การกำจัดลิกนินจากไม้สักแผ่นบางโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นางสาว ภาวดี เอี่ยมทัศนา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-3340-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIGNIN REMOVAL FROM TEAK VENEER USING COMBINATIONS OF ENZYMES AND HYDROGEN PEROXIDE

Miss Bhavadee Iamtasna

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic year 2005

ISBN 974-14-3340-9

481622

Thesis Title	LIGNIN REMOVAL FROM TEAK VENEER USING COMBINATIONS OF ENZYMES AND HYDROGEN PEROXIDE
By	Miss Bhavadee Iamtasna
Field of study	Chemical Engineering
Thesis Advisor	Associate Professor Chirakarn Muangnapoh, Dr.Ing.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Seeroong Prichanont, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Engineering, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

..... Dean of the Faculty of Engineering

(Professor Direk Lavansiri, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Professor Wiwut Tanthapanichakoon, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Chirakarn Muangnapoh, Dr.Ing.)

..... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Seeroong Prichanont, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Satok Chaikunchuensakun, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Sarawut Rimdusit, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Artiwan Shotipruk, Ph.D.)

ภาวดี เอี่ยมทัศนา : การกำจัดลิกนินจากไม้สักแผ่นบางโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์. (LIGNIN REMOVAL FROM TEAK VENEER USING COMBINATIONS OF ENZYMES AND HYDROGEN PEROXIDE) อ. ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร.จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์, 112 หน้า. ISBN 974-14-3340-9.

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ร่วมกับการใช้สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการกำจัดลิกนินออกจากไม้สักแผ่นบางที่ผลิตโดยใช้ไม้สักจากป่าปลูก โดยให้มีการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างทางธรรมชาติของไม้น้อยที่สุด การทดลองทางห้องปฏิบัติการนี้ใช้ชิ้นส่วนของไม้สักแผ่นบางที่ใช้ทางการค้าและใช้เอนไซม์ไซแลนเนสที่ความเข้มข้น 0.01 – 2.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, เอนไซม์แลกเคสที่ความเข้มข้น 0.01 – 1.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 – 20 ร่วมกับการวัดค่าการกำจัดสารลิกนินออกตามช่วงเวลาที่กำหนด (0.5 – 24 ชั่วโมง) โดยการทดลองที่ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะดำเนินการที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ซึ่งการวัดผลการกำจัดลิกนินนี้ใช้เทคนิคการสแกนไม้ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพเพื่อเปรียบเทียบค่าระดับสีเทาที่วัดได้ก่อนและหลังการทดลอง

การศึกษาความสามารถในการกำจัดลิกนินโดยใช้เอนไซม์ไซแลนเนส, เอนไซม์แลคเคส หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงชนิดเดียว พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถเพิ่มคุณภาพสีของไม้สักแผ่นบางในขณะที่เอนไซม์ทั้งสองชนิดไม่สามารถเพิ่มคุณภาพสีของไม้ ต่อมาทำการศึกษาความสามารถในการกำจัดลิกนินโดยใช้เอนไซม์แต่ละชนิดร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ไซแลนเนส 0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 10 ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สามารถกำจัดลิกนินมีค่าเฉลี่ยระดับสีเทาจางลงร้อยละ 24.34 และกำจัดลิกนินได้ดีกว่าการทดลองที่ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 10 เพียงอย่างเดียว ในขณะที่การกำจัดลิกนินด้วยสารผสมเอนไซม์แลคเคสและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ผลการกำจัดลิกนินที่ต่ำกว่าการกำจัดด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว นอกจากนี้ พบว่าวิธีการกำจัดลิกนินที่ดีที่สุด คือ ใช้เอนไซม์ไซแลนเนสในขั้นตอนแรก แล้วตามด้วยไฮโดนเจนเปอร์ออกไซด์หรือสารผสมระหว่างไฮโดนเจนเปอร์ออกไซด์และเอนไซม์แลคเคส โดยเริ่มต้นการทดลองด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส 0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าส่วนผสมแบบแยกขั้นตอนให้ค่าเฉลี่ยระดับสีเทาจางลงร้อยละ 26.4 ซึ่งเป็นผลที่ดีที่สุด ทั้งนี้ความสามารถในการกำจัดลิกนินเพิ่มขึ้นร้อยละ 19.3 ของการทดลองที่ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 10 เพียงอย่างเดียว

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....ภาวดี เอี่ยมทัศนา.....

สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์.....

ปีการศึกษา.....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ทีปรึกษาร่วม.....สีรุ้ง.....

4471820421: MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: TEAK / VENEER / LIGNIN / ENZYMES / XYLANASE / LACCASE / HYDROGEN PEROXIDE

BHAVADEE IAMTASNA: LIGNIN REMOVAL FROM TEAK VENEER USING COMBINATIONS OF ENZYMES AND HYDROGEN PEROXIDE. THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR CHIRAKARN MUANGNAPOH, Dr.Ing., THESIS COADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR SEEROONG PRICHANONT, Ph.D., 112 pp. ISBN 974-14-3340-9.

The main purpose of this doctoral research is to study the effects of enzymes combination and hydrogen peroxide on lignin removal from commercially grown teak veneer with minimum changing in its natural texture. Controlled laboratory experiments using samples of teak veneer, combinations of xylanase, laccase and hydrogen peroxide, and series of lignin removal time were conducted to accomplish the research purpose. Image processing technique was used to determine lignin removal from pre- and post-treated veneer samples. Xylanase, laccase, and hydrogen peroxide concentrations were varied between 0.01 to 2.50 unit/millilitre, 0.01 to 1.00 unit/millilitre, and 2 to 20 % respectively, while the experimental time was conducted between 0.5 to 24 hours. All experiments concerning hydrogen peroxide were performed at 60^{O}C and pH 6.5.

The major findings from this research are summarized and presented as follows. Xylanase and laccase do not help removing lignin from teak veneer, in contrast to hydrogen peroxide. However, when using the combination of 0.05 unit/millilitre xylanase and 10% hydrogen peroxide at 60^{O}C and pH 6.5 for 4 hours, lignin at the amount of 24.34% in gray scale was removed- a 10% improvement over the sole 10% hydrogen peroxide. The mixture of laccase and hydrogen peroxide lower the hydrogen peroxide ability to remove lignin. Moreover, it was found that removal of lignin is best done first by the action of xylanase then follows by hydrogen peroxide or mixtures of hydrogen peroxide and laccase. The best condition for lignin removal from teak veneer is 0.05 unit/millilitre xylanase at 32^{O}C and pH 4.5 for thirty minutes follows by the mixture of 10% hydrogen peroxide and 0.05 unit/millilitre laccase at 60^{O}C and pH 6.5 for 4 hours. This condition results in 26.4% change in gray scale, a 19.3% improvement over the sole 10% hydrogen peroxide.

Department.....Chemical Engineering.....Student's signature.....Bhavadee Iamtasna.....

Field of study...Chemical Engineering.....Advisor's signature.....C. Muangnapoh.....

Academic year.....2005.....Co-advisor's signature.....Prichanont.....

ACKNOWLEDGEMENTS

A doctoral research in the chemical engineering has been an adventure and challenge that required knowledge, experience, commitment and endless supports from chairperson and members of dissertation committee, faculties, colleagues, friends and family. An extraordinary recognition and appreciation go to Associate Professor Dr. Chirakarn Muangnapoh, Advisor of my dissertation committee, for her dedication and contribution throughout my doctoral study and research at the Chemical Engineering Department of Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. Additional recognition and appreciations go to Assistant Professor Dr. Seeroong Prichanont (Co-Advisor), Professor Dr. Wiwut Tanthapanichakoon, Associate Professor Dr. Satok Chaikunchuensakun, Assistant Professor Dr. Sarawut Rimdusit, and Assistant Professor Dr. Artiwan Shotipruk for their supports throughout my dissertation, research and study.

I would like to thank Metro Top Wood Co., Ltd. for funding this research and providing veneer samples. A special note of appreciation goes to Mr. Chawalit Danulux for writing and providing a computer program use in image analysis.

For their encouragement and strong support I would like to thank my colleagues, friends and sisters, Ratchat Chantawongvuti, Metta Ongkasuwan, Marasri Ujin, Thritha Iamtasna and Varunya Udomsak.

Finally I would like to thank my mother for everything she has done for me. I am forever grateful for her love, her encouragement and her support throughout my life. I also would like to thank her for proof reading my dissertation.

CONTENTS

PAGE

ABSTRACT (IN THAI) iv

ABSTRACT (IN ENGLISH) v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES xi

LIST OF FIGURES xiii

CHAPTER

I INTRODUCTION 1

1.1 General introduction 1

1.2 Statement of Problem 2

1.3 Scope of Research 2

1.4 Objective 3

1.5 Significant of Research 3

1.6 Organization of the Dissertation 4

II LITERATURE REVIEW 5

2.1 Literature Review on Wood 5

2.1.1 Structure of wood 5

2.1.2 Cell wall 8

2.1.3 Pits and perforations 9

2.2 Literature Review on Chemical Composition of Wood 9

2.2.1 Cellulose 10

2.2.2 Hemicellulose 11

2.2.3 Lignin 12

2.3 Literature Review on Lignin Removal Methods 18

2.4 Literature Review on Enzymatic System 19

2.5 Literature Review on Xylanase and Laccase 20

PAGE

III RESEARCH MODEL 21
3.1 Research Model 21
3.2 Dependent Variable Definition and Unit of Measure 23
3.3 Independent Variables Definition and Unit of Measure 23
3.4 Specific Research Questions 24
3.5 Chapter Summary 25
IV RESEARCH METHODOLY 26
4.1 Selection of Research Method 26
4.2 Experimental Design 26
4.2.1 Examination of each chemical component 27
4.2.1.1 H_2O_2 27
4.2.1.2 Xylanase 28
4.2.1.3 Laccase 28
4.2.2 Examination of combination of chemical components 29
4.2.2.1 H_2O_2, xylanase and time 29
4.2.2.2 H2O2, laccase and time 29
4.2.2.3 Xylanase, laccase and time 30
4.3 Sample Selection Criteria 31
4.3.1 Selection of population 31
4.3.2 Selection of sample 31
4.4 Sample Preparation Procedurel 32
4.5 Experimental 32
4.5.1 Chemicals 32
4.5.2 Enzymes 33
4.5.3 Experimental apparatus 33
4.5.4 Experiments 33
4.5.4.1 Single chemical component 33
4.5.4.2 Combination of chemical component 34
4.5.5 Experimental procedure 34
4.6 Data Collecting Method 35
4.7 Chapter Summary 36

PAGE

V RESULTS AND DATA ANALYSIS 37

5.1 Examining the Effect of Each Independent Variables, Xylanase, Laccase, Hydrogen Peroxide and Time, on Lignin Removal from Teak Veneer 37

5.1.1 Hydrogen peroxide experiment 37

5.1.2 Xylanase experiment 39

5.1.3 Laccase experiment 41

5.1.4 Section summary 43

5.2 Examining the Effects of the Combination of Different Levels of Xylanase, Laccase, Hydrogen Peroxide and Time on Lignin Removal from Teak Veneer 44

5.2.1 Hydrogen peroxide, xylanase and time 44

5.2.2 Hydrogen peroxide, laccase and time 46

5.2.3 Xylanase, laccase and time 49

5.2.4 Section summary 52

5.3 Conclusions and suggestions 52

5.4 Extended Research 54

5.4.1 Xylanase 54

5.4.2 Hydrogen peroxide 61

5.4.3 Further study on xylanase, laccase and H_2O_2 62

5.5 Surface Examination 69

5.6 Chapter Summary 73

VI CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS 74

6.1 Brief Review of Chapter I to IV 74

6.2 Conclusions 74

6.3 Recommendations and Future Research 75

REFERENCES 76

APPENDICES 80

Appendix A Image Processing Technique 81

A1 Theory 82

A2 Data collecting using image processing technique 83

PAGE

Appendix B Preparation of Buffer Solution 84
B1 Preparation of 0.2 M phosphate buffer pH 6.5 85
B2 Preparation of 0.2 M acetate buffer pH 4.5 85
Appendix C Sample of Calculation 86
Appendix D Preliminary Experiments 89
Appendix E Enzymatic Assay of Laccase 92
Appendix F Enzymatic Assay of Xylanase 95
Appendix G Experimental Data 97
Appendix H ANOVA Results 108
Appendix I Determination of Xylose Content 114
VITAE 117

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Composition of wood	10
4.1	Dependent and independent variables and their level	27
4.2	2x3 Factorial experimental design for H_2O_2 and time	27
4.3	3x3 Factorial experimental design for xylanase and time	28
4.4	3x3 Factorial experimental design for laccase and time	28
4.5	2x3x3 Factorial experimental design for H_2O_2, xylanase and time	29
4.6	2x3x3 Factorial experimental design for H_2O_2, laccase and time	29
4.7	3x3x3 Factorial experimental design for xylanase, laccase and time	30
4.8	Summary of the established factorial experimental design	30
4.9	Qualification requirement of samples	31
5.1	Effect of hydrogen peroxide and time on percentage change in gray scale	38
5.2	Effect of xylanase and time on percentage change in gray scale	40
5.3	Effect of laccase and time on percentage change in gray scale	42
5.4	Effect of xylanase, H_2O_2 and time on percentage change in gray scale	44
5.5	Effect of laccase, H_2O_2 and time on percentage change in gray scale	47
5.6	Effect of xylanase, laccase and time on percentage change in gray scale	50
5.7	Effect of xylanase concentration and time on the average % change in gray scale (room temperature)	56
5.8	Effect of xylanase concentration and time on the average % change in gray scale (60°C)	57
5.9	Effect of xylanase concentration and time on xylose produced (room temperature)	59
5.10	Effect of xylanase concentration and time on xylose produce (60°C)	60
5.11	Effect of hydrogen peroxide and time on percentage change in gray scale	61

TABLE **PAGE**

5.12 Effect of 0.05u/ml xylanase on H_2O_2 performance 63

5.13 Experimental data on sequential experiments 65

5.14 Results summarization 67

5.15 Comparison of market teak veneer and research teak veneer 68

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	Structure of wood	6
2.2	Schematic diagram of cell wall	9
2.3	Constituent of wood	10
2.4	Structure of cellulose molecule	11
2.5	Structure of hard wood xylan	11
2.6	Lignin unit structure and atoms designation	13
2.7	Mackay et al.'s published biosynthesis pathway for coniferyl, sinaply and *p*-coumaryl alcohols	14
2.8	Lignin linkages	16
2.9	Example of lignin chemical structure	17
3.1	Research Model	22
5.1	Effect of hydrogen peroxide and time on percentage change in gray scale	39
5.2	Effect of xylanase and time on percentage change in gray scale	41
5.3	Effect of laccase and time on percentage change in gray scale	43
5.4	Effect of xylanase and time at 2% H_2O_2 on percentage change in gray scale	45
5.5	Effect of xylanase and time at 10% H_2O_2 on percentage change in gray scale	45
5.6	Effect of laccase and time at 2% H_2O_2 on percentage change in gray scale	47
5.7	Effect of laccase and time at 10% H_2O_2 on percentage change in gray scale	48
5.8	Effect of laccase and time at 0.25 u/ml xylanase on percentage change in gray scale	50
5.9	Effect of laccase and time at 0.50 u/ml xylanase on percentage change in gray scale	51
5.10	Effect of laccase and time at 1.00 u/ml xylanase on percentage change in gray scale	51

FIGURE **PAGE**

5.11 Effect of xylanase concentration and time on the average % change in gray scale (room temperature) 56

5.12 Effect of xylanase concentration and time on the average % change in gray scale (60°c) 57

5.13 Effect of xylanase concentration and time on xylose produced (room temperature) 59

5.14 Effect of xylanase concentration and time on xylose produced (60°C) 60

5.15 Effect of hydrogen peroxide and time on percentage change in gray scale .. 62

5.16 Scanning electron microscope of untreated wood and wood treated with xylanase 0.05 u/ml at 32°C for 30 min, then treated with 10%H_2O_2 and laccase 0.05 u/ml at 60°C for 4 hours at (x500) 70

5.17 Scanning electron microscope of untreated wood and wood treated with xylanase 0.05 u/ml at 32°C for 30 min, then treated with 10%H_2O_2 and laccase 0.05 u/ml at 60°C for 4 hours at (x50) 70

5.18 Scanning electron microscope of untreated wood and wood treated with xylanase 0.05 u/ml at 32°C for 30 min, then treated with 10%H_2O_2 at 60°C for 4 hours (x500) 71

5.19 Scanning electron microscope of untreated wood and wood treated with xylanase 0.05 u/ml at 32°C for 30 min, then treated with 10%H_2O_2 at 60°C for 4 hours (x50) 71

5.20 Scanning electron microscope of untreated wood and wood treated with elemental chlorine free chemical (x500) (market wood) 72

5.21 Scanning electron microscope of untreated wood and wood treated with elemental chlorine free chemical (x50) (market wood) 72