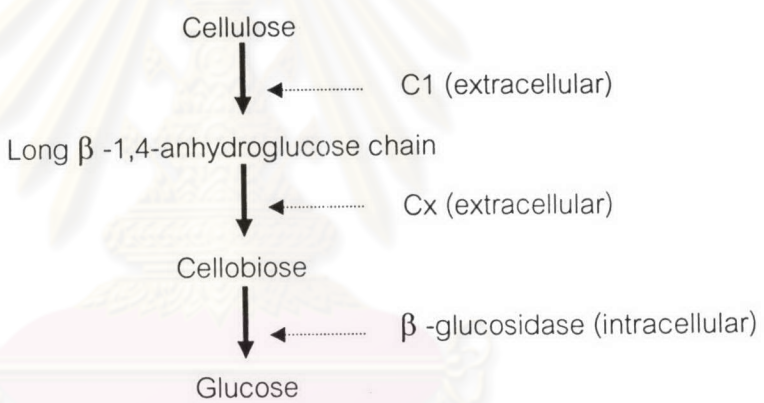
บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 เซลลูเลส (Cellulases)

การศึกษาการทำงานของเซลลูเลสเริ่มต้นโดย Reese และคณะในปี ค.ศ. 1950 พบว่ามีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ โดยอาศัยเอนไซม์ C1 และ Cx ปฏิกิริยาเริ่มจากจุลินทรีย์หลั่ง C1 ออกมานอกเซลล์ทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสให้กลายเป็นสายเซลลูโลสเส้นตรงยาวก่อน หลังจากนั้น Cx จะเข้าทำงานต่อเพื่อย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลสายสั้นๆ (cello-oligosaccharides) เช่น เซลโลไบโอส (cellobiose) ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กจะแพร่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์จากนั้นเบตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) จะทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอส ให้กลายเป็นกลูโคสต่อไป ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วย C1และ Cx (ดัดแปลงจาก Wike *et al.*, 1983)

จากการศึกษาต่อมาทำให้ทราบว่า C1 คือ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) (EC 3.2.1.91) และ Cx คือ เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) (EC 3.2.1.4) (Wike *et al.*,1983) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์สามารถถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ ถ้ามีกลูโคสอยู่ในระบบมากจะยับยั้งการทำงานของเบตา-กลูโคซิเดส ทำให้เซลโลไบโอสถูกสะสมมากขึ้น ซึ่งถ้ามีมากพอจะไปยับยั้งการทำงานของ C1 และ Cx ต่อไป (Ericksson *et al.*,1990)

2.2 องค์ประกอบของเซลลูเลส

เซลลูเลส เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วยเอนไซม์หลายองค์ประกอบ (multicomponent enzymes) โดยมีเอนไซม์

องค์ประกอบอย่างน้อย 3 กลุ่ม ทำงานร่วมกัน คือ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) (EC 3.2.1.91) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) (EC 3.2.1.4) และ เบตา-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) (EC 3.2.1.21) (Xiemenes *et al.*,1996, Wike *et al.*,1983 ; Domingues *et al.*,2000)

เอกโซกลูคาเนส (EC 3.2.1.91,1,4-β-D-glucan-cellobiohydrolase **หรือ** C1)

ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณพันธะ β-1,4-glycosidic linkage ที่ปลายด้าน non-reducing end ของ crystalline cellulose ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลสสั้นขึ้น เช่น เซลโลไบโอส และถ้าปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์จะได้กลูโคส สามารถวัดแอคติวิตีโดยให้ทำปฏิกิริยากับ crystalline cellulose เช่น กระดาษกรอง และ Avicel เป็นต้น (Wike *et al.*,1983)

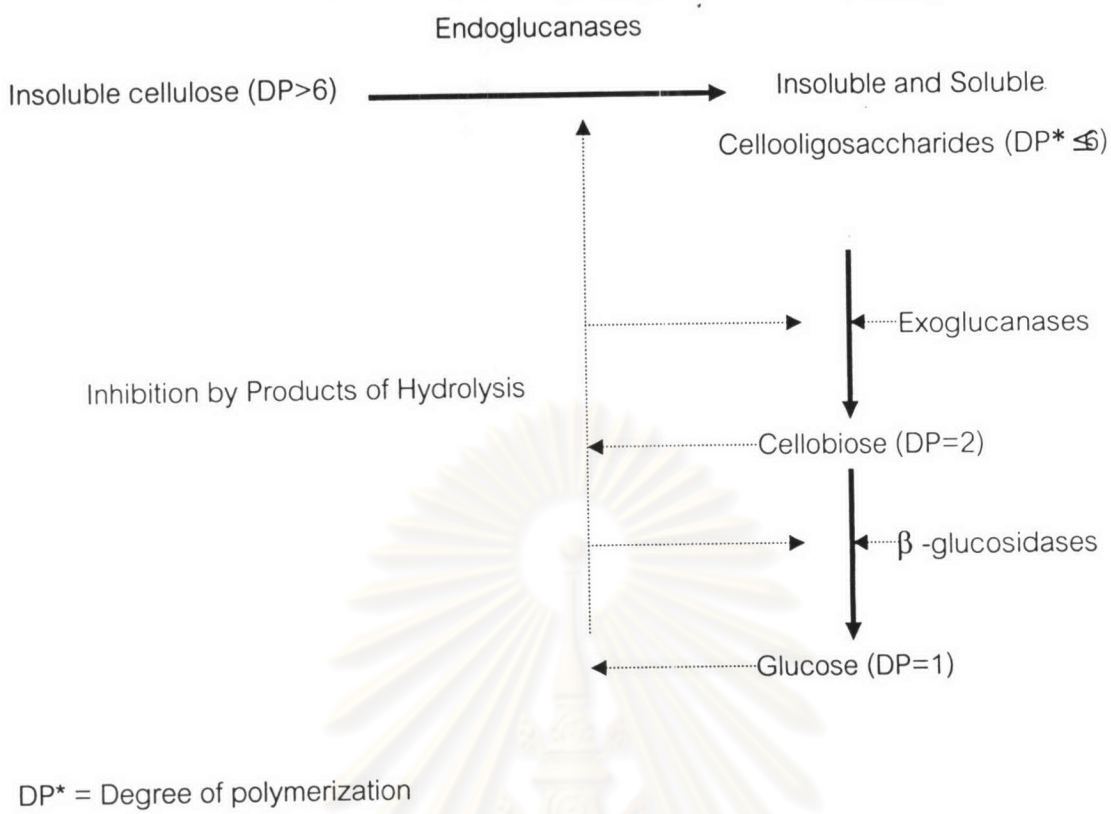
เอนโดกลูคาเนส (EC 3.2.1.4, 1,4- β-D-glucan-glucanohydrolase **หรือ** Cx)

ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณพันธะ β-1,4-glycosidic linkage ภายในสายเซลลูโลสบริเวณ amorphous cellulose อย่างสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลสั้นๆ เช่น เซลโลไบโอส และถ้าปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์จะได้กลูโคส สามารถวัดแอคติวิตีโดยให้ทำปฏิกิริยากับ carboxymethylcellulose (CMC) เป็นต้น (Wike *et al.*,1983)

เบตา-กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21, β-D-glucoside glucohydrolase **หรือ** cellobiase)

ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลโลไบโอสบริเวณพันธะ β-glucosidic bond ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส (β-D-glucose) 2 โมเลกุล สามารถวัดแอคติวิตีโดยให้ทำปฏิกิริยากับ cellobiose และ ρ-nitrophenyl- β-D-glucopyranoside (ρ-NPG) เป็นต้น (Wike *et al.*,1983)

ดังนั้นการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลสอย่างสมบูรณ์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคสนั้น ต้องอาศัยการทำงานของ เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดสร่วมกัน เช่น จุลินทรีย์จะผลิตเอกโซกลูคาเนส และเอนโดกลูคาเนสจากนั้นจึงขับออกนอกเซลล์ เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น เซลโลไบโอส จากนั้นเซลโลไบโอสจะซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ และเบตา-กลูโคซิเดสจะย่อยสลายเซลโลไบโอสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสเพื่อใช้เป็นพลังงานต่อไป โดยเซลโลไบโอส 1 โมเลกุล จะย่อยสลายได้น้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล



DP* = Degree of polymerization

รูปที่ 2.2 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลส (ดัดแปลงจาก Wike *et al.*,1983)

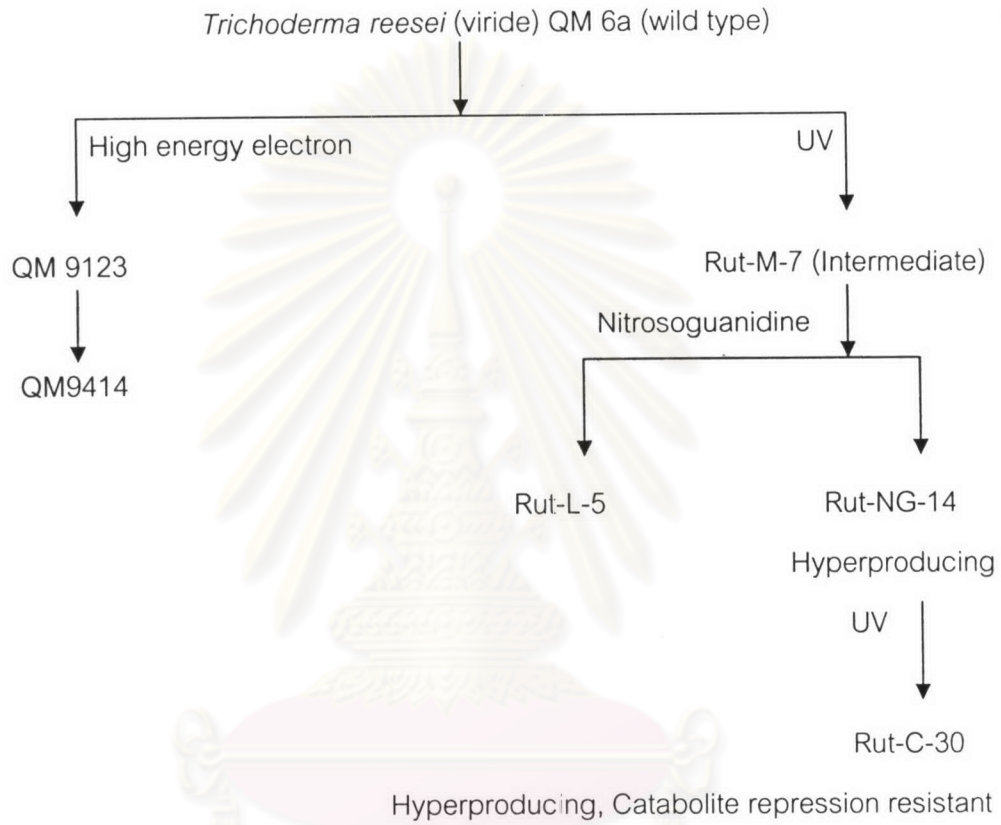
2.3 การผลิตเซลลูเลส

ในปัจจุบันเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการต่างๆ มาก โดยเฉพาะในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น ในอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อการผลิตอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมอาหารเพื่อการผลิตน้ำตาล ไวน์ อุตสาหกรรมเชื้อเพลิงเพื่อการผลิตเอทธานอล หรืออุตสาหกรรมสิ่งทอเพื่อการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้าย ดังนั้นการผลิตเซลลูเลสให้ได้ปริมาณมากและมีสมบัติตรงความต้องการ กระบวนการผลิตจึงมีส่วนสำคัญ เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเซลลูเลส เช่น จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งผลิตเซลลูเลส แหล่งคาร์บอน การปรับสภาพวัตถุดิบ แหล่งไนโตรเจน แหล่งอาหารเสริม และอุณหภูมิ เป็นต้น

2.3.1 **จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งผลิตเซลลูเลส** (Cellulolytic microorganisms)

การย่อยสลายเซลลูโลสในธรรมชาติส่วนมากเกิดเนื่องมาจากการทำงานของจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย แอคติโนมัยซิทีส และเชื้อรา ซึ่งจุลินทรีย์พวกนี้จะทำการย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้กลูโคสเพื่อใช้เป็นพลังงานในการเจริญเติบโต จุลินทรีย์พวกนี้พบได้ทั่วไปตามสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น ในดิน ในอากาศ บนซากพืชที่เน่าเปื่อยผุพัง เป็นต้น โดยเฉพาะเชื้อราได้

มีผู้ทำการศึกษาหาสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ดีมาเป็นระยะเวลานานแล้ว เช่น เชื้อรา *Trichoderma reesei* ที่คัดแยกโดย U.S. Army Natrick Research จากนั้นมีผู้ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เป็น *T. reesei* QM-6a และ Rut-M-7 จนมาถึงสายพันธุ์ QM 9414 และ Rut C30 ดังรูปที่ 2.3 โดยเฉพาะ *T. reesei* Rut C30 เนื่องจากมีการผลิตเซลลูเลสและไซแลนเนสได้มาก ทั้งยังสามารถทนต่อภาวะการผลิตได้ดี



รูปที่ 2.3 การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *T. reesei* ในการผลิตเซลลูเลส (Wike *et al.*,1983)

ถึงแม้ว่าเชื้อรา *T. reesei* Rut C30 สามารถผลิตเซลลูเลส เช่น เอกโซกลูคาเนส และไซแลนเนสได้ในปริมาณมาก สามารถทนต่อปฏิกิริยาในการทำงานได้ดี แต่ในงานบางชนิด เช่น การกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายด้วยเซลลูเลส กลับต้องการเซลลูเลสที่มีเอกโซกลูคาเนสในปริมาณน้อยแต่ต้องการเอนโดกลูคาเนสในปริมาณมาก ในขณะที่การผลิตแอลกอฮอล์จากวัสดุทางการเกษตรต้องการเชื้อราที่มีเซลลูเลสในกลุ่มเบตา-กลูโคซิเดสมาก ดังนั้นเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราเพียงชนิดเดียวอาจไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในทุกๆ งานวิจัย จึงได้มีผู้ทำการคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ดีจากวัสดุและแหล่งวัตถุดิบต่างๆ มาอย่างต่อเนื่องทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เช่น การคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเซลลูเลสจากดิน (Yamanobe *et al.*, 1987)

Botryotrichum sp. ซึ่งคัดแยกจากได้จากดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ (ศิริพงษ์ เปรมจิต, 2533) *Aspergillus* sp. *Helicomyces* sp. และ *Chaetomium* sp. ที่คัดแยกจากดิน ปุ๋ย และซากพืชซากสัตว์ในประเทศไทย (Limtong *et al.*,1990) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลสจากซากพืชบริเวณทะเลทราย Sonoran ประเทศสหรัฐอเมริกา (Sreenath *et al.*,1996) จากดินในบริเวณสวน Sayap-Kinabalu ประเทศมาเลเซีย (Kader and Omar, 1998) จากดินชั้นบนและล่างในประเทศอียิปต์ (Razak *et al.*, 1999) *Acrophialophora* sp. จากดินบริเวณปลูกป่านศรนารายณ์ (Punnapayak *et al.*,1999) และ *Aspergillus fumigatus* จากอากาศบริเวณที่ทิ้งขยะในประเทศโปแลนด์ (Krikstaponis *et al.*, 2001) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีเชื้อราอีกหลายชนิดที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เชื้อราบางชนิดที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้

ชนิด	เอกสารอ้างอิง
Acrophialophora sp.	Punnapayak *et al.*, 1999
Aspergillus aureoviride	Zaldivar *et al.*, 2001
A. fumigatus	Dahot and Noomrio, 1996 ; Ximenes *et al.*, 1996
A. niger	Juhasz *et al.*, 2003 ; Hrmova *et al.*, 1989 ; Coral *et al.*, 2002
A. flavus	Razak *et al.*, 1999
A. terreus	Elshafei *et al.*, 1990
Botryotrichum sp.	ศิริพงษ์ เปรมจิต, 2534
Curvularia pallescens	Freire *et al.*, 1999
Coriolus versicolor	Evans, 1985
Fusarium sp.	Misukoshi *et al.*, 1977
Fusarium oxysporum	Christakopoulos *et al.*, 1996
Helicomyces sp.	Limtong *et al.*, 1990
Humicola insolens	Azevedo *et al.*, 2000
Irpex lacteus	Kanda *et al.*, 1978

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 เชื้อราบางชนิดที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ (ต่อ)

ชนิด	เอกสารอ้างอิง
Mucor pusillus	Grajek, 1987
Penicillium sp.	Castellanos *et al.*, 1995
P. purpurogenum	Kamagata *et al.*, 1991
Piromyces sp.	Dijkerman *et al.*, 1996
Pleurotus sajor-caju	Reddy *et al.*, 2003 ; Kannan and Oblisami, 1990
Poria placenta	Ratto *et al.*, 1997
Pyricularia oryzae	Hirayama *et al.*, 1978
Trichoderma sp.	Vlaev *et al.*, 1997
T. harzianum	Wojtezak *et al.*, 1987; Saddler *et al.*, 1985
T. reesei	Busto *et al.*, 1997; Reczey *et al.*, 1996
T. reesei QM 9414	Acebal *et al.*, 1986 ; Krishna *et al.*, 2000
T. reesei Rut C30	Xiao-Bin *et al.*, 1999 ; Szengyel and Zacchi, 2000
T. viride	Gomes *et al.*, 1992 ; Kim *et al.*, 1988

2.3.2 **แหล่งคาร์บอน** (Carbon sources)

แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญที่จุลินทรีย์ใช้ในการสร้างพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ จุลินทรีย์ที่เจริญในภาวะที่ไม่มีอากาศใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในขณะที่จุลินทรีย์ที่เจริญในภาวะมีอากาศใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50 ถึง 55 ในการเจริญเติบโต (สมใจ ศิริโภค, 2544)

ในการผลิตเซลลูเลสแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ คือ เซลลูโลสบริสุทธิ์ เนื่องจากมีความจำเพาะต่อเซลลูเลสสูง ดังนั้นจึงให้ผลผลิต คือ เซลลูเลสในปริมาณมาก และมีผลิตภัณฑ์อื่นๆ ปนเปื้อนมาน้อย เช่น microcrystalline cellulose (MCC) (Krishna *et al.*, 2000) Solka Floc (Reczey *et al.*, 1996) α-cellulose (Punnapayak *et al.*, 1999) Avicel (Ratto *et al.*, 1997) carboxymethylcellulose (CMC) (Kanda *et al.*, 1978) และ กระดาษกรอง (Xiemenes *et al.*, 1996) เป็นต้น อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเซลลูโลสบริสุทธิ์จะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับผลิตเซลลูเลส แต่เนื่องจากมีราคาแพง จึงทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ดังนั้นจึงได้มีผู้วิจัยหาแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ที่มีราคาถูกกว่า มาเป็นแหล่งเซลลูโลสเพื่อผลิตเซลลูเลส สามารถแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 2 กลุ่ม คือ

วัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม

แหล่งคาร์บอนที่ได้จากวัสดุพวกนี้มักเป็นวัสดุเหลือทิ้ง จากกระบวนต่างๆ ในอุตสาหกรรม เช่น เยื่อกระดาษ (Maheshwari *et al.*, 1994) เป็นต้น

วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร

แหล่งคาร์บอนที่ได้จากวัสดุพวกนี้มักเป็นผลิตผลเหลือทิ้งจากการเกษตรแบบต่างๆ เช่น ฟางข้าว (Vlasenko *et al.*, 1997) ฟางข้าวสาลี (Ortega *et al.*, 2000) รำข้าวสาลี (Smits *et al.*, 1996) ชานอ้อย (Bigelow and Wyman, 2002) และซังข้าวโพด (Vlaev *et al.*, 1997 และ Bigelow and Wyman, 2002) เป็นต้น

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีการปลูกพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆ หลายชนิด เป็นพื้นที่กว้าง เช่น ข้าว อ้อยข้าวโพด และกล้วย ดังนั้นในแต่ละปีจึงมีขยะที่เกิดจากการเกษตรเป็นจำนวนมาก ดังตารางที่ 2.2 ถึง 2.4 แสดงให้เห็นถึงปริมาณการผลิตผลผลิตทางการเกษตรบางชนิด

ตารางที่ 2.2 ปริมาณการเพาะปลูกอ้อยในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2535 ถึง 2545 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, http://www.oae.go.th/statistic/index.html)

พ.ศ.	เนื่อที่เพาะปลูก (ไร่)	เนื้อที่ให้ผล (ไร่)	ผลผลิต (ตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กก.)
2535/36	6267	6198	39827	6426
2536/37	5355	4997	37823	7569
2537/38	5887	5767	50597	8774
2538/39	6279	6156	57974	9417
2539/40	6314	6127	56394	9204
2540/41	5897	-	46873	7949
2541/42	5735	-	50332	8776
2542/43	5862	-	52813	9010
2543/44	5481	-	49563	9042
2544/45	6320	-	60013	9496

ตารางที่ 2.3 ปริมาณการเพาะปลูกข้าวโพดในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2535 ถึง 2545 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, http://www.oae.go.th/statistic/index.html)

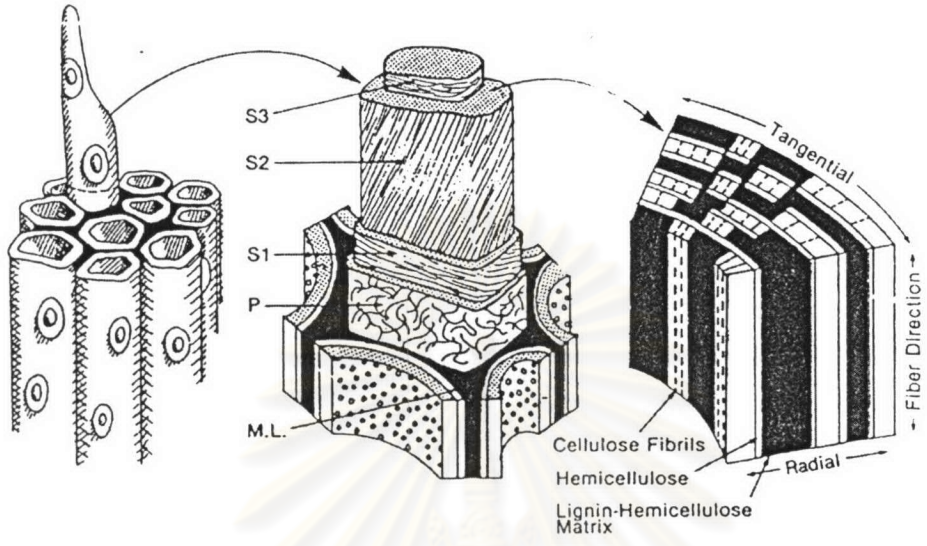
พ.ศ.	เนื่อที่เพาะปลูก (ไร่)	เนื้อที่ให้ผล (ไร่)	ผลผลิต (ตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กก.)
2535/36	8446	7725	3672	475
2536/37	8370	7610	3328	437
2537/38	8829	8446	3965	469
2538/39	8346	7896	4155	526
2539/40	8665	8217	4533	552
2540/41	8729	7488	3832	512
2541/42	9008	8628	4617	535
2542/43	7719	7541	4286	568
2543/44	7802	7594	4462	588
2544/45	7685	7474	4466	598

ตารางที่ 2.4 ปริมาณการเพาะปลูกกล้วยหอมในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2540 ถึง 2544 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, http://www.oae.go.th/statistic/index.html)

พ.ศ.	เนื่อที่เพาะปลูก (ไร่)	เนื้อที่ให้ผล (ไร่)	ผลผลิต (ตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กก.)
2540	79,405	56,298	146,421	2,601
2541	86,207	64,110	168,947	2,635
2542	85,602	56,812	159,607	2,809
2543	86,272	62,755	174,378	2,778
2544	61,150	52,747	151,458	2,871

ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเซลลูเลสน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยลดปัญหาขยะที่เกิดจากวัสดุการเกษตร และที่สำคัญเนื่องจากหาง่าย และมีราคาถูก ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำ แต่วัสดุเหล่านี้ส่วนมากเป็นต้นพืช หรือองค์ประกอบต่างๆ ของพืช ซึ่งในองค์ประกอบหลักไม่ได้มีเพียงเซลลูโลสอย่างเดียว แต่จะ

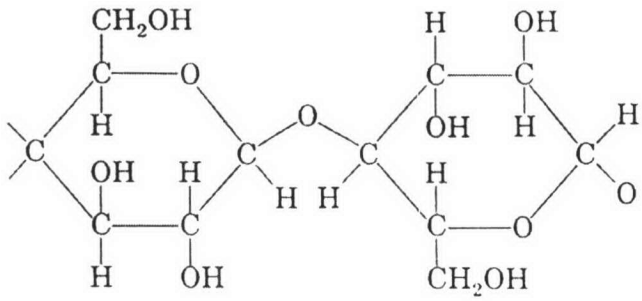
ประกอบไปด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ประกอบไปด้วย เซลลูเลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และ เถ้า ดังแสดงในรูปที่ 2.4



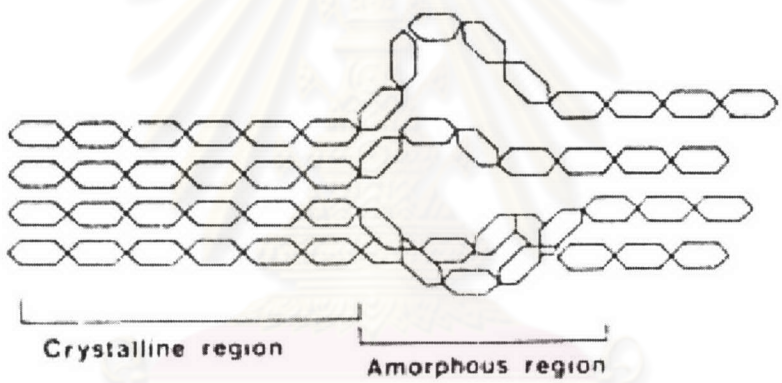
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของเนื้อไม้ (Buswell, 1991)

เซลลูโลส

เซลลูโลส เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของผนังเซลล์พืช เป็นคาร์โบไฮเดรทที่มีมากที่สุดในโลก เป็นกลูแคนที่มีกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1→4) glycosidic linkage (รูปที่ 2.5) ระหว่างอะตอมของออกซิเจนบนวงแหวน Pyranose กับหมู่ –OH ของโมเลกุลถัดไป เกิดเป็นสายพอลิเมอร์ของ D-anhydroglucopyranose ลักษณะอณูของเซลลูโลสเป็นสายยาวและไม่แตกกิ่ง (รูปที่ 2.6) มีบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนอยู่หนาแน่นทำให้โครงสร้างแข็งแรง เป็นระเบียบ ยากต่อการย่อยสลาย เรียก Crystalline regions มีประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และบริเวณที่มีพันธะไฮโดรเจนน้อย ทำให้โครงสร้างไม่เป็นระเบียบจึงย่อยสลายได้ง่ายกว่า เรียก Amorphous regions มีประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ (Voet and Voet, 1995) ความยาวโมเลกุลของกลูโคสที่มาต่อกันเป็นเซลลูโลสแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช เช่น ฝ้าย มีโมเลกุลของกลูโคสมาต่อกันมากกว่า 1,000 หน่วย และอาจพบมากถึง 5,000 หน่วย (อภิชาติ สนธิสมบัติ, 2545) โดยประมาณ 2,000 สายจะมารวมตัวกันเป็นมัดเรียกว่า เส้นใย (fibril) มีค่า Degree of polymerization (DP) ประมาณ 1,000 ถึง 2,000 หน่วย แต่ในบางกรณีอาจพบค่า DP สูงถึง 14,000 หน่วยได้ (Heikinheimo and Buchert, 2001)



รูปที่ 2.5 การเชื่อมต่อของกลูโคสแบบ β-(1,4) glycosidic linkage
(ดัดแปลงจาก Hollen *et al.*, 1979)



รูปที่ 2.6 โมเลกุลของสายเซลลูโลส (ดัดแปลงจาก Nevalainen and Penttila)

การย่อยสลายเซลลูโลส

เนื่องจากเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคสต่อกันเป็นสายยาว ดังนั้นการย่อยสลายเซลลูโลสอย่างสมบรูณ์จะทำให้ได้กลูโคสออกมา แต่ถ้าย่อยสลายไม่สมบรูณ์จะเกิดน้ำตาลที่มีโมเลกุลสายสั้นออกมา เช่น เซลโลไบโอส เป็นต้น ซึ่งวิธีย่อยสลายเซลลูโลสมี 2 วิธี คือ

วิธีทางเคมี (Chemical hydrolysis) แบ่งย่อยออกได้เป็น 2 วิธี คือ

การย่อยสลายด้วยกรด (Acid hydrolysis)

วิธีนี้เป็นการอาศัยกรดเข้มข้น หรือ เจือจางเข้าทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสโดยตรง ข้อดีคือปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือ น้ำตาลที่เกิดขึ้นอาจถูกทำลายด้วยกรด หรือทำ

ปฏิกิริยากับกรดได้สารชนิดอื่น เช่น เฟอฟูรัล และต้องใช้ภาชนะที่ทนการกัดกร่อนได้ดี ตัวอย่าง เช่น ใช้กรดไฮโดคลอริก 2 โมลาร์ (Punnapayak, 1980) หรือกรดซัลฟูริก 75 เปอร์เซ็นต์ (Chen and Wayman, 1991) เป็นต้น

การย่อยสลายด้วยด่าง (Alkali hydrolysis)

วิธีนี้เป็นการอาศัยด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือแอมโมเนีย เข้าทำปฏิกิริยา และมักต้องอาศัยอุณหภูมิสูง และออกซิเจนช่วยในการเร่งปฏิกิริยา

วิธีทางชีวภาพ (Biological hydrolysis)

ทำโดยใช้เอนไซม์ได้แก่ เซลลูเลส ซึ่งส่วนมากผลิตจากเชื้อรา และแบคทีเรีย ข้อดีของการใช้เอนไซม์ทำปฏิกิริยา คือ เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะ ทำให้ผลผลิตที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง ไม่จำเป็นต้องอาศัยปฏิกิริยาที่รุนแรงในการทำปฏิกิริยา ทำให้บำบัดของเสียได้ง่าย ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมมากเหมือนวิธีทางเคมี แต่มีข้อเสียคือ ระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาจะนานกว่า

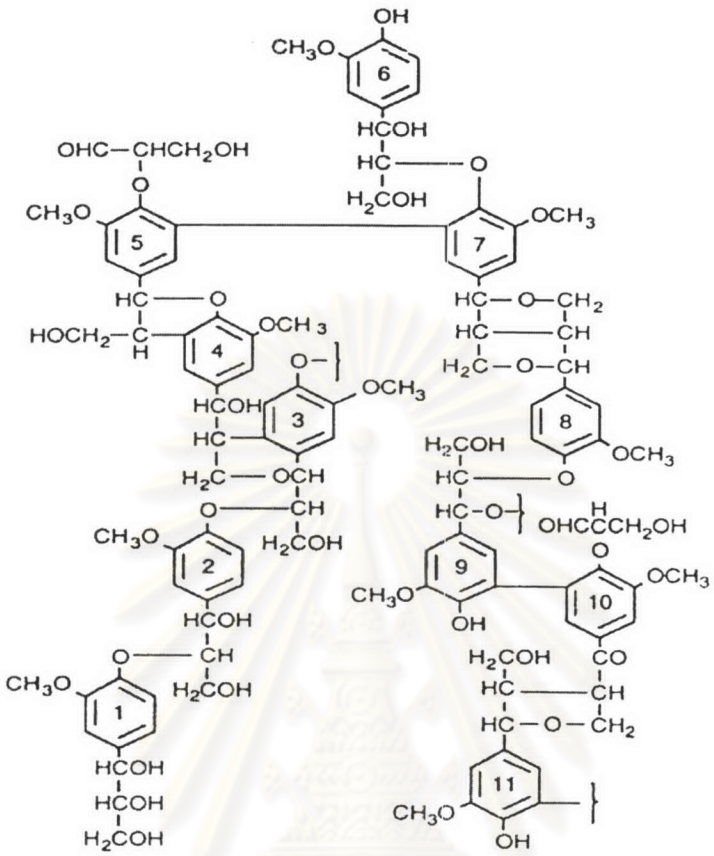
เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนเป็นสารอินทรีย์ที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส องค์ประกอบหลัก คือ น้ำตาล 5 โมเลกุล เช่น ไซโลส หรือ ไซแลน มาเชื่อมต่อกันเป็นสายโครงสร้างหลักของโมเลกุล โครงสร้างมักเป็นกิ่งก้านสาขา และอาจพบน้ำตาลชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น กลูโคส อะราบิโนส เป็นต้น

ในพืชไม้เนื้อแข็งพบไซแลนเป็นองค์ประกอบ 20 ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ ในไม้เนื้ออ่อนพบเพียง 8 เปอร์เซ็นต์ (Haltrich *et al.*, 1996) โดยโครงสร้างเป็นน้ำตาลดี-ไซโลส (D-Xylose) มาเชื่อมต่อกันเป็นสายหลักด้วยพันธะเบตา-1,4-ไซโลซิดิก (β-1,4-xylosidic) เป็นสายหลัก (Christakolos *et al.*, 1996) เฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนสามารถูกย่อยสลายได้ด้วยกรด หรือ ด่าง เช่นเดียวกับเซลลูโลส แต่การย่อยสลายด้วยเอนไซม์นั้นจะมีความจำเพาะต่อไซแลนเนส เช่น เอนโดไซแลนเนส (Endoxylanase) และ เบตา-ไซโลซิเดส (β-xylosidase) เป็นต้น

ลิกนิน

ลิกนินเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากรองจากเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส จัดเป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) ลิกนินมาจากคำว่า lignum ซึ่งเป็นคำในภาษาละติน แปลว่า ไม้ โครงสร้างประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ phenyl propane ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ C-O-C หรือ C-C ซึ่งจะจับประสานกันเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ในลักษณะ 3 มิติ ที่มีกิ่งก้านจำนวนมาก (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 แบบจำลองโมเลกุลลิกนินของไม้เนื้ออ่อน (Griffin, 1994)

จากการศึกษาพบว่าการผลิตเซลลูเลสนั้นสามารถนำวัสดุการเกษตรมาเป็นแหล่งเซลลูโลสได้ เนื่องจากวัสดุเหล่านี้ส่วนมากมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบอื่นๆ เช่น เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า (ตารางที่ 2.5) และในวัสดุการเกษตรบางชนิด เช่น ก้านใบกล้วยอาจมีแร่ธาตุหรือสารประกอบบางชนิดที่อาจช่วยเสริมการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ (ตารางที่ 2.6) แต่การนำไปใช้เพื่อผลิตเซลลูเลสนั้นจำเป็นต้องมีการปรับสภาพ (pretreatment) ให้เหมาะสมต่อการใช้ เช่น ตัด บด ให้มีขนาดเล็กลง กำจัดองค์ประกอบอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ เช่น เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน ออกเสียก่อนเพื่อลดปัญหาการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ ซึ่งวิธีการปรับสภาพวัสดุการเกษตรที่จะนำมาใช้ผลิตเซลลูเลสที่นิยมใช้สามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธี คือ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ

ตารางที่ 2.5 ปริมาณเซลลูเลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้าของวัสดุการเกษตรและขยะจากอุตสาหกรรมบางชนิด

ชนิดพืช	ปริมาณองค์ประกอบ (เปอร์เซ็นต์)				เอกสารอ้างอิง
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า	
ชานอ้อย	41	20	20	-	Fermor, 1993
ชานอ้อย	33.28	22.58	6.15	4.25	Aiello *et al.*, 1996
ฟางข้าวสาลี	40	28	17	-	Fermor, 1993
ต้นทานตะวัน	38.50	33.50	17.50	4.57	Sharma *et al.*, 2002
กระดาษ	85–99	0	0–15	-	Sun and Cheng, 2002
กระดาษหนังสือพิมพ์	40–55	25–40	18–30	-	Sun and Cheng, 2002

ตารางที่ 2.6 ชนิดและปริมาณแร่ธาตุบางชนิด ที่พบเป็น องค์ประกอบในส่วนต่างๆ ของต้นกล้วย (Simmons, 1959)

ชนิดแร่ธาตุ	ปริมาณแร่ธาตุ (%/dry wt)		
	ก้าน	ลำต้น	ใบ
N	0.4-1.4	0.4-2.2	0.3-2.2
P_2O_5	0.4-1.1	0.06-1.2	0.06-0.5
K_2O	6.6-21	2.2-8.5	2.7-6.5
CaO	0.5-2.4	1.2-3.9	1.0-4.8
MgO	0.4-0.8	0.4-1.0	0.7-6.8
Fe_2O_3	0.05-0.9	0.003-0.3	0.2
SO_3	0.3-0.7	0.3-0.6	0.3
Cl	0.06-0.08	0.06-1.2	0.1
Na_2O	0.1-0.3	0.2-0.3	0.2
SiO_2	0.08-1.6	0.7-1.3	4.1-4.4

2.3.3 การปรับสภาพวัตถุดิบทางการเกษตร

วิธีทางกายภาพ (physical pretreatment)

เป็นวิธีที่มีความง่าย และสะดวกมากที่สุด ได้แก่ การตัด บด การปรับสภาพด้วยวิธีนี้จะช่วยให้เซลลูโลสมีค่า crystallinity ลดลง และเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวต่อการทำงานของเอนไซม์ (ตารางที่ 2.7)

วิธีทางเคมี (chemical pretreatment)

เป็นวิธีที่ใช้สารเคมีบางชนิดเข้าไปทำปฏิกิริยากับวัสดุการเกษตร ทำให้สามารถย่อยสลายองค์ประกอบต่างๆ ที่ไม่ต้องการ เช่น เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน ออกจากวัสดุทางการเกษตรได้ดี นิยมใช้มากในปัจจุบันเนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลาสั้น แต่มีข้อเสียคือ ต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อนได้ดี เสียค่าใช้จ่ายสูง สามารถแบ่งย่อยตามกลุ่มสารเคมีที่ทำปฏิกิริยาได้ 3 กลุ่ม คือ การปรับสภาพด้วยกรด (acid pretreatment) เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)เป็นต้น การปรับสภาพด้วยด่าง (alkali pretreatment) เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$)เป็นต้น และ การปรับสภาพด้วยสารเคมีชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 2.8)

วิธีทางชีวภาพ (biological pretreatment)

วิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่มักใช้จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายลิกนิน โดยเฉพาะกลุ่มของ white-rot เช่น *Phanerochaete chrysosporium* (Zacchi *et al.*, 2000) มาเป็นตัวปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส ซึ่งจะช่วยในการกำจัดลิกนินส่วนหนึ่งออกไปได้ มีข้อดีคือ ใช้สารเคมีที่มีความเป็นกรดและด่างต่ำทำให้จัดการกับของเสียที่เกิดขึ้นได้ง่าย และช่วยรักษาสิ่งแวดล้อม จึงลดค่าใช้จ่ายได้มาก แต่มีข้อเสียคือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรง และใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยานาน

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างการปรับสภาพวัสดุทางการเกษตรบางชนิดด้วยวิธีทางกายภาพแบบต่างๆ

การปรับสภาพ	ชนิดพืช	เอกสารอ้างอิง
ตัด บด	รำข้าวสาลี	Jecu, 2000
	ฟางข้าวสาลี	Jecu, 2000
	ฟางข้าว	Park *et al.*, 2002
	switch grass	Chang and Holtzapple, 2000
น้ำร้อนอุณหภูมิ 200 ถึง 230 ^{o} C	ชานอ้อยฮาวาย	Bigelow and Wyman, 2002
รังสี	ฟางข้าว	Xin and Kumakura, 1993

ตารางที่ 2.8 การปรับสภาพวัสดุทางการเกษตรบางชนิดด้วยวิธีทางเคมี

การปรับสภาพ	สารเคมี	ชนิดพืช	เอกสารอ้างอิง
การปรับสภาพด้วยกรด	HCl	ก้านเครือกล้วย	Krishna, 1999
	H_2SO_4	ก้านเครือกล้วย ฟางข้าว ซังข้าวโพด	Krishna, 1999 Vasenko *et al.*, 1996 Vlaev *et al.*, 1997
	HNO_3 0.6 N	ฟางข้าวสาลี	Dahot and Noomrio, 1996
	Peracetic acid	Switch grass, ชานอ้อย	Chang *et al.*, 2000
	H_3PO_4	ฝ้าย	Ashadi *et al.*, 1996
การปรับสภาพด้วยด่าง	$Ca(OH)_2$	ฟางข้าวสาลี ซังข้าวโพด	Chang *et al.*, 1998 Kaar and Holtzapple, 2000

วิธีการผสม (various combination pretreatment)

เป็นวิธีการปรับสภาพที่รวมวิธีต่างๆ มากกว่า 1 วิธี เข้าด้วยกัน ทำให้มีการปรับสภาพมีประสิทธิภาพมากขึ้น นิยมใช้มากในปัจจุบัน เช่น ใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การตัด บด ร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น (ตารางที่ 2.9)

ตารางที่ 2.9 การปรับสภาพวัสดุทางการเกษตรบางชนิดด้วยวิธีผสม

ชนิดพืช	การปรับสภาพ	เอกสารอ้างอิง
ฝ้าย	NaOH 1 M 170 ^{O} C	Tahoun and Ibrahim, 1999
ฟางข้าวสาลี	NaOH 1 % 110 ^{O} C NaOH 1 % 120 ^{O} C	Acebal *et al.*, 1986 Estrada *et al.*, 1988
ชานอ้อย	NaOH 4 % 120 ^{O} C	Aguiar *et al.*, 2001

2.3.4 **แหล่งไนโตรเจน** (Nitrogen source)

เนื่องจากจุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 8 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งเซลล์ (อรพิน ภูมิภมร,2526 และ สมใจ ศิริโภค,2544) ดังนั้นจุลินทรีย์จึงต้องการธาตุอาหารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง อย่างไรก็ดีจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการไนโตรเจนใน

รูปแบบที่แตกต่างกันไป บางชนิดเจริญได้ดีในอินทรีย์ไนโตรเจน ชนิดที่นิยมใช้ ได้แก่ ยูเรีย และเปปโตน เป็นต้น และบางชนิดเจริญได้ดีในอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน ได้แก่ แอมโนเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และแอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) เป็นต้น เนื่องจากมีราคาถูก แต่มีข้อเสียคือระเหยง่ายดังนั้นต้องเก็บในภาชนะที่ปิดมิดชิด การใช้แอมโนเนียมซัลเฟต มักก่อให้เกิดภาวะเป็นกรดในอาหารเนื่องจากจะเกิด SO^{-2}_4 ในอาหารทำให้ค่าความเป็นกรดและด่างลดลง ในขณะที่การใช้แอมโมเนียมไนเตรท จะทำให้ค่าความเป็นกรดและด่างในอาหารสูงขึ้น ในการผลิตเซลลูเลสมักมีการใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้งในด้านชนิดและปริมาณที่ใช้ ขึ้นอยู่กับชนิดจุลินทรีย์และภาวะการผลิต ดังแสดงในตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 การแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ในการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราบางสายพันธุ์

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณที่ใช้ (%w/v)	ชนิดเชื้อรา	เอกสารอ้างอิง
ยูเรีย	0.3	*Trichoderma reesei* QM 9414	Krishna *et al.*, 2000
น้ำแช่ข้าวโพด	5	*Aspergillus niger* KK2	Kang *et al.*, 2004
เปปโตน	0.75	*Trichoderma reesei*	Reczey, 1996
NH_4NO_3	5	*T. reesei*	Busto *et al.*, 1996
	6	*T. reesei*	Ortega *et al.*, 2001
$(NH_4)_2SO_4$	0.4	*Acrophialophora* sp.	Punnapayak *et al.*, 1999
	1	*Aspergillus niger*	Jecu, 2000
	0.25	*A. fumigatus*	Dahot and Noomrio, 1996
	0.05	*Pellicularia filamentosa*	Mizukoshi *et al.*, 1977
	0.14	*Trichoderma* sp.	Vlaev *et al.*, 1997
	0.5	*T. reesei* Rut C30	Domingues *et al.*, 2000
	0.14	*T. reesei* Rut C30	Szengyel and Zacchi, 2000
	0.2	*T. reesei* Rut C30	Xiao-Bin *et al.*, 1999
KNO_3	0.1	*Pestalotiopsis versicolor*	Rao *et al.*, 1983

2.3.5 **อุณหภูมิ** (Temperature)

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากเกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ เพราะว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดเจริญได้ดีที่ในอุณหภูมิแตกต่างกัน แต่ในบางกรณีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ไม่ได้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่อความคงตัวและการทำงานของเอนไซม์ที่ปลดปล่อย เช่น

Macris และคณะ (1989) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต cellobiohydrolase CMCase และ β-glucosidase จาก *Neurospora crassa* คือ 25 องศาเซลเซียส

Bastawde (1992) ผลิตเซลลูเลส (เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส) จากเชื้อรา *A. terreus* ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้ไปย่อยสลายเซลลูโลสพบว่าสามารถย่อยสลายได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้น ภายใน 48 ชั่วโมง

Gomes และคณะ (1992) ผลิตเซลลูเลสจากเชื้อรา *T. viride* BT 2169 โดยใช้ sulphite pulp เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต FPase และ β-glucosidase คือ 32.8 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง และ 31.1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 170 ชั่วโมง ตามลำดับ

Prasertsan และ Oi (1992) ผลิตเซลลูเลสจากเชื้อรา *A. niger* ATTC 6275 โดยใช้ภาวะการผลิตแบบ solid state พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต CMCase คือ 30 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เศษต้นปาล์มเป็นแหล่งเซลลูโลส

Maheswari และคณะ (1993) ผลิตเซลลูเลสจาก *T. reesei* โดยใช้ฟางข้าวสาลีเป็นแหล่งเซลลูโลส พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต CMCase และ FPase คือ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน

Jecu (2000) ศึกษาผลของอุณหภูมิในช่วงต่างๆ คือ 25 28 30 34 37 ต่อการผลิตเอนโดกลูคาเนสจาก *A. niger* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต คือ 30 และ 34 องศาเซลเซียส

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเซลลูเลส

ค่าความเป็นกรดและด่างและอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเซลลูเลสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังนั้นในการนำเซลลูเลสไปใช้ในกระบวนการต่างๆ จำเป็นที่จะต้องศึกษาค่าความเป็นกรดและด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเซลลูเลสจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2.11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.11 ค่าความเป็นกรดและด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลสทนร้อนจากจุลินทรีย์บางชนิด

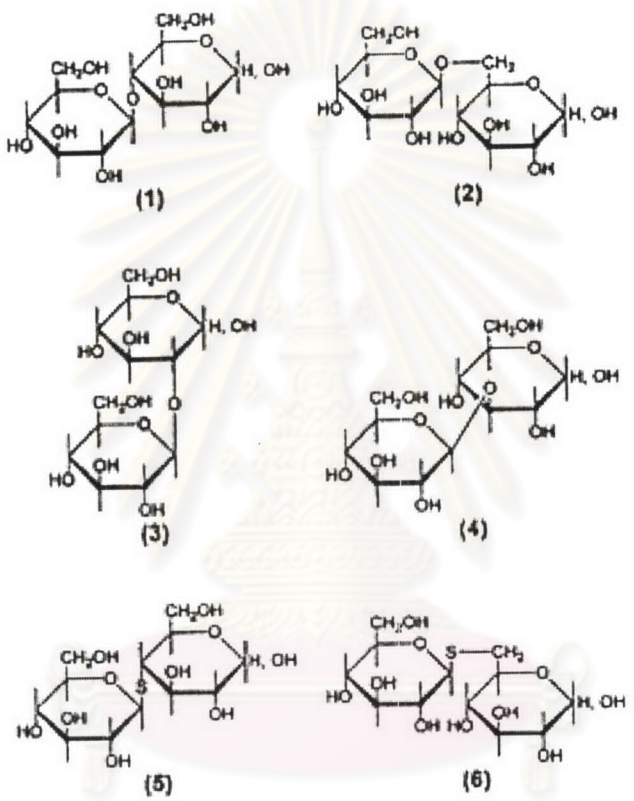
ชนิดเชื้อรา	ภาวะที่เหมาะสมในการทำงาน		เอกสารอ้างอิง
	อุณหภูมิ (^{o} C)	ค่าความเป็นกรดและด่าง	
Anaerocellum thermophilum	85–90	5.0–6.6	Zverlov *et al.*, 1998
Bacillus subtilis	65–70	5.0–6.5	Mawadza *et al.*, 2000
Pyrococcus furiosus	102–105	–	Kengen *et al.*, 1993
Thermotoga neapoltana (EndocellulaseA)	95	6.0	Bok *et al.*, 1998

Kvesitadze และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาต่อเอนโดกลูคาเนสจากเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ เช่น *Allescheria terrestrisa Chaetomium thermophile Aspergillus versicolor* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต คือ 30 องศาเซลเซียส ยกเว้น *Allescheria terrestrisa* ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 40 ถึง 45 องศาเซลเซียส เชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาต่อเอนโดกลูคาเนส คือ 50 ถึง 70 องศาเซลเซียส

George และคณะ (2001) ศึกษาค่าความเป็นกรดและด่างอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาต่อเอนโดกลูคาเนสจากแอคติโนมัยซีสทนร้อน *Thermomonospora* พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 และความเสถียรในช่วงค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 7 ถึง 10 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส และสามารถคงค่าความเสถียรได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ใน 72 ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 และ 70 องศาเซลเซียส ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์จะลดลงเหลือ 6 และ 3 ชั่วโมงตามลำดับ

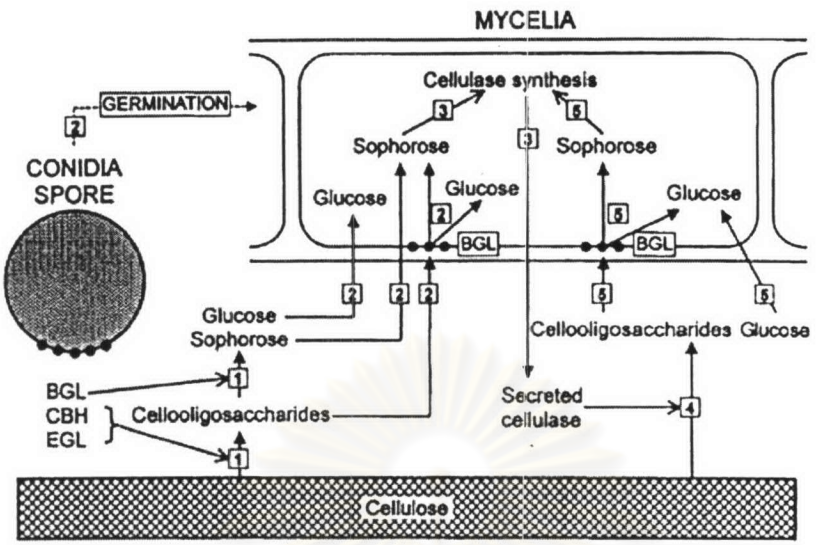
2.5 ผลของน้ำตาลบางชนิดที่มีต่อการชักนำการผลิตเซลลูเลส

โดยทั่วไปเซลลูเลสสามารถผลิตได้โดยจุลินทรีย์ที่มีการสังเคราะห์เซลลูเลส เมื่อนำจุลินทรีย์ดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบจะเกิดการกระตุ้นให้มีการผลิตเซลลูเลสขึ้น แต่เนื่องจากเซลลูโลสไม่ละลายน้ำและมีโมเลกุลใหญ่จึงไม่สามารถผ่านเข้าเซลล์จุลินทรีย์ได้ จึงไม่ใช่ตัวกระตุ้นโดยตรงให้มีการผลิตเซลลูเลส แต่เมื่อเซลลูเลสที่ถูกหลั่งออกมาจะไปย่อยสลายเซลลูโลสให้เกิดเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ (Cellooligosaccharide) ซึ่งสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ จะกระตุ้นให้เกิดการผลิตเซลลูเลสขึ้น ดังรูปที่ 2.8 ถึง 2.10 ซึ่งมีน้ำตาลหลายชนิดที่สามารถกระตุ้นให้มีการผลิตเซลลูเลสได้

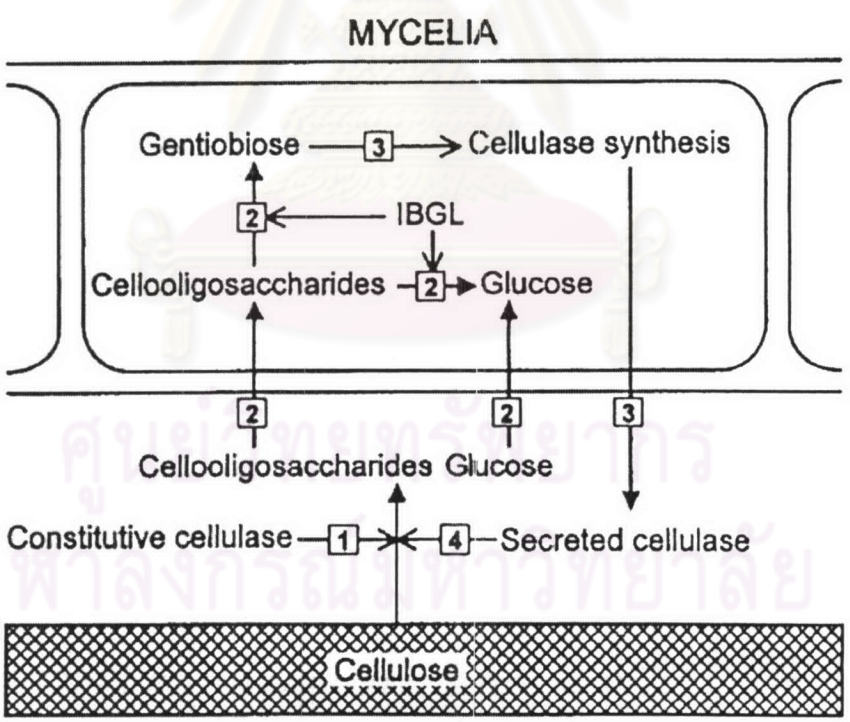


รูปที่ 2.8 โครงสร้างของน้ำตาลบางชนิดที่มีผลต่อการชักนำการผลิตเซลลูเลส,
1. เซลโลไบโอส 2. เจนติโอไบโอส 3. ซอฟอโรส 4. ลามินาริไบโอส
5. ไตโอเซลโลไบโอส 6. ไตโอเจนติไบโอส (Sato and Tomita, 2001)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.9 ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนการกระตุ้นให้มีการผลิตเซลลูเลสจาก *Hypocrea jecorina* (Sato and Tomita, 2001)



รูปที่ 2.10 ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนการกระตุ้นให้มีการผลิตเซลลูเลสจาก *Penicillium. purpurogenum* (Sato and Tomita, 2001)

Thirumale และคณะ (2001) ผลิตเซลลูเลสจาก *Clostridium papyrosolvens* CFR-703 พบว่าน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น เทฮาโลส แลคโตส เซลโลไบโอส ซอฟอโรส และมอลโทส เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการผลิต เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และเบตา-กลูโคซิเดส ได้ดี

Hrmova และคณะ (1989) ศึกษาการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นตัวกระตุ้นให้ผลิตเซลลูเลสจาก *A. terreus* พบว่าลามินาริไบโอส ซอฟอโรส เจนติโอไบโอส และเซลโลไบโอส เป็นตัวกระตุ้นที่ดีต่อการผลิตเอนโดกลูคาเนส และ ไซโลสและไซโลไบโอสเป็นตัวกระตุ้นที่ดีต่อการผลิตไซแลนเนส

Chen และ Wayman (1992) ใช้น้ำตาลจากการย่อยสลายแป้งด้วยกรดเป็นตัวกระตุ้นให้ *T. reesei* มีการผลิตเซลลูเลสเพิ่มขึ้น

2.6 การนำเซลลูเลสไปประยุกต์ในด้านต่างๆ

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์กลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน คือ

อุตสาหกรรมการเกษตร

มีรายงานการวิจัยการใช้เซลลูเลสจากเชื้อราชนิดต่างๆ ในการช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบให้เป็นปุ๋ย เช่น การใช้ *Trichurus spiralis* ซึ่งสามารถผลิตเซลลูเลสได้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายฟางข้าวสาลีให้เป็นปุ๋ยหมัก (Hart *et al.*, 2003)

อุตสาหกรรมอาหาร

เนื่องจากเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส ดังนั้นจึงมีการนำไปใช้ในการผลิตน้ำตาลจากวัสดุการเกษตรหลายชนิด เช่น จากฟางข้าวสาลี (Tahoun and Ibrahim, 1999) และข้าวโพด (Hang and Woodams, 2001) เป็นต้น

อุตสาหกรรมเชื้อเพลิง

เซลลูเลสมีบทบาทสำคัญในการผลิตเชื้อเพลิงเนื่องจากสามารถย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นกลูโคสและถูกยีสต์นำไปใช้เพื่อผลิตแอลกอฮอล์ ได้ เช่น การผลิตเอทธานอลจากต้นทานตะวัน (Sharma, 2002) ใบอ้อย (Krishna, 1998) กระดาษที่ใช้แล้ว (Wayman, 1992) และต้น Amsonia (Punnapayak and Hoffman, 1994) เป็นต้น

อุตสาหกรรมกระดาษ

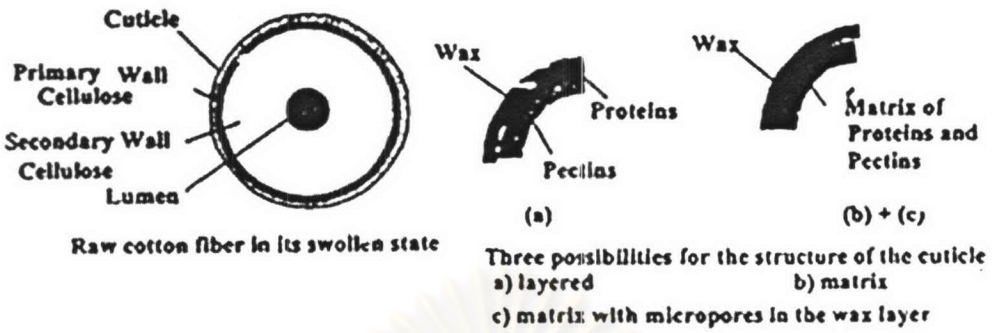
เซลลูเลสมีบทบาทในการช่วยเตรียมกระดาษให้มีคุณภาพดีขึ้น และอาจใช้เป็นตัวช่วยในการกำจัดหมึกพิมพ์ออกจากกระดาษที่ใช้แล้วเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ เช่น Sreenath และคณะ

(1996) ใช้เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อราที่คัดแยกได้ พบว่าสามารถกำจัดหมึกออกจากกระดาษที่ใช้แล้วได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์

อุตสาหกรรมสิ่งทอ

ฝ้ายเป็นเส้นใยธรรมชาติที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก และมีส่วนอื่นๆ เช่น เพคติน โปรตีน ไขและน้ำมันเกาะติดอยู่ด้วย (รูปที่ 2.11) ซึ่งส่วนที่ไม่ใช่เซลลูโลสนี้ถ้าไม่กำจัดออกจะมีปัญหาในกระบวนการผลิต คือ ทำให้ผ้าฝ้ายดูดซึมน้ำ สีย้อมและสารเคมียาก ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหานี้จึงได้มีวิธีในการเตรียมผ้าฝ้ายก่อนนำมาเข้าสู่กระบวนการผลิต วิธีที่ใช้กันอยู่ทั่วไป คือ ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนั้นจึงทำให้น้ำทิ้งหลังกระบวนการมีค่าความเป็นกรดและด่าง ค่า COD และค่า BOD สูง จึงค่อนข้างเป็นอันตรายและต้องถูกบำบัดอย่างดีก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมทำให้เปลืองค่าใช้จ่าย ดังนั้นกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพโดยใช้เอนไซม์ เช่น เซลลูเลส จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่มีความสำคัญเพื่อใช้แทนที่สารเคมีดังกล่าว เพราะสามารถนำไปใช้ในกระบวนการต่างๆ ของการผลิตสิ่งทอได้หลายขั้นตอน เช่น Biopolishing และ Scouring เพื่อเป็นการกำจัดขนบนผ้าใยเซลลูโลสและกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้า นอกจากนี้กระบวนการใช้เอนไซม์ยังมีข้อดีหลายข้อคือ ใช้อุณหภูมิไม่สูงมากคืออยู่ในช่วง 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส ในขณะที่การใช้วิธี Alkali scouring โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ใช้อุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส ทำให้เป็นการลดพลังงานที่ใช้ น้ำเสียจากการใช้เอนไซม์บำบัดได้ง่าย ความเป็นกรดและด่างไม่สูง องค์ประกอบของผ้าไม่ถูกทำลายเพราะเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะสูง ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปนมาด้วยและสภาวะที่ใช้ไม่รุนแรงมาก (Sarkar and Etters, 2001) ที่สำคัญสามารถนำไปใช้กับกระบวนการต่างๆ ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นได้เช่น อะไมเลสและเพคติเนส เป็นต้น (Li and Hardin, 1997) ดังนั้นการใช้เซลลูเลสจึงมีบทบาทมากขึ้น เพราะไม่ต้องการปฏิกิริยาและสารเคมีที่รุนแรง ดังนั้นจึงไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและผู้ใช้ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำทิ้ง

Buschle-Diller และคณะ (1994) ศึกษาการใช้เซลลูเลสจาก *T. viride* ในกระบวนการเตรียมผ้าชนิดต่างๆ ได้แก่ ผ้าฝ้าย ผ้าลินิน ผ้ารามี ผ้าวิสคอสเรยอนและผ้าฝ้ายผสมลินิน พบว่าถ้าใช้เวลาทำปฏิกิริยานานขึ้นจะทำให้เส้นใยบนผ้าถูกทำลายมากขึ้น สามารถตรวจสอบตำแหน่งของเอนไซม์ที่เข้าทำปฏิกิริยาโดยการย้อมสีผ้าด้วย Congo red และนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้ไม่สามารถใช้กับผ้า ramine ผ้ารามีและผ้าวิสคอสเรยอนได้ แต่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีอื่น เช่น การนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน



รูปที่ 2.11 โครงสร้างและองค์ประกอบของเส้นใยฝ้าย (Li and Hardin, 1998)

Busche-Diller และคณะ (1996) ศึกษาการนำเซลลูเลสมาใช้ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้าย โดยใช้ภาวะการทำปฏิกิริยา คือ เซลลูเลสความเข้มข้น 86 FPU ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง 4.8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ถึง 24 ชั่วโมง

Sreenath และคณะ (1996) ใช้เซลลูเลสร่วมกับไซแลนเนสและเพคติเนสในกระบวนการกำจัดขนบนผ้าฝ้ายผสมปอกระเจา

Choe และคณะ (1997) ศึกษาปฏิกิริยาของสีย้อมต่อการทำงานของเซลลูเลส พบว่าสีย้อมบางชนิดจะยับยั้งการทำงานของเซลลูเลส ซึ่งระดับการยับยั้งจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสีย้อม และเมื่อใช้เซลลูเลสในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้ายพบว่าเซลลูเลสสามารถทำลายเส้นใยผ้าได้ ซึ่งระดับการทำลายขึ้นอยู่กับ ขนาดเส้นด้ายที่ใช้ทอผ้า โครงสร้างของผ้า เป็นต้น

Li และ Hardin (1998) ใช้เซลลูเลสและเพคติเนสในกระบวนการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้าย มีภาวะที่ใช้สำหรับเซลลูเลส คือ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และการใช้สารช่วยเปียกที่ไม่มีประจุ (nonionic surfactant) จะช่วยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับผ้าดีขึ้น ในขณะที่การเขย่าถ้าแรงมากไปจะไปทำลายเอนไซม์

Kumar และ Harnden (1999) พบว่าการใช้เซลลูเลสในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้ายเพื่อให้ผ้าเปียกน้ำดีขึ้นนั้นอาจไม่เหมาะสมเสมอไป เนื่องจากถ้าใช้เอนไซม์ความเข้มข้นมากเซลลูเลสจะไปทำลายเนื้อผ้าได้

Yachmenev และคณะ (1999) ศึกษาการใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับเซลลูเลสในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้ายพบว่ามีข้อดี คือ ช่วยลดเวลา ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ และคลื่นอัลตราโซนิกไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

Campos และคณะ (2000) ศึกษาการทำงานของ acid cellulases จาก *T. reesei* และ neutral cellulases จาก *Humicola insolens* พบว่า acid cellulases มีปฏิกิริยาต่อสี indigo มากกว่า neutral cellulases

Andreaus และ Compos (2000) พบว่าการนำผ้าฝ้ายไปกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเซลลูเลสก่อนนำไปย้อมสี indigo จะทำให้ผ้าฝ้ายติดสีดีขึ้น จึงเป็นการลดปริมาณการใช้สีลดลง

Andreaus และคณะ (2000) ใช้เซลลูเลสจาก *T. reesei* ในการเตรียมผ้าฝ้ายสำหรับย้อมสี acid dye ซึ่งพบว่าเอนไซม์ทำงานดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และการใช้เอนไซม์มีข้อดี คือ ช่วยให้กระบวนการย้อมติดสีของผ้าดีขึ้น ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และลดการใช้สารละลายที่เป็นด่างมากๆ เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์

Blanchard และคณะ (2000) ศึกษาภาวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการใช้เอนไซม์ในสิ่งทอ พบว่าประกอบด้วยหลายปัจจัยคือ ค่าความเป็นกรดและด่าง เวลาการทำปฏิกิริยา อุณหภูมิ ชนิดของเอนไซม์ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ และชนิดของผ้าที่ใช้เป็นต้น

Wakida และคณะ (2000) ศึกษาการใช้เซลลูเลสร่วมกับการใช้สารเคมีบางชนิด ได้แก่ สารละลายแอมโมเนีย และโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าจะช่วยทำให้ผ้านุ่มมากขึ้นกว่าการใช้เซลลูเลสเพียงอย่างเดียว เนื่องจากสารละลายแอมโมเนียหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์จะช่วยในการทำปฏิกิริยาทั้งในส่วนที่เป็น crystalline และ amorphous cellulose

Sarkar และ Etters (2001) ศึกษาการใช้เอนไซม์ในกระบวนการต่างๆ ในสิ่งทอ โดยเซลลูเลสมักถูกใช้ในกระบวนการกำจัดสิ่งสกปรก (Scouring) การฟอกขาว (Bleaching) และ Biopolishing ซึ่งถ้าเป็น acid cellulase มีภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาคือ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.5 ถึง 5.5 อุณหภูมิ 45 ถึง 55 องศาเซลเซียส และ neutral cellulase มีภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาคือ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.5 ถึง 8.0 อุณหภูมิ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส

Buschle-Diller และคณะ (2001) ใช้อะไมโลกลูโคซิเดสในกระบวนการลอกแป้งร่วมกับการใช้เพคติเนสร่วมกับเซลลูเลสในกระบวนการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้า พบว่าทำให้ผ้ามีค่าความขาว และการดูดซึมน้ำดีขึ้น จึงเป็นการประหยัดการใช้สารเคมี

Heikinheimo และ Buchert (2001) ตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างการใช้เอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนสทางการค้าจาก *T. reesei* ในกระบวนการเตรียมผ้าฝ้ายถัก พบว่าการใช้เอนโดกลูคาเนสร่วมกับเอกโซกลูคาเนสจะเพิ่มประสิทธิภาพของการทำงานของเอนไซม์มากกว่าการใช้เอนไซม์ใดเอนไซม์หนึ่ง

Jin และ Maekawa (2001) ศึกษากระบวนการเตรียมผ้าลินินและ ผ้ารามี โดยการใช้เอนไซม์ พบว่าถ้ามีการใช้เอนไซม์ผสมหลายชนิด เช่น เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส และ เพคติเนสจะ

สามารถกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าได้ดี และทำให้ผ้าขาวขึ้นกว่าการใช้เอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่ง เนื่องจากผ้าดังกล่าวมีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลสน้อย แต่จะมีส่วนที่ไม่ใช่เซลลูโลสมาก เช่น เฮมิเซลลูโลส เพคติน ลิกนิน ไข และสี เป็นต้น

Takagishi และคณะ (2001) สรุปภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้เอนไซม์ในกระบวนการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายคือ เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับเพคติเนส 0.06 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 8.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส EDTA 1 มิลลิโมลาร์ เขย่า 5 ถึง 10 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย