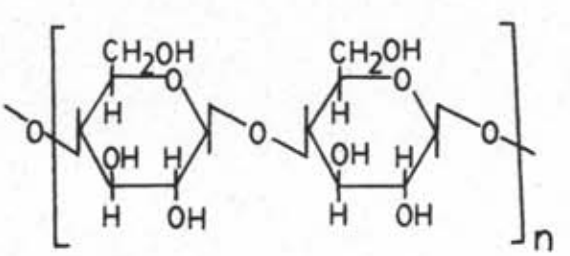
บทที่ 1

บทนำ

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีผลิตผลทางการเกษตรเป็นรายได้หลัก ดังนั้นย่อมมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอยู่เป็นจำนวนมากโดยเฉพาะ ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด เป็นต้น วัสดุเหล่านี้มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเซลลูโลส (cellulose) ประมาณ 30-60 เปอร์เซนต์ (Stephens และHeichel, 1975,ทัศคร,1981) และไซแลน (xylan) ซึ่งเป็นเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) 15-30 เปอร์เซนต์ (Norkrans ,1967, Lotong ,1980) ถ้าหากสามารถนำเอาวัสดุเหลือใช้เหล่านี้มาแปรรูปให้เป็นผลิตผลที่นำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่นได้ เช่น กลูโคส (glucose) แอลกอฮอล์ (alcohol) โปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) เหล่านี้เป็นต้น น่าจะเป็นประโยชน์ต่อประเทศชาติอย่างยิ่ง

เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ชนิดโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของดี-กลูโคส (D-glucose) ประมาณ 3,000-10,000 โมเลกุล โมเลกุลของกลูโคสเหล่านี้จะอยู่ในรูปของเบตา-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-glucopyranose) และเชื่อมต่อเข้าด้วยกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่หนึ่งกับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่สี่ในโมเลกุลถัดไป (รูปที่ 1) ทำให้โมเลกุลของเซลลูโลสมีลักษณะเป็นสายยาว น้ำหนักโมเลกุลมีค่าอยู่ระหว่าง 200,000-2,000,000 ดาลตัน แล้วแต่ชนิดของพืช



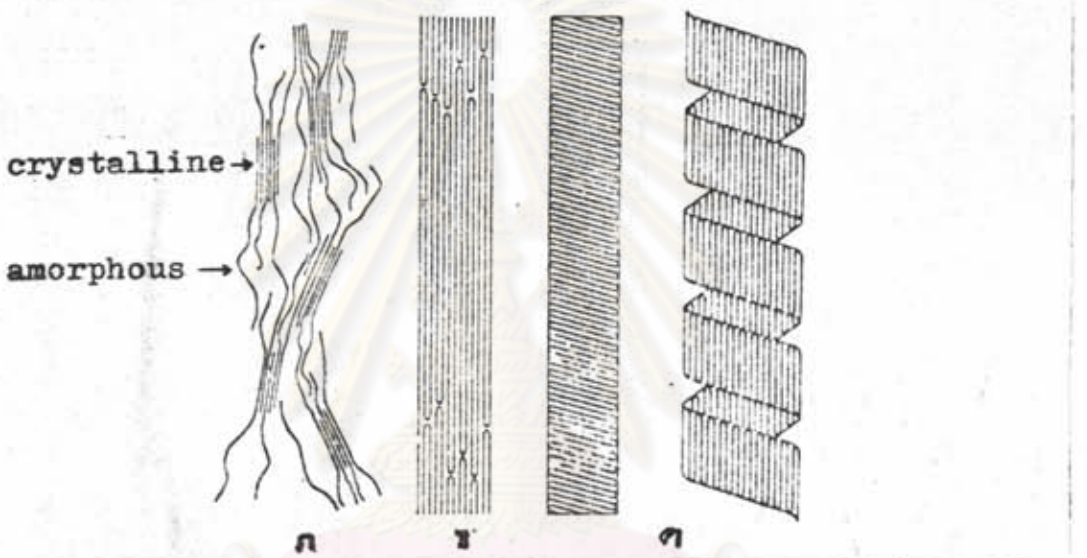
β-1,4-glucosidic linkage

รูปที่1 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส (Davidson ,1967)

ในธรรมชาติโดยทั่วไปจะไม่พบว่าเซลลูโลสที่อยู่ในผนังเซลล์ของพืชเป็นสายเดียวเรียงตัวง่ายๆ แต่มักจะพบว่าโมเลกุลของเซลลูโลสจะเรียงตัวขนานชิดกันและกัน และจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่สามของโมเลกุลหนึ่งกับออกซิเจนอะตอมที่อยู่ในริง(ring)ของโมเลกุลอื่นอย่างมีระเบียบมาก ในลักษณะที่เรียกว่า คริสตัลไลน์ไมเซล (crystalline micelles) แต่ละไมเซลประกอบด้วยโมเลกุลของเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุล และมีรูปร่างเป็นริบบินหนา ไมเซลประมาณ 10-20 ไมเซลจะมาเรียงตัวเป็นโครงสร้างใหญ่ขึ้นเรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งอาจจะม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใย (fiber) เซลลูโลสหรือม้วนพันกันเป็นเกลียวรอบแกนของเส้นใยเซลลูโลส จากลักษณะการเรียงตัวของโมเลกุลของเซลลูโลสดังที่กล่าวมาแล้วนี้ทำให้แบ่งรูปร่างของโครงสร้างของเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืชได้ 3 แบบที่แตกต่างกัน (Norkrans ,1967) ดังแสดงในรูปที่ 2 ผนังเซลล์ของพืชจะมีเซลลูโลสจัดตัวอยู่เป็นแถบๆ (discrete units) ไม่ติดต่อกันโดยตลอด แยกโดยช่องว่าง และเมื่อเซลล์แก่เต็มที่ภายในช่องว่างจะเต็มไปด้วยลิกนิน (lignin) ทำให้เซลลูโลสถูกหุ้มล้อมไว้ด้วยลิกนิน นอกจากนี้ยังมีโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นอีกจำนวนมากที่ปะปนอยู่กับเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืช โพลีแซคคาไรด์เหล่านี้มี ไซแลน แมนแนน (mannan) และโพลียูโรไนด์ (polyuronide) พวกอะราแบน (araban) และกาแลคแตน (galactan) มักพบในปริมาณน้อยกว่าเซลลูโลส (Greulch, 1973)

สัดส่วนของเซลลูโลสในเนื้อเยื่อของพืชนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อและชนิดของพืชแล้วยังขึ้นกับวิธีการสกัดด้วย ดังนั้นในการเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสของแหล่งต้นตอที่แตกต่างกันจะต้องระบุว่าเป็นเซลลูโลสส่วนไหนหรือบอกวิธีสกัดไว้ด้วย ตัวอย่างเช่น ถ้าพูดถึงเซลลูโลสหยาบ (crude cellulose) หมายถึงคอมเพล็กซ์คาร์โบไฮเดรต (complex carbohydrates) แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ปราศจากลิกนินและเป็นส่วนที่ไม่ละลายใน 17.5 เปอร์เซนต์โซเดียมไฮดรอกไซด์เย็น เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์เชิงเดี่ยวหรือโพลีแซคคาไรด์ผสมที่มีขนาดเล็กกว่าเซลลูโลส ปริมาณเซลลูโลสของพืชไม้เนื้อแข็งมักจะรายงานเป็นแอลฟา-เซลลูโลส ขณะที่พวกพืชการเกษตรจะรายงานในรูปของเซลลูโลสหยาบ (Stephens และ Heichel ,1975) และมีรายงานว่าปริมาณเซลลูโลสหยาบของพืชการเกษตรมีค่าอยู่ใน

ช่วง 20-90 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง และปริมาณแอลฟา-เซลลูโลสของพืชไม้เนื้อแข็ง ประมาณ 30-50 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง โดยทั่วไปเซลลูโลสในพืชจะอยู่ในรูปของลิกโน-เซลลูโลส (ligno-cellulose) ซึ่งมีลิกนินอยู่ประมาณ 20-30 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง (Norkrans ,1967; Stephens และ Heichel ,1975)



รูปที่ 2 รูปร่างของโครงสร้างของเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชโดยทั่วไป ก) fringe micelle ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก(crystalline) และอะมอร์ฟัส(amorphous) ข)โครงสร้างของเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส ค)โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นริบบินหนาเกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้งฉากกับแกนของริบบินและแถบริบบินจะม้วนเป็นเกลียว (helix) (Norkrans ,1967)

การที่จะนำเซลลูโลสจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาทำให้เป็นประโยชน์นั้น ขั้นตอนที่สำคัญที่สุดคือการย่อยสลายเซลลูโลสเป็นกลูโคส และจากกลูโคสนี้สามารถนำไปใช้ทำประโยชน์อย่างอื่นต่อไปอีกมาก เช่น ใช้เป็นส่วนผสมของอาหารคนและสัตว์ เป็นแหล่งของคาร์บอนในการเลี้ยงจุลชีพอื่นให้ได้มากเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งของโปรตีนและไนโตรเจน หรือโปรตีนเซลล์เดียว ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสารประประกอบอินทรีย์และสารประกอบทางชีวเคมี และใช้ในการหมักเพื่อให้ได้เชื้อเพลิง เช่น แอลกอฮอล์ ตัวทำละลายต่างๆ เช่น อะซีโตน รวมทั้งสารเคมีอื่นๆ เป็นต้น (Edwards ,1975)

ปฏิกริยาการย่อยสลายของสารประกอบเซลลูโลสได้รับการศึกษามาเป็นเวลาถึง 90ปีแล้ว จนกระทั่งถึงทุกวันนี้ การย่อยสลายเซลลูโลสอาจทำได้ 2 วิธีด้วยกัน (Mandels และ Sternberg,1976; Nisizawa ,1973) คือ

1) วิธีทางเคมี เป็นการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรด ฉะนั้นเครื่องมือที่ใช้จะต้องสามารถทนต่อกรดราคาย่อมจะแพง และนอกจากนี้โครงสร้างส่วนที่เป็นผลึก (crystalline structures)ของเซลลูโลสจะมีผลทำให้ทนทานต่อกรดมาก จึงต้องการความเข้มข้นของกรดสูง และอุณหภูมิสูงในการย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้น้ำตาล ภายใต้สภาวะเช่นนี้กลูโคสบางส่วนจะทำปฏิกริยากับกรดต่อไปอีกได้ผลิตผลข้างเคียงชนิดอื่น และยิ่งไปกว่านั้นปฏิกริยาการย่อยสลายโดยใช้กรดไม่มีความจำเพาะ (nonspecificity) ต่อเซลลูโลส กรดสามารถทำปฏิกริยากับสารอื่นที่ปนมากับเซลลูโลสด้วย ผลสรุปคือทำให้ได้กลูโคสปริมาณต่ำรวมทั้งมีผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ (by-products)ด้วย (Mandels และ Sternberg,1976; Fennington และคณะ,1982)

2) วิธีทางชีวภาพ เป็นการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ซึ่งพบในจุลชีพหลายชนิดโดยมากเป็นราและแบคทีเรีย เอนไซม์เซลลูเลสจะย่อยสลายเซลลูโลสจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกลูโคส ปฏิกริยาเกิดขึ้นที่สภาวะซึ่งไม่รุนแรง ดังนั้นกลูโคสจึงไม่ถูกสลายต่อไป นอกจากนี้เอนไซม์มีความจำเพาะ(specificity) ต่อสารประกอบเซลลูโลส จะไม่ทำปฏิกริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลส ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ ไม่มีผลิตภัณฑ์ซึ่งไม่ต้องการปะปนมาด้วย (Mandels และ Sternberg ,1976; Fennington และคณะ,1982)

เมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสทั้ง 2 วิธีแล้วพบว่า วิธี

ทางชีวภาพซึ่งย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นวิธีที่ดีกว่า ทำให้มีผู้สนใจศึกษาค้นคว้าหาจุลชีพซึ่งสามารถสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสได้สูงกันอย่างกว้างขวาง และพบว่ามีจุลชีพไม่กี่ชนิดนักที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ ซึ่งโดยมากจะเป็นรา เช่น Trichoderma viride (Selbyและ Maitland,1967; Okada และคณะ,1968; Berghem และ Pettersson ,1973;Mandels และคณะ, 1974; Mandels และ Sternberg ,1976) Trichoderma koningii (Halliwell ,1965;Wood ,1968; Wood และ McCrae,1972) Trichoderma reesei (Dwivedi และ Ghose,1979) Aspergillus niger (Ikeda และคณะ,1968) Aspergillus terreus (Garg และ Neelakantan, 1982) Irpex lacteus (Kanda และคณะ,1976) Chrysosporium lignorum (Almin และคณะ,1975) Chysosporium pruinosum (Mandels,1975) Penicillium funiculosum (Mandels,1975; Wood และ McCrae ,1977) Fusarium solani (Wood และ McCrae , 1977) Fusarium moniliforms (Matsumoto และคณะ,1973) Thermoascus aurantiacus (Tong และคณะ,1980) Thermomo-spora curvata (Fennington และคณะ,1982) เป็นต้น

ในปี 1950 Reese และคณะได้เสนอแนวความคิดของ C_1-C_x เพื่ออธิบายกลไกการย่อยสลายเซลลูโลส จากนั้นมาการศึกษาทางด้านชีวเคมีเกี่ยวกับกลไกการย่อยสลายเซลลูโลสจึงได้รับความสนใจมากขึ้น ในสมมติฐานแรกของ Reese และคณะนั้นเชื่อว่าเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยส่วนของ C_1 และ C_x มาทำงานร่วมกันโดยที่ C_1 เป็นเอนไซม์ที่ไปทำลายพันธะไฮโดรเจนของเส้นใยเซลลูโลสในลักษณะธรรมชาติ (native cellulose) ทำให้เซลลูโลสนั้นเหมาะสำหรับที่ C_x จะย่อยสลายเป็นโอลิโก-แซคคาไรด์ (oligosaccharides) สายสั้นๆต่อไป จากสมมติฐานของ Reese และผลการศึกษาคุณสมบัติของเซลลูเลสจากราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้สูงในระยะต่อมา เช่น T. viride (Selby และ Maitland ,1967; Berghem และ Pettersson ,1973,1974; Pettersson ,1975;Berghem และคณะ,1975 1976) T. koningii (Wood ,1968;Wood และ McCrae ,1972)

P. funiculosum (Selby ,1968; Wood และ McCrae,1977) F. solani (Wood ,1969) และ T. aurantiacus (Tong และคณะ,1980) พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสเป็นมัลติคอมโพเนนท์เอนไซม์ (multicomponent enzyme) มีองค์ประกอบของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ส่วนมาทำงานร่วมกันคือ

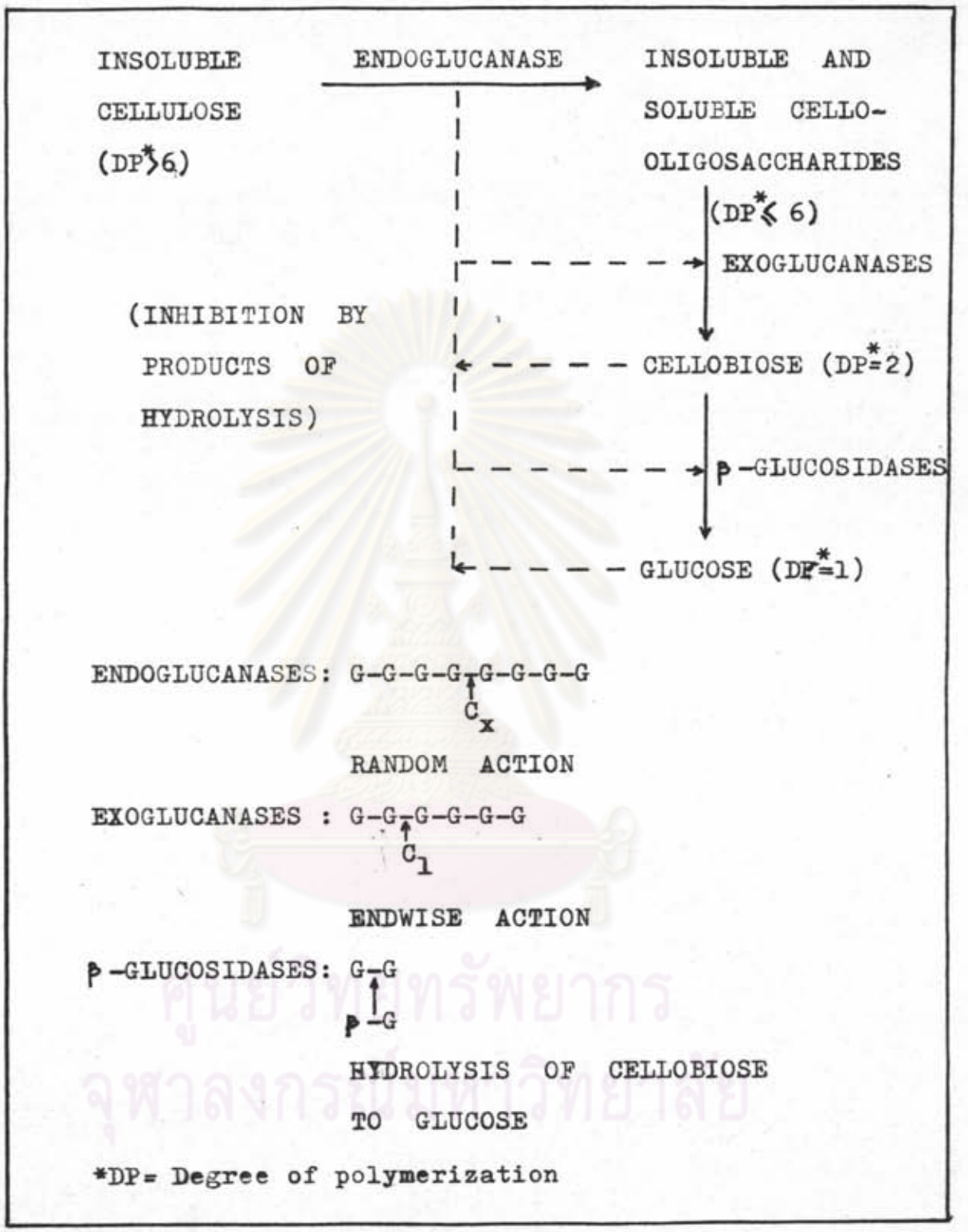
1) C_1 , เบตา-1,4-กลูแคนเซลโลไบโอไฮโดรเลส (β-1,4 -glucan cellobiohydrolase) หรือ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) (EC 3.2.1.74) จะทำหน้าที่ตัดไมเลกุลของเซลโลไบโอส (cellobiose) จากปลายด้านที่ไม่มีอำนาจรีดิวซ์ (non-reducing end)ของสายเซลลูโลส

2) C_x, เบตา-1,4-กลูแคน กลูคาโนไฮโดรเลส (β-1,4- glucan glucanohydrolase) หรือ เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) (EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ตัดพันธะเบตา-1,4 ภายในสายเซลลูโลสตรงบริเวณโครงสร้างส่วนอะมอร์ฟัสอย่างสุ่ม (randomly acting) ทำให้ได้กลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกเซลลูโลส (oligocellulose)

3) เบตา-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) หรือเซลโลไบเอส(cellobiase) (EC3.2.1.21) ทำหน้าที่เปลี่ยนเซลโลไบโอสและโอลิโกเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส ซึ่งจะเป็นตัวส่งเสริมการทำงานของ C_1 และ C_x การย่อยสลายเซลลูโลสจะได้กลูโคสมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับสัดส่วนของเบตา-กลูโคซิเดสในเซลลูเลสจะมีมากหรือน้อย ดังนั้นเอนไซม์ตัวนี้จะเป็นกุญแจสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส

จากการศึกษาลำดับการเข้าทำปฏิกริยาต่อเซลลูโลสขององค์ประกอบแต่ละส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสในราชนิด T. viride ตามผลการวิจัยของ Selby และ Maitland (1967) และ Pettersson (1975) ให้ผลซึ่งแตกต่างไปจากสมมติฐานของReese คือ C_1 จะทำปฏิกริยากับเซลลูโลสซึ่งเป็นผลิตผลจากการทำปฏิกริยาของเซลลูโลสธรรมชาติกับ C_x (รูปที่ 3)

Whitaker และ Thomas (1963) ได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของสภาวะของการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส นอกจากนี้ยังเน้นอีกว่าความแตกต่างของสภาวะที่เลี้ยงเพียงเล็กน้อยไม่เพียงแต่มีผลกระทบต่อปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตเท่านั้นอาจมีผลต่อคุณภาพของเอนไซม์ที่ผลิตด้วย ปัจจัยสำคัญที่อาจมีผลกระทบต่อผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ควรจะคำนึงถึงคือ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ปริมาณ



รูปที่ 3 ลำดับการทำปฏิกริยาของเอนไซม์เซลลูเลส (mode of action of cellulase) (Tangnu,1982)

และคุณภาพของเซลลูโลสที่ใช้, ปริมาณของเกลือของโลหะที่มีอยู่) pH อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ชนิดเหนี่ยวนำ จะสังเคราะห์ขึ้นเมื่อรานั้นเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลส เซลโลไบโอส และสารประกอบอื่นที่มีเบตา-ไกลโคซิดิก ลิงเกจ เช่น แลคโตส (lactose) ซาลิซิน (salicin) และโซโฟโรส (sophorose) (Norkrans ,1967; Mandels ,1975) แต่ระดับของเอนไซม์ที่สังเคราะห์ได้จะสูงสุดเมื่อใช้เซลลูโลสเป็นตัวเหนี่ยวนำ เช่น T. viride จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงใน nutrient salts ที่มีคอมเพล็กซ์เซลลูโลสที่บริสุทธิ์ 1 เปอร์เซนต์ (Mandels และ Sternberg ,1975) และการเติมทวีน-80 (Tween -80) ทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของ T. viride สูงขึ้น (Mandels ,1975; Fennington ,1982)

จากการศึกษาเซลลูเลสของ T. viride เมื่อมีการสังเคราะห์เซลลูเลสนั่นหมายถึงว่าเซลลูโลสถูกใช้ไป pH จะลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อการสังเคราะห์เซลลูเลสสูงสุด pHก็จะลดลงต่ำสุด ต่ำกว่า 3.0 (Mandels และSternberg ,1976) ซึ่งจะมีผลต่อการสังเคราะห์เซลลูเลสมากโดยเฉพาะส่วนของเบตา-กลูโคซิเดส(Sternberg 1976) ยังผลทำให้การสังเคราะห์เซลลูเลสลดลง แต่ถ้าสามารถควบคุม pHไว้ที่ pHที่เหมาะสม (pH 5.0) การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสจะคงรักษาระดับไว้ได้ (Mandels และคณะ,1975)

อุณหภูมิก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งของการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส อุณหภูมิที่เหมาะสมจะขึ้นกับชนิดของจุลชีพ พวกที่เป็น mesophiles การเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์นั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมจะไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส พวกthermophiles อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (Tansey ,1971; Mandels ,1975) นอกจากนี้จำนวนสปอร์เริ่มต้นก็มีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ (Tangnu ,1982) ถ้าจำนวนสปอร์เพิ่มการสังเคราะห์เอนไซม์ก็จะเพิ่ม แต่ถ้าจำนวนสปอร์มากเกินไปไม่พอเหมาะกับสับสเตรต การสังเคราะห์เอนไซม์จะไม่เพิ่มขึ้นหรืออาจจะลดลง และปัจจัยอีกประการหนึ่งที่จะต้องคำนึงถึงคือ กลูโคสซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของการย่อยสลายเซลลูโลสจะไปยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสโดยที่เมตาบอลิซึมของกลูโคสเป็นตัวการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสเป็น คาตาบอไลต์ รีเพรสชัน (catabolite repression)

(Nisizawa และคณะ,1972; Mandels ,1975)

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสนี้เกิดจากการทำงานร่วมกันขององค์ประกอบเอนไซม์อย่างน้อย 3 ส่วน ดังนั้นจึงได้มีนักวิจัยทำการแยกองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งได้จากจุลชีพที่แยกได้มาเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลชีพชนิดอื่นที่มีผู้ทำการศึกษาไว้ การจำแนกองค์ประกอบของเซลลูเลสโดยทั่วไปอาศัยความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรต คือ เซลโลไบโอไฮโดรเลสหรือเอก-โซกลูคาเนสใช้อะวิเซลเป็นสับสเตรต เอนโดกลูคาเนสมีความจำเพาะต่อคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และเบตา-กลูโคซิเดสใช้ออร์โธไนโตรเฟนิล-เบตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์หรือเซลโลไบโอสเป็นสับสเตรต การแยกองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจากราที่มีแอคติวิตีของเซลลูเลสเท่าที่ผ่านมาทำได้โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ เช่น โมเลคิวลาร์-ซีฟโครมาโตกราฟฟี (molecular-sieve chromatography)โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละองค์ประกอบของเอนไซม์ ไอออน-เอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟฟี (ion-exchange chromatography) โดยอาศัยความแตกต่างของประจุ แอฟฟินิตี โครมาโตกราฟฟี (affinity chromatography) และไอโซอิเลคตริก โฟกัสซิง (isoelectric focusing) โดยอาศัยค่าไอโซ-อิเลคตริก พีเอช (isoelectric pH) ซึ่งเป็นค่าประจำตัวของโปรตีน เป็นต้น ดังตัวอย่างการแยกองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจากราชนิดต่างๆในตารางที่ 1

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาคุณสมบัติทั้งทางฟิซิโคเคมิคัล และเอนไซม์ (physicochemical and enzymatic properties)ของแต่ละองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งจะเป็นความรู้พื้นฐานของเอนไซม์เซลลูเลสที่จะเป็นส่วนช่วยในการเปรียบเทียบกับเซลลูเลสจากจุลชีพชนิดอื่นๆ และนำไปสู่ความเข้าใจถึงกลไกการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลชีพที่แยกได้ด้วย จากรายงานการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ C_1 , C_x และเบตา-กลูโคซิเดสของเซลลูเลสจากเชื้อราหลายชนิด พบว่าคุณสมบัติโดยทั่วไปของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดสามารถรวบรวมได้ดังนี้คือ 1)เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในรูปของไกลโคโปรตีน (glycoprotein) (Berghem และ Pettersson,1973; Wood ,1975; Shoemaker และ Brown ,1978) 2)น้ำหนักโมเลกุลของ C_1 และ C_x มีค่าใกล้เคียงกัน พบว่า C_1 และ C_x ของ T. viride, T.koningii , F. solani และ P.funiculosum

ตารางที่ 1 ขั้นตอนการแยกองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสของจุลชีพชนิดต่างๆให้บริสุทธิ์

Microorganisms	Components	Step of purification	References
T. viride	C_1	Molecular-sieve chromatography on Bio-Gel P-10 Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 (salt gradients) Isoelectric focusing Molecular-sieve chromatography on Bio-Gel P-60	Berghem and Pettersson,1973; Pettersson,1975.
T. koningii	C_1	Molecular-sieve chromatography on Sephadex G-75 Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 (salt gradients) Ion-exchange chromatography	Wood,1968; Wood and McCrae,1972.

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Microorganisms	Components	Step of purification	References
T. koningii	C_1	on DEAE-Sephadex A-50 (pH gradients)	
F. solani	C_1	Molecular-sieve chromatography on Ultrogel AcA 54 Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 (pH gradients)	Wood and McCrae 1977.
P. funiculosum	C_1	Chromatography on DEAE-Sephadex A-50 (pH gradients) Isoelectric focusing	Selby,1969.
T. viride	C_x	Chromatography on Bio-Gel P-10 Chromatography on DEAE-Sephadex A-50	Pettersson,1975; Berghem,et al, 1975.

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Microorganisms	Components	Step of purification	References
T. viride	C_x	Chromatography on SE-Sephadex C-50 Bio-specific chromatography Isoelectric focusing Chromatography on Bio-Gel P-60	
T. koningii	C_x	Chromatography on Sephadex G-75 Chromatography on DEAE-Sephadex A-50 (salt gradients) Chromatography on SE-Sephadex C-50 (salt gradients) or on DEAE-Sephadex A-50	Wood,1968; Wood and McCrae 1972,1975.

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Microorganisms	Components	Step of purification	References
F. solani	C_x	Chromatography on Ultrogel AcA 54 Chromatography on DEAE-Sephadex A-50 (pH gradients)	Wood and McCrae, 1977.
T. viride	β-glucosidase	Chromatography on SE-Sephadex Isoelectric focusing Chromatography on Bio-Gel P-60	Berghem and Pettersson,1974.
T. aurantiacus	β-glucosidase	Chromatography on Sephadex G-100 Polyacrylamide disc-gel electrophoresis	Tong et al.,1980.

อยู่ในช่วง 45,000-75,000(Wood ,1975) ส่วนเบตา-กลูโคซิเดสในราบางชนิดก็มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ C_1 และ C_x เช่น T.viride และ A. fumigatus มีค่าอยู่ระหว่าง 40,850-47,000 (Berghem และ Pettersson ,1974; Rudick และ Elbein ,1973) ในราบางชนิด เช่น F. solani เบตา-กลูโคซิเดสมีขนาดใหญ่มากมีน้ำหนักโมเลกุลถึง 400,000 ดาลตัน ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้ในการแยกเบตา-กลูโคซิเดสออกจาก C_1 และ C_x 3) เอนไซม์ทั้งสามชนิดคงตัวมาก สามารถจะเก็บที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้นานถึง 12 สัปดาห์ (Wood ,1975) 4) เป็นเอนไซม์ที่สามารถทนต่อ pH ในช่วงที่เป็นกรดอ่อนๆ จนถึงด่างอ่อนๆ (4.0-8.0)ได้ (Berghem และPettersson ,1973,1974; Shoemaker และ Brown ,1978)เป็นต้น

ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาถึงจุลชีพที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกันมากมายดังที่กล่าวมาแล้วก็ตาม แต่ปัจจุบันยังไม่มีผู้สามารถนำเอาขบวนการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอย่างจริงจัง เนื่องจากต้นทุนการผลิตยังสูงเมื่อเทียบกับการใช้วัสดุอื่นเป็นแหล่งต้นตอกลูโคส อีกทั้งประสิทธิภาพและขบวนการผลิตกลูโคสโดยเอนไซม์เซลลูเลสยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างกระจ่างมากพอ ดังนั้นนักวิจัยจึงยังคงพยายามศึกษาเพื่อค้นหาและคัดเลือกจุลชีพซึ่งมีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส โดยมีความหวังว่าจะได้จุลชีพชนิดที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าที่เคยพบ และรวมไปถึงการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยจุลชีพชนิดนั้น ศึกษาขั้นตอนของการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส และศึกษาปัจจัยต่างๆที่จะมีผลต่อการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งนอกจากจะขึ้นกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้แล้วยังขึ้นกับปริมาณและชนิดของเซลลูโลส ผลกระทบจากการยับยั้งของผลิตภัณฑ์ตัวกลาง (intermediate) และผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dwivedi และ Ghose ,1979; Fan และคณะ,1980) ทั้งนี้ก็เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของขบวนการผลิตกลูโคสโดยเอนไซม์เซลลูเลสและลดต้นทุนการผลิต ซึ่งจะทำให้สามารถนำขบวนการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสนี้ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเพื่อใช้เป็นแหล่งต้นตอกลูโคส

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศในแถบศูนย์สูตร ซึ่งความชื้นและอุณหภูมิปกติเหมาะต่อการเจริญของเชื้อราเป็นมาก จากข้อมูลของกองโรงงานกำจัดมูลฝอย กรุงเทพ

มหานคร พบว่าการเน่าเปื่อยผุพังของขยะในกรุงเทพมหานครซึ่งมีวัสดุที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบถึง 90 เปอร์เซนต์ (เอกสารเรื่องการกำจัดมูลฝอยของกรุงเทพมหานคร ของกองโรงงานกำจัดมูลฝอย สำนักรักษาความสะอาด 20 ตุลาคม 2520) เป็นไปอย่างรวดเร็ว ทำให้น่าคิดว่าในกองขยะซึ่งเป็นแหล่งของจุลชีพ น่าจะมีเชื้อราชนิดที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบของขยะอยู่มากมายด้วย จึงพยายามแยกเชื้อราจากกองขยะ ทั้งนี้โดยตั้งความหวังไว้ว่าอาจจะได้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงรวมทั้งประสิทธิภาพในการเร่งการย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสูงอีกด้วย ทั้งนี้จะเน้นถึงวัสดุเหลือใช้ที่คิดว่ามีปริมาณมากและเป็นปัญหาในการกำจัดของเกษตรกรและอุตสาหกรรมในประเทศไทย ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ดังนี้คือ

1) แยกเชื้อราจากกองขยะ ชนิดที่มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลส และรวมถึงการแยกเชื้อราเหล่านั้นให้บริสุทธิ์ด้วย

2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่แยกได้ และคัดเลือกเชื้อราที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสได้สูง

3) เตรียมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่สังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสได้สูงให้ได้ปริมาณมาก และนำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

4) ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและจลนศาสตร์ของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

5) ศึกษาความสามารถของเชื้อราที่คัดเลือกได้ และความสามารถของเอนไซม์เซลลูเลสที่สังเคราะห์โดยเชื้อรานี้ในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพดเป็นต้น

008643