หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

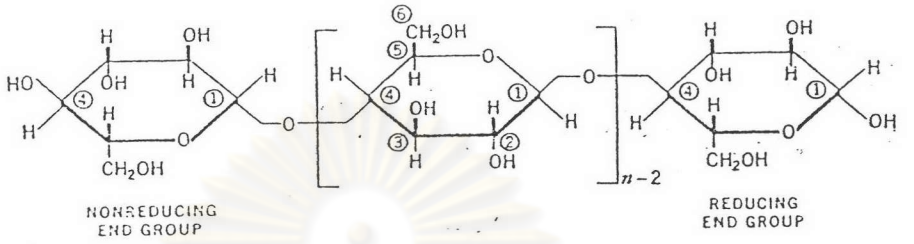
การตรวจเอกสาร

เซลลูโลส

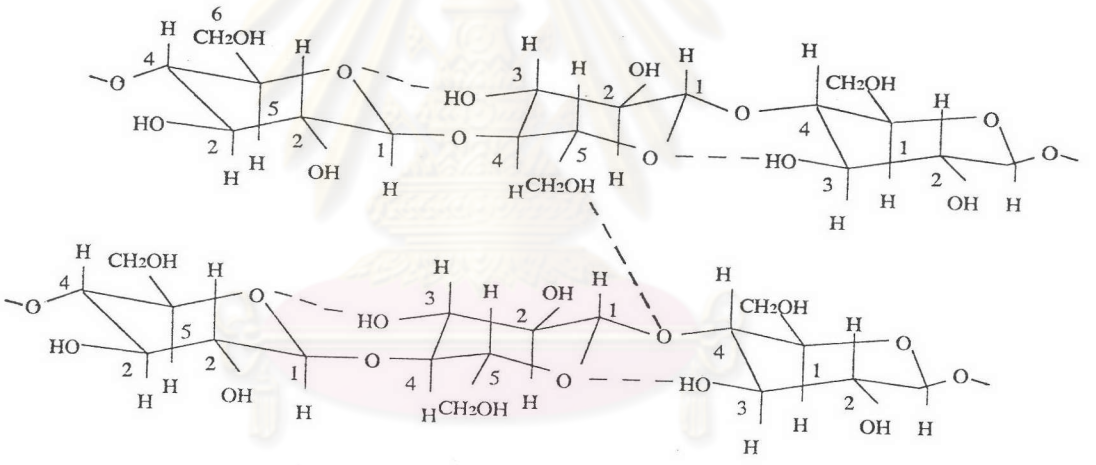
1. ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลีแซคคาไรด์ ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของดี-กลูโคส (D-glucose) ในรูปบีตา-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-glucopyranose) มาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ในโมเลกุลถัดไป (รูปที่ 1ก) หนึ่งโมเลกุลของเซลลูโลสประกอบด้วยดี-กลูโคสประมาณ 15 หน่วย จนถึงประมาณ 14,000 หน่วย (Cowling and Kirk, 1976) มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.5 เมกกะดาลตัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคส เท่ากับ 180.16 ดาลตัน ความยาวของหน่วยย่อยดี-กลูโคส เท่ากับ 0.515 นาโนเมตร และความยาวทั้งหมดของโมเลกุลเซลลูโลสมีค่ามากกว่า 5 ไมโครเมตร ถ้าพิจารณาถึงโครงรูป (conformation) ของการจัดเรียงตัวของหน่วยย่อยดี-กลูโคส จะอยู่ในลักษณะ chair form แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวนของโมเลกุลถัดไป และเชื่อมต่อระหว่างสายเซลลูโลสที่ขนานกัน ด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของดี-กลูโคสในอีกสายหนึ่ง (Zabriskie, Qutabucldin, and Dowing, 1980 ; Sasaki, 1982) (รูปที่ 1ข) จากการจัดเรียงตัวเหล่านี้ ทำให้สายเซลลูโลสเรียงตัวขนานซึ่งกันและกันอย่างมีระเบียบเป็นกลุ่มของผลึก (crystalline micelles) โดยแต่ละกลุ่ม ประกอบด้วยโมเลกุลเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุล มีรูปร่างเป็นแถบหนา กลุ่มเหล่านี้ประมาณ 10 ถึง 20 กลุ่ม จะมาเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้น เรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งสามารถแบ่งลักษณะโครงสร้างเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ตามการจัดเรียงตัวของไมโครไฟบริลได้ 3 ลักษณะ (Nisizawa, 1973) คือ

ก



ข



รูปที่ 1 แสดงสูตรโมเลกุลและลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

ก. สูตรโมเลกุล

ข. ลักษณะโครงสร้าง

ที่มา : Nisizawa (1973)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก. Fringe micelles ในไมโครไฟบริล ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) และอะมอร์ฟัส (amorphous) (รูปที่ 2ก)

ข. โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส (รูปที่ 2ข)

ค. โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นเกลียว (helix) เกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้งฉากกับแนวแกน (รูปที่ 2ค)

ในธรรมชาติ เซลลูโลสจะอยู่ในรูปของลิกโนเซลลูโลส โดยจะเชื่อมต่ออยู่กับพอลีแซคคาไรด์อื่นๆ เช่น เพคติน เฮมิเซลลูโลส แป้ง และฟีโนลิก พอลิเมอร์ของลิกนิน (Lutzen, et al., 1983) จากการศึกษาถึงโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส พบว่าในส่วนของ secondary cell wall จะเป็นส่วนที่พบเซลลูโลสมากที่สุด และจะมีปริมาณลดลงในส่วนของ middle lamella ส่วนเฮมิเซลลูโลส และลิกนินจะพบมากในส่วนของ middle lamella และจะมีปริมาณลดลงในส่วนของ secondary cell wall บริเวณที่มีการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลสอย่างเป็นระเบียบสูง เรียกว่า บริเวณคริสตัลลีน ส่วนบริเวณที่มีการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลสไม่เป็นระเบียบ หรือเป็นระเบียบน้อยกว่า เรียกว่า บริเวณอะมอร์ฟัส หรือพาราคริสตัลลีน (Cowling and Kirk, 1976 ; Brown, 1983 ; Lee, Pagan, and Rogers, 1983) บริเวณคริสตัลลีน จะมีประมาณ 50-90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือจะเป็นอะมอร์ฟัส (Tsao and Chiang, 1983) แต่ละบริเวณจะแสดงคุณสมบัติในการยอมรับต่อกลไกการเข้าทำปฏิกริยาของเอนไซม์แตกต่างกัน โดยบริเวณอะมอร์ฟัสจะยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกริยาการย่อยสลายได้ง่ายกว่าบริเวณคริสตัลลีน ดังนั้นกลไกการย่อยสลาย จะเกิดขึ้นที่บริเวณอะมอร์ฟัสได้เร็วกว่า และเกิดขึ้นก่อนบริเวณคริสตัสลีน (Sasaki, 1982 ; Lee, et al., 1983)

เซลลูโลสไม่ละลายในน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายด่างอ่อน แต่ละลายได้ดีในกรด หรือด่างแก่ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามลักษณะการละลายในกรด หรือด่างได้เป็น 3 ชนิดคือ

ก. แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 17.5 เปอร์เซ็นต์

ข. บีตา-เซลลูโลส (β-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 17.5 เปอร์เซ็นต์

ก

ข

ค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป

ก. Fringe micelles ในไมโครไฟบริล

ข. โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส

ค. โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นริบบินหนา

ที่มา : Nisizawa (1973)

ค. แกมมา-เซลลูโลส (ɤ-cellullose) เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายได้ดีทั้งในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 17.5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายกรดเจือจาง

2. การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส

ในธรรมชาติการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส เกิดโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกัน ในสภาพที่มีออกซิเจน ผลที่ได้จากการย่อยสลาย จะได้กาซคาร์บอนไดออกไซด์ ฮิวมัส ความร้อน และจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์จะได้มาจากการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสในสภาพที่เหมาะสม มีการระบายอากาศ และอุณหภูมิที่เหมาะสม มีแหล่งอาหารเพียงพอกับการนำไปสร้างพลังงานเพื่อใช้ในระบบเมตาบอลิซึม และการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน การย่อยสลายเซลลูโลส จะได้กาซคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน เอทธานอล กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดซัคซินิก กรดบิวทีริก และกรดแลคติก เป็นต้น (Alexander, 1976) นอกจากนี้การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส ยังสามารถทำได้โดยวิธีทางเคมี ซึ่งเป็นการย่อยสลายด้วยสารเคมี อาทิเช่น การใช้กรด การย่อยสลายวิธีนี้ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นจะไม่เฉพาะเจาะจง ดังนั้นน้ำตาลกลูโคสบางส่วนที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกริยากับกรดต่อไป ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงชนิดอื่น และกรดยังทำปฏิกริยากับสารอื่นที่ติดมากับเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้โครงสร้างในส่วนที่เป็นคริสตัลลีน ก็จำเป็นต้องใช้กรดที่มีความเข้มข้น และอุณหภูมิสูงในการย่อยสลายจึงจะได้น้ำตาลกลูโคส ปฏิกริยาการย่อยจึงเกิดแบบรุนแรง ภาชนะที่ใช้ก็ต้องทนทานต่อการกัดกร่อน ต้นทุนจึงสูง และกรดที่ถูกทิ้งออกมา ยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย แต่วิธีนี้ปฏิกริยาการย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 15-20 นาที (Goldstein, 1981 ; Tsao and Chiang, 1983) หรือโดยวิธีทางชีวภาพ อาทิเช่น การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความเฉพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับสารประกอบเซลลูโลส โดยจะไม่ทำปฏิกริยากับสารอื่นที่ปนมา จึงทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ ลักษณะการย่อยจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ปฏิกริยาเกิดขึ้นในที่มีอุณหภูมิซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถเจริญเติบโตได้ และปฏิกริยาที่เกิดขึ้นก็ไม่รุนแรง นอกจากนี้ก็ไม่จำเป็นต้องใช้ภาชนะที่ทนทานต่อการกัดกร่อน ต้นทุนจึงต่ำกว่า และยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม หากแต่วิธีนี้น้ำตาลกลูโคสที่ได้อยู่ในรูปของสารละลายเจือจาง (Goldstein, 1981)

เอนไซม์เซลลูเลส

1. ระบบเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาโดยการแยก และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาระบบของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเซลลูเลสเป็น multicomponent enzymes มีระบบเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดมาทำงานร่วมกัน (Ryu and Mandels, 1980 ; Montenecourt, 1983) คือ

ก. Exo β-1,4-glucan cellobiohydrolase หรือ Exoglucanase หรือ C_1 (EC.3.2.1.91)

ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสโดยตัดพันธะของ β-1,4-glucosidic จากปลายด้านของ non-reducing ทำให้ได้เซลโลไบโอส และกลูโคส (ในปริมาณที่น้อย) น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายจะมีการจัดเรียงตัวเป็น α-configulation (inversion)

ข. Endo β-1,4-glucan glucanohydrolase หรือ Endoglucanase หรือ C_X (EC.3.2.1.4)

ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส โดยตัดพันธะ β-1,4-glucosidic ภายในสายเซลลูโลส ในบริเวณที่เป็นอะมอร์ฟัส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น carboxymethyl cellulose (CMC), walseth cellulose และ cello-oligomers เอนไซม์นี้จะตัดพันธะอย่างสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ กลูโคส และเซลโลไบโอส โดยจะได้เซลโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

ค. β-glucosidase หรือ cellobiase (EC.3.2.1.21)

ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เป็นกลูโคส

การทำงานของ C_1 และ C_X เป็นปฏิกริยาภายนอกเซลล์ ส่วนการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase เป็นปฏิกริยาภายในเซลล์ โดยจะย่อยสลายเซลโลไบโอสที่เกิดจากการทำงานของ C_1 และ C_X ที่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ (Sin and Reese, 1953) ส่วนอัตราการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการเช่น โครงสร้างธรรมชาติของเซลลูโลส องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่เข้าทำปฏิกริยา อิทธิพลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น (Tsao and Chiang, 1983 ; Bland and Douglas, 1985)

2. สมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาถึงโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเซลลูเลสเป็น glycoprotein ประกอบด้วยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ถึง 60,000 ดาลตัน (Montenecourt, 1983) มีสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ co-factor หรือโลหะอื่นๆในการทำปฏิกริยา โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์ จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน ประมาณ 50 องศาเซลเซียส (^{o}C) ยกเว้นจุลินทรีย์ทนร้อนบางชนิด นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง ทนต่อความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ในช่วงกว้างประมาณ 4.0 ถึง 8.0 และคงทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 และ 4.0 ^{o}C ได้เป็นเวลาหลายปี หรือเก็บโดยวิธี freeze dry หรือตกตะกอนด้วยอะซิโตน หรือเอทธานอล โดยไม่สูญเสียสมบัติ (Ryu and Mandels, 1980) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ย่อมมีสมบัติแตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

3. การกระตุ้นและการยับยั้งการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสมีการควบคุมอยู่ 2 แบบ แต่ละแบบเป็นอิสระต่อกันคือ แบบชักนำให้เกิด และแบบยับยั้ง ซึ่งจะพบทั้งในเชื้อรา (Zhu et al., 1982) และ เชื้อแบคทีเรีย (Fennington, Neubauer, and Stutzenberger, 1984 ; Wood et al., 1984)

Ross และคณะ (1983) รายงานว่าเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ชนิดชักนำ จะสร้างขึ้นเมื่อจุลินทรีย์เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลส หรือสารประกอบที่มีพันธะ β-1,4-glucosidic เช่น lactose salicin cellobiose sophorose ดังนั้นในสภาพที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสลาย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง สามารถละลายน้ำ และสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เนื่องจากเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีหลายองค์ประกอบ ในการผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณมากๆ จึงขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ เพราะแหล่งคาร์บอนที่ใช้มีหลายชนิด ที่สามารถกระตุ้นให้จุลินทรีย์มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยเฉพาะเซลลูโลสชนิดที่ไม่ละลายน้ำ จะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการชักนำ ให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสได้ทุกองค์ประกอบ และเอนไซม์ที่สังเคราะห์ได้ ยังสามารถนำไปย่อยสลายผลึกเซลลูโลส ที่มีอยู่ในธรรมชาติได้ดีอีกด้วย แต่ถ้าแหล่งคาร์บอนเป็นพวกไดแซคคาไรด์ (disaccharide) โซโฟโลส (sophorose) ที่ละลายน้ำได้ เช่น แลคโตส เซลโลไบโอส

ตารางที่ 2 สมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

organism	cellulase component	MW	pH		Temperature(^{0}C)		activity on
			activity	stability	activity	inactivity	
Scytalidium lignicola (Desai, Ray, and Petel, 1983)	β-glucosidase I	74,000	5.0	4.0-6.0	55	50, 24 hrs. สูญเสียประสิทธิภาพ 80%	-PNPG -cellobiose
	β-glucosidase II	59,000	4.8	4.0-6.0	55		
Sporotrichum cellulophilum (Durand, Soucaille, and Tiraby, 1984)	FPase	-	5.5	3.0-7.0	60	-	-filter paper
	endoglucanase	-	5.0	3.0-7.0	60	-	-CMC
T. reesei TD.B6 (Durand, et al.,	FPase	-	4.8	3.0-7.0	65	70	-filter paper
	endoglucanase	-	4.4	3.0-7.0	60	70	-CMC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 (ต่อ) สมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

organism	cellulase component	MW	pH		Temperature(^{0}C)		activity on
			activity	stability	activity	inactivity	
1984)				สูญเสียประสิทธิภาพ 90 %			
Pseudomonas solanacearum (Schell, 1987)	endoglucanase	43,000	7.5	5.5-8.0	50	>70	-CMC
A. niger AS 101 (Singh, et al., 1990a, 1990b)	exoglucanase	52,500	5.5	4.0-6.0	50	65, 60 min สูญเสียประสิทธิภาพ 50%	-filter paper
	cellobiase	-	5.0-5.0	4.0-6.0	60	75, 40 min	
Ruminococus sp.	endoglucanase						

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 (ต่อ) สมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

organism	cellulase component	MW	pH		Temperature(^{0}C)		activity on
			activity	stability	activity	inactivity	
(Srivastava, Ali,	-EG A	22,000	7.5-8.0	-	45	-	-CMC
and Khanna, 1991)	-EG B	225,000	7.5	-	40	-	-CMC
	-EG C	10,000	8.0	-	40	-	-CMC
Bacillus stearo-	cellulase I	-	7.0	5.0-10.0	60	>65	-CMC, filter
thermophilus	cellulase II	-	10.0	6.0-10.0	60	>60	paper, avicel
(Kume and Fujio,							
1991)							
T. viride HK-75	exocellulase						
(Goto, Furukawa,	-exo-I	56,000	4.0	2.0-7.0	55	>55	-p-nitrophenyl-
and Hayashida,	-GPExo	9,000	4.0	2.0-7.0	55	>55	β-D-cellobio-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 (ต่อ) สมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

organism	cellulase component	MW	pH		Temperature(^{0}C)		activity on
			activity	stability	activity	inactivity	
1992)							side (PNP-G_2
Coriolus versi-	CMCase I	26,000	5.0	4.0-6.0	55	-	-CMC
color (Idogaki	CMCase II	29,500	5.0	4.0-6.0	55	-	-CMC
and Kitamoto, 1992)							
R. albus	endoglucanase						
(Watanabe, et al.,	-EG I	43,000	6.8	-	37	70, 10 min	-cellopentaose
1992)	-EG II	54,000	6.7	-	44	สูญเสียประ	CMC, cello-
	-EG III	53,000	5.7	-	55	สิทธิภาพ 100%	hexaose
Microbispora	cellobiohydrolase						
bispora (Hu, et	-CBH I	74,000	6.5	-	60	-	-acid-swollen

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 (ต่อ) สมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

organism	cellulase component	MW	pH		Temperature(^{0}C)		activity on
			activity	stability	activity	inactivity	
al., 1992)	-CBH II	92,500	6.5	-	60	-	cellulose
P. purpurogenum (Hidalgo, Steiner, and Eyzaguirre, 1992)	β-glucosidase	90,000	3.5	2.5-9.5	60	-	-aryl-β-glucosides, cellobiose, amygdalin
Bacillus sp. (Kricke, et al., 1994)	CMCase	250,000	6.0	3.0-11.0	50	-	-avicel
Botrytis cinerea (Sasaki and Naga-	β-glucosidase	380,000	3.0	4.0-10.0	60	>60	-avicel, CMC, salicin, sodium

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 (ต่อ) สมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

organism	cellulase component	MW	pH		Temperature(^{0}C)		activity on
			activity	stability	activity	inactivity	
yama, 1994)							pectate
Cellulomonas sp.	endoglucanase						
(Prasertsan and	-EG I	62,000	7.0	6.0-7.0	50	60, 24 min	-CMC
Doelle, 1986)	-EG II	44,000	7.0	6.0-7.0	40	60, 36 min	-CMC
	-EG III	62,944	7.0	6.0-7.0	50	60, 24 min	-CMC
	-EG IV	76,880	7.0	6.0-7.0	50	60, 1 hr.	-CMC
	-EG V	142,914	7.0	6.0-7.0	50	60, 24 min	-CMC
	-EG VI	120,572	7.0	6.0-7.0	40-50	60, 21 min	-CMC
						สูญเสียประสิทธิ	
						ภาพ 50%	

หรือแม้แต่อะนาลอคของเซลโลไบโอส เช่น ไธโอเซลโลไบโอส (thiocellobiose) และเซลโลไบโออะซิเตท (cellobioacetate) ก็สามารถนำมาใช้เป็นตัวชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ได้ แต่ไม่ค่อยดีนัก สำหรับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสได้เลย (Masaki et al., 1983 ; Lin and Wilson, 1987) นอกจากนี้ การเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) บางชนิด เช่น Tween 80 sucrose monopulmatate และ non-ionic surfactant อื่นๆ ยังทำให้เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์มากขึ้น

Kawamori และคณะ (1986) ศึกษาการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในเชื้อรา T. reesei ด้วย L-sorbose พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มก./มล.) มีผลกระตุ้นให้เชื้อราสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีเหมือนกับการใช้ sophorose ซึ่งเป็นสารกระตุ้นที่ดีสำหรับการสร้างเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในการสร้างเอนไซม์นั้น สามารถถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ cycloheximide ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Ghosh และ Kundu (1980) ศึกษาการชักนำการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส ในเชื้อรา A. terreus (IJIRA 6.2) พบว่าการชักนำด้วยสาร Tamarind Kernel Polysaccharide (TKP) จาก Tamarindus indica ช่วยให้เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) β-glucosidase บีตา-ไซโลซิเดส (β-xylosidase) และ extra-cellular protein ในปริมาณที่สูง ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 2.5 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าสาร TKP เป็นสายพอลีแซคคาไรด์ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-glucosidic ประกอบไปด้วยน้ำตาล D-glucose D-xylose D-galactose และ L-arabinose ในอัตราส่วน 8:4:2:1

Ali และ Sayed (1992) ศึกษาการควบคุมการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในเชื้อรา A. terreus (GTC 826) พบว่าสามารถกระตุ้นให้เชื้อราสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้โดยใช้ glucose, xylose และ cellobiose เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้น 5.0 มก./มล. แต่ถ้าระดับความเข้มข้นสูงกว่านี้ การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจะถูกยับยั้ง และนอกจากนี้ยังพบว่าการชักนำให้เชื้อราสร้างเอนไซม์เซลลูเลสสามารถถูกยับยั้งได้ถึง 57 64 และ 25 เปอร์เซ็นต์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อใช้ 2,4-dinitriphenol ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ (mM) sodium azide ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 mM และ malonate ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากสารเหล่านี้ไปมีผลในการยับยั้งการหายใจ จึงทำให้การสร้างพลังงาน โดยเฉพาะพลังงาน ATP ภายในเซลล์เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ และยังพบว่าการสร้างเอนไซม์ endoglucanase สามารถถูกยับยั้งได้ถึง 65 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ cycloheximide ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 mM ทั้งนี้เพราะ cycloheximide มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

สำหรับการยับยั้งการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลส พบว่ามีการยับยั้ง 2 แบบ คือ แบบแก่งแย่ง (competitive) และแบบไม่แก่งแย่ง (non-competitive) การยับยั้งแบบแก่งแย่งของเอนไซม์ จะถูกยับยั้งโดยอิทธิพลของกลูโคส และเซลโลไบโอส ซึ่ง Ryu และ Mandels (1980) กล่าวว่ากลูโคสเป็นสารยับยั้งที่มีฤทธิ์ปานกลาง แต่เซลโลไบโอสเป็นสารยับยั้งที่มีฤทธิ์แรง ถ้าอัตราส่วนระหว่างกลูโคส และเซลโลไบโอสสูง จะไปมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ทำให้เกิดการสะสมของเซลโลไบโอส ความเข้มข้นของเซลโลไบโอสที่มากขึ้นจะไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์ endoglucanase และเอนไซม์ exoglucanase

Montenecourt (1983) ศึกษาการควบคุมการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลสในเชื้อรา T. reesei พบว่า นอกจากจะถูกควบคุมโดยกระบวนการทางชีวเคมี แล้วยังถูกควบคุมโดยพันธุกรรม โดยยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ endoglucanase และ exoglucanase เป็นแบบ inducible หรือ repressor gene ทำให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดดังกล่าวถูกควบคุมโดยซับสเทรต หรือผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ เซลโลไบโอส ส่วนเอนไซม์ β-glucosidase มียีนควบคุมที่ทำให้การสร้างเอนไซม์เป็นแบบ constitutive และถูกยับยั้งการทำงานโดยกลูโคส

Ferchak และ Pye (1983) ศึกษาผลของน้ำตาล cellobiose glucose ethanol และ metal ions ต่อการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลส ในเชื้อรา Thermomonospora fusca พบว่า cellobiose เป็นสารยับยั้งที่มีฤทธิ์แรงต่อระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส โดยมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย swollen cellulose ลดลง 25 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ glucose เป็นสารยับยั้งที่มีฤทธิ์ปานกลาง มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง 40 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 20

เปอร์เซ็นต์ ส่วน ethanol พบว่ามีผลเพียงเล็กน้อยต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง 15 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดสอบ metal ions พบว่า Ca^{2+} และ Co^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ถึง 1.0 mM มีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่ Pb^{2+} และ Hg^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 mM มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

Prasertsan และ Doelle (1986) ได้ทำการแยก และศึกษาลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Cellulomonas sp. พบว่าน้ำตาล glucose มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ถึง 15 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.034 เปอร์เซ็นต์ หรือประมาณ 1.65 mM และน้ำตาล cellobiose มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อยู่ระหว่าง 0 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือประมาณ 2.92 mM ส่วนผลของ metal ions ชนิดต่างๆ คือ Hg^{2+} Co^{2+} Ca^{2+} Mg^{2+} Zn^{2+} และ Fe^{3+} พบว่ามีเพียง Hg^{2+} เท่านั้น ที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ถึง 55 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 5.0 mM

Singh และคณะ (1990a, 1990b) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ exoglucanase และเอนไซม์ β-glucosidase จากเชื้อรา A. niger พบว่า Na^{2+} และ K^{2+} มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ส่วน Mn^{2+} Co^{2+} Ca^{2+} และ Mg^{2+} มีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่ Pb^{2+} และ Hg^{2+} มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิด

4. ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ ปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีก เช่น ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง รวมไปถึงสภาพแวดล้อมในการผลิต ซึ่งได้แก่ อายุและปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) อุณหภูมิ การให้อากาศ และอัตราการเขย่า (Duff, 1988 ; Steiner et al., 1987)

Warzywoda, Ferre และ Pourquie (1983) ทำการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei พบว่า Whatman CC 41 cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการผลิตเอนไซม์

Rao และคณะ (1983) ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในสภาพการหมักแบบ solid state จากเชื้อรา Pestalotiopsis versicolor โดยใช้กระดาษหนังสือพิมพ์ กากอ้อย ฟางข้าว และฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ (pretreated) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่ากากอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ KNO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่อซับสเทรต 10 กรัม

Kawamori และคณะ (1986) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าชานอ้อยที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ carboxymethyl cellulase (CMCase) สูงสุดคือ 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร (U/ml)

Acebal และคณะ (1986) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 9414 โดยใช้ฟางข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อใช้ฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ ในขณะที่การผลิตเอนไซม์จะสูงที่สุดเมื่อใช้ฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารเคมี โดยเชื้อราให้ค่า activity สูงสุด คือ 666 หน่วยต่อกรัมซับสเทรต

Macris และคณะ (1989) ศึกษาถึงวิธีการอย่างง่าย และประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ B-glucosidase จากเชื้อรา Neurospora crassa ในการผลิตแบบ solid state พบว่าการใช้ฟางข้าวสาลีที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ แล้วเติมด้วยสารละลาย mineral salts ช่วยให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด โดยให้เอนไซม์ cellobiohydrolase CMCase และ β-glucosidase 6.1 969.2 และ 169.4 หน่วยต่อกรัมซับสเทรต ตามลำดับ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม คือ pH 6-7 และอุณหภูมิ 25 ^{o}C

Jin และ Toda (1989) ศึกษาถึงผลของ urea K_2HPO_4 yeast extract และ cellulose ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในเชื้อรา Clostridium thermocopriae พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ urea จาก 2 เป็น 6 กรัมต่อลิตร (ก./ล.) K_2HPO_4 จาก 4.4 เป็น 5.0 ก./ล. และลดความเข้มข้นของ yeast extract จาก 6.0 เป็น 4.0 ก./ล. ช่วยให้การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.6 เท่า (จาก 0.60 เป็น 0.94 หน่วย) และการใช้ cellobiose เข้าไปแทนที่ cellulose ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา ในระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแต่อย่างใด แต่ถ้าเพิ่มปริมาณของ cellobiose เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสลดลงอย่างรวดเร็ว

Gomes และคณะ (1989) ศึกษาถึงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในเชื้อรา Gliocladium virens พบว่าการใช้ฟางข้าวสาลีที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ bacto-peptone ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ระดับความเข้มข้น 0.14 เปอร์เซ็นต์ และ urea ที่ระดับความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5 ทำให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด โดยให้ค่า filter paper cellulase (FPase) และ β-glucosidase 0.33 และ 1.52 U/ml ตามลำดับ

Schafner และ Toledo (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei โดยการหมักแบบต่อเนื่อง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก พบว่า เชื้อรามีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อใช้น้ำตาลไซโลสที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เสริมด้วย sorbose ที่ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีปริมาณของเซลล์เท่ากับ 4.54 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ภาวะที่เหมาะสม คือ pH 4.0 ในขณะที่การผลิตเอนไซม์สูงสุดคือให้ FPA 0.69 หน่วย เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันแต่ pH ในระหว่างการผลิตเป็น 3.5

Keskar (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Penicillium jathinellum พบว่าชานอ้อย รำข้าว และรำข้าวสาลี ที่ระดับความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์

เซลลูเลส โดยให้ CMCase FPase และ β-glucosidase เท่ากับ 45 3.2 และ 4.5 U/ml ตามลำดับ pH ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทั้ง 3 ชนิดคือ 4.5 ถึง 5.5 และเมื่อทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในถังหมักขนาด 14 ลิตร พบว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ CMCase FPase และ β-glucosidase สูงสุดคือ 60 5 และ 9 U/ml ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 10 วัน และเมื่อนำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ไปย่อยสลายฟางข้าวสาลี และกระดาษกรองที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว พบว่า ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด 57-58 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C โดยให้น้ำตาลกลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

Bastawde (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา A. terreus พบว่าเชื้อรามีการเจริญ และผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด เมื่อใช้ cellulose powder เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตเอนไซม์ endo-1,4-β-glucanase FPase และ β-glucosidase เท่ากับ 14.4 1.3 และ 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ คือ NH_4Cl $NH_4H_2PO_4$ และ $(NH_4)_2SO_4$ ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด คือ pH 5 สำหรับเอนไซม์ endo-1,4-β-glucanase pH 6 สำหรับเอนไซม์ FPase และ pH 4.0-4.5 สำหรับเอนไซม์ β-glucosidase ที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C เป็นเวลา 8 วัน หรืออุณหภูมิ 28 ^{o}C เป็นเวลา 14 วัน เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้ไปย่อยสลายเซลลูโลสคือสำลี กระดาษกรอง ชานอ้อย และฟางข้าว พบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง

Prasertsan และ Oi (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา A. niger ATCC 6275 ภายใต้การหมักแบบ solid state พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ palm cake เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตเอนไซม์ CMCase และ β-glucosidase เท่ากับ 78.5 และ 0.79 หน่วยต่อกรัมซับสเทรต ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ระยะเวลา 20 วัน นอกจากนี้ยังพบว่า palm cake ยังสามารถใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลได้อีกด้วย

Abrha และ Gashe (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Cladosporium sp. พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดเมื่อใช้ CMC ในระดับความเข้ม

ข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และ KNO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้การเติม tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.5 ถึง 4.5 เท่า ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในการหมักคือ pH เริ่มต้น 5.2 อุณหภูมิ 20 ถึง 23 ^{o}C อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ส่วนประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C ที่ pH 5.0

Gashe (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Trichoderma sp. A-001 ที่คัดแยกได้จากกองปุ๋ยหมัก พบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้ CMC stover cardboard avicel กระดาษกรอง เปลือกข้าวบาเลย์ หญ้า และฟางข้าวสาลี เป็นแหล่งคาร์บอน แต่การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเมื่อใช้กระดาษกรอง ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อราจะผลิตเอนไซม์ CMCase FPase และ β-glucosidase 167 18 และ 49 U/ml ตามลำดับ KNO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าการใช้ NH_4Cl และ urea เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้การใช้ tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ CMCase FPase และ β-glucosidase เพิ่มขึ้น 2.6 ถึง 23 2 ถึง 60 และ 3.8 ถึง 1,225 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ สำหรับภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ คือ pH เริ่มต้น 5.2 อุณหภูมิ 28 ^{o}C อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที และภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ทั้งสามชนิดคือ pH 5.5 อุณหภูมิ 60 ^{o}C

Gomes และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. viride BT 2169 ในสูตรอาหาร basic mineral (BM) โดยปรับ pH เริ่มต้นเป็น 5.5 พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ FPase และ β-glucosidase คือ ที่อุณหภูมิ 32.8 ^{o}C เป็นเวลา 144 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 31.1 ^{o}C เป็นเวลา 170 ชั่วโมง โดยมี sulphite pulp เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ FPase และ β-glucosidase 0.55 และ 3.37 U/ml ตามลำดับ และเมื่อทำการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ sulphite pulp เป็นแหล่งคาร์บอน ในระดับความเข้มข้นเท่าเดิม พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ FPase และ β-glucosidase 0.61 และ 2.72 U/ml ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ sulphite pulp เป็น 6 เปอร์เซ็นต์ การผลิตเอนไซม์

FPase และ β-glucosidase เพิ่มขึ้น 3.0 และ 2.4 เท่า ตามลำดับ

Maheswari และคณะ (1993) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei โดยใช้ฟางข้าวสาลี ที่ผ่านการปรับสภาพ และไม่ผ่านการปรับสภาพ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าฟางข้าวสาลี ที่ผ่านการปรับสภาพ ช่วยให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ CMCase และ FPase สูงกว่าฟางข้าวสาลี ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพถึง 52 และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคือที่ pH เริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 35 ^{o}C เป็นเวลา 12 วัน

Okeke และ Obi (1993) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Arthrographis sp. ซึ่งคัดแยกได้จากกองปุ๋ยหมัก พบว่า อุณหภูมิ และ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 30 ^{o}C pH เริ่มต้น 5.0 ถึง 6.0 โดยมีกระดาษกรอง และ microcrystalline cellulose (MCC) ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ คือ NH_4NO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าการเติม tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase เพิ่มขึ้นจาก 2.10 เป็น 2.54 8.33 เป็น 13.37 และ 3.89 เป็น 5.97 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสได้เริ่มต้นในศตวรรษที่ 19 โดยนักโรคพืชในสมัยนั้น ได้ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากต้นพืชที่เป็นโรค พบเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) และเชื้อรา เป็นตัวการสำคัญในการทำให้ต้นพืชเกิดโรค การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสโดยเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ จะเกิดตรงบริเวณที่จุลินทรีย์เข้าทำอันตราย (สุนทร วงศ์สวัสดี, 2516) หลังจากนั้นการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ก็ได้รับความสนใจมากขึ้น รวมไปถึงการศึกษาถึงสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ การนำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม เป็นต้น ปัจจุบันการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ก็ยังคงปฏิบัติกันอยู่ เช่น Chavanich, Hajime และ Shinsaku (1981) ได้คัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซแลนเลส (xylanase) จากกองขยะ โรงงานกระดาษ

แถบชานเมือง กรุงเทพมหานคร ได้เชื้อรา Cephalosporium sp. Aspergillus sp. Humicola sp. Talaromyces sp. และ Thermonascus sp. Abdel-Hafez (1982) ได้คัดแยกเชื้อราที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสได้ จากดินในทะเลทราย ประเทศซาอุดิอาระเบีย ได้เชื้อรา Aspergillus sp. Alternaria sp. Stachybotrys sp. Penicillium sp. และ Botryotrichum sp. Sandhu และ Arora (1985) ได้คัดแยกเชื้อราจากเปลือกไม้ Dalbergia ได้เชื้อราทั้งสิ้น 19 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ พบว่ามี 2 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสได้เป็นอย่างดีคือ Acrophia-lophora sp. และ Thielavia sp. Sandhu และคณะ (1985) ได้คัดแยกเชื้อราจากดินในประเทศอินเดีย พบเชื้อราทั้งสิ้น 98 สายพันธุ์ โดยมีสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีคือ Aspergillus sp. Chaetomium sp. Thermoascus sp. Penicillium sp. Thielavia sp. และ Acremonium sp. Bahkali (1992) ได้คัดแยกเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง ในประเทศซาอุดิอาระเบีย พบเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีคือ Colletotrichum lindemuthianum

สำหรับเชื้อแบคทีเรีย Hungate (1947) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส จากกระเพาะโคพบเชื้อ Bacteroides succinogenes Benoit และคณะ (1992) ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากขยะเทศบาล พบเชื้อแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้เชื้อ Clostridium sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ต่อมาได้มีการคัดแยก และเก็บรวบรวมแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสได้มากขึ้นเช่น Actinomyces cellulosae Angiococcus cellulosum Bacillus cellulosae Cellulomonas acidula Cellulomonas aurogena Sporangium cellulosum Streptomyces celluloflavas (Dunlap and Lin-chang, 1979) Ruminicoccus albus Pseudomonas solanacearum (Kawai, et al., 1987)

การหมักแอลกอฮอล์ (Alcohol fermentation)

การหมัก (fermentation) ในทางเทคโนโลยีทางชีวภาพและทางอุตสาหกรรมหมายถึง กระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้น โดยอาศัยกระบวนการทางเมตาบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ ภายใต้

ภาวะที่มีอากาศ (aerobe) หรือภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobe) ก็ได้ (พวงพร ชิตกไกร, 2530)

เนื่องจากวิกฤติการณ์ทางด้านพลังงาน เริ่มต้นตั้งแต่ต้นทศวรรษ 1970 จนถึงปัจจุบัน อันเป็นผลมาจากน้ำมันปิโตรเลี่ยมที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานหลักมีราคาสูง ดังนั้นจึงได้มีความพยายามผลิตแหล่งพลังงานอื่นขึ้นมาทดแทน เช่น การผลิตกาซธรรมชาติ หรือการผลิตเชื้อเพลิงเหลว เป็นต้น (Chriatakopoulos, Macris, and Kekos, 1990) การหมักแอลกอฮอล์ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่ได้รับความนิยม แต่เดิมการผลิตแอลกอฮอล์ อาศัยการผลิตโดยวิธีทางเคมี โดยการดูดซับเอทธีลีน (ethylene) ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นเพื่อให้ได้เอทธิลซัลฟูริก แอซิก (ethyl sulfuric acid) ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอล (ethanol) และกรดซัลฟูริก (sulfuric acid)

$$3\ C_2H_4 + 2H_2SO_4 \longrightarrow CH_3CH_2OSO_3H + (CH_3CH_2)_2SO_4$$

ethylene

$$CH_3CH_2OSO_3H + H_2O \longrightarrow CH_3CH_2OH + H_2SO_4$$

ethyl sulfuric acid — ethanol

หรือโดยการเติมน้ำลงในเอทธีลีนโดยตรง โดยใช้กรดซัลฟูริก เป็นตัวเร่งปฏิกริยา ที่ความดัน 68 บรรยากาศ (100 spi) และอุณหภูมิ 400 ^{o}C

$$C_2H_4 + H_2O \longrightarrow CH_3CH_2OH$$

แต่ในปัจจุบันนิยมอาศัยการหมัก โดยเฉพาะในประเทศซึ่งมีวัตถุดิบที่ใช้หมักได้จำนวนมาก และราคาถูก (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529) การหมักเอทธานอลเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยอาศัยกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งกลไกในการหมักเกิดขึ้นดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

glucose — ethanol

แต่ในสภาวะที่มีอากาศ เชื้อจุลินทรีย์สามารถออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคสให้กลายเป็นกาซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

ในทางทฤษฎีเชื้อจุลินทรีย์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทธานอลได้ 51.1 เปอร์เซ็นต์ และกาซคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของน้ำตาล แต่ในทางปฏิบัติน้ำตาลประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ที่ถูกเปลี่ยนเป็นเอทธานอล นอกนั้นเชื้อจุลินทรีย์ใช้สำหรับการเจริญเติบโต จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักเอทธานอล คือเชื้อยีสต์ โดยเฉพาะเชื้อยีสต์ในสกุล Saccharomyces sp. แต่เชื้อยีสต์ในสกุลอื่น ก็ได้รับความสนใจเช่นกัน เช่น Candida sp. รวมไปถึงเชื้อแบคทีเรียบางสกุลด้วย เช่น Zymomonas sp. และ Clostridium sp. เป็นต้น

เอทธานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลายประเภท เช่น วัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้ง สารประกอบประเภทเซลลูโลส หรือผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น whey กากผลไม้จากโรงงานผลไม้กระป๋อง หรือ sulfite liquor เป็นต้น (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529 ; Kosaric, Russell, and Stewart, 1980) ในการผลิตเอทธานอลจากสารประกอบประเภทเซลลูโลสนั้น มีขั้นตอนที่สำคัญคือ กระบวนการย่อยสารประกอบเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส หรือกรดเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส และกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสด้วยเชื้อยีสต์หรือแบคทีเรียเพื่อให้ได้เอทธานอล

การหมักเอทธานอลสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น การหมักแบบ solid state (Amin, 1992) การหมักแบบต่อเนื่อง (Park and Baratti, 1992) การหมักแบบ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) (Spindler, Wyman, and Grohmann, 1988) หรือการหมักแบบ mixed-cultures หรือ co-cultures (Hagerdal and Haggstrom, 1985 ; Abouzied and Reddy, 1986) เป็นต้น สำหรับการหมักแบบ mixed-cultures หรือ co-cultures เป็นวิธีการใหม่ที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากเป็นการหมักที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน ระหว่างการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส และการหมักน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทธานอล ดังนั้นจึงเป็นการลดปัญหาเกี่ยวกับการยับยั้ง

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสโดยผลิตภัณฑ์สุดท้าย นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอทธานอล เพราะในระบบการหมักแบบนี้ใช้ถังหมักเพียงถังเดียว (Hagerdal and Haggstrom, 1985) การหมักแบบนี้ นอกจากจะนำมาใช้ในการหมักเอทธานอลแล้ว ยังมีการนำไปใช้ในการหมักสารเคมีชนิดอื่นๆอีก เช่น การหมักโปรตีนเซลเดียวจาก beet pulp (Ghanem, 1992) การหมักกรดแลคติกจากแป้ง (Haggstrom and Dostalek, 1981) การหมักกรดแอสปาติก และกรดซัคซินิกจากน้ำตาลกลูโคส (Hotta and Takao, 1993) เป็นต้น

Hagerdal และ Haggstrom (1985) ศึกษาการหมักเอทธานอลแบบ mixed-cultures โดยใช้เชื้อรา T. reesei C30 ร่วมกับเชื้อยีสต์ S. cerevisiae โดยมี solka floc BW 200 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตเอทธานอลได้สูงถึง 40 กรัมต่อลิตร หรือประมาณ 83 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังพบว่าการจำกัดปริมาณของออกซิเจน ยังช่วยให้การผลิตเอทธานอลเพิ่มขึ้น

Tanaka, Kurosawa และ Murakami (1985) ศึกษาการหมักเอทธานอลโดยใช้เชื้อรา A. awamori ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย Zymomonas mobilis โดยมีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถผลิตเอทธานอลได้ 25 กรัมต่อลิตร ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม คือ pH 4.5 ถึง 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C และอัตราการเขย่า 220 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการหมัก 84 ชั่วโมง

Abouzied และ Reddy (1986) เปรียบเทียบการหมักเอทธานอลแบบ mono-culture กับการหมักแบบ co-cultures ในการหมัก potato starch พบว่าการหมักแบบ co-cultures ให้ผลผลิตของเอทธานอลสูงกว่าการหมักแบบ mono-culture ในขณะเดียวกันการเพิ่มปริมาณของเชื้อยีสต์ตั้งต้นจาก 4 เป็น 12 เปอร์เซ็นต์ ยังช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเอทธานอลให้สูงขึ้นเป็น 96 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลาของการหมักเพียง 2 วัน นอกจากนี้ยังพบว่า pH ที่เหมาะสมในการหมักเอทธานอล คือ 5.0 ถึง 6.0 ในขณะที่ pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ คือ 5.0 ถึง 8.0

Pirselova, Smogrovicova และ Balaz (1993) ศึกษาการหมักเอทธานอลจาก

แป้งโดยใช้เชื้อยีสต์ S. fibuligera ร่วมกับเชื้อยีสต์ S. cerevisiae พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้ง 20 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอทธานอลได้สูงสุด 13.7 กรัมต่อลิตร หรือประมาณ 88 เปอร์เซ็นต์ โดยมี pH ที่เหมาะสม คือ 5.8 ถึง 6.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย