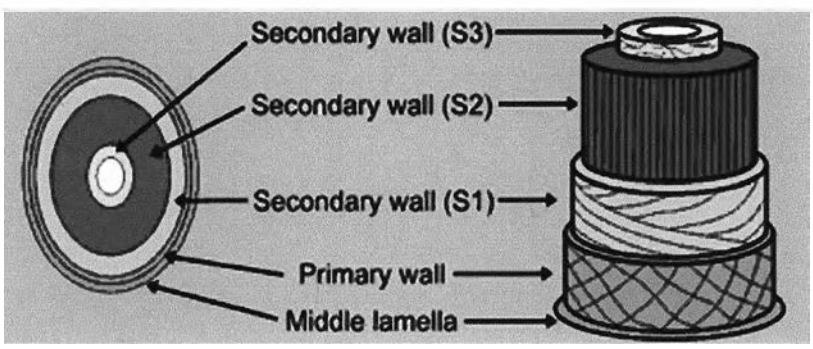
สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีวมวลของพืช (Plant Biomass)

โครงสร้างของชีวมวลพืชประกอบด้วยเซลล์หลายกลุ่มที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน อาจเป็นเซลล์ที่มีชีวิตอยู่หรือเซลล์ที่ตายแล้ว โดยแต่ละเซลล์จะมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นของผนังเซลล์ 2 ชั้น ได้แก่ ผนังเซลล์ปฐมภูมิ (Primary cell wall) และผนังเซลล์ทุติยภูมิ (Secondary cell wall) ซึ่งผนังเซลล์ปฐมภูมิจะประกอบไปด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และอาจจะพบลิกนินได้บ้างในผนังเซลล์ชั้นนี้ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะเป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่และอยู่ในระยะเจริญ โดยการแบ่งตัวจะพบในผนังเซลล์ชั้นนี้ ซึ่งจะทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ด้วยแสง หายใจ และส่งผ่านสารอาหารต่างๆ เป็นต้น ผนังเซลล์ทุติยภูมิจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อเซลล์หยุดเจริญแล้ว ซึ่งจะประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และจะพบลิกนินมากในผนังเซลล์ชั้นนี้ โดยผนังเซลล์ทุติยภูมิจะทำหน้าที่ในการให้ความแข็งแรงหรือลำเลียงน้ำให้กับไม้ โดยผนังเซลล์ทุติยภูมิจะแบ่งออกเป็น 3 ชั้น โดยแต่ละชั้นนั้นจะมีองค์ประกอบของชีวมวลพืชที่แตกต่างกัน โดยจะแบ่งออกเป็นเซลล์ทุติยภูมิชั้นที่หนึ่ง (Secondary wall, S1) โดย S1 ทำหน้าที่เป็นผนังเซลล์ในชั้นนอกสุดของผนังเซลล์ทุติยภูมิ ถัดมาเป็นชั้นเซลล์ชั้นทุติยภูมิชั้นที่สอง (Secondary wall, S2) โดยชั้น S2 มีความหนามากที่สุดและมีการจัดเรียงตัวของคาร์โบไฮเดรตและลิกนินอย่างหนาแน่น ถัดจากชั้นเซลล์ทุติยภูมิชั้นที่สาม (Secondary wall, S3) โดยชั้น S3 จะเป็นส่วนที่ลำเลียงน้ำ สารอาหาร หรือสะสมอาหาร (Eriksson et al., 1990) แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของไม้เนื้ออ่อนและเนื้อแข็ง (Selvendran and Oneill, 1985)

โดยทั่วไปผนังเซลล์ของพืชประกอบไปด้วยชีวมวลพืชประเภท เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน รวมกันประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ของชีวมวลพืชทั้งหมดจับตัวกันแน่นด้วยโครงสร้างที่ซับซ้อนและแข็งแรง โดยมีลิกนินทำหน้าที่เป็นกาวเชื่อมต่อช่วยให้เนื้อไม้คงรูปและป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์และยังทำหน้าที่ในการเป็นเยื่อเลือกผ่านในเนื้อไม้อีกด้วย

เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลส เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) โมเลกุลใหญ่ประกอบด้วย โมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสที่จัดเรียงตัวเป็นเส้นยาวตรงที่เชื่อมกันแบบไม่เป็นกิ่งก้านสาขา เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า 1-4 ไกลโคซิดิค (β-1,4 glycosidic linkage) โดยทั่วไปสายของเซลลูโลสจะประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 8,000-12,000 หน่วย (Saha and Bothast, 1997) และในพืชชั้นสูงอาจมีมากถึง 14,000 หน่วย ในธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสอยู่เป็นสายเดี่ยว แต่อยู่เป็นแบบผลึกที่เรียงตัวกันเป็นระเบียบและจับตัวกันเป็นกลุ่มแน่นหนาและไม่ละลายน้ำ ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงกับผนังเซลล์ของพืช

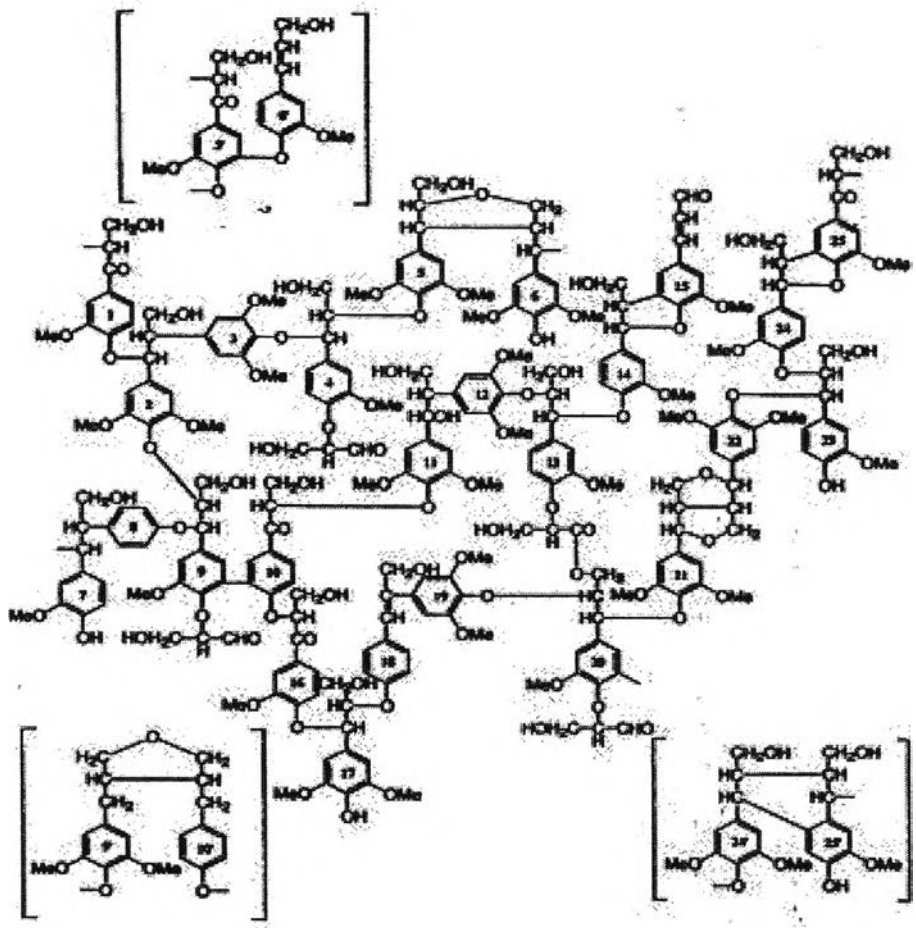
เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลส เป็นพอลิแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งซึ่งมีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลสแต่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิดเช่น แมนโนส ไซโลส กลูโคส กาแลกโตส อะราบิโนส รวมทั้งกรดกลูคูโรนิก และกาแลกทูโรนิก เฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างที่เป็นกิ่งก้านสาขาจัดเรียงตัวแบบไม่เป็นระเบียบ ส่วนที่เป็นสายตรงของเฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่จะเป็นหน่วยของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันตรงตำแหน่ง บีต้า 1-4 (Bungay, 1981) ซึ่งเฮมิเซลลูโลสพบในเนื้อเยื่อของพืชโดยรวมอยู่กับสารอื่นๆ เช่น ลิกนิน และเซลลูโลส เป็นต้น เฮมิเซลลูโลสเป็นโครงสร้างของผนังเซลล์พืชทำหน้าที่ในการเสริมสร้างผนังเซลล์พืชให้หนาและแข็งแรงขึ้นเมื่อพืชเจริญเติบโต เฮมิเซลลูโลสจำแนกได้ 2 ประเภท คือ เฮมิเซลลูโลสจากไม้เนื้ออ่อน (softwood hemicellulose) พบมากในพืชตระกูลสน ตัวอย่างเช่น สนเมืองหนาวชนิดต่างๆ ในไม้เนื้ออ่อนมีเฮมิเซลลูโลสประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบของเฮมิเซลลูโลสจากไม้เนื้ออ่อนจะเป็นน้ำตาลแมนโนสเป็นหลัก ส่วนเฮมิเซลลูโลสจากไม้เนื้อแข็ง (hardwood hemicellulose) จะพบมากในพืชแองจิโอสเปิร์ม (angiosperms) เช่น ไม้ดอกชนิดต่างๆ ในไม้เนื้อแข็งจะมีเฮมิเซลลูโลสประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบของเฮมิเซลลูโลสจากไม้เนื้ออ่อนจะเป็นน้ำตาลไซโลสเป็นหลัก

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินเป็นสารประกอบฟีนอล โมเลกุลของลิกนินจะแทรกและเชื่อมอยู่ระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ลิกนินช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์พืช (Reid, 1995) ซึ่งลิกนินจะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเนื้อไม้ ทำหน้าที่เสมือนตัวเชื่อมประสานเส้นใยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสทำให้เกิดโครงสร้างที่แข็งแรงของเนื้อไม้และปกป้องไม่ให้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสถูกทำลายจากจุลินทรีย์ (Jang et al., 2001) โดยทั่วไปลิกนินในเนื้อไม้และเนื้อเยื่อลำเลียงของพืชจะมีอยู่ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ (Kirk, 1987) ลิกนินมีโมเลกุลขนาดใหญ่ตั้งแต่ 8,000-11,000 กิโลดาลตัน (Lara et at., 2003) ลักษณะโครงสร้างของลิกนิน ดังแสดงในภาพที่ 2 ลิกนินไม่สามารถละลายน้ำได้และไม่มีคุณสมบัติในการยืดหยุ่น ดังนั้นจึงทำให้พืชที่มีลิกนินมากมีความแข็งแรงทนทานซึ่งไม้แต่ละชนิดจะมีอัตราส่วนระหว่างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินไม่เท่ากัน และนอกจากนี้ยังพบว่าพืชแต่ละชนิดหรือแม้แต่ชนิดเดียวกัน แต่อายุและการเจริญในสภาพที่แตกต่างกันก็มีผลทำให้มีปริมาณลิกนินแตกต่างกันด้วย โดยเมื่อไม้มีอายุมากขึ้นปริมาณลิกนินก็จะเพิ่มขึ้นด้วย



ภาพที่ 2 โครงสร้างของลิกนินในเนื้อไม้ (Glazer, A.W., and Nikaido, H., 1995)

ประเภทของลิกนิน

ประเภทของลิกนินสามารถแบ่งได้ตามชนิดที่พบในพืชที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นจะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (Eugenia, Sanchez and Hernandez, 2000) คือ

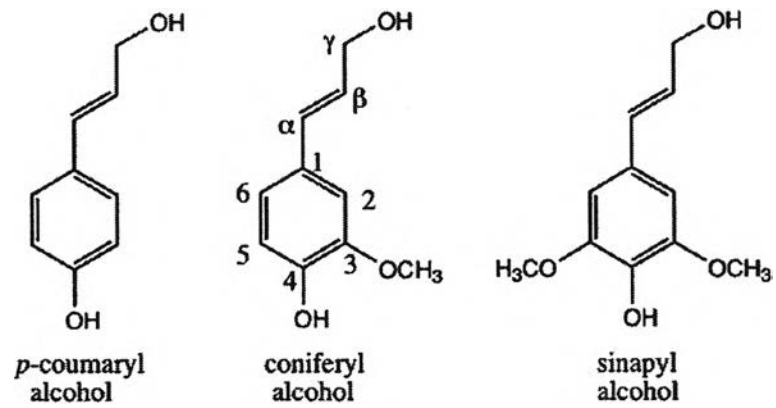
1. ลิกนินจากไม้เนื้ออ่อน (Soft wood lignin) ได้แก่ ลิกนินที่มาจากไม้ที่มีลักษณะใบแคบ ซึ่งได้แก่ พืชตระกูลสน เช่น สนสองใบ สนสามใบ เป็นต้น

2. ลิกนินจากไม้เนื้อแข็ง (Hard wood lignin) ได้แก่ ลิกนินจากไม้ใบกว้าง ได้แก่ ไม้เบญจพรรณต่างๆ เช่น ยูคาลิปตัส เป็นต้น

3. ลิกนินจากหญ้าหรือพืชล้มลุก (Grass lignin) ได้แก่ ลิกนินจากพืชตระกูลหญ้าที่ไม่มีเนื้อไม้ เช่น ฝ้าย ปอ ฟางข้าว กก ชานอ้อย เป็นต้น

กระบวนการสังเคราะห์ลิกนิน

กระบวนการสังเคราะห์ลิกนินในธรรมชาติ เกิดจากสารตั้งต้น (precursors) 3 ชนิด ได้แก่ พารา-คูมาริล แอลกอฮอล์ (*p*-coumaryl alcohol) โคนิเฟอริล แอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol) และ ซินนาปิล แอลกอฮอล์ (sinapyl alcohol) (Kirk, 1999) โดยสารตั้งต้นทั้ง 3 ชนิด ในกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินนั้นจะมีความแตกต่างกันของจำนวนหมู่เมทอกซี (methoxy) บนวงแหวนอะโรมาติกที่แตกต่างกัน (Reid, 1995) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างของสารตั้งต้น phenyl propanoid ทั้ง 3 ชนิดของกระบวนการสังเคราะห์ลิกนิน (Wong, 2009)

นอกจากนั้นแล้วลิกนินยังเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำจึงทำให้กระบวนการย่อยสลายลิกนินเกิดขึ้นได้ช้าจึงมีการคิดค้นกระบวนการย่อยสลายลิกนินเพื่อให้ได้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสออกมาสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ซึ่งกระบวนการย่อยสลายลิกนินนั้นอาจทำได้หลายวิธี เช่น การให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงหรือการใช้สารเคมีประเภทกรดหรือด่าง แต่กระบวนการดังกล่าวจะสิ้นเปลืองพลังงานและสารเคมีเป็นจำนวนมากในการย่อยสลายลิกนินออก ดังนั้นจึงได้มีการนำวิธีการย่อยสลายลิกนินด้วยวิธีการทางชีวภาพมาศึกษา ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้นั้นส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่อยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes และบางส่วนจะเป็นเชื้อราที่อยู่ในกลุ่ม Ascomycetes โดยเชื้อราที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ดี เรียกว่าราฟอกขาว (White rot fungi)

2.2 ราฟอกขาว หรือ White Rot Fungi

ราฟอกขาวเป็นราที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบทั้งหมดของเซลล์พืชได้ แต่โดยส่วนใหญ่ราในกลุ่มนี้มักจะย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสมากกว่าเซลลูโลส ดังนั้นหลังจากที่เนื้อไม้เกิดการย่อยสลายโดยรากลุ่มนี้แล้วจะคงเหลือเซลลูโลสอยู่ซึ่งจะมองเห็นเป็นสีขาวจึงเป็นที่มาของชื่อราฟอกขาว ราฟอกขาวเหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินได้ เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเดส (Oxidoreductases) ที่มีชื่อว่า ลิกนิเนส (lignineses) โดยส่วนใหญ่ราฟอกขาวจะเป็นราในกลุ่ม Basidiomycetes แต่บางชนิดอาจจะพบในกลุ่ม Ascomycetes ราฟอกขาวพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเฉพาะบนผิวของเปลือกไม้ ท่อนไม้ หรือเศษไม้ ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญของลิกนิน ตัวอย่างราฟอกขาวได้แก่ *Bjerkandera adusta Coriolus versicolor Ganoderma lucidum Phanerochaete chrysosporium Phlebia radiate Pleurotus ostreatus Pycnoporus sanguineus Schizophyllum commune* และ *Xylaria* sp. เป็นต้น (Herpoel et al., 2000)

ราฟอกขาวมีกลไกในการย่อยสลายลิกนินโดยการสร้างเอนไซม์ลิกนิเนส (ligninase) ลิกนินเนสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนิน เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของลิกนินเป็นแบบไม่สมมาตร และมีมอนอเมอร์ภายในโมเลกุลหลายชนิด ดังนั้นเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินจึงมีหลายชนิด ลิกนินเนสประกอบไปด้วยเอนไซม์หลัก 3 ชนิด คือ ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase, E.C.1.11.1.14) แมงกานีส เปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase, E.C.1.11.1.7) และแลคเคส (laccase, E.C.1.10.3.2) การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิกนินเนสจะเกิดขึ้นโดยการสร้างโมเลกุลอนุมูลอิสระ (free radical molecule) เพื่อใช้ในการออกซิไดซ์โมเลกุลสารอินทรีย์อื่นๆ หลายชนิด โดยเฉพาะโมเลกุลสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างแบบอะโรมาติกซึ่งเป็นองค์ประกอบของลิกนิน ราฟอกขาวจะผลิตเอนไซม์ลิกนิเนสในช่วงเมแทบอลิซึมแบบทุติยภูมิ (secondary metabolism) และการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มนี้ขึ้นอยู่กับภาวะการเจริญของเชื้อรา ตัวอย่างเช่น สัดส่วนของคาร์บอนกับไนโตรเจนในอาหาร การจำกัดปริมาณแหล่งคาร์บอนหรือไนโตรเจนไอออนของโลหะในอาหาร เช่น เหล็ก (Fe^{2+}) แมงกานีส (Mn^{2+}) และคอปเปอร์ (Cu^{2+}) เป็นต้น หรือปริมาณตัวเหนี่ยวนำ (inducer) เช่น เวอราทิลแอลกอฮอล์ (vertaryl alcohol; 3,4-dimethoxybenzyl alcohol) ABTS (2,2-Azino-di-(3-ethybenzothialozin-6-sulfonic acid) เป็นต้น และนอกจากภาวะที่กระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์แล้ว การย่อยสลายลิกนินนั้นจำเป็นต้องมีภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต แต่การทำงานของเอนไซม์อาจจะไม่ใช่ภาวะเดียวกับการผลิตเอนไซม์

ปัจจุบันมีการศึกษาเชื้อราในกลุ่มราฟอกขาวกันเป็นจำนวนมากและพบว่ามีหลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนิเนส โดยเฉพาะแลคเคสที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินในเนื้อไม้ได้ นอกจากนี้แล้วยังมีเชื้อราฟอกขาวอีกหลายชนิด เช่น *Phanerocheate chrysosporium* ที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kennes and Lema, 1994) และพบว่าราฟอกขาวบางชนิดไม่ได้เพียงแต่ย่อยสลายลิกนินหรือสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนินเท่านั้น แต่ยังพบว่ามีการนำราฟอกขาวไปใช้ประโยชน์ทางด้านอื่น เช่น *G. lucidum* ที่มีสรรพคุณทางยา เป็นต้น และนอกจากนี้ยังมีอีกหลายสายพันธุ์ที่มีความสำคัญในเชิงอุตสาหกรรมอาหาร เช่น *P. ostreatus L. edodes* และ *S. commune* เป็นต้น (Ko et al., 2001)

ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase, E.C. 1.11.1.14)

ลิกนิน เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเปอร์ออกซิเดส (peroxidases) ภายในโมเลกุลของเอนไซม์มีไอออนของเหล็กเป็นองค์ประกอบ เอนไซม์ชนิดนี้มีลักษณะเด่นคือ นอกจากออกซิไดซ์วงแหวนของโมเลกุลอะโรมาติก (aromatic ring) ได้แล้วยังสามารถออกซิไดซ์หมู่เมทอกซิล (methoxyl group) ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชั่นของโมเลกุลอะโรมาติกได้ด้วย เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ดีในภาวะที่เป็นกรดช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่ (pH) 3.0 ในขณะเดียวกันความเสถียรของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงเมื่อเอนไซม์นี้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด (Tein and Kirk, 1988) ในธรรมชาติเนื้อไม้จะมีสภาพเป็นกรดที่มีค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 4.0 ซึ่งยังไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่เชื้อราจะสร้างกรดออกซาลิก (oxalic acid) ออกมาลดค่าความเป็นกรดด่าง เพื่อสนับสนุนให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น (Dutton et al. 1993; Dutton and Evans, 1996) มีการศึกษาถึงการผลิตลิกนิน เปอร์ออกซิเดสจากเชื้อราและพบว่าเชื้อราจะผลิตเอนไซม์นี้ได้ดีในภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนอยู่ในปริมาณจำกัด

เนื่องจากโมเลกุลของลิกนิน เปอร์ออกซิเดสนั้นมีขนาดใหญ่จึงไม่สามารถแทรกเข้าไปในเนื้อไม้เพื่อย่อยสลายลิกนินได้ ดังนั้นกลไกการย่อยสลายลิกนินในเนื้อไม้โดยเอนไซม์นี้จึงเป็นกลไกแบบทางอ้อม (indirect mechanism) โดยเชื้อราจะผลิตเวอราทิลแอลกอฮอล์ (veratyl alcohol; 3,4-dimethoxybenzyl alcohol) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์โมเลกุลเล็กออกมา จากนั้นเอนไซม์จะออกซิไดซ์โมเลกุลเวอราทิลแอลกอฮอล์ให้กลายเป็นโมเลกุลอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกซึ่งจะสามารถแทรกเข้าไปในเนื้อไม้เพื่อออกซิไดซ์ลิกนินต่อไป

แมงกานีส เปอร์ออกซิเดส (Manganese peroxidase, E.C.1.11.1.7)

แมงกานีส เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเปอร์ออกซิเดส ภายในโมเลกุลของเอนไซม์มีเหล็กไอออนเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส การทำงานของเอนไซม์นี้มีกลไกคล้ายกับลิกนิน เปอร์ออกซิเดสแต่มีข้อแตกต่างกันคือ ในปฏิกิริยาจะต้องมีไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ร่วมอยู่ด้วย มีงานวิจัยพบว่าปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตบางชนิดเช่น ไดเมททอกซีฟีนอล (dimethoxyphenol) ไม่ต้องการแมงกานีสไอออนในการเกิดปฏิกิริยา (Archibald, 1990) ราฟอกขาวทุกชนิดจะผลิตแมงกานีส เปอร์ออกซิเดส ในขณะที่บางชนิดไม่พบลิกนิน เปอร์ออกซิเดส การทำงานของลิกนิน เปอร์ออกซิเดสและแมงกานีส เปอร์ออกซิเดส ต้องการไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ (H_2O_2) ร่วมด้วยในปฏิกิริยา

แลคเคส (Laccase, E.C. 1.10.3.2)

แลคเคสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มพอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันของซับสเตรตในสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) หลายชนิด หรืออะโรมาติกเอมีน (aromatic amine) (Duran et al., 2002) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล ให้กลายเป็นอนุมูลอิสระของฟีนอล (phenol radical) แลคเคสเป็นคิวโปรโปรตีน (cuproprotein) ที่มีทองแดง (copper) เป็นองค์ประกอบในเอนไซม์ โดยทั่วไปโมเลกุลของแลคเคสมีคอปเปอร์ไอออนเป็นองค์ประกอบอยู่ 4 อะตอม ตรงบริเวณเร่ง (active site) และแบ่งออกเป็น 3 ชนิด โดยการทำงานของแลคเคสนั้นจะต้องอาศัยตัวช่วย (mediator) ปฏิกิริยาจึงเกิดได้ดี (Camarero et al., 2007) แลคเคสมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงระหว่าง 3.5-7 (Salas et al., 1995)

2.3 เอนไซม์และเซลล์ตรึงรูป (Enzyme and Cell immobilizations)

เอนไซม์ตรึงรูป หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะ หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้อยากขึ้น หรือไม่ละลายเลย มีผลทำให้เอนไซม์ เปลี่ยนจากสถานะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวกลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะที่ทำปฏิกิริยา

เซลล์ตรึงรูป ได้มีการดัดแปลงมาจากการตรึงรูปเอนไซม์โดยเป็นการกำจัดขอบเขตของเซลล์ให้อยู่ในบริเวณที่กำหนด แต่เซลล์ยังคงรักษาสมบัติในการเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ให้มีความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำและใช้อย่างต่อเนื่องได้ โดยเซลล์ที่นำมาทำการตรึงรูปนี้จะเป็นเซลล์ที่อยู่ในช่วงการเจริญ ระยะพัก หรือตายแล้ว (Chibaya and Wingard, 1983) ซึ่งวิธีการตรึงรูปเซลล์จะช่วยลดขั้นตอนในการสกัดเอนไซม์และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้โดยไม่ทำให้เสียความสามารถในการทำปฏิกิริยา

ข้อจำกัดของการใช้เซลล์และเอนไซม์อิสระ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

1. เอนไซม์หรือเซลล์อิสระไม่เสถียร
2. เอนไซม์หรือเซลล์อิสระใช้ได้ครั้งเดียว
3. เอนไซม์อิสระ ถ้าจะให้แอคติวิตีสูงต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้งาน
4. เอนไซม์อิสระในอุตสาหกรรมมีต้นทุนการใช้งานสูง

ประโยชน์ของเอนไซม์และเซลล์ตรึงรูป

1. มีโอกาสเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์และความเสถียรของเอนไซม์ได้ถ้าใช้วิธีการที่เหมาะสม
2. สามารถใช้งานกับระบบของเอนไซม์และเซลล์หลายชนิด
3. สามารถใช้ซ้ำ ใช้ต่อเนื่อง และใช้เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ได้
4. ใช้ภาวะการทำงานที่แตกต่างจากเอนไซม์หรือเซลล์อิสระได้ ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของตัวพยุงและวิธีการตรึงรูป
5. เอนไซม์หรือเซลล์ที่นำมาตรึงรูป ไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถทำงานได้ดี

กระบวนการตรึงรูปเอนไซม์และเซลล์

วิธีการตรึงรูป แบ่งเป็น 3 วิธีใหญ่ (Kennedy and Cabral, 1987)

1. การเชื่อมกับตัวพยุง (Carrier binding) หมายถึง การเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์หรือเซลล์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ และอาจไม่ละลายในตัวทำละลายบางชนิด

1.1 วิธีการดูดซับทางชีวภาพ (physical adsorption method) เป็นวิธีการตรึงโดยใช้ตัวดูดซับกับสารเคมีที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไอออนิก หรือพันธะไฮโดรเจน โดยอาศัยหลักธรรมชาติเคมี (Cheetham,1980)

1.2 การใช้พันธะโควาเลนต์ (Covalent binding) เป็นวิธีการเชื่อมเซลล์หรือเอนไซม์โดยตรงกับสารพาหะ โดยสารที่ใช้เชื่อมต่อกับเซลล์หรือเอนไซม์ได้แก่ กลุ่มอะมิโน กลุ่มคาร์บอกซิล กลุ่มซัลฟีริล กลุ่มไฮดรอกซิล หรือ กลุ่มอิมิดาโซล (Cheetham,1979)

2. การเชื่อมขวาง (Cross-linking) หมายถึงการเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกัน โดยใช้สารพวกไบหรือสารมัลติฟังชันนอลรีเอเจนต์ (bi or multifunctional reagent) เช่น กลูทาอัลดีไฮด์ และโทลูอีน (Chibata et al., 1978)

3. การกักขัง (Entrapment)

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะต่างจากการตรึงด้วยวิธีการทางเคมีโดยที่ไม่ได้มีการเชื่อมติดหรือไม่มีพันธะเกิดขึ้นระหว่างเซลล์หรือเอนไซม์กับพาหะ สามารถใช้ได้กับการตรึงเซลล์และเอนไซม์ทุกชนิด แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

3.1 การตรึงแบบไมโครแคปซูล (Micro capsulation type) หมายถึงการกักขังเซลล์หรือเอนไซม์ไว้ในเยื่อกึ่งเลือกผ่าน ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของของเซลล์และเอนไซม์ได้ แต่ยอมให้สับเสตรต และผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ (Cheetham, 1980)

3.2 การตรึงแบบแลตทิช (Lattic type) หมายถึงการตรึงเซลล์โดยการกักขังไว้ในเจลของสารพอลิเมอร์ ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมและประสบความสำเร็จมากที่สุด (Cheetham, 1980)

2.4 วิธีการตรึงเอนไซม์และเซลล์ในแคลเซียมอัลจิเนต (Enzyme and Cells Entrapment in Calcium Alginate)

การกักขังเอนไซม์หรือเซลล์โดยใช้อัลจิเนตเป็นวิธีการที่เรียบง่าย สารอัลจิเนตที่นิยมใช้กันมากสำหรับการตรึงเอนไซม์และการตรึงเซลล์คือ โซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate) ซึ่งเป็นพอลิแอนไอออน (polyanion) ทั้งนี้เนื่องจากสามารถทำการทดลองได้ที่อุณหภูมิห้องและสามารถละลายน้ำได้ ไม่มีพิษ มีความเสถียรต่อสารเคมีสูง ทนต่อความเป็นกรดด่าง และเป็นที่ยอมรับในกานนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยามายาวนาน (Fraser and Bickerstaff, 1997)

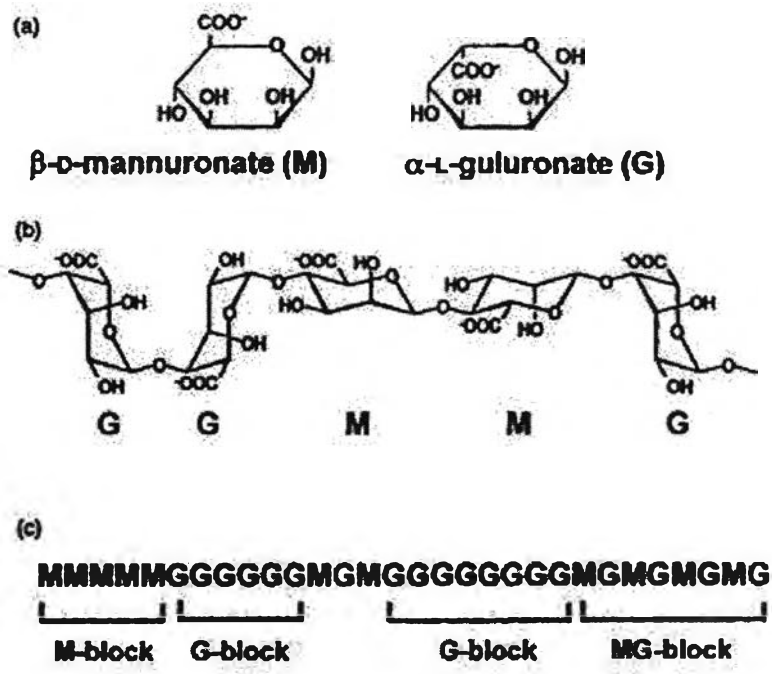
อัลจิเนต (Alginate)

อัลจิเนตหรืออัลจินเป็นสารที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (Phaeophyceae) ในการผลิตอัลจิเนตเป็นอุตสาหกรรมสาหร่ายทะเลที่ใช้ ได้แก่ *Macrocystis pyrifera* มีอัลจินประมาณ 14-19 เปอร์เซ็นต์ *Laminaria cloustoni* และ *Laminaria digitata* มีอัลจินประมาณ 15-40

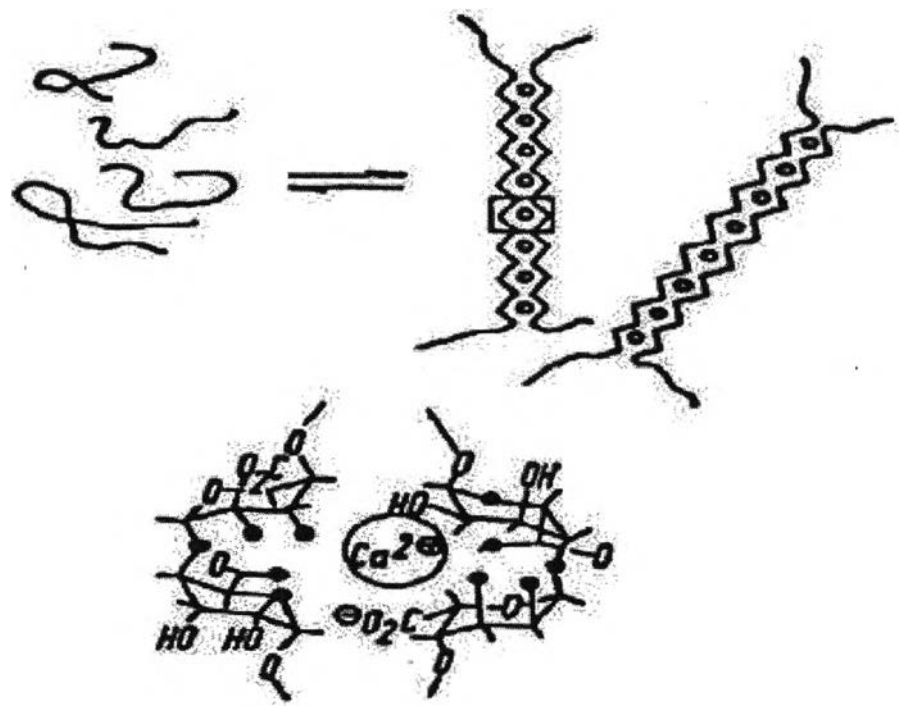
เปอร์เซ็นต์ ปริมาณที่พบจะขึ้นกับชนิดของสาหร่าย ฤดูกาล และแหล่งที่สาหร่ายเจริญเติบโต สาหร่ายเหล่านี้พบได้ทั่วๆ ไปในโลก ประเทศที่ผลิตอัลจิเนตมาก คือ อเมริกา อังกฤษ ฝรั่งเศส สเปน นอร์เวย์ แคนนาดา และญี่ปุ่น

อัลจิเนตมีโครงสร้างทางเคมีเป็นพอลิเมอร์ร่วมของกรดบีต้า-ดี-แมนนูโรนิค(β-D-manuronic acid, M) และ กรดแอล-กลูโคโรนิค (L-guluronic acid, G) ในโมเลกุลต่อกันแบบพันธะ 1-4 ประกอบด้วยบริเวณของฮอมอพอลิเมอร์ริค (homopolymeric) ของ G และ M ที่เรียกว่า G- และ M-blocks ตามลำดับและยังมีบางส่วนของโมเลกุลเป็น MG-blocks ดังภาพที่ 4 สัดส่วนของโคพอลิเมอร์ (copolymer) และโครงสร้างเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดสมบัติของอัลจิเนต เช่น ถ้าโพลีเมอร์มี G ในปริมาณที่สูงจะมีสมบัติเป็นเจลที่แข็งที่ความเข้มข้นของโลหะประจุบวกเฉพาะ (polyvalent metal cation) แต่ถ้าพอลิเมอร์มี M ปริมาณสูงจะมีแนวโน้มที่จะเกิดเจลที่อ่อนนุ่ม และมีภาวะในการเกิดเจลที่กว้างกว่าอัลจิเนตที่ผลิตจำหน่ายเป็นการค้ามีหลายอนุพันธ์จึงมีสมบัติการละลายในน้ำที่แตกต่างกัน เช่น อนุพันธ์ ของเกลือ Ca^{2+} K^{+} Na^{+} NH^{4+} และยังผลิตในรูปของอัลจิเนต โพรพิลีน ไกลคอล (propyleneglycol alginate) ซึ่งได้จากปฏิกิริยาของกรดอัลจีนิค (alginic) กับ โพรพิลีนออกไซด์ (propylene oxide) ภายใต้ความดันอนุพันธ์เหล่านี้จะละลายได้ทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น ความหนืดของสารละลายอัลจิเนตที่ได้ขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ความเข้มข้น น้ำหนักโมเลกุลและการมีโลหะประจุบวก

อัลจิเนตไม่ทุกชนิดมีสมบัติเป็นเจลและจะเกิดเจลได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ Ca^{2+} โครงสร้างของเจลมีลักษณะคล้ายกล่องไข่ (egg box) โดยมี Ca^{2+} เกาะอยู่กับสายพอลิเมอร์ ดังภาพที่ 5 สมบัติที่ดีของอัลจิเนตคือ ทำให้เกิดเป็นเจลที่ไม่สามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นอัลจิเนตในน้ำเย็นเมื่อมี Ca^{2+} รวมอยู่ด้วย ซึ่งสมบัติในการเกิดเจลที่อุณหภูมิต่ำนี้ทำให้อัลจิเนต แตกต่างจากไฮโดรคอลลอยด์ที่ได้จากสาหร่ายสีแดง อัลจิเนตถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดตั้งแต่ปี ค.ศ. 1920 โดยเติมในอาหารกระป๋องบางชนิด ใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด สารเพิ่มความคงตัว ทำให้อีมัลชันคงตัว สารทำให้เกิดเจล



ภาพที่ 4 โครงสร้างของอัลจิเนตชนิดต่างๆ (Phillips and Williams, 2000)



ภาพที่ 5 กลไกการเกิดเจลของแคลเซียมอัลจิเนต (Egg-box model) (Phillips and Williams, 2000)

การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ทำได้โดยการผสมเอนไซม์หรือเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.05-0.2 โมลาร์ จะเกิดเป็นเจลของแคลเซียมอัลจิเนตขึ้นทันที หลังจากนั้นทำการแช่เม็ดเจลที่ได้ไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เม็ดเจลเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ สมบัติของเจลที่ได้จะขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของอัลจิเนตที่ใช้ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดความเข้มข้น ของไอออนโลหะและปริมาณเซลล์ที่ใช้

2.5 **หลักการและกระบวนการบำบัดน้ำเสีย** (เกรียงศักดิ์ อุดมสินโรจน์, 2539)

น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมมีลักษณะที่แตกต่างกันขึ้นกับกระบวนการผลิต อาจมีความเข้มข้นหรือเจือจาง และอาจประกอบด้วยสารอินทรีย์และอนินทรีย์ จึงทำให้วิธีการบำบัดน้ำเสียที่เหมาะสมขึ้นกับลักษณะสมบัติของน้ำเสียนั้น การจัดการน้ำเสียอาจแบ่งเป็น 2 วิธีการคือ การกำจัดน้ำเสียและการบำบัดน้ำเสีย

การกำจัดน้ำเสียหรือ Disposal คือ การขจัดน้ำเสียให้หมดไปดังนั้นน้ำที่ปล่อยทิ้งออกมาจะไม่มีน้ำเสียปนออกมาอีก เช่น การตากแห้ง การปล่อยทิ้งทะเล การปล่อยลงดินโดยตรง ซึ่งแต่ละวิธีก็จะเหมาะสมกับอุตสาหกรรมแต่ละชนิด เช่นโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น

การบำบัดน้ำเสียหรือ Wastewater treatment คือ การทำให้น้ำเสียมีคุณภาพดีขึ้นและดีเพียงพอที่จะปล่อยทิ้งลงแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำในแหล่งรับน้ำธรรมชาติ การบำบัดน้ำเสียเป็นการลดสารพิษในน้ำเสียให้ต่ำลง โดยผ่านกระบวนการบำบัดต่างๆ แบ่งกระบวนการบำบัดน้ำเสียได้ 3 กลุ่มคือ

- กระบวนการบำบัดทางเคมี (Chemical treatment)
- กระบวนการบำบัดทางกายภาพ (Physical treatment)
- กระบวนการบำบัดทางชีวภาพ (Biological treatment)

น้ำเสียจากโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษ

น้ำเสียจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษมักก่อให้เกิดปัญหาในด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากสีและความเป็นพิษของน้ำเสีย เพราะในระบบบำบัดน้ำเสียไม่สามารถกำจัดหรือแยกสีออกจากน้ำเสียได้ทั้งหมดในกระบวนการผลิตเยื่อและกระดาษ โดยเฉพาะในกระบวนการผลิตเยื่อนั้น

โครงสร้างทางเคมีของลิกนินจะถูกทำลายและจะเกิดเป็นสารอนุพันธ์ต่างๆ ของลิกนิน ซึ่งน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตเยื่อจะมีสารเหล่านี้เจือปนอยู่ ทำให้น้ำทิ้งมีสีน้ำตาลเข้มและมีความเป็นพิษสูง แหล่งของน้ำเสียที่มีลิกนินเจือปนอยู่ในโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษดังนี้

1. น้ำทิ้งจากการย่อยเยื่อและการล้างเยื่อ (Digester and washer)

น้ำทิ้งนี้จะเรียกอีกอย่างว่า black liquor เพราะเป็นน้ำที่มีสีดำเข้ม หรือมีสีน้ำตาลเข้มจากการเกิด amophoric group ของลิกนิน

2. น้ำ white water จากการแยกเยื่อ ทำความสะอาดเยื่อและการล้างเยื่อให้ข้น (screening, cleaning and thickening)

น้ำจากแหล่งนี้มีปริมาณมาก ในกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษแบบคราฟท์ น้ำทิ้งส่วนนี้จะเป็นส่วนที่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ สารลิกนินจากกระบวนการนี้จะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการล้างเยื่อ

3. น้ำทิ้งจากเครื่องล้างเยื่อในกระบวนการฟอกเยื่อ (Bleach plant washer)

น้ำทิ้งจากการฟอกเยื่อจะมีปริมาณสารอินทรีย์ประเภท Chlorinated aromatic อยู่มาก ซึ่งขั้นตอนที่ก่อให้เกิดอินทรีย์สารเหล่านี้มาจากขั้นตอน chlorination และ Alkaline extraction น้ำทิ้งจากขั้นตอนทั้งสองนี้จะมีค่า บีโอดี ซีโอดี และ ค่าความเข้มของสีสูงมาก

ผลเสียของสีในแหล่งน้ำธรรมชาติ (เกรียงศักดิ์ อุดมสินโรจน์, 2539)

1. กั้นหรือขวางแสงแดดไม่ให้ส่องลงไปในน้ำ ทำให้การสังเคราะห์แสงลดลง
2. ทำให้แหล่งน้ำนั้นไม่น่ามอง เพราะสีเป็นสิ่งที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า
3. สีส่วนใหญ่เกิดจากสารอินทรีย์ประเภท Dissolved และ Colloidal ซึ่งจะใช้ออกซิเจนในน้ำ

สีของน้ำมี 2 ประเภท คือ (เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, 2539)

1. สีที่แท้จริง (True color) เกิดจากสารประกอบของสารแขวนลอยที่มีในน้ำ

2. สีที่ปรากฏ (Apparent color) เกิดจากการสะท้อนของสิ่งสกปรกที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ การที่จะทราบสีที่แท้จริงของน้ำ อาจทำได้โดยการเก็บตัวอย่างน้ำกรองสิ่งที่แขวนลอยออก โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสารแขวนลอยออก แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปวัดสีที่แท้จริงแล้วนำมาเปรียบเทียบกับสีมาตรฐาน

2.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การผลิตแลคเคสและการประยุกต์ใช้ในเชิงเทคโนโลยีชีวภาพ

แลคเคสถูกค้นพบครั้งแรกในน้ำของต้นแลคเกอร์ และถูกค้นพบเรื่อยๆ ใน เชื้อรา แมลง และแบคทีเรีย แต่การผลิตแลคเคสจากเชื้อรานั้นได้รับความสนใจมากกว่าการผลิตแลคเคสจากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ (Liu et al., 2009) และการผลิตแลคเคสจากเชื้อรานั้นพบว่าการผลิตแลคเคสที่ได้รับความนิยมนั้น คือการผลิตจากราฟอกขาว เนื่องจากเชื้อราในกลุ่มนี้มีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรากลุ่มอื่น โดยเฉพาะการนำเอนไซม์และเชื้อราในกลุ่มราฟอกขาวไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การบำบัดน้ำเสียในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ การกำจัดสีสังเคราะห์จากโรงงานสิ่งทอ การกำจัดสารพิษในสิ่งแวดล้อม โดยอุตสาหกรรมที่ได้รับความนิยมมากได้แก่ อุตสาหกรรมการลดสีน้ำเสียจากโรงงานเยื่อกระดาษ

Fahy et al. (1997) ศึกษาการลดลงของสี Molasses spent wash (MSW) โดยใช้เชื้อรา *P. chrysosporium* ในระดับขวดเขย่าโดยวิธีการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอัตราส่วนเซลล์ 0.45 กรัม (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ต่อลิตรของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถลดสีของ MSW ได้ 85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราตรึงรูปใน MSW ที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน พบว่าการใช้แคลเซียมอัลจิเนตสามารถลดสีของ MSW ได้เร็วกว่าการใช้เซลล์อิสระ

Nagarathnamma and Bajpai. (1999) ได้ทำการคัดแยกเชื้อราจำนวน 110 สายพันธุ์ โดยทำการเลี้ยงในอาหารสูตร Potato Dextros Broth (PDB) โดยทำการศึกษาชนิดและความความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนและไนโตรเจน ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 3-7 และอุณหภูมิในช่วง 25-50 องศาเซลเซียส พบว่าภาวะที่เหมาะสมคือ กลูโคส 1 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 1.5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 2 กรัม โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.15 กรัม ในน้ำทิ้งจากขั้นตอนการผลิตเยื่อกระดาษ ปริมาณ 1 ลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 3-4 โดยมีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใส่น้ำตาลกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรามีความสามารถในการลดสีได้ 92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ใส่น้ำตาลกลูโคสลดสีได้ 78 เปอร์เซ็นต์

Hongman et al. (2003) ทำการทดลองเพิ่มปริมาณแลคเคสจากเชื้อ *P. ostreatus* ในการลดสีแอนทราควินโนน (anthraquinone dye) โดยทำการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน สารประกอบอะโรมาติก และตัวชักนำอื่นๆ พบว่า เมื่อใช้เซลโลไบโอสและเปปโตนทำให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงขึ้นและเมื่อใช้ ABTS เป็นตัวชักนำทำให้ค่าการลดลงของสีแอนทราควินโนนลดลง 90 เปอร์เซ็นต์

Chairattanamanokorn et al. (2004) ได้ศึกษาการลดสีน้ำเสียจากกระบวนการกลั่นแอลกอฮอล์โดยราฟอกขาวทนร้อน โดยทำการคัดแยกเชื้อราสายพันธุ์ที่ทนร้อนได้ เพื่อใช้ในการลดสีน้ำเสียจากกระบวนการกลั่นแอลกอฮอล์ โดยทำการศึกษาเชื้อรา 38 สายพันธุ์ ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 และ 43 องศาเซลเซียส บนอาหารที่มีส่วนผสมของ ABTS และ แมงกานีสคลอไรด์ พบว่าที่ 43 องศาเซลเซียส *P. coccineus* 4 สายพันธุ์ สามารถลดสีน้ำเสียได้ทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว และเมื่อนำเส้นใยเชื้อราไปทำการตรึงรูปโดยใช้ polyurethane พบว่า สามารถลดโครงสร้างสามมิติของฟีนอลได้มากกว่าการใช้เส้นใยอิสระภายใต้ภาวะการเลี้ยงแบบที่มีการให้อากาศที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส และการใช้เส้นใยตรึงรูปสามารถลดสีน้ำเสียได้ 50 เปอร์เซ็นต์

Maximo and Ferreira. (2004) ทำการศึกษาการลดลงของสีในอุตสาหกรรมสิ่งทอ โดยเชื้อรา *Irpex lacteus* และการปรับเปลี่ยนเอนไซม์ลิกนิน นำเชื้อรา *I. lacteus* มาลดสีย้อมสิ่งทอ 2 ชนิด คือ Reactive Blue 19 (RBBR) และ Reactive Black 5 พบว่าเมื่อทำการเลี้ยง *I. lacteus* 2 วัน สี RBBR เหลืออยู่น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ Reactive Black 5 ลดสีลงได้ช้ากว่าโดยใช้เวลา 10 วัน ถึงจะลดสีได้ 90 เปอร์เซ็นต์ และในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถตรวจพบลิกนิน เปอร์ออกซิเดสในอาหารเลี้ยง ส่วนแมงกานีส เปอร์ออกซิเดสและแลคเคสสามารถตรวจพบในปริมาณที่น้อยและตรวจพบหลังจากที่มีการลดลงของสีย้อมสิ่งทอแล้ว

Silva et al. (2005) ทำการศึกษาการผลิตลิกนินโนไลติกเอนไซม์ จากเชื้อรา *Ganodeerma* spp. โดยทำการศึกษาเอนไซม์ 3 ชนิดคือ ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส แมงกานีส เปอร์ออกซิเดส และแลคเคส โดยทำการศึกษาจากเชื้อรา 4 ชนิด ในการย่อยสีสังเคราะห์ Remazol Brilliant Blue R (RBBR) พบว่ามี 2 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสีสังเคราะห์ RBBR ได้ดีคือ GASI3.4 และ CBB209 เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารสูตร production โดยมีการเติมและไม่มีการเติมรำข้าว (4.5 กรัม) และ โพรพานิล (2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยทำการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างและวัดค่ากิจกรรมของลิกนิน เปอร์ออกซิเดส แมงกานีส

เปอร์ออกซิเดส และแลคเคส พบว่ามี *Ganoderma* sp. 2 สายพันธุ์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับภาวะการเลี้ยงเชื้อรา พบว่าเมื่อใช้รำข้าวจะให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสเพิ่มขึ้น และเมื่อมีการใส่ยาปราบวัชพืชลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อราจะไปยับยั้งการสร้างลิกนิน เปอร์ออกซิเดสและแมงกานีส เปอร์ออกซิเดส

Wu et al. (2005) ทำการศึกษาการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตเยื่อกระดาษโดยราฟอกขาวและทำการเลี้ยงบนพลาสติกโดยมีการเติมน้ำจากกระบวนการฟอกเยื่อ พบว่า เชื้อรา 5 สายพันธุ์ ที่สามารถเจริญเติบโตได้ คือ *P. chrysosporium P. ostreatus L. edodes T. versicolor* และ S22 และพบว่า *P. chrysosporium P. ostreatus* และ S22 มีความสามารถในการ ย่อยสลายลิกนินได้ที่ภาวะการทำงานที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 9-11 โดยเติมกลูโคส 1 กรัมต่อลิตร และ แอมโมเนียมทาร์เทรต 0.2 กรัมต่อลิตร พบว่าให้ผลการย่อยสลายลิกนินในน้ำเสียได้ดี

Madhavi and Lee. (2005) ทำการแยกราฟอกขาวจากเปลือกไม้และนำมาทำการคัดแยกและจัดจำแนกสายพันธุ์ พบว่าเป็น สายพันธุ์ *Ganoderma* sp. หลังจากนั้นนำมาศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคส จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารสูตรที่มี กลูโคสให้ค่ากิจกรรมของแลคเคส 124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารที่มีการปรับปรุงโดยใช้แป้ง 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสเพิ่มขึ้นเป็น 288 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้คอปเปอร์ซัลเฟต 1 มิลลิโมลาร์ ทำให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสเพิ่มขึ้นเป็น 410 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และพบว่าเมื่อมีตัวชักนำ (inducer) เช่น 2,5-ไซลีดีน (2,5-xylidine) กรดเฟอรูลิค (ferulic acid) พารา-อะนิซิดีน (ρ-anisidine) เป็นต้น พบว่าเมื่อใช้ 2,5-ไซลีดีน 0.8 มิลลิโมลาร์ ทำให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสเพิ่มขึ้น 692 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Park et al. (2006) ศึกษาการลดลงของสี acid black 52 โดยใช้เชื้อรา *F. trogii* และศึกษาการนำเชื้อราตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ด้วย โดยเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ 3 ชนิด คือ แลคเคส ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส (LiP) และ แมงกานีส เปอร์ออกซิเดส (MnP) และมีรายงานว่าเอนไซม์กลุ่มนี้สามารถลดสี acid black 52 ภายใต้ภาวะที่มีการตรึงเชื้อราและการใช้เส้นใยอิสระ และเมื่อตรึงเชื้อรา *F. trogii* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อราจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของอัลจิเนตเพิ่มขึ้นและแม้ว่าจะใช้เชื้อราน้อยลงและความเข้มข้นของอัลจิเนตที่เหมาะสมคือ 4 เปอร์เซ็นต์ การลดลงของสีเมื่อใช้เซลล์ตรึงรูปจะมีค่าการลดลงของสีมากกว่าเมื่อ

เทียบกับการใช้เซลล์อิสระและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้และสามารถเก็บรักษาได้นานกว่าการใช้เซลล์อิสระ

Marie et al. (2007) ศึกษาความเป็นไปได้ของแลคเคสจากเชื้อรา *P. sanguineus* MUCL 41582 พบว่ามีการสร้าง ไอโซไซม์ LAC-1 ที่เข้มข้น ในการบำบัดน้ำเสียและกลไกการย่อยสลายของสี anthraquinonic acid พบว่าความสามารถของราฟอกขาวในการลดสีและลดความเป็นพิษของสีน้ำเสียที่ไหลออกมาเกิดจากแลคเคสที่ผลิตมาจากเชื้อรา *P. sanguineus* สายพันธุ์ MUCL 41582 จากการสำรวจพบว่าโรงงานสิ่งทอจะปล่อยน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของโซเดียมซัลไฟต์และโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณที่สูง และจากการศึกษาโครงสร้างของสี anthraquinonic Abu62 พบว่าเป็นซับสเตรตที่ดีสำหรับแลคเคส LAC-1 นอกจากนี้แล้วนั้นพฤติกรรมของ LAC-1 นั้นยังมีการแสดงออกที่แตกต่างออกไปเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับแลคเคสชนิดอื่นที่มีการออกซิไดซ์ ABTS

Veronica et al. (2008) ได้ศึกษากระบวนการฟอกเยื่อกระดาษแบบคราฟท์ด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้แลคเคสจากเชื้อรา *Trametes trogii* โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงสมบัติของเอนไซม์ในการฟอกเยื่อกระดาษคราฟท์ จากไม้สนด้วยกระบวนการทางชีวภาพ พบว่า *T. trogii* ให้ผลในการฟอกเยื่อกระดาษแบบคราฟท์ได้ดีที่สุด เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน ในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสและแอสพาราจีนเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยมีการเติม 1 มิลลิโมลาร์ คอปเปอร์ซัลเฟต พบว่า *T. trogii* สามารถผลิตแมงกานีส เปอร์ออกซิเดสได้ 0.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ แลคเคส 44 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำแลคเคสไปใช้ในกระบวนการฟอกเยื่อพบว่ามีค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้นหลังจากการฟอกด้วยเอนไซม์

Teerapatsakul et al. (2008) ศึกษาการลดสีน้ำเสียโดยใช้แลคเคสตรึงรูปในคอปเปอร์อัลจิเนต ซึ่งเป็นวิธีการตรึงรูปเอนไซม์แบบใหม่ที่นำมาใช้ในกระบวนการลดสีน้ำเสียด้วยแลคเคสจากเชื้อราฟอกขาว *Ganoderma* sp. KU-Alk4 เอนไซม์จะมีประสิทธิภาพสูงในการลดสีน้ำเสียเมื่อมีการตรึงใน Cu-Al และ Cu-alginate พบว่าสามารถลดสี indigo carmine ได้ 96 เปอร์เซ็นต์ในการทดลองซ้ำต่อเนื่อง ได้ 6 ครั้ง เป็นเวลา 12 วัน

Prasongsuk et al. (2009) ทำการศึกษาการลดสีน้ำเสียจากโรงงานเยื่อกระดาษโดยใช้ราฟอกขาวที่มีสามารถทนร้อนได้ พบว่าเชื้อราทั้ง 12 ตัวอย่าง ที่ทำการคัดแยกจากจังหวัดต่างๆ ใน

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประเทศไทย พบว่ามี 8 ตัวอย่างที่สามารถทนร้อนและสามารถผลิตเอนไซม์ลิกนิโนไลติกได้ โดยใช้เชื้อรา *P. chrysosporium* เป็นตัวเปรียบเทียบ และพบว่าจาก 8 ตัวอย่างมี 3 สายพันธุ์ คือ *Daedaleopsis* sp. *S. commune* PT และ *S. commune* SL ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และได้นำเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทำการทดสอบบนอาหารแข็งที่มีการเติม ABTS เพื่อทำการทดสอบการสร้างแลคเคส และพบว่า *P. chrysosporium* เพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถออกซิไดซ์แมงกานีสได้ โดยทำการทดสอบบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของแมงกานีสคลอไรด์และพบว่า *P. chrysosporium* และ *Daedaleopsis* sp. สามารถลดสีน้ำเสียได้เมื่อทำการทดสอบในอาหารเหลวและอาหารแข็ง สามารถลดสีน้ำเสียได้ 52 และ 86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