เอกสารอ้างอิง

1. Ghose, T.K., "Cellulase Biosynthesis and Hydrolysis of Cellulosic Substances," Adv. Biochem. Eng., 6, 39, 1977.

2. ฝ่ายสนเทศอุตสาหกรรม, "รายงานภาวะเศรษฐกิจอุตสาหกรรมเฉพาะประเภท ปี 2527 : อุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง," กองเศรษฐกิจอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพมหานคร, 2527.

3. Anprung, P., N. Sriputtirut, and K. Dummananda, Fermentable Sugar Production from Solid Pineapple Waste," J. Sci. Res. Chula. Univ., 1989, in press.

4. กรมศุลกากร, "สถิติสินค้าต่างประเทศของไทย เดือนธันวาคม 2529," กระทรวงการคลัง, กรุงเทพมหานคร, 2529.

5. Cowling, E.B., "Physical and Chemical Constraints in the Hydrolysis of Cellulose and Lignocellulosic Materials," Cellulose as a Chemical and Energy Resource (Wilke, C.R. ed.), pp. 163-180, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A., 1975.

6. Goksøyr, J., and J. Eriksen, "Cellulases," Microbial Enzymes and Bioconversions (Rose, A.H. ed.), pp. 283-292, Academic Press, Inc., London, 1980.

7. Stephens, G.R., and G.H. Heichel," Agricultural and Forest Products as Sources of Cellulose," Cellulose as a Chemical and Energy Resource (Wilke, C.R. ed.), pp. 29, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A., 1975.

8. UNIDO IS. 476, "Enzymatic Conversion of Cellulosic Materials to Sugars and Alcohol : the Technology and Its Implications," United Nations Industrial Development Organization, USSR., 1984.

9. Wood, T.M., "Properties and Mode of Action of Cellulases," Cellulose as a Chemical and Energy Resource (Wilke, C.R. ed.), pp. 111-137, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A., 1975.

10. Cowling, E.B., and W. Brown, "Structural Features of Cellulosic Materials in Relation to Enzymatic Hydrolysis," Cellulases and Their Applications (Gould, R.F. ed.), pp. 152-187, American Chemical Society Publications, U.S.A., 1969.

11. Millett, M.A., A.J. Baker, and L.D. Satter, "Pretreatments to Enhance Chemical, Enzymatic, and Microbiological Attack of Cellulosic Materials," Cellulose as a Chemical and Energy Resource (Wilke, C.R. ed.), pp. 193-219, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A., 1975.

12. ธนิต ผิวนิ่ม, "การตรึงเอนไซม์," เอกสารประกอบการประชุมวิชาการเรื่อง "เอนไซม์และการประยุกต์ใช้", หน้า 59-73, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ, 2530.

13. Yaqoob, M., and M. Aslam, "Physical Immobilization of Cellulase on Charcoal and Glass Beads," J. Pure Appl. Sci., 2(2), 37-39, 1983.

14. Mandels, M., J. Kostick, and R. Parizek, "Use of Adsorbed Cellulase in the Continuous Conversion of Cellulose to Glucose," J. Polym. Sci., Part C, 36, 445-459, 1971.

15. Rohrbach, R.P., "Support Matrix and Immobilized Enzyme System," U.S. Pat 4,525,456, June 25, 1985.

16. Fadda, M.B., M.R. Dessi, R. Maurici, A. Rinaldi, and G. Satta, "Highly Efficient Solubilization of Natural Lignocellulosic Materials by a Commercial Cellulase Immobilized on Various

Solid Support," Appl. Microbiol. Biotechnol., 19(5), 306 306-11, 1984.

17. Wongkhalaung, C., Y. Kashiwagi, Y. Magae, T. Ohta, and T. Sasak, "Cellulase Immobilized on a Soluble Polymer," Appl. Microbiol. Biotechnol., 21(1-2), 37-41, 1985.

18. Rogalski, J., J. Szozodrak, A. Dawidowioz, Z. Ilozuk, and A. Leonowiez, "Immobilization of Cellulose and D-Xylanase Complexes from *A. terreus.* F-413 on Controlled Porosity Glasses," Enzyme Microb. Technol., 7(8), 395-400, 1985.

19. Thomplison, D.K., I.A. Angelo and M.P. Mathur, "Immobilization of Rennet on Sand, a Preliminary Report," The Indian J. Dairy Sci., 36(3), 328, 1983.

20. Anprung, P., S. Chuengsaengsatityaporn, and C. Thunpithayakul, "Preparation of Immobilized Rennin for Cheese Making I : Preparation and Enzymatic Properties of Rennin Immobilized on Sand," ASEAN Food Conference, Bangkok, 1988.

21. Kumakura, M., and I. Kaetsu, "Nature of Polymer Matrix of Immobilized Enzyme Composites Obtained by Radiation Polymerization of Bifunctional Monomers and Its Effect on the Enzymatic Activity," Makromol. Chem., 184(9), 1831-6, 1983.

22. _____, "Immobilization of Cellulose Using Porous Polymer Matrix," J. Appl. Polym. Sci., 29, 2713-2718, 1984.

23. _____, "Encapsulation of Enzymes by a Radiation Technique," Biotechnol. Lett., 6(7), 409-12, 1984.

24. Ghose, T.K., and J.A. Kostick, "A Model for Continuous Enzymatic Saccharification of Cellulose with Simultaneous Removal of Glucose Syrup," Biotechnol. Bioeng., 12, 921-946, 1970.

25. Okamoto, H., P. Tipayang, and Y. Inada, "Fibrin Membrane Endowed with Biological Function V. Multienzyme Complex of Uricase, Catalase, Allantoinase and Allantoicase," Biochim. Biophy. Acta, 611, 35-39, 1980.

26. Hartmeier, W., "Coimmobilization of Enzymes and Whole Cells," Abstr. International Conference on Biotechnology and Food, Hohenheim University, Federal Republic of Germany, 20-24 Feb. 1989.

27. สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, ฟลูอิดไดเซชัน, หน้า 1-52, สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 2528.

28. Mc Cabe, W.L., J.C. Smith, and P. Harriott, "Fluid Mechanics," Units Operations of Chemical Engineering (Carberry, J.J. ed.), pp. 147-161, McGraw-Hill, Inc., New York, 1985.

29. Karube, I., S. Tanaka, T. Shirai, and S. Suzuki, "Hydrolysis of Cellulose in a Cellulase-Bead Fluidized Bed Reactor," Biotechnol. Bioeng., XIX, 1183-1191, 1977.

30. Rogers, P.L., R.G. Cail, D.F. Midgley, and C. Fryer, "The Prospects for L-Lysine Production in Australia," Food Technology in Australia, 38(12), 514-518, 1986.

31. Nakayama, K., "Lysine," Comprehensive Biotechnology (Moo-Young, M. ed.), Vol. 3, pp. 607-620, Pergamon Press, Ltd., New York, 1985.

32. Pelechova, J., R. Seifert, and F. Smekal, "Biosynthesis of L-Lysine from Paper Hydrolyzate with *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium* sp.," Kvasny Prum., 29(2), 279-282, 1983.

33. Chancharoensin, S., and A. Bhumiratana, "Production of L-Lysine by Homoserine Auxotrophic Mutant of *Corynebacterium glutamicum* (Hom^-)," Thai J. Agric. Sci., 16, 315-337, 1983.

34. Somogyi, M., "Notes on Sugar Determination," J. Biol. Chem., 195, 19-23, 1952.

35. Tipayang, P. and M. Kozaki, "Lactic Acid Production by a New *lactobacillus* sp., *Lactobacillus vaccinostercus* Kozaki and Okada sp. nov., Immobilized in Calcium Alginate," J. Ferment. Technol., 60, 595-598, 1982.

36. AOAC., Official Method of Analysis, 13 rd. ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., 1980.

37. Trevan, M.D., Immobilized Enzymes, pp. 12, 22-23, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A., 1980.

38. Klibanov, A.M., "Enzyme Stabilization by Immobilization," Proceeding of a Regional Workshop (Flegel, T.W., and V. Meevootisom, eds.), pp. 19-51, Mahidol University, Bangkok, 1982.

39. Pitel, J.A. and W.M. Cheliak, "Enzyme Activities During Imbibition and Germination of Seeds of Tamarack (*Larix laricina*)," Physiol. Plant, 67(4), 562-569, 1986.

40. Funfu, D.L.M., A. Houbion, and J. Remacle, "Alteration of Enzymes in Aging Human Fibroblasts in Culture IV. Effect of Glutathione on the Alteration of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase," Mech. Ageing Dev., 32(2-3), 249-266, 1985.

41. Maulik, P. and S. Ghosh, "NADPH/NADH-Dependent Cold-labile Glutamate Dehydrogenase in *Azospirillum brasilense*. Purification and Properties," Eur. J. Biochem., 155(3), 595-602, 1986.

42. Tanaka, M., G.J. Song, R. Matsuno, and T. Kamikubo, "Evaluation of Effectiveness of Pretreating Rice Straw with n-Bytylamine for Improvement of Sugar Yield," Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 19-25, 1985.

43. _____, "Optimal Conditions for Pretreatment of Rice Straw with n-Butyllamine for Enzymatic Solubilization," Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 13-18, 1985.

44. Sriputtirut, N., and P. Anprung, "Preparation and Enzymic Properties of Cellulase and Cellobiase Complexes Immobilized on Sand," Abstr. International Conference on Biotechnology and Food, Hohenheim University, Federal Republic of Germany, 20-24 Feb. 1989.

45. Robinson, P.J., P. Dunnill, and M.D. Lilly, "Porous Glass as a Solid Support for Immobilization or Affinity Chromatography of Enzymes," Biochim. Biophys. Acta., 242, 659-661, 1971.

46. Imai, K., T. Shiomi, K. Uchida, and M. Miya, "Immobilization of Enzyme into Poly (vinyl alcohol) Membrane," Biotechnol. Bioeng., 28(11), 1721-6, 1986.

47. Kumakura, M., and I. Kaetsu, "Immobilized Enzyme Particles Prepared by Radiation Polymerization of Polyurethane Prepolymer," Helvetica Chimica Acta., 66, 2778-2784, 1983.

48. Novo Industri A/S, "Celluclast™," Novo Industri A/S, Denmark, 1978.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ข้อมูลเพิ่มเติม

ก-1. องค์ประกอบสำคัญของกากสับปะรด (3)

ตาราง ก-1 องค์ประกอบสำคัญของกากสับปะรดแห้ง

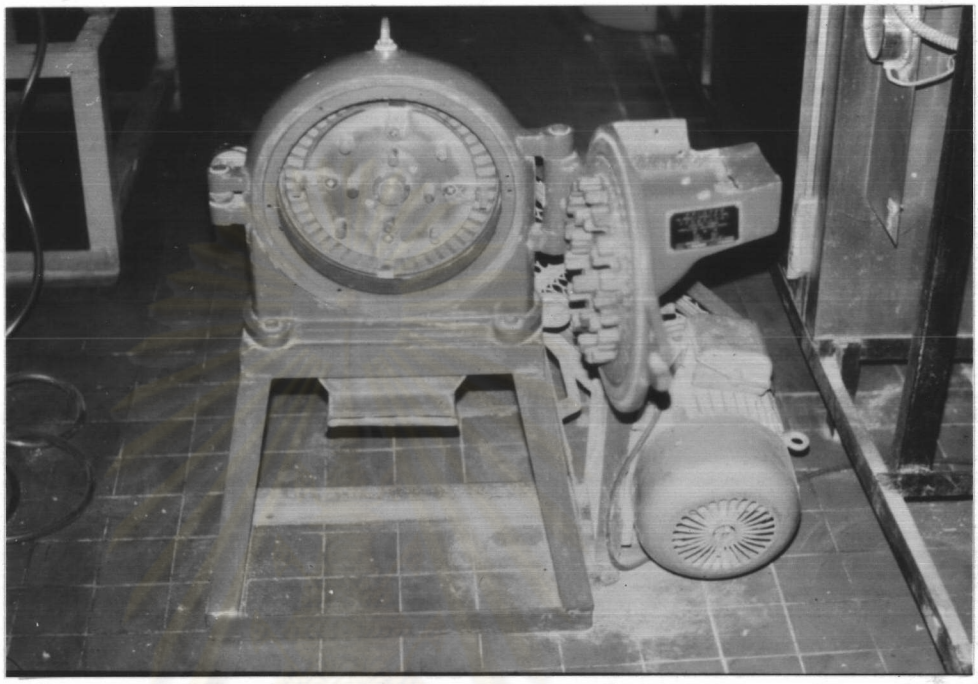
องค์ประกอบ	ปริมาณ[ก] (%)
เส้นใย (crude fiber)	29.33
เซลลูโลส (cellulose)	24.33
ลิกนิน (lignin)	4.80
เถ้า (ash)	2.29

ก หมายถึง เปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้ง (based on dry weight)

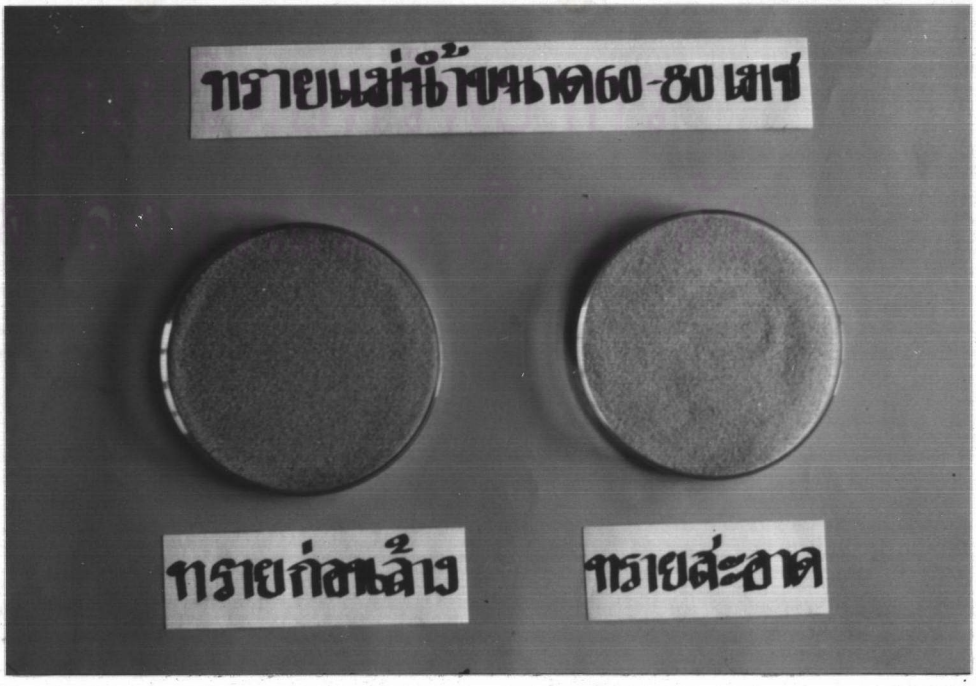
หมายเหตุ ในเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (crop residues) ทั่วไปมีลิกนินในช่วงร้อยละ 3-13 โดยน้ำหนัก

รูป ก-1 ลักษณะกากสับปะรดสดและกากสับปะรดแห้ง

ก-2. ลักษณะของเครื่อง pin mill



ก-3. ลักษณะทรายแม่น้ำขนาด 60-80 เมช



ก-4. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson

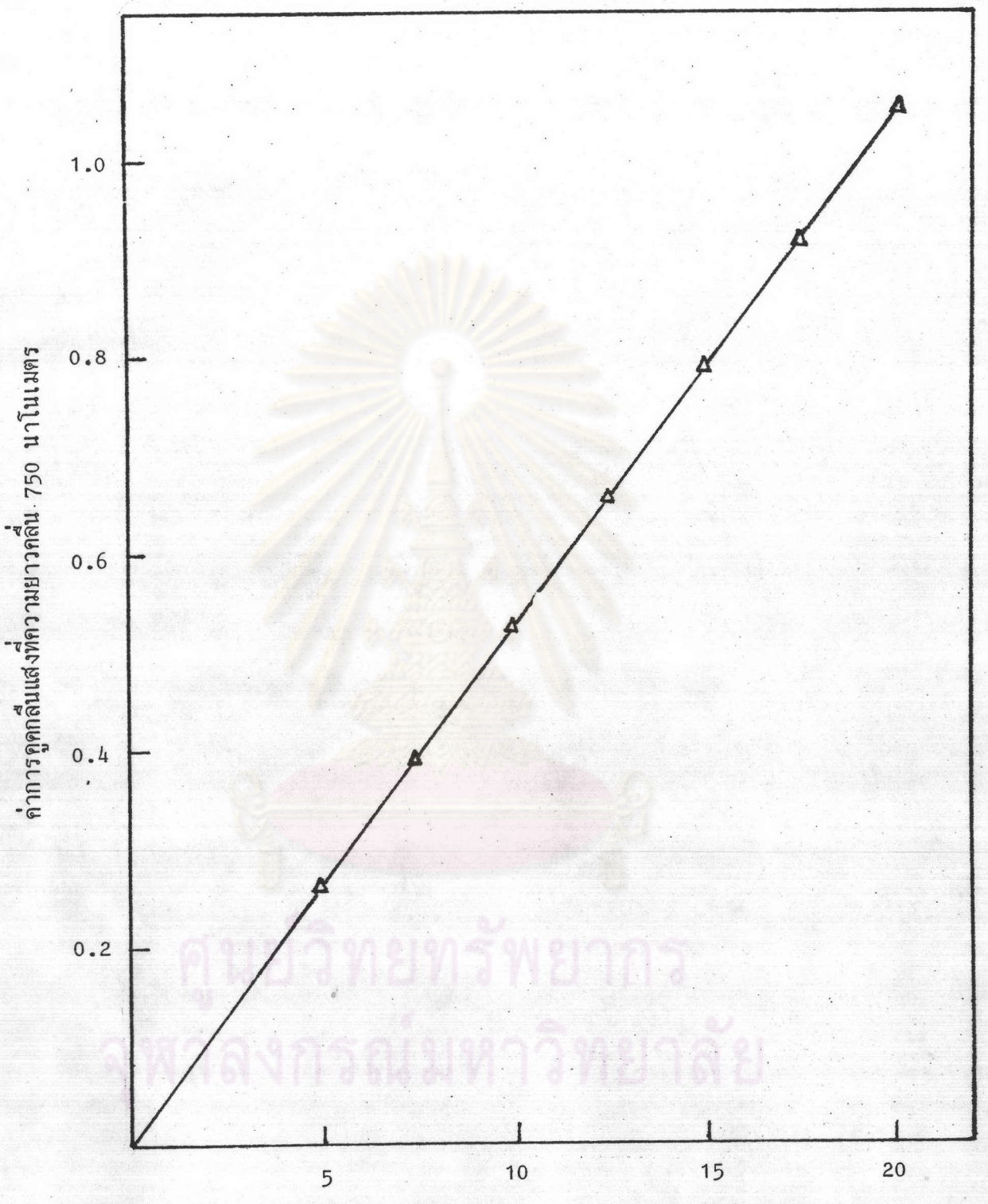
ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารละลาย Somogyi ซึ่งเตรียมตามวิธีในข้อ 3.2.2.2.4 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองและผสมของเหลวในหลอดทดลองให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมเวอร์เทกซ์ นำหลอดทดลองดังกล่าวต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีเมื่อครบเวลา จากนั้นเติมสารละลาย Nelson ซึ่งเตรียมตามวิธีในข้อ 3.2.2.2.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วผสมของเหลวในหลอดให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมเวอร์เทกซ์ เจือจางของเหลวในหลอดด้วยการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 4 มิลลิลิตร และผสมของเหลวให้เข้ากันอีกครั้ง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของของเหลวที่ได้ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับการทดสอบไร้สิ่งตัวอย่าง (blank test) ซึ่งใช้สารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง อ่านความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสซึ่งเตรียมได้ตามวิธีในข้อ ก-5.

