บทที่ 1

บทนำ

การศึกษาเกี่ยวกับเซลลูเลสเริ่มต้นขึ้นโดย Reese Ralph และ Hillel (1950) โดยพบว่าเซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำงานร่วมกันในการย่อยสลายเซลลูโลส จนกระทั่งได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจากน้ำตาลกลูโคสนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ ได้อีกมากมาย เช่น นำกลูโคสไปเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพื่อนำไปผลิตสารเคมีชนิดอื่นๆ เช่น เอทานอล บิวทานอล อะซีโตน กลีเซอรอล เป็นต้น (Wyman, 2002) นอกจากนี้เซลลูเลสยังเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในเชิงอุตสาหกรรมต่างๆ หลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมพลังงาน ฯลฯ (Lynd, Wyman and Gerngross., 1999) เซลลูเลสสามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น หอยทาก *Helix aspersa* (Holden and Tracey, 1950) จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ หลายชนิด (cellulolytic microbes) ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย รา หรือแอคติโนมัยสิท เช่น *Cellulomonas* spp. *Clostridium* spp. *Ruminococcus* spp. *Aspergillus* spp. *Trichoderma* spp. ฯลฯ (Lynd *et al.*, 2002)

จากการศึกษาพบว่ามีการนำเอาจุลินทรีย์ไปใช้ในการศึกษา และผลิตเซลลูเลสมากที่สุด เนื่องจากมีความหลากหลายของสายพันธุ์สูง มีราคาถูก สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ มูลสัตว์ ซากพืชซากสัตว์ เป็นต้น โดยเฉพาะเชื้อรา *Trichoderma reesei* พบว่ามีการศึกษาและนำมาผลิตเซลลูเลสในระดับอุตสาหกรรมค่อนข้างมาก เนื่องจากเป็นเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสออกมาได้จำนวนมาก และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด (Kubicek *et al.*, 1990; Saloheimo *et al.*, 1997) และจากคุณสมบัตินี้ของ *T. reesei* ทำให้มีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ของ *T. reesei* ขึ้นเพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้มากขึ้น ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้มากขึ้น (Miettinen-Oinonen and Suominen, 2002) โดยเริ่มจาก *T. reesei* QM6a ที่คัดแยกได้จากฝ้ายโดย Elwyn T. Reese และ Mary Mandels (1984) ได้ถูกนำมาปรับปรุงสายพันธุ์โดยวิธีต่างๆ จนกระทั่งได้เป็น *T. reesei* QM9414 ที่มีเซลลูเลสแอกทิวิตีมากขึ้น และจาก *T. reesei* QM9414 นี้ได้มีหน่วยงานต่างๆ นำไปปรับปรุงสายพันธุ์ต่างๆ อีกจำนวนมาก ซึ่งในจำนวนนี้มี *T. reesei* Rut C-30 ที่ปรับปรุงสายพันธุ์โดยมหาวิทยาลัย Rutgers (Rutgers University, New Brunswick, NJ, USA) ให้มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้มากขึ้น ทนต่อสภาวะต่างๆ ได้ดีมากขึ้น (Gogary *et al.*, 1990)

การวัดเซลลูเลสแอกทิวิตีทำได้โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หรือน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเซลลูเลส วิธีการวัดเซลลูเลสแอกทิวิตีมีอยู่หลายวิธี ได้แก่ Somogyi-Nelson method (Nelson, 1944; Somogyi, 1951) Dinitrosalicylic acid method (Miller, 1959) Phenol-Sulfuric method (Dubois *et al.*, 1956) ฯลฯ โดยวิธีที่นิยมใช้ในการวัดเซลลูเลสแอกทิวิตีมากที่สุดคือ Somogyi-Nelson method และ Dinitrosalicylic acid method (DNS) การวัดเซลลูเลสแอกทิวิตีโดยวิธี Somogyi-Nelson method เป็นการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยให้น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเซลลูเลสทำปฏิกิริยากับสารละลาย Alkaline copper และ Arsenomolybdate เกิดเป็นสารละลายสีเขียวมะกอก มีความเข้มของสีตามปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ จากนั้นนำไปคำนวณหาค่าเซลลูเลสแอกทิวิตีจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้วิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี เปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ส่วนการวัดเซลลูเลสแอกทิวิตีโดยวิธี Dinitrosalicylic method (DNS) เป็นการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยให้น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเซลลูเลสทำปฏิกิริยากับสารละลาย Dinitrosalicylic acid เกิดเป็นสารละลายสีเหลือง มีความเข้มของสีตามปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส จากนั้นนำไปคำนวณหาค่าเซลลูเลสแอกทิวิตีจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่โดยใช้วิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี เปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

ในปัจจุบันเทคโนโลยีทางภาพเข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันมากขึ้น เช่น การใช้เครื่องสแกนเนอร์สแกนวัตถุต่างๆ การใช้กล้องดิจิทัลในการถ่ายรูป เป็นต้น ซึ่งเทคโนโลยีทางภาพและระบบประมวลผลทางภาพเหล่านี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสร้างโพรไฟล์ในการแปลงค่าสีได้ เช่นเดียวกับการใช้อุปกรณ์วัดสีราคาแพงทั่วไป เช่น สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เป็นต้น (Hansuebsai, Krisda and Pungrassamee, 2003) มีการนำเอาอุปกรณ์และเครื่องมือเหล่านี้ไปใช้ประยุกต์กับงานด้านอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น การนำกล้องดิจิทัลมาใช้ในการคัดแยกคุณภาพของสิ่งทอ (Luo *et al.*, 2002) การวัดปริมาณจีโนมิกด้วยกล้องดิจิทัล (Bornfleth *et al.*, 1996) การสกรีนดวงตาวิเคราะห์โรคเบาหวานในดวงตา (diabetic retinopathy) ด้วยกล้องดิจิทัล (Basu *et al.*, 2002) เป็นต้น

ในการวัดเซลลูเลสแอกทิวิตี เป็นการวัดค่าสีที่เกิดขึ้นจากการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเซลลูเลส ซึ่งโดยปกติแล้วจะใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ในการอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ออกมาอยู่ในรูป OD unit ซึ่งวิธีนี้มีข้อจำกัดในการวัดแสง เนื่องจากเป็นการวัดแสงในทิศทางเดียว ทำให้อาจจะเกิดความผิดพลาดในการวัดค่าแสงได้ ดังนั้นจึงนำเอาระบบประมวลผลทางภาพเข้ามาใช้ในการวัดเซลลูเลสแอกทิวิตีแทนการใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยกล้องดิจิทัลในการวัดค่าสีในระบบ RGB จากนั้น

คำนวณให้เป็นค่าสีในระบบ CIE L*a*b* โดยโปรแกรม DIB color measurement software แล้วนำค่าสีที่อ่านได้ไปคำนวณหาเซลลูเลสแอกทิวิตีต่อไป การทำงานของกล้องดิจิทัลเป็นการใช้หลักการสะท้อนของแสง (reflected) ในการสร้างโพรไฟล์ในการแปลงค่าสี เป็นการวัดแสงในทุกทิศทาง ทำให้ได้ค่าสีที่ตรงตามความเป็นจริง (Hansuebsai, Krisda and Pungrassamee, 2003) ดังนั้นการใช้กล้องดิจิทัลเป็นเครื่องมือในการวัดสี แทนการใช้เครื่อง spectrophotometer จะสามารถลดความผิดพลาดจากการวัดสีได้ อีกทั้งยังเป็นการนำไปสู่วิธีการวัดเซลลูเลสแอกทิวิตีแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการวัดเซลลูเลสแอกทิวิตีโดยใช้เทคนิคแบบย่อส่วน และนำระบบประมวลผลทางภาพเข้ามาประยุกต์ใช้ในการวัดเซลลูเลสแอกทิวิตี ให้ได้ผลที่มีความถูกต้อง สะดวก และรวดเร็ว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

พัฒนาการวัดเซลลูเลสแอกทิวิตีแบบใหม่โดยใช้เทคนิคย่อส่วน และระบบประมวลผลทางภาพเข้ามาประยุกต์ใช้ในการวัดเซลลูเลสแอกทิวิตี ให้สามารถวิเคราะห์ผลได้ถูกต้อง สะดวก ประหยัด และรวดเร็ว

ขอบเขตของการวิจัย

รายงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ คิดค้นวิจัยหาแนวทางในการวิเคราะห์เซลลูเลสแอกทิวิตีแบบใหม่ โดยการลดปริมาณการใช้สารเคมีต่างๆ ลง และใช้ระบบประมวลผลทางภาพเปรียบเทียบกับวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย