หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญ ในปีหนึ่งๆพืชจะสร้างเซลลูโลสประมาณ 5 พันล้านตัน (Ryu and Mandels, 1980) แหล่งที่สำคัญของเซลลูโลส นอกจากจะได้จากพืชตามธรรมชาติแล้ว ยังได้จากอุตสาหกรรมการแปรรูปพืช และอุตสาหกรรมอื่นๆอีก เช่น อุตสาหกรรมแปรรูปไม้ อุตสาหกรรมเส้นใย อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ขยะเทศบาล รวมไปถึงวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) อีกด้วย ซึ่งวัสดุเหล่านี้ประกอบไปด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในอัตราส่วน 4:3:2 โดยประมาณตามลำดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชนิดของเนื้อเยื่อ อายุ สภาพแวดล้อมของการเจริญเติบโต สภาพทางสรีระวิทยา และวิธีการวิเคราะห์ (Tangnu, 1982 ; Kirk, 1983)

ป่านศรนารายณ์ (Agave sisalana Perrine.) เป็นพืชเส้นใยที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง เนื่องจากเส้นใยของป่านศรนารายณ์มีความเหนียว คงทน จึงเป็นที่ต้องการของตลาดเพื่อนำไปแปรสภาพเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ เช่น เชือกมัดของ อุปกรณ์ขัดเงาโลหะสเตนเลส ผสมคอนกรีตอัดแรง ใช้ทำหัตถกรรม เช่น กระเป๋าถือ รองเท้า (อัจฉราพร ไศละสูต, 2528) ในอุตสาหกรรมทำเชือก เมื่อนำเส้นใยของป่านศรนารายณ์ไปใช้แล้ว ส่วนที่เหลือทิ้ง เช่น เศษเส้นใย เศษเนื้อเยื่อที่ได้จากการขูดเส้นใย หรือส่วนกากใบ ยังนำไปใช้ประโยชน์ได้อีก คือใช้แทนปุ๋ยพืชสด โดยใส่ลงไปในแปลงปลูกโดยตรง หรือจะทำให้แห้งแล้วนำไปเผา จะได้เถ้าถ่านที่มีเปอร์เซ็นต์ของธาตุอาหารสูง ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของเถ้าจะเป็นพวกไลม์คาร์บอเนต (lime carbonate) 11 เปอร์เซ็นต์ เป็นโปแทสคาร์บอเนต (potass carbonate) และอีก 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นไลม์ฟอสเฟต (lime phosphate) หรือนำไปสกัดเพื่อสังเคราะห์สารเคมีอื่นๆ เช่น กรดออกซาลิก (oxalic acid) และขี้ผึ้งคาร์นัวบา (carnauba wax) (พิสุทธิ์ ศาลากิจ, 2528) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยป่านศรนารายณ์ พบว่า ประกอบด้วยเซลลูโลส 62 เปอร์เซ็นต์ แพนโทแซน 16 เปอร์เซ็นต์ ขี้ผึ้ง 2 เปอร์เซ็นต์ คาร์บไฮ

เดรตชนิดอื่นๆ 10 เปอร์เซ็นต์ ขี้เถ้า 1 เปอร์เซ็นต์ (Lock, 1969) และจากรายงานของ FAO (1974) พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยป่านศรนารายณ์ ประกอบด้วยเซลลูโลส 78 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 10 เปอร์เซ็นต์ ลิกนิน 8 เปอร์เซ็นต์ และมีองค์ประกอบอื่นๆอีก เช่น ขี้ผึ้ง จากองค์ประกอบเหล่านี้ จะเห็นได้ว่าป่านศรนารายณ์เป็นพืชที่มีปริมาณเซลลูโลสสูง สามารถนำไปแปรสภาพให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ โดยอาศัยกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์

การย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถทำได้หลายวิธี ที่สำคัญ คือ วิธีทางชีวภาพ ซึ่งเป็นการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยระบบของเอนไซม์เซลลูเลส วิธีนี้มีข้อได้เปรียบวิธีทางเคมี คือ ต้นทุนต่ำกว่า เพราะปฏิกริยาเกิดขึ้นได้ในที่อุณหภูมิซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถเจริญเติบโตได้ จึงไม่จำเป็นต้องใช้พลังงานมาก ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นก็ไม่รุนแรง ไม่จำเป็นต้องใช้ภาชนะที่ทนกรด และที่สำคัญคือไม่เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Mandels and Sternberg, 1976; Goldstein, 1981 ; Tsao and Chiang, 1983)

ในธรรมชาติ มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสลายเซลลูโลส เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และเชื้อแอคติโนมัยซีติส ในจำนวนนี้เชื้อรา เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่มากกว่า และขับออกจากเซลล์ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สะดวกต่อการแยกสกัดเอนไซม์ จึงมีผู้ให้ความสนใจศึกษา และนำมาผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม อาทิ เช่น เชื้อรา Trichoderma reesei อย่างไรก็ตาม เชื้อราและจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ ก็ได้รับความสนใจเช่นกัน (ตารางที่ 1) (Mandels and Sternberg, 1976 ; Ryu and Mandels, 1980 ; Margaritis and Merchant, 1983 ; Macris, 1984)

เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ (complex enzymes) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดมาทำงานร่วมกัน คือ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) และ บีตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) ผลจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่สำคัญคือ น้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ โปรตีนเซลเดียว ไวตามิน กรดอินทรีย์ สารปฏิชีวนะ และเคมีภัณฑ์ต่างๆ โดยผ่านกระบวนการหมัก (fermentation) (Gosoykr and Erikson, 1980 ; Sasaki, 1982) นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอีก เช่น อุตสาหกรรม

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

เชื้อรา	เชื้อแบคทีเรีย	เชื้อแอคติโนมัยซีติส
Alternaria sp.	Bacillus sp.	Micromonospora sp.
Aspergillus sp.	Cellulomonas sp.	Nocardia sp.
Chaetomium sp.	Clostridium sp.	Strephomyces sp.
Corprinus sp.	Corynebacterium sp.	Streotasporangium sp.
Foames sp.	Cytophaga sp.	
Fusarium sp.	Polyangium sp.	
Myrothecium sp.	Pseudomonas sp.	
Penicillium sp.	Sporocytophaga sp.	
Polyporus sp.	Vibrio sp.	
Rhizoctonia sp.		
Rhizopus sp.		
Sporotrichum sp.		
Thielavia sp.		
Trametes sp.		
Trichothecium sp .		
Trichoderma sp.		
Verticillium sp.		
Zygorhynchus sp.		

ที่มา : Margaritis และ Merchant (1983)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิตยา อุตสาหกรรมผลิตอาหาร อุตสาหกรรมผลิตกระดาษ เป็นต้น (Reese, 1975)

ถึงแม้การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยระบบของเอนไซม์จะประสบผลสำเร็จมากก็ตาม แต่จากการวิเคราะห์ทางด้านเศรษฐกิจ พบว่าต้นทุนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสยังคงสูงอยู่ จากรายงานของ Wright, Power และ Douglas (1986) เสนอไว้ว่า ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนทั้งหมดที่ใช้ในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุประเภทเซลลูโลส เป็นต้นทุนที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ มีองค์ประกอบของเอนไซม์ไม่ครบทุกองค์ประกอบ หรือมีบางองค์ประกอบอยู่ในระดับต่ำ โดยเฉพาะเอนไซม์ β-glucosidase หรือในบางครั้งเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายต่ำภายใต้สภาวะของการทดลอง หรือถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end-product inhibition) จึงทำให้เกิดข้อจำกัดในการนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Ryu and Mandels, 1980 ; Mandels, 1985 ; Steiner, et al., 1987) ด้วยเหตุนี้ งานวิจัยส่วนใหญ่จึงพยายามศึกษาค้นคว้า เพื่อที่จะปรับปรุงผลผลิตของเอนไซม์เซลลูเลสให้สูงขึ้น และช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ให้ต่ำลง (Castanon and Wilke, 1980) ซึ่งอาจทำได้โดยการปรับปรุงประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ เช่น การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยการตรึงเซลล์ (Webb, Fukuda, and Atkinson, 1986 ; Kumakura, Kanno, and Nisizawa, 1989) การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้จุลินทรีย์ร่วมกัน (Madamwar and Patel, 1992) การปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Acebal, et al., 1986 ; Steiner, et al., 1987 ; Allen, et al., 1989 ; Gomes, et al., 1989 ; Ali, et al., 1991 ; Bastawde, 1992) การปรับปรุงรูปแบบในการผลิตเอนไซม์ (Ryu, et al., 1979 ; Hendy, Wilke, and Blanch, 1984) การปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น การทำสายพันธุ์กลาย (mutagenesis) (Alberto, et al., 1991 ; Helmi, et al., 1991) gene cloning (Tsuchiyoshi and Kunio, 1991) protoplast fusion (Sonya, 1992) รวมไปถึงการคัดเลือกหาสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงในธรรมชาติ (Sandhu and Arora, 1985 ; Sharma, Bhalla, and Bhatt, 1991 ; Bahkali, 1992 ; Gashe, 1992 ; Saad and Wedad, 1992) ซึ่งเป็นวิธีที่สำคัญ เป็นขั้นตอนแรกในการพบสายพันธุ์ใหม่ๆของเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับในบ้านศรนารายณ์ Lock (1969)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานว่ามีเชื้อราหลายชนิดสามารถเจริญได้บริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ โดยเชื้อเหล่านั้นอาศัยเซลลูโลสในป่านศรนารายณ์เป็นแหล่งอาหาร (Lock, 1969)

งานวิจัยในครั้งนี้ มุ่งที่จะศึกษาและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง โดยการเก็บรวบรวมเชื้อราจากบริเวณที่มีการปลูกป่านศรนารายณ์ แล้วนำมาทดสอบสมบัติในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส รวมไปถึงการนำเชื้อราที่ได้ไปใช้ในการหมักเอทธานอล ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหาร ยา และเชื้อเพลิง ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเก็บรวบรวมและคัดเลือกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จากแหล่งปลูกป่านศรนารายณ์

2. เพื่อศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อราที่คัดแยกได้

3. เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับห้องปฏิบัติการ

4. เพื่อศึกษาการผลิตแอลกอฮอล์ (เอทธานอล) แบบเชื้อผสม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จากแหล่งปลูกป่านศรนารายณ์ และสามารถใช้เชื้อราที่คัดแยกได้ เป็นแหล่งสายพันธุ์ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

2. ทราบภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกได้

3. สามารถนำเชื้อราที่คัดแยกได้ มาใช้ร่วมกับเชื้อยีสต์ ในการผลิตเอทธานอลแบบเชื้อผสม

ขอบเขตของการศึกษา

งานวิจัยนี้ ทำการศึกษาคัดเลือก และจัดจำแนกถึงระดับสกุลของเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดยการเก็บ และรวบรวมเชื้อราที่ต้องการจากแหล่งปลูกป่านศรนารายณ์ แล้วนำมาทดสอบสมบัติในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส รวมไปถึงการนำเชื้อราที่คัดแยกได้ ไปใช้ในการหมักเอทธานอลแบบเชื้อผสมร่วมกับเชื้อยีสต์ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย