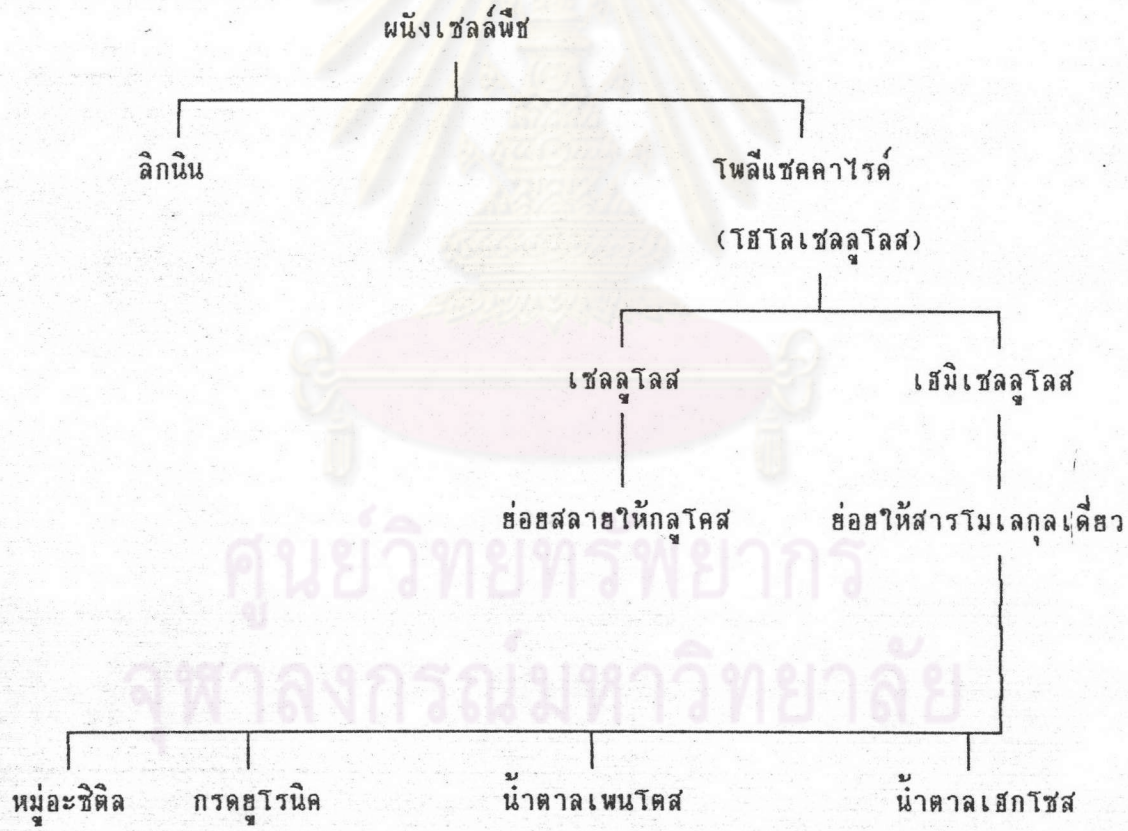
บทที่ 2

วารสารปริทรรศน์

2.1 องค์ประกอบทางเคมีของฟางข้าว

ฟางข้าวมีองค์ประกอบสำคัญคือ เซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) (รุ่งอรุณ วัฒนวงศ์ และ สมชาติ รุ่งอินทร์, 2523; Clowson และคณะ, 1970) ซึ่งมีการจัดแบ่งองค์ประกอบของเซลล์พืช ดังแสดงในรูปที่ 1



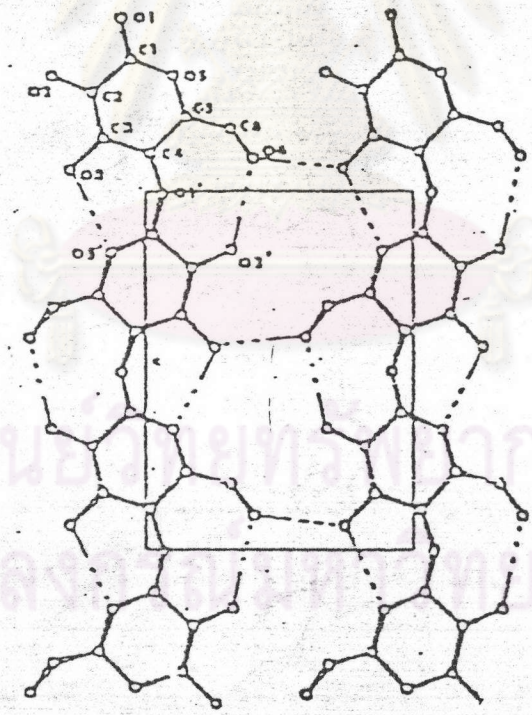
รูปที่ 1 องค์ประกอบของผนังเซลล์พืช (Greulch, 1973)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.1 เซลลูโลส (Davidson, 1967)

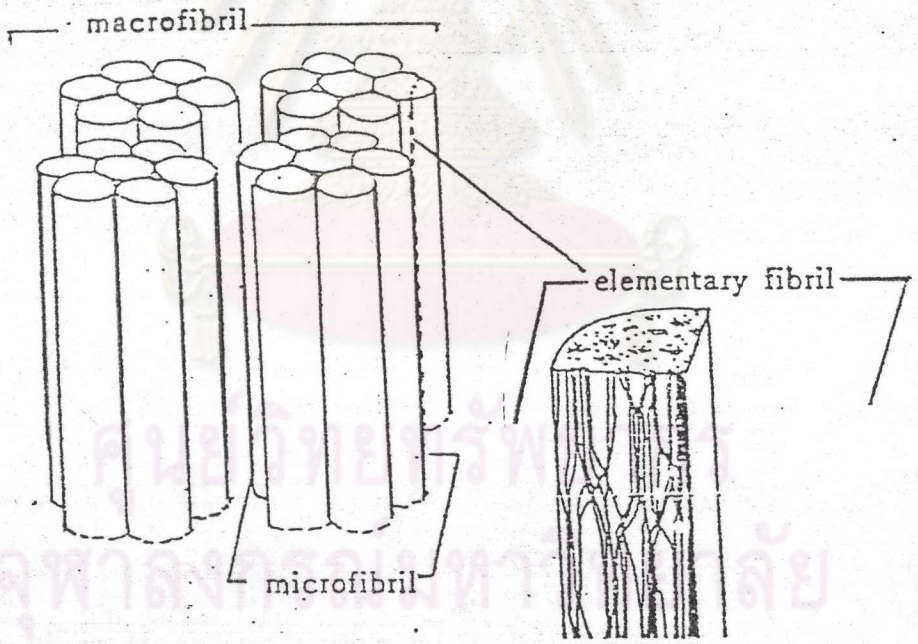
เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรต ชนิดโพลีแซคคาไรด์ มีสูตรโมเลกุล $(C_6H_{12}O_6)_n$ มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ กรดหรือด่างอ่อน แต่ละลายในกรดหรือด่างแก่ เซลลูโลสที่มีตามธรรมชาติจะมีสารอื่นมาแทรกรวมอยู่ด้วย เช่น เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน กัม (gum) และแทนนิน (tannin) เป็นต้น โครงสร้างของเซลลูโลสประกอบด้วยโมเลกุลของ ดี-กลูโคส (D-glucose) ประมาณ 15-40,000 โมเลกุลแล้วแต่ชนิดของพืช โมเลกุลของกลูโคสเหล่านี้จะอยู่ในรูปเบต้า-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-glucopyranose) เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่หนึ่งกับตำแหน่งที่สี่ของโมเลกุลถัดไป

เซลลูโลสเรียงตัวเป็นสายเดี่ยว โดยอะตอมคาร์บอนของ ดี-กลูโคส จัดเรียงตัวแบบรูปเก้าอี้ (chair form) แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลสที่อยู่ติดกันจะเชื่อมกันทางด้านข้างด้วยพันธะไฮโดรเจน ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 พันธะไฮโดรเจนในเซลลูโลส โดยกลูโคสแต่ละยูนิตจะเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลเซลลูโลส 2 พันธะ คือ O3-H...O5' และ O6...H-O2' และพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโมเลกุลเซลลูโลส O6-H...O3 (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2532)

กลุ่มของสายโมเลกุลเซลลูโลสที่เชื่อมกันด้านข้างของสายด้วยพันธะไฮโดรเจนนี้ เรียกว่าไฟบริลมูลฐาน (elementary fibril) การเชื่อมกันดังกล่าวใช้ X-ray diffraction photograph ศึกษาโครงสร้างโมเลกุลเซลลูโลส ถ้ามีการเรียงตัวอย่างมีระเบียบขนานกันไปทำให้เกิดบริเวณที่เป็นผลึก (crystalline regions) และถ้าการเรียงตัวดังกล่าวมีความเป็นระเบียบน้อยลงทำให้เกิดบริเวณที่เรียกว่า อสัณฐาน (amorphous regions หรือ paracrystalline regions)ไฟบริลมูลฐาน เมื่อรวมกลุ่มกันจะเรียกว่า ไมโครไฟบริล ไมโครไฟบริลเมื่อเชื่อมกันทางด้านข้างและมีลิกนินเป็นตัวห่อหุ้มให้รวมกันเป็นกลุ่มเรียก แมคโครไฟบริล โดยมี เฮมิเซลลูโลส และสารอื่นๆ อยู่ภายในช่องว่างระหว่างไมโครไฟบริลแต่ละกลุ่ม การรวมกลุ่มของสายโมเลกุลเซลลูโลสและการสะสมของสารต่าง ๆ ในช่องว่างดังกล่าวทำให้เซลลูโลสในธรรมชาติมีระบบการป้องกันการย่อยสลายโดยเอนไซม์



รูปที่ 3 ลำดับการรวมกลุ่มของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช (Nisizawa, 1973)

Baker และคณะ (1959) สรุปความแตกต่างของโครงสร้างทางกายภาพของเซลลูโลสที่มีในผนังเซลล์พืช ในบริเวณส่วนที่เป็นผลึกและอสัณฐานไว้ดังนี้ คือ

ก. เซลลูโลสในธรรมชาติจะมีค่า degree of polymerization แตกต่างกันตามชนิดของพืช

ข. ส่วนที่มีค่า degree of polymerization สูงสุดของเซลลูโลส คือ ส่วนที่เป็นผลึก จากการใช้ X-ray diffraction photograph ทำให้รู้ขนาดที่แน่นอนของโครงสร้างตาข่ายและอาจบ่งบอกลักษณะผลึกเดี่ยว ๆ ได้

ค. ค่า degree of polymerization ของส่วนที่เป็นอสัณฐานจะมีค่าน้อยที่สุดและไม่มีค่าที่แน่นอน

ง. ส่วนที่เป็นผลึก ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึกแบบต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่องทำให้ยุ่งยากต่อการแพร่ของตัวทำละลาย เอนไซม์ หรือสารต่าง ๆ

จ. ส่วนที่เป็นอสัณฐานจะง่ายต่อการแพร่กระจายของตัวละลาย เอนไซน์หรือสารต่าง ๆ

ฉ. เซลลูโลสของพืชชนิดต่าง ๆ จะมีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกัน

2.1.2 เฮมิเซลลูโลส (Goodwin และ Mercer, 1983)

เป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลเช่น ไซแลน (xylan) แมนแนน (mannan) และกรดยูโรนิค (uronic acid) ชนิดต่าง ๆ รวมกัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลที่มีอะตอมของคาร์บอนเท่ากับ 5 อะตอม เฮมิเซลลูโลส มีลักษณะโครงสร้างเป็นกิ่งก้าน (branch) ขนาดของโมเลกุลมีความยาว 30-50 หน่วย น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าเซลลูโลส คุณสมบัติไม่ละลายน้ำแต่ละลายในด่าง ถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสจะแทรกอยู่ระหว่างสายโมเลกุลของเซลลูโลส และทำหน้าที่เป็นสารเชื่อม (cement) ให้กับเซลลูโลส และไฟบริลอยู่ด้วยกัน

2.1.3 ลิกนิน

เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่ไม่ใช่โพลีแซคคาไรด์ มีน้ำหนักโมเลกุลสูงอยู่ภายในโครงสร้างของพืช โดยอยู่รอบเซลลูโลส เรียกว่า ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) และป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยสลาย ลิกนินเป็นสารประกอบอะโรเมติก ที่ประกอบด้วยหมู่เมธอกซิล (methoxyl group; $-OCH_3$) หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group; -OH) และส่วนที่เป็น

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) โดยปกติไม่สามารถระบุได้ว่าลิกนินเป็นสารประกอบประเภทใด เพราะไม่สามารถกำหนดโครงสร้างที่แน่นอนได้

2.2 เซลลูเลส (cellulase)

เซลลูเลสเป็น glycoprotein ประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต อัตราส่วน 1:1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000-60,000 ดาลตัน (Whitaker, 1972) มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ ไม่ต้องการ co-factor หรือโลหะอื่นในการทำปฏิกิริยา มีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง ทนต่อความเป็นกรดด่างช่วงพีเอช 4.0-8.0 คงทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสได้เป็นเวลาหลายปี และเก็บโดยวิธี Freeze dry หรือ ตกตะกอนด้วยอะซีโตนหรือเอธานอลโดยไม่เสียคุณสมบัติ เอนไซม์เซลลูเลสทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสให้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ น้ำตาลกลูโคส เอนไซม์เซลลูเลสจากแหล่งต่างกันมีสมบัติแตกต่างกัน ได้แก่ สัดส่วนขององค์ประกอบ อุณหภูมิ และค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน

2.2.1 องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูโลสจะถูกทำให้เกิดการย่อยสลายทางชีววิทยาโดยการใช้จุลินทรีย์ หรือจากเอนไซม์ที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิต คือ สัตว์เคี้ยวเอื้อง ปลวก หอยทากบางชนิด ซึ่งขึ้นกับความสามารถย่อยสลายเซลลูโลส และเมตาโบลิซึมของสิ่งมีชีวิต Tong, Cole และ Shephord, 1980 กล่าวว่าเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายโดยการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งมีสมบัติเป็น multicomponent enzyme เมื่อใช้เทคนิคทางโครมาโตรกราฟฟิคและอิเลคโตรฟอรีซีส สามารถแยกเอนไซม์เซลลูเลสออกเป็นองค์ประกอบย่อย ๆ ได้ 3 ชนิด คือ

2.2.1.1 เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase หรือ C_1 หรือ Exo β-1,4-glucan-cellobiohydrolase หรือ EC.3.2.1.74)

ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแยกสายเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส โดยการย่อยสลายเซลลูโลสและโอลิโกเซลลูโลสจากปลายที่ไม่มีอำนาจรีดิวส์ (non-reducing end) ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดจากด้านปลายของเซลลูโลส โดยการทำงานของเอกโซกลูคาเนส ซึ่งย่อยสลายโครงสร้างเซลลูโลสที่ซับซ้อนให้เป็นเซลลูโลสสายตรง

2.2.1.2 เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase หรือ C_x หรือ Endo β-1,4-glucan-glucanohydrolase หรือ EC.3.2.1.4)

สามารถย่อยสลายอนุพันธ์เซลลูโลสที่ละลายน้ำ ได้โอลิโกเมอร์ , เซลโลไบโอส และกลูโคสบางส่วน แต่เอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรทที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดที่ปลายด้านในของเซลลูโลสและเป็นแบบสุ่มโดยย่อยสลายที่พันธะเบต้า-1,4 ไกลโคซิดิก

2.2.1.3 เบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase หรือ Cellobiase หรือ EC.3.2.1.21)

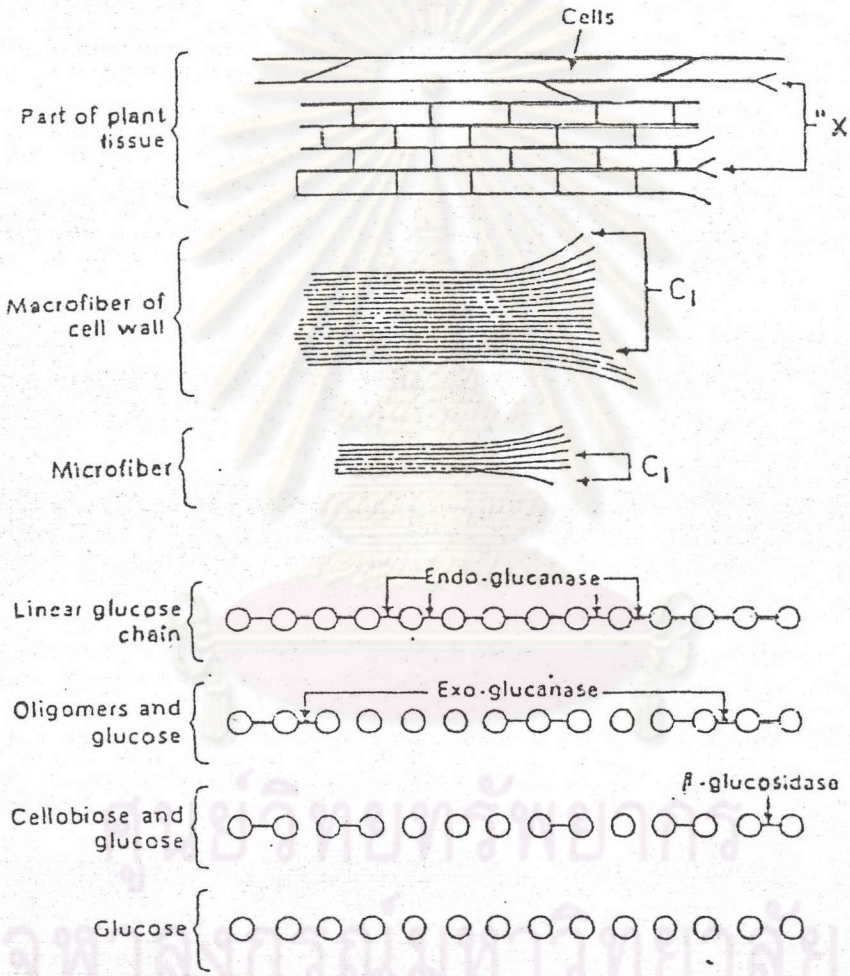
ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอส โอลิโกแซคคาไรด์และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Cellooligo-saccharides) สายสั้น ๆ เป็นเอนไซม์ที่เสริมการทำงานของเอกโซกลูคาเนส และเอนโดกลูคาเนส แต่ไม่มีผลกับการย่อยสลายเซลลูโลสโดยตรง การย่อยสลายจะให้กลูโคสมากหรือน้อยขึ้นกับสัดส่วนของเอนไซม์นี้

เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสเป็น Multicomponent enzyme ดังนั้น Mandels, 1975; Mandels และ Reese, 1957; Mandels และ Sternberg, 1976 จึงได้ใช้ค่าแอคติวิตีของเซลลูเลสรวม (Complete cellulase, C_o) เป็นค่าทำนายแสดงการเกิด saccharify ของเซลลูโลส หรือใช้เป็นดัชนีแสดงถึงความสัมพันธ์ซึ่งกันและกันของเอนไซม์ย่อยที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส ทั้ง 3 ชนิด คือ เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส เบต้า-กลูโคซิเดส ระหว่างการย่อยสลายเซลลูโลส ถ้าการย่อยสลายเซลลูโลสมีประสิทธิภาพดี ค่าแอคติวิตีของเซลลูเลสรวมสูง และถ้าย่อยสลายได้ไม่ดีจะมีค่าแอคติวิตีของเซลลูเลสรวมต่ำ

2.2.2 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

Cowling (1975) ตั้งสมมติฐาน ว่ามีเอนไซม์ "X" ซึ่งมักพบร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส จะเข้าทำงานเป็นอันดับแรกโดยทำให้เซลล์พืชแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ มีการแตกของผนังเซลล์และเกิดการหักของเซลล์บางเซลล์ขึ้น จากนั้นเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสเข้าทำงานตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4 การทำงานของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส และเอนโดกลูคาเนส จะย่อยเซลลูโลสไปเป็นเซลโลไบโอสและโอลิโกเซลลูโลส และต่อจากนั้น เบต้า-กลูโคซิเดส ย่อยต่อไปเป็นกลูโคส

Lee และคณะ (1953)ได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจะย่อยบริเวณอสัณฐานและบริเวณผลึกพร้อม ๆ กัน แต่บริเวณอสัณฐานมีการจัดเรียงตัวที่ไม่เป็นระเบียบ ดังนั้น เอนไซม์เซลลูเลสจึงย่อยบริเวณนี้ได้รวดเร็วกว่า



รูปที่ 4 การย่อยสลายเซลลูโลส โดยเอนไซม์ "X" และเอนไซม์องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสตามสมมติฐานของ Cowling (Cowling, 1975)

ประสิทธิภาพการย่อยสลายที่ดีของเอนไซม์จะต้องทำงานร่วมกัน ทั้ง 3 ชนิด แต่เอนไซม์เหล่านี้จะถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นกล่าวคือ เอกโซกลูคาเนส และเอนโดกลูคาเนส จะถูกยับยั้งโดยเซลโลไบโอส และเบต้า-กลูโคสซิเดส ถูกยับยั้งโดยกลูโคส ดังนั้นการขาดเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งไปอาจทำให้เกิดการสะสมของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ทำให้อัตราการย่อยสลายลดต่ำลงเพราะจุลินทรีย์จะใช้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นแทนการสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเซลลูโลส จนกว่าเมื่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนั้นได้ลดลงไป จุลินทรีย์จึงเริ่มต้นผลิตเอนไซม์มาย่อยเซลลูโลสใหม่ กระบวนการนี้ เรียกว่า คะตาโบลิก รีเพรชชั่น (catabolic repression) (Nisizawa และคณะ, 1971) ซึ่ง Nisizawa และคณะ (1971) ได้ทดลองกับ *Trichoderma viride* QM6a พบว่า มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงจะเกิดปฏิกิริยายับยั้งได้

2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533)

ปัจจัยทางเคมีและกายภาพที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส มีดังนี้

2.2.3.1 ความชื้นของเส้นใยเซลลูโลส

ความชื้นของเส้นใยเซลลูโลสมีผลทำให้เส้นใยเซลลูโลสเกิดการพองตัว เนื่องจากน้ำที่จับกับโมเลกุลของเซลลูโลสจะทำให้โครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสเปิดออก เอนไซม์เซลลูเลสสามารถแพร่ผ่านเข้าทำการย่อยสลายดีขึ้น นอกจากนี้น้ำยังเป็นสารประกอบที่ให้ธาตุสำคัญ สำหรับเติมลงสู่หมู่อิสระที่เกิดในกระบวนการทำลายพันธะไกลโคซิดิกอีกด้วย

2.2.3.2 ความสามารถในการแพร่ผ่าน (diffusibility) ของโมเลกุลเอนไซม์

เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติเหมือนเอนไซม์ทั่วไป คือเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำและมวลโมเลกุลสูงทั้งขนาดและรูปร่างของโมเลกุลเอนไซม์เป็นปัจจัยกำหนดความสามารถในการแพร่ผ่านของโมเลกุลเอนไซม์เข้าสู่โครงสร้างของเซลลูโลสที่ซับซ้อน

2.2.4.3 ความเป็นผลึก (crystallinity) ของเซลลูโลส

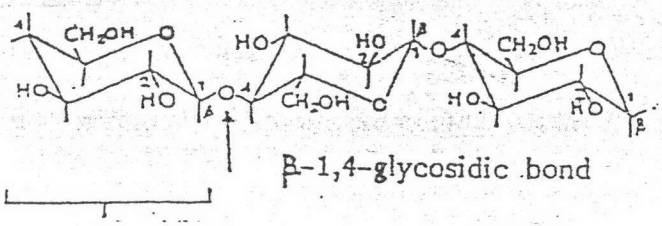
สายโมเลกุลเซลลูโลสที่มีการเรียงตัวกันอย่างมีระเบียบขนานกันไป

และมีการเชื่อมกันทางด้านข้างของสายโมเลกุลเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้เกิดบริเวณที่มีลักษณะเป็นผลึก ซึ่งมีความต้านทานการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าบริเวณที่เป็นอสัณฐาน ซึ่งสายโมเลกุลเซลลูโลสมีการเรียงตัวเป็นระเบียบน้อยกว่าบริเวณแรก เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสสามารถแพร่ผ่านเข้าสู่โครงสร้างที่ไม่มีความเป็นระเบียบได้ดีกว่า

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสมีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกับการย่อยสลายด้วยกรด คือ ในระหว่างการย่อยสลายนั้นขณะที่ส่วนอสัณฐานซึ่งเป็นส่วนของโมเลกุลที่ไวต่อการย่อยสลายถูกย่อยสลายไป จะทำให้เซลลูโลสที่เหลือมีสัดส่วนของความเป็นผลึกเพิ่มขึ้นความต้านทานต่อการย่อยสลายจึงเพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนั้นการเตรียมสภาพขั้นต้นใด ๆ ที่มีผลทำให้สัดส่วนความเป็นผลึกของเซลลูโลสลดลงได้ก็จะมีผลช่วยเพิ่มความไวของเซลลูโลสต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ การเตรียมสภาพที่ช่วยลดความเป็นผลึกของเซลลูโลสดังกล่าวรวมถึงการตกตะกอนจากสารละลาย และการรบกวนโดยวิธีกลเช่น การสั่นสะเทือนโดยการใช้เครื่องโม่แบบสั่นสะเทือน (vibratory ball miller) หรือการใช้รังสี

2.2.3.4 ลักษณะโครงรูป (conformation) ของกลูโคสในโมเลกุลเซลลูโลส

เซลลูโลสรูปผลึกมีความต้านทานการย่อยสลายมากกว่าเซลลูโลสรูปอสัณฐาน เนื่องจากโครงสร้างทางกายภาพที่มีความเป็นระเบียบช่วยกีดกัน การเข้าย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลส นอกจากนี้ยังมีสาเหตุเนื่องจากโครงรูปและสภาพแข็งแกร่งแบบสเตอริก (stericrigidity) ของหน่วยแอนไฮโดรกลูโคส (anhydroglucose units) ในบริเวณที่เป็นผลึกซึ่งในบริเวณดังกล่าวหน่วยกลูโคสจะมีโครงรูป เป็นแบบเก้าอี้ (chair conformation) ที่มีหน่วยกลูโคไพราโนสจัดเรียงตัวในทิศทางตรงข้ามกันในผลึก ดังรูปที่ 5 ทำให้เกิดความจำเพาะที่เรียกว่า สเตอริโอสเปซิฟิคซิตี (stereospecificity) ของการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 การจัดเรียงตัวของหน่วยกลูโคไพราโนสในทิศทางตรงกันข้ามกันในผลึกเซลลูโลส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533)

2.2.3.5 จำนวนหน่วยกลูโคสต่อโมเลกุลของเซลลูโลส

โมเลกุลของเซลลูโลสมีความยาวต่างกันตั้งแต่ แกมมา-เซลลูโลส มีหน่วยกลูโคสน้อยกว่า 15 หน่วยต่อโมเลกุลจนถึงแอลฟา-เซลลูโลส ซึ่งมี 10,000-14,000 หน่วยต่อโมเลกุล อัตราการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะต่างกันขึ้นกับขนาดของโมเลกุลเซลลูโลส โดยเฉพาะการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ตัดสายเซลลูโลสจากด้านปลาย (endwise mechanism)

ในระหว่างการย่อยสลายเซลลูโลสนั้นเมื่อสายเซลลูโลสถูกตัดให้สั้นลงจนกระทั่งโมเลกุลสามารถละลายได้ และไม่มีโครงสร้างซับซ้อนที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลอื่นมากนักจะพบว่าสายเซลลูโลสนั้นมีความไวต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น

2.2.3.6 ธรรมชาติของวัตถุดิบที่เป็นแหล่งเซลลูโลส

วัตถุดิบจากธรรมชาติที่เป็นแหล่งเซลลูโลสจะมีสารประกอบต่างๆ รวมถึงอินทรียสารที่ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นกลาง (neutral solvents) เช่น อะซีโตน อีเธอร์ เมธานอล เอธานอล เบนซิน และน้ำ สารประกอบเหล่านี้มีอิทธิพลต่ออัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ เนื่องจากการสะสมของสารประกอบดังกล่าวภายในโครงสร้างที่เป็นแคปิลารี่ของผนังเซลล์มีผลกีดกันการเข้าถึงเซลลูโลสของเอนไซม์ นอกจากนี้สารประกอบบางชนิดยังมีผลโดยตรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูโลสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แต่ไม่มีผลยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวในซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชเดียวกัน และผลการยับยั้งจะแตกต่างกันไปสำหรับเซลลูโลสจากแหล่งต่างกัน

ลิกนินซึ่งรวมตัวอยู่ในโครงสร้างของเซลลูโลสและทำหน้าที่ห่อหุ้มไมโครไฟบริล ให้รวมกันเป็นกลุ่มใหญ่นั้น มีผลจำกัดต่อการเข้าทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ดังนั้น

019702

การย่อยสลายเซลลูโลสให้มีประสิทธิภาพสูงจำเป็นต้องกำจัดลิกนินออกบางส่วนเสียก่อน นอกจากนี้ชนิด ปริมาณและการกระจายของกลุ่มแทนที่ (substituent groups) ก็มีผลต่ออัตราการย่อยเซลลูโลสด้วยเช่นกัน กล่าวคือ กลุ่มแทนที่ต่าง ๆ เช่น กลุ่มเมธิล กลุ่มเอธิล กลุ่มไฮดรอกซี่เอธิล กลุ่มคาร์บอกซีเมธิล เป็นต้น เมื่อกลุ่มเหล่านี้เข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของหมู่ไฮดรอกซิลชั้นปฐมภูมิ หรือหมู่ไฮดรอกซิลชั้นทุติยภูมิในเซลลูโลสเกิดขึ้นเป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลส ทำให้เซลลูโลสมีความเป็นผลึกลดลงและมีการละลายเพิ่มขึ้น ทำให้อนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ได้นั้นมีความไวต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงจุดที่มีการละลายสมบูรณ์ (complete solubility) หลังจากจุดนี้แล้วอนุพันธ์ที่ได้จะมีความไวต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ลดลง

2.3 <u>การเตรียมฟางข้าวขั้นต้น</u> (pretreatment)

