บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีการเพาะปลูกและผลิตข้าวที่จัดอยู่ภายใน 5 อันดับแรกของโลก รองมาจากจีน, อินเดีย, อินโดนีเซีย และบังคลาเทศ ดังแสดงในตารางที่ 1 จากสถิติการผลิตข้าวของประเทศไทย ในช่วงที่ผ่านมาระหว่างปี 2530 ถึง 2535 ปริมาณผลิตข้าวทั้งประเทศ เฉลี่ยตกประมาณปีละ 19 ล้านตัน จากปริมาณข้าวที่ผลิตได้ทั้งโลกประมาณ 400 ล้านตัน ซึ่งนับว่าเป็นปริมาณที่มาก ผลิตผลพลอยได้จากการสีข้าว คือ แกลบ โดยพบว่ามีปริมาณประมาณ 22.5-25.2% ของปริมาณข้าวเปลือกโดยน้ำหนัก (Houston, 1976; Khane, 1984) พบว่าในแต่ละปีมีปริมาณแกลบจากการสีข้าวอย่างน้อยถึงปีละ 4 ล้านตัน ซึ่งจัดได้ว่ามีปริมาณที่มากทีเดียว

ตารางที่ 1. ผลผลิตข้าวของประเทศที่ผลิตข้าวได้มาก 12 อันดับแรกของโลก ปี พ.ศ. 2534

อันดับที่	ประเทศ	ปริมาณผลผลิตข้าว (ล้านตัน)
1	จีน	187.45
2	อินเดีย	110.95
3	อินโดนีเซีย	44.32
4	บังคลาเทศ	28.58
5	ไทย	20.40
6	เวียดนาม	19.43
7	พม่า	13.20
8	ญี่ปุ่น	12.00
9	ฟิลิปปินส์	9.67
10	บราซิล	9.50
11	เกาหลีใต้	7.48
12	สหรัฐอเมริกา	7.00

ที่มา : ศูนย์สถิติการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ.2536

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2. ผลผลิตข้าวของประเทศไทยในระหว่างปี 2530-2535

ปี	ผลผลิตข้าว (ล้านตัน)
2530	18.43
2531	21.26
2532	20.60
2533	17.19
2534	20.40
2535	19.92

ที่มา : ศูนย์สถิติทางการเกษตร สำนักงานสถิติทางการเกษตร กระทรวงเกษตร และสหกรณ์ พ.ศ.2536

ความรู้เกี่ยวกับแกลบ

จากที่ได้กล่าวมาแล้วแกลบเป็นผลพลอยได้จากการผลิตข้าว โดยจะมีแกลบ 22.5-25.2% ของปริมาณข้าวเปลือกโดยน้ำหนัก ส่วนประกอบหลักของแกลบได้แก่ เซลลูโลส, ลิกนิน, เถ้า และน้ำตาล (Houston, 1967) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3. แสดงสินค้าประกอบหลักของแกลบ (Houston, 1967)

ส่วนประกอบ	ร้อยละโดยน้ำหนัก
เซลลูโลส	34-44
ลิกนิน	19-47
น้ำตาล*	17-26
เถ้า	13-29
ความชื้น	8.5-11.0

* ดี-ไซโรส, แอล-อะราบิโนส, ดี-กาแลคโตส, กรดเมธิลกลูคูโรนิค

ส่วนประกอบของแกลบที่เป็นสารอินทรีย์ เมื่อแยกสลายเป็นธาตุพื้นฐานจะประกอบด้วยคาร์บอน (C) 51.2% ไฮโดรเจน (H) 6.9% และออกซิเจน (O) 41.9% โดยน้ำหนักในแกลบจะประกอบด้วยเถ้า 13.29% ซึ่งพบว่าในเถ้าแกลบจะมีส่วนประกอบซิลิกา (SiO_2) อยู่สูงถึง 87-97% โดยน้ำหนัก โดยมีความแตกต่างกันบ้างตามแหล่งที่เพาะปลูก (Saccher, 1988) ได้มีผู้วิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมีของเถ้าแกลบ ซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 4 (Khane, 1984)

ตารางที่ 4. ส่วนประกอบทางเคมีของเถ้าแกลบ (Khane, 1984)

Composition	% (Wt.)
SiO_2	93.1
K_2O	2.3
MgO	0.5
Al_2O_3	0.4
CaO	0.4
Fe_2O_3	0.2
Na_2O	0.1

จะเห็นได้ว่าในส่วนของเถ้าแกลบจะมีซิลิกาเป็นส่วนประกอบอยู่สูงถึง 93.1% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นที่มีซิลิกาเป็นส่วนประกอบในเถ้าของพืชแต่ละชนิด พบว่าในแกลบจะมีปริมาณซิลิกาในเถ้าปริมาณที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น ๆ

ตารางที่ 5. แสดงปริมาณเถ้าและปริมาณซิลิกาในเถ้าของพืชต่าง ๆ (Khane, 1984)

พืช	ส่วนของพืช	เถ้า %	ซิลิกาในเถ้า (%)
แกลบ	-	22.1	93.0
ข้าวสาลี	ใบ	10.5	90.5
ข้าวฟ่าง	ใบ	12.5	88.7
ฟางข้าว	-	14.6	82.0
สาเก	ต้น	8.6	81.0
ชานอ้อย	-	14.7	73.0
ข้าวโพด	ใบ	12.1	64.3
ไผ่	ตา	1.5	57.4
ทานตะวัน	ต้นและใบ	11.5	25.3
เลนทานา	ต้นและใบ	11.2	23.3

<u>ซิลิกา</u>

ซิลิกาเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างพื้นฐานทางเคมี คือ SiO_2 ซิลิกามีหลายชนิด แตกต่างกันตามลักษณะของอนุภาคของเนื้อสาร ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 2 กลุ่ม (Iller, 1979; Conradt, 1992) ได้แก่

1. ซิลิกาผลึก (crystalline silica) ซึ่งสามารถแบ่งย่อยเป็นหลายชนิดตามความแตกต่างของรูปร่าง ลักษณะผลึกและความหนาแน่นของซิลิกา รูปร่างของผลึกมีหลายแบบ เช่น สามเหลี่ยม, สี่เหลี่ยม, หกเหลี่ยม, สี่เหลี่ยมลูกบาศก์ และเส้นยาว ตัวอย่างของซิลิกาที่มีลักษณะเป็นผลึก เช่น low-temperature quartz (low-t quartz) มีรูปผลึกเป็นแบบสามเหลี่ยม high-t quartz มีรูปผลึกเป็นแบบหกเหลี่ยม, low-t cristobalite มีรูปร่างผลึกเป็นแบบสี่เหลี่ยม, high-t cristobalite มีรูปร่างผลึกเป็นแบบทรงสี่เหลี่ยมลูกบาศก์, low-t tridymite มีรูปร่างผลึกเป็นแบบเส้นยาว เป็นต้น

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ซิลิกาอสณฐาน (amorphous silica หรือ non-crystalline silica) เป็นซิลิกาที่มีอนุภาคส่วนประกอบรูปร่างไม่เป็นผลึก ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ 3 กลุ่ม คือ

- Vitreous silica เป็นซิลิกาที่ใช้ทำแก้ว มีลักษณะที่เป็นเนื้อเดียวกันโดยตลอด ไม่มีรูขนาดเล็ก (porous) เกิดจากการหลอมซิลิกาชนิดผลึก

- Silica gels เป็นซิลิกาที่มีรูขนาดเล็ก (Microporous) อยู่เป็นจำนวนมาก มีพื้นที่ผิวอนุภาคสูง ตัวอย่างของซิลิกาชนิดนี้ ได้แก่ aquagels, alcogels, xerogels, aerogels

- Silica powder เป็นซิลิกาที่มีอนุภาคส่วนประกอบของโครงสร้างที่มีขนาดเล็กมากในระดับไมโครเมตรถึงนาโนเมตร ซึ่งเรียกโครงสร้างนี้ว่า microstructure และ nanostructure ตามลำดับ ตัวอย่างของซิลิกาชนิดนี้ เช่น ผงเอควาเจนิค (aquagenic powders) ซึ่งได้จากการตกตะกอนของสารละลาย aquagenic pyrogenic powders ได้จากการระเหยเอาส่วนที่เป็นน้ำในซิลิกาออกไปโดยการให้ความร้อนในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน ผงไบโอเจนิค (biogenic powder) เป็นซิลิกาชนิดผงเอควาเจนิคที่สร้างขึ้นในพืชหรือไดอะตอม

<u>ประโยชน์ของซิลิกา</u>

ซิลิกาได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรม สำหรับผลิตสินค้าต่าง ๆ และใช้ในการผลิตวัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานอุตสาหกรรม ตลอดจนงานทางวิทยาศาสตร์ ทั้งนี้ประโยชน์และการใช้งานของซิลิกา โดยทั่วไปพอสรุปได้ดังนี้

1. เป็นสารเพิ่มความแข็งแรงและแน่นหนาแก่สารอื่น เช่น ยาง พลาสติก และสารโพลิเมอร์อื่น ๆ
2. เป็นสารลดแรงยึดระหว่างผิวของแข็ง เช่น ป้องกันการแตกร้าว หรือการอัดตัวอย่างแน่นของวัสดุ
3. เป็นสารเพิ่มแรงยึดโดยเฉพาะในกาว
4. เป็นสารเพิ่มความหนืดในของเหลว เช่น ใน สี หมึก ยา จาระบี และเครื่องสำอาง

5. เป็นสารเพิ่มความเงา (optical effects)
6. เป็นสารเพิ่มช่วยกันน้ำ (hydrophobic หรือ water-repellent)
7. เป็นสารดูดซึม (absorbent) ใช้เฉพาะซิลิกาชนิด silica gels
8. เป็นตัวแร่งปฏิกิริยาใช้เฉพาะซิลิกาชนิด reactive
9. เป็นสารบรรจุในคอลัมน์เพื่อวิเคราะห์ (chromatographic colomn packing)
10. ใส่ในสีที่ฉีดพ่นเพื่อป้องกันการอุดตันของหัวฉีด
11. ใช้เป็นส่วนผสมวัสดุที่ใช้งานที่ทนความร้อนที่สูง และเพิ่มความแข็ง

สำหรับประเทศไทยนั้นได้มีการใช้ซิลิกาในปริมาณสูง และซิลิกาผลิตได้ในประเทศมีไม่พอเพียงต่อความต้องการสำหรับอุตสาหกรรมของประเทศ จึงมีการนำเข้าซิลิกาจากต่างประเทศที่มีมูลค่าที่มากและเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6. สถิติปริมาณและมูลค่าการนำเข้าประเทศของสารประกอบซิลิกา

ปี (พ.ศ.)	ปริมาณ (กก.)	มูลค่า (บาท)
2523	781,413	10,962,275
2524	1,626,982	29,004,794
2525	1,994,398	34,084,804
2526	2,783,015	48,889,605
2527	2,848,400	48,379,587
2528	3,433,152	61,244,830
2529	4,455,521	91,654,454
2530	6,328,371	144,680,862
2531	8,190,044	189,784,400
2532	10,106,260	240,769,528
2533	18,013,161	268,045,395
2534	2,633,132	120,927,817
2535	2,395,626	134,088,202

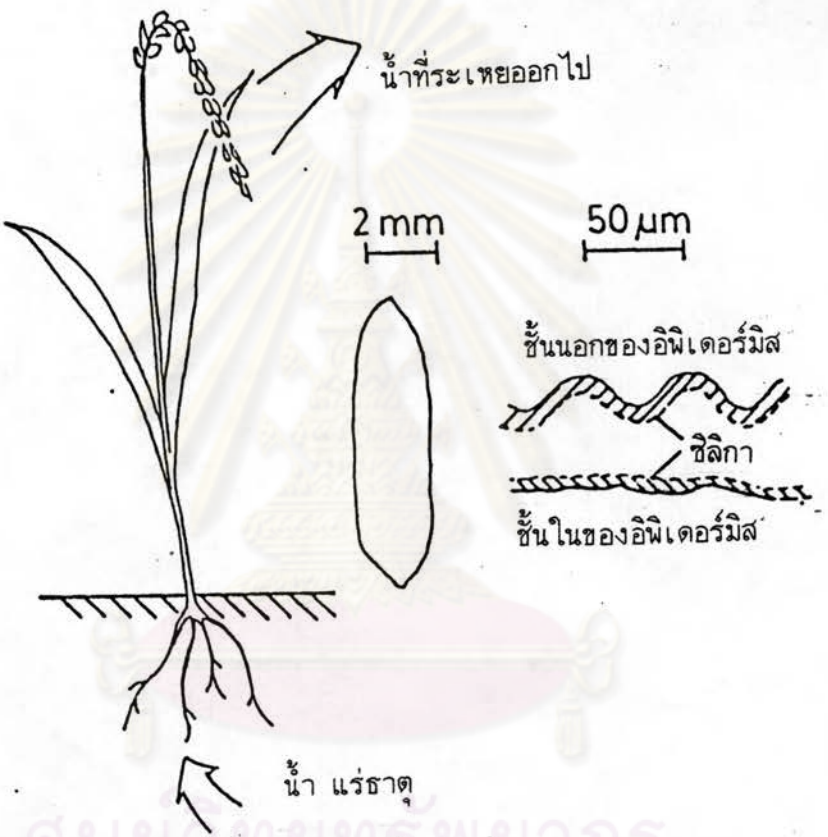
ที่มา : รายงานของกรมศุลกากร กระทรวงการคลัง

การสะสมของซิลิกาในพืช

การสะสมของซิลิกาโดยพืช เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนโดยพืชจะดูดเอาซิลิกาที่เป็นอนุภาคเล็ก ๆ ซึ่งละลายอยู่ในน้ำสู่ลำต้น โดยผ่านทางรากแล้วเข้าไปสะสมในส่วนต่าง ๆ ของพืชทำให้ได้ซิลิกาที่บริสุทธิ์เข้าไปสะสมในส่วนของพืชและจัดรูปแบบของซิลิกาเป็นแบบชนิดผง (sillica powder) จากข้อมูลนี้ทำให้เกิดเหตุผลที่ดีว่า หากมีวิธีใดกำจัดส่วนสารอินทรีย์สิ่งปนเปื้อนที่เป็นสารอนินทรีย์ชนิดอนุมูลของประจุบวกออกไป โดยไม่ทำลายความบริสุทธิ์ และโครงสร้าง microstructure ของซิลิกาแล้ว จะสามารถเตรียมซิลิกาที่มีคุณภาพสูงมากได้

กระบวนการสะสมของซิลิกาในพืชนั้นมีผู้ศึกษาอยู่บ้าง การศึกษาในช่วงแรกนั้น Lanning และคณะ, 1958; Lanning, 1963 ได้ศึกษาถึงแหล่งและสมบัติของซิลิกาในพืชต่าง ๆ ได้แก่ ดอกทานตะวัน, ข้าวสาลี, ข้าวโพด, ไผ่, และเลนทานา ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั้งหมด พบว่าซิลิกาส่วนใหญ่จะสะสมอยู่ในชั้นอิพิเดอร์มิสของส่วนต่าง ๆ ของพืชที่เป็นส่วนจำเพาะ ขนาดอนุภาคของซิลิกา จะมีขนาดประมาณ 10-100 ไมครอน Yoshida และคณะ, 1962 ได้ศึกษาถึงซิลิกาในต้นข้าว พบว่ามีการสะสมอยู่ในช่องว่างระหว่างชั้นของคิวติเคิล (cuticle) ซึ่งเป็นชั้นด้านนอกของผิว และชั้นอิพิเดอร์มิสเซลของแกลบ ดังรูป 1 สำหรับการสะสมของซิลิกาในพืชเกิดขึ้นโดยที่ซิลิกาที่ละลายน้ำ (Soluble silica) จากดินจะซึมผ่านเข้าทางรากพืชและเข้าสู่ท่อนำน้ำของพืชไปสะสมในส่วนปลายของพืชที่น้ำไปถึง และเป็นจุดที่มีการระเหยออกของน้ำไปสู่บรรยากาศ Jeffrey, 1987 ศึกษาการสะสมของซิลิกาในพืชต่าง ๆ พบว่าในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะมีการสะสมของซิลิกามากกว่าพืชใบเลี้ยงคู่ประมาณ 10-20 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1. แสดงการเข้าไปสะสมของซิลิกาในข้าว และแหล่งสะสมของซิลิกาในแกลบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

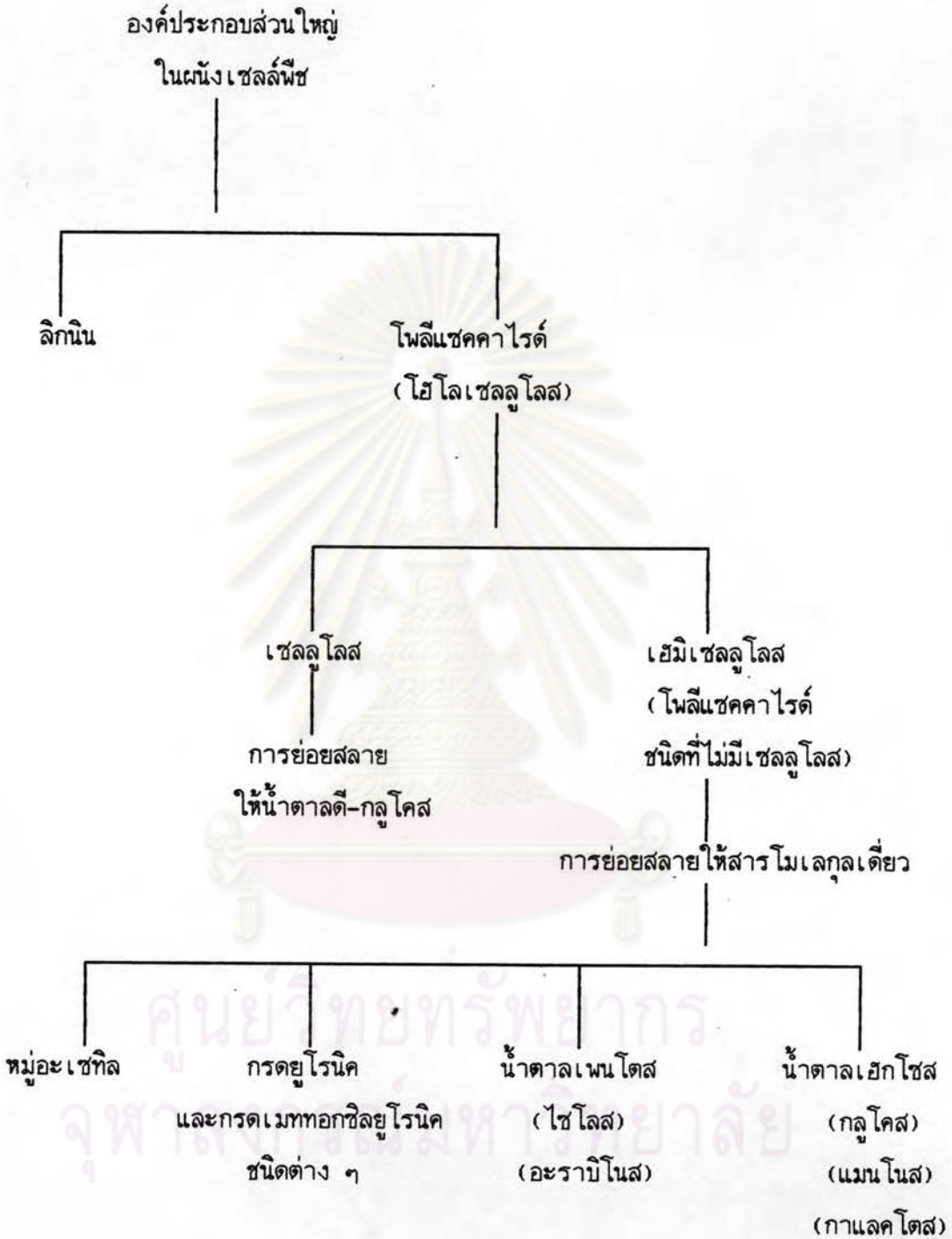
องค์ประกอบของเซลล์พืช

ในเซลล์พืชประกอบด้วย

1. เซลลูโลส เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย ดี-กลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 glucosidic เป็นสายตรงไม่มีแขนงย่อย (unbranched polymer) มีสูตรทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เป็นองค์ประกอบซึ่งให้ความแข็งแรงในพืช ตามธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่มักพบอยู่ร่วมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลส เพนโตแซน (pentosans) กัม (gum) แทนนิน (tannins) ไขมัน และสารเกิดสี (colouring matter) เป็นต้น (Meyer, 1961; Greulch, 1973; Darvill และคณะ, 1980; Paturau, 1989) (รูปที่ 2)

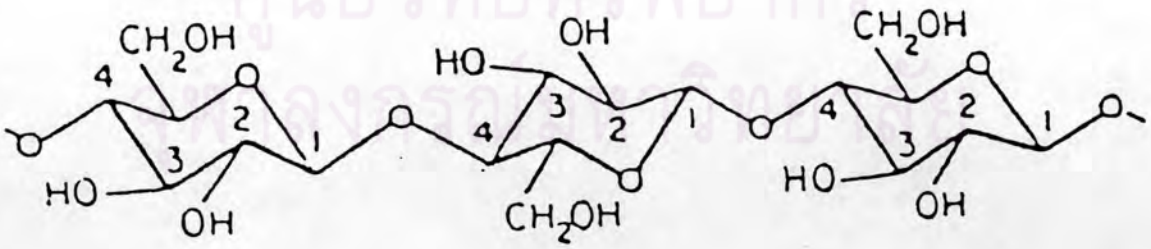
รูปแบบ (conformation) ของการจัดเรียงตัวของหน่วย ดี-กลูโคสในสายเซลลูโลสจะมีลักษณะเป็นรูปเก้าอี้ (chair form) แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลส (intramolecule) จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) สองแห่งคือ ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวน (ring) ของโมเลกุลถัดไป และระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับ 2 ของโมเลกุลถัดไป นอกจากนี้ยังมีการเชื่อมต่อระหว่างสายเซลลูโลส (intermolecule) ที่ขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ในอีกสายหนึ่ง ดังแสดงในรูปที่ 3.

จำนวนหน่วยย่อยของกลูโคสในสายของเซลลูโลส จะมีตั้งแต่ประมาณ 15 หน่วย จนถึงประมาณ 10,000-14,000 หน่วย (Cowling และ Kirk, 1976) โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.5 MDa (Brown, 1983) ขึ้นกับชนิดของพืช จากที่กล่าวแล้วว่าโดยธรรมชาติของเซลลูโลสจะไม่อยู่ในรูปเซลลูโลสอิสระ แต่จะเชื่อมอยู่กับโพลีแซคคาไรด์อื่น ๆ เช่น เพคติน, เฮมิเซลลูโลส, แป้ง และ phenolic polymer ของลิกนิน (Cowling และ Kirk, 1976; Lutzen และคณะ, 1983)

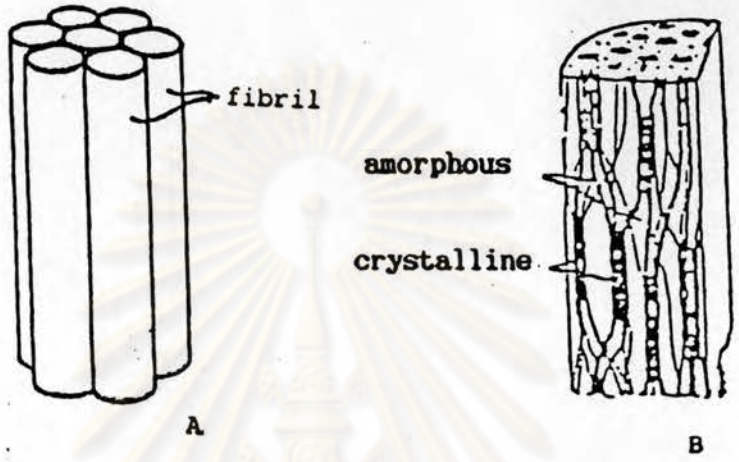


รูปที่ 2. แสดงการแยกองค์ประกอบในเซลล์พืช (Greulch, 1973)

Cowling และ Kirk (1976) ศึกษาถึงโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสในพืช พบว่าในส่วนของ secondary cell wall จะเป็นส่วนที่พบเซลลูโลสมากที่สุดและจะมีปริมาณลดลงในส่วนของ middle lamella ส่วนเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน จะพบมากในส่วน middle lamella และจะมีปริมาณลดลงในส่วนของ secondary cell wall ทั้งนี้เซลลูโลส และองค์ประกอบชนิดอื่นของผนังเซลพืชจะเรียงตัวเป็นกลุ่มยาวเรียก microfibrils ดังรูปที่ 4 microfibril แต่ละสายจะเชื่อมต่อระหว่างสายที่ขนานกันด้วย พันธะไฮโดรเจน บริเวณที่มีการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลสอย่างเป็นระเบียบสูง (highly order) เรียกว่าบริเวณ crystalline ส่วนบริเวณที่มีการจัดเรียงไม่เป็นระเบียบหรือเป็นระเบียบน้อยกว่า (less order หรือ disorder) เรียกว่าบริเวณ amorphous หรือ paracrystalline (Cowling และ Kirk, 1976; Brown, 1983; Lee และคณะ, 1983; Wald และคณะ, 1984) ดังรูปที่ 4 บริเวณที่เป็น crystalline จะมีประมาณ 50-90 เปอร์เซนต์ ส่วนที่เหลือจะเป็น amorphous (Fan และ Lee, 1983; Tsao และ Chiang, 1983) แต่ละบริเวณจะยอมรับการเข้าทำปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ แตกต่างกัน โดยบริเวณ amorphous ยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายได้ง่ายกว่า บริเวณ crystalline (Fan และ Lee, 1983; Lee และคณะ, 1983) ดังนั้นกลไกการย่อยสลายจะเกิดขึ้นที่บริเวณ amorphous ได้เร็วกว่าและเกิดขึ้นก่อนบริเวณ crystalline (Sasaki, 1982)



รูปที่ 3. แสดงลักษณะการจัดเรียงตัวของหน่วยกลูโคสในเซลลูโลส (Nisizawa, 1973)



รูปที่ 4. ลักษณะของไมโครไฟบริล (Nisizawa, 1973)

A : กลุ่มไมโครไฟบริลที่เรียงตัวขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน

B : ภาพตัดตามยาวของไมโครไฟบริล

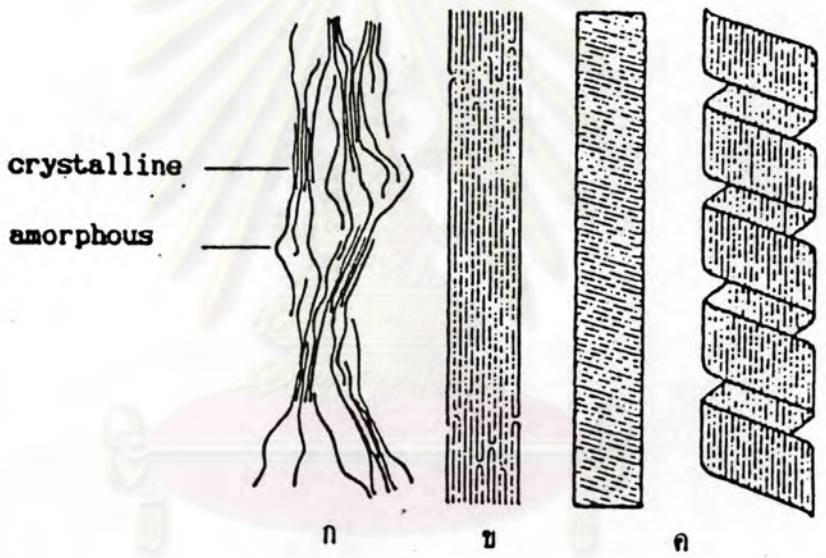
สามารถแบ่งลักษณะโครงสร้างเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืช ตามการจัดเรียงตัวของไมโครไฟบริลได้ 3 ลักษณะ คือ

1. ฟริงจ์ไมเซลล์ (fringe micelles) คือไมโครไฟบริลที่เรียงตัวเป็นริ้ว ๆ ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) และอสัณฐาน (amorphous) รูปที่ 5 ก.

2. โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส รูปที่ 5 ข.

3. โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นริบบินหนา เกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้งฉากกับแกนของริบบิน และริบบินจะม้วนเป็นเกลียว (helix) รูปที่ 5 ค.

ผนังเซลล์ของพืชจะมีเซลลูโลสจัดเรียงตัวเป็นแถบ ๆ ไม่ติดต่อกันโดยตลอด เมื่อเซลล์แก่เต็มที่ภายในช่องว่างจะเต็มไปด้วยลิกนิน นอกจากนี้ยังมีโพลีแซ็กคาไรด์อื่น ๆ ที่ปนอยู่กับเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ได้แก่ ไซแลน (xylan), แมนแนน (mannan), โพลียูโรไนด์ (polyuronide), อะระแบน (araban), กาแลคแตน (galactan) โพลีแซ็กคาไรด์เหล่านี้มักพบในปริมาณที่น้อยกว่าเซลลูโลส



รูปที่ 5. โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป (Nisizawa, 1973)

ก. ฟริงต์ไมเซลล์ (fringe micelles) ในไมโครไฟบริล
ข. โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส
ค. โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นริบบินหนา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปกติเซลลูโลสนั้นไม่ละลายน้ำในตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายด่างอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในกรดหรือด่างแก่ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามลักษณะการละลายในกรดหรือด่างได้เป็น 3 ชนิด (Paturua, 1989)

1. แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ความเข้มข้นร้อยละ 17.5

2. เบตา-เซลลูโลส (β-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 17.5

3. แกมมา-เซลลูโลส (γ-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สุด สามารถละลายได้ดีทั้งในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 และสารละลายกรดเจือจาง

2. <u>เฮมิเซลลูโลส</u> เป็นอินทรีย์สารที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส และถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ (polymer) ของน้ำตาลเพนโตส (pentose) มีลักษณะเป็นเฮเทอร์โรจีเนียส (heterogenous) โดยประกอบด้วยโพลีแซ็กคาไรด์หลายชนิดมารวมกัน มีลักษณะโครงสร้างเป็นกิ่งก้านสาขา ซึ่งแตกต่างจากเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงอย่างมีระเบียบ น้ำหนักโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสจะต่ำกว่าเซลลูโลส ขนาดของโมเลกุลมีความยาว 30-50 หน่วย และมีองค์ประกอบหลักคือ ไซแลน นอกจากนี้ยังมีกลูแคน (glucan) แมนแนน และ กาแลคแตน เฮมิเซลลูโลสเมื่อถูกย่อยสลายจะได้เป็นน้ำตาลเพนโตสและเฮกโซส (hexose) ได้แก่ ไซโลส (xylose) แมนโนส (mannose) กาแลคโตส (galactose) และ อะราบิโนส (arabinose)

ไซแลน ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบหลักในเฮมิเซลลูโลส นั้นเป็นโพลิแซคคาไรด์ของ ดี-ไซโลส ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ β-1,4-xylosidic สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มด้วยกันโดยอาศัยสมบัติการละลาย คือ

ก. ไซแลนที่ละลายในสารละลายด่าง ซึ่งเป็นไซแลนที่พบมากในเฮมิเซลลูโลสของพืชทั่วไป

ข. ไซแลนที่สามารถละลายน้ำได้ หรือ เรียกว่า "อะราบิโนไซแลน" ที่พบมากในธัญญพืช โดยเป็นโพลิเมอร์ของไซโลสที่มีกิ่งก้านสาขาเป็นโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่น ๆ ปนอยู่ เช่น (เมธิล)-กลูคูโรโนไซแลนในพืชพวกไม้เนื้อแข็ง (Biely, 1985) เพนโตแซน ก็เป็นโพลิเมอร์อีกรูปหนึ่งของเฮมิเซลลูโลส ประกอบด้วย ไซโลส, อะราบิโนส และกรดยูโรนิก

3. ลิกนิน เป็นสารประกอบที่มีอยู่ในพืช รองลงมาจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส พบใน secondary layer ของผนังเซลล์และใน middle lamella ของพืช ในพืชที่อ่อนอยู่มีลิกนินเพียงเล็กน้อย และจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อพืชแก่ขึ้น โครงสร้างของลิกนินเป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) ที่ประกอบด้วยหมู่เมทธอกซี (methoxy group, $-OCH_3$) หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) และส่วนที่เป็นสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compound) โดยปกติไม่สามารถระบุได้ว่าลิกนินเป็นสารประกอบประเภทใด เพราะไม่สามารถกำหนดโครงสร้างที่แน่นอนได้ ทั้งนี้เนื่องจากลิกนินจะไม่อยู่ในลักษณะตัวเดียวโดด ๆ แต่จะเกาะกันเป็นสายยาวซึ่งมีอยู่หลายแบบ ลิกนินไม่ละลายในน้ำและสารอินทรีย์

เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดรวมกัน (multi-component enzyme) โดยจะมีองค์ประกอบของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด มาทำงานร่วมกัน (Reese, 1963, Ryu และ Mandels, 1980; Fan และ Lee, 1983; Montenecourt, 1983) อันได้แก่

1. Exo β-1,4 glucan cellobiohydrolase หรือ exoglucanase หรือ C_1 (E.C. 3.2.1.91) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสและโอลิโกเซลลูโลสจากปลายด้าน non-reducing end ได้เซลโลไบโอสและเซลลูโลสสายสั้น ๆ

$$\text{cellulose (amorphous cellulose)} \xrightarrow{\text{exoglucanase } (C_1)} \text{cellobiose + short chain cellulose}$$

2. Endo-β-1, 4 glucan glucanohydrolase หรือ endoglucanase หรือ C_x (E.C. 3.2.1.4)

การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ตัดพันธะ β-1, 4 glucosidic ภายในสายเซลลูโลสในบริเวณที่เป็น amorphous หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น carboxymethyl cellulose, walseth cellulose และ cell-oligomers เอนไซม์นี้จะตัดพันธะอย่างสุ่ม (random) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ กลูโคส (β-configulation) และ cellobiose โดยจะให้ cellobiose เป็นผลิตภัณฑ์หลัก

$$\text{amorphous cellulose} \xrightarrow{\text{endoglucanase } (C_x)} \text{Cellobiose (main product)+glucose}$$

3. β-glucosidase หรือ cellobiase (E.C. 3.2.1.21)

เป็นเอนไซม์มีหน้าที่ย่อยสลาย cellobiose และ cellodextrins ให้เป็นกลูโคส สามารถย่อยสลาย cellobionic acid ให้เป็น gluconolactone และกลูโคส (Eriksson, 1978)

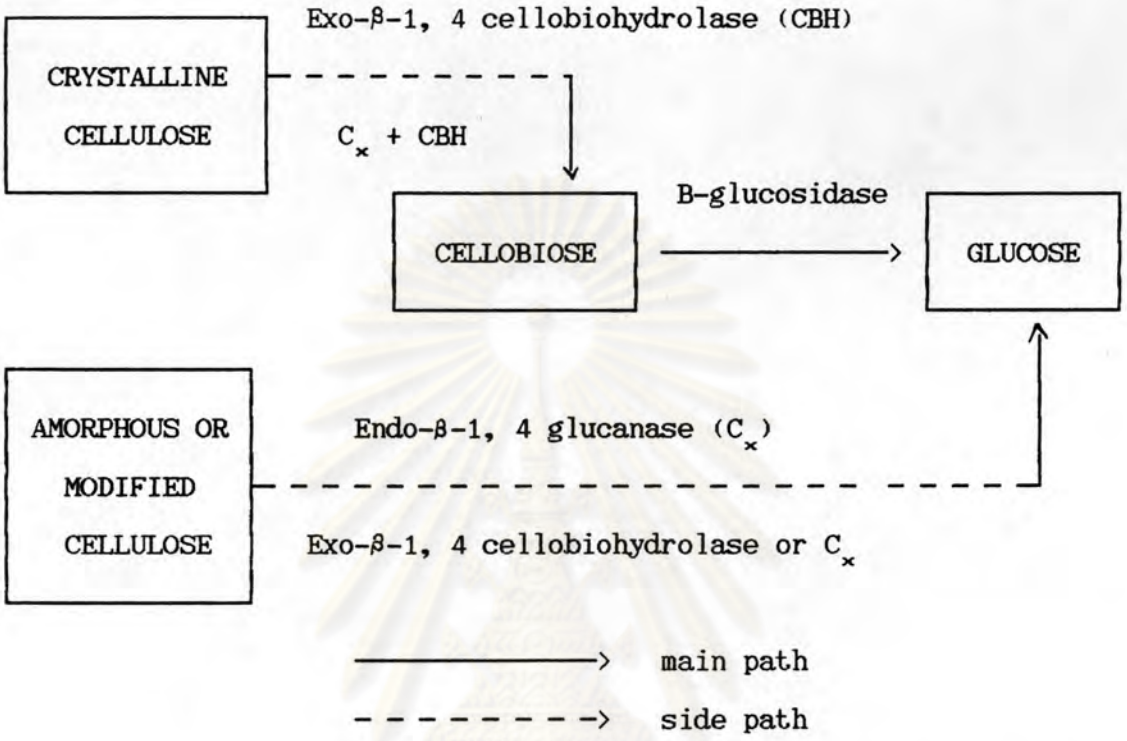
$$\text{cellobiose and cellodextrin} \xrightarrow{\beta\text{-glucosidase}} \text{glucose}$$

ระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Ryu, และคณะ 1980) มีดังนี้คือ

C_1 เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่เข้าย่อยสลายโดยทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายเซลลูโลส ทำให้ได้สายของ D-anhydroglucose ที่สั้นลงเหมาะต่อการย่อยสลายต่อด้วย C_x

C_x จะย่อยสลายพันธะ β-1,4 glucosidic แบบสุ่มได้เป็นเซลโลไบโอสและกลูโคส

Cellobiase จะยอยสลายเซลโลไบโอสทำให้ได้กลูโคสออกมา

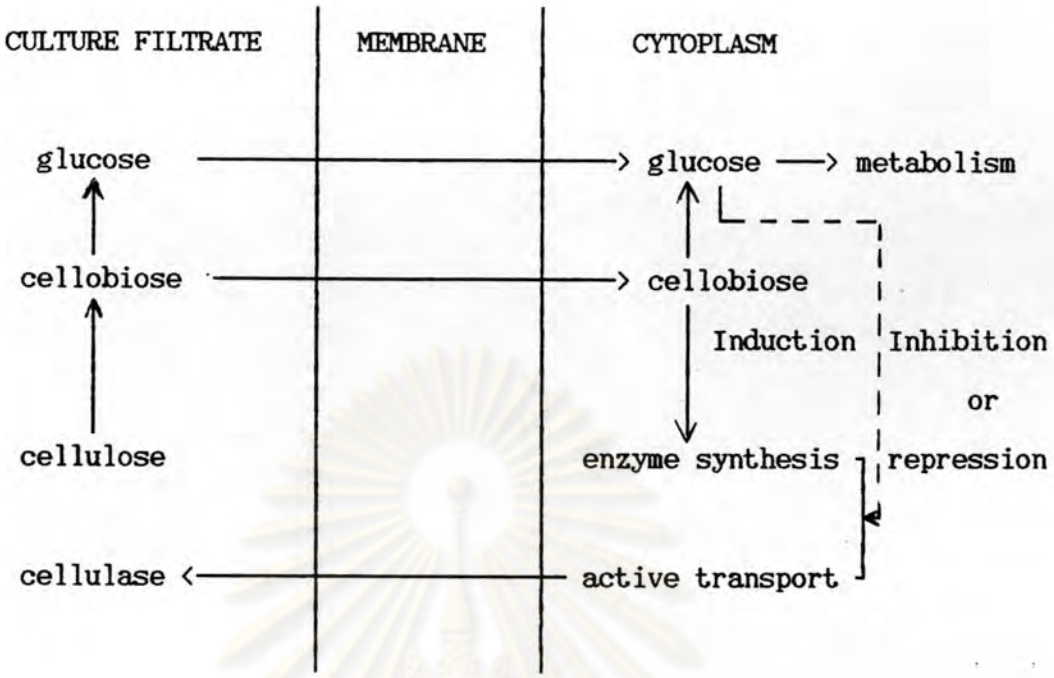


รูปที่ 6. แสดงลำดับการเข้าทำปฏิกริยาการย่อยสลายเซลลูโลส ของระบบเอนไซม์เซลลูโลส ที่มา : Fan และ Lee (1983)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>กลไกการควบคุมการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลส</u>

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ชนิดเหนี่ยวนำ (inducible enzyme) จะสร้างขึ้นเมื่อจุลินทรีย์เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลส หรือสารประกอบที่มีพันธะ B-1, 4-glucosidic เช่น แลคโตส, ซาริชิน, เซลโลไบโอส Ghose และคณะ 1975 ได้ศึกษาการเติมเซลโลไบโอสที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ลงไปในช่วงที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตช้า และโซโฟโรส (sophorose) (Mandels และคณะ, 1962 ; Yamane และคณะ 1965 ; Nisizawa, 1971) โซโฟโรสสามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ของ <u>Trichoderma</u> และ <u>Pseudomonas</u> (Mandels และคณะ, 1962 ; Nisizawa, 1971) ดังนั้น ในสภาพที่มีเซลลูโลสเป็นคาร์บอน จุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสลาย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง สามารถละลายน้ำและสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลได้ ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 การสังเคราะห์และการควบคุมการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในเชื้อรา T. reesei. ที่มา : Ross และคณะ (1983)

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

1. ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ซึ่งจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส มีทั้งรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท โดยราเป็นจุลินทรีย์หลักที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เช่น เชื้อราในกลุ่ม Aspergillus, Trichoderma, Penicillium, Sporotrichum ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่า T.reesei หรือเดิมคือ T.viride เป็นราที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงและมีประสิทธิภาพ การศึกษาส่วนใหญ่ซึ่งเกี่ยวกับสรีรวิทยาของการผลิตเอนไซม์จึงเน้นกับ T.viride Mandel และคณะ (1971) ได้ชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าของ T.viride QM6a โดยการฉายรังสีอีเลคตรอนที่มีพลังงานสูง ได้เป็น T.viride QM 9123 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงเพิ่มขึ้นจากเดิม 2 เท่า และชักนำก่อให้เกิดการผ่าเหล่าของ T.viride QM 9123 ไปเป็น T. viride 9414 และเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับ T. viride สายพันธุ์เดิม (Mandels และ Sternberg, 1976)

2. ส่วนประกอบของอาหาร โดยปรกติแล้ว จะไม่มีอาหารชนิดใดจำเพาะต่อการเพาะเลี้ยง และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แต่จะผันแปรตามชนิดของรา สูตรอาหารที่ใช้เป็นอาหารพื้นฐาน เช่น สูตรของ Meldels และ Reese (1957) จะมีแอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีสารจำเป็นที่สำคัญ (Trace element) เช่น $FeSO_4$, $ZnSO_4$, $MnSO_4$ และ $CoCl_2$ มีรายงานว่า เอนไซม์เซลลูเลสจะถูกสร้างได้มากที่สุดเมื่อเติม trace element ครบทุกชนิดในปริมาณที่เหมาะสม จะขาดสิ่งใดไม่ได้โดยเฉพาะ Zn จะมีผลมากที่สุดต่อการลดปริมาณของเอนไซม์ (Mandels and Reese, 1957)

เซลลูโลสที่บริสุทธิ์ใช้เป็นสารอาหารที่เพิ่มการผลิตเซลลูเลสได้ดีกว่าเซลลูโลสในธรรมชาติ (Gupta และคณะ, 1972) ปริมาณเซลลูโลสที่ใช้ไม่ควรมากกว่า 10% (Mandels และ Andreotti, 1978) เนื่องจากเซลลูโลสที่มีความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อการหมุนของใบพัดในถังเพาะเลี้ยงเชื้อถ้าสามารถควบคุมปริมาณเซลลูโลสที่จะเติมให้เหมาะสม (fed-batch fermentation) ทีละน้อยจะทำให้ใช้เซลลูโลสในปริมาณมากกว่า 10% ได้ (Hendy และคณะ, 1984) Mandels และ Weber (1969) ใช้เปปโตนกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสโดย T.reesei QM 6a Allen (1983) พบมิวแทนท์ที่สามารถใช้แอมโมเนียมไอออนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ Warzywoda และคณะ (1983) พบว่าอาจใช้สารสกัดจากยีสต์แทนเปปโตนได้ ทำให้สามารถผลิตเซลลูเลสได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูก

3. การกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสด้วยสารกระตุ้น เช่นการใช้แลคโตส โซฟอโรส เซลโลไบโอส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Warzywoda และคณะ (1983) พบว่า แลคโตสและเซลโลไบโอสเป็นสารกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสที่ด้อยกว่าเซลลูโลสเมื่อใช้กับสายพันธุ์ดั้งเดิม (native strain) แต่เป็นสารกระตุ้นที่ดีกว่าในเชื้อกลายพันธุ์ Kawamoriและคณะ(1985a) รายงานว่า แอล-ซอโบสสามารถกระตุ้นการทำงานของ CMCase ที่ผลิตโดย T.reesei ได้ Eriksen และ Goksoyr (1976) สามารถใช้ไซแลนและเซลลูโลสกระตุ้นการผลิตเอนโดกลูคาเนสโดย Chaetomium thermophile ได้

Nisizawa และคณะ (1971) พบว่า โซฟอโรสสามารถกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสใน T.viride ได้ ในขณะที่ Whitaker (1971) พบว่า เซลโลไบโอสเป็นทั้งตัวยับยั้งและตัวกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเซลโลไบโอส ถ้าความเข้มข้นต่ำจะกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ แต่ถ้าความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์

4. บทบาทของสารลดแรงตึงผิวต่อการผลิตเอนไซม์ สารลดแรงตึงผิว เช่น ทวีน 80 นั้นสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ได้ (Mandels และ Weber, 1969) การเพิ่มการสร้างเซลลูเลสโดยสารลดแรงตึงผิวนี้อาจเนื่องมาจาก เมื่อเซลลูเลสถูกสร้างขึ้นใน rough endoplasmic reticulum แล้วถูกนำไปเก็บใน golgi apparatus ใน cytoplasm ก่อนจึงปล่อยออกภายนอกเซลโดยขบวนการ exocytosis หรือ autolytic process (Berg และ Petterson, 1977) สารลดแรงตึงผิวจะไปเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านผนังเซลล์ (cell membrane permeabillity) ของเอนไซม์ (Blanch และ Wilke, 1983) Desai และคณะ, (1982) ทดลองเพาะเลี้ยง Scytalidium lignicola ในสารอาหารที่มีทวีน 80 เป็นส่วนผสมพบว่าสามารถผลิตเซลลูเลสได้มากขึ้น

5. สภาวะของการเพาะเลี้ยง การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงมากมายเช่น ความเป็นกรดเป็นด่าง, อุณหภูมิ, การถ่ายเทอากาศ และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น การทดลองที่แตกต่างกันในห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ไม่อาจสรุปผลของปัจจัยที่แน่นอนลงได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป

5.1 ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเจริญและมีกิจกรรมต่าง ๆ ในสภาพที่เป็นกลาง แต่ในสภาพที่เป็นกรด เชื้อราจะเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรานั้น Limtong และคณะ (1981) ได้ทำการศึกษาผลของ pH เริ่มต้นในอาหารต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย Aspergillus sp. 26$_p$57 โดยใช้ pH ตั้งแต่ 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือ 6.5 Tangnu และคณะ (1981) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก T.reesei เมื่อเลี้งในอาหารที่มีเซลลูโลส 2.5% และ 5% ที่ pH 4.0, 5.0 และ 6.0 พบว่าที่การควบคุม pH ที่ 5.0 จะได้ค่า FPase แอคติวิตีที่สูงกว่า pH 4.0 และ 6.0

5.2 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิสูง แต่บางชนิดผลิตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ Loginova และ Tashpulatov (1965) ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ Aspergillus 21B$_8$ ทั้งสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophile) และสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophile) พบว่า สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่อุณหภูมิ 30 °ซ ส่วนสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้ดีที่อุณหภูมิ 45 °ซ นอกจากนี้ Gard และ Neelakantan (1982) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ A.terreus GN1 ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 65, 70, 75 และ 80 °ซ พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 60 °ซ

5.3 ปริมาณออกซิเจนในการเลี้ยงราเพื่อผลิตเอนไซม์ Andren และ Nystrom (1976) พบว่า การเพาะเลี้ยง T.reesei ในอาหารที่มีออกซิเจนละลายอยู่น้อยกว่าร้อยละ 10 (dissolved oxygen tension, DOT) จะลดการเจริญของเชื้อและลดการผลิตเซลลูเลส Robinson (1984) ทดลองเลี้ยง T.reesei Rut C 30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมี DOT ร้อยละ 10 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี

ขั้นตอนการผลิตซิลิกา

การผลิตซิลิกาจากแกลบตามวิธีของ Jame และ Rao, 1986;Chen และ Chang, 1991; อุไรวรรณ, 2535; Conradt, 1992 ประกอบขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน คือ

1. การปรับสภาพของแกลบ (pretreatment)

เป็นขั้นตอนที่กำจัดสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ที่ไม่ใช่ซิลิกาออกไปให้มากที่สุด โดยนำแกลบมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับแกลบให้ออกไป แล้วนำแกลบที่ล้างแล้วไปอบแห้ง และนำมาผ่านขั้นตอนการปรับสภาพของแกลบ (pretreatment) โดยการใช้ขั้นตอน 2 วิธี ได้แก่

ก. การใช้สารเคมี โดยการต้มแกลบในกรดและด่างชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก (HCl), กรดซัลฟูริก (H_2SO_4), กรดไนตริก (HNO_3) และด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

ข. การใช้เอนไซม์ โดยการย่อยแกลบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และการใช้เอนไซม์ร่วมกับการใช้กรด

2. การเผา (incineration)

เป็นการเผาทำลายสารอื่น ๆ ที่เหลืออยู่เพื่อให้ได้ซิลิกาออกมาเพียงอย่างเดียว สำหรับวิธีของอุไรวรรณ ลีลาอดิศร เผาแกลบที่ผ่านการปรับสภาพและอบแห้งแล้วที่อุณหภูมิ 600°ซ. เป็นเวลา 6 ชม.

รูปที่ 8. แผนผังการผลิตซิลิกาจากแกลบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร</u>

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด แกลบ โดยทั่วไปจะมีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินเป็นส่วนประกอบ เมื่อนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาย่อย ถ้าปฏิกริยาการย่อยเซลลูโลสเกิดอย่างสมบูรณ์แล้วจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสเท่านั้น แต่หากปฏิกริยาเกิดแบบไม่สมบูรณ์ จะได้โพลิเมอร์ของกลูโคสในขนาดต่างๆ หลายชนิดปนกัน เช่น เซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคาไรด์

การย่อยวัสดุทางการเกษตร ทำได้ 2 วิธีคือ

1. การย่อยด้วยสารเคมี (chemical hydrolysis)
2. การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

1. การย่อยด้วยสารเคมีแบ่งตามวิธีของ Paquot และคณะ (1984) ได้เป็น 2 ประเภท คือ

1.1 การย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) แบ่งเป็น 2 กระบวนการ คือ

1.1.1 Homogenous process เป็นกระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดซัลฟูริก ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่มีข้อเสีย คือ ต้องมีการแยกกรดออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้ และจะมีปัญหาด้านการผุกร่อนของเครื่องมือ

1.1.2 Heterogenous process เป็นกระบวนการใช้กรดอ่อนกว่า แต่ใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 180 องศาเซลเซียส วิธีนี้ไม่สามารถนำกรดกลับมาใช้ใหม่ นิยมใช้กันมากในอุตสาหกรรมการผลิต ไฮโดรเซลลูโลส (hydrocellulose) และ gel - form microcrystalline cellulose แต่จะให้ผลผลิตต่ำ (50-55 %) การย่อยด้วยกรด จะทำให้เพนโตแซนในเฮมิเซลลูโลสเปลี่ยนเป็นเฟอฟูรัล ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Paturau, 1989) ดังสมการ

$$\underset{\text{เพนโตแซน}}{C_5H_8O} \longrightarrow \underset{\text{เพนโตส}}{C_5H_{10}O_5} \longrightarrow \underset{\text{เฟอฟูรัล}}{C_5H_4O_2}$$

1.2 การย่อยด้วยด่าง (alkaline hydrolysis)

สารละลายด่างที่นิยมใช้ เช่น สารละลายเจือจางของโซเดียมไฮดรอก-

สายของโพลีแซคคาไรด์สั้นลง ปฏิกริยานี้เกิดในสภาพอุณหภูมิสูงประมาณ 160 ถึง 180 องศาเซลเซียส และต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อยเพื่อใช้ในการย่อยเฮมิเซลลูโลส

แม้ว่าการย่อยด้วยกรดจะเป็นวิธีที่ใช้กันในอุตสาหกรรมแต่ก็ยังมีข้อเสียด้วย โดยแสดงไว้ในตารางที่ 7

2. การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

เป็นการย่อยวัสดุทางการเกษตรด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Parisi, 1989; Woodward, 1987) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งรา และ แบคทีเรีย แต่เอนไซม์ที่นิยมใช้ คือ เซลลูเลสจากราโดยเฉพาะ Trichoderma viride (หรือภายหลังจัดอยู่ใน T.reesei) (Parisi, 1989) วิธีนี้นิยมใช้ในการย่อยวัสดุทางการเกษตร โดยมีข้อดีและข้อเสียดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 7. เปรียบเทียบผลดีและผลเสียในการย่อยวัสดุทางการเกษตรด้วยกรดและด่าง

ผลดี	ผลเสีย
1. วัสดุการเกษตรไม่ต้องผ่านการปรับสภาพ (pretreat) ก่อน 2. ปฏิกิริยาเกิดเร็ว ง่าย และสั้น 3. คะตะไลซ์ที่ใช้ในปฏิกิริยามีราคาถูก และและหาได้ง่าย 4. ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ (ถ้าใช้กรดแก่) 5. ให้ผลิตภัณฑ์สูง (ถ้าใช้กรดแก่)	1. ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่เจาะจง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่บริสุทธิ์ 2. น้ำตาลที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น furfural และสารเคมีอื่น ๆ 3. ต้องใช้อุณหภูมิสูง (กรณีใช้กรดอ่อน) 4. ถ้าใช้กรดแก่ จำเป็นต้องมีกระบวนการแยกกรดออกมา(recovery)ซึ่งราคาสูง 5. ก่อนนำน้ำตาลไปใช้จำเป็นต้องมีกระบวนการทำน้ำตาลให้เป็นกลางก่อน 6. by-product ของการย่อยด้วยกรด เช่น เฟอร์ฟูรัล อาจเป็นพิษต่อเซลล์ 7. ต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่สามารถทนกรดได้

ที่มา : Woodward (1987) และ Parisi (1989)

ตารางที่ 8. เปรียบเทียบผลดีและผลเสียในการย่อยวัสดุการเกษตรด้วยเอนไซม์

ผลดี	ผลเสีย
1. สภาวะที่ใช้ทั้งอุณหภูมิและ ความเป็นกรดด่างไม่รุนแรง 2. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่ถูกย่อยเปลี่ยนเป็นสาร เช่น เฟอร์ฟูรัล ที่เป็นพิษต่อเซลล์เป็นต้น 3. สามารถทำการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยวัสดุการเกษตรได้ 4. ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนการกัดกร่อน หรือราคาแพง	1. วัสดุทางการเกษตร ต้องผ่านการปรับสภาพก่อน 2. ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของมันได้ (product inhibition) 3. สูญเสียเอนไซม์ไปเนื่องจากถูกดูดซับอยู่วัสดุที่ไม่ถูกย่อย

ที่มา : Woodward (1987) และ Parisi (1989)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร</u>

ในการจะย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบ ฯลฯ ด้วยเอนไซม์ให้ได้ผลดีมีประสิทธิภาพสูงขึ้น นั้น จำเป็นต้องทำการปรับสภาพวัสดุนั้นเสียก่อน ทั้งนี้เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร จะมีเซลลูโลสที่ไม่ได้อยู่ในรูปอิสระ แต่จะอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ระหว่างลิกนิน-เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ซึ่งทำให้แน่นและยากต่อการย่อยโดยเอนไซม์ เนื่องจากโครงสร้างที่ซับซ้อนของคาร์โบไฮเดรทเหล่านี้ และดังที่กล่าวแล้วว่า ลิกนินที่อยู่รวมกับเซลลูโลส จะเป็นตัวป้องกันการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นการปรับสภาพ

วัสดุทางเกษตร จะเน้นการเตรียมวัตถุดิบให้เหมาะสมต่อการย่อยของเอนไซม์ โดยการทำลายโครงสร้างผลึก (Crystalline) ในเซลลูโลส และสารประกอบเชิงซ้อนของลิกนินและคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น รวมทั้งการกำจัดลิกนินออกไปทำให้เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของเซลลูโลสมีมากขึ้นสำหรับจะสัมผัสกับเอนไซม์ได้มากขึ้น และทำให้เซลลูโลสพองตัว มีความสามารถในการละลายสูงขึ้น (Dekker และ Willis, 1983; Woodward, 1987 ; Parisi, 1989)

วิธีปรับสภาพแบ่งได้เป็น 2 วิธีการใหญ่ ๆ (Millett, 1976, Parisi, 1989, กนก, 2528)

1. วิธีทางกายภาพ (physical pretreatment)

1.1 การบด ตัด ลดขนาดวัตถุดิบ เป็นการบดผลึกของเส้นใยเซลลูโลสให้แตกออก ทำให้ขนาดวัตถุดิบเล็กลง ทำให้พื้นที่ผิวของวัตถุดิบเพิ่มขึ้น จึงสัมผัสกับเอนไซม์ได้มากขึ้น จึงทำให้การย่อยของเอนไซม์ดียิ่งขึ้น เครื่องมือที่ใช้ เช่น ball mill, hammer mill และ roller mill เป็นต้น

1.2 การใช้ความร้อนและความดัน จะทำให้ส่วนของเฮมิเซลลูโลสสลายตัวออกจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรม ส่วนเซลลูโลสและลิกนินยังคงอยู่ในวัสดุเหลือทิ้งเหล่านั้น แต่การย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะเกิดได้มากขึ้น (Buchhdz และคณะ 1980/1981) เช่น กระบวนการ steam explosion เป็นการปรับสภาพโดยใช้ไอน้ำอุณหภูมิสูงภายใต้ความดัน แล้วลดความดันทันที ทำให้น้ำระเหยรวดเร็วเส้นใยเซลลูโลสแยกออกจากกัน

1.3 การใช้รังสีต่าง ๆ เช่น x-ray, r-ray, uv-ray จะทำให้ degree of polymerization, ดัชนีความเป็นผลึก (crystallinity index) ลดลง และเพิ่มความสามารถในการอมน้ำ (swelling)

2. วิธีทางเคมี (chemical pretreatment)

การใช้สารเคมีทำให้พื้นที่ผิวของสับสเตรทมากขึ้น และปริมาณของลิกนินและผลึก (crystalline) ลดลง ทำให้เซลลูโลสมีการละลายน้ำหรืออมน้ำ (swell) มากขึ้น การใช้สารเคมีแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

2.1 Alkaline treatment การใช้ด่าง เช่น NaOH

2.2 Acid treatment การใช้กรด เช่น HCL, H_2SO_4

2.3 Oxidizing agents treatment ตัวอย่างสารเคมี ได้แก่ $NaClO_2$, $KBrO_2$, KIO_3, SO_2, O_3

การศึกษาการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านขั้นตอนการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ Knappert, Grethlein และ Alvin (1980) ศึกษาการใช้กรดอ่อนในการปรับสภาพฟางข้าวโอ๊ต พบว่าการใช้กรด 1 % ที่อุณหภูมิ 189 องศาเซลเซียส เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้ว จะได้กลูโคสถึง 90.4 % ในขณะที่ฟางข้าวโอ๊ตที่ไม่ผ่านการปรับสภาพจะให้กลูโคสเพียง 21.3 %

Vidand (1982) ได้ใช้วิธีทางฟิสิกส์และทางเคมีในการ pretreat ฟางข้าวก่อนที่จะนำไปย่อยสลายโดยเอนไซม์ พบว่าการใช้การบด (grinding) และติดตามด้วยการใช้ความร้อน (110 องศาเซลเซียส 30 นาที) จะเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายโดยเอนไซม์ได้มาก

Rao (1983) ได้ทำการทดลอง pretreat ชานอ้อยด้วย 1 N NaOH ที่ทำให้ร้อนและ neutralize ด้วย HCl และ pretreat ด้วยไอน้ำเปรียบเทียบกับชานอ้อยที่ไม่ได้ผ่านการ pretreat ปรากฏว่าชานอ้อยที่ไม่ได้ผ่านการ pretreat เปลี่ยนเป็นน้ำตาล โดยการย่อยสลายของเอนไซม์ cellulases จากเชื้อ Penicillium funiculosum 17 เปอร์เซนต์ pretreat ด้วยด่างและ neutralize เปลี่ยนเป็นน้ำตาล 63 เปอร์เซนต์ และส่วนที่ pretreat ด้วยไอน้ำเปลี่ยนเป็นน้ำตาล 52 เปอร์เซนต์

Manonmani และ Sreekantieh (1987) ศึกษาการใช้ด่าง 1.5 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน (autoclave) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดปริมาณลิกนินได้ถึง 80.69% และเมื่อนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก T.viride ที่ความเข้มข้น 1.0 หน่วยต่อ มล. สภาวะการย่อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 4.8 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้น้ำตาลรีดิวซ์ถึง 87.75%

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีหลายชนิด โดยจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ รา แบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท.

รา

ราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสมีอยู่หลายชนิด ซึ่งพอจะแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 2 กลุ่มคือ

1) ราที่ต้องการอากาศ (aerobic fungi)

เป็นกลุ่มรากลุ่มใหญ่ของราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมาก ตัวอย่างของรากลุ่มนี้ ได้แก่ Aspergillus terreus, Aspergillus fumigatus, Trichoderma reesei, Trichoderma harjianum, Trichoderma Koningii, Penicillium purpurogenum, Penicillum funiculosum, Fusalium solani, Sporotrichum pulverulentum, Sclerotium rolfsii, Tolaromyces emersonii, Polyporus adustus, Myrothecium verrucaria. (Rehm, 1983; Alexander, 1976; Reichelt, 1983; Enari, 1983)

รากลุ่มนี้จะสร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกและปลดปล่อยนอกเซล(extracellular cellulase) โดยเอนไซม์เซลลูเลสของราเหล่านี้จะประกอบด้วยเอนไซม์หลัก 3 ชนิด endo-β-1,4-glucanase (endo-β-1, 4 glucan glucanohydrolase ทำหน้าที่ตัดพันธะ β-1, 4 glucosidic ภายในโมเลกุลของเซลลูโลสแบบสุ่ม ทำให้ได้สายของเซลลูโลสที่สั้นลงอาจได้เป็นเซลโลไบโอสและกลูโคส,exo-β-1,4-glucanase หรือ cellobiohydrolase ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสจากปลาย non-reducing end และ β-glucosidase ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอสได้เป็นกลูโคส ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด นั้นเป็นเอนไซม์หลักของระบบเอนไซม์เซลลูเลสของรา ซึ่งในการย่อยสลายเซลลูโลสชนิดผลึก (crystalline cellulose) อย่างสมบูรณ์นั้นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลักทั้ง 3 ชนิดนี้ (Wood และ McCrae, 1979) เอนไซม์ของราบางชนิดอาจจะสร้างเอนไซม์อย่างอื่นอยู่ด้วยนอกเหนือจากเอนไซม์หลัก 3 ชนิดนี้ แต่ก็เป็นส่วนประกอบส่วนน้อย เช่น glucohydrolase (β-1, 4-glucan-glucohydrolase) (Wood และ Mc Crae, 1972) Cellobiose oxidase (Ayers และคณะ, 1978)

2) ราที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic fungi)

ราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มนี้จะพบในลำไส้ของสัตว์หลายชนิด โดยอยู่รวมกันกับแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลสมีหน้าที่สำคัญในการย่อยเซลลูโลสของพืชที่สัตว์บริโภคเข้าไปรากลุ่มนี้ได้แก่ Neocallimastix frontalis, Piromonas communis, Sphaeromonas communis.

Neocallimastix frontalis นั้นมีรายงานว่าสามารถพบได้ในลำไส้ของแกะ (Wood และคณะ, 1986) รากลุ่มนี้สร้างเอนไซม์เซลลูเลสและปลดปล่อยออกสู่ภายนอก (extracellular enzyme) สามารถย่อยเซลลูโลสชนิดผลึกและเซลลูโลสสายสั้นได้ และพบว่าระบบของเอนไซม์เซลลูเลสของรากลุ่มนี้กับเอนไซม์เซลลูเลสของราต้องการอากาศจะประกอบด้วยเอนไซม์หลัก ๆ และระบบการทำงานที่เหมือนกัน (Wood, 1989)

ในราทั้งสองกลุ่มนี้กลุ่มราที่ต้องการอากาศ ได้รับการศึกษาในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากกว่ากลุ่มราที่ไม่ต้องการอากาศ ในกลุ่มราต้องการอากาศที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสราที่ได้รับความนิยมและเป็นราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ปริมาณที่สูง คือ Trichoderma reesei (Sternberg, 1976), (Rehm และ Reed, 1987) ชื่อเดิมคือ Trichoderma viride (Parisi, 1989) (Reese และ Mandels, 1984) โดยรานี้ได้ถูกนำมาศึกษาและจัดจำแนกโดยห้องปฏิบัติการทางการทหารของกองทัพสหรัฐ (U.S. Army Natrick Laboratories) โดยถูกจัดเก็บรวบรวมเป็นรหัส QM สายพันธุ์แรกคือ Trichoderma viride QM 6 a ซึ่งเป็นราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง (Mandels และ Sternberg, 1976) จากนั้นได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์จาก Trichoderma viride QM 6a โดยการทำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสีได้เป็น T. viride QM 9123 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่า T. viride QM6a และได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ โดยการนำ T. viride QM 9123 ฉายด้วยรังสีแกรมมาได้สายพันธุ์ใหม่คือ T. viride QM 9414 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด ต่อมาเปลี่ยนชื่อเป็น T. reesei

ตารางที่ 9 สายพันธุ์รา Trichoderma ที่เก็บในศูนย์เก็บรวบรวม Natrick

QM No.	ATCC No.	Type	Cellulase Activity FPase (U./ml.)
6a	13631	Wild strain	0.5-0.7
9123	24449	Enhanced cellulase mutant derived from QM 6a	1.0-1.2
9414	26921	Enhanced cellulase mutant derived from QM 9123	1.5-2.0

ที่มา : Mandels, M. และ Sternberg, D., 1976

ซึ่งรา Trichoderma reesei QM 9414 เป็นราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณที่สูง และเป็นราที่นิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2. แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้มีอยู่หลายสกุล เช่น Clostridium, Cellulomonas Pseudomonas, Micromonospora, Cytophaga, Cellvibrio, ซึ่งพอจะจำแนกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 2 กลุ่ม คือ

2.1 แบคทีเรียต้องการอากาศ (aerobic bacteria) เช่น Cytophaga, Cellvibrio, Cellulomonas, Pseudomonas เป็นต้น

2.2 แบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.2.1 แบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศชอบอุณหภูมิปานกลาง (anaerobic mesophile) ได้แก่ Clostridium cellobioparum, Ruminococcus albus Bacteriodes succinogenes, Acetivibrio cellulolyticus

2.2.2 แบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศชอบอุณหภูมิสูง (anaerobic thermophile) ได้แก่ Clostridium thermocellum, Plectridium cellulolyticum, Clostridium ellipsosporogenes

Cellulomonas เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศแกรมบวก สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสและมีการศึกษาอย่างกว้างขวางคือ Cellulomonas fimi (Miller และคณะ,1988)

เอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างโดยแบคทีเรียชนิดนี้ในอาหารมีเซลลูโลสเป็นแหล่งของคาร์บอน จะสร้างเอนไซม์เซลลูเลสหลายชนิด โดยเอนไซม์ที่สร้างส่วนใหญ่จะเป็นเอนไซม์ที่ยึดติดกับเซลลูโลส (cellulose-bound enzyme) มีส่วนน้อยที่เป็นเอนไซม์อิสระ เอนไซม์หลักที่พบในเอนไซม์เซลลูเลสคือ เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) มีความสามารถย่อยคาบอกซีเมธิลเซลลูโลสได้ดี ส่วนเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) นั้นพบว่ามีส่วนน้อยและไม่เด่นชัดนัก และเอนไซม์ β-glucosidase จะสร้างอยู่ภายในเซล (intracellualar) และจะมีการปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลได้เพียงน้อยมาก (Enari, 1983)

Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศแกรมลบ จากการศึกษาของ Hazlewood และคณะ,(1992) ทดลองผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดนี้ที่ 37°ซ. พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสส่วนใหญ่คือเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) และเอนไซม์ชนิดนี้จะถูกชักนำให้สร้างด้วยแหล่งของเซลลูโลส คือ เอวิเซล (avicel), กระดาษกรองและคาร์บอกซีเมททิวเซลลูโลส และถูกยับยั้งการสร้างด้วยเซลโลไบโอสและกลูโคส และพบว่าแบคทีเรียนี้สร้างเอนไซม์ไซแลนเนส (Xylanase) อีกด้วย การสร้างเอนไซม์จะถูกปล่อยออกนอกเซลมาสู่ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ แต่พบว่าในอาหารผลิตที่ใช้เอวิเซล หรือกระดาษกรองเป็นแหล่งเซลลูโลส จะพบว่ามีเอนไซม์สัดส่วนปริมาณมากไปยึดแน่นกับเซลลูโลสชนิดไม่ละลายน้ำ

Clostridiun thermocellum เป็นตัวแทนของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในระบบไร้อากาศซึ่งได้รับศึกษาในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอย่างกว้างขวางเป็นแบคทีเรียสร้างสปอร์ไม่ต้องการอากาศและชอบอุณหภูมิสูง แกรมบวก และแบคทีเรียที่ทราบกันแล้วว่าผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดชนิดหนึ่ง Johnson และคณะ,(1982) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลเลส จากแบคทีเรียชนิดนี้พบว่าสร้างเอนไซม์ชนิดปลดปล่อยออกนอกเซล (extracellular enzyme) ซึ่ง สามารถย่อยเซลลูโลสชนิดผลึก (crystalline cellulose) เช่น เอวิเซลได้

มีอุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการเจริญที่อุณหภูมิสูง ในช่วง 55-65°ซ. (Enari,1983) และเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียชนิดนี้จะมีประสิทธิภาพ และมีความเสถียรในสภาวะที่ปราศจากสับสเตรท ตั้งแต่อุณหภูมิจาก 37°ซ ถึง 70°ซ. แต่จะสูญเสียประสิทธิภาพในเวลาอันสั้นที่อุณหภูมิ 80°ซ. (Johnson, 1982) ทั้งนี้พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก Clostridium thermoullum เป็นเอนไซม์นอกเซลชนิดเชิงซ้อน (extracellular multienzyme complex) ซึ่งส่วนประกอบเชิงซ้อนนี้เรียกว่า เซลโลโซม (cellosome) ซึ่งมีส่วนประกอบของเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) เป็นเอนไซม์หลัก ซึ่งมีมากหลายชนิด ส่วนเอนไซม์ที่พบในปริมาณที่น้อยลงไป คือ เบตา-กลูโคสิเดส (β-glucosidase) และเอ็กโซกลูคาเนส (exoglucanase) และมีไซแลเนส (xylanase) ด้วย (Beguin และคณะ 1988)

3. แอคติโนมัยสีท (actinomycete)

แอคติโนมัยสีทที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้แก่ Micromonospora, Strcptomyces, Nocardia

Micromonospora sp (Chowdhury, 1991) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียชนิดนี้โดยใช้แหล่งของเซลลูโลสตามธรรมชาติ มาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารผลิตเอนไซม์ เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ขี้เลื่อย และฝ้ายพบว่า ฟางข้าวจะเป็นแหล่งของเซลลูโลสตามธรรมชาติที่ให้ปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด โดยแบคทีเรียชนิดนี้จะผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) เป็นเอนไซม์หลักโดยมีปริมาณสูงสุด และมีปริมาณของเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) ในปริมาณที่น้อยกว่ามาก

การเปรียบเทียบเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากราและแบคทีเรีย

1. ส่วนประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส

จากที่กล่าวมาแล้วว่าเอนไซม์เซลลูเลสนั้น เป็นเอนไซม์เชิงซ้อน (complex enzyme) ซึ่งจะประกอบด้วยเอนไซม์หลัก 3 ชนิด คือ เอนโดกลูคาเนส (endo-glucanase) เอกโซกลูคาเนส (exo-glucanase) และเบต้า-กลูโคสิเดส (β-glucosidase) ซึ่งถ้ามีเอนไซม์ครบทั้ง 3 เอนไซม์นี้ แล้วจะเรียกว่าเป็นเอนไซม์เซลลูเลสที่แท้จริง (true cellulase) ซึ่งพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่แท้จริงนั้นจะพบได้ในระบบเอนไซม์เซลลูเลสจากราเป็นส่วนใหญ่ได้แก่ Trichoderma, Fusarium Pennicilium, Aspergillus เป็นต้น ซึ่งจะมีความสามารถใน

การย่อยเซลลูโลสในธรรมชาติ (native cellulose) ได้ ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียนั้นจะเป็นเอนไซม์เซลลูเลสที่ไม่แท้จริง โดยส่วนใหญ่คือมีเอนไซม์ส่วนประกอบที่ไม่ครบ (Doung และคณะ,1983) โดยจะขาดเอนไซม์ cellobiohydrolase (exo-β-(1-4) glucanase) ในการที่ย่อยเซลลูโลส ชนิดผลึก (crystaline cellulose) (Rehm และ Reed, 1987) (Doung และคณะ 1983) ซึ่งในราจะมีเอนไซม์ชนิดนี้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าในการย่อยเซลลูโลสในธรรมชาติ พวกราจะทำการย่อยก่อน เพราะมีเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสชนิดผลึก และต่อจากนั้นแบคทีเรียจึงทำการย่อยต่อระบบเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียจะประกอบด้วยเอนไซม์ เอนโด-กลูคาเนสเป็นเอนไซม์หลัก (Borriss, 1987)

2. การปลดปล่อยเอนไซม์จากเซลล์

ราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะปลดปล่อยเอนไซม์อกมานอกเซล และจะอยู่ในส่วนของอาหารผลิตเอนไซม์ หรือส่วนที่เป็นน้ำของอาหารผลิตเอนไซม์ ใบแบคทีเรียการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีทั้งมีการปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น Clostridium, Cellulomonas เป็นต้น แต่มีแบคทีเรียบางชนิดที่เมื่อสร้างเอนไซม์ออกมาแล้วเอนไซม์จะยึดติดอยู่กับส่วนของนอกของเซล (cell-bound enzyme) เช่น cellulomonas (Beguin และ Eisen, 1978 Langsford และคณะ,1984) และเอนไซม์บางส่วนที่ปล่อยออกมาจะยึดเกาะเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเซลลูโลสของ เช่นใน Clostridium thermocellum เอนไซม์จะเกาะติดอย่างแน่นกับเซลลูโลสที่ไม่ละลายได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เรียกว่าเซลโลโซม (cellosome)

3. ปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิต

ปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียในอาหารเหลวจะพบต่ำกว่าในกรณีของราพบว่า ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลวของ T. reesei จะสูงกว่าของ Clostridium thermocellum (Doung และคณะ 1983)

4. การเจริญและเอนไซม์

แม้ว่าแบคทีเรียจะมีการเพิ่มปริมาณของเซลในอัตราที่เร็วกว่ารา (Enari, 1983) และเวลาในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแบคทีเรียที่สั้นกว่ารา คือในช่วง 3-4 วัน แต่ก็มีแบคทีเรียบางชนิดที่ใช้เวลาในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสนานกว่า เช่น Cellulomonas sp. ใช้เวลา 4-5 วัน (Han, 1968) Pseudomonas fluorescens. สร้างเอนไซม์เอ็นโด-กลูคาเนสสูงสุดที่เวลา 6 วัน (Hazlewood, และคณะ, 1992) ซึ่งราก็ใช้เวลาในการผลิต

เอนไซม์เซลลูเลสในช่วงใกล้เคียงกัน เช่น Trichoderma reesei QM 9414 ใช้เวลาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในช่วง 5-7 วัน

การเลือกใช้จุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้รา Trichoderma reesei ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ในการทดลองย่อยแกลบ เนื่องจากเหตุผลที่ได้กล่าวมาแล้ว คือระบบเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยรา จะเป็นเอนไซม์เซลลูเลสที่แท้จริง ซึ่งจะมีองค์ประกอบของเอนไซม์หลักทั้ง 3 ชนิด ครบคือ endo-glucanase, exo-glucanase และ β-glucosidase ดังนั้นเอนไซม์ที่ได้จึงมีประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสธรรมชาติได้อย่างดี และเนื่องจากระบบการผลิตเอนไซม์ของรานี้ เป็นระบบที่ง่ายคือ ในระบบที่มีอากาศ ซึ่งมีวิธีทำและใช้อุปกรณ์ที่ง่ายและไม่ซับซ้อน ส่วนการใช้แบคทีเรีย ซึ่งตัวแทนของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีคือ Clostridum thermocellum ซึ่งต้องใช้ระบบการผลิตในระบบไร้อากาศ (anerobic system) ซึ่งจะทำให้ขั้นตอนซับซ้อนยาก และใช้อุปกรณ์มากขึ้นจึงทำให้ค่าใช้จ่ายสูง และปริมาณความเข้มของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากแบคทีเรียมีปริมาณต่ำกว่าที่ผลิตจากรา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงสกุลของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

Fungi	Bacteria	Actinomycetes
Alternaria	Bacillus	Micromonospora
Aspergillus	Cellulomonas	Nocardia
Chaetomium	Clostridium	Streptomyces
Coprinus	Corynebacterium	Streotasporangium
Foames	Cytophaga	
Fusarium	Polyangium	
Myrothecium	Pseudomonas	
Penicillium	Sporocytophaga	
Polyporus	Vibrio	
Rhizoctonia		
Rhizopus		
Sporotrichum		
Thiejavia		
Trametes		
Trichoderma		
Trichothecium		
Verticillium		
Zygorhynchus		

ที่มา : Alexander (1976) ; Reichelt (1983)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1178400 90

การศึกษาการปรับสภาพแกลบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ในการศึกษาเบื้องต้นของการย่อยแกลบด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อผลิตซิลิกาโดย อุไรวรรณ (2535) และ Conradt (1992) โดยใช้เซลลูคลาสต์ 1.5 แอล (celluclast 1.5 L) ในอัตราส่วนของแกลบต่อเอนไซม์ แกลบ 90 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ปริมาณเอนไซม์ 630 หน่วย ผลการทดลอง พบว่าการทำงานของเอนไซม์นั้นจะมีประสิทธิภาพในช่วง 4 ชั่วโมงแรกเท่านั้น และแม้ว่าจะเติมเอนไซม์ใหม่ลงไปหลังการเติมครั้งแรก 2 ชั่วโมงก็ให้ น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นมาเล็กน้อยเท่านั้น สิ่งนี้ก่อให้เกิดอุปสรรคต่อการใช้งานในระดับอุตสาหกรรม อันเนื่องจากความไม่คุ้มทุน

ดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ ต้องการที่จะศึกษาและปรับปรุงประสิทธิภาพในการย่อยแกลบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และนำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้นเองจากรา Trichoderma reesei TISTR 3081 ซึ่งเป็นราที่เก็บรักษาอยู่ในศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์แห่งภาคพื้นเอเชียอาคเนย์ (Bangkok MIRCEN) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และทดลองนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาทดลองย่อยแกลบเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ทางการค้าที่ภาวะเหมาะสมของแต่ละกรณี และศึกษาการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยแกลบร่วมในกระบวน การผลิตซิลิกา เปรียบเทียบผลผลิตของซิลิกาที่ได้กับซิลิกาชนิดอื่น ๆ ที่ใช้วิธีการผลิตที่ต่างกัน โดยมีความแตกต่างกับงานงานวิจัยของ Conradt (1992)ซึ่งเป็นการศึกษาขั้นพื้นฐานถึงวิธีการผลิตซิลิกาจากแกลบ โดยใช้วิธีการปรับสภาพแกลบอย่างกว้าง ๆ หลายวิธี อันได้แก่ การใช้ กรดชนิดต่าง ๆ การใช้ด่าง ตลอดจนการใช้เอนไซม์ แต่สำหรับงานวิจัยนี้จะเน้นถึงการศึกษา วิธีการนำเอนไซม์เซลลูเลส มาใช้ในขั้นตอนการปรับสภาพของแกลบของกระบวนการผลิตซิลิกา เพื่อต้องการหลีกเลี่ยงวิธีการใช้กรด หรือใช้แต่ในปริมาณที่น้อยลง โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสมาช่วยในการปรับสภาพแกลบ