ก-5. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson ของสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมได้ตามวิธีข้อ 3.2.2.2.1

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ ก-5.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ก-5. กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก-6. การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

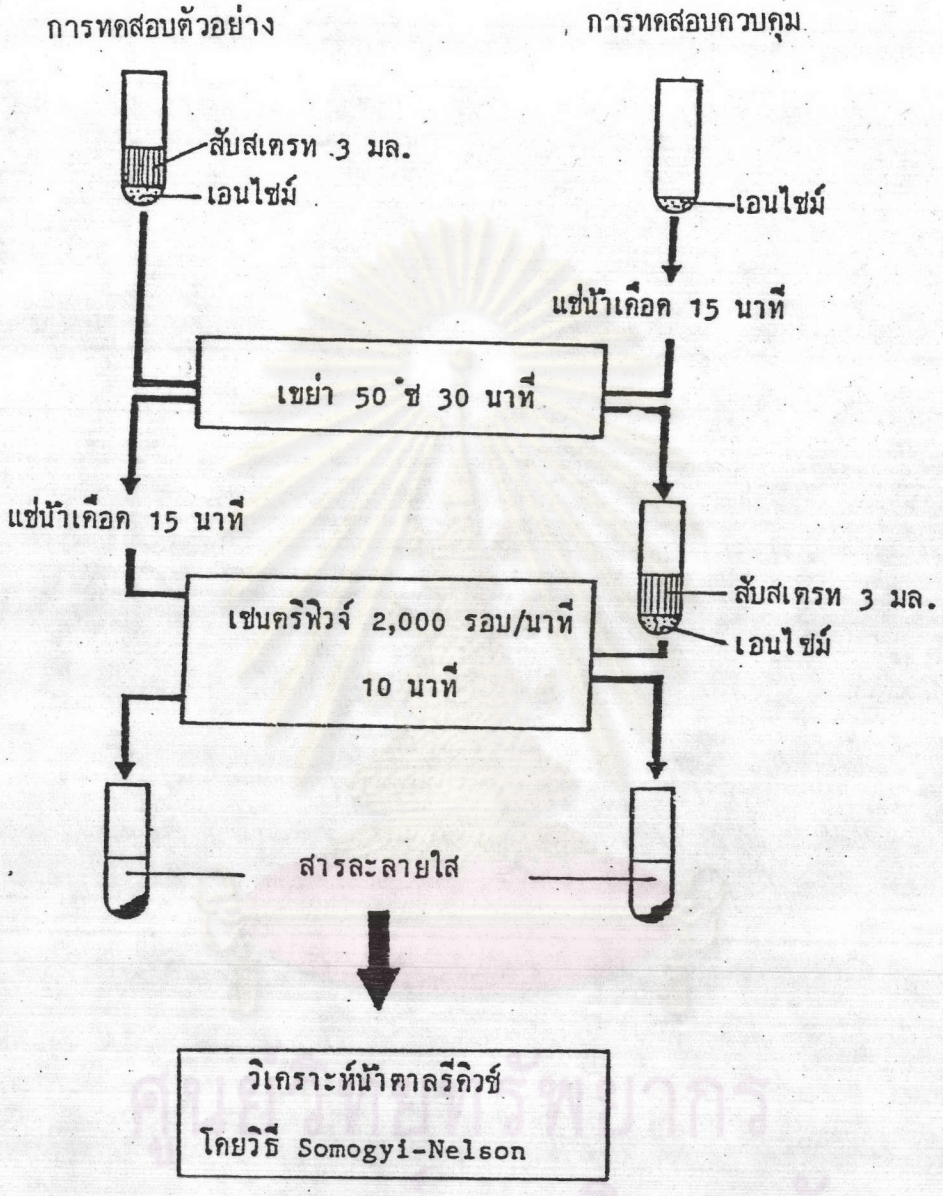
ก-6.1 การทดสอบตัวอย่าง (sample test)

นำหลอดตัวอย่างซึ่งบรรจุเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปหนัก 1 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาให้ความร้อนเบื้องต้นในเครื่องอังน้ำแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยของเอไวเซลความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งเตรียมตามวิธีในข้อ 3.2.2.1.2 ที่ผ่านการให้ความร้อนเบื้องต้นจนมีอุณหภูมิเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าหลอดบรรจุสารตัวอย่างดังกล่าวที่อุณหภูม 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยการแช่หลอดบรรจุสารตัวอย่างในน้ำเดือดนาน 15 นาที จากนั้นแยกเอไวเซลที่เหลือจากการย่อยออกโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงอัตราเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำสารละลายใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson ดังข้อ ก-4.

ก-6.2 การทดสอบควบคุม (control test)

นำหลอดบรรจุเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปหนัก 1 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาให้ความร้อนโดยการแช่น้ำเดือดนาน 15 นาที จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติมสารแขวนลอยของเอไวเซลความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งเตรียมตามวิธีในข้อ 3.2.2.1.2 ที่ผ่านการให้ความร้อนเบื้องต้นจนมีอุณหภูมิเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แยกเอไวเซลออกโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงอัตราเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำสารละลายใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson ดังข้อ ก-4.

วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนทั้งหมดแสดงดังรูปที่ ก-6.



รูปที่ ก-6. วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

สับสเตรท = สารแขวนลอยของเอไวเซลความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0

ก-7. รายละเอียดของเอนไซม์เซลลูเลส

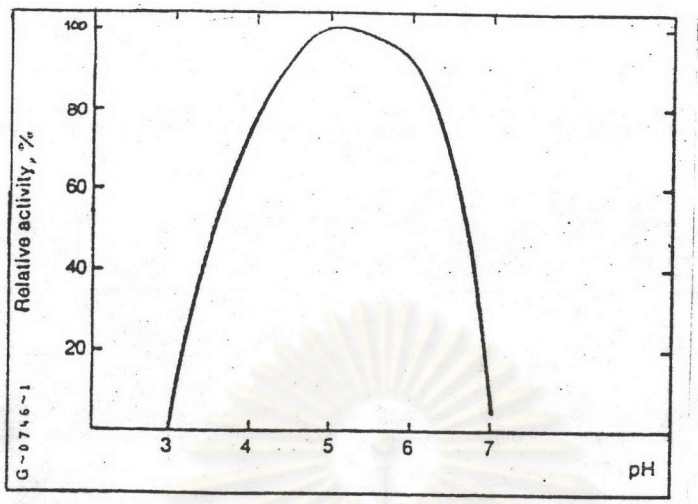
เอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีชื่อทางการค้าคือ เซลลูคลาสท์ 1.5 แอล (Celluclast 1.5 L) มีรายละเอียดดังนี้ (48)

ก-7.1 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูคลาสท์ 1.5 แอล

เซลลูคลาสท์เป็นเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเตรียมโดยการหมักแบบแช่จุ่ม (submerged fermentation) ใช้สายพันธุ์คัดเลือกของ *Trichoderma reesei* การย่อยสลายสับสเตรท เช่น เอไวเซล โดยใช้เซลลูคลาสท์นั้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นกลูโคส, เซลโลไบโอส และสายโพลีเมอร์ของกลูโคสขนาดต่าง ๆ กัน โดยสัดส่วนของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดที่ได้จะขึ้นกับสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา นอกจากนี้เซลลูคลาสท์มีผลในการลดความหนืดของสับสเตรทพวกเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ (soluble cellulosic substrates) เช่น คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (CMC) และบีตา-กลูแคน (beta-glucans) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ เซลลูคลาสท์มีองค์ประกอบเป็นเซลโลไบโอ ไฮโดรเลส (EC 3.2.1.91) เอกโซ-1,4-บีตา-ดี-กลูโคสิเดส (EC 3.2.1.74) และ เอนโด-1,4-บีตา-ดี-กลูคาเนส (EC 3.2.1.4)

เซลลูคลาสท์มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล ละลายน้ำได้ดี ความหนาแน่น (density) ประมาณ 1.2 กรัมต่อมิลลิลิตร มีแอคติลิตี 1,500 NCU ต่อกรัม โดย NCU หรือ Novo Cellulase Unit คือปริมาณของเอนไซม์ซึ่งสามารถย่อยสลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (Hercules 7LFD) ภายใต้ภาวะที่กำหนด (40 °ซ, พีเอช 4.8, 20 นาที) ให้คาร์โบไฮเดรตที่มีกลุ่มรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลาร์ต่อนาที

แอคติวิตีของเซลลูคลาสท์เมื่อทำการย่อยสลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสที่พีเอชและอุณหภูมิต่าง ๆ แสดงในรูปที่ ก-7.1 และ ก-7.2 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานคือ 50-60 °ซ ที่พีเอช 4.5-6.0

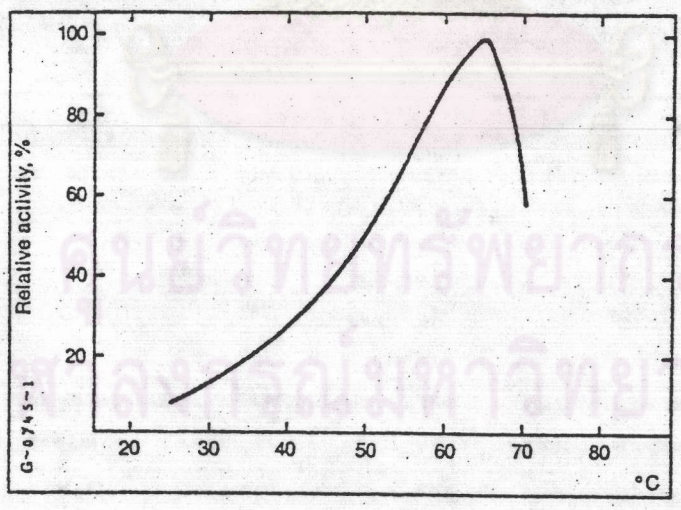


รูปที่ ก-7.1 ผลของพีเอชต่อแอคติวิตีของเซลลูคลาสท์

ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.02 NCU ต่อมิลลิลิตร

อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

เวลาในการทำปฏิกิริยา 20 นาที



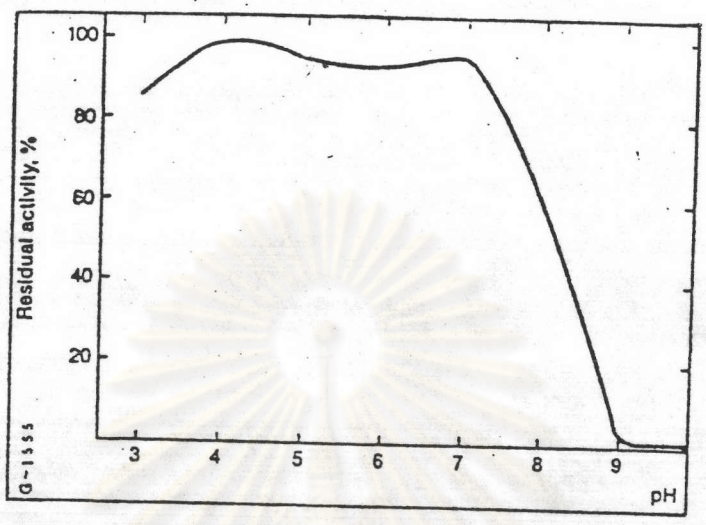
รูปที่ ก-7.2 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเซลลูคลาสท์

ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.02 NCU ต่อมิลลิลิตร

พีเอช 4.8

เวลาในการทำปฏิกิริยา 20 นาที

เสถียรภาพของเซลลูคลาสท์ที่พีเอชและอุณหภูมิต่าง ๆ เมื่ออยู่ในรูปของสารละลายเอนไซม์ แสดงในรูปที่ ก-7.3 และ ก-7.4 ตามลำดับ



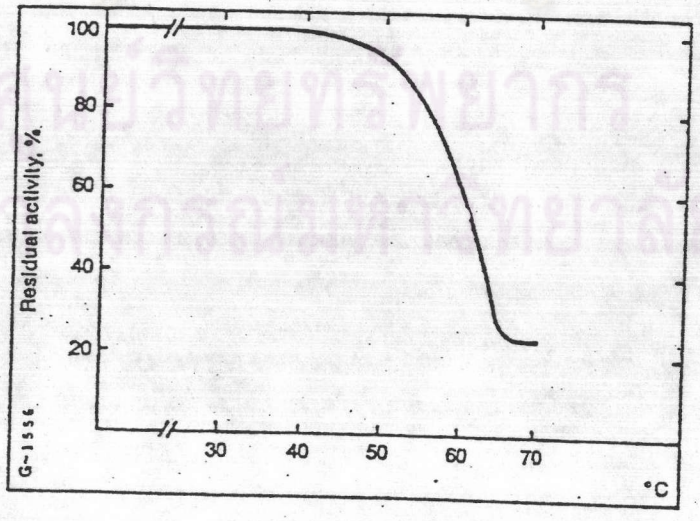
รูปที่ ก-7.3 ผลของพีเอชต่อเสถียรภาพของเซลลูคลาสท์

ความเข้มข้นของเอนไซม์ 2 NCU ต่อมิลลิลิตร

อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เวลาของการเก็บ (storage time) 16 ชั่วโมง

บัฟเฟอร์ Mcllvaine



รูปที่ ก-7.4 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเซลลูคลาสท์

ความเข้มข้นของเอนไซม์ 2 NCU ต่อมิลลิลิตร

พีเอช 4.8

เวลาของการเก็บ 30 นาที

โดยทั่วไปการเก็บเซลลูคลาสท์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนั้น เอนไซม์จะยังคงมีแอคติวิตีเท่าเดิม (1,500 NCU ต่อกรัม) เมื่อเก็บนาน 3 เดือน และหลังจากนั้นเอนไซม์จะมีแอคติวิตีลดลงร้อยละ 1-2 ต่อเดือน การเก็บเซลลูคลาสท์ที่อุณหภูมิต่ำลง (5-10 °ซ) จะทำให้อายุการเก็บ (shelf life) ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น

ก-7.2 การใช้งาน

เซลลูคลาสท์สามารถใช้สำหรับการผลิตน้ำตาลสำหรับหมักโดยการย่อยสลายวัตถุดิบพวกเซลลูโลส และใช้ลดความหนืดหรือเพิ่มผลผลิตสำหรับผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ได้จากพืช

สำหรับการผลิตน้ำตาลสำหรับหมักจากวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบนั้นจำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมสภาพขั้นต้นวัตถุดิบก่อน เพื่อทำให้เซลลูโลสมีสภาพที่เหมาะต่อการเข้าทำงานของเอนไซม์

นอกจากนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของการย่อยสลายโดยเซลลูคลาสท์คือเซลโลไบโอส และกลูโคส เซลโลไบโอสนั้นไม่ใช่น้ำตาลสำหรับหมัก ดังนั้นเพื่อให้ได้การเปลี่ยนสูงสุด (maximum conversion) จากเซลลูโลสเป็นน้ำตาลสำหรับหมักที่ต้องการ ควรใช้เอนไซม์เซลโลไบเอสร่วมกับเซลลูคลาสท์ เอนไซม์เซลโลไบเอส (EC 3.2.1.21) ดังกล่าวมีชื่อทางการค้าคือ โนโวไซม์ 188 (Novozyme^{TM} 188) โดยใช้อัตราส่วนของเซลลูคลาสท์ต่อโนโวไซม์เป็น 1 : 0.2 โดยน้ำหนัก ปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ใช้นั้นขึ้นกับภาวะของปฏิกิริยา เช่น พีเอช, อุณหภูมิ, และความเข้มข้นของสับสเตรท และอัตราส่วนของเซลลูคลาสท์ต่อโนโวไซม์เปลี่ยนแปลงตามความเหมาะสมของกระบวนการ

ก-8. <u>รายละเอียดของเอนไซม์เซลโลไบเอส</u>

เอนไซม์เซลโลไบเอสที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีชื่อทางการค้าคือ โนโวไซม์ 188 (Novozyme^{TM} 188) มีรายละเอียดดังนี้

ก-8.1 คุณสมบัติของเอนไซม์โนโวไซม์ 188

โนโวไซม์เป็นเอนไซม์เซลโลไบเอส (EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้น้ำตาลกลูโคส โดยเซลโลไบโอสเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ไม่สามารถใช้หมักได้ (non-formentable carbohydrate) ประกอบด้วยดี-กลูโคส 1 โมเลกุลเชื่อมกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไกลโคสิดิค

โนโวไซม์มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล มีแอคติวิตี 188 หน่วยของเอนไซม์เซลโลไบเอสต่อกรัม (cbu/g) เนื่องจากโนโวไซม์เป็นเอนไซม์ตัวอย่างที่ใช้สำหรับห้องทดลอง ยังไม่มีการผลิตเพื่อการค้า ดังนั้นรายละเอียดต่าง ๆ เกี่ยวกับโนโวไซม์จึงปรากฏพอสังเขป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ตัวอย่างการวิเคราะห์และคำนวณข้อมูล

ข-1. การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอด

ข-1.1 การทดลองแบบแผนแฟคตอเรียล 2 ปัจจัย

เมื่อ A และ B คือ ปัจจัยที่ศึกษา

a และ b คือ จำนวนระดับทั้งหมดของปัจจัย A และ B ตามลำดับ

r คือ จำนวนของการทำซ้ำ (replication) ในแต่ละทรีตเมนต์

n คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอดทำได้ดังนี้

ตารางที่ ข-1.1 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอด สำหรับการทดลองแบบแผนแฟคตอเรียล 2 ปัจจัย

SOV	df	SS	MS	$F_{calculated}$	F_{table}
A	(a - 1)	$\sum_{i=1}^{a} Y_{i...}^2/br - CT$	SS_A/df_A	MS_A/MS_E	$f(\%\ sig., df_A, df_E)$
B	(b - 1)	$\sum_{j=1}^{b} Y_{.j.}^2/ar - CT$	SS_B/df_B	MS_B/MS_E	$f(\%\ sig., df_B, df_E)$
AB	(a-1)(b-1)	$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y_{ij.}^2/r - CT - SS_A - SS_B$	SS_{AB}/df_{AB}	MS_{AB}/MS_E	$f(\%\ sig., df_{AB}, df_E)$
Error	ab(r-1)	$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{r} Y_{ijk}^2 - CT - SS_A - SS_B - SS_{AB}$	SS_E/df_E		
Total	abr - 1				

$$CT = \left(\sum_{i=1}^{a} \sum_{j=1}^{b} \sum_{k=1}^{r} Y_{ijk} \right)^2 / n$$

n = abr

Y_{ijk} = ข้อมูลที่ได้แต่ละค่า

i และ j = แต่ละระดับของปัจจัย A และปัจจัย B

k = แต่ละค่าของการทำซ้ำ

$.$ = การรวมค่าของข้อมูลตามแนวของอักษรนั้น ๆ ในทุกระดับของปัจจัยที่เหลือ เช่น $Y_{ij.}$ หมายถึง การรวมค่าของข้อมูลที่ได้จากการทำซ้ำในแต่ละทรีตเมนต์คอมบิเนชัน (treatment conbination) ของปัจจัย A และปัจจัย B

ข-1.2 การทดลองแบบแผนแฟคตอเรียล 3 ปัจจัย

เมื่อ A, B และ C คือ ปัจจัยที่ศึกษา

a, b และ c คือ จำนวนระดับทั้งหมดของปัจจัย A, B และ C ตามลำดับ

r คือ จำนวนของการทำซ้ำ

n คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอดทำได้ดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข-1.2 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอด สำหรับการทดลองแบบแผนแฟคตอเรียล 3 ปัจจัย

SOV	df	SS	MS	$F_{calculated}$	F_{table}
A	(a-1)	$\sum_{i=1}^{a} Y_{i...}^2/bcr - CT$	SS_A/df_A	MS_A/MS_E	$f(\%sig.,df_A,df_E)$
B	(b-1)	$\sum_{j=1}^{b} Y_{.j..}^2/acr - CT$	SS_B/df_B	MS_B/MS_E	$f(\%sig.,df_B,df_E)$
C	(c-1)	$\sum_{k=1}^{c} Y_{..k.}^2/abr - CT$	SS_C/df_C	MS_C/MS_E	$f(\%sig.,df_C,df_E)$
AB	(a-1)(b-1)	$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y_{ij..}^2/cr - CT - SS_A - SS_B$	SS_{AB}/df_{AB}	MS_{AB}/MS_E	$f(\%sig.,df_{AB},df_E)$
AC	(a-1)(c-1)	$\sum_{i=1}^{a}\sum_{k=1}^{c} Y_{i.k.}^2/br - CT - SS_A - SS_C$	SS_{AC}/df_{AC}	MS_{AC}/MS_E	$f(\%sig.,df_{AC},df_E)$
BC	(b-1)(c-1)	$\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{c} Y_{.jk.}^2/ar - CT - SS_B - SS_C$	SS_{BC}/df_{BC}	MS_{BC}/MS_E	$f(\%sig.,df_{BC},df_E)$
ABC	(a-1)(b-1)(c-1)	$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{c} Y_{ijk.}^2/r - CT - SS_A - SS_B - SS_C - SS_{AB} - SS_{AC} - SS_{BC} - SS_{ABC}$	SS_{ABC}/df_{ABC}	MS_{ABC}/MS_E	$f(\%sig.,df_{ABC},df_E)$
Error	(abc-1)(r-1)	Total SS - Treatment SS	SS_E/df_E		
Total	abcr-1	$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{c}\sum_{l=1}^{r} Y_{ijkl}^2 - CT$			

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อ $CT = Y^2..../n$

$n = abcr$

i,j,k = แต่ละระดับของปัจจัย A, B และ C

l = แต่ละค่าของการทำซ้ำ

$.$ = การรวมข้อมูลตามแนวของอักษรนั้น ๆ ในทุกระดับของปัจจัยที่เหลือ เช่น $Y_{ijk.}$ หมายถึง การรวมข้อมูลที่เกิดจากการทำซ้ำของแต่ละทรีทเมนต์คอมบิเนชันของปัจจัย A ปัจจัย B และปัจจัย C

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข-2. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's New Multiple Range test สำหรับการทดลองแบบแผนแฟคตอเรียล

โดยการหาค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้สำหรับแต่ละทรีตเมนต์คอมบิเนชันแล้วเรียงลำดับค่าเฉลี่ยจากน้อยไปหามาก จากนั้นคำนวณค่า $S_y = (MS_E/r)^{\frac{1}{2}}$ เมื่อ r คือจำนวนการทำซ้ำ เปิดตารางหาค่า Significant Studentized Range (SSR) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ตั้งแต่ค่า P = 2 ถึง P = n-1 ที่ df_E (n คือจำนวนค่าเฉลี่ยทั้งหมดที่ต้องการเปรียบเทียบ) แล้วคำนวณค่า LSR = $S_y \times SSR$ จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่กับค่า LSR ตามค่าของ P

ข-3. ตัวอย่างการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอด และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's New Multiple Range test สำหรับการทดลองแบบแผนแฟคตอเรียล

จากการทดลองในข้อ 3.3.1.3 การกำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส สารละลายกลูตารัลดีไฮด์และอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสโดยน้ำหนัก ในสารละลายเอนไซม์เชิงซ้อน โดยใช้การทดลองแบบแฟคตอเรียล 2×3×3

เมื่อ A คือ ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส มี 2 ระดับ คือร้อยละ 5 และ 7 โดยปริมาตร

B คือ ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ มี 3 ระดับคือ ร้อยละ 1, 2.5 และ 5 โดยปริมาตร

C คือ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอส มี 3 ระดับคือ 5:1, 2:1 และ 1:1

โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ข้อมูลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ ข-3.

ตารางที่ ข-3. ข้อมูลการทดลองแปรความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอส

A	B	C	Replications		Treatment Total
			1.	2.	
a_1 = 5%	b_1 = 1%	c_1 = 5:1	0.370	0.431	0.801
		c_2 = 2:1	0.521	0.538	1.059
		c_3 = 1:1	0.502	0.474	0.976
	b_2 = 2.5%	c_1 = 5:1	0.402	0.518	0.920
		c_2 = 2:1	0.663	0.701	1.364
		c_3 = 1:1	0.540	0.539	1.079
	b_3 = 5%	c_1 = 5:1	0.389	0.481	0.870
		c_2 = 2:1	0.626	0.524	1.150
		c_3 = 1:1	0.382	0.412	0.794
a_2 = 7%	b_1 = 1%	c_1 = 5:1	0.326	0.497	0.823
		c_2 = 2:1	0.411	0.498	0.909
		c_3 = 1:1	0.466	0.453	0.919
	b_2 = 2.5%	c_1 = 5:1	0.417	0.358	0.775
		c_2 = 2:1	0.516	0.713	1.229
		c_3 = 1:1	0.553	0.665	1.218
	b_3 = 5%	c_1 = 5:1	0.399	0.397	0.796
		c_2 = 2:1	0.673	0.669	1.342
		c_3 = 1:1	0.582	0.500	1.082
Total			0.738	9.368	18.106

วิธีการคำนวณ

$$\text{Correction term (CT)} = Y^2.../abcr$$

$$= \frac{(18.106)^2}{2\times3\times3\times2}$$

$$= 9.1063$$

ตารางที่ 1

B	A		Total
	a_1 (5%)	a_2 (7%)	
b_1 (1%)	2.836	2.651	5.487
b_2 (2.5%)	3.363	3.222	6.585
b_3 (5%)	2.814	3.220	6.034
Total	9.013	9.093	18.106

$$\text{Total SS ตารางที่ 1} = \frac{\left\{(2.836)^2 + ... + (3.220)^2\right\}}{6} - 9.1063$$

$$= 0.0685$$

$$SS_{(A)} = \frac{\left\{(9.013)^2 + (9.093)^2\right\}}{18} - 9.1063$$

$$= 1.76 \times 10^{-4}$$

$$SS_{(B)} = \frac{\left\{(5.487)^2 + (6.585)^2 + (6.034)^2\right\}}{12} - 9.1063$$

$$= 5.02 \times 10^{-2}$$

$$SS_{(AB)} = \text{Total SS} - SS_{(A)} - SS_{(B)}$$

$$= 0.0685 - 0.0002 - 0.05025$$

$$= 1.81 \times 10^{-2}$$

ตารางที่ 2

B	C			Total
	c_1 (5:1)	c_2 (2:1)	c_3 (1:1)	
b_1 (1%)	1.624	1.968	1.895	5.487
b_2 (2.5%)	1.695	2.593	2.297	6.585
b_3 (5%)	1.666	2.492	1.876	6.034
Total	4.985	7.053	6.068	18.106

Total SS ตารางที่ 2 $= \frac{\{(1.624)^2 + \ldots (1.876)^2\}}{4} - 9.1063$

$= 0.2635$

$SS_{(C)} = \frac{\{(4.985)^2 + (7.053)^2 + (6.068)^2\}}{12} - 9.1063$

$= 1.78 \times 10^{-1}$

$SS_{(BC)} = \text{Total SS} - SS_C - SS_B$

$= 0.2635 - 1.78 \times 10^{-1} - 5.02 \times 10^{-2}$

$= 3.50 \times 10^{-2}$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3

C	A		Total
	a_1	a_2	
c_1	2.591	2.394	4.985
c_2	3.573	3.480	7.053
c_3	2.849	3.219	6.068
Total	9.013	9.093	18.106

Total SS ตารางที่ 3 $= \frac{\{(2.591)^2 + \ldots + (3.219)^2\}}{6} - 9.1063$

$= 0.1937$

$SS_{(AC)} = \text{Total SS} - SS_{(C)} - SS_{(A)}$

$= 0.1937 - 0.1783 - 0.0002$

$= 1.52 \times 10^{-2}$

Treatment SS $= \frac{\{(0.801)^2 + \ldots + (1.082)^2\}}{2} - 9.1063$

$= 0.3160$

$SS_{(ABC)} = \text{Treatment SS} - \{SS_{(A} + SS_{(B)} + SS_{(C)} + SS_{(AB)} + SS_{(AC)} + SS_{(BC)}\}$

$= 0.3160 - \{0.0002 + 0.05025 + 0.1783 + 0.0181 + 0.0349 + 0.01520\}$

$= 1.90 \times 10^{-2}$

Total SS $= \sum_{i=1}^{a} \sum_{j=1}^{b} \sum_{k=1}^{c} \sum_{l=1}^{r} Y_{ijkl}^2 - CT$

$= \{(0.370)^2 + \ldots + (0.500)^2\} - 9.1063$

$= 0.3850$

Error SS = Total SS - Treatment SS

= 0.3850 - 0.3160

= 6.90×10^{-2}

ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์

SOV	df	SS	MS	F_{cal}
A	1	1.76×10^{-4}	1.76×10^{-4}	4.60×10^{-2}
B	2	5.02×10^{-2}	2.51×10^{-2}	6.55^{**}
C	2	1.78×10^{-1}	9.82×10^{-2}	23.26^{**}
A×B	2	1.81×10^{-2}	9.03×10^{-3}	2.36
A×C	2	1.52×10^{-2}	7.59×10^{-3}	1.98
B×C	4	3.50×10^{-2}	8.74×10^{-3}	2.28
A×B×C	4	1.90×10^{-2}	4.77×10^{-3}	1.25
Error	18	6.90×10^{-2}	3.83×10^{-3}	
Total	35	3.85×10^{-1}		

ข-4. ตัวอย่างการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's New Multiple Range test สำหรับการทดลองแบบแผนแฟคตอเรียล

จากการทดลองข้อ 3.3.1.3 เช่นกัน

การคำนวณ

$$LSR = SSR\sqrt{\frac{MS_E}{\text{จำนวนซ้ำ}}}$$

$$= SSR\sqrt{\frac{3.83 \times 10^{-3}}{2}}$$

$$= SSR \times 0.044$$

P	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	14	16	18
SSR	2.97	3.12	3.21	3.27	3.32	3.35	3.37	3.39	3.41	3.43	3.45	3.46	3.47
LSR	0.131	0.137	0.141	0.144	0.146	0.147	0.148	0.149	0.150	0.151	0.152	0.152	0.153

เรียงลำดับค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีตเมนต์

0.682 0.671 0.615 0.609 0.575 0.541 0.540 0.530 0.488 0.460 0.455

0.435 0.412 0.401 0.397 0.390 0.388

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนฤมล ศรีพุทธิรัตน์ เกิดเมื่อวันที่ 26 เมษายน พ.ศ. 2508 ณ จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2529 เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2530 โดยได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาและการค้นคว้าวิจัยประจำปีการศึกษา 2530 จากโครงการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนา (STDB) และทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยอีกส่วนหนึ่งจากบัณฑิตวิทยาลัย ในระหว่างศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิตมีกิจกรรมทางวิชาการดังนี้

20-22 ตุลาคม 2530	ร่วมการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 13 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
19-21 ตุลาคม 2531	ร่วมการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 14 ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
20-24 กุมภาพันธ์ 2532	ร่วม International Conference on Biotechnology and Food ณ มหาวิทยาลัย Hohenheim ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน

และมีผลงานวิชาการดังนี้คือ

1. นฤมล ศรีพุทธิรัตน์, กาญจนา ทุมมานนท์ และ ปราณี อ่านเปรื่อง, "การผลิตน้ำตาลสำหรับหมักจากกากสับปะรดแข็ง" การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 13, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่, 2530.
2. นฤมล ศรีพุทธิรัตน์ และ ปราณี อ่านเปรื่อง, "ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นของกากสับปะรดแข็งโดยเอน-บิวทิลลามีนต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์," การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 14, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, 2531.

3. Anprung, P., N. Sriputtirut, and K. Dummananda, "Fermentable Sugar Production from Solid Pineapple Waste," J. Sci. Res. Chula. Univ., 1989, in press.

4. Sriputtirut, N., and P. Anprung, "Preparation and Enzymic Properties of Cellulase and Cellobiase Complexes Immobili[ed on Sand," Abstr. International Conference on Biotechnology and Food, Hohenheim University, Federal Republic of Germany, 20-24 Feb. 1989.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย