หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เดกซ์แทรนเป็นสายไฮโมโพลิเมอร์ของดี-กลูโคส (D-glucose) ที่เชื่อมด้วยพันธะ ∝-(1,6)กลูโคสิดิก (∝-1,6- glucosidic lingkages)เป็นส่วนใหญ่ และมีแขนงย่อย (branches) ที่เชื่อมด้วยพันธะแบบ∝-(1,3) หรือ ∝-(1,4) การสังเคราะห์เดกซ์แทรนเกิดได้โดยปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ซูโครสให้เป็นกลูโคส และ ฟรักโตส โดยเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส (dextransucrase) หรืออีกชื่อหนึ่งว่า กลูโคซิลทรานเฟอเรส (glucosyltransferase : GTF) แล้วกลูโคสที่ได้จะโพลิเมอไรซ์เป็นสายยาวของเดกซ์แทรน (Imrie และ Tilbury, 1972) ดังสมการที่ 1

$$n\ \text{Sucrose} \xrightarrow{\text{dextransucrase (หรืออีกชื่อหนึ่ง GTF)}} [\text{Glucose}]_n + n\ \text{Fructose}$$

ซูโครส — เดกซ์แทรน — ฟรักโตส

สมการที่ 1 ปฏิกิริยาการเกิดเดกซ์แทรนจาก เดกซ์แทรนซูเครส (Barnes , 1974)

อ้อยซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตน้ำตาลทรายนั้นอาจมีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียกลุ่ม *Leuconostoc spp.* ซึ่งประกอบด้วย *Leuconostoc mesenteroides* และ *Leuconostoc dextranicum* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบในไร่อ้อยหรือบริเวณที่มีน้ำอ้อย เชื้อดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส และเมื่อปลดปล่อยเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครสออกมา จะเปลี่ยนซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ถึง 70-88 % ในน้ำอ้อย (Irvine, 1981)ให้เป็นเดกซ์แทรนดังสมการข้างต้น

เดกซ์แทรนที่สร้างขึ้นนี้จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมาก (10^6-10^7ดอลตัน)(Monsan,

1991) ทำให้มีสมบัติเหนียวและมีความหนืดสูงมาก ซึ่งจะจับติดกับท่อส่งน้ำอ้อยภายในโรงงานน้ำตาล ก่อให้เกิดการอุดตันบริเวณ ท่อ ถัง เครื่องกรอง แผ่นกรองและอื่นๆ เป็นการลดอัตราการผลิตน้ำตาลลง และหากมีในปริมาณมากจะทำให้อัตราการกรองต่ำลง การเกิดผลึกของน้ำตาลทรายช้าลงหรือไม่สมบูรณ์ (Imrie และ Tilbury,1972) นอกจากนี้เมื่อแบคทีเรียเหล่านี้ใช้น้ำตาลในน้ำอ้อยแล้วจะปลดปล่อยเมตาโบไลซ์เป็นกรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดแลคติก กรดบิวทิริก เป็นต้น ผลที่ตามมาจะสามารถก่อให้เกิดการบูดเน่าของน้ำอ้อยได้ (Madhu,Shukla และ Prabhu,1984)

จากการศึกษาของ Tilbury (1985 อ้างถึงในเอก แสงวิเชียร,2532) พบว่าการสูญเสียซูโครสเนื่องจากการสร้างสารจำพวกเดกซ์แทรนของแบคทีเรียเหล่านี้ คิดเป็น 4.75 % ของปริมาณซูโครสที่ได้ต่อวัน และความสูญเสียนี้ประมาณได้ว่า เป็นการสูญเสียน้ำตาลถึง 9.2 % ของผลผลิตน้ำตาลที่ได้ต่อปี ตัวอย่างเช่น ในปี 2533 มีการส่งออกน้ำตาลทราย 2.3 ล้านเมตริกตัน ซึ่งเป็นมูลค่า 17,948 ล้านบาท (ฝ่ายนโยบายและเศรษฐกิจน้ำตาล,2533) ในอัตราข้างต้นจะประมาณการณ์ได้ว่าเดกซ์แทรนจะก่อการสูญเสียรายได้ถึง 1,650 ล้านบาท ซึ่งนับว่าสูงมาก

จากปัญหาดังที่กล่าวมาข้างต้น พอจะสรุปปัจจัยที่ก่อปัญหาได้ 3 ประการ อันได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย น้ำตาลซูโครส และเดกซ์แทรน การแก้ปัญหาในโรงงานน้ำตาลจึงอาจทำได้โดยการกำจัดปัจจัยใดปัจจัยหนึ่ง เช่น การฆ่าเชื้อโดยการทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อน (sterilization) หรือ การเติมสารกำจัดเชื้อแบคทีเรีย (bacteriocide) ลงไป อย่างใดก็ตามวิธีทั้งสองต่างก็ไม่เหมาะสมในทางปฏิบัติ โดยกรณีแรกต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง ส่วนกรณีหลังยังอาจมีผลทำให้น้ำตาลที่ได้มีรสชาด หรือสีเปลี่ยนไป วิธีการที่สามคือ การควบคุมปริมาณเดกซ์แทรนในระบบ จะทำได้ 2 วิธีด้วยกัน (Imrie และ Tilbury,1972) คือ

1.การป้องกันการเกิดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย โดยอาศัยข้อเท็จจริงที่ว่าเดกซ์แทรนเกิดเนื่องจากการบนเปื้อนของเชื้อ *L. mesenteroides* และ *L. dextranicum* ดังนั้นการป้องกันการเกิดเดกซ์แทรนจำเป็นต้องกำจัดที่ต้นเหตุ เช่น

1.1 การใช้วิธีทางกายภาพ คือการป้องกันน้ำอ้อยบูดเน่าด้วยการควบคุมสภาวะแวดล้อมทางกายภาพ เพื่อหยุดการเจริญของเชื้อ เช่น การเก็บในที่อุณหภูมิต่ำ การใช้ความร้อน การควบคุมความเป็นกรดด่างของน้ำอ้อย และการควบคุมปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์ใช้ได้ (water activity) และการฉายรังสี เป็นต้น แต่ทั้งหมดล้วนเป็นวิธีที่ใช้ได้ผลในระดับ

ห้องปฏิบัติการจึงมักไม่ประสบผลสำเร็จในการนำไปใช้จริง

1.2 การใช้วิธีทางเคมี ได้แก่ การใช้สารเคมีฆ่าหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (bacteriocide หรือ bacteriostatic) กับต้นอ้อย ดินที่ปลูก หรือใช้กับเครื่องมือที่ใช้ในการตัดอ้อย แต่วิธีนี้อาจเหลือสารเคมีตกค้างที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

2. การกำจัดเดกซ์แทรนออกจากน้ำอ้อย ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น

2.1 การสลายด้วยกรดร่วมกับความร้อน (Monsan และ Paul,1991) แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ เกิดการตัดสายโมเลกุลของเดกซ์แทรนแบบสุ่ม (random) และอาจทำให้เกิด sucrose inversionได้

2.2 การใช้รังสีอุลตราไวโอเลต คลื่นอุลตราโซนิก (Watson และ Wolff,1955) นอกจากนี้อาจใช้วิธีทางกายภาพ เช่น อุลทราฟิลเทรชัน (ultrafiltration) ไดอะไลสีส (dialysis) และ รีเวอร์สออสโมสีส (reverse osmosis) แต่วิธีเหล่านี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากมีราคาแพง

วิธีการโดยตรงที่จะกำจัดเดกซ์แทรน และแก้ปัญหาภายในโรงงานน้ำตาลได้อย่างปลอดภัยต่อผู้บริโภค คือ การใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ซึ่งมีข้อดีคือ เป็นปฏิกิริยาทางเอนไซม์ที่จำเพาะต่อเดกซ์แทรนสูง ปฏิกิริยาเกิดในสภาวะ (อุณหภูมิ,ความเป็นกรดด่าง) ที่ไม่รุนแรง มีความเป็นพิษต่ำ และใช้ในปริมาณน้อยแต่ได้ผลสูง (Imrie และ Tilbury, 1972) พบว่าการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเพียง 3 หน่วยต่อ 100 มล. ของน้ำอ้อย สามารถกำจัดเดกซ์แทรนได้ถึง 68.5 % ในเวลาเพียง 20 นาทีที่ความเป็นกรดด่าง 7.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

<u>สมบัติและการใช้ประโยชน์ของเดกซ์แทรนเนส</u>

เดกซ์แทรนเนส (E.C.3.2.1.11) หรือ α-D-1,6-glucan 6-glucano hydrolase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะชนิด α-1,6 ไกลโคสิดิก ภายในสายเดกซ์แทรน (Koh และ Khouw,1970; Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991) ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นไอโซมอลโตส และโอลิโกแซคคาไรด์อื่นๆ และอาจได้

กลูโคสบ้างเล็กน้อย (Tsuchiya และคณะ,1956; Koenig และ Day,1989) ผลการย่อยจะเหลือสายเดกซ์แทรนที่สั้นลง (น้ำหนักโมเลกุลลดลง) ซึ่งมีผลทำให้สมบัติความเหนียวหนืดลดตามลงไปด้วย โดยหากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดจำนวนกลูโคสน้อยกว่า 8 หน่วยแล้วจะสูญเสียความเหนียวและความหนืดหมด ซึ่งเป็นวิธีการแก้ปัญหาของเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย ซึ่งก่อความเสียหายในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายได้

เดกซ์แทรนเนสสามารถผลิตได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งแบคทีเรียในหลายสปีชีส์ เช่น *Micrococcus* สายพันธุ์ Z-10 (ณฐินี สุวรรณสิงห์,2533) ยีสต์ เช่น *Lipomyces starkeyi* (Konig และ Day,1989) และราในหลายสปีชีส์ เช่น *Penicillium sp.* (Chaiet และคณะ,1970 ; Madhu และ Prabhu,1984 ; Shukla, Madhu และ Prabhu,1989) *Aspergillium sp.* (Joshi และ Tamhane, 1975) *Chaetomium sp.* (Hattori, Ishibashi และ Minayo,1981) เอนไซม์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน อาจมีสมบัติหรือความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างกัน เช่น จาก *Penicillium sp.* จะมีคุณสมบัติย่อยสลายพันธะแบบ endo-1,6-α-D -glucosidase (Tsuru, Tsuji และ Fukumoto, 1971 ; เอก แสงวิเชียร,2532) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซมอลโตส และ ไอโซมอลโตแซคคาไรด์เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียมักจะมีคุณสมบัติเป็นเอนโดเดกซ์แทรนเนสที่ให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น tri-,tetra- และ pentasaccharides โดยมีไอโซมอลโตสเป็นส่วนน้อย (Riffer, 1983) โดยทั่วไปราจะเป็นแหล่งที่มีการศึกษาการผลิตเดกซ์แทรนเนสมากที่สุด อีกทั้งได้มีการนำไปใช้ผลิตทางการค้า (NOVO,1983)

Joshi และ Tamhane (1975) ศึกษาการผลิตเดกซ์แทรนเนส โดยเชื้อรา *Aspergillus luchensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ complex medium ซึ่งประกอบด้วย 2 % เดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ , 1 % สารสกัดจากยีสต์, 2 % สารสกัดจากเนื้อวัว (beef extract), 0.5 % เปปโตน และ 2 % คอร์นสตีพลิเคอร์ (corn steep liquor) พบว่าในสูตรอาหารดังกล่าว *A. luchensis* จะสร้างเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 ในขณะที่ Madhu และ Prabhu (1983) ซึ่งเลี้ยง *Penicillium aculeatum* ในอาหารสูตรของ Fukumoto พบว่า รานี้ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีเดกซ์แทรนเนสแอคติวิตีสูงสุดถึง 60-70 หน่วยต่อมล. ที่ชั่วโมงที่ 96 ของการเลี้ยงเชื้อ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Shukla, Madhu และ Prabhu (1989) ศึกษาตัวแปรต่างๆ ต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium aculeatum* NSI-4 พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรของ Fukumoto ซึ่งมี 1.5 % เดกซ์แทรน (น้ำหนักโมเลกุล 40 x 10^6) เป็นสารชักนำ ความเป็นกรดด่าง 5.5-6.0 ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดถึง 230 หน่วยต่อมล.

Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia (1991) พบว่า เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส จาก *Paecilomyces lilacinus* เป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมน้ำตาลได้

สำหรับการศึกษาในประเทศไทย โดย เอก แสงวิเชียร (2532) คัดเลือกเชื้อราจากตัวอย่างดินแหล่งต่างๆ ในประเทศ พบว่า *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้จากการปนเปื้อนใน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้สูง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงจากสูตรของ Fukumoto ซึ่งประกอบด้วย 1 % เดกซ์แทรน (น้ำหนักโมเลกุล 3-50 x 10^6) เป็นแหล่งคาร์บอน 0.2 % $NaNO_3$ 0.2 % K_2HPO_4 0.05 % KCl 0.05 % $MgSO_4$ ที่ 6.0 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยเอนไซม์ที่ได้มีคุณสมบัติจำเพาะในการย่อยสลายพันธะ แอลฟา 1,6

เซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ ที่พบมากในธรรมชาติ และมีการศึกษาเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารเคมีต่างๆ ตลอดจนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Mes-Hartree และ Hogan,1983; Paturua,1989; กนก รัตนะกนกชัย, 2528)

<u>องค์ประกอบของเซลล์พืช</u>

ในเซลล์พืชประกอบด้วย

1. เซลลูโลส เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย ดี-กลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ไกลโคสิดิก เป็นสายตรง ไม่มีแขนงย่อย (unbranched polymer) มีสูตรทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เป็นองค์ประกอบซึ่งให้ความแข็งแรงในพืช โดยธรรมชาติของเซลล์พืชจะไม่พบเซลลูโลสอยู่ในรูปอิสระ แต่มักพบอยู่ร่วมกับ ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส

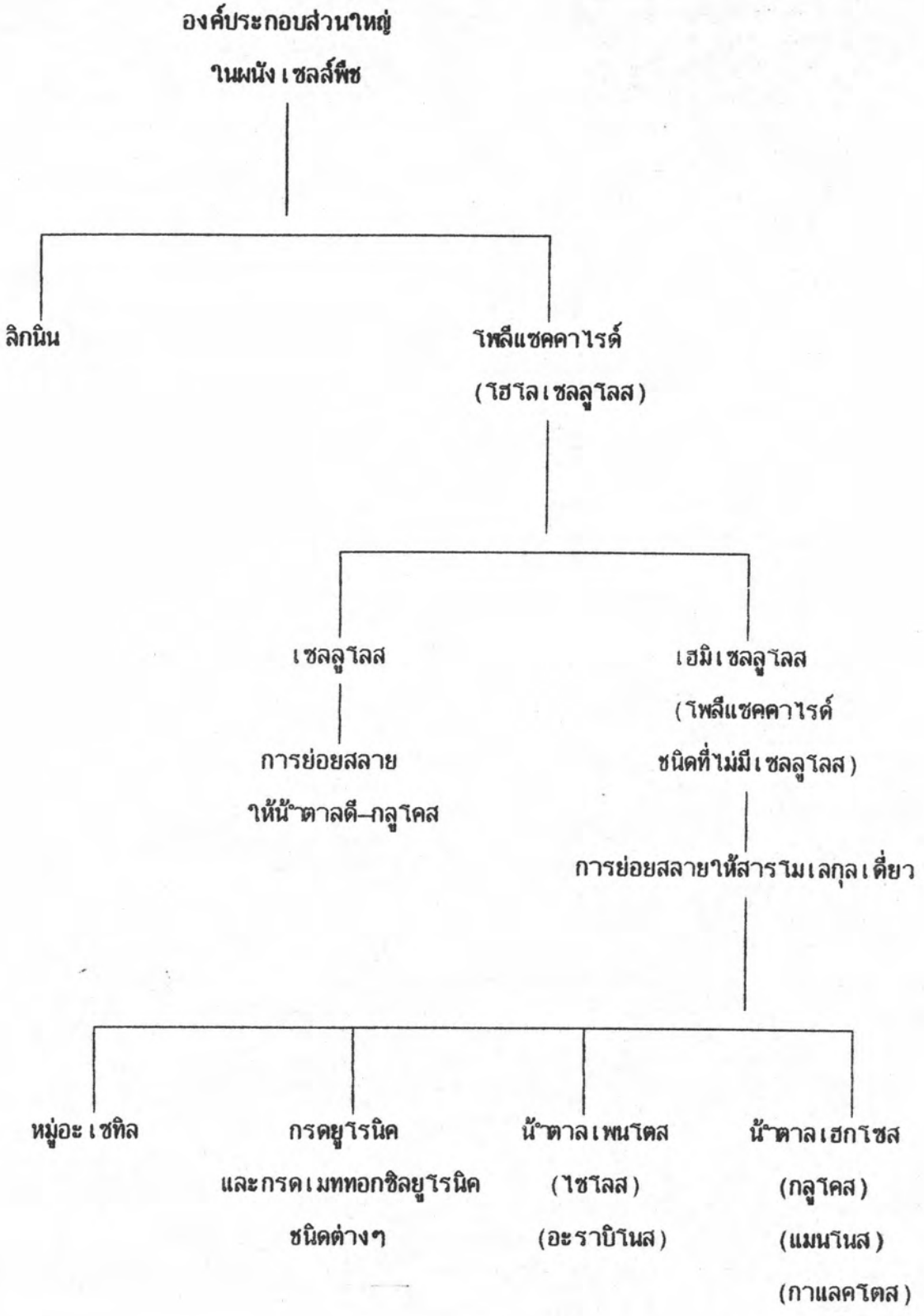
เพนโตแซน (pentosans) กัม (gum) แทนนิน (tannins) ไขมัน และ สารเกิดสี (colouring matter) เป็นต้น (Meyer,ed.,1961; Greulch, 1973; Darvill และคณะ,1980 ;Paturau, 1989) ดังแสดงในรูปที่ 1

การจัดเรียงตัวของหน่วยดี-กลูโคสจะอยู่ในลักษณะ chair form แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลส จะเชื่อมต่อกันด้วย พันธะไฮโดรเจน (Intra molecule H-bond) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวน (ring) ของโมเลกุลถัดไป และเชื่อมต่อระหว่างสายเซลลูโลสที่ขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (Inter molecule H-bond) ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลดี-กลูโคส ในอีกสายหนึ่ง ดังรูปที่ 2 (Nisizawa,1973)

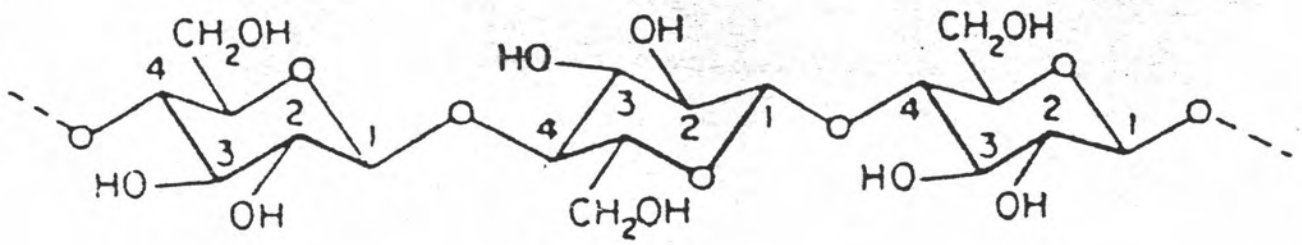
จำนวนหน่วยของกลูโคสในสายของเซลลูโลสไม่สามารถทราบจำนวนที่แท้จริงได้ แต่ประมาณได้ว่าต้องมีจำนวนมาก ตั้งแต่ 1,000 ถึง 10,000 หน่วยกลูโคส (Tsao และ Chiang,1983) แตกต่างกันไปตามชนิดของพืช เช่น Schulz และ Marx (อ้างถึงใน Meyer,ed.,1961) กล่าวว่า degree of polymerizationของเซลลูโลสในไฟเบอร์ของพืชจำพวก ฝ้าย และ ป่าน มีจำนวนหน่วยกลูโคส ตั้งแต่ 6,500 ถึง 9,000 หน่วย จากการศึกษาถึงไฟเบอร์ของเซลลูโลสโดยวิธี X-ray พบว่าเซลลูโลสประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) ซึ่งสายเซลลูโลสมีการเรียงตัวขนานกันอย่างมีระเบียบทำหน้าที่เป็นแกนของไฟเบอร์ (fiber axis) และส่วนที่สายของเซลลูโลสมีการเรียงตัว อย่างไม่เป็นระเบียบ เรียกว่า "เซลลูโลสอสัณฐาน (amorphous cellulose)" (Meyer, ed.,1961) ดังแสดงในรูปที่ 3ก

ผนังเซลล์ของพืชจะมีเซลลูโลสจัดเรียงตัวเป็นแถบๆ ไม่ติดต่อกันโดยตลอด เมื่อเซลล์แก่เต็มที่ภายในช่องว่างจะเต็มไปด้วยลิกนิน (รูปที่ 3ข) ซึ่งไม่ละลายน้ำและสารอินทรีย์ชนิดใด โดยจะอยู่รอบๆ เซลลูโลส และทำหน้าที่ป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยสลาย นอกจากนี้ยังมีโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ ที่ปะปนอยู่กับเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ได้แก่ ไซแลน แมนแนน โพลียูโรไนด์ อะราแบน และ กาแลคแตน แต่มักพบในปริมาณที่น้อยกว่าเซลลูโลส (Gokoyr และ Ereken, 1986)

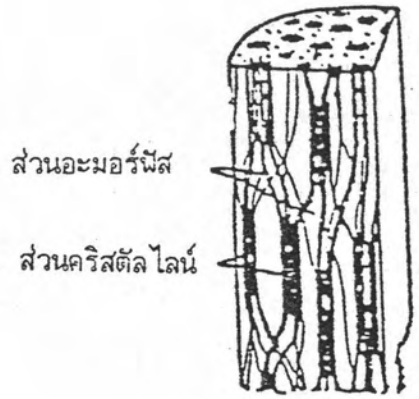
เซลลูโลสมีโครงสร้างที่ซับซ้อน และไม่ละลายในน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายด่างอ่อนแต่สามารถละลายได้ดีในกรดหรือด่างแก่ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามการละลายในด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เป็น 3 ชนิด(Paturua,1989)คือ



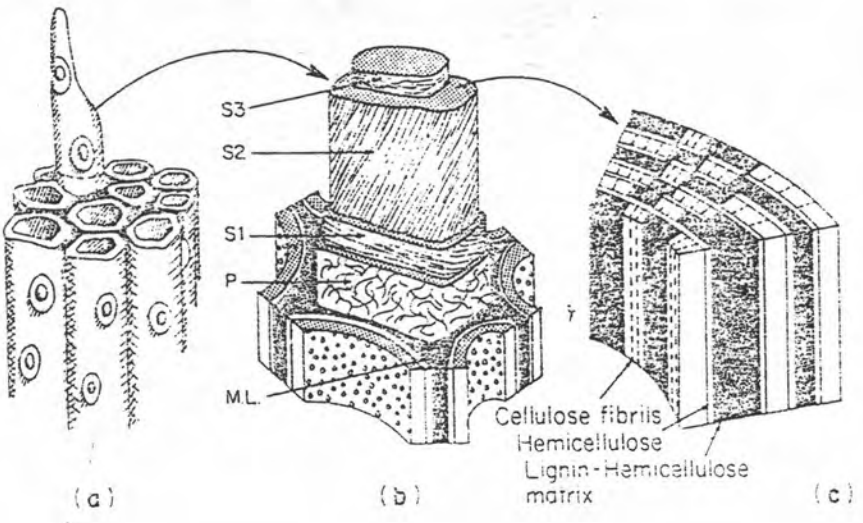
รูปที่ 1 แสดงการแยกองค์ประกอบในเซลล์พืช (Greulch, 1973)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะการจัดเรียงตัวของหน่วยกลูโคสในเซลลูโลส (Nisizawa, 1973)



รูปที่ 3ก แสดงส่วนของเซลลูโลสที่เป็นผลึกและเซลลูโลสอสัณฐาน



รูปที่ 3ข แสดงการจัดเรียงตัวของเซลลูโลสภายในเซลล์พืช (Kirk,1983)

(a) รูปตัดขวางแสดงลักษณะภายนอกของผนังเซลล์

(b) และ (c) แสดงลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ภายในไฟบริลของเซลลูโลสในผนังเซลล์ (secondary wall)

เส้นผ่าศูนย์กลางแต่ละเซลล์ประมาณ 25 ไมโครเมตร

S1-S3 คือ ผนังเซลล์ชั้นที่สอง (secondary cell wall)

P คือ ผนังเซลล์ชั้นต้น (primary cell wall)

ML คือ middle lamella

1.1 แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose)เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายใน 17.5% ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิห้อง

1.2 เบตา-เซลลูโลส (β-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายใน 17.5 % ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่ตกตะกอนได้ง่ายเมื่อสารละลายมีสภาพเป็นกรด

1.3 แกมมา-เซลลูโลส (γ-cellose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายใน 17.5 % ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรด แต่สามารถตกตะกอนได้โดยแอลกอฮอลล์

2. เฮมิเซลลูโลส เป็นส่วนประกอบของพืชที่สามารถละลายใน 17.5 % ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เย็น (cold caustic soda) ได้ (Paturau,1989) ต่างจากเซลลูโลส โดยเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส และ/หรือ น้ำตาลเฮกโซส เช่น โพลิเมอร์ของ ดี-ไซโลสในรูปไซแลน, อะราบิโนสในรูปแอล-อะราบิแนน, กาแลคโตสในรูปของดี-กาแลคแตน และ แมนโนสในรูปของดี-แมนแนน ที่มีลักษณะเป็น heterogenous ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดมารวมกัน เฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขาแตกต่างจากเซลลูโลส ที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง และมีสายโพลิเมอร์สั้นกว่าโดยมีขนาดยาวประมาณ 40 หน่วยกลูโคส (Paturau,1989; Kirk,1983)

ไซแลน ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบหลักในเฮมิเซลลูโลส นั้นเป็นโพลีแซคคาไรด์ของดี-ไซโลส ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ β-1,4-xylosidic สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มด้วยกัน โดยอาศัยสมบัติการละลาย คือ

ก. ไซแลนที่ละลายในสารละลายด่าง ซึ่งเป็นไซแลนที่พบมากในเฮมิเซลลูโลสของพืชทั่วไป

ข. ไซแลนที่สามารถละลายน้ำได้ หรือ เรียกว่า "อะราบิโนไซแลน" ที่พบมากในธัญญพืช โดยเป็นโพลิเมอร์ของไซโลสที่มีกิ่งก้านสาขาเป็นโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นๆ ปนอยู่ เช่น (เมธิล)-กรดกลูคูโรนิก ใน อะราบิโน-เมธิล-กลูคูโรโนไซแลนในหญ้า และเมธิล-กลูคูโรโนไซแลนในพืชพวกไม้เนื้อแข็ง (Biely,1985)

เพนโตแซน ก็เป็นโพลิเมอร์อีกรูปหนึ่งของเฮมิเซลลูโลส ประกอบด้วย ไซโลส อะราบิโนส และกรดยูโรนิก

3. ลิกนิน เป็นสารประกอบอะโรมาติก ประกอบด้วยหมู่เมทอกซิล (methoxy group $-OCH_3$), หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group -OH) และส่วนที่เป็นฟีโนลิค (phenolic) หรือเรียกว่า "Methylated phenolic compound" มีสูตรโครงสร้าง $C_{49}H_{52}O_{14}$

ลิกนินเป็นสารประกอบที่ไม่สามารถละลายในน้ำและสารอินทรีย์ชนิดใด จะอยู่ภายในโครงสร้างของเซลล์พืชโดยอยู่รอบๆ เซลลูโลสและป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยสลาย

<u>การย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร</u>

เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (agricultural wastes) เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด เป็นต้น มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่มาก ดังแสดงในตารางที่ 1

ดังนั้นเมื่อนำวัสดุทางการเกษตรมาย่อย (hydrolyze) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จะได้น้ำตาลออกมา โดยถ้าทำการย่อยเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์ชนิดเดียว คือ กลูโคส แต่ถ้าการย่อยเกิดไม่สมบูรณ์ จะได้ทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคาไรด์ (oligasaccharides) ปนกัน ส่วนเฮมิเซลลูโลส เมื่อย่อยจะได้น้ำตาลหลายชนิดปนกัน ขึ้นกับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลสเอง

การย่อยวัสดุการเกษตร ทำได้ 2 วิธีด้วยกัน คือ

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

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนินในวัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)	ลิกนิน (%)	เอกสารอ้างอิง
Conifers	40 - 50	20 - 30	25 - 35	Parisi,1989
Deciduous trees	40 - 50	30 - 40	15 - 20	Parisi,1989
ชานอ้อยทั้งหมด	40	30	20	Parisi,1989
-ไฟเบอร์	41	ND	20.5	Paturau,1989
-พิธ (Pith)	33.5	ND	21	Paturau,1989
ซังข้าวโพด	45	35	15	Parisi,1989
ก้านข้าวโพด(stalks)	35	25	35	Parisi,1989
ฟางข้าวสาลี	30	50	15	Parisi,1989
ฟางข้าวเจ้า	32.1-36	>25	12	Virkola,1975; Kirk,1983
เปลือกข้าวโพด	41.7-45	37-41.6	10.8-19	กนก,2528
ก้านถั่วเหลือง	35	>25	20	Kirk,1983

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่มีรายงานของข้อมูลนั้น

ต้องมีการแยกกรดออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้ และจะมีปัญหาด้านการผุกร่อนของเครื่องมือ

1.1.2 Heterogenous process เป็นกระบวนการใช้กรดอ่อนกว่า แต่ใช้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 180 องศาเซลเซียส วิธีนี้ไม่สามารถนำกรดกลับมาใช้ใหม่ นิยมใช้กันมากในอุตสาหกรรมการผลิต ไฮโดรเซลลูโลส (Hydrocellulose) และ gel - form microcrystalline cellulose แต่จะให้ผลผลิตต่ำ (50-55 %) การย่อยด้วยกรด จะทำให้เพนโตแซนในเฮมิเซลลูโลสเปลี่ยนเป็นเฟอฟูรัล ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Paturau,1989) ดังสมการที่ 2

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

1.2 การย่อยด้วยด่าง (Alkaline Hydrolysis)

สารละลายด่างที่นิยมใช้ เช่น สารละลายเจือจางของโซเดียมไฮดรอกไซด์, แอมโมเนีย และ เอธิลลีนไดอะมีน เป็นต้น การใช้ด่างย่อยวัสดุการเกษตรจะมีผลทำให้สายของโพลีแซคคาไรด์สั้นลง ปฏิกิริยานี้เกิดในสภาพอุณหภูมิสูงประมาณ 160 ถึง 180 องศาเซลเซียส และต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อยเพื่อใช้ในการย่อยเฮมิเซลลูโลส

สำหรับข้อดีและข้อเสียของการย่อยวัสดุทางการเกษตรด้วยกรด แสดงไว้ในตารางที่ 2

2. การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis)

เป็นการย่อยวัสดุทางการเกษตรด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Parisi,1989; Woodward,1987) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งรา และ แบคทีเรีย แต่เอนไซม์ที่นิยมใช้ คือ เซลลูเลสจากราโดยเฉพาะ *Trichoderma viride* (หรือภายหลังจัดอยู่ใน *T. reesei*) (Parisi,1989) ข้อดีและข้อเสียของการใช้เอนไซม์ในการย่อยวัสดุทางการเกษตร ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลดีและผลเสียในการย่อยวัสดุทางการเกษตรด้วยกรด

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 และสารเคมีอื่นๆ 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 3 เปรียบเทียบผลดีและผลเสียในการย่อยวัสดุการเกษตรด้วยเอนไซม์

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

ที่มา: Woodward (1987); Parisi (1989)

018913

สมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด (Ryu และ Mandels,1980; Parisi,1989) คือ

1. Endo-β-1,4 glucan glucanohydrolases (E.C. 3.2.1.4) หรือ Endoglucanase หรือ C_x ทำหน้าที่ตัดพันธะ 1,4 กลูโคสิดิก ภายในสายเซลลูโลสในบริเวณที่เป็นอะมอร์ฟัส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส ซึ่งเป็นการตัดแบบสุ่ม (random) ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น เซลโลไบโอส และมี กลูโคส บ้างเล็กน้อย

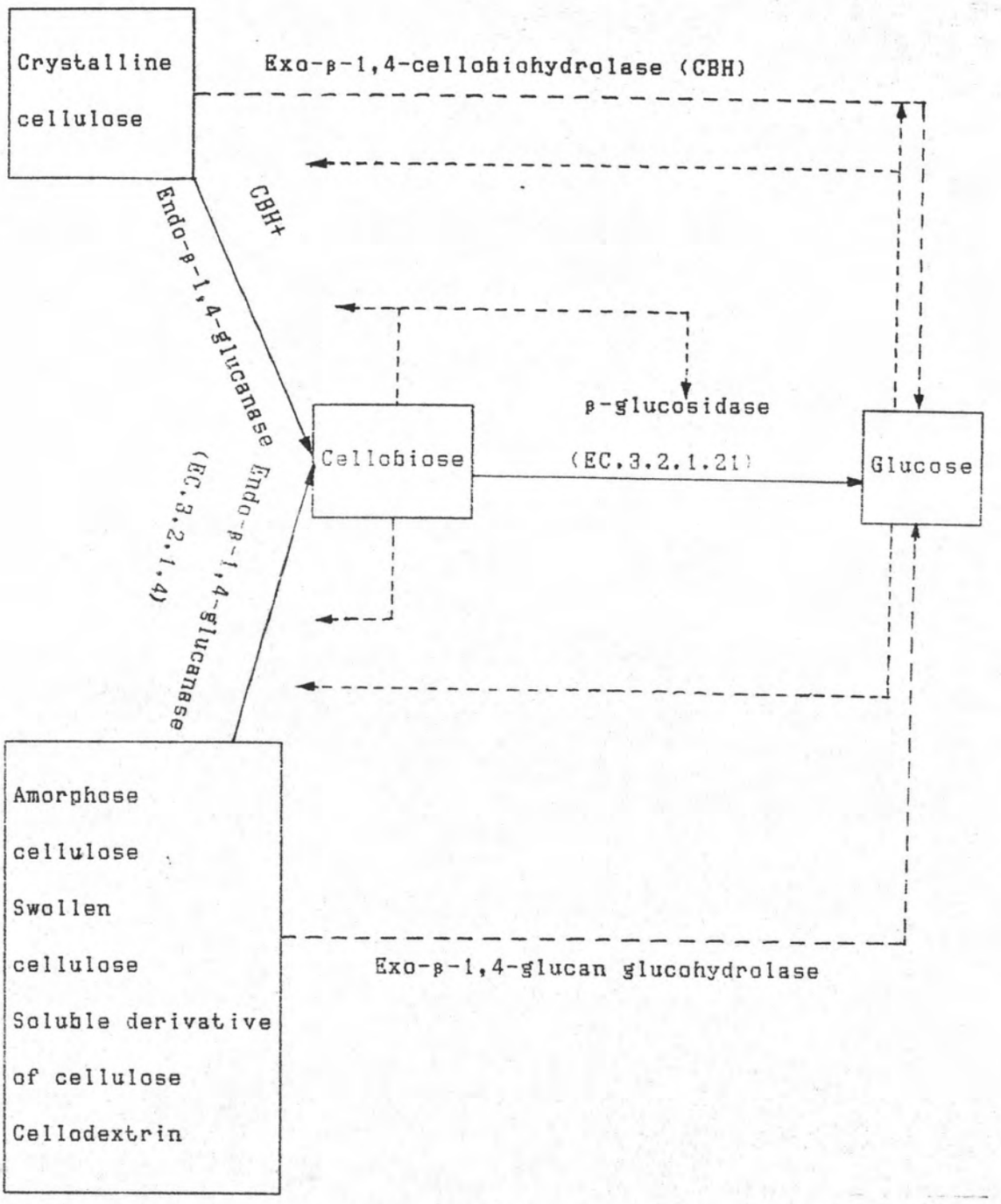
2. Exo-β-1,4 glucan cellobiohydrolase หรือ Exoglucanase หรือ C_1 (E.C. 3.2.1.91) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดพันธะของ β-1,4 กลูโคสิดิก จากปลายทางด้าน non-reducing ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น กลูโคสและเซลโลไบโอส

3. β-Glucosidase หรือ Cellobiase (E.C. 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย เซลโลไบโอส และ เซลโลเดกซ์ทริน ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส

Dwivedi และ Ghose (1979) ศึกษากลไกการย่อยเซลลูโลสในชานอ้อย(ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างแล้ว) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จาก *Trichoderma reesei* QM 9414 พบว่าเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และ เอนไซม์เอกโซ-เซลโลไบโอไฮโดรเลส จะถูกดูดซับอยู่บนผิวของชานอ้อยบริเวณที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble crystalline bagasse) เป็นขั้นตอนแรก โดยจะตัดสายเซลลูโลส (depolymerization) จากปลายด้าน non-reducing ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น เซลโลไบโอส และ กลูโคสบ้างเล็กน้อย จากนั้นจะปลดปล่อยน้ำตาลที่ได้ออกมาอยู่ในสารละลาย เพื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ เบตา-กลูโคสิเดส เปลี่ยนเซลโลไบโอส ให้เป็นกลูโคส ดังรูปที่ 4

การปรับสภาพวัสดุทางการเกษตร

เซลลูโลสจากพืช หรือ วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และ ซังข้าวโพด ฯลฯ จะอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ระหว่าง ลิกนิน-เซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลส ดังที่กล่าวแล้วข้างต้น ยังมีลักษณะโครงสร้างของ



รูปที่4 แสดงการย่อยเซลลูโลสด้วยระบบเอนไซม์เซลลูเลส (Bailey and Ollis, 1986)

เซลลูโลส อันได้แก่ ดีกรีของผลึก (degree of crystallinity) จำนวนหน่วยกลูโคสในสายเซลลูโลส (degree of polymerization) การอมน้ำ (degree of water swelling) และพื้นที่ผิว จะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ดังนั้น จึงต้องทำการปรับสภาพ (pretreat) วัสดุเหล่านี้ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้น้ำตาลใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่อไป

การปรับสภาพวัสดุทางการเกษตร เป็นการเตรียมวัตถุดิบให้เหมาะสมต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ ด้วยการทำลายโครงสร้างผลึกในเซลลูโลส และ สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต, กำจัดลิกนิน, เพิ่มพื้นที่ผิวเพื่อให้เอนไซม์เข้าย่อยได้ง่ายขึ้น และเพิ่มจำนวนพันธะไกลโคสิดิก เพื่อให้จับกับเอนไซม์ได้ง่าย (Dekker และ Wallis, 1983; Woodward,1987; Pirisi,1989)

<u>วิธีการปรับสภาพ</u> สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีการใหญ่ๆ (Pirisi,1989) คือ

1. <u>วิธีทางกายภาพ</u> (Physical Prtreatment)

1.1 การบด ตัด ลดขนาดวัตถุดิบ เป็นการบดผลึกของเส้นใยเซลลูโลสให้แตกออก เพื่อให้เอนไซม์ย่อยสลายได้ง่ายขึ้น รวมทั้งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าทำการย่อยได้ดีขึ้น จากการศึกษาของ Kelsey and Shafizadeh (1980) พบว่า การบดวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้น

1.2 การใช้ความร้อน และ ความดัน เป็นการทำให้เซลลูโลสในวัตถุดิบอิ่มตัวด้วยไอน้ำ ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง แล้วลดความดันทันที ทำให้น้ำระเหยอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้เส้นใยแยกออกจากกัน เป็นการเพิ่มขนาด เพื่อให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยา ซึ่งเรียกว่า "กระบวนการ Steam Explosion Process"

Dekker และ Wallis (1983) พบว่า การปรับสภาพชานอ้อยด้วยการทำ Autohydrolysis - steam Explosion ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลาเพียง 4 นาที จากนั้นย่อยด้วยเซลลูเลส จะมีเปอร์เซนต์การเปลี่ยนวัตถุดิบเป็นน้ำตาล

ถึง 50 % ในสภาวะความเป็นกรดด่าง 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในเวลา 24 ชั่วโมง และสูงถึง 80 % ถ้าเพิ่มการย่อยด้วยเอนไซม์ เบตา-กลูโคสิเดส

2. <u>วิธีทางเคมี</u> (Chemical Pretreatment)

การใช้สารเคมีจะทำให้ปริมาณลิกนิน และ ผลึก (crystalline) ลดลง และทำให้เซลลูโลสมีการละลายน้ำ หรือ อมน้ำ (swell) มากขึ้น

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

Manonmani and Sreekantieh (1987) ศึกษาการใช้ด่าง 1.5 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน (autoclave) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดปริมาณลิกนินได้ถึง 80.69 % และเมื่อนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. viride* ที่ความเข้มข้น1.0 หน่วยต่อมล. สภาวะการย่อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 4.8เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้น้ำตาลรีดิวซ์ถึง 87.75 %

สืบเนื่องจากการที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม หลังฤดูการเก็บเกี่ยวแต่ละปีจะมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด แกลบ และ ชานอ้อย เหลือเป็นจำนวนมาก และจากการที่วัสดุการเกษตรเหล่านี้มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ เช่น ชานอ้อย มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบมากถึง 33-41 % (Paturua, 1989), ฟางข้าว มี 32.1 ถึง 36 % (Virkola,1975; Kirk,1983) เป็นต้น และยังเป็นทรัพยากรหมุนเวียน (renewable resource) จึงมีการศึกษาเพื่อนำเซลลูโลสจากวัสดุการเกษตรเหล่านี้มาใช้เป็นสับสเตรท หรือ แหล่งคาร์บอนในการผลิตสารเคมีต่างๆ เช่น แอลกอฮอลล์ กรดอะซีติก และกรดอินทรีย์อื่นๆ (Mes-Hartree และ Hogan,1983; Paturua,1989)

ในลักษณะเดียวกันงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เพื่อลดต้นทุนการผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยเริ่มจากการหาวิธีและสภาวะในการปรับสภาพวัสดุเหล่านี้ รวมถึง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดสในการย่อยวัสดุการเกษตร แล้วจึงทำการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ไฮโดรไลเสทที่ได้ทดแทนแหล่งคาร์บอนในสูตรรวมทั้งการหาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนด้วย