โครงสร้างทางเคมีของฟางข้าวตามธรรมชาติ มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสำคัญ ส่วนที่เป็นผลึกและบริเวณที่มีลิกนินล้อมรอบจะป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยสลาย การทำให้เกิด delignification decrystalline และ depolymerization จะทำให้โครงสร้างของเซลลูโลสลดความแข็งแรงลงเอนไซม์หรือจุลินทรีย์จะย่อยสลายเซลลูโลสดีขึ้น Rockwell (1976) ได้สรุปวัตถุประสงค์ของการเตรียมฟางข้าวขั้นต้น เพื่อ

ก. ลดความสัมพันธ์ของส่วนผลึกของเซลลูโลส

ข. แยกลิกนินที่ล้อมรอบเซลลูโลสออก

ค. ลดค่า degree of polymerization ของเซลลูโลส

การย่อยสลายฟางข้าวขั้นต้นที่นิยมใช้กันทั่วไป มีทั้งวิธี ทางกายภาพ และวิธีทางเคมี วิธีทางกายภาพ เช่น การใช้อุณหภูมิสูง การบด, การฉายรังสี เป็นต้น วิธีทางกายภาพทำให้ degree of polymerization ลดลง แต่จะแยกลิกนินออกจากฟางข้าวได้น้อย และการพองตัว (swollen) ของเซลลูโลสต่ำ ส่วนวิธีทางเคมีสารเคมีที่นิยมใช้ เช่น กรดซัลฟูริก, โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น (Han และ Anderson, 1974; Han และ Callihan, 1974) สามารถแยกลิกนินได้ดีกว่าการใช้วิธีทางกายภาพ

2.4 การผลิตน้ำตาลกลูโคสโดยการย่อยสลายเซลลูโลส

การย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล กลูโคส โดยทั่วไปแบ่งเป็น 2 วิธี คือ

2.4.1 วิธีทางเคมี (acid hydrolysis)

โดยการใช้กรดกำมะถันหรือกรดเกลือ โครงสร้างส่วนที่เป็นผลึกมีความต้านทานต่อกรดมาก ต้องใช้ความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิสูงดังนั้นจึงเร่งให้เกิดปฏิกิริยากับสารชนิดอื่นที่ปนมากับเซลลูโลสเกิดเป็นกรดลีวูลีนิค (levulinic acid) เฟอร์ฟิวราล (furfural) หรือ มีเธน (methane) แต่ได้กลูโคสในปริมาณต่ำ

2.4.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

การย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์สามารถทำได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ ปฏิกิริยาเกิดในสภาวะที่ไม่รุนแรง และเอนไซม์เซลลูเลสยังมีความจำเพาะกับเซลลูโลส ทำให้ได้กลูโคสค่อนข้างบริสุทธิ์

2.5 จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส มีหลายชนิดดังตารางที่ 2 โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะย่อยเซลลูโลสที่พันธะ เบต้า-1,4 ไกลโคซิดิก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลลูโลสจากโครงสร้างที่ซับซ้อนเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่และเดี่ยวซึ่งจุลินทรีย์จะนำน้ำตาลนี้ไปใช้เป็นสารต้นตอคาร์บอนในเมตาโบลิซึมของเซลล์ เพื่อการเจริญเติบโตและสร้างจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (สุจิมา รักษาศีล, 2533)

รา	แบคทีเรีย	แอคติโนมัยซีตีส
Alternaria sp.	*Bacillus* sp.	*Micromonospora* sp.
Aspergillus sp.	*Cellulomonas* sp.	*Nocardia* sp.
Chaetomium sp.	*Clostridium* sp.	*Streptomyces* sp.
Corprinus sp.	*Corynebacterium* sp.	*Streotasporangium* sp.
Foames sp.	*Cytophaga* sp.	
Fusarium sp.	*Polyangium* sp.	
Myrothecium sp.	*Pseudomonas* sp.	
Pennicillium sp.	*Sporocytophaga* sp.	
Polyporus sp.	*Vibrio* sp.	
Rhizoctonia sp.		
Rhizopus sp.		
Sporotrichum sp.		
Trichoderma sp.		
Trichothecium sp.		
Verticillium sp.		
Zygohynchus sp.		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 การใช้จุลินทรีย์ผสมย่อยสลายเซลลูโลส

จากการวิจัยของ Han และ Srinivasan, (1968) ได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของ *Cellulomonas sp.* จากการหมักกากอ้อย พบว่า *Cellulomonas sp.* สร้างเอกโซกลูคาเนสและเอนโดกลูคาเนส ออกมาย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นเซลโลไบโอสได้ดี แต่การสร้างเบต้ากลูโคซิเดส ออกมาน้อยทำให้การเปลี่ยนแปลงของเซลโลไบโอสไปเป็นกลูโคสไม่ดีนัก ทำให้มีปริมาณเซลลโลไบโอสสะสมอยู่มาก จึงทำให้มีผลกระทบต่อ *Cellulomonas* sp. โดยแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโต คือ น้ำตาลกลูโคสมีปริมาณน้อยทำให้การเจริญเติบโตและการสร้างจำนวนเซลล์โปรตีนเป็นไปในอัตราที่ต่ำ และผลอีกประการหนึ่ง คือ ปริมาณน้ำตาลเซลโลไบโอสที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสจะยับยั้งการทำงานของเอกโซกลูคาเนส และเอนโดกลูคาเนสหรือเกิดปฏิกิริยา คะตาโบลิก รีเพรชชั่น จึงทำให้การทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดต่ำลง

ในปี ค.ศ. 1969 Han และ Srinivasan (1969) ได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ของ *Alcaligenes faecalis* ซึ่งไม่จัดอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า *A. faecalis* สามารถสร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้ดี แต่ไม่สามารถเจริญบนเซลลูโลสที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ นั่นคือไม่สามารถสร้างเอกโซกลูคาเนสและเอนโดกลูคาเนส ดังนั้น การใช้ *A. faecalis* ร่วมกับ *Cellulomonas* sp. จะช่วยทำให้เซลโลไบโอสย่อยสลายไปเป็นกลูโคสได้ดียิ่งขึ้น ทำให้มีแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ผสม ซึ่งจะเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ ผลดีอีกประการหนึ่ง คือลดการเกิดคะตาโบลิกรีเพรชชั่นได้ เพราะ เซลโลไบโอสที่ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอกโซกลูคาเนส และเอนโดกลูคาเนสลดลงจึงทำให้การทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นได้

การวิจัยใช้เชื้อรา *Trichoderma viride* (Selby และ Maitland, 1967; Peiterson, 1975a) เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในการทดลองใช้ฟางข้าวบาร์เลย์เป็นแหล่งเซลลูโลส โดยการเลี้ยงเชื้อแบบจุ่ม (submerged cultivation) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Czapek's dox media สูตรของ Mandels และ Weber (1969) พบว่า เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเบต้ากลูโคซิเดส ถูกสร้างออกมาในปริมาณเพียงพอทำให้เซลลูโลสเปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอสและกลูโคสได้ แต่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชเนื่องจากเมตาโบลิซึมของ *T. viride* ทำให้พีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลง จะมีผลกระทบโดยตรงต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ

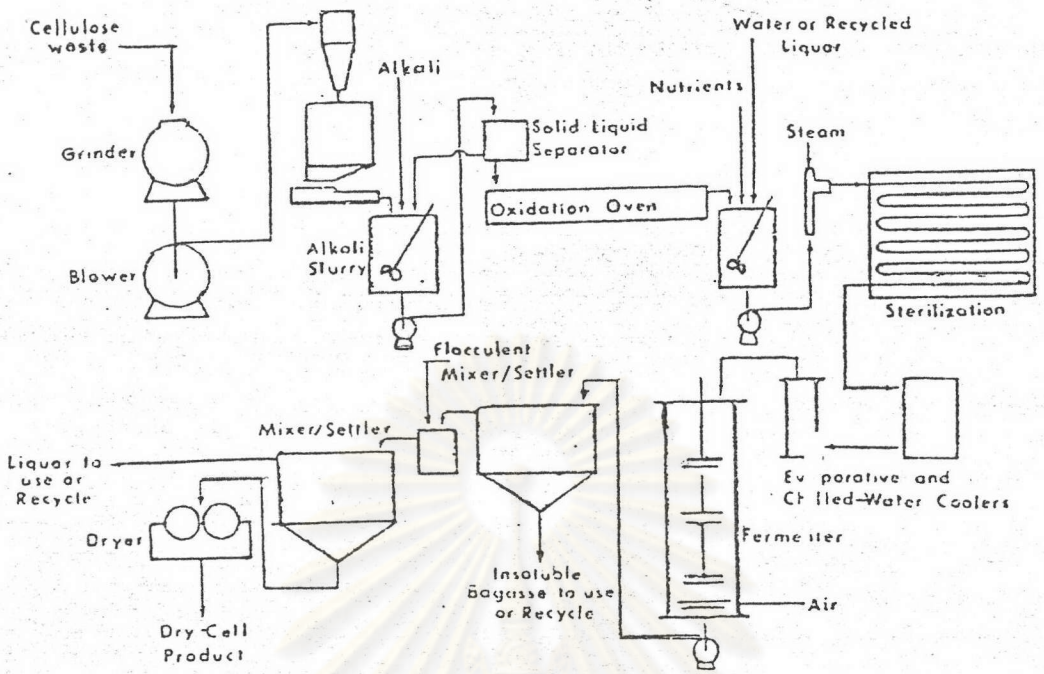
T. viride ทำให้ *T. viride* ผลิตเอนไซม์นี้น้อยลง (วรรณดี สุประดิษฐ์อาภรณ์, 2532; Sternberg, 1976, Osothsin, 1981) ดังนั้น จึงเกิดน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณต่ำ ทำให้การเพิ่มจำนวนของเชื้อรา *T. viride* ที่จะใช้น้ำตาลรีดิวซ์ลดต่ำลงด้วย จำเป็นต้องใช้ระยะเวลานานขึ้น จึงจะให้เอนไซม์และโปรตีนที่สูงสุด

ยีสต์ *Candida utilis* มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถทนต่อพีเอชต่ำได้และสามารถใช้น้ำตาลเพนโตสและเฮกโซสได้ดี (สุมาลี เหลืองสกุล, 2527) แต่ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ การใช้ยีสต์ร่วมกับ *T. viride* เพื่อให้ยีสต์นี้ใช้เซลโลไบโอสและน้ำตาลรีดิวซ์ที่สะสมอยู่ให้ลดลง เพื่อลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ หรือ คะตาโบลิกรีเพรชชั่น และเร่งให้ *T. viride* ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากขึ้น

2.7 <u>โปรตีนเซลล์เดียวจากฟางข้าว</u>

ฟางข้าวมีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ เซลลูโลส ซึ่งเกิดจากการเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันเป็นจำนวนมาก เมื่อนำฟางข้าวมาเป็นสับสเตรทสำหรับจุลินทรีย์ ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จะสร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ต่าง ๆ เช่น เซลโลไบโอส กลูโคส เป็นต้น และจุลินทรีย์จะนำน้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์หรือชีวมวล (biomass) ให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ภายหลังจากการแยกเซลล์จุลินทรีย์หรือชีวมวลออกจากสับสเตรทและสารอาหารแล้ว ซึ่งเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้เหล่านี้คือ ผลผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ซึ่ง Han และคณะ (1971) รายงานขั้นตอนการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวไว้ดังรูปที่ 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 ขั้นตอนกระบวนการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากกากอ้อย (Han และคณะ, 1971)

2.8 การสกัดโปรตีนจากโปรตีนเซลล์เดียว

การสกัดโปรตีนจากโปรตีนเซลล์เดียว มีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงคุณภาพของผลผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ดังนี้ คือ

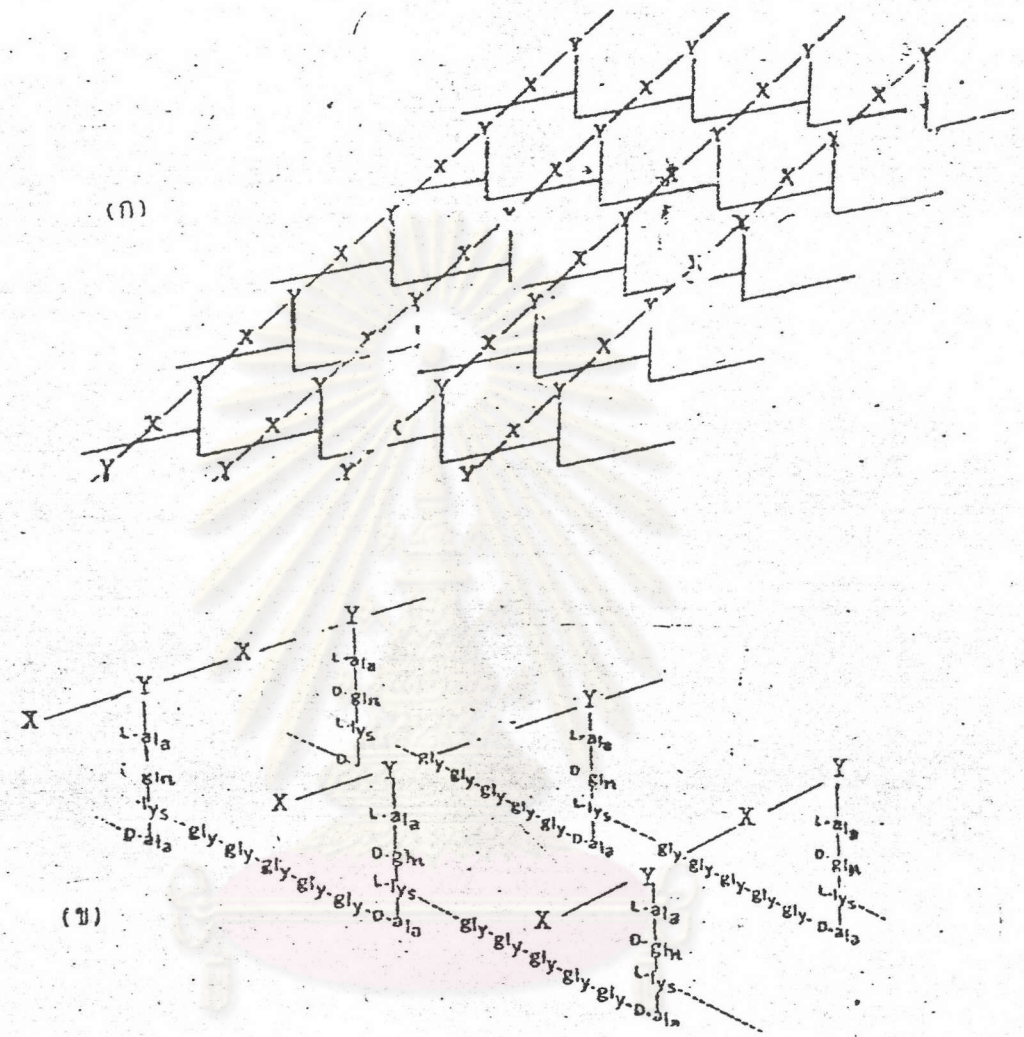
1. เพื่อเพิ่มปริมาณของกรดอะมิโนของโปรตีนเซลล์เดียว โดยการแยกผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งประกอบด้วย crude fiber หรือโพลีแซคคาไรด์เป็นส่วนใหญ่ออก (Tannenbaum, Mateles และ Capco, 1966)

2. ลดปริมาณ crude fiber ที่ย่อยสลายยาก มีกลิ่นรสที่ไม่น่าพอใจและรบกวนต่อลำไส้และกะเพาะอาหาร ทำให้เกิดปัญหาต่อระบบขับถ่ายของร่างกาย ซึ่ง crude fiber จะเป็นองค์ประกอบที่มีมากในบริเวณผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ (Han และคณะ, 1971)

3. ลดปริมาณกรดนิวคลีอิก ด้วยการใช้วิธีการทางกายภาพหรือวิธีการทางเคมี เช่น homoginization, การใช้อุณหภูมิสูง, การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น (Vananuvat และ Kinsella, 1975)

เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกหรือลบมีโครงสร้างที่แข็งแรง เกิดจากเส้นใยขนานของไกลแคน -X-Y- ดังรูปที่ 7 และมีสายเปปไทด์ (peptide chain) มาเชื่อมขวางด้วยพันธะโควาเลนท์ เรียกว่า เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) หรือมิวเรน (murein) ประมาณ 50 เปอร์เซนต์ ประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิด คือ N-acetyl-D-glucosamine และกรด N-acetylmuramic ที่เชื่อมกันด้วยพันธะเบต้า-1,4 ไกลโคซิดิก ผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะมีเปปติโดไกลแคนเรียงตัวไขว้กันไปมาหลาย ๆ ชั้นทำให้ผนังเซลล์ค่อนข้างหนา ดังนั้นเอนไซม์จึงย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ยาก ส่วนผนังเซลล์ของราและยีสต์ จะประกอบด้วยโมเลกุลที่เกาะกันด้วยพันธะเบต้า-1,3-ไกลโคซิดิก เกิดโครงสร้างอสัณฐาน และมีพันธะเบต้า-1,4 ไกลโคซิดิก เกิดเป็นโครงสร้างสามมิติที่มีการไขว้กัน คล้ายกับพวกแบคทีเรีย แต่มีความแข็งแรงน้อยกว่า (นุ่มนวล อุดมพงษานนท์, 2527) ดังนั้น การเลือกวิธีการสกัดโปรตีนเพื่อย่อยสลายผนังเซลล์จะต้องเหมาะสมกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด จึงจะทำให้มีประสิทธิภาพสูง และไม่เกิดในสภาวะที่รุนแรงอันอาจจะทำลายปริมาณกรดอะมิโนของผลผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้ ซึ่ง Tannenbaum, Mateles และ Capco (1966) ได้ทดลอง สกัดเซลล์แบคทีเรีย *Cellulomonas* sp. ด้วยวิธีการทางเคมีและกายภาพ แล้ววัดปริมาณกรดอะมิโน พบว่า การใช้สารละลายไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 9.7 เวลา 2 ชั่วโมงเหมาะสมที่สุด ส่วน Vananuvat และ Kinsella, (1975) ได้ทดลองสกัด *Saccharomyces fragilis* พบว่า การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ พีเอช 11.5 จะเหมาะสมที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 โครงสร้างของเปปติโดไกลแคน ก.อย่างง่าย ข.อย่างละเอียด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย