หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ส่วนประกอบในเซลล์พืช

ฟางข้าวจัดเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสิก (lignocellulosic material) ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีส่วนประกอบหลัก ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และสภาวะที่เจริญเติบโตของต้นข้าว การนำเอาส่วนประกอบในฟางข้าวมาใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องทราบถึงลักษณะโครงสร้างและปริมาณส่วนประกอบเหล่านั้น เพื่อพิจารณาเลือกวิธีการผลิตที่เหมาะสม

1. เซลลูโลส เป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดในเซลล์พืช ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงแก่เซลล์พืช โดยธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่มักรวมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลส เพนโตแซน (pentosan) กัม (gum) แทนนิน (tannins) ไขมัน (lipid) และสารเกิดสี (colouring matter) เป็นต้น (Meyer และคณะ, 1961; Greulch, 1973; Darvill และคณะ 1980; Paturau, 1989) ดังแสดงในรูป 2.1

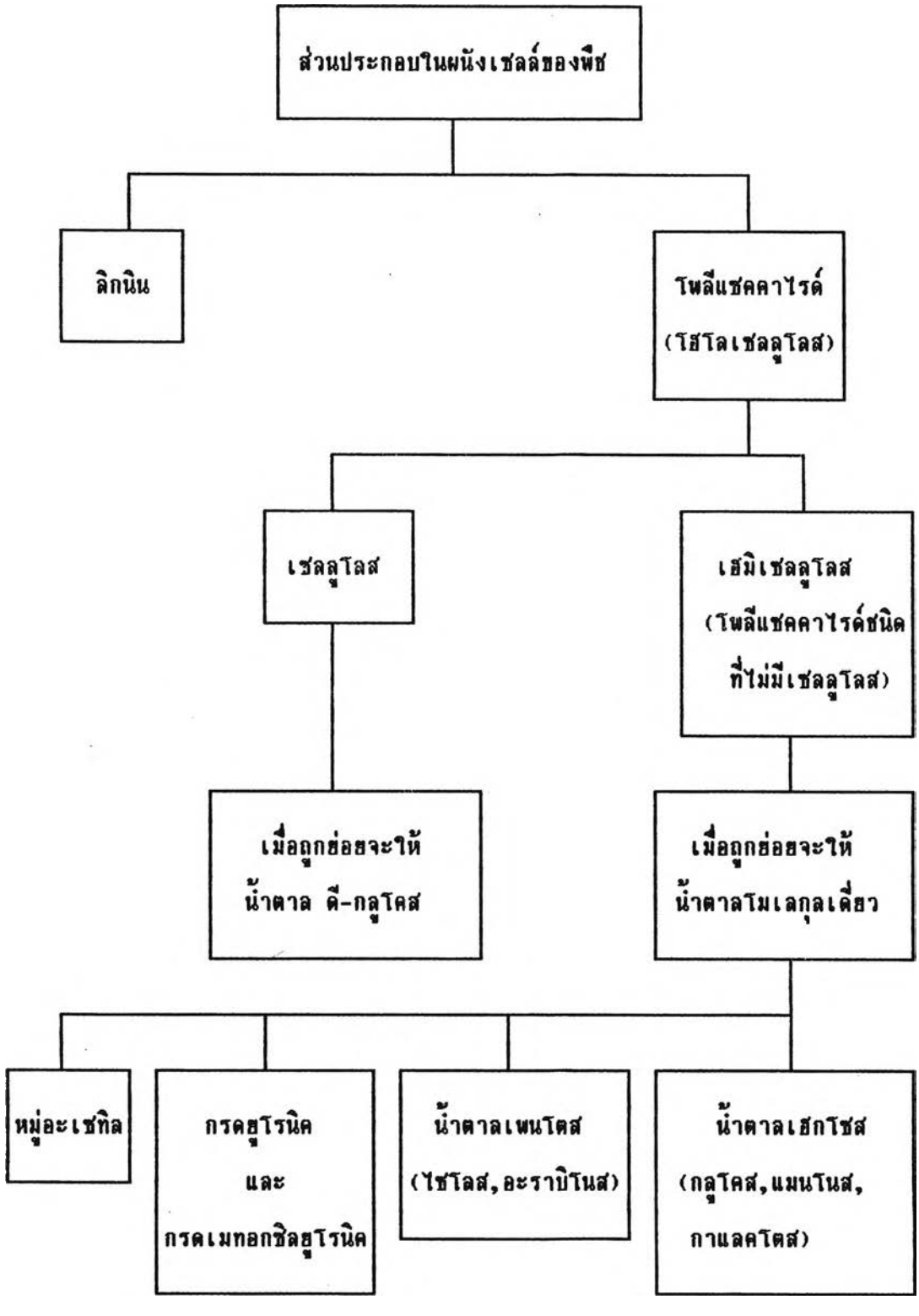
ก. โครงสร้างทางกายภาพ

ผนังเซลล์พืชมีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ ซึ่งเป็นหน่วยเล็กๆที่ประกอบรวมเป็นเนื้อเยื่อพืช ในเซลล์พืชมีโปรโตปลาสซึม (protoplasm) และสารหล่อเลี้ยงในเซลล์ (cell sap) โดยมีผนังบางๆที่ไม่มีสีเรียกว่า เซลล์เมมเบรน (cell membrane) ห่อหุ้มอยู่ ดังรูปที่ 2.2 แสดงภาคตัดขวางของเส้นใยเซลลูโลส (cellulose fiber) และลักษณะของเซลล์

ตารางที่ 2.1 ปริมาณเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส, และลิกนิน ในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรบางชนิด

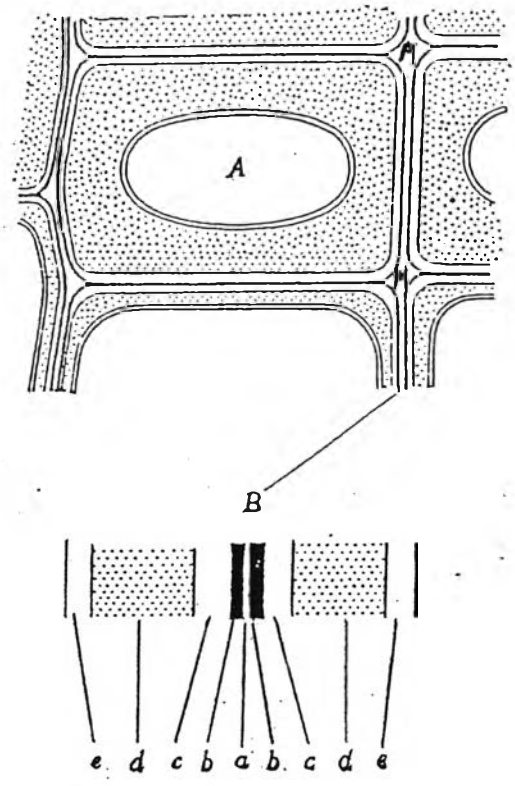
Materials	Percentage of Dry Matter		
	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Cereals Straws			
Barley	40.7	23.8	8.0
Rice	39.6	34.3	6.3
Sorghum	42.2	31.6	7.6
Wheat	43.2	22.4	9.5
Legume Straws			
Cowpea	27.8	13.2	14.2
Lupin	53.2	13.4	15.3
Tropical by Products			
Sugarcane bagasse	38.4	34.2	10.8
Sugarcane tops	25.7	25.7	7.5

ที่มา: Hogen และ Leche (1983)



รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงส่วนประกอบในเซลล์พืช

ที่มา: Greulch (1973)



รูปที่ 2.2 ภาคตัดขวางของเส้นใยเซลลูโลส
ที่มา: วัชรา อินทุลักษณ์ (2527)

A แสดงเซลล์ที่ถูกล้อมรอบด้วยเซลล์อื่นๆซึ่งแยกออกจากกันโดยมีสารระหว่างเซลล์ (intercellular substance) ที่เรียกว่า มิดเดิลลาเมลลา (middle lamella) คั่นอยู่

M มิดเดิลลาเมลลา

a เป็นส่วนผนังเซลล์ที่อยู่ติดกัน

b เป็นส่วนที่ติดกับผนังมิดเดิลลาเมลลา ซึ่งก็คือผนังเซลล์ชั้นแรก (primary cell wall) เรียกว่า P

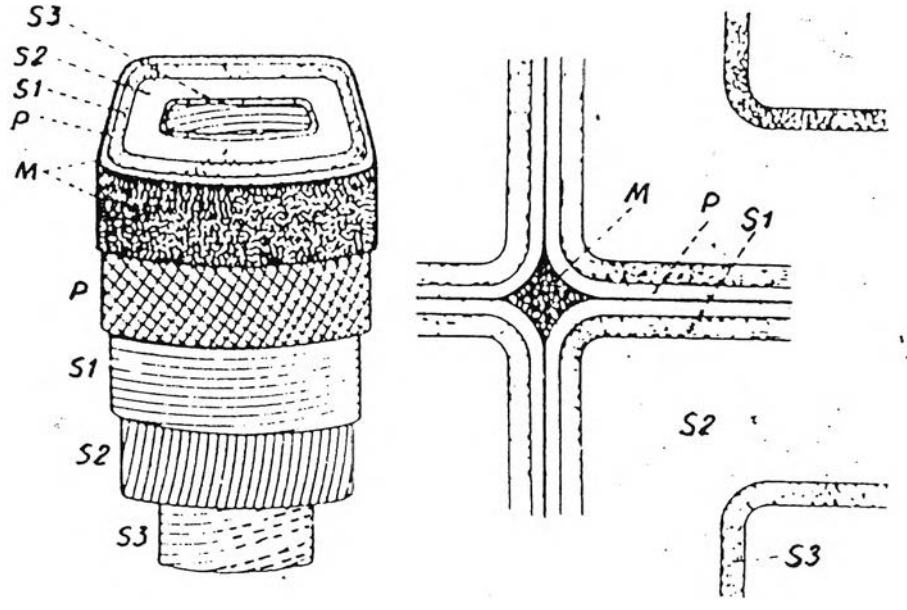
c เป็นส่วนนอกสุดของผนังเซลล์ชั้นที่สอง (external layer of secondary cell wall) เรียกว่า S_1

d เป็นส่วนกลางของผนังเซลล์ชั้นที่สอง (middle layer of secondary cell wall) เรียกว่า S_2

e เป็นส่วนในสุดของผนังเซลล์ชั้นที่สอง (inner layer of secondary cell eall) เรียกว่า S_3 ซึ่งส่วนนี้จะล้อมรอบช่องว่างภายในเซลล์เรียกว่าลูเมน (lumen)

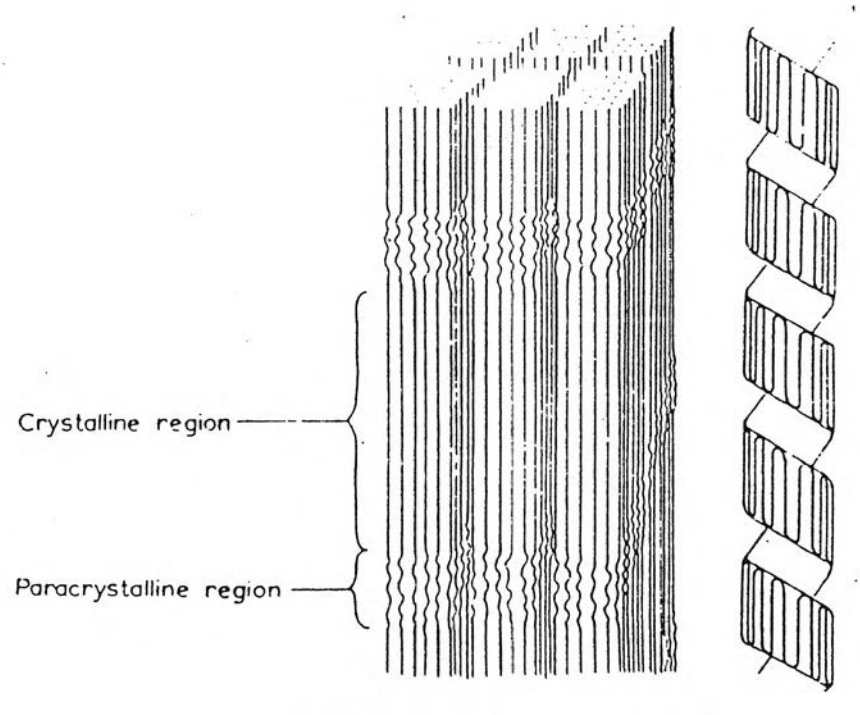
จากภาคตัดขวาง แสดงให้เห็นว่าผนังเซลล์ชั้นแรก P และส่วนทั้งสามของผนังเซลล์ชั้นที่สอง คือ S_1, S_2 และ S_3 ประกอบด้วยเซลลูโลสที่รวมตัวกันเป็นมัดเรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งมีความยาวไม่จำกัด (รูปที่ 2.3) ในผนังเซลล์ชั้นแรก ไมโครไฟบริลของเซลลูโลสจะมีโครงสร้างซับซ้อนไขว้กันอย่างไม่เป็นระเบียบคล้ายร่างแห ที่ผนังเซลล์ชั้นแรกนี้ยังประกอบด้วย เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งมีปริมาณมากกว่าเซลลูโลสอีกด้วย ในผนังเซลล์ชั้นที่สอง ไมโครไฟบริลของเซลลูโลสในส่วนนอกสุด (S_1) จะจัดเรียงตัวเป็นสองกลุ่ม ในทิศทางตรงข้ามกัน ซ้อนขดกันไปมาเป็นเกลียว (spirals) ดังรูป 2.4 ผนังเซลล์ส่วนกลางของชั้นที่สอง (S_2) เป็นส่วนที่มีความหนามากกว่า เนื่องจากมีเซลลูโลสรวมตัวกันอยู่หนาแน่นกว่าบริเวณอื่นของเซลล์ ประกอบด้วยเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นเกลียว แต่ละไมโครไฟบริลเรียงตัวขนานกันไปตามแกนของไฟบริล ระหว่างไมโครไฟบริลจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) เมื่อนำผนังเซลล์ชั้นที่สองมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าการกระจายตัวของไมโครไฟบริลของเซลลูโลสไม่เป็นแบบเดียวกัน ดังแสดงในรูป 2.5 บริเวณที่มีการจับกันระหว่างไมโครไฟบริลด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้เกิดบริเวณที่มีไมโครไฟบริลที่หนาแน่นเป็นระเบียบ เป็นส่วนที่เรียกว่าเซลลูโลสผลึก (crystalline cellulose) แสดงได้ในบริเวณที่เป็นลูกโซ่ในกรอบสี่เหลี่ยม (รูปที่ 2.5 ข.) เซลลูโลสอีกบริเวณหนึ่งมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลเป็นระเบียบน้อยกว่า เนื่องจากไม่มีการจับกันระหว่างไมโครไฟบริลด้วยพันธะไฮโดรเจน แสดงด้วยเส้นสีดำที่อยู่นอกกรอบสี่เหลี่ยม เป็นบริเวณที่เรียกว่า เซลลูโลสอสัณฐาน (amorphous cellulose หรือ paracrystalline cellulose) ซึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอน ผนังเซลล์ชั้นที่สองส่วนในสุด (S_3) ประกอบด้วยไมโครบริล ล้อมรอบช่องว่างกลางเซลล์ การจัดเรียงตัวของไมโครไฟบริลในชั้นนี้ เป็นเกลียวนจากด้านในออกมาด้านนอก

ในการพิจารณาว่าเซลลูโลสจะทำปฏิกิริยากับสารเคมีได้ดีหรือไม่ จะพิจารณาจากการที่สารเคมีสามารถกระจายเข้าไปในส่วนต่างๆของผนังเซลล์ได้ดีเพียงใด ซึ่งจะสัมพันธ์กับโครงสร้างและส่วนประกอบต่างๆของเซลล์



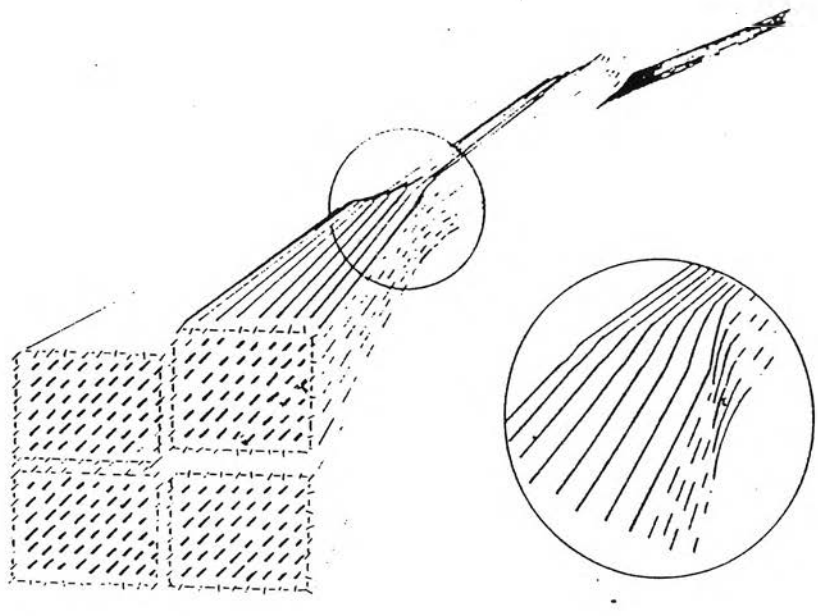
รูปที่ 2.3 ภาคตัดขวางของไมโครไฟบริล

ที่มา: Cowling (1975)

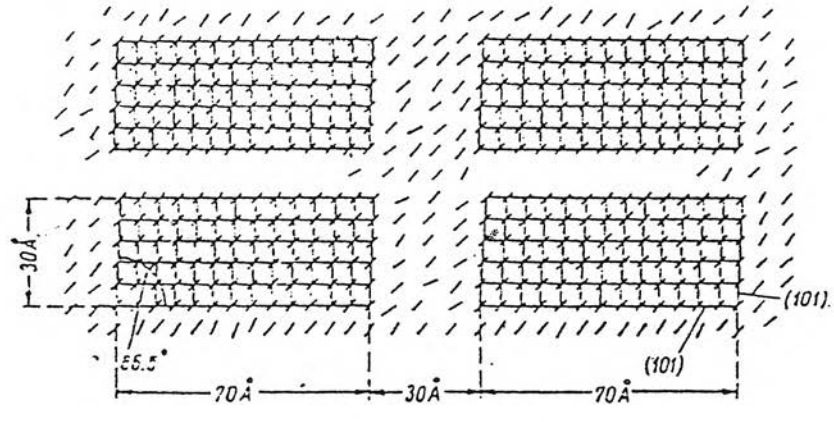


รูปที่ 2.4 เส้นใยเซลลูโลสในบริเวณที่มีการเรียงตัวอย่างมีระเบียบ (เซลลูโลสผลึก) และบริเวณที่มีการเรียงตัวอย่างหลวมๆ (เซลลูโลสอสัณฐาน)

ที่มา: Cowling (1975)



ก.



ข.

รูปที่ 2.5 ก. ภาคตัดขวางการเรียงตัวของไมโครไฟบริลของเซลลูโลสในผนังเซลล์ชั้นที่สอง

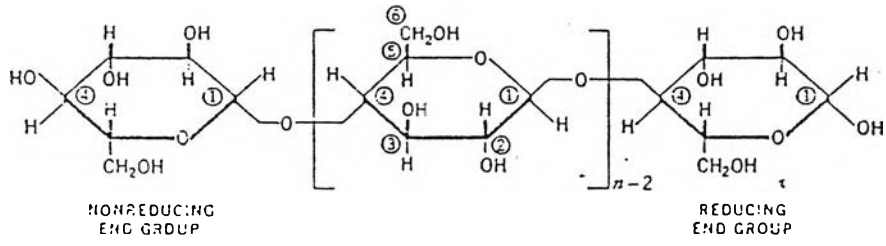
ข. บริเวณเซลลูโลสผลึก แสดงด้วยขีดสีดำที่อยู่รวมกันในบริเวณสี่เหลี่ยม และบริเวณเซลลูโลสอสัณฐานที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ซึ่งล้อมรอบบริเวณเซลลูโลสผลึก แสดงด้วยขีดสีดำที่กระจายอยู่นอกกรอบสี่เหลี่ยม

ที่มา: Cowling (1975)

ข. ส่วนประกอบทางเคมีของเซลลูโลส

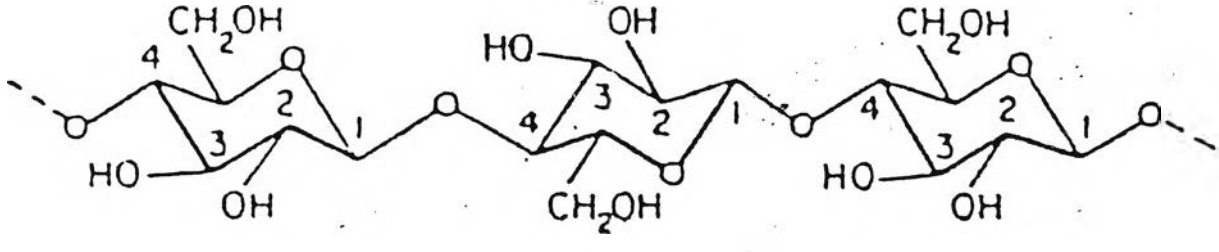
เซลลูโลส เป็นสารประกอบอินทรีย์ ประเภทคาร์โบไฮเดรท (carbohydrate) ที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสหลายโมเลกุล เรียงต่อกันเป็นโครงสร้างคล้ายลูกโซ่ (รูปที่ 2.6) การจัดเรียงตัวของ กลูโคสจะอยู่ในลักษณะรูปเก้าอี้ (chair form) (รูปที่ 2.7) แต่ละโมเลกุลจับกันด้วยพันธะไกลโคสิดิก (glycosidic bond) ระหว่างคาร์บอนตัวที่หนึ่งของกลูโคสกับคาร์บอนตัวที่สี่ของกลูโคสตัวถัดไป เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) ของคาร์บอนตัวที่หนึ่งอยู่ในตำแหน่งเบต้า (beta) จึงเรียกพันธะนี้ว่า เบต้า-1,4-ไกลโคสิดิก (β-1,4-glycosidic bond) การเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงไม่มีแขนงย่อย มีสูตรเคมีทั่วไปคือ $-(C_6H_{10}O_5)-_n$ เมื่อ n คือจำนวนหน่วยกลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง จำนวนหน่วยกลูโคสในสายเซลลูโลสไม่สามารถทราบจำนวนที่แท้จริงได้ แต่ประมาณได้ว่าต้องมีจำนวนมาก ตั้งแต่ 1,000 ถึง 10,000 หน่วยกลูโคส (Tsao และ Chiang,1983) มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 50,000 ถึง 500,000 เนื่องจากระหว่างสายเซลลูโลสจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเรียงแน่นเป็นมัดไมโครไฟบริล จึงมีความแข็งแรงและไม่ละลายน้ำหรือสารอินทรีย์ใดๆ และไม่ละลายในสารละลายด่างอ่อน หรือกรดอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในสารละลายกรดแก่ หรือสารละลายด่างแก่ ซึ่งสามารถแบ่ง ชนิดเซลลูโลสตามปริมาณการละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เป็น 3 ชนิด (Paturua, 1989) คือ

- แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) คือเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิห้อง
- เบต้า-เซลลูโลส (β-cellulose) คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซนต์ อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด
- แกมม่า-เซลลูโลส (γ-cellulose) คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซนต์ และละลายได้ในสารละลายกรด แต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์



รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของลูกโซ่เซลลูโลส

ที่มา: Lehninger (1975)



รูปที่ 2.7 ลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส

ที่มา: Nisizawa (1973)

2. เฮมิเซลลูโลส

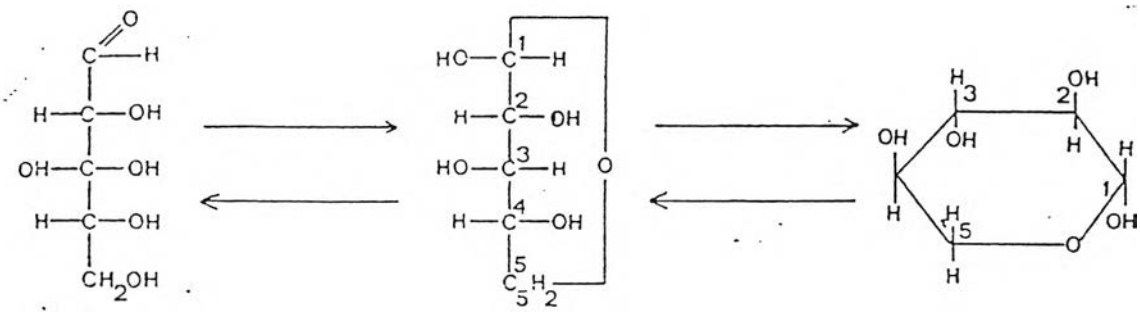
เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (pentose) ซึ่งส่วนมากเป็นดี-ไซแลน (D-xylan) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส (xylose) หลายๆโมเลกุล ต่อกันด้วยพันธะ เบต้า-1,4-ไกลโคสิดิก ดังแสดงในรูป 2.8 และ 2.9 สายโพลีเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นเฮทเทอโรจีนัส (heterogenous) ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดปนกัน คือ

ก. เพนโตแซน (pentosan) ส่วนใหญ่เป็นไซแลน และอะราแบน (araban) เมื่อนำไปย่อย จะได้น้ำตาลไซโลสและอะราบิโนส (arabinose) ไซแลนเป็นสารที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลสมากกว่าสารอื่น

ข. เฮกโซแซน (hexosan) ส่วนใหญ่เป็น แมนแนน (mannan) กาแลคแทน (galactan) และกลูแคน (glucan) เมื่อถูกย่อย จะได้น้ำตาล แมนโนส (mannose) กาแลคโตส (galactose) และกลูโคส ตามลำดับ

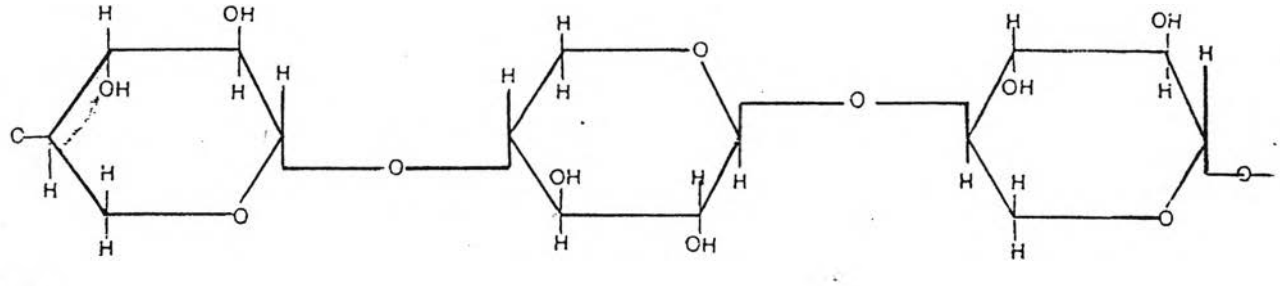
ค. โพลียูโรไนด์ (polyuronides) ส่วนมากเป็นสารประกอบของกรดโพลียูโรนิค (polyuronic acid) และยังพบกรดยูโรนิค (uronic acid) ปนอยู่ด้วย ที่สำคัญ คือ เฮกซูโรนิค (hexuronic acid) เช่น เบต้า-ดี-กลูคูโรนิค (β-D-glucuronic) เบต้า-ดี-แมนนูโรนิค (β-D-mannuronic) แสดงในรูป 2.10

ข้อแตกต่างของเฮมิเซลลูโลสกับเซลลูโลสคือ เฮมิเซลลูโลสสามารถถูกย่อยด้วยกรดสารละลายเจือจาง สามารถละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้สายโพลีเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขามากกว่า และมีความยาวของสายโพลีเมอร์สั้นกว่า โดยมีความยาวประมาณ 40 หน่วยกลูโคส (Paturau, 1989; Kirk, 1983)



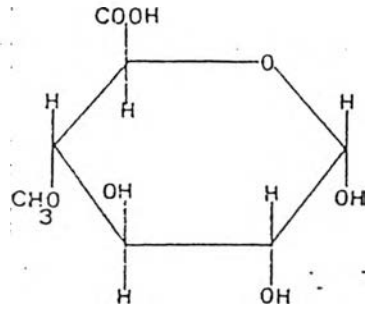
รูปที่ 2.8 สูตรโครงสร้างของไซโลส ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม

ที่มา: Lehninger (1975)

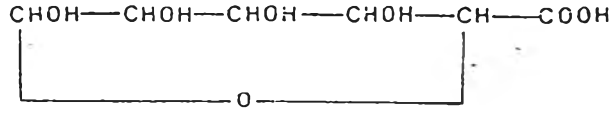


รูปที่ 2.9 สูตรโครงสร้างโพลีเมอร์ไซแลน ประกอบด้วยโครงสร้างหกเหลี่ยม
ของน้ำตาลไซโลส ที่ต่อกันด้วยพันธะ เบต้า-ไกลโคสิดิก

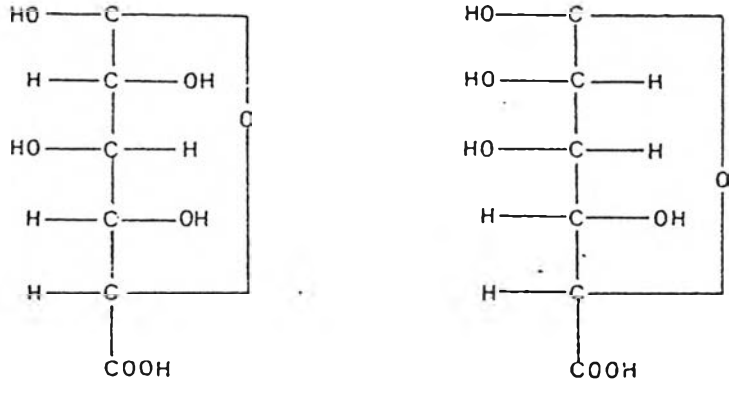
ที่มา: Heuser (1944)



ก.



ข.



ค.

รูปที่ 2.10 ก. สูตรโครงสร้างหกเหลี่ยมของ 4-เมทิล-ดี-กลูโคยูโรนิค

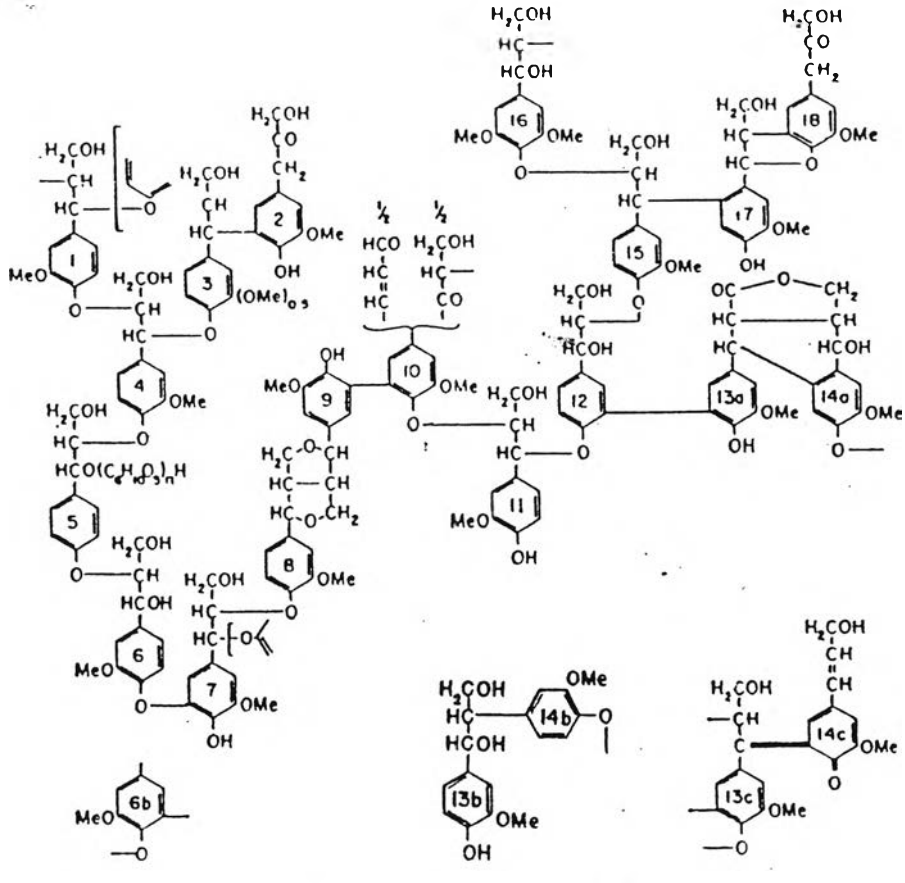
ข. สูตรเคมีของกรดยูโรนิค ที่เป็นส่วนประกอบของเฮมิเซลลูโลส

ค. สูตรโครงสร้างของกรดยูโรนิค ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม

ที่มา: Ott และ Spurlin (1963)

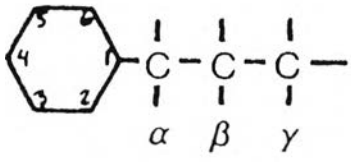
3. ลิกนิน

เป็นโพลีเมอร์ของสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) หรือเรียกว่าเป็น ฟีโนลิกโพลีเมอร์ (phenolic polymer) โดยมีหน่วยฟีนิลโพรเพน (phenyl propane unit) เรียงต่อกันแบบสุ่ม (random) ที่หน่วยฟีนอล (phenol unit) อาจเป็น กัวอิเอซิล (guaiacyl) หรือ ไซรินกิล (syringyl) ดังแสดงในรูปที่ 2.12 ที่ตำแหน่งแอลฟา และเบต้าของโมเลกุลลิกนิน อาจเกิดการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุล หรือคาร์บอนในหน่วยฟีนอล อาจเกิดพันธะกับคาร์บอนในอีกหน่วยหนึ่งภายในสายโพลีเมอร์ที่ประกอบกันเป็นโมเลกุลลิกนิน ทำให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น ในเอทานอล หรือเมทานอล (methanol) ที่ร้อน และในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปกติลิกนินจะอยู่ในโครงสร้างของเซลล์พืชบริเวณรอบๆ เซลลูโลส โดยเป็นตัวป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยอีกด้วย

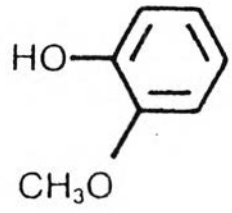


รูปที่ 2.11 แสดงโมเลกุลลิกนิน

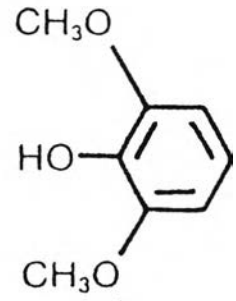
ที่มา: Cowlihg (1975)



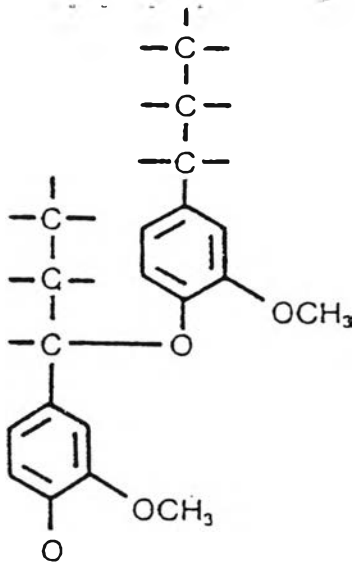
Phynyl Propane Unit



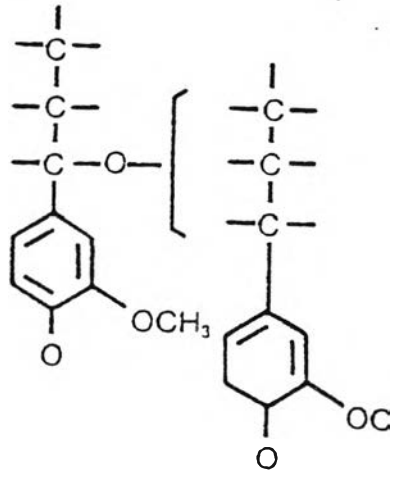
Guaiacyl



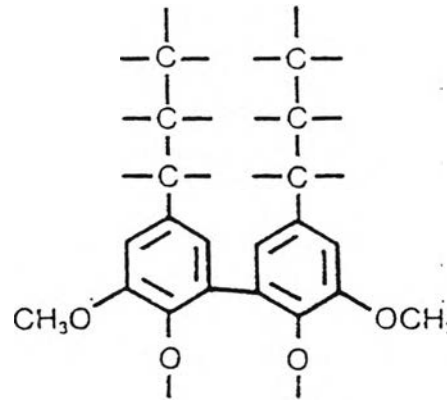
Syringyl



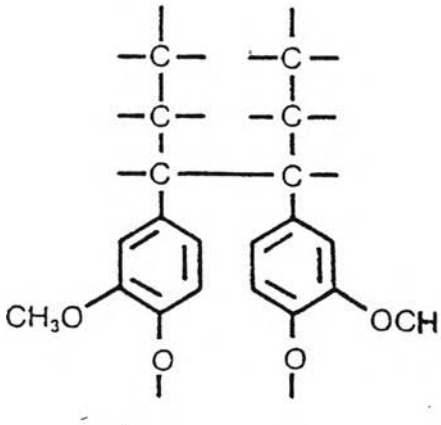
Beta-4' Bonding



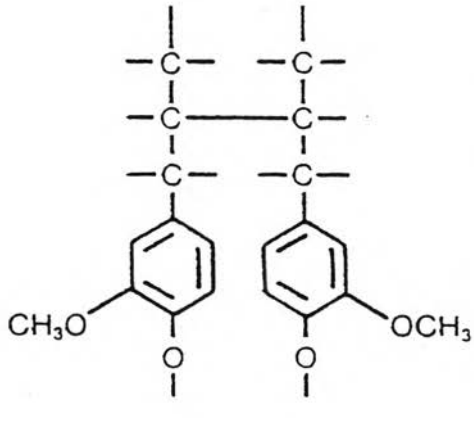
Alpha-Alkylether



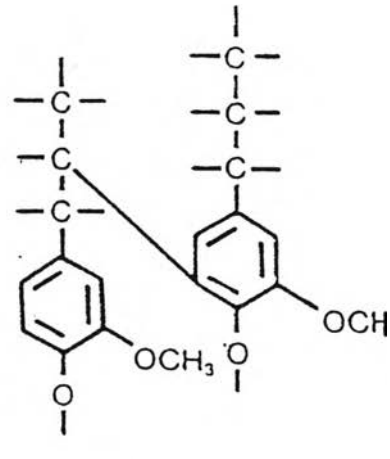
5-5' Bonding



Alpha-Alpha' Bonding



Beta-Beta' Bonding



Beta-5' Bonding

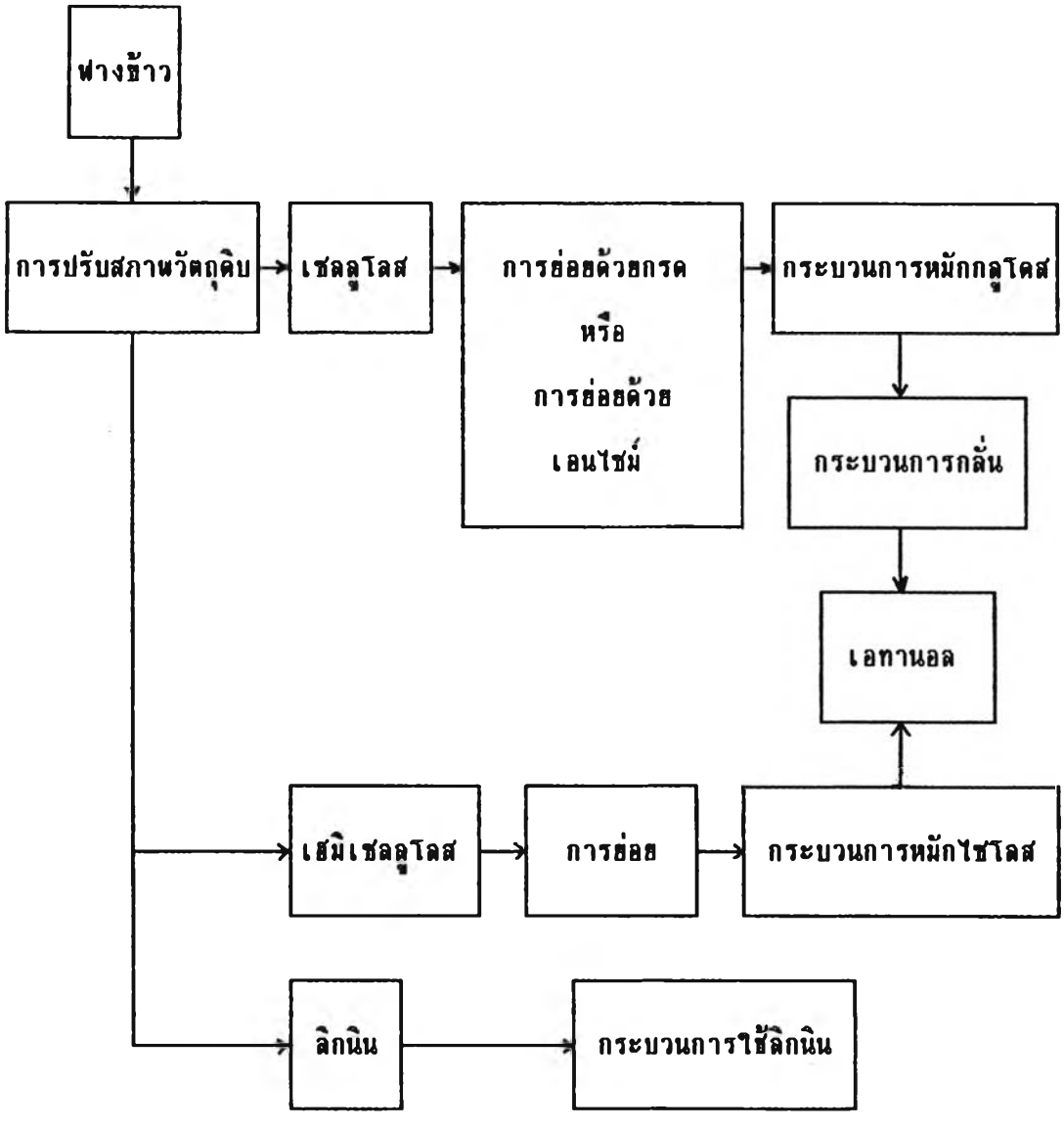
รูปที่ 2.12 หน่วยโมโนเมอร์และพันธะในโมเลกุลลิกนิน

ที่มา: Wright (1988)

กระบวนการผลิต

เนื่องจากวิทยานิพนธ์นี้จะทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว โดยนำส่วนเซลลูโลสในฟางข้าวมาใช้ประโยชน์ โดยมีกระบวนการที่สำคัญ คือ

1. การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment)
2. การย่อยหรือการทำไฮโดรไลซิส (hydrolysis)
3. การผลิตเอทานอล (ethanol production)



รูปที่ 2.13 แผนภาพแสดงกระบวนการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว

1. การปรับสภาพวัตถุดิบ

เนื่องจากเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต อยู่ในรูปที่เป็นผลึกของสารประกอบเชิงซ้อน (complex) กับลิกนินและเฮมิเซลลูโลสดังที่กล่าวแล้วแต่ส่วนที่นำมาใช้จริงคือส่วนของเซลลูโลสเท่านั้น ดังนั้นในขั้นแรกของการผลิตจึงต้องแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อน เพราะเป็นตัวลดพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ การมีลิกนินปริมาณมากจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และยังเป็นอุปสรรคต่อการหมัก (fermentation) นอกจากนี้โครงสร้างเซลลูโลสที่เป็นผลึกยังทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยด้วยเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการปรับสภาพ คือ เพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกจากเซลลูโลส และเป็นการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์

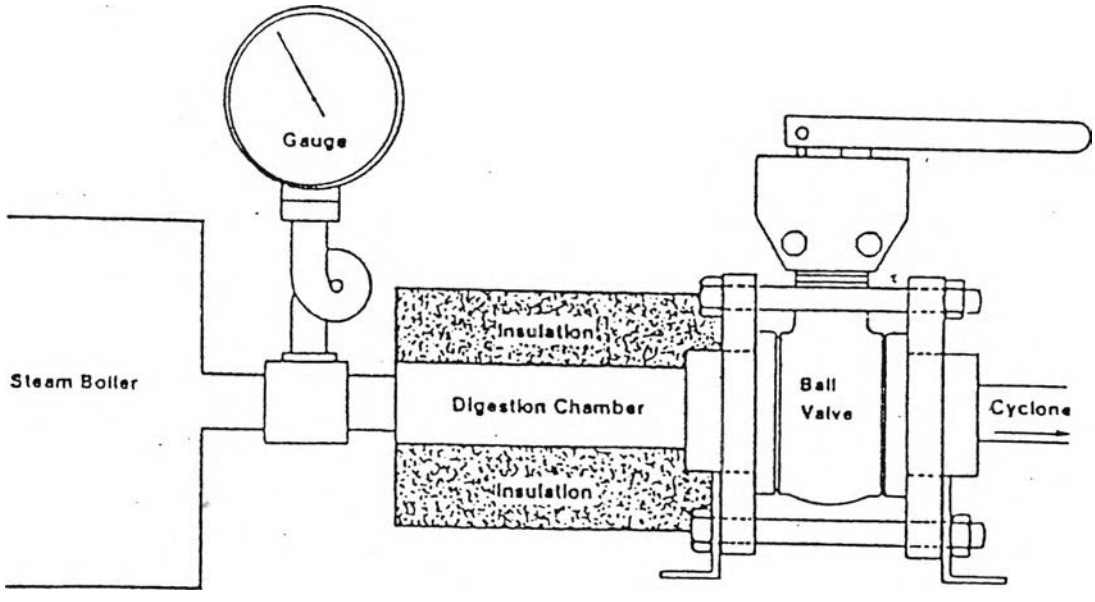
วิธีการปรับสภาพแบ่งได้เป็น 4 วิธีใหญ่ๆ คือ

1.1 วิธีทางกายภาพ (Physical Pretreatment)

เป็นการปรับสภาพ โดยการลดขนาดของวัตถุดิบ และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยา เช่น การบด การใช้ความร้อน

Cadoche และ Gerardo (1989) พบว่าถ้านำวัตถุดิบ เช่น ไม้เนื้อแข็ง ฟาง และข้าวโพด มาบดด้วยเครื่อง "Knife Mill" หรือเครื่อง "Hammer Mill" จะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว และลดความเป็นผลึกของเซลลูโลสลง เมื่อนำไปย่อย จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) มากขึ้น

Brownell และ Saddler(1987) ศึกษาการปรับสภาพในไม้เนื้อแข็ง โดยใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิสูง (175 ถึง 250 องศาเซลเซียส) ในช่วงเวลาสั้นๆ (30 ถึง 60 วินาที) เพื่อหลีกเลี่ยงการเสียสภาพของเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูง (260 องศาเซลเซียส) และการเปลี่ยนเป็นสารอื่นของลิกนิน ซึ่งอาจเป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ แล้วลดความดันลงอย่างรวดเร็ว วัตถุดิบจะแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยา วิธีการนี้เรียกว่า "Steam Explosion" หรือ "Steam Pretreatment" เนื่องจากเป็นการทำงานภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง ดังนั้นเครื่องมือที่ใช้จะต้องออกแบบระบบป้องกันการระเบิดเป็นอย่างดี (รูปที่ 2.14) พบว่าวิธีนี้สามารถแยกเซลลูโลสออกจากเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้ถึง 90 เปอร์เซนต์



รูปที่ 2.14 แสดงเครื่องมือในการปรับสภาพด้วยไอน้ำ
ที่มา: Saddler และคณะ (1982)

1.2 <u>วิธีทางเคมี</u> (Chemical Pretreatment)

เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้สารละลายกรด สารละลายด่าง ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารออกซิแดนท์ (oxidant reagent) วัตถุประสงค์ เพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส ในกรณีการใช้สารละลายกรด เพราะเฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยได้ในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส หรือเพื่อเพิ่มปริมาณการละลายของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินในกรณีการใช้สารละลายด่าง และยังทำให้เกิดการบวม (swelling) ของโครงสร้าง ซึ่งเชื่อว่าจะช่วยเพิ่มอัตราการย่อย เนื่องจากเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาได้มากขึ้น

Doneffer (1969) ศึกษาการปรับสภาพฟางข้าว โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในการปรับสภาพอยู่ในช่วง 8 ถึง 10 เปอร์เซนต์ จึงจะช่วยให้ฟางข้าวถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้ดีขึ้น และการย่อยจะลดลงเมื่อความเข้มข้นต่ำกว่าระดับนี้

Hamilton และคณะ (1984) ทดลองนำเอาวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมข้าวโพดที่กำจัดเฮมิเซลลูโลสออกแล้ว มาปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ร่วมกับสารเชิงซ้อนเฟอร์ริกโซเดียมดาร์เตรท (ferric sodium tartrate complex) แล้วนำไปทำปฏิกิริยาการย่อยกับเอนไซม์ พบว่าปริมาณการย่อยเพิ่มขึ้น 2 ถึง 3 เท่า เทียบกับวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และภายในเวลา 24 ชั่วโมง สามารถย่อยได้ถึงเกือบ 90 เปอร์เซนต์

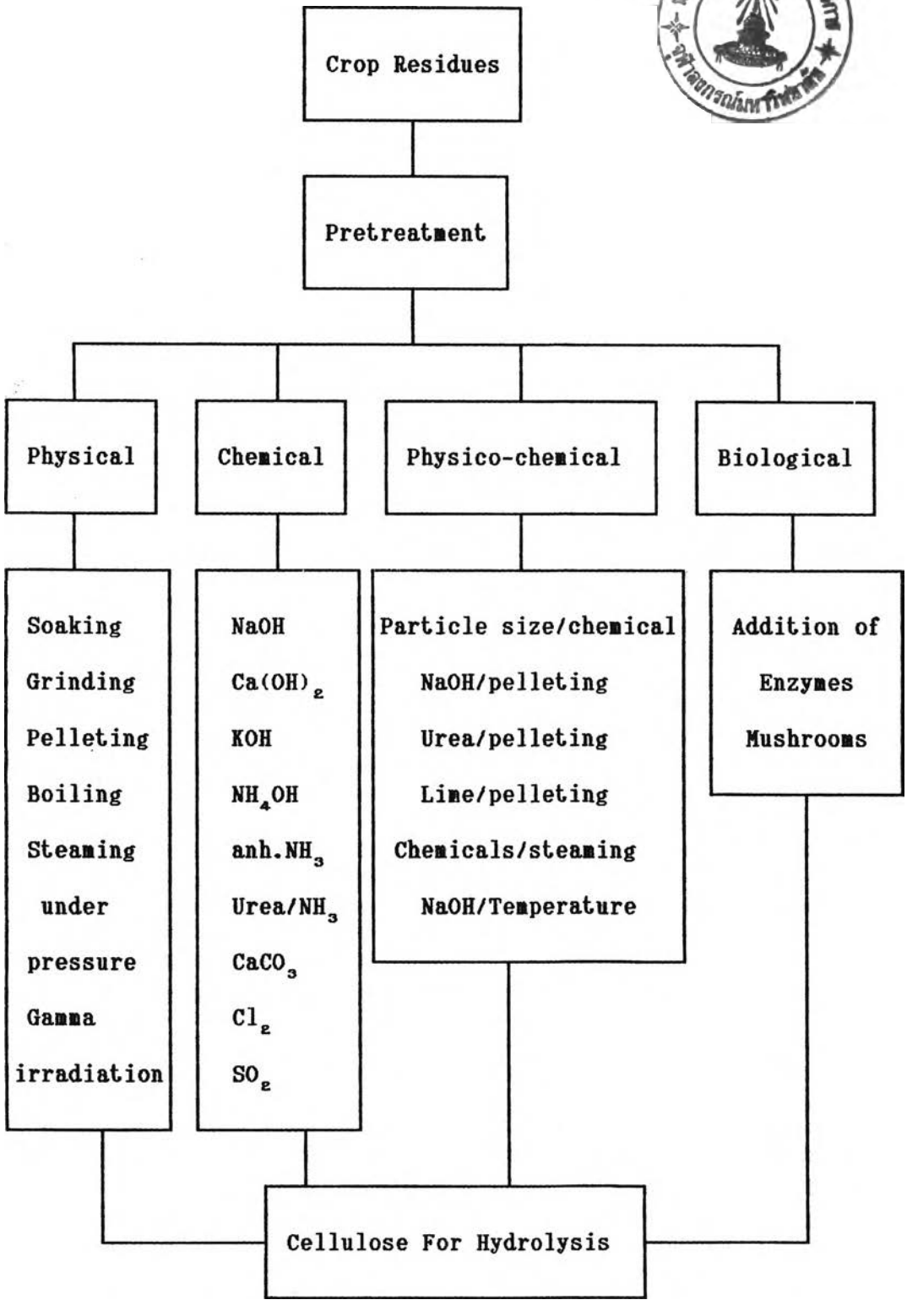
1.3 วิธีทางเคมีฟิสิกส์ (Physico-Chemical Pretreatment)

เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบ โดยใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี

Han และ Callihan (1974) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อน ภายใต้ความดันสูง ของการปรับสภาพฟางข้าว ในกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าประสิทธิภาพการย่อยเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อนที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้ความร้อนภายใต้ความดันสูงเพียงอย่างเดียว พบว่าการย่อยลดลงเมื่อความร้อนเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากการแตกตัวของน้ำตาลที่เกิดขึ้น เปลี่ยนเป็นสารประเภท เฟอฟูรัล (furfural) ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) หรือ กรดฟอร์มิก (formic acid) ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์

1.4 วิธีทางชีวภาพ (Biological Pretreatment)

เป็นการใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้เปลี่ยนอยู่ในรูปโซ่ตรง และช่วยลดความเป็นผลึก



รูปที่ 2.15 แผนภาพแสดงวิธีการต่างๆที่ใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบ

ที่มา: Hogen และ Leche (1983)

Rabinovitch (1981) ศึกษาการปรับสภาพหลายๆวิธีในวัตถุดิบหลายชนิด และให้ข้อสรุปที่น่าสนใจว่า

1. วัสดุลิกโนเซลลูโลสิกควรผ่านการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อย
2. การทำ Steam Pretreatment ที่อุณหภูมิสูงเหมาะสำหรับการย่อยด้วยเอนไซม์
3. การปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้หลายๆวิธีร่วมกันอาจไม่ให้ผลดีเท่ากับใช้วิธีใดวิธีหนึ่ง
4. การเลือกวิธีการปรับสภาพ ควรเลือกให้เหมาะสมกับวัตถุดิบที่ใช้
5 อัตราการย่อยจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาตรรูพรุน (pore volume) ของวัตถุดิบเพิ่มขึ้น นั่นคือ ประสิทธิภาพการย่อยขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพการปรับสภาพวัตถุดิบ

2. <u>การย่อย</u>

เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาล เมื่อนำมาทำการย่อยจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ดังสมการ 2-1 และ 2-2 ถ้าเซลลูโลสถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ จะให้น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว ถ้าการย่อยไม่สมบูรณ์จะได้ทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส (cellobiose) และโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ปนกัน ส่วนเฮมิเซลลูโลสเมื่อถูกย่อย จะให้น้ำตาลเพนโตสหลายชนิดปนกัน ขึ้นกับโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เป็นข้อเสียเปรียบสำหรับการย่อยของเฮมิเซลลูโลส

$$\underset{\text{เฮกโตแซน}}{(C_6H_{10}O_5)_n} + n\,H_2O \longrightarrow \underset{\text{เฮกโซส}}{n\,C_6H_{12}O_6} \qquad (2\text{-}1)$$

$$\underset{\text{เพนโตแซน}}{(C_5H_8O_4)_m} + m\,H_2O \longrightarrow \underset{\text{เพนโตส}}{m\,C_5H_{10}O_5} \qquad (2\text{-}2)$$

การย่อยในเนื้อเยื่อพืชสามารถอธิบายได้ โดยใช้โครงสร้างภายในโมเลกุลของเซลลูโลสจากที่กล่าวข้างต้น เซลลูโลสแบ่งตามโครงสร้างการจัดเรียงโมเลกุลเป็น 2 ส่วน คือ บริเวณเซลลูโลสอสัณฐานและบริเวณเซลลูโลสที่เป็นผลึก

Nikitin และคณะ (1966) ทำการทดลอง และวิเคราะห์ผลการย่อยเซลลูโลสในทั้ง 2 บริเวณ พบว่าเซลลูโลสบริเวณอสัณฐาน จะเกิดการย่อยได้รวดเร็วแม้ในสภาวะอ่อน (mild condition) ซึ่งในสภาวะนี้เซลลูโลสที่เป็นผลึก จะไม่เกิดการย่อย แต่จะเกิดเมื่อใช้สภาวะที่รุนแรง (vigorous condition) เช่น ที่ความเข้มข้นของกรดสูงหรือที่อุณหภูมิสูง จากผลการทดลองนี้กล่าวว่า การย่อยจะเกิดในบริเวณเซลลูโลสอสัณฐานก่อน เนื่องจากโมเลกุลเกาะกันอย่างหลวมๆ ทำให้อัตราการย่อยเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ต่อมาจึงเกิดปฏิกิริยาในบริเวณเซลลูโลสผลึก ซึ่งโมเลกุลยึดกันหนาแน่นกว่า ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลง

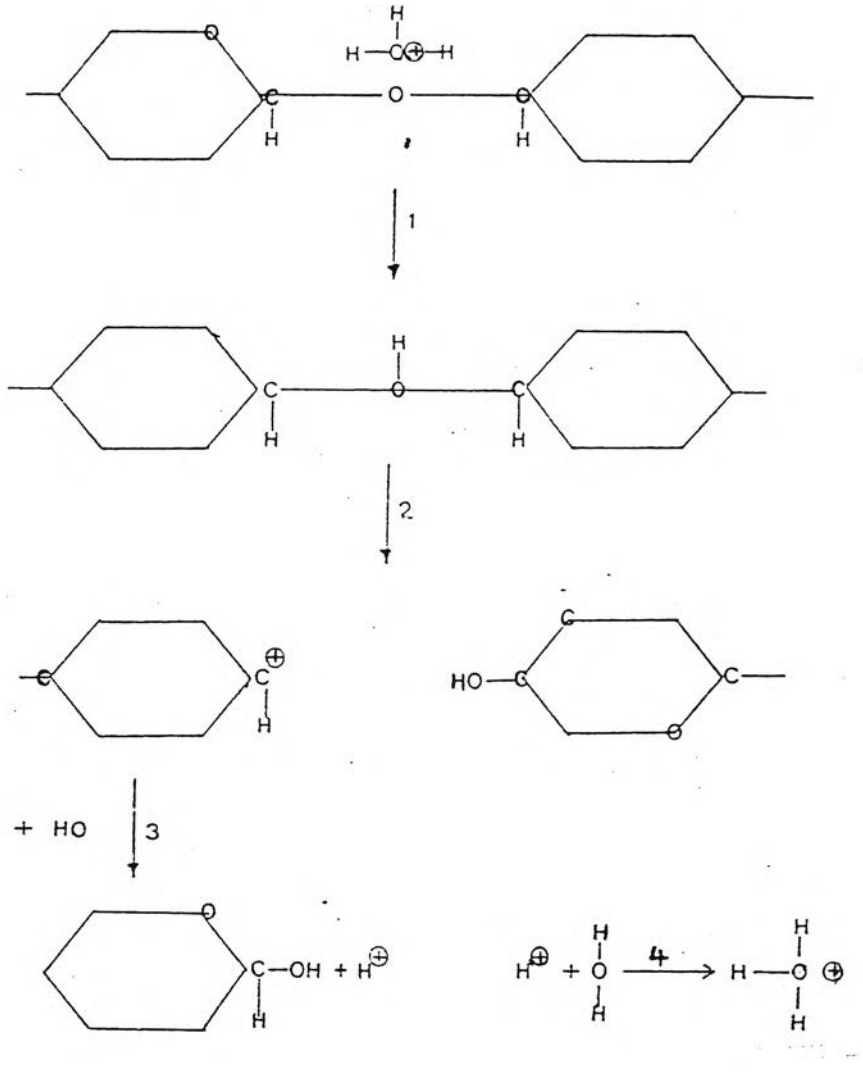
Nikitin (1966);Heuser (1944); Ott และคณะ (1963) ศึกษาโครงสร้างของเซลลูโลสในบริเวณที่เป็นผลึก ในขณะเกิดปฏิกิริยาการย่อย โดยใช้รังสีเอกซ์ (x-ray) พบว่า ในบริเวณนี้จะมีการขยายเนื้อที่มากขึ้นในขณะที่เกิดปฏิกิริยา เนื่องมาจากสาเหตุ 2 ประการ คือ

- เซลลูโลสอสัณฐานจะละลายในตัวทำละลายและรวมตัวกันเป็นผลึกใหม่ (recrystallization)
- บริเวณเซลลูโลสอสัณฐานบางส่วนจะรวมตัวเป็นผลึกใหม่ และการรวมตัวเป็นผลึกใหม่จะเกิดขึ้นเฉพาะในปฏิกิริยาที่ใช้สภาวะอ่อนเท่านั้น ซึ่งจะทำให้การจับกันของพันธะไกลโคสิดิกจะเกิดการคลายตัวอย่างช้าๆ แต่ไม่ถึงกับถูกทำลายไป ทำให้มีโอกาสที่จะเกิดการจัดเรียงโมเลกุลเป็นผลึกได้

การย่อยเซลลูโลสทำได้ 2 วิธีใหญ่ๆคือ

2.1 <u>การย่อยด้วยสารเคมี</u> (Chemical Hydrolysis)

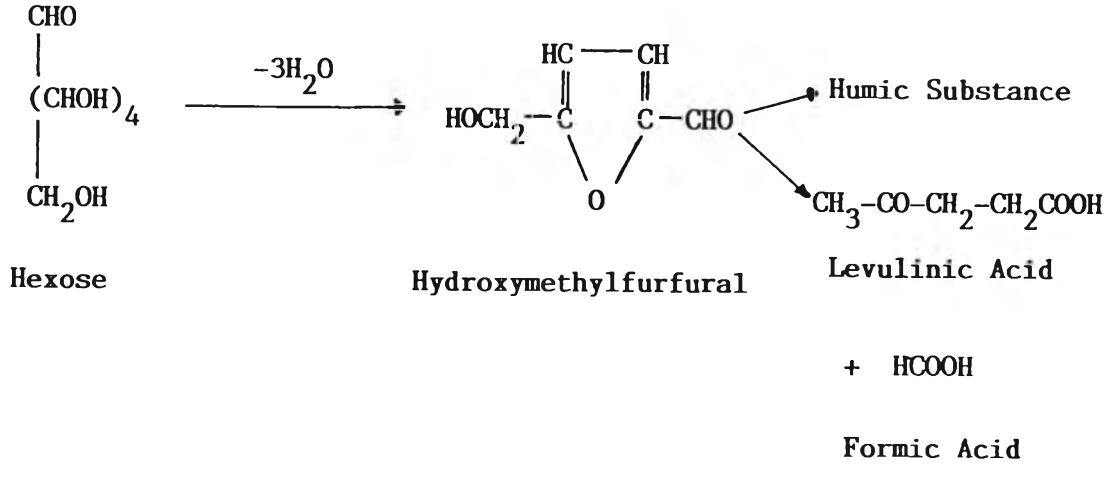
เป็นการย่อยด้วยสารละลายกรดหรือสารละลายด่าง ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาการทำลายพันธะไกลโคสิดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจน (oxygen) ถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส



รูปที่ 2.16 กลไกปฏิกิริยาการย่อยด้วยสารละลายกรด

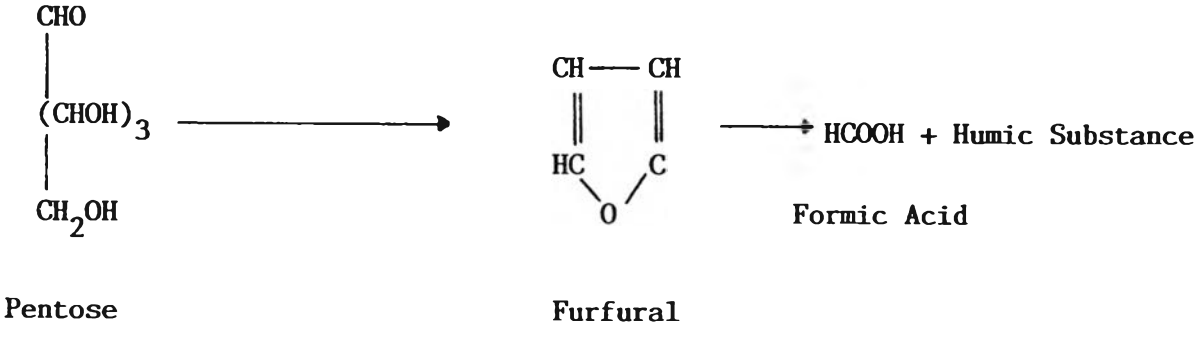
1. อะตอมออกซิเจนที่พันธะไกลโคสิดิก ถูกโปรโตไนซ์ด้วยโปรตอนของไฮโดรเนียมอิออน
2. พันธะไกลโคสิดิกแตกออก และเกิดเป็นคาร์บอเนียมอิออน และโพลีแซคคาไรด์ที่สั้นลง
3. คาร์บอเนียมอิออนทำปฏิกิริยากับน้ำ ได้โพลีแซคคาไรด์สายสั้นลงกว่าเดิม
4. โปรตอนจับกับโมเลกุลของน้ำ เกิดเป็นไฮโดรเนียมอิออน และเริ่มทำปฏิกิริยาใหม่

ที่มา: Nikitin (1966)



รูปที่ 2.17 สมการปฏิกิริยาการย่อยของเฮกโซส ด้วยสารละลายกรด

ที่มา: Heuser (1944)



รูปที่ 2.18 สมการปฏิกิริยาการย่อยของน้ำตาลเพนโตส ด้วยสารละลายกรด

ที่มา: Heuser (1944)

การย่อยด้วยสารเคมีแบ่งตามวิธีของ Paquot (1984) เป็น 2 วิธีคือ

(1) <u>การย่อยด้วยกรด</u> (Acid Hydrolysis) แบ่งเป็น 2 กระบวนการคือ

(1.1) กระบวนการแบบโฮโมจีนีส (Homogeneous Process)

เป็นกระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก (hydrocloric acid) หรือกรดซัลฟูริก (sulfuric acid) ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่คือน้ำตาลกลูโคส แต่มีข้อเสียคือ ต้องมีการแยกกรดที่ใช้ ออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้ และเรื่องการผุกร่อนของเครื่องมือ

(1.2) กระบวนการแบบเฮเทอโรจีนีส (Heterogeneous Process)

เป็นกระบวนการที่ใช้กรดอ่อนกว่า แต่ต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่า 180 องศาเซลเซียส ผลการย่อยคือเซลลูโลสที่ยังคงมีโครงสร้างของเส้นใยอยู่

(2) <u>การย่อยด้วยด่าง</u> (Alkaline Hydrolysis)

สารละลายที่นิยมใช้ คือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เอทิลีนไดอะมีน (ethylene diamine) และแอมโมเนีย (ammonia) เป็นต้น การใช้สารละลายด่างในการย่อย จะทำให้สายของโพลีแซคคาไรด์สั้นลง โดยปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 160 ถึง 180 องศาเซลเซียส และต้องใช้ออกซิเจนเข้าร่วมในปฏิกิริยาการย่อยด้วย

2.2 <u>การย่อยด้วยเอนไซม์</u>

เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น เพื่อทำหน้าที่เร่ง (catalyst) ปฏิกิริยาภายในเซลล์ เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพสูง ในสภาวะการทำงานที่เหมาะสมจะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็วถึง 10^{8} ถึง 10^{11} เท่า เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความเฉพาะ (specificity) ต่อปฏิกิริยาหนึ่งๆเท่านั้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง แม้ว่าเอนไซม์จะถูกสร้างและอยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (in vivo) แต่สามารถสกัดออกมาใช้งานได้เช่นเดียวกับเมื่ออยู่ในเซลล์

เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งรา และแบคทีเรีย ที่นิยมนำมาใช้คือ เซลลูเลสที่ได้จาก *Trichoderma viride* (หรือภายหลังจัดอยู่ใน *T.reessi*) (Parisi, 1989)

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบผลดีและผลเสียในการย่อยด้วยกรด

ผลดี	ผลเสีย
1.วัตถุดิบไม่ต้องผ่านการปรับสภาพก่อน 2.ปฏิกิริยาเกิดเร็ว ง่าย และสั้น 3.ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้มีราคาถูกและหาง่าย 4.ปฏิกิริยาสามารถทำให้เกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ (กรณีการใช้กรดแก่) 5.ให้ผลิตภัณฑ์สูง (กรณีการใช้กรดแก่)	1.ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่เจาะจงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่บริสุทธิ์ 2.น้ำตาลที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นสารอื่น เช่น เฟอฟูรัล และสารเคมีอื่นๆ 3.ต้องใช้อุณหภูมิสูง (กรณีการใช้กรดอ่อน) 4.ถ้าใช้กรดแก่ ต้องมีกระบวนการแยกกรด 5.ก่อนนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยไปใช้ต้องปรับสภาพให้เป็นกลางก่อน 6.ผลพลอยได้ของปฏิกิริยาของการย่อยด้วยกรด เช่น เฟอฟูรัล เป็นพิษต่อเซลล์ 7.ต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่สามารถทนต่อการกัดกร่อนของกรดได้ ซึ่งราคาแพง 8.การกำจัดสารเคมีที่เหลือจากกระบวนการทำได้ยาก

ที่มา: Woodward (1987) และ Parisi (1989)

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบผลดีและผลเสียในการย่อยด้วยเอนไซม์

ผลดี	ผลเสีย
1.สภาวะที่ใช้ทั้งอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างไม่รุนแรง 2.ปฏิกิริยามีความเฉพาะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง 3.ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น 4.สามารถทำการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยได้ 5.ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน	1.วัตถุดิบต้องผ่านการปรับสภาพก่อน 2.ผลิตภัณฑ์ที่ได้ สามารถยับยั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ (product inhibition) 3.สูญเสียเอนไซม์ไป เนื่องจากถูกดูดซับ (adsorbed) บนวัสดุที่ไม่ย่อย 4.เสี่ยงต่อการปนเปื้อน(contamination)ของเชื้อจุลินทรีย์ 5.ถ้าระบบมีสารที่เป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยา เช่น เฮมิเซลลูโลสหรือลิกนิน อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะช้าลง

ที่มา: Woodward (1987) และ Parisi (1989)

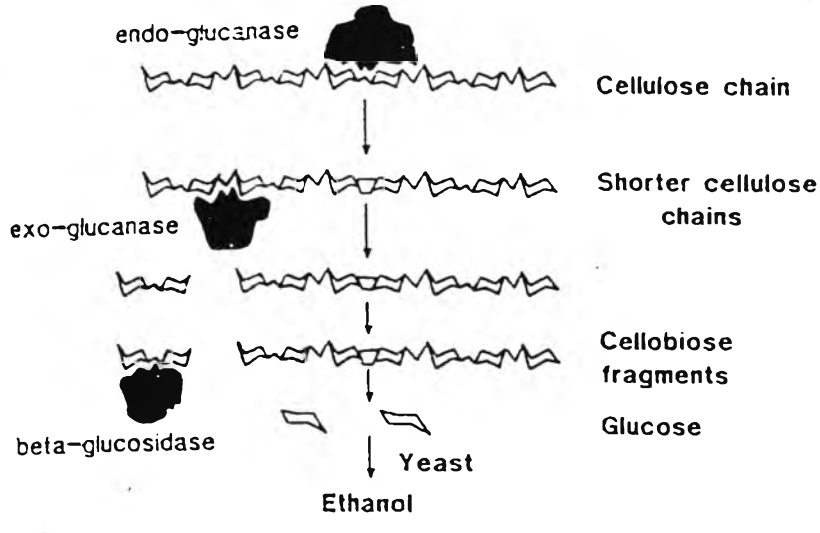
2.2.1 ชนิดและตำแหน่งทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ 3 ชนิดที่ทำงานร่วมกันแบบ "synergistic action" ได้แก่

(1) เอ็นโดกลูคาเนส (endoglucanase, C_x) ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสและโอลิโกแซคคาไรด์ ให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส โดยจะย่อยจากทางด้านปลายรีดิวซ์ (reducing end) ของสายโซ่เซลลูโลส

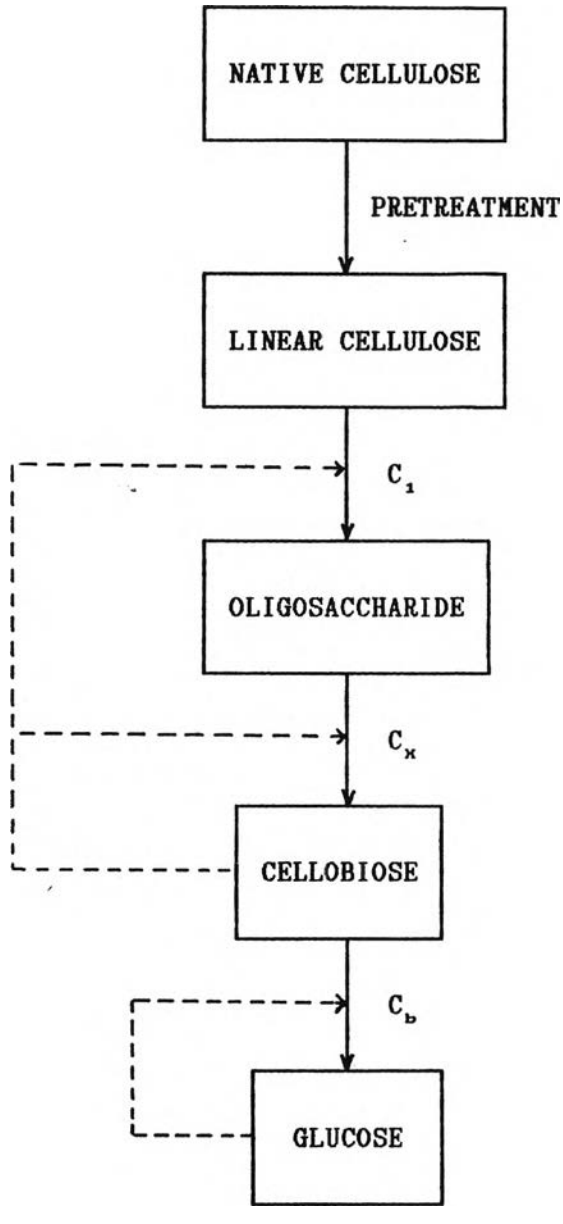
(2) เอ็กโซกลูคาเนส (exoglucanase, C_1) ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสและโอลิโกแซคคาไรด์ ให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส ตำแหน่งที่ทำงานจะเป็นแบบสุ่ม (random)

(3) เบต้า-กลูโคสิเดส (β-glucosidase, C_b) ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอส ให้เปลี่ยนเป็นกลูโคส



รูปที่ 2.19 โครงสร้างของเซลลูโลสและตำแหน่งที่เอนไซม์ชนิดต่างๆเข้าทำปฏิกิริยา
ที่มา: Wright (1988)

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ดังนี้คือ β-glucosidase จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีผลยับยั้งต่อเนื่อง คือทำให้ในระบบมีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ endoglucanase และ exoglucanase ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและยุติในที่สุด



รูปที่ 2.20 แผนภาพแสดงการย่อยและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส
ที่มา: Siu และ Reese (1953)

จากการศึกษาของ Selby และ Maitland (1967) พบว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ ต้องทำงานร่วมกันจึงจะมีประสิทธิภาพในการย่อย เมื่อแยกชนิดใดชนิดหนึ่งออกไปจะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยลดลง

2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (วิชัย ลีลาวัชรมาศ, 2530)

1) อุณหภูมิ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น 2 เท่า ทุกๆอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส เมื่อเขียนกราฟระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยากับอุณหภูมิพบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะสูงที่สุดที่อุณหภูมิหนึ่ง ที่อุณหภูมินี้เรียกว่า "optimum temperature" เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าที่จุดนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะต่ำลง เนื่องจากเอนไซม์จะเกิดการเสียสภาพ (denaturation) หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส

2) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH ค่าหนึ่ง ที่ pH สูงหรือต่ำกว่านี้กิจกรรม (activity) ของเอนไซม์จะลดลง pH ที่ค่านั้นนี้เรียกว่า "optimum pH" เซลลูเลสมี optimum pH อยู่ในช่วง 4.8 ถึง 5.5

3) ความเข้มข้นของสับสเตรท (substrate) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และจะช้าลงเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทสูงขึ้น และในที่สุดอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นอีก

4) ปริมาณเอนไซม์ เมื่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาดำเนินไปจนถึงจุดสูงสุด พบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยา จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์

5) ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibitor) การศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ มีประโยชน์ในการอธิบายกระบวนการทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท และลักษณะของ "functional group" ที่บริเวณ "active size" ทำให้เข้าใจ และสามารถควบคุมกระบวนการที่เกิดขึ้นได้

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มี 2 แบบใหญ่ๆ คือ การยับยั้งแบบผันกลับได้ (reversible enzyme inhibition) และแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible enzyme inhibition) (Lehniger, 1975)

(5.1) การยับยั้งแบบผันกลับได้ เป็นการยับยั้งที่สามารถทำให้เอนไซม์นั้นๆ กลับสู่สภาพที่สามารถทำงานได้ เมื่อกำจัดสารยับยั้งออกไป การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์วิธีนี้แบ่งเป็น 3 ลักษณะ คือ

(5.1.1) การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) เป็นการยับยั้งในลักษณะ ที่สารยับยั้งสามารถเข้าจับกับเอนไซม์ (E) ในลักษณะเดียวกับที่สับสเตรท (S) จับกับเอนไซม์ที่ active size เกิดการเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ของเอนไซม์กับสารยับยั้ง (enzyme-inhibitor complex, EI) ซึ่งคล้ายกับสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์กับสับสเตรท (enzyme-substrate complex, ES) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ ดังสมการ 2-3 จึงเกิดการแข่งกันระหว่างสารยับยั้งกับสับสเตรท

$$E + I \rightleftharpoons EI \qquad (2\text{-}3)$$

โมเลกุลของสารยับยั้งเมื่อจับกับเอนไซม์แล้ว จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมี และสามารถให้คำนิยามค่าคงที่ของสารยับยั้ง (inhibitor constant, K_i)ได้ว่า

$$K_i = \frac{[EI]}{[E][I]} \qquad (2\text{-}4)$$

การยับยั้งแบบแข่งขัน สามารถตรวจสอบได้ง่าย เพราะเมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของสารยับยั้งมีค่าคงที่ค่าหนึ่ง เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทเพิ่มขึ้น การยับยั้งจะลดลง

(5.1.2) การยับยั้งแบบ uncompetitive inhibition การยับยั้งแบบนี้สารยับยั้งไม่สามารถเข้าจับกับเอนไซม์โดยตรง แต่จะเข้าจับกับ ES แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรท-สารยับยั้ง (enzyme-substrate-inhibitor complex, ESI) ทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์

$$ES + I \rightleftharpoons ESI \qquad (2\text{-}5)$$

และค่าคงที่ของสารยับยั้ง, K_i เป็นดังนี้

$$K_i = \frac{[ESI]}{[ES][I]} \qquad (2\text{-}6)$$

จากสมการข้างต้นจะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทเพิ่มขึ้น การยับยั้งจะเกิดมากขึ้น การยับยั้งแบบนี้เกิดขึ้นน้อยมากในปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทเพียงชนิดเดียว แต่พบมากในปฏิกิริยาที่มีสับสเตรท 2 ชนิด

(5.1.3) การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) สารยับยั้งในลักษณะนี้สามารถเข้าจับได้ทั้งกับเอนไซม์โดยตรง และกับ ES เนื่องจากมีโครงสร้างเหมือนกับสับสเตรท จึงเข้าจับกับเอนไซม์ได้ แม้ว่าจะมีสับสเตรทจับอยู่ และสามารถเข้าจับกับเอนไซม์ที่บริเวณใดบริเวณหนึ่งนอกเหนือจากที่ active size ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับสับสเตรทได้ จึงไม่สามารถเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ได้ ดังสมการ

$$E + I \rightleftharpoons EI$$

$$ES + I \rightleftharpoons ESI \qquad (2\text{-}7)$$

จะได้ค่า K_i 2 ค่า ซึ่งอาจมีค่าเท่าหรือไม่เท่ากันก็ได้

$$K_i^{(EI)} = \frac{[EI]}{[E][I]} \qquad (2\text{-}8)$$

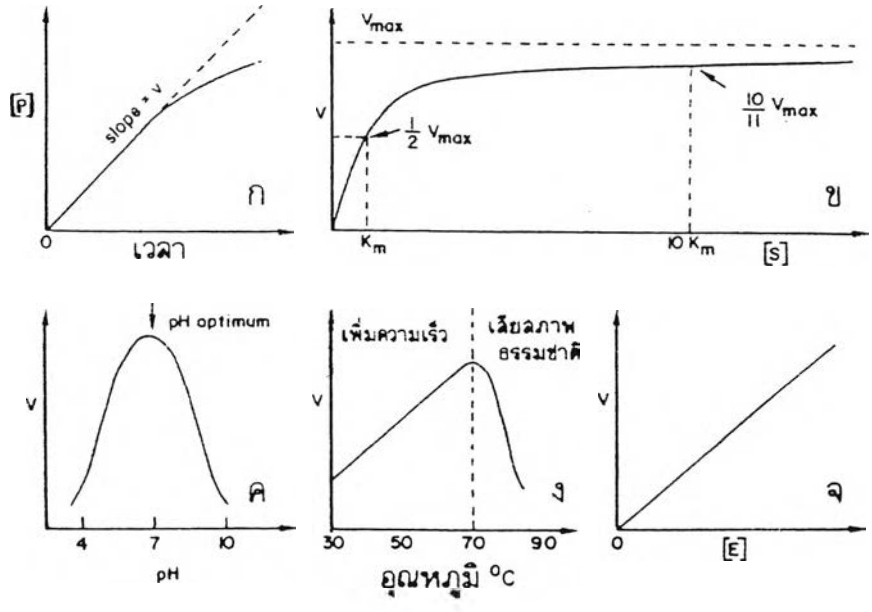
$$K_i^{(ESI)} = \frac{[ESI]}{[ES][I]} \qquad (2\text{-}9)$$

ผลของการยับยั้งในลักษณะนี้ไม่สามารถทำให้ผันกลับได้โดยการเพิ่มของปริมาณสับสเตรท

(5.2) การยับยั้งการแบบไม่ผันกลับ เอนไซม์บางตัวจะเกิดการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ เนื่องจากสารยับยั้งสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) กับเอนไซม์ และเปลี่ยนสภาพของ functional group ของเอนไซม์อย่างถาวร ทำให้เอนไซม์อยู่ในสภาพที่ไม่สามารถทำงานได้ (inactive) การยับยั้งแบบนี้จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นการยับยั้งจะมากขึ้นเพราะโมเลกุลถูกเปลี่ยนสภาพทางเคมีมากขึ้น

6) <u>ผลของโลหะต่างๆ</u>

อิออนของโลหะต่างๆมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งในลักษณะยับยั้งและกระตุ้น



รูปที่ 2.21 กราฟแสดงการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์

ก. การเพิ่มของสารผลิตภัณฑ์ (P) ตามเวลา

ข. ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยา (V) กับความเข้มข้นของสับสเตรท (S)

ค. ผลของ pH ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา

ง. ผลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา

จ. ผลของปริมาณเอนไซม์ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา

ที่มา: มนตรี จุฬาวัฒนกล (2530)

2.2.3 <u>จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์</u>

การศึกษาเกี่ยวกับจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการย่อยเซลลูดลส จะแตกต่างกันตามชนิดของเอนไซม์ แต่ยังคงใช้หลักการเดียวกัน โดยอาศัยสมการของ Michaelis และ Menten (1913) เป็นพื้นฐานสำคัญ

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_e} E + P \qquad (2\text{-}10)$$

จากสมการการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรท (2-10) Michaelis และ Menten ให้คำอธิบายไว้ว่า เมื่อเอนไซม์ (E) จับกับสับสเตรท (S) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (ES) ซึ่งอาจสลายตัวให้เอนไซม์กับสารผลิตภัณฑ์ (P) หรือ เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับเป็นเอนไซม์กับสับสเตรท เมื่อ k_1, k_{-1} และ k_e เป็นค่าคงที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาต่างๆ ความเร็วของปฏิกิริยา (v) เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ ES ดังสมการ 2-11 ส่วนความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (V_{max}) จะเกิดขึ้น เมื่อเอนไซม์ทั้งหมดอยู่ในสภาพ ES ถ้าให้ $[E_o]$ เป็นความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมด V_{max} จะมีค่า ดังสมการ 2-12

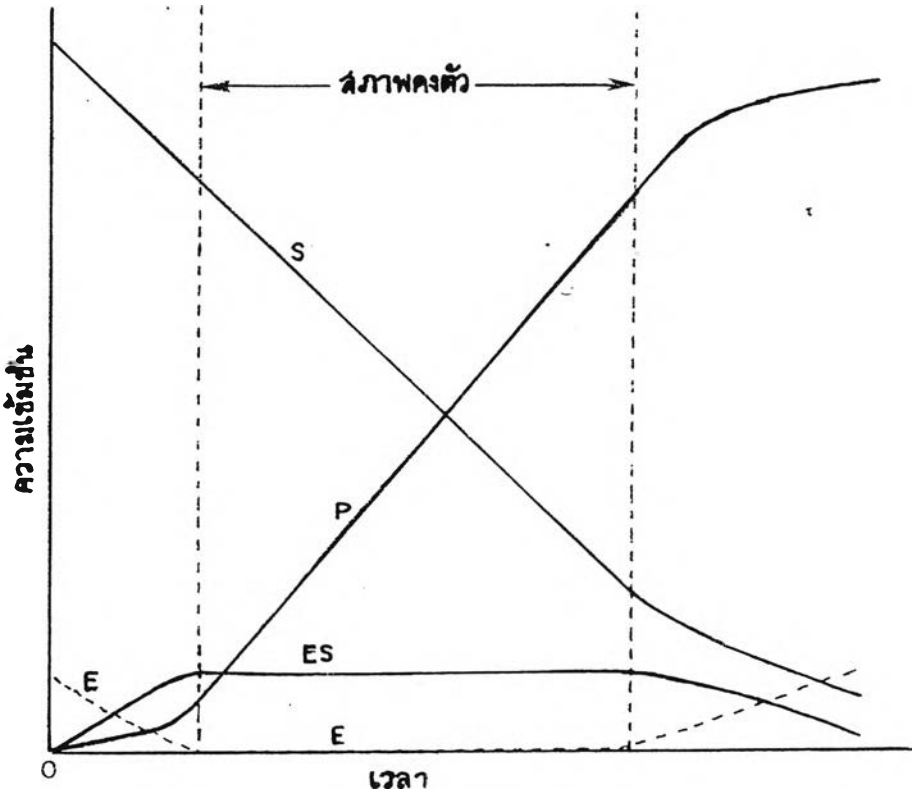
$$v = d[P]/dt = k_e [ES] \qquad (2\text{-}11)$$

$$V_{max} = k_e [E_o] \qquad (2\text{-}12)$$

ความเข้มข้นของสารต่างๆในสมการ 2-10 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงในขณะเกิดปฏิกิริยา ดังแสดงในรูป 2.22 จะเห็นว่าเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปช่วงหนึ่ง จนเข้าสู่สภาวะคงตัว (steady state) ความเข้มข้นของ ES มีค่าคงที่ เพราะอัตราเร็วของการสลายตัวของ ES มีค่าเท่ากับอัตราเร็วในการเกิดของ ES ดังสมการ 2-13

$$k_{-1} [ES] + k_e [ES] = k_1 [E][S] \qquad (2\text{-}13)$$

I16185353



รูปที่ 2.22 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสับสเตรท (S) เอนไซม์อิสระ (E) สารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์กับสับสเตรท (ES) และสารผลิตภัณฑ์ (P) ของปฏิกิริยา ตามเวลาที่ปฏิกิริยาดำเนินไป ช่วงเวลาที่ ES คงที่ เรียกว่า สภาวะคงตัว (steady state)

ที่มา: ปราณี อ่านเปรื่อง (2530)

แต่ปริมาณ E_o ซึ่งไม่เปลี่ยนแปลงในระหว่างที่เกิดปฏิกิริยา จะประกอบด้วยเอนไซม์ที่อยู่ในสภาพอิสระ (E) รวมกับเอนไซม์ที่จับกับสับสเตรท

$$[E_o] = [E] + [ES] \qquad (2\text{-}14)$$

จากสมการ 2-13 และ 2-14 จะได้ว่า

$$(k_1 + k_2)\,[ES] = k_1\,[S][E_o] - k_1\,[S][ES] \qquad (2\text{-}15)$$

ดังนั้น จากสมการ 2-11, 2-12 และ 2-15 สามารถเขียนได้ว่า

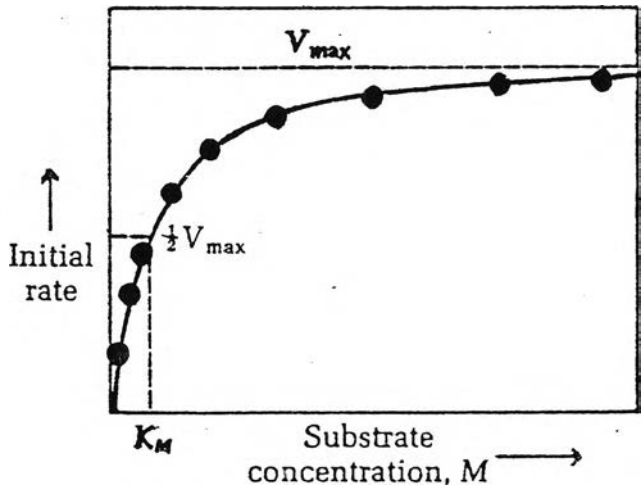
$$(k_{-1} + k_2 + k_1\,[S])\,v/k_2 = k_1\,[S]\,V_{max} / k_2 \qquad (2\text{-}16)$$

และ
$$v = V_{max}\,[S] / (K_m + [S]) \qquad (2\text{-}17)$$

เมื่อ
$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1 \qquad (2\text{-}18)$$

สมการ 2-17 เรียกว่าสมการของ Michaelis และ Menten หรือสมการของสภาพคงตัว (steady state equation) ค่า K_m เรียกว่าค่าคงที่ของ Michaelis (Michaelis constant) เป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการจับของเอนไซม์กับสับสเตรท ถ้า K_m มีค่าน้อย เอนไซม์กับสับสเตรทจะจับกันได้ดี ส่วนค่า V_{max} แสดงถึงอัตราการสลายตัวของ ES ไปเป็นสารผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา ค่าคงที่ทั้งสองนี้จะเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ หรือ pH ของปฏิกิริยา ค่า K_m และ V_{max} เป็นค่าที่สามารถวัดได้จากกราฟที่เขียนระหว่างความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยากับความเข้มข้นของสับสเตรท (รูปที่ 2.23) ซึ่งจะได้กราฟที่มีลักษณะเป็นรูปไฮเพอร์โบลา (rectangular hyperbola) จากสมการ 2-17 เมื่อ [S] มีค่ามากกว่า K_m มากๆ จะทำให้ $v = V_{max}$ และเมื่อ $v = V_{max} / 2$ จะทำให้ $[S] = K_m$

สมการของ Michaelis และ Menten ใช้ได้กับปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทชนิดเดียว สำหรับปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทมากกว่าหนึ่ง การเขียนสมการอธิบายจะซับซ้อนขึ้น



รูปที่ 2.23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสับสเตรท
กับอัตราเร็วของปฏิกิริยา

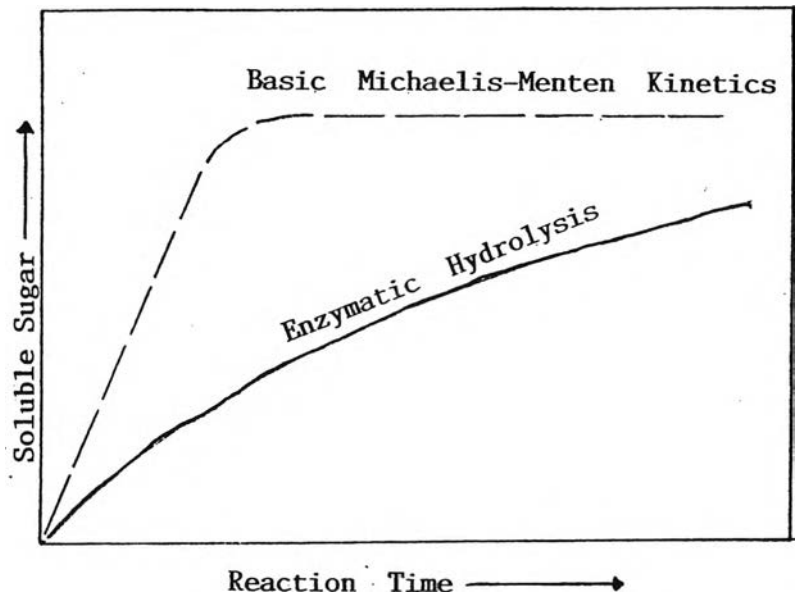
ที่มา: ปราณี อ่านเปรื่อง (2530)

Matin, Terry และ George (1981) กล่าวไว้ว่าการอธิบายจลนพลศาสตร์ของการย่อยเซลลูโลสในระบบต่างๆ โดยอาศัยสมการของ Michaelis และ Menten เป็นพื้นฐาน ได้ค่าเวลาในการผลิตน้ำตาล (t) ดังสมการที่ 2-19

$$t = (K_M/V_{max}) \ln (S_o/(S_o - P)) + (P/V_{max}) \qquad (2\text{-}19)$$

เมื่อ S_o คือปริมาณสับสเตรทเริ่มต้น

เมื่อนำค่า P กับค่า t ที่ได้จากการทดลองไปเขียนกราฟ และเปรียบเทียบค่ากับค่าที่ได้จากสมการของ Michaelis และ Menten พบว่ามีการเบี่ยงเบน ดังแสดงในรูปที่ 2.24 การเบี่ยงเบนที่เกิดขึ้น และอัตราเร็วของการผลิตน้ำตาลจะช้าลงในช่วงท้ายของปฏิกิริยา เป็นผลจากการยับยั้งปฏิกิริยาโดยสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น



รูปที่ 2.24 กราฟที่ได้จากสมการของ Michaelis และ Menten
ที่มา: Martin และคณะ (1981)

Huang (1975) อธิบายแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ในปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. viride* ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 4.8 ในถังปฏิกรณ์แบบกะ (batch recater) ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์และสับสเตรทต่างๆ วัดค่าการดูดซับของเอนไซม์บนผิวสับสเตรท โดยให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และยับยั้งปฏิกิริยาด้วยสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น พบว่า ข้อมูลที่ได้มีความสัมพันธ์กัน ที่ค่าการเปลี่ยน (conversion) ตั้งแต่ 70 เปอร์เซนต์ขึ้นไป และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง (first-order reaction) ที่มีสมการอัตราเร็วเป็น

$$1/v_o = (1 + K_1E_o)/(k_2X_1{}_mK_1E_o)(1/S_o) + (1/k_2E_o) \qquad (2\text{-}20)$$

ค่า v_o หาได้จากการเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ กับเวลา สำหรับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเขียนได้ว่า

$$t = \frac{X_{1m}K_1(S_o) + 1 + K_1(E_o)}{k_2X_{1m}K_1(E_o)(S_o)}(P) + \frac{1 + K_1(E_o) + K_3(S_o)}{2k_2X_{1m}K_1(E_o)(S_o)^2}(P)^2$$

$$+ \frac{1 + K_1(E_o) + K_3(S_o)}{3k_3X_{1m}K_1(E_o)(S_o)^3}(P) \qquad (2\text{-}21)$$

Ghose (1977) เขียนสมการของระบบการยับยั้งแบบไม่แข่งขันโดยสารผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลสไว้ว่า

$$t = (3.27)(1+[G_2]/4.68\ 10^{-3})\ \ln([G_2]/([G_2] - G_o)) - (6.58\ 10^{-3})G_2$$

$$+ ([G_2]^2/9.56\ 10^{-3}) \qquad (2\text{-}22)$$

เมื่อ t คือเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

$[G_2]$ คือเซลโลไบโอสในรูปสายโพลีเมอร์

G_2 คือเซลโลไบโอสในรูปที่ละลาย

การศึกษากลไกการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาถูกควบคุมด้วยขั้นตอนใด และการนำระบบการยับยั้งแบบไม่แข่งขันโดยสารผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยามาใช้ในการศึกษา จะใช้สมมติฐานว่า สายคาร์โบไฮเดรทในระบบเป็นเซลโลไบโอสเท่านั้น และต้องมีความเข้มข้นของสับสเตรทมากกว่า 0.3 เปอร์เซนต์

Howell (1975) เขียนสมการอย่างง่ายเพื่ออธิบายจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลสไว้ดังสมการที่ 2-23

$$v = d[P]/dt = k_2(X_1) \qquad (2\text{-}23)$$

$$t = A \ln (S_o/S_o\text{-}P) + BP + DP^2$$

เมื่อ A, B และ D คือค่าคงที่รวมของปฏิกิริยา ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ K_m และตัวแปรอื่นๆของระบบ เช่น

$$A = (K_m/V)(1 + S_o/K_1)$$

$$B = (1/V)(1 - K_m/K_i)$$

และ $$D = (1/2V)(1/K_c)$$

เมื่อ K_i และ K_c คือค่าคงที่ของตัวยับยั้งเอนไซม์และสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งจะมีค่าแตกต่างกันในแต่ละสมการ

$K_c = \alpha$ สำหรับระบบการยับยั้งแบบแข่งขัน

$K_i \neq K \neq \alpha$ สำหรับปฏิกิริยาที่การยับยั้งที่เกิดขึ้นเกิดจากหลายๆสาเหตุร่วมกัน

$K_c = K_i = \alpha$ สำหรับสมการ Michaelis และ Menten

ถ้าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง จะได้ว่า

$$t = A \ln (S_o/(S_o - P)) \qquad (2\text{-}24)$$

และกราฟที่ได้จะเป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 2.24

แบบจำลองที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ เป็นแบบจำลองที่อธิบายโดยไม่รวมผลที่เกิดจากการที่เอนไซม์ถูกดูดซับบนผิวของลิกนิน ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อย ทำให้เสียเอนไซม์จากระบบไป และการนำสมการของ Michaelis และ Menten มาใช้ยังมีปัญหาในข้อมูลที่ได้จากการทดลองจริง ทั้งนี้เนื่องจากเซลลูโลสเป็นสารที่ไม่ละลายในตัวทำละลายในระบบ และการยับยั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลจากสารอื่นที่ไม่ใช่สารผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา

2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ดังนั้นปัจจัยใดก็ตามที่มีผลต่อการเสียสภาพของโปรตีนจะมีผลต่อการเสียภาพของเอนไซม์ด้วย เช่น ความร้อน สภาพความเป็นกรด-ด่าง ตัวทำละลายอินทรีย์ ยูเรีย หรือรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นต้น

2.2.5 สมบัติของสับสเตรทที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

1) ความเป็นผลึก วัตถุดิบที่มีความเป็นผลึกอยู่มากทำให้การย่อยเกิดขึ้นได้ยาก
2) พื้นที่ผิวสัมผัส ถ้าพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทมีมาก โอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยา จะมีมาก
3) ปริมาณลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัตถุดิบ เนื่องจากทำให้การย่อยเกิดได้ยากขึ้น
4) องศาการเกิดโพลีเมอร์ไรเซชั่น (degree of polymerization) โมเลกุลของเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นใยที่แข็งแรง เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนยึดอยู่จึงถูกย่อยได้ยาก ดังนั้นการเพิ่มองศาการเกิดโพลีเมอร์ไรเซชั่นจะทำให้ความแข็งแรงของเส้นใยมีมากขึ้น ซึ่งจะถูกย่อยได้ยากขึ้น

เนื่องจากการนำเอนไซม์มาใช้มีข้อดี ข้อเสีย และข้อจำกัดหลายอย่าง ดังนั้นการนำเอนไซม์มาใช้จะต้องออกแบบระบบให้เหมาะสม เพื่อให้เกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะทำให้ได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่จะนำไปหมักต่อไป

3. การผลิตเอทานอล

การผลิตเอทานอล คือกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสให้เป็นเอทานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ (yeast) แบคทีเรีย (bacteria) โดยปกติจะเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic procees) เรียกกระบวนการเปลี่ยนนี้ว่ากระบวนการหมัก (fermentation process) การเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลจำเป็นต้องพิจารณาถึง

1. ปริมาณน้ำตาลที่สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้
2. ปริมาณและความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ
3. กระบวนการผลิต
4. การเปลี่ยนเป็นเอทานอลของน้ำตาล
5. ตัวยับยั้งปฏิกิริยา
6. สภาวะของกระบวนการ

3.1 ปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการหมัก คือ ยีสต์ อาหาร ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และการให้อากาศ (วัชรา อินทุลักษณ์, 2527) ปัจจัยทั้ง 5 นี้จะมีผลเกี่ยวเนื่องซึ่งกันและกัน การทำให้กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพจะต้องทำการปรับสภาวะให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด และ ประหยัดที่สุด

3.1.1 ยีสต์ คือจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง ไม่มีคลอโรฟิล แต่มีนิวเคลียส มีรูปร่างเป็นวงกลม หรือเป็นวงรีรูปไข่ เคลื่อนไหวไม่ได้ มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย ส่วนมากขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ (budding) ในสภาวะที่เหมาะสม ยีสต์สามารถแตกหน่อได้ภายในเวลา 1 ถึง 2 ชั่วโมง โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 25 ถึง 40 องศาเซลเซียส บางชนิดสามารถทนสภาพความเป็นกรดได้ ยีสต์เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่ใช้และไม่ใช้อากาศ ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวเคมี ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมัก ยีสต์สามารถแยกได้ประมาณ 39 จีนัส (genus) และประมาณ 349 สปีชีส์ (species) แต่พบว่ามีเพียง 2 จีนัสเท่านั้นที่มีบทบาทโดยตรงต่ออุตสาหกรรมการหมัก คือ *Candida sp.* และ *Saccharomyces* sp. และที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้คือ *Saccharomyces cerevisiae*

3.1.2 อาหาร หมายถึงสารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ ซึ่งใช้ในการสร้างโปรโตปลาสซึม (protoplasm) และใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึม (metabolism) ต่างๆ ของเซลล์ สารอาหารที่จำเป็นได้แก่

1) คาร์บอน

องค์ประกอบส่วนใหญ่ของยีสต์ คือ คาร์โบไฮเดรท กรดอะมิโน (amino acid) และสารประกอบอื่นๆ ของคาร์บอน ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งพลังงาน ดังนั้น คาร์บอนจึงเป็นสารอาหารหลักที่ยีสต์ต้องได้รับเพียงพอ เพื่อการดำรงชีวิตและการขยายพันธุ์ ปกติยีสต์จะได้รับคาร์บอนจากสารประกอบอินทรีย์โดยตรง โดยเซลล์ยีสต์จะผลิตเอนไซม์ออกมาย่อย ทำให้โมเลกุลมีขนาดเล็กลง แล้วจึงดูดซึมเข้าไปใช้ในเซลล์ เช่น การดูดซึมกลูโคสที่ได้จากการย่อยคาร์โบไฮเดรท แหล่งคาร์บอนที่ยีสต์สามารถย่อยและเปลี่ยนเป็นส่วนประกอบของเซลล์ มีหลายพวก คือ น้ำตาลที่ประกอบด้วยคาร์บอน 5 ถึง 6 อะตอม และโพลีแซคคาไรด์

2) ไนโตรเจน (nitrogen)

ยีสต์จะใช้ไนโตรเจนในการสร้างเอนไซม์ และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ เช่น แอมโมเนีย (ammonia) และ ยูเรีย (urea) เป็นต้น ซึ่งเป็นทั้งอาหารหลักและอาหารเสริมของยีสต์ นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการสารประกอบไนโตรเจนบางอย่าง ที่ยีสต์ไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ เช่น กรดอะมิโนบางชนิด และสารที่มีโครงสร้างเป็นพิวรีน (purine) และไพริมิดีน (pyrimidine) การเติมกรดอะมิโนบางชนิดลงไปในอาหารสามารถทำให้ยีสต์เจริญได้ดีขึ้น เนื่องจากยีสต์มีสมบัติพิเศษ สามารถเปลี่ยนไนโตรเจนในสารอนินทรีย์ให้เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน และโปรตีน (protein) โดยเฉพาะแอมโมเนียมอิออนที่ละลายอยู่ในน้ำ แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) แอมโมเนียมฟอสเฟต (ammonium phophate) ไนเตรท (nitrate) และยูเรีย เป็นต้น

3) ฟอสฟอรัส (phosphorus)

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่สำคัญชนิดหนึ่งในการเจริญของยีสต์ ในลักษณะที่เป็นอาหารเสริม ซึ่งจะเติมลงไป ในรูปเกลือฟอสเฟต (phosphate salt) เช่น โพแทสเซียมฟอสเฟต (potassium phosphate) เนื่องจากฟอสฟอรัส เป็นสารจำเป็นในการสร้างสารประกอบที่สามารถนำไปใช้เป็นพลังงานได้ คือ ATP โดยปกติจะเติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟตประมาณ 0.3 ถึง 0.5 กรัมต่อลิตรของสารละลายน้ำตาล เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

4) แร่ธาตุ (mineral salt) และวิตามิน (vitamin) ชนิดต่างๆ

ชนิดของแร่ธาตุที่ยีสต์ต้องการจะแตกต่างกันไปในยีสต์แต่ละชนิด แร่ธาตุบางชนิดมีหน้าที่ในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา หรือกระบวนการสำคัญภายในเซลล์ เช่น กำมะถัน เป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโนบางชนิด แมกนีเซียมในรูปเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ช่วยกระตุ้นปฏิกิริยาต่างๆ และเป็นส่วนประกอบในกรดนิวคลีอิก (nucleic acid)

ยีสต์แต่ละชนิดมีความต้องการวิตามินต่างกัน และบางอย่างยีสต์ไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ภายในเซลล์ เช่น วิตามินบี ไบโอติน (biotin) เป็นต้น จึงจำเป็นที่จะต้องมีการเติมวิตามินที่ยีสต์ต้องการนี้ลงไปเพื่อให้ประสิทธิภาพในการเจริญของยีสต์ดีขึ้น

3.1.3 <u>ค่าความเป็นกรด-ด่าง</u> การเปลี่ยนแปลง ค่าความเป็นกรด-ด่างของกระบวนการหมัก มีผลต่อเมตาโบลิซึมของยีสต์ ซึ่งอาจมีผลทำให้การเจริญของยีสต์หยุดชะงักลง การเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการหมัก จะช่วยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบไว้ได้อย่างดี นอกจากนี้ยังสามารถลดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์ ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 4.5 ถึง 6.5 ดังนั้นในการจัดสูตรอาหาร จะจัดให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วงแคบๆ ให้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมกับชนิดของยีสต์ที่เลือกใช้ เพื่อให้การหมักมีประสิทธิภาพ

3.1.4 <u>อุณหภูมิ</u> มีผลโดยตรงกับการเจริญของยีสต์ รวมทั้งจลนพลศาสตร์ของการหมัก ซึ่งอัตราการเจริญของยีสต์จะสูงขึ้นตามอุณหภูมิ จนถึงจุดหนึ่ง ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงเกินจุดนี้ไปยีสต์จะเจริญได้ช้าลง และตายไปในที่สุด และกระบวนการหมักเป็นปฏิกิริยาคายความร้อน (exothermic process) จึงมีการคายความร้อนออกมา ซึ่งถ้าปล่อยให้มีการคายความร้อนออกมามากเกินอาจทำให้ยีสต์ตายได้ ดังนั้นจึงต้องปรับให้ได้ตามความสามารถของยีสต์ นอกจากนี้พบว่าอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการใช้น้ำตาล ซึ่งจะลดลงตามค่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ จะอยู่ในช่วง 15 ถึง 35 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 37.8 องศาเซลเซียสแล้ว ยีสต์จะเจริญได้ช้าลง และการผลิตแอลกอฮอล์จะน้อยลง

3.1.5 อากาศ ยีสต์ต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการหายใจ การให้อากาศมีความจำเป็นในช่วงการเพิ่มจำนวนเซลล์ของยีสต์ แต่ไม่จำเป็นในระหว่างที่มีการผลิตแอลกอฮอล์ การให้อากาศในปริมาณมากเกินไปมีผลทำให้อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ต่ำลง

3.2 กลไกในการหมัก

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน แสดงได้ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 \qquad \Delta G = +14.6 \text{ กิโลแคลอรี/โมล}$$

กลูโคส เอทานอล

นอกจากนี้ยีสต์ยังมีกระบวนการหายใจ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ออกซิเจนตามสมการ

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O \qquad \Delta G = -688 \text{ กิโลแคลอรี/โมล}$$

ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ น้ำตาลกลูโคสจะผ่านเข้าเซลล์โดยผ่านผนังเซลล์ และเกิดการหมักขึ้นในโปรโตปลาสซึม กลูโคสจะถูกเปลี่ยนไปตามวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis Pathway, ภาคผนวก ท) จะได้พลังงานไปใช้ในการเพื่อจำนวนเซลล์ เมื่อจำนวนเซลล์เพิ่มถึงระดับหนึ่ง ยีสต์หยุดการเพิ่มจำนวนเซลล์ และจะเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอล

ผลพลอยได้จากการหมัก ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน นอกจากเอทานอลแล้ว ยังมีสารอื่น เช่น กลีเซอรอล (glycerol) กรดซัคซินิค (succinic acid) กรดซิตริก (citric acid) และกรดแลคติก (lactic acid) เป็นต้น ส่วนในสภาวะที่ใช้ออกซิเจนจะได้ปริมาณเซลล์ยีสต์มากขึ้น

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. Han และ Callihan (1974) ได้ศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวโดยวิธีทางเคมีด้วยวิธีการต่างๆ แล้วนำฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแล้วที่มีเซลลูโลสหนัก 0.2 กรัม ไปทำปฏิกิริยาการย่อยกับเอนไซม์เซลลูเลส 150 มิลลิกรัม ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ผลการปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ

Treatment	TSAE (%)	Reducing Sugar	Crystallinity index	Digestibility index
Control (untreated)	29.4	0.14	5.30	-1.365
Steam, 160C, 4h	61.5	0.18	6.70	0.003
Propylene glycol	69.0	0.17	8.35	0.199
3% NaOCl, 130C, 4h	54.2	0.16	3.68	-0.782
3% NaCl, 160C, 4h	65.5	0.15	4.36	-0.445
3% Urea, 160C, 4h	64.1	0.17	7.05	0.043
5% $Na_2B_4O_4$, 160C,4h	78.6	0.18	7.50	-0.342
3% HCl, 130C, 4h	59.3	0.05	5.30	-1.438
3% H_2SO_4, 130C, 4h	53.5	0.07	5.40	1.494
3% HNO_3, 130C, 4h	59.9	0.09	6.50	-0.937
3% NH_3, 130C, 4h	60.0	0.18	-	0.107
2% NaOH, 160C,10min	54.4	0.20	6.47	0.069
4% NaOH, 100C,15min	73.0	0.28	5.94	1.500
4% NaOH, 100C,60min	78.0	0.27	6.56	1.489
4% NaOH, 150C,50min	76.0	0.24	5.94	1.299

ที่มา: Han และ Callihan (1974)

หมายเหตุ: TSAE หมายถึง ปริมาณสารที่ละลายในสารละลายหลังการย่อยด้วยเอนไซม์

จากผลการทดลองในตารางที่ 2.4 พบว่าการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะให้ผลการปรับสภาพดีที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 4 เปอร์เซนต์ (1โมลาร์) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการปรับสภาพเท่ากับ 15 นาที และปริมาณ TSAE เพิ่มจาก 29.4 เป็น 73.0 เปอร์เซนต์ ส่วนการปรับสภาพโดยใช้สารละลายกรดชนิดต่างๆให้ผลการปรับสภาพต่ำกว่า เนื่องจากการใช้กรดเข้มข้นที่อุณหภูมิสูงทำให้น้ำตาลเกิดการเสียสภาพไปหรือเปลี่ยนไปเป็นสารอื่น นอกจากนี้พบว่าปริมาณลิกนินของสับสเตรท ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด มีปริมาณสูงกว่าสับสเตรทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายด่าง ซึ่งเป็นผลจากการที่เมื่อใช้สารละลายกรดในการปรับสภาพแล้วยังคงมีลิกนินอยู่ในโครงสร้างของสับสเตรท ส่วนในกรณีที่ใช้ด่าง จะเกิดการละลายของลิกนินซึ่งจะถูกแยกออกไปเมื่อนำไปกรอง และเชื่อว่าสารละลายกรดสามารถละลายเซลลูโลสในบริเวณที่ถูกย่อยได้ง่ายกว่า (บริเวณเซลลูโลสอสัณฐาน) ออกไป เหลือส่วนที่ย่อยยาก (บริเวณเซลลูโลสผลึก) ไว้ในปริมาณมาก ซึ่งสามารถทราบได้จากค่าดัชนีของความเป็นผลึก (crystallinity index)

2. Detroy และคณะ (1981) ได้ศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวสาลีในการผลิตเอทานอลโดยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ วิธีการปรับสภาพที่ใช้ คือ วิธีทางเคมี เปรียบเทียบกันระหว่างการใช้สารละลายกรดกับสารละลายด่าง และศึกษาการปรับสภาพ 2 ขั้นตอน ด้วยเอทิลีนไดอะมีน (EDA) และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) นำผลการทดลองที่ดีที่สุดไปใช้ปรับสภาพฟางข้าวสาลี เพื่อใช้ผลิตน้ำตาลที่จะใช้หมักเป็นเอทานอล ให้ผลการทดลองแสดงในตาราง 2.5 จากผลการทดลองพบว่า การปรับสภาพฟางข้าวสาลีด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาปรับสภาพ 4 ชั่วโมง สามารถแยกเฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้ดีกว่า และปริมาณเซลลูโลสที่สูญเสียไปยังต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 25 และ 90 องศาเซลเซียส และเมื่อปรับสภาพด้วยกรดในขั้นตอนที่ 1 แล้วตามด้วยการปรับสภาพโดยใช้ EDA ในขั้นตอนที่ 2 พบว่าสามารถแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้สูงขึ้นอีก แต่การปรับสภาพในขั้นตอนที่ 2 ด้วย EDA ไม่เพิ่มประสิทธิภาพให้กับการปรับสภาพโดยใช้สารละลายด่างในขั้นตอนที่ 1 มากนัก โดยการปรับสภาพขั้นตอนที่ 2 ด้วย EDA จะให้ผลดีเมื่อทำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ค่าการเปลี่ยนสูงถึง 98 เปอร์เซนต์

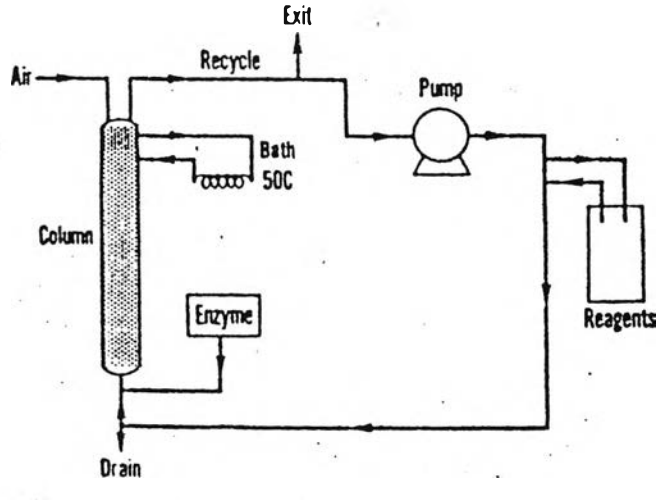
ตารางที่ 2.5 การปรับสภาพฟางข้าวสาลีและการย่อยด้วยเอนไซม์

Chemical Pretreatment		Percent Loss			Conversion of Cellulose to Glucose (%)
Primary	Secondary	Hemicell.	Cellulose	Lignin	
5% H_2SO_4, 25C, 4h	None	15	2	6	30
	EDA	51	5	69	98
	NH_4OH	40	1	25	55
5% H_2SO_4, 90C, 4h	None	93	3	11	26
	EDA	93	10	75	59
	NH_4OH	92	7	19	30
1% NaOH, 25C, 1h	None	32	13	17	51
	EDA	51	11	61	61
	NH_4OH	50	14	40	70
1% NaOH, 90C, 1h	None	60	9	35	75
	EDA	60	17	47	72
	NH_4OH	60	9	29	73
H_2O (Ctrl.)	-	0	0	0	11

ที่มา: Detroy และคณะ (1981)

เมื่ออุณหภูมิในการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดสูงขึ้น ค่าการเปลี่ยนของเซลลูโลสเป็นกลูโคสจะต่ำลง แม้ว่าจะแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้ดี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำตาลที่เกิดขึ้นเปลี่ยนเป็นสารอื่น เช่น เฟอร์ฟูรัลและอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรัล ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการย่อย การปรับสภาพขั้นที่ 2 ด้วย NH_4OH จะให้ผลดีสำหรับการปรับสภาพฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพขั้นตอนที่ 1 ด้วยสารละลายด่าง โดยจะให้ค่าการเปลี่ยนของเซลลูโลสเป็นกลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 70 เป็น 83 เปอร์เซนต์

เลือกวิธีการปรับสภาพฟางข้าวสาลี โดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.5 ถึง 1 เปอร์เซนต์ นำฟางข้าวที่ปรับสภาพแล้วไปทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ ในคอลัมน์แบบต่อเนื่อง (continuous column) ดังแสดงในรูปที่ 2.25



รูปที่ 2.25 เครื่องปฏิกรณ์ที่ใช้ในการย่อยและการหมัก

ที่มา: Detroy และคณะ (1981)

น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้นำไปหมักเป็นเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces uvarum* สายพันธุ์ NRRLY-1347 โดยใช้จำนวนเซลล์เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ผลการผลิตแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 การผลิตกลูโคสและเอทานอลจากฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพโดยวิธีทางเคมี

Chemical Pretreatment	Straw (g)/ H_2O volume (l)	Total Sugar		Conversion (%)	
		Glucose (g)	Xylose (g)	Cellulose to Glucose	Glucose to Ethanol
1% NaOH, 24h	300/8	35	13.5	26	42
0.5% NaOH, 6h	300/6	39	23.9	30	41
0.5% NaOH, 24h	500/4	40	16.4	18	30
10% NH_4OH, 24h	300/4	20	5.2	15	31
Anh. NH_3(6g),6h	100/1	20	7.0	15	33

ที่มา: Detroy และคณะ (1981)

จากตาราง 2.6 พบว่าค่าการเปลี่ยนของกลูโคสเป็นเอทานอลค่อนข้างต่ำ เนื่องจากเกิดสารที่เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ในระหว่างการปรับสภาพ ทำให้ปริมาณน้ำตาลในคอลัมน์ต่ำ (1ถึง 3 เปอร์เซนต์)

3. Detroy และคณะ (1982) ได้ศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวสาลีโดยใช้วิธีต้มกับไอน้ำที่อุณหภูมิสูง เปรียบเทียบกับวิธีการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Chen และ Anderson, 1980) การปรับสภาพโดยวิธีต้มกับไอน้ำทำโดยนำฟางข้าวสาลีมาบด ตัดให้มีขนาด 10 ถึง 45 มิลลิเมตร ใส่ลงในหม้อต้มไอน้ำ ที่มีการกวนอย่างช้าๆ นำไปต้มที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 60 นาที โดยใช้อัตราส่วน

ของน้ำต่อฟางเป็น 7 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก นำตะกอนฟางไปวิเคราะห์ ให้ผลการทดลองแสดงในตาราง 2.7

ตารางที่ 2.7 ผลการปรับสภาพฟางข้าวสาลีโดยวิธีต้มกับไอน้ำ

Residue yield (%)	Cellulosic pulp composition (%)			
	Cellulose	Pentosans	Lignin	Ash
85.5	46.3 (33)*	18.0 (29)	16.5 (14)	7.8 (9)

ที่มา: Detroy และคณะ (1982)

* ค่าจากการวิเคราะห์ในฟางข้าวสาลีที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ

การปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำโดยนำฟางข้าวสาลีมาบด แล้วร่อนด้วยตะแกรงร่อนขนาด 4 มิลลิเมตร นำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองแยกตะกอนฟางออก แล้วนำไปต้มกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นเดิมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปกรอง แล้วล้างตะกอนจนมีสภาพเป็นกลาง วิเคราะห์ส่วนประกอบในตะกอนฟาง ให้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 ผลการปรับสภาพฟางข้าวสาลีโดยวิธีของ Chen และ Anderson

Residue yield (%)	Cellulosic pulp composition (%)			
	Cellulose	Pentosans	Lignin	Ash
60.3	54.3	20.9	8.34	5.90

ที่มา: Detroy และคณะ (1982)

จากตารางที่ 2.7 และ 2.8 พบว่าในการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีการสูญเสียในระหว่างการปรับสภาพสูงกว่าการปรับสภาพโดยใช้ไอน้ำ แต่เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของฟางที่ผ่านการปรับสภาพแล้วจะเห็นว่า การปรับสภาพโดยวิธีใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะให้ผลดีกว่า

4. สุภาพร ชาติวรพงศา (2536) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (dextranase) โดยใช้วัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย แกลบ และรำข้าว ทำการปรับสภาพโดยวิธีทางเคมีที่อุณหภูมิและความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเติมเบต้า-กลูโคสิเดส โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 80 หน่วยต่อกรัมวัสดุ และเติมเบต้า-กลูโคสิเดสปริมาณ 60 หน่วยต่อกรัมวัสดุ ใน 50 มิลลิลิตรของสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ ที่มีค่า pH เท่ากับ 4.8 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที นำน้ำตาลที่ได้ไปใช้ในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่อไป ให้ผลการทดลองดังตาราง 2.9

จากผลการทดลองพบว่า การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ด่างร่วมกับการใช้ความร้อนภายใต้ความดัน มีผลช่วยทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น ซึ่งดีกว่าการใช้สารละลายกรดซัลฟูริก หรือการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และการใช้ความร้อนภายใต้ความดันเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เนื่องจากการปรับสภาพด้วยกรดและด่างทำให้การเปลี่ยนของโครงสร้างของเซลล์พืชต่างกัน โดยการปรับสภาพด้วยกรดหรือการต้มที่อุณหภูมิสูงจะมีการกำจัดลิกนินออกไปปริมาณเล็กน้อย กรดจะทำลายโครงสร้างของลิกนินโดยตรง หรือจะทำลายพันธะระหว่างคาร์โบไฮเดรทกับลิกนิน ซึ่งจะทำให้สารประกอบของผนังเซลล์พืช เช่น เฮมิเซลลูโลส หรือเซลลูโลสอสัณฐานหลุดออก เกิดเป็นช่องที่ผนังเซลล์ ทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาได้สะดวกขึ้น แต่การใช้กรดจะทำให้ค่าดัชนีความเป็นผลึกและอัตราส่วนของเซลโลไบโอสและกลูโคสสูง เมื่อทำการย่อยจึงให้ปริมาณน้ำตาลต่ำ ต่างจากการปรับสภาพด้วยสารละลายด่าง ซึ่งจะทำให้ช่องว่างภายในโครงสร้างเกิดขึ้นมากกว่า โดยจะเข้าทำลายถึงเนื้อเยื่อชั้นใน และเลือกทำลายเฉพาะเฮมิเซลลูโลสและพันธะระหว่างคาร์โบไฮเดรทกับลิกนินเท่านั้น นอกจากนี้ยังทำให้เส้นใยมีการบวม และมีพื้นที่ผิวมากขึ้นด้วย ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้มากกว่า

ตารางที่ 2.9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเบต้า-กลูโคสิเดส

ชนิดวัสดุ	วิธีการปรับสภาพ	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุ) ที่เวลาต่างๆ				
		10 นาที	15 นาที	30 นาที	60 นาที	120 นาที
แกลบ	5% H_2SO_4	26	43.5	33	29.5	24
	1% NaOH	17.5	22	47.5	52	61
	Autoclave	ND	17.5	36	47	ND
	Autoclave + 1% NaOH	ND	30.5	23	42.5	ND
ฟางข้าว	5% H_2SO_4	110	113	121	120	121
	1% NaOH	295.5	351.5	407	530	622
	Autoclave	ND	89	139	143.5	ND
	Autoclave + 1% NaOH	ND	743	635.5	596.5	ND
รำข้าว	5% H_2SO_4	204	228	249	246.5	270.5
	1% NaOH	430	370	361	410	401.5
	Autoclave	ND	222.5	219	238.5	ND
	Autoclave + 1% NaOH	ND	65.5	219.5	151.5	ND

ที่มา: สุภาพร ชาติวรพงศา (2536)

หมายเหตุ: ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

ตารางที่ 2.9 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเบต้า-กลูโคสิเดส

ชนิดวัสดุ	วิธีการปรับสภาพ	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุ) ที่เวลาต่างๆ				
		10 นาที	15 นาที	30 นาที	60 นาที	120 นาที
ชานอ้อย	5% H_2SO_4	164	171	182	195	190.5
	1% NaOH	208.5	275	325.5	396	388.5
	Autoclave	34.5	38.5	37	ND	ND
	Autoclave + 1% NaOH	1134	1038	1032	ND	ND

ที่มา: สุภาพร ชาติวรพงศา (2536)

หมายเหตุ: ND หมายถึงไม่ได้ทำการทดลอง