำให้โครงสร้างของแกลบเป็นรูพรุน ดังนั้นส่วนหนึ่งของเอนไซม์จะถูกดูดซับอยู่ในแกลบ การหาปริมาณของเอนไซม์ในระบบ จึงพบว่าต่ำกว่ากรณีที่ใช้เวลาน้อยซึ่งมีรูพรุนน้อยการดูดซับจึงเกิดน้อยตามไปด้วย ส่วนในกรณีของน้ำตาลรีดิวซ์นั้น ในกรณีแรกเมื่อเอนไซม์แทรกตัวเข้าไปในแกลบได้ดีย่อมสลายเซลลูโลสของแกลบและปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีกว่ากรณีหลังที่เข้าทำงานของเอนไซม์เกิดได้ไม่ดี เช่นการย่อยแกลบที่ต้ม 6 ชม. จะมีแอคติวิตีเอนไซม์ในระบบต่ำกว่า แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะสูงกว่า การย่อยแกลบต้ม 3 ชม. ดังแสดงในรูปที่ 22



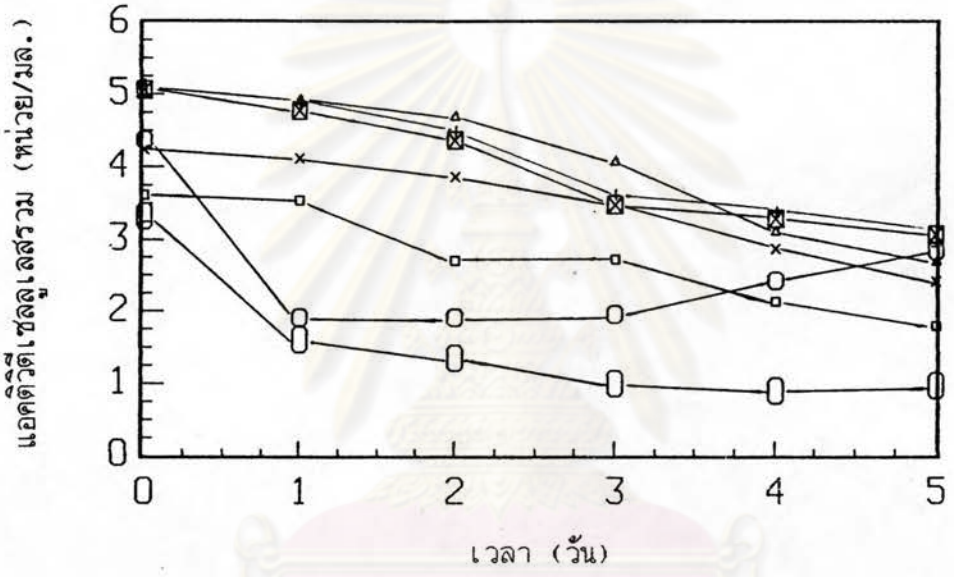
รูปที่ 20. แอคติวิตีของเอนไซม์และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรด ปริมาณแกลบที่ใช้คือ 4.5 กรัม ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. ที่มีน้ำ ชจัดอิออน 50 มล. แปรผันความเข้มข้นของ EDTA. 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% และ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเป็นกรดด่าง ในช่วง 4.5-4.8 และปริมาณเซลลูเลส 42 หน่วย. ในสภาวะอุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่เวลา 48 ชม.



-△- autoclave 30 นาที -+- autoclave 1 ชม. -⊠- autoclave 2 ชม.
-×- ต้ม 3 ชม. -□- ต้ม 6ชม. -O- กรด HCl
-O- แกลบดิบไม่เติม EDTA., ทวีน 80

รูปที่ 21. ปริมาณแกลบ 4.5 กรัม ในขวดแก้วรูปกรวย ขนาด 250 มล.น้ำขจัดอิออน 50 มล.EDTA. ปริมาณ 0.01 กรัม ทวีน 80 ปริมาณ 0.02 มล.ความเป็นกรดด่าง 4.5-4.8 ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 42 หน่วย ในสภาวะอุณหภูมิ-ห้องภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



-▵- autoclave 30 นาที -+- autoclave 1 ชม. -⊠- autoclave 2 ชม.
-x- ต้ม 3 ชม. -□- ต้ม 6ชม. -O- กรด HCl
-O- แกลบดิบไม่เติม EDTA.,ทวีน 80

รูปที่ 22. แอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ในระบบการย่อยแกลบชนิดต่าง ๆ ในสภาวะการย่อยแกลบของรูปที่ 21

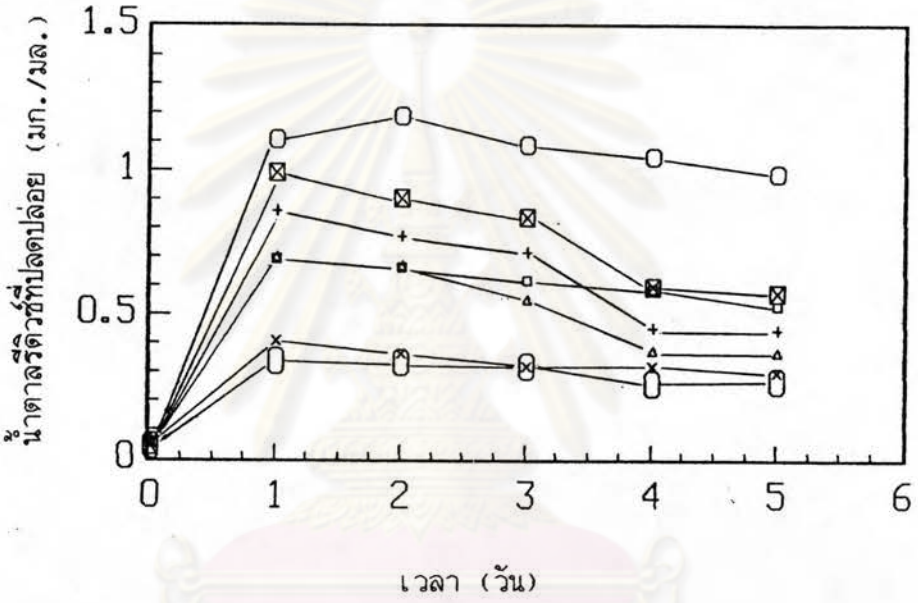
ตารางที่ 12 แสดงค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ได้ ในระบบการย่อยแกลบชนิดต่าง ๆ ปริมาณแกลบ 4.5 กรัม ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. น้ำขจัดอิออนปริมาณ 50 มล. ทวีน 80 ปริมาณ 0.02 มล. ความเป็นกรดด่างในช่วง 4.5-4.8 ปริมาณเอนไซม์เซลลูคลาสต์ 42 หน่วย ในสภาวะอุณหภูมิห้องภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที

แกลบชนิดต่าง ๆ	น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด (มก.ต่อมล.)	คิดเป็น %*
1. แกลบเตรียมด้วยกรด HCl	1.19	100
2. แกลบ autoclave 2 ชม.	0.997	83.37
3. แกลบ autoclave 1 ชม.	0.929	78.06
4. แกลบ autoclave 1/2 ชม.	0.826	69.41
5. แกลบต้ม 6 ชม.	0.551	46.30
6. แกลบต้ม 3 ชม.	0.460	38.65
7. แกลบดิบ (ไม่เติมEDTA,ทวีน80)	0.364	30.58

* เปรียบเทียบกับแกลบเตรียมด้วยกรด HCl

4.1.13 การทดลองย่อยแกลบที่ไม่ได้เตรียมด้วยกรดโดยในบัฟเฟอร์

เนื่องจากการทดลองย่อยแกลบที่เตรียมโดยไม่ใช้กรด นั้นพบว่าค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของน้ำในการย่อยแกลบมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 4.5 เพิ่มขึ้นไปเป็นเกือบ 6.5 ซึ่งมีค่าแตกต่างจากค่าที่ควบคุม ดังนั้นจึงมีข้อสันนิษฐานว่า การใช้บัฟเฟอร์เพื่อรักษาสภาพความเป็นกรดด่างที่ค่อนข้างคงที่จะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยจะดีขึ้นหรือไม่ โดยใช้ซิเตรทบัฟเฟอร์และซิเตรทบัฟเฟอร์ดัดแปลง โดยใช้แอมโมเนียมซิเตรทแทนโซเดียมซิเตรท เนื่องจากในซิเตรทบัฟเฟอร์ปกติที่ใช้โซเดียมซิเตรท จะให้โซเดียมอิออน (Na^+) ซึ่งจะมีผลทำให้ซิลิกาที่ได้ไม่บริสุทธิ์ ผลการทดลอง (รูปที่ 23, 24, 25 และ 26) พบว่าการควบคุมความเป็นกรดด่างให้อยู่ที่ 4.8 โดยใช้ซิเตรทบัฟเฟอร์ทั้งสองชนิดให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยและเอนไซม์แอคติวิตีที่เหมือนกัน และใกล้เคียง

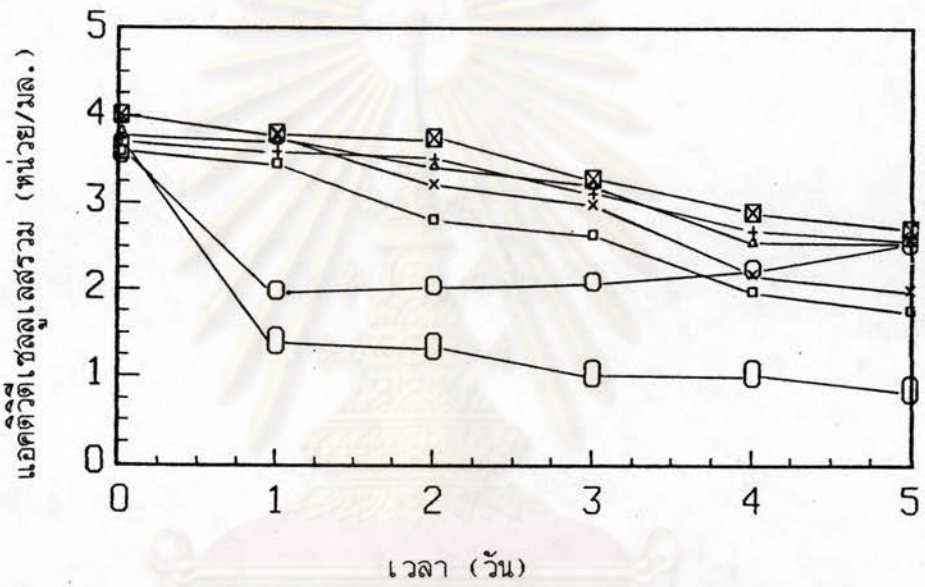


-△- autoclave 30 นาที -+- autoclave 1 ชม. -⊠- autoclave 2 ชม.

-x- ต้ม 3 ชม. -□- ต้ม 6ชม. -O- กรด HCl

-O- แกลบดิบไม่เติม EDTA, ทวีน 80

รูปที่ 23 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยในระบบการย่อยแกลบชนิดต่าง ๆ สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับรูปที่ 21 เว้นแต่ใช้ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8 แทนน้ำขจัดอิออน

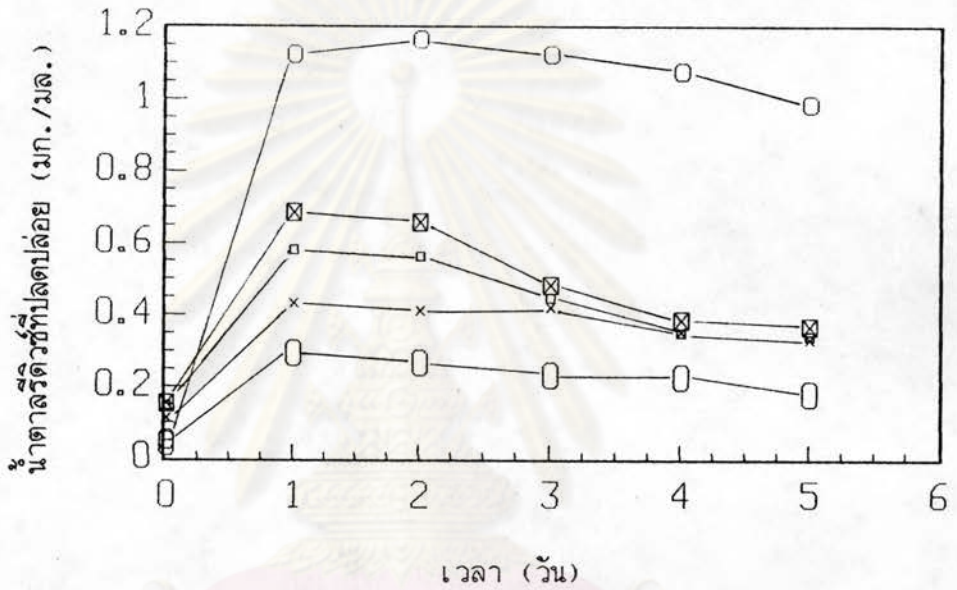


-▵- autoclave 30 นาที -+- autoclave 1 ชม. -⊠- autoclave 2 ชม.

-x- ต้ม 3 ชม. -□- ต้ม 6ชม. -O- กรด HCl

-O- แกลบดิบไม่เติม EDTA, ทวีน 80

รูปที่ 24 แอคติวิตีเซลลูเลสรวมในระบบการย่อยแกลบชนิดต่าง ๆ ของรูปที่ 23

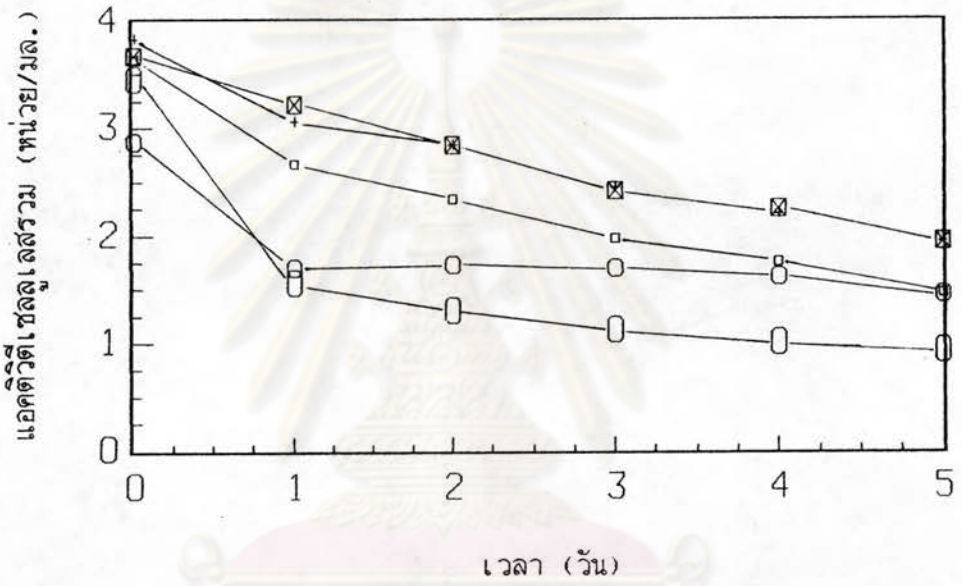


-□- autoclave 1 ชม. -⊠- autoclave 2 ชม.

-×- ต้ม 6ชม. -O- กรด HCl

-O- แกลบดิบไม่เติม EDTA, ทวีน 80

รูปที่ 25 น้ำตาลรีดิวซ์ ในระบบการย่อยแกลบชนิดต่าง ๆ สภาวะการทดลองเหมือนรูปที่ 24 เว้นแต่ใช้ซิเตรทบัฟเฟอร์ดัดแปลง pH 4.8 แทนซิเตรทบัฟเฟอร์ปกติ



-+- autoclave 1 ชม. -⊠- autoclave 2 ชม.

-□- ต้ม 6ชม. -O- กรด HCl

-[]- แกลบดิบไม่เติม EDTA, ทวีน 80

รูปที่ 26 แอคติวิตีเอนไซม์ ในระบบการย่อยแกลบชนิดต่าง ๆ ของรูปที่ 25

กับการย่อยที่ไม่ได้ควบคุมความเป็นกรดด่างโดยใช้น้ำขจัดอิออน pH 6.5(ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ได้ในการย่อยแกลบชนิดต่าง ๆ โดยใช้น้ำกำจัดอิออน, ซิเตรทบัฟเฟอร์และซิเตรทบัฟเฟอร์ดัดแปลง ในสภาวะการย่อยเดียวกัน

แกลบชนิดต่าง ๆ	น้ำขจัดอิออน		ซิเตรทบัฟเฟอร์		ซิเตรทบัฟเฟอร์ดัดแปลง	
	น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด มก.ต่อมล.	% *	น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด มก.ต่อมล.	% *	น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด มก.ต่อมล.	% *
1. แกลบเตรียมด้วยกรด HCl	1.19	100	1.18	100	1.16	100
2. แกลบ autoclave 2ชม.	0.997	83.37	0.983	83.30	0.677	58.36
3. แกลบ autoclave 1ชม.	0.929	78.06	0.853	72.28	0.574	49.48
4. แกลบ autoclave 1/2ชม.	0.826	69.41	0.692	58.64	ND	ND
5. แกลบต้ม 6 ชม.	0.551	46.30	0.685	58.05	0.428	36.89
6. แกลบต้ม 3 ชม.	0.460	38.65	0.385	32.63	ND	ND
7. แกลบดิบ	0.364	30.58	0.331	28.05	0.288	24.87

ND = ไม่ได้ทดสอบ

* = เปรียบเทียบกับแกลบที่เตรียมด้วยกรด HCl

จากตารางที่ 13 สรุปได้ว่าการใช้น้ำขจัดอิออนในระบบการย่อยแกลบ ให้ประสิทธิภาพในการย่อยใกล้เคียงกับการควบคุมการเป็นกรดด่าง โดยใช้ซิเตรทบัฟเฟอร์ ซึ่งการใช้ซิเตรทบัฟเฟอร์ดัดแปลงโดยใช้ NH_4^+ ให้ผลการย่อยใกล้เคียงกับการใช้ Na^+ ในซิเตรทบัฟเฟอร์ปกติ ซึ่งโซเดียมอิออนก็จะมีผลเสีย ทำให้ซิลิกาที่ได้ไม่บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำขจัดอิออนในระบบการย่อยแกลบ

4.1.14 ผลของปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสต่อการย่อยแกลบ

ทำการแปรผันปริมาณของเอนไซม์เซลลูคลาสต์ 1.5 แอล ที่ 32 ,42, 52.5 63, 73.5, 84, 100, และ 105 หน่วย ในการย่อยแกลบที่ผ่านการเตรียมด้วยกรด 4.5 กรัม พบว่าค่าน้ำตาลรีดิวซ์ภายใน 48 ชม. จะมีค่าสูงขึ้นตามปริมาณของเอนไซม์ที่ใส่ลงไป ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรด โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ปริมาณต่าง ๆ กัน ที่เวลา 48 ชม.

ปริมาณเอนไซม์ (หน่วย/ 4.5 กรัมแกลบ)	น้ำตาลรีดิวซ์ 48 ชม. (มก./มล.)
32	0.953
42	1.057
52.5	1.166
63	1.224
73.5	1.340
84	1.340
100	1.347
105	1.359

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.15 ผลของเฮกเซนต่อการย่อยแกลบด้วยเซลลูเลส

สืบเนื่องจากเฮกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถสกัดไขมันหรือสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแกลบได้ ผลดังกล่าวอาจสามารถเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของเซลลูโลสต่อเซลลูเลสและทำให้ประสิทธิภาพการย่อยแกลบดีขึ้นได้ จึงได้ทดลองสกัดแกลบด้วยเฮกเซนโดยการสลับก่อนหลังของการใช้เฮกเซน กับ autoclave ผลการทดลอง พบว่า ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแกลบที่เตรียมโดย autoclave/เฮกเซน และ ชนิด เฮกเซน/autoclave ที่เวลา 24 ชม. มีค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใกล้เคียง คือ 0.701 และ 0.695 มก.ต่อ มล. ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าการย่อยแกลบที่เตรียมโดย การ autoclave เพียงอย่างเดียว คือ 0.691 มก.ต่อ มล. เพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อเทียบกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จาก. (ตารางที่ 15) ซึ่งแสดงว่าการสกัดแกลบด้วยเฮกเซนนั้น ไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบแต่อย่างไร

ตารางที่ 15 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแกลบที่เตรียมโดยการใช้การ autoclave และเฮกเซน ปริมาณ 4.5 กรัมในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล.ปริมาณน้ำชจัดอิออน 50 มล. EDTA. 0.02 กรัม ทวีน 80 ปริมาณ 0.02 มล. ความเป็นกรดด่าง 4.5-4.8 ปริมาณเอนไซม์ 42 หน่วย ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที

แกลบชนิดต่าง ๆ	ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 24 ชม. (มก.ต่อ มล.)
1. autoclave/เฮกเซน	0.701
2. เฮกเซน/autoclave	0.695
3. autoclave	0.691

4.2 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากรา Trichoderma reesei. TISTR 3081

จากการที่ใช้เอนไซม์เชิงพาณิชย์นั้นมีราคาสูงจึงได้พัฒนาการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นเองจากรา Trichoderma reesei. TISTR 3081 แล้วศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเซลลูเลสเพื่อให้ปริมาณเซลลูเลสที่สูง สำหรับใช้แทนเซลลูคลาส 1.5 แอล ในการเตรียมซิลิกาจากแกลบ

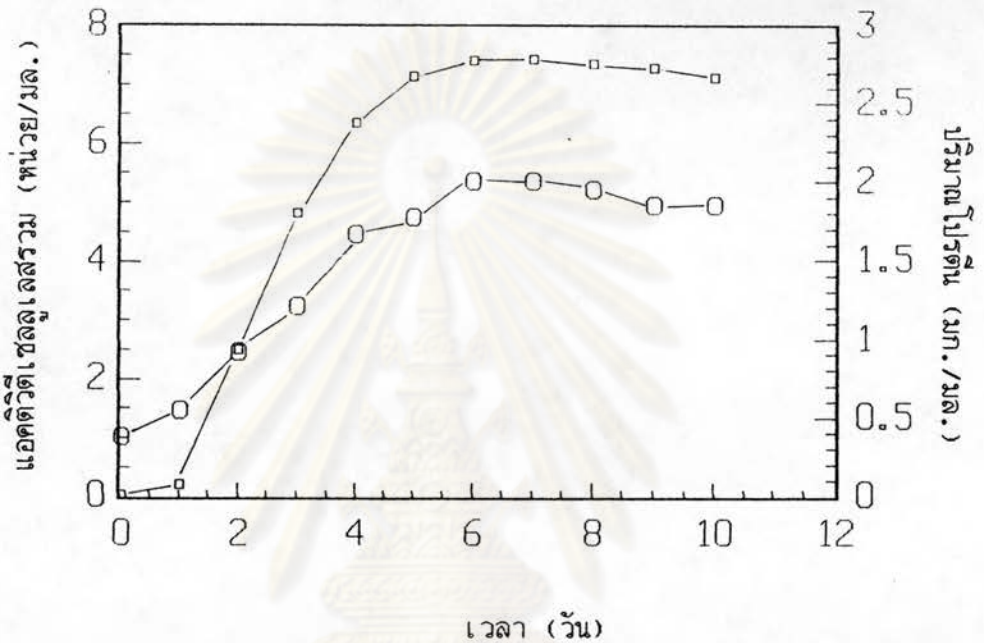
การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสกระทำโดยการเลี้ยง T. reesei. TISTR 3081 โดยใช้อาหารผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Mendel และ Weber, 1969)ที่มีเอวิเซล (avicel) ปริมาณ 2 % เป็นแหล่งเซลลูโลส ชิ้นราจำนวน 5ชิ้น (เตรียมตามหัวข้อ 3.4) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ100 มล. เขย่า 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน พบว่า T. reesei. TISTR 3081 เมื่อเลี้ยงภายใต้ภาวะดังกล่าวสามารถผลิต เอนไซม์เซลลูเลสในรูป เซลลูเลสรวม เอนโดกลูคาเนส (C_x) เอกโซกลูคาเนส (C_1) แอคติวิตีเอฟพีเอส (FPase) เบตากลูโคสิเดส และโปรตีนสูงสุด 7.40, 0.418, 0.152, 0.935, 0.029 หน่วยต่อมล. และ 2.0 มก.ต่อมล. ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 27, 28 และ 29

ตารางที่ 16 แสดงค่าแอคติวิตีเอนไซม์เซลลูเลสที่สูงสุดที่ผลิตได้จากรา Trichoderma reesei. TISTR 3081

ปริมาณเอนไซม์สูงสุด				
Total Cellulase (หน่วย/มล.)	FPase (หน่วย/มล.)	C_1 (หน่วย/มล.)	C_x (หน่วย/มล.)	B-glucosidase (หน่วย/มล.)
7.40(7)	0.935(8)	0.152(6)	0.418(6)	0.029(7)

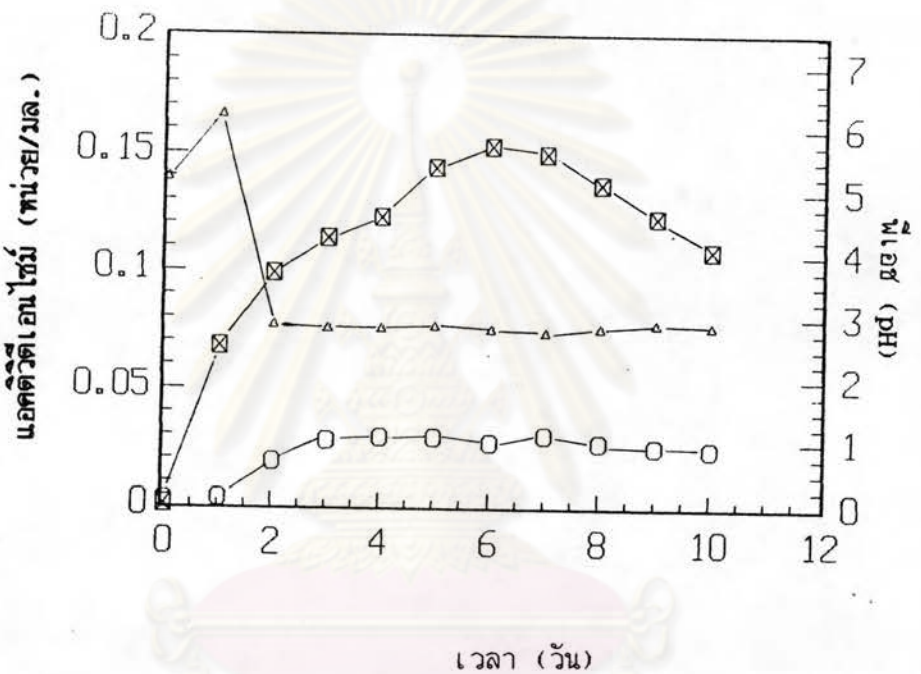
(6) ค่าสูงสุดวันที่ 6 (8) ค่าสูงสุดวันที่ 8

(7) ค่าสูงสุดวันที่ 7 ND ไม่ได้ทดสอบ



-O- โปรตีนในอาหารเอวิเซล -□- เซลลูเลสรวมในอาหารเอวิเซล

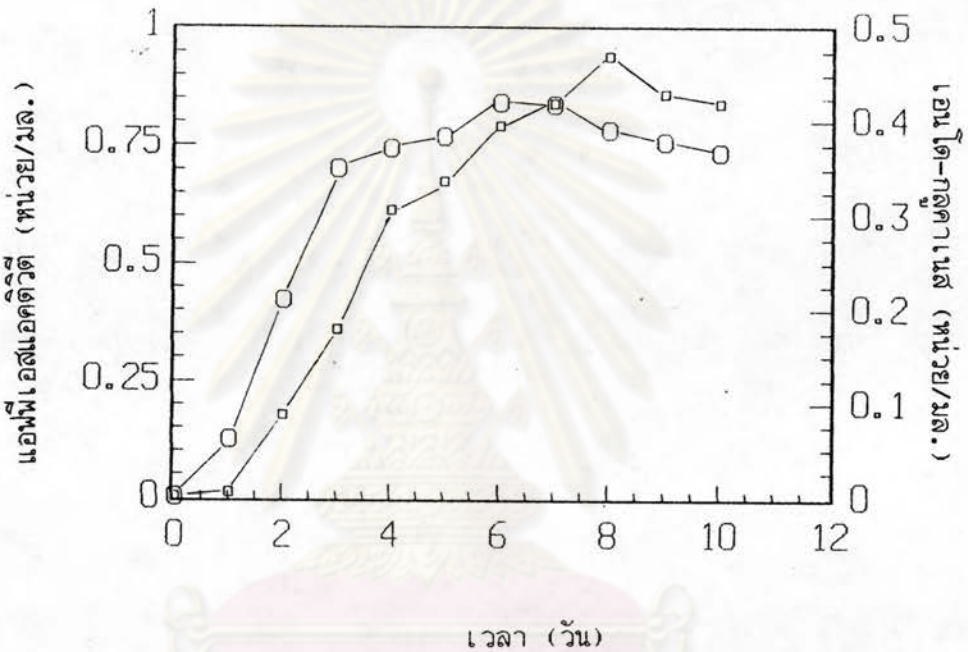
รูปที่ 27 แอคติวิตีเอนไซม์เซลลูเลส และโปรตีนของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส T. reesei TISTR 3081 ในอาหารผลิตที่ใช้เอวิเซลเป็นแหล่งของเซลลูโลส โดยใช้ชิ้นรา 5 ชิ้นต่ออาหารผลิต 100 มล. เป็นกล้าเชื้อเขย่าในขวดแก้วรูปกรวย อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ในสภาวะอุณหภูมิห้อง



-O- เบตา-กลูโคซิเดสในอาหารเอวิเซล -△- พีเอช (pH)

-⊠- เอกโซ-กลูคาเนสในอาหารเอวิเซล

รูปที่ 28 แอคติวิตีของเอกโซ-กลูคาเนส, เบตา-กลูโคซิเดส และค่าความเป็นกรดด่างเมื่อเลี้ยงเชื้อ T. reesei TISTR 3081 ภายใต้สภาวะเช่นเดียวกับรูปที่ 27



-O- เอนโด-กลูคาเนสในอาหารเอวิเซล -□- แอฟพีเอสแอคติวิตีในอาหารเอวิเซล

รูปที่ 29 แอคติวิตีของเอฟพีเอสแอคติวิตี และเอนโด-กลูคาเนส เมื่อเลี้ยงเชื้อ T. reesei TISTR 3081 ภายใต้สภาวะเช่นเดียวกับรูปที่ 27

4.3 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยแกลบโดยเซลลูเลสที่ผลิตจาก Trichoderma reesei 3081

4.3.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T. reesei

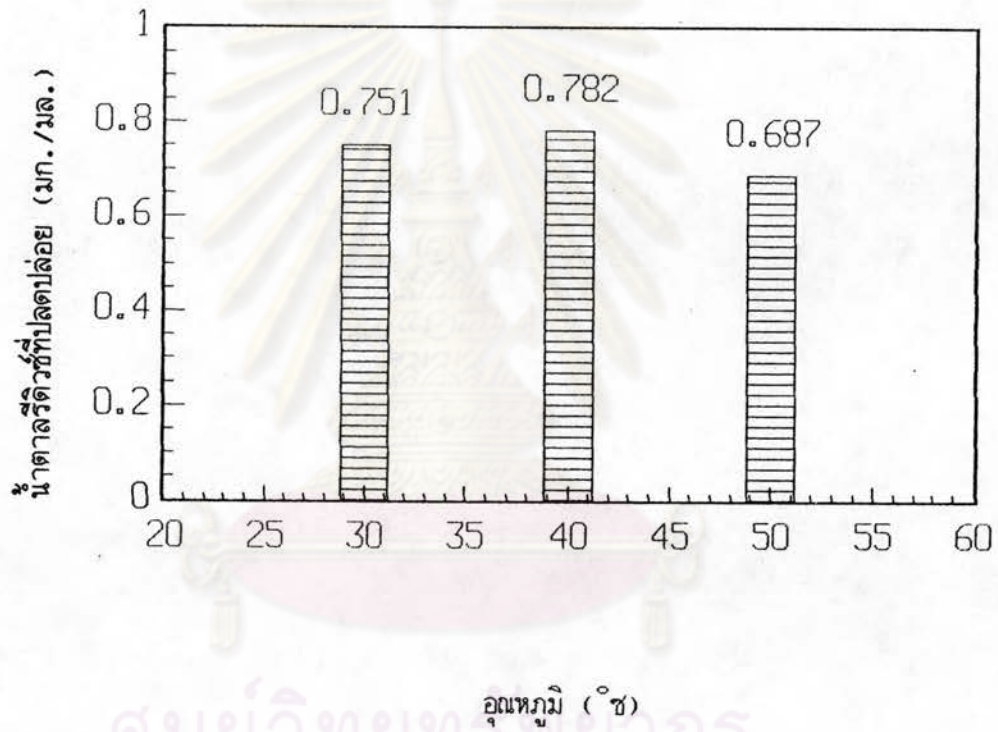
การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 30, 40 และ 50°ซ. พบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยแกลบสูงสุดที่อุณหภูมิ 40°ซ. รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30 และ 50°ซ. โดยได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยเป็น 0.782, 0.751 และ 0.687 มก.ต่อมล. ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการย่อยที่อุณหภูมิ 30 และ 40°ซ. มีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังแสดงรูปที่ 30 ซึ่งการย่อยแกลบที่อุณหภูมิ 30°ซ. (อุณหภูมิห้อง) เป็นวิธีที่สะดวกได้ผลดีและยังประหยัดพลังงานอีกด้วยจึงเลือกใช้ระบบการย่อยแกลบที่อุณหภูมิห้อง

4.3.2 อิทธิพลของค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้

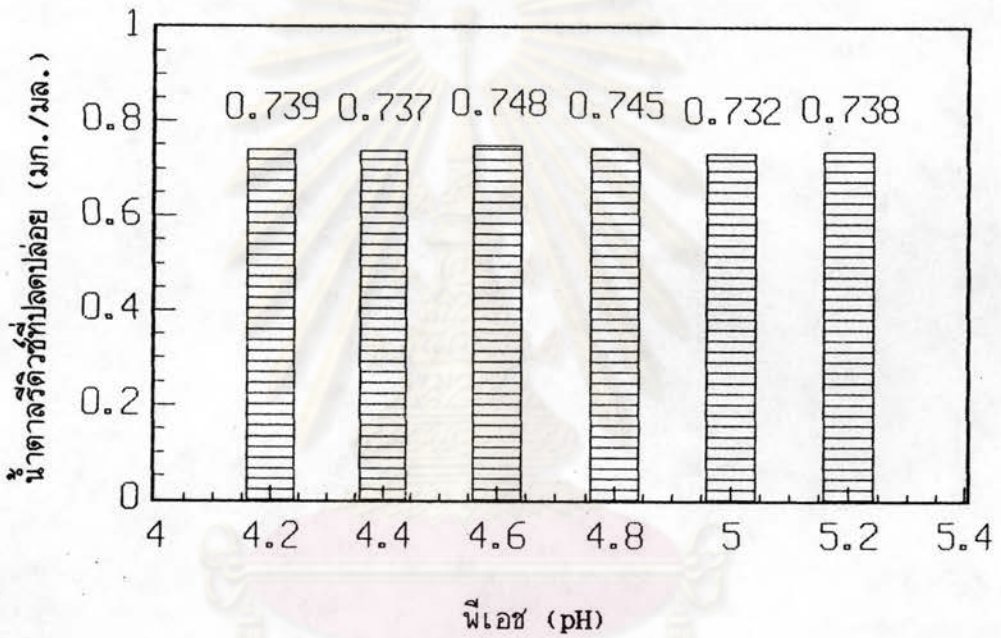
การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยแกลบที่ผลิตได้ในสภาพความเป็นกรดด่างต่าง ๆ กันที่ 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0 และ 5.2 พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยแกลบได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อย มีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก มีค่าที่ใกล้เคียงกัน โดยมีประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุดอยู่ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.6, 4.8 ซึ่งมีค่าน้ำตาลนี้ก็มีค่าที่ไม่แตกต่างกันมาก แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้นจาก T. reesei มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานในช่วงกว้าง ดังรูปที่ 31

4.4 เปรียบเทียบการย่อยแกลบด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก T. reesei เปรียบเทียบกับเซลลูคลาสต์

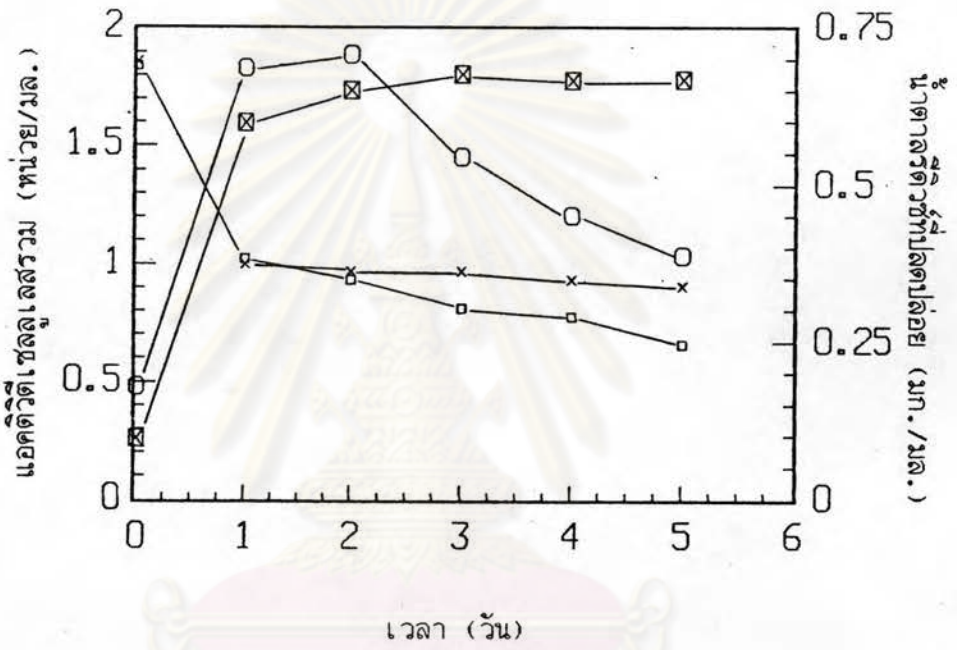
เปรียบเทียบผลการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดโดยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า คือ เซลลูคลาสต์ 1.5 แอล ใส่ปริมาณ 0.08 มล. (แอคติวิตีเอนไซม์เท่ากับ 42 หน่วย) เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นเองจาก T.reesei ปริมาณ 9.0 มล. (แอคติวิตีเอนไซม์เท่ากับ 42 หน่วย) ต่อแกลบ 4.5 กรัม ปริมาณน้ำขจัดอิออน 50 มล. ผลลัพธ์ที่ได้จะเห็นว่า แอคติวิตีของเซลลูเลสในวันแรกและการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ ของทั้งสองกรณีไม่ได้มีผลแตกต่างกันอย่างไร (0.648 และ 0.706 มก.ต่อมล.ตามลำดับ) แต่พบว่าเมื่อ 2 วันผ่านไป กรณีของ T. reesei นั้นค่าเอนไซม์แอคติวิตีและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงในขณะที่เอนไซม์ในเชิงการค้าค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 32)



รูปที่ 30 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดโดยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก T. reesei ที่อุณหภูมิ 30, 40, และ 50 °ซ เป็นเวลา 2 ชม.



รูปที่ 31 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรด โดยเอนไซม์เซลลูเลสจาก T. reesei. ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0 และ 5.2



-O- น้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อย(เอนไซม์ผลิต) -□- เซลลูเลสรวม(เอนไซม์ผลิต)

-⊠- น้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อย(เอนไซม์การค้า) -×- เซลลูเลสรวม(เอนไซม์การค้า)

รูปที่ 32 เปรียบเทียบการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรด ปริมาณ 4.5 กรัม ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า และเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้นเอง ปริมาณ 42 หน่วย ปริมาณน้ำชจัดอิออน 50 มล. ความเป็นกรดด่าง 4.5-4.8 ในสภาวะอุณหภูมิห้องภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที

4.5 เปรียบเทียบการย่อยแกลบด้วยเอนไซม์จาก T. reesei และเซลลูคลาสต์ 1.5 แอล

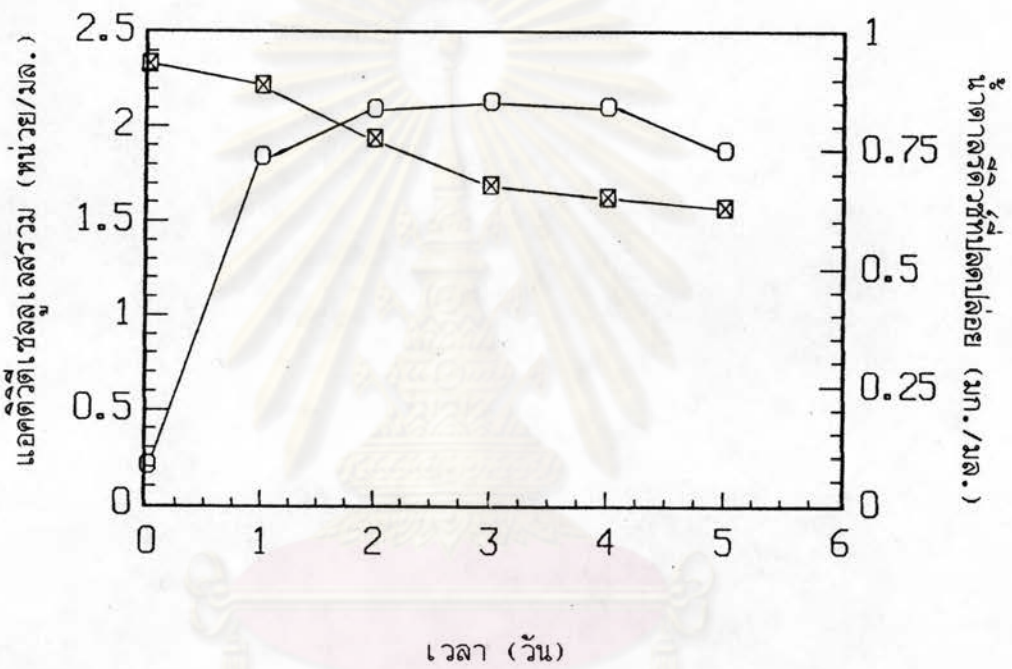
ทำการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรด ที่อัตราส่วน กรด:น้ำ 1:5, 1:6 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าและที่ผลิตจาก T. reesei ย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดอัตราส่วน กรด:น้ำ 1:5 ตามวิธีในข้อ 3.7 พบว่าในทั้ง 3 กรณี เอนไซม์แอคติวิตีมีรูปแบบและค่าที่ใกล้เคียงกันเพียงแต่แอคติวิตีของเซลลูเลสจาก T. reesei ในวันหลัง ๆ มีค่าต่ำกว่าของวันแรกเล็กน้อยในขณะที่น้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยนั้น กรณีที่ย่อยด้วยเซลลูคลาสต์ 1.5 แอล กับการเตรียมด้วยกรด 1.5 ให้ผลดีกว่า 2 กรณีหลังเล็กน้อย 0.914, 0.991 มก.ต่อมล. ตามลำดับ (รูปที่ 33, 34 และ 35)

4.6 ลักษณะของแกลบที่ผ่านการเตรียมด้วยวิธีต่าง ๆ

ทำการตรวจสอบลักษณะสัมผัสของแกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีต่าง ๆ และแสดงผลในตารางที่ 17 ดังนี้

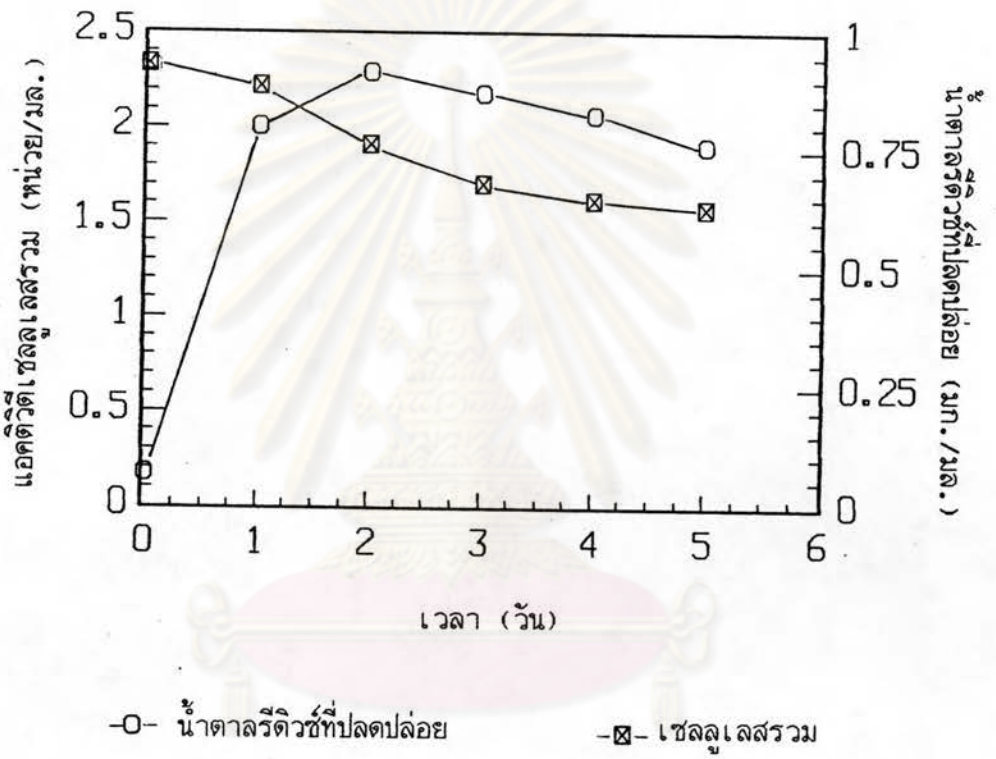
ตารางที่ 17 เปรียบเทียบลักษณะและสีของแกลบที่ผ่านการเตรียมด้วยวิธีต่าง ๆ

วิธีเตรียม	สี	ลักษณะสัมผัส
แกลบดิบ	เหลืองแกมน้ำตาลอ่อน	แข็ง, เปราะน้อยมาก
แกลบดิบ ; เซลลูคลาสต์	เหลืองแกมน้ำตาลอ่อน	แข็ง, เปราะน้อยมาก
แกลบต้ม	เหลืองแกมน้ำตาลเข้ม	แข็ง, เปราะเล็กน้อย
แกลบต้ม ; เซลลูคลาสต์	เหลืองแกมน้ำตาลเข้ม	แข็ง, เปราะเล็กน้อย
แกลบ autoclave (121°ซ)	เหลืองแกมน้ำตาลเข้ม	แข็ง, เปราะเล็กน้อย
แกลบ autoclave (121°ซ); เอนไซม์	เหลืองแกมน้ำตาลเข้ม	แข็ง, เปราะเล็กน้อย
แกลบ HCl (1:4)	น้ำตาลเข้มมาก	เปราะมาก
แกลบ HCl (1:5)	น้ำตาลเข้ม	เปราะปานกลาง
แกลบ HCl (1:5) ; เซลลูคลาสต์	น้ำตาลเข้ม	เปราะปานกลาง
แกลบ HCl (1:5) ; เอนไซม์จาก T.reesei	น้ำตาลเข้ม	เปราะปานกลาง
แกลบ HCl (1:6)	น้ำตาล	เปราะปานกลาง
แกลบ HCl (1:6) ; เซลลูคลาสต์	น้ำตาล	เปราะปานกลาง

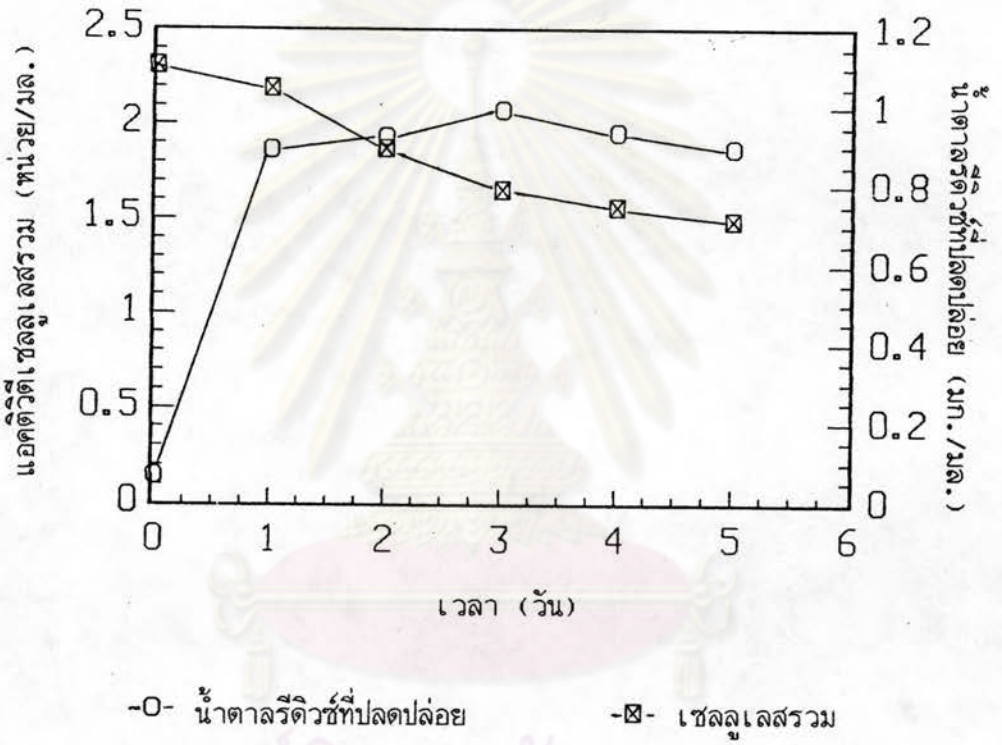


-O- น้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อย -⊠- เซลลูเลสรวม

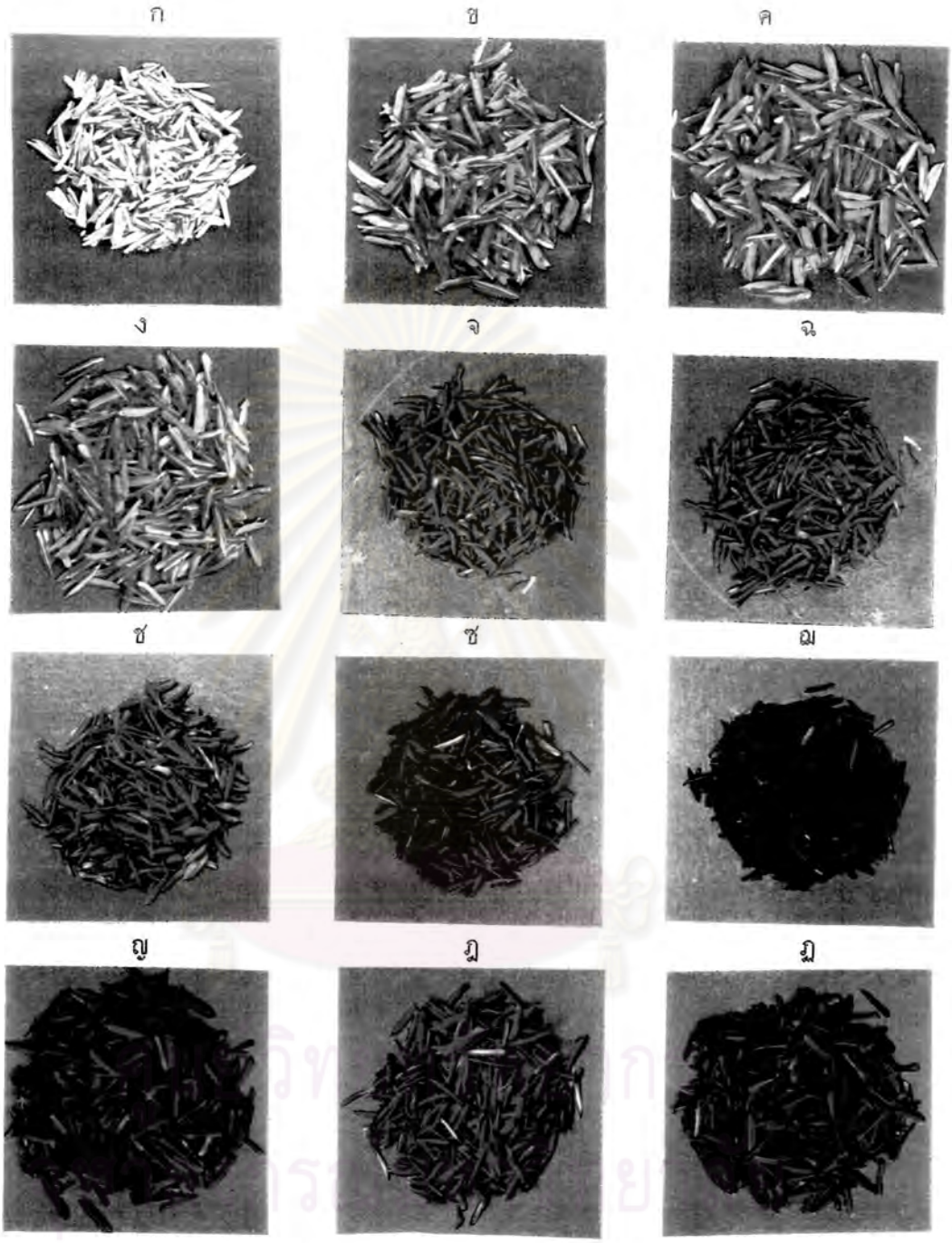
รูปที่ 33 การย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริก อัตราส่วนต่อน้ำ 1:5 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า ปริมาณแกลบ 72 กรัม ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 1 ลิตร ปริมาณน้ำขจัดอิออน 400 มล. ความเป็นกรดด่าง 4.5-4.8 EDTA. 0.02% (w/v) ทวีน 80 0.1% (v/v) เอนไซม์ 672 หน่วย ในสภาวะอุณหภูมิห้องภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาที.



รูปที่ 34 การย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริก อัตราส่วนกรดต่อน้ำ 1:5 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก T. reesei ในระบบการย่อยแกลบ เช่นเดียวกับรูปที่ 33



รูปที่ 35 การย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริก อัตราส่วนกรดต่อน้ำ 1:6 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า ในระบบการย่อยแกลบเช่นเดียวกับรูปที่ 34



รูปที่ 36 แกลบผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีต่าง ๆ

ก)ไม่ผ่านการปรับสภาพ ข)เอนไซม์การค้า ค)ต้ม ง)ต้ม/เอนไซม์การค้า
จ)autoclave ฉ)autoclave/เอนไซม์การค้า ช)HCl(1:6) ซ)HCl(1:5)
ฌ)HCl(1:4) ญ)HCl(1:5)/เอนไซม์การค้า ฎ)HCl(1:5)/เอนไซม์ T. reesei
ฏ)HCl(1:6)/เอนไซม์การค้า

4.7 น้ำหนักของแกลบและเถ้าแกลบที่ได้จากการเตรียมแกลบโดยวิธีต่าง ๆ

ชั่งน้ำหนักแกลบที่เหลือจากการปรับสภาพด้วยวิธีต่าง ๆ โดยเทียบกับแกลบที่ผ่านการล้างและอบแห้ง 100 กรัม และชั่งน้ำหนักของเถ้าแกลบที่ได้หลังจากการเผา ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบน้ำหนักที่เหลือจากการเตรียมและการเผาแกลบชนิดต่าง ๆ

วิธีเตรียม	น้ำหนักแกลบที่เหลือหลังจากการปรับสภาพ แกลบ 100 กรัม	น้ำหนักเถ้าแกลบที่ได้จากการเผาแกลบต่าง ๆ 100 กรัม
แกลบดิบ	100	22.7
แกลบดิบ ; เซลลูคลาสต์	93.2	20.1
แกลบต้ม	93.5	19.6
แกลบต้ม ; เซลลูคลาสต์	86.47	20.5
แกลบ autoclave (121°ซ)	95.46	21.7
แกลบ autoclave (121°ซ); เซลลูคลาสต์	87.7	20.2
แกลบ HCl (1:4)	71.8	19.4
แกลบ HCl (1:5)	73.5	21.2
แกลบ HCl (1:5) ; เซลลูคลาสต์	67.5	20.6
แกลบ HCl (1:5) ; เอนไซม์จาก T. reesei	67.7	20.9
แกลบ HCl (1:6)	74.8	21.4
แกลบ HCl (1:6) ; เซลลูคลาสต์	68.72	20.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 สมบัติทางกายภาพของซิลิกาที่ผลิตจากแกลบ

4.8.1 ลักษณะของเถ้าแกลบที่ได้จากการเผาแกลบชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบสีของเถ้าแกลบที่ปรากฏด้วยตาและเปรียบเทียบความขาว (brightness) ด้วยเครื่องมือ reflectophotometer

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบสีของเถ้าแกลบที่ได้จากการเผาแกลบที่ผ่านการเตรียมโดยวิธีต่าง ๆ

เถ้าแกลบที่มาจากแกลบชนิดต่าง ๆ	สี	% ความขาวเทียบกับแมกนีเซียมออกไซด์
แกลบดิบ	สีเทา มีเม็ดสีน้ำตาล	55.9
แกลบดิบ ; เซลลูคลาสต์	สีขาว	80.4
แกลบต้ม	สีเทา, มีเม็ดสีน้ำตาล	58.5
แกลบต้ม ; เซลลูคลาสต์	สีขาว	81.8
แกลบ autoclave (121°ซ)	สีเทา, มีเม็ดสีน้ำตาล	66.8
แกลบ autoclave (121°ซ) ; เซลลูคลาสต์	สีขาว	81.5
แกลบ HCl (1:4)	สีขาว	91.6
แกลบ HCl (1:5)	สีขาวเทา	70.2
แกลบ HCl (1:5) ; เซลลูคลาสต์	สีขาว	91.5
แกลบ HCl (1:5) ; เอนไซม์จาก T. reesei	สีขาว	91.1
แกลบ HCl (1:6)	สีขาวแกมเทาอ่อน	67.7
แกลบ HCl (1:6) ; เอนไซม์เซลลูคลาสต์	สีขาว	90.4

มาตรฐานเทียบกับแมกนีเซียมออกไซด์ ให้มีความขาวเท่ากับ 100% (TAPPI, 1991)

รูปที่ 37 เถ้าแกลบหรือซิลิกาที่ได้จากแกลบผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีต่าง ๆ
ก) ไม่ผ่านการปรับสภาพ ข) เอนไซม์การค้า ค) ต้ม ง) ต้ม/เอนไซม์การค้า
จ) autoclave ฉ) autoclave/เอนไซม์การค้า ช) HCl(1:6) ซ) HCl(1:5)
ฌ) HCl(1:4) ญ) HCl(1:5)/เอนไซม์การค้า ฎ) HCl(1:5)/เอนไซม์ T. reesei
ฏ) HCl(1:6)/เอนไซม์การค้า

4.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณซิลิกา (SiO_2)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณซิลิกา ในตัวอย่างขี้เถ้าแกลบที่ได้จากการเผาแกลบที่ผ่านการเตรียมโดยวิธีต่าง ๆ ตามวิธี gravity method ผลของการวิเคราะห์ได้แสดงไว้ในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 แสดงปริมาณของซิลิกาในเถ้าแกลบที่ได้จากการเผาแกลบชนิดต่าง ๆ

วิธีการเตรียมแกลบ	% ซิลิกา (โดยน้ำหนัก)
แกลบดิบ (ไม่ผ่านการเตรียม)	93.8 , 93.2
แกลบดิบ ; เอนไซม์เซลลูคลาสต์	94.8 , 95.3
แกลบต้ม	95.2 , 94.0
แกลบต้ม ; เอนไซม์เซลลูคลาสต์	96.3 , 95.7
แกลบ autoclave (121°ซ)	93.3 , 93.9
แกลบ autoclave (121°ซ); เอนไซม์เซลลูคลาสต์	96.3 , 95.9
แกลบ HCl (1:4)	99.8 , 98.8
แกลบ HCl (1:5)	97.6 , 97.2
แกลบ HCl (1:5) ; เอนไซม์เซลลูคลาสต์	99.8 , 99.8
แกลบ HCl (1:5) ; เอนไซม์จาก T. reesei	99.8 , 99.7
แกลบ HCl (1:6)	95.8 , 95.3
แกลบ HCl (1:6) ; เอนไซม์เซลลูคลาสต์	97.4 , 98.1

หมายเหตุ อบเถ้าแกลบที่ 500 °ซ 5 นาที เพื่อไล่ความชื้นก่อนการวิเคราะห์หาปริมาณซิลิกา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8.3 ค่าพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area, BET.) ของเถ้าแกลบหรือซิลิกาที่เตรียมได้จากการเผาแกลบชนิดต่าง ๆ โดยเครื่องวัดพื้นที่ผิวจำเพาะ Micromeritics รุ่น Flow controller 2300 Fc

ตารางที่ 21 แสดงค่าพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area.) ของเถ้าแกลบหรือซิลิกาที่เตรียมจากการเผาแกลบชนิดต่าง ๆ

วิธีการเตรียมแกลบ	ค่าพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area) ($m^2./g.$)
แกลบดิบ (ไม่ผ่านการเตรียม)	107 $\pm$ 2.47
แกลบดิบ ; เอนไซม์เซลลูคลาสต์	131 $\pm$ 3.27
แกลบต้ม	124 $\pm$ 1.52
แกลบต้ม ; เอนไซม์เซลลูคลาสต์	131 $\pm$ 0.94
แกลบ autoclave (121°ซ)	121 $\pm$ 2.45
แกลบ autoclave (121°ซ) ;เอนไซม์เซลลูคลาสต์	145 $\pm$ 4.34
แกลบ HCl (1:4)	178 $\pm$ 8.45
แกลบ HCl (1:5)	132 $\pm$ 1.51
แกลบ HCl (1:5) ; เอนไซม์เซลลูคลาสต์	178 $\pm$ 2.47
แกลบ HCl (1:5) ; เอนไซม์จาก T. reesei	185 $\pm$ 3.42
แกลบ HCl (1:6)	131 $\pm$ 3.47
แกลบ HCl (1:6) ; เอนไซม์เซลลูคลาสต์	194 $\pm$ 1.87