หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

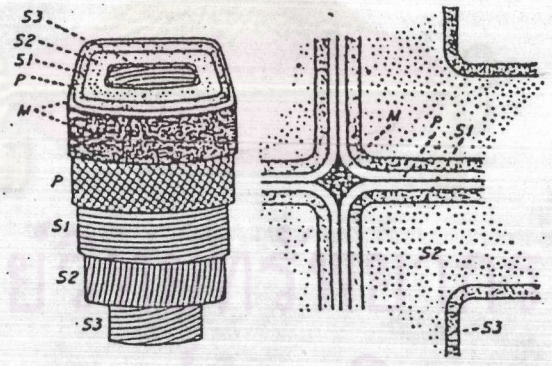
บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 เซลลูโลส

2.1.1 โครงสร้างของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช

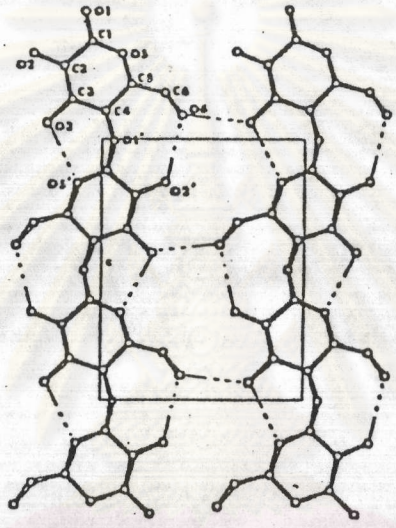
เซลล์พืชประกอบด้วยผนังเซลล์หลายชั้น ได้แก่ ผนังชั้นปฐมภูมิ (primary wall) มีลักษณะบาง ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยเซลลูโลสและสารประกอบเพคติน ผนังชั้นทุติยภูมิ (secondary wall) อยู่ล้อมรอบชั้นปฐมภูมิ มีลักษณะหนากว่าและประกอบด้วยผนังชั้นนอก ชั้นกลาง และชั้นใน ผนังชั้นปฐมภูมิของเซลล์ที่ติดกันจะเชื่อมกันด้วยสารประกอบเพคตินและลิกนิน ช่องว่างระหว่างสองเซลล์ที่อยู่ติดกันนี้เรียกว่า มิดเดิล ลาเมลลา (middle lamella) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การเรียงตัวของผนังเซลล์แต่ละชั้นในเซลล์พืช และตำแหน่งของมิดเดิล ลาเมลลา (5)

M = มิดเดิล ลาเมลลา
P = ผนังชั้นปฐมภูมิ
S_1 = ผนังชั้นทุติยภูมิ ชั้นนอก
S_2 = ผนังชั้นทุติยภูมิ ชั้นกลาง
S_3 = ผนังชั้นทุติยภูมิ ชั้นใน

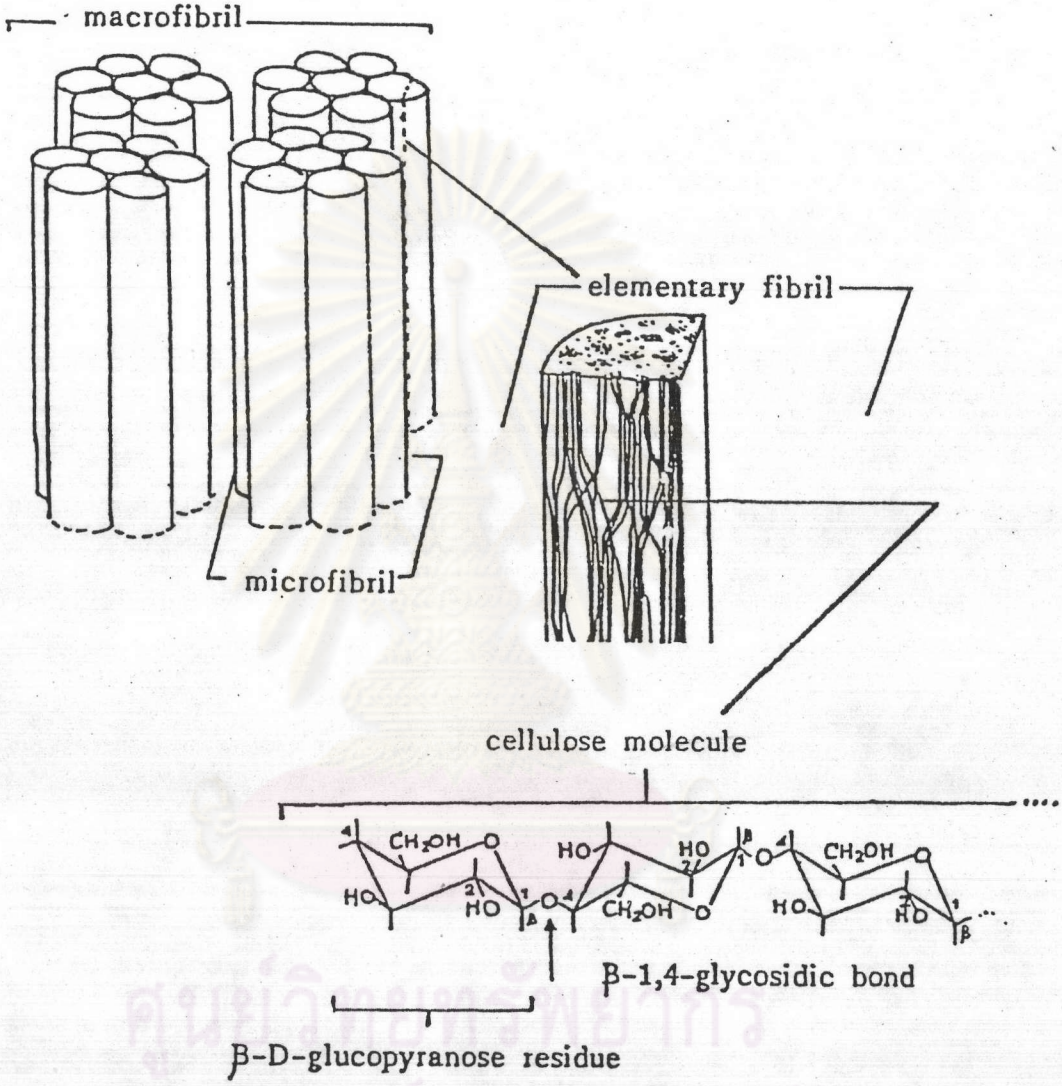
ในแต่ละชั้นของผนังเซลล์พืชประกอบด้วย เซลลูโลสซึ่งเป็นกลุ่มของสายโมเลกุลเซลลูโลส มีหน่วยที่เล็กที่สุดคือ บีตา-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-glucopyranoses) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไกลโคสิดิก สายโมเลกุลเซลลูโลสมีขนาดต่าง ๆ กัน ตั้งแต่แกมมา-เซลลูโลส ซึ่งมีบีตา-ดี-กลูโคไพราโนส น้อยกว่า 15 หน่วยต่อโมเลกุล จนถึงแอลฟา-เซลลูโลสซึ่งมีบีตา-ดี-กลูโคไพราโนสประมาณ 10,000-14,000 หน่วยต่อโมเลกุล ความยาวของโมเลกุลเซลลูโลสวัดโดยค่าอัตราของการเกิดโพลิเมอร์(degree of polymerization) โมเลกุลเซลลูโลสที่อยู่ติดกันจะเชื่อมกันทางด้านข้างของสายด้วยพันธะไฮโดรเจน ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 พันธะไฮโดรเจนในเซลลูโลส โดยกลูโคสแต่ละยูนิตจะเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลเซลลูโลส 2 พันธะ คือ O3-H···O5' และ O6···H-O2' และพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโมเลกุลเซลลูโลส O6-H···O3

กลุ่มของสายโมเลกุลเซลลูโลสที่เชื่อมกันด้านข้างของสายด้วยพันธะไฮโดรเจนนี้เรียกไฟบริลมูลฐาน (elementary fibril) การเชื่อมกันดังกล่าวถ้าสายโมเลกุลเซลลูโลสมีการเรียงตัวอย่างมีระเบียบขนานกันไปทำให้เกิดบริเวณที่เป็นผลึก (crystalline regions) และถ้าการเรียงตัวดังกล่าวมีความเป็นระเบียบน้อยลงจะทำให้เกิดบริเวณที่เรียกว่าบริเวณอสัณฐาน (amorphous regions หรือ paracrystalline regions) ไฟบริลมูลฐานจำนวนหนึ่งเมื่อรวมกลุ่มกันจะเรียกว่า ไมโครไฟบริล ไมโครไฟบริลเมื่อเชื่อมกันทางด้านข้างและมีลิกนินเป็นตัวห่อหุ้มให้รวมกันเป็นกลุ่มเรียก แมคโครไฟบริล โดยมีเฮมิเซลลูโลสและสาร

อื่น ๆ ขังอยู่ภายในช่อง ว่างระหว่างไมโครไฟบริลแต่ละกลุ่ม การรวมกลุ่มของสายโมเลกุลเซลลูโลส และการสะสมของสารต่าง ๆ ในช่องว่างดังกล่าวทำให้เซลลูโลสในธรรมชาติมีระบบการป้องกันการย่อยสลายโดยเอนไซม์ (6)



รูปที่ 4 ลำดับการรวมกลุ่มของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช และโครงสร้างของสายโมเลกุลเซลลูโลส

2.1.2 วัตถุดิบที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (3, 7, 8)

เศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจะมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในปริมาณต่างกันไป ดังตารางที่ 4 และเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยทั่วไปจะมีปริมาณลิกนินเฉลี่ยร้อยละ 3-13

ตารางที่ 3 ปริมาณเซลลูโลสในวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ

วัตถุดิบ	ส่วนประกอบที่พิจารณา (component)	ปริมาณเซลลูโลส* (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
ข้าวโพด (corn)	stover	36
	ซัง (cobs)	28
ถั่วลิสง (peanuts)	เปลือก (hulls)	49
ข้าว (rice)	แกลบ (hulls)	42
	ฟาง (straw)	30
ข้าวฟ่าง (sorghum)	ต้นแห้ง (hay)	32
	เปลือก (hulls)	51
ถั่วเหลือง (soybean)	ต้นแห้ง (hay)	31
	เปลือก (hulls)	52
อ้อยน้ำตาล (sugarcane)	ใบแก่ (mature plants)	42
	ชานอ้อย (bagasse)	48
ฝ้าย (cotton)	เปลือกหุ้มเมล็ด (seed hulls)	60
	เส้นใย (fibre)	91
	ลำต้น (stalks)	35
สับปะรด (pineapple)	กากแห้ง	24.53
ข้าวโอต (oats)	เมล็ด (grain)	18
	ฟาง (straw)	40
	แกลบ (hulls)	51
อัลฟัลฟา (alfalfa)	ต้นอ่อนแห้ง (hay-midbloom)	30
	ต้นแก่แห้ง (hay-mature)	36

2.2 เอนไซม์เซลลูเลส

2.2.1 แหล่งของเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสสกัดได้จากจุลินทรีย์และเนื้อเยื่อสัตว์หลายชนิด เช่น *Aspergillus wentii* *Aspergillus niger* *Trichoderma viride* *Penicillium funiculosum* *Fusarium solani* *Helix panatia* *Helix pomatia* ไส้เดือนดิน และ *Octopus vulgaris* เป็นต้น เอนไซม์เซลลูเลสจากแหล่งที่แตกต่างกันจะมีสมบัติต่างกัน อันได้แก่ สัดส่วนของเอนไซม์ องค์ประกอบ อุณหภูมิ และค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน (8)

2.2.2 องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ร่วมกัน เมื่อใช้เทคนิคทางโครมาโตรกราฟฟิคและอิเลคโตรฟอรีซิส สามารถแยกเอนไซม์เซลลูเลสที่ซับซ้อนออกเป็นองค์ประกอบย่อย ๆ ได้ โดยพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสมีเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด เป็นองค์ประกอบหลัก (9) ได้แก่

2.2.2.1 เอนไซม์ซี 1 (C_1) ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแยกสายของเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสำหรับการเข้าทำงานของเอนไซม์อื่น ๆ ต่อไป ดังนั้นเอนไซม์ซี 1 จึงจำเป็นอย่างยิ่งในกรณีที่มีการย่อยสลายสับสเตรทที่มีโครงสร้างซับซ้อน

2.2.2.2 เอนไซม์ซีเอกซ์ (C_x) หรือเอนไซม์บีตา- (1→4) กลูคาเนส (β-(1→4) glucanases) สามารถย่อยสลายอนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรทที่มีโครงสร้างซับซ้อนมาก ๆ ได้ การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์นี้มักใช้คาร์บอกซีเมธิล เซลลูโลสหรือไฮดรอกซีเอธิล เซลลูโลสเป็นสับสเตรทโดยวัดแอคติวิตีจากค่าความหนืดที่ลดลงหรือวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาการย่อยสลาย โดยปกติเอนไซม์ซีเอกซ์มีเอนไซม์องค์ประกอบย่อย ๆ คือ

2.2.2.2.1 เอนไซม์เอนโด-บีตา-(1→4) กลูคาเนส (endo-β-(1→4) glucanases) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสโมเลกุลออกเป็นโอลิโกเมอร์และน้ำตาลกลูโคสบางส่วน

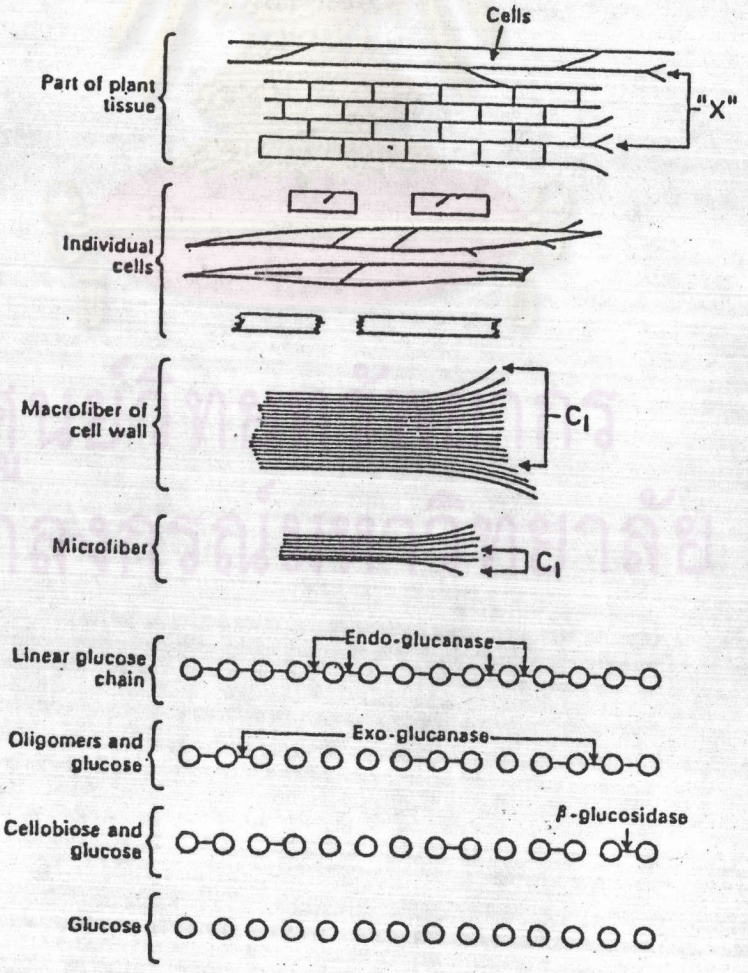
2.2.2.2.2 เอนไซม์เอกโซ-บีตา-(1→4) กลูคาเนส (exo-β-(1→4) glucanases) ทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลเซลลูโลสออกเป็นเซลโลไบโอส

และน้ำตาลกลูโคส

2.2.2.3 เอนไซม์บีตา-กลูโคสิเดส (β-glucosidases) หรือเอนไซม์เซลโลไบเอส ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligosaccharides) สายสั้น ๆ ได้น้ำตาลกลูโคสโดยสามารถย่อยเซลโลไบโอสและเซลโลทริโอสได้อย่างรวดเร็วและอัตราการย่อยสลายจะลดลงเมื่อความยาวของสายโมเลกุลเซลลูโลสเพิ่มขึ้น

2.2.3 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

Cowling ได้เสนอสมมติฐานเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส โดยกล่าวว่ามีเอนไซม์ "x" ที่มักพบอยู่รวมกับเอนไซม์เซลลูเลสจะเข้าทำงานเป็นอันดับแรกที่ตำแหน่งมิดเดิลลาเมลลา ทำให้เซลล์พืชถูกแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ มีการแตกของผนังเซลล์และเกิดการหักของเซลล์บางเซลล์ขึ้น จากนั้นเอนไซม์องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสจะเข้าทำงานตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์ "x" และเอนไซม์องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส ตามสมมติฐานของ Cowling

2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (5,10)

ปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส มีดังนี้

2.2.4.1 ความชื้นของเส้นใยเซลลูโลส

ความชื้นของเส้นใยเซลลูโลสมีผลทำให้เส้นใยเซลลูโลสเกิดการพองตัว เนื่องจากน้ำที่จับกับโมเลกุลของเซลลูโลสจะทำให้โครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสเปิดออก เอนไซม์เซลลูเลสสามารถแพร่ผ่านเข้าทำการย่อยสลายได้ดีขึ้น นอกจากนี้น้ำยังเป็นสารประกอบที่ให้ธาตุสำคัญสำหรับเติมลงสู่หมู่อิสระที่เกิดในกระบวนการทำลายพันธะไกลโคสิดิคอีกด้วย

2.2.4.2 ความสามารถในการแพร่ผ่านของเอนไซม์โมเลกุล (diffusibility)

เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติเหมือนเอนไซม์ทั่วไป คือเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำและมีมวลโมเลกุลสูง ทั้งขนาดและรูปร่างของเอนไซม์โมเลกุลเป็นปัจจัยกำหนดความสามารถในการแพร่ผ่านของเอนไซม์โมเลกุลเข้าสู่โครงสร้างของเซลลูโลสที่ซับซ้อน

2.2.4.3 ความเป็นผลึกของเซลลูโลส (crystallinity)

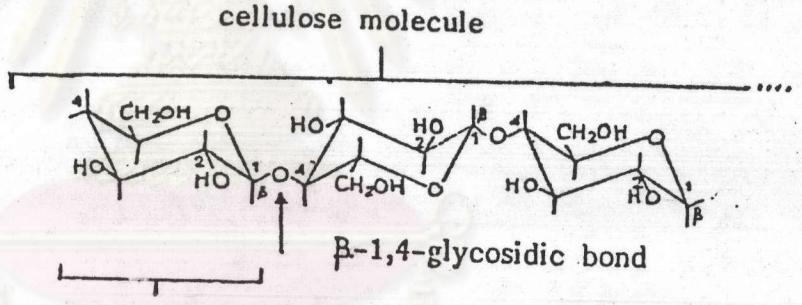
สายโมเลกุลเซลลูโลสที่มีการเรียงตัวกันอย่างมีระเบียบขนานกันไป และมีการเชื่อมกันทางด้านข้างของสายโมเลกุลเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้เกิดบริเวณที่มีลักษณะเป็นผลึก ซึ่งมีความต้านทานต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าบริเวณที่เป็นอสัณฐาน ซึ่งสายโมเลกุลเซลลูโลสมีการเรียงตัวเป็นระเบียบน้อยกว่าบริเวณแรก ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสสามารถแพร่ผ่านเข้าสู่โครงสร้างที่ไม่มีความเป็นระเบียบได้ดีกว่า

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสมีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกับการย่อยสลายด้วยกรด กล่าวคือ ในระหว่างการย่อยสลายนั้นขณะที่ส่วนอสัณฐานซึ่งเป็นส่วนของโมเลกุลที่ไวต่อการย่อยสลายถูกย่อยสลายไป จะทำให้เซลลูโลสที่เหลือมีสัดส่วนของความเป็นผลึกเพิ่มขึ้น ความต้านทานต่อการย่อยสลายจึงเพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนั้นการเตรียมสภาพขั้นต้นใด ๆ ที่มีผลทำให้สัดส่วนความเป็นผลึกของเซลลูโลสลดลงได้ก็จะมีผลช่วยเพิ่มความไวของเซลลูโลสต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ การเตรียมสภาพที่ช่วยลดความเป็นผลึกของเซลลูโลสดังกล่าว รวมถึงการตกตะกอนจากสารละลาย และการรบกวนโดยวิธีกล

เช่น การสั่นสะเทือนโดยการใช้เครื่องโม่แบบสั่นสะเทือน (vibratory ball miller) หรือการใช้รังสี

2.2.4.4 ลักษณะโครงรูป (conformation) ของกลูโคสในโมเลกุลเซลลูโลส

เซลลูโลสรูปผลึกมีความต้านทานต่อการย่อยสลายมากกว่าเซลลูโลสรูปอสัณฐาน เนื่องจากโครงสร้างทางกายภาพที่มีความเป็นระเบียบช่วยกีดกันการเข้าถึงของเอนไซม์เซลลูเลส นอกจากนี้ยังมีสาเหตุเนื่องจากโครงรูปและสภาพแข็งแกร่งแบบสเตอริก (steric rigidity) ของหน่วยแอนไฮโดรกลูโคส (anhydroglucose units) ในบริเวณที่เป็นผลึก ซึ่งในบริเวณดังกล่าวหน่วยกลูโคสจะมีโครงรูปเป็นแบบเก้าอี้ (chair conformation) ที่มีหน่วยกลูโคไพราโนสจัดเรียงตัวในทิศทางตรงข้ามกันในผลึก ดังรูปที่ 6 ทำให้เกิดความจำเพาะที่เรียกว่าสเตอริโอสเปซิฟิคซิตี (stereospecificity) ของการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์



รูปที่ 6 การจัดเรียงตัวของหน่วยกลูโคไพราโนสในทิศทางตรงข้ามกันในผลึกเซลลูโลส

2.2.4.5 จำนวนหน่วยกลูโคสต่อโมเลกุลของเซลลูโลส

โมเลกุลของเซลลูโลสมีความยาวต่างกันตั้งแต่แกมมา-เซลลูโลสซึ่งมีหน่วยกลูโคสน้อยกว่า 15 หน่วยต่อโมเลกุล จนถึงแอลฟา-เซลลูโลส ซึ่งมี 10,000-14,000 หน่วยต่อโมเลกุล อัตราการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะต่างกัน ขึ้นกับขนาดของโมเลกุลเซลลูโลส โดยเฉพาะการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ตัดสายเซลลูโลสจากด้านปลาย (endwise mechanism)

ในระหว่างการย่อยสลายเซลลูโลสนั้นเมื่อสายเซลลูโลสถูกตัดให้สั้นลงจนกระทั่งโมเลกุลสามารถละลายได้ และไม่มีโครงสร้างซับซ้อนที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลอื่นมากนักจะพบว่า สายเซลลูโลสนั้นมีความไวต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น

2.2.4.6 ธรรมชาติของวัตถุดิบที่เป็นแหล่งเซลลูโลส

วัตถุดิบจากธรรมชาติที่เป็นแหล่งเซลลูโลสจะมีสารประกอบต่าง ๆ รวมถึงอินทรีย์สารที่ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นกลาง (neutral solvents) เช่น อะซิโตน อีเธอร์ เมธานอล เอธานอล เบนซีน และน้ำ สารประกอบเหล่านี้มีอิทธิพลต่ออัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ เนื่องจากการสะสมของสารประกอบดังกล่าวภายในโครงสร้างที่เป็นแคปิลารี่ของผนังเซลล์มีผลกีดกันการเข้าถึงของเอนไซม์สู่เซลลูโลส นอกจากนี้สารประกอบบางชนิดยังมีผลโดยตรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส เช่น กลูตาไธโอน (glutathione) และซิสทีน (cystine) ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แต่ไม่มีผลยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวในซิเตรตบัฟเฟอร์ที่พีเอชเดียวกัน และผลการยับยั้งนี้จะแตกต่างกันไปสำหรับเซลลูเลสจากแหล่งต่างกัน

ลิกนินซึ่งรวมตัวอยู่ในโครงสร้างของเซลลูโลสและทำหน้าที่ห่อหุ้มไมโครไฟบริลให้รวมกันเป็นกลุ่มใหญ่นั้นมีผลจำกัดการเข้าทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ดังนั้นการย่อยสลายเซลลูโลสให้มีประสิทธิภาพสูงจำเป็นต้องกำจัดลิกนินออกบางส่วนเสียก่อน นอกจากนี้ชนิด ปริมาณ และการกระจายของกลุ่มแทนที่ (substituent groups) ก็มีผลต่ออัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเช่นกัน กล่าวคือ กลุ่มแทนที่ต่าง ๆ เช่น กลุ่มเมธิล กลุ่มเอธิล กลุ่มไฮดรอกซีเอธิล กลุ่มคาร์บอกซีเมธิล เป็นต้น เมื่อกลุ่มเหล่านี้เข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของหมู่ไฮดรอกซิลชั้นปฐมภูมิ หรือหมู่ไฮดรอกซิลชั้นทุติยภูมิในเซลลูโลสเกิดเป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลส ทำให้เซลลูโลสมีความเป็นผลึกลดลงและมีการละลายเพิ่มขึ้น ทำให้อนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ได้นั้นมีความไวต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงจุดที่มีการละลายสมบูรณ์ (complete solubility) หลังจากจุดนี้แล้วอนุพันธ์ที่ได้จะมีความไวต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ลดลง

2.3 การเตรียมสภาพขั้นต้นวัตถุดิบ (pretreatment) (8,11)

สิ่งจำเป็นประการแรกของการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสคือ การสัมผัสกันโดยตรงระหว่างเอนไซม์กับโมเลกุลเซลลูโลส เนื่องจากมีปัจจัยต่าง ๆ ทั้งปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมีดังกล่าวข้างต้น ที่มีส่วนกำหนดความไวของปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสจึงต้องมีการเตรียมสภาพขั้นต้นวัตถุดิบให้เหมาะสมก่อนการย่อยสลาย การเตรียมสภาพขั้นต้นแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

2.3.1 การเตรียมสภาพขั้นต้นทางเคมี (chemical pretreatment) ได้แก่

2.3.1.1 การทำให้เกิดการพองตัวโดยใช้ด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือแอมโมเนีย ทำให้เกิดการสลายพันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมระหว่างสายโมเลกุลเซลลูโลสและช่วยกำจัดลิกนินออกบางส่วน

2.3.1.2 การกำจัดลิกนิน (delignification) โดยการสกัดด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิสูง เช่น การใช้บิวทานอล (butanol) และแอลกอฮอล์ชนิดอื่นที่มีมวลโมเลกุลสูงกว่าบิวทานอล

2.3.1.3 การใช้โอโซนหรือคาโดเซน (cadoxen) ช่วยกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดขนาดความยาวของโมเลกุลเซลลูโลส ลดความเป็นผลึก และเพิ่มการละลายของเซลลูโลส

2.3.1.4 การใช้ไอน้ำ (steaming) วิธีนี้ช่วยให้เซลลูโลสถูกย่อยได้ดีขึ้น แม้ว่าไม่มีการใช้สารเคมีใด ๆ ก็ตาม แต่การแตกตัวของหมู่อะเซทิลในตอนต้นของกระบวนการนี้จะทำให้เกิดสภาพความเป็นกรดซึ่งนำไปสู่การย่อยสลายเซลลูโลสและลิกนินได้บางส่วน

2.3.2 การเตรียมสภาพขั้นต้นทางกายภาพ (physical pretreatment) ได้แก่

2.3.2.1 การโม่บด เป็นการใช้แรงบีบอัด (compressive force) และแรงเฉือน (shearing force) ทำให้ความยาวของโมเลกุลเซลลูโลสลดลง

2.3.2.2 การฉายรังสี เช่น การใช้รังสีแกมมาหรืออิเลคตรอนที่มีความเร็วสูง (high-velocity electrons) ทำให้เซลลูโลสถูกย่อยได้ดีขึ้นเนื่องจากความยาวของสายโมเลกุลเซลลูโลสลดลง

2.3.2.3 การใช้อุณหภูมิต่ำโดยการแช่เยือกแข็งเซลลูโลสในน้ำที่ -75 องศาเซลเซียส ทำให้ความแข็งแรงและความยาวของสายโมเลกุลเซลลูโลสลดลง นอกจากนั้น การแช่เยือกแข็งสลับกับการละลายน้ำแข็ง (thawing) หลาย ๆ ครั้งติดต่อกันไป จะทำให้ผลดังกล่าวเพิ่มขึ้น

2.3.2.4 การใช้ความดันสูงที่อุณหภูมิห้อง ทำให้เซลลูโลสถูกย่อยสลายได้ดีขึ้น

2.4 <u>การผลิตน้ำตาลสำหรับหมักโดยการย่อยสลายเซลลูโลส</u>

การผลิตน้ำตาลสำหรับหมักจากวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบนั้น โดยทั่วไปแบ่งเป็น 2 วิธีคือ

2.4.1 การย่อยสลายด้วยกรด (acid hydrolysis)

โดยการใช้กรดกำมะถันหรือกรดเกลือแบ่ง 2 วิธี ได้ดังนี้

2.4.1.1 การย่อยสลายด้วยกรดแบบช้า (slow acid hydrolysis) ส่วนใหญ่จะใช้วิธีนี้ในการย่อยสลายเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็งหรือขี้เลื่อยจากไม้เนื้อแข็ง

2.4.1.2 การย่อยสลายด้วยกรดแบบเร็ว (rapid acid hydrolysis) โดยการใช้กรดควบคู่กับไอน้ำที่อุณหภูมิและความดันสูง

ปัญหาของการย่อยสลายด้วยกรดคือ น้ำตาลสำหรับหมักที่ได้มีปริมาณต่ำ เนื่องจากประมาณร้อยละ35 ของน้ำตาลสำหรับหมักที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสนั้นจะถูกสลายต่อไปโดยกรด ทำให้ได้เฟอร์ฟิวราล (furfural) มีเธน (methane) และกรดน้ำตาล (sugar acid) เช่น กรดลีวูลีนิค (levulinic) ผลเสียนอกจากจะทำให้ร้อยละผลได้ (% yield) ต่ำแล้ว สารประกอบที่ได้นี้ยังมีผลยับยั้งการหมักในยีสต์อีกด้วย

2.4.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์สามารถทำได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ ไม่มีปัญหาการสูญเสียน้ำตาลสำหรับหมักที่ได้เหมือนการย่อยสลายด้วยกรด

2.5 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสอิสระ

ผลงานวิจัยของปราณี และคณะ (3) ในการทดลองใช้กากสับปะรดเป็นแหล่งเซลลูโลส ศึกษาผลของการเตรียมสภาพขั้นต้นและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายเซลลูโลสจากกากสับปะรด พบว่าการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรดโดยการโม่บดจนได้กากสับปะรดที่มีขนาดอนุภาคประมาณ 250 ไมครอน ควบคู่กับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำกากสับปะรดที่ผ่านการเตรียมสภาพขั้นต้นแล้วมาย่อยโดยใช้สารละลายผสมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์อะไมโลกลูโคสิเดสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 67 ชั่วโมง ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดร้อยละ 58.63 โดยน้ำหนักเมื่อเทียบกับกากแห้งเริ่มต้น คิดเป็นร้อยละของผลได้ (% yield) เท่ากับ 78.43

2.6 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูป

มีผลงานวิจัยอีกมากมายเกี่ยวกับการย่อยสลายเซลลูโลสจากแหล่งต่าง ๆ ให้ได้น้ำตาลสำหรับหมักโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสในรูปของสารละลาย ซึ่งปรากฏเสมอว่าเอนไซม์ไม่เสถียรเท่าที่ควร อีกทั้งไม่สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ เสถียรภาพและความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่ได้ของเอนไซม์สามารถทำได้โดยการตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพยุงที่เป็นของแข็ง

การใช้เอนไซม์ตรึงรูปโดยทั่วไปมีข้อได้เปรียบเหนือการใช้เอนไซม์อิสระดังนี้ (12)

2.6.1 เอนไซม์ตรึงรูปมีความเสถียรมากกว่าเอนไซม์อิสระ

2.6.2 ในทางปฏิบัติสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ เนื่องจากสามารถแยกเอนไซม์ออกจากสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ได้สะดวก

2.6.3 สามารถดัดแปลงเอนไซม์เพื่องานเฉพาะอย่างได้ง่าย

2.6.4 นำเอนไซม์ตรึงรูปไปใช้ในปฏิกิริยาที่เป็นกระบวนการต่อเนื่องได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.6.5 ใช้เนื้อที่ของภาชนะในการเกิดปฏิกิริยาน้อยกว่า

2.6.6 การควบคุมปฏิกิริยาทำได้ดีและสะดวกกว่า

2.6.7 ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงและได้ผลผลิตสูงกว่าด้วย

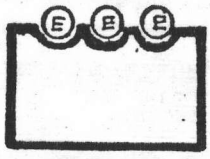
2.6.8 เป็นการประหยัดทรัพยากรธรรมชาติอีกทั้งช่วยลดมลพิษ (pollution) ที่จะเกิดต่อสิ่งแวดล้อม

การตรึงรูปเอนไซม์แบ่งเป็น 3 ประเภท ตามวิธีที่ใช้ในการตรึงดังสรุปในตาราง ที่ 4 และรูปที่ 7 ตามลำดับ

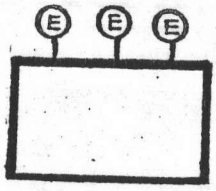
ตารางที่ 4 การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการต่าง ๆ

วิธีการตรึงรูปเอนไซม์	ลักษณะสำคัญ
1. วิธีเชื่อมกับตัวพยุง (carrier binding)	เอนไซม์จะถูกตรึงอยู่กับตัวพยุงโดยกระบวนการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) การเชื่อมด้วยพันธะเชิงไอออน (ionic binding) หรือการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent binding)
2. วิธีเชื่อมข้าม (cross linking)	เอนไซม์จับกันเป็นร่างแหโดยมีโมเลกุลของสารอินทรีย์เป็นตัวเชื่อมโยง
3. วิธีห่อหุ้ม (entrapment)	เอนไซม์ถูกห่อหุ้มในร่างแหโพลิเมอร์แบบเป็นช่องในไมโครแคปซูล (microcapsule) หรือถูกกักโดยอัลตราเมมเบรน (ultramembrane)

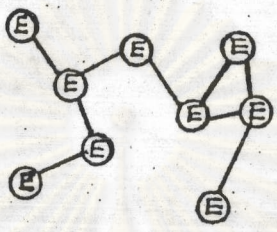
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



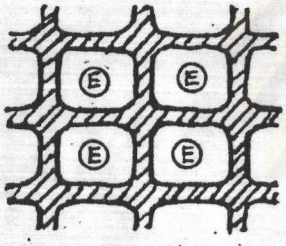
(1)



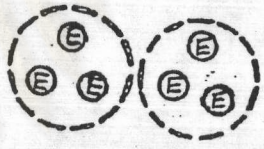
(2)



(3)



(4)



(5)

รูปที่ 7 ลักษณะการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีต่าง ๆ

(1) วิธีเชื่อมกับตัวพยุงโดยการดูดซับ

(2) วิธีเชื่อมกับตัวพยุงด้วยพันธะเชิงไอออนหรือพันธะโคเวเลนต์

(3) วิธีเชื่อมข้าม

(4) วิธีห่อหุ้มในร่างแหโพลีเมอร์แบบช่อง

(5) วิธีห่อหุ้มในไมโครแคปซูล

Ⓔ คือ เอนไซม์

มีการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

2.6.1 การตรึงรูปโดยวิธีเชื่อมกับตัวพยุง (carrier binding)

2.6.1.1 การเชื่อมกับตัวพยุงด้วยการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption)

การตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีการดูดซับกับตัวพยุงสามารถทำได้โดยง่าย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปและความเสียหายต่อเอนไซม์น้อยที่สุด อย่างไรก็ตาม การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีนี้แรงของพันธะที่ดูดซับเอนไซม์บนตัวพยุงอ่อนมาก เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเกิดขึ้นในระบบจะทำให้เอนไซม์ถูกชะล้างออกจากตัวพยุงได้ง่าย ตัวพยุงที่มีผู้ทดลองใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธีการดูดซับนี้ได้แก่ แก้วอัลคิลามีน (alkylamine glass bead) และถ่านไม้ (charcoal) พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุงทั้งสองชนิดนี้มีแอคติวิตีใกล้เคียงกัน (13)

Mandels และคณะ (14) ได้ใช้เซลลูโลสซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์เอง เป็นตัวพยุงในการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* แบบดูดซับ ขณะที่มีการย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นตัวพยุงนั้นเอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากตัวพยุงดังกล่าวจะดูดซับบนตัวพยุงที่เติมลงใหม่อย่างต่อเนื่องตลอดเวลา เมื่อการย่อยสลายนี้เกิดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปแบบถังกวน น้ำตาลกลูโคสที่ได้นั้นสามารถแยกออกจากเอนไซม์ตรึงรูปโดยการกรองเชิงเดียว (simple filtration) หรือการหมุนเหวี่ยง (centrifugation) หรือโดยการกักเอนไซม์-เซลลูโลสเชิงซ้อน (enzyme-cellulose complex) ไว้ในคอลัมน์ (column) แล้วชะเอาเฉพาะส่วนน้ำตาลออกมา พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นถึงร้อยละ 5-14 จากการใช้เซลลูโลสเข้มข้นร้อยละ 10-20 โดยน้ำหนัก อย่างไรก็ตาม พบว่ามีการหลุดของเอนไซม์เซลลูเลสเกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายเซลลูโลสอย่างต่อเนื่องดังกล่าว

2.6.1.2 การเชื่อมกับตัวพยุงด้วยพันธะเชิงไอออน

การตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีนี้เป็นการยึดเหนี่ยวเอนไซม์เข้ากับตัวพยุงที่มีประจุตรงข้าม อาศัยหลักการที่ว่าเอนไซม์ในสารละลายจะมีประจุเนื่องจากการแตกตัวของสายรอง (side chain) ของกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์โดยชนิดของประจุสุทธิและจำนวนของประจุบนโมเลกุลของเอนไซม์จะขึ้นกับค่าพีเอชของสารละลายที่ใช้ ตัวพยุงที่ใช้ในกรณีนี้ได้แก่ ตัวแลกเปลี่ยนแคตไอออน (cation exchangers) และตัว-

แลกเปลี่ยนแอนไอออน (anion exchangers) สำหรับยึดกับเอนไซม์ที่มีประจุเป็นบวกและลบตามลำดับ

สำหรับเอนไซม์เซลลูเลสนั้น ในปี ค.ศ. 1985 Rohrbach (15) ได้ทดลองเตรียมตัวพยุงและตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลส ตัวพยุงดังกล่าวเตรียมขึ้นจากตัวพยุงแกน (core supports) ที่เป็นวัสดุชนิดต่าง ๆ เช่น แก้ว เซรามิค โลหะ พลาสติก และเมมเบรน การเตรียมตัวพยุงสำหรับตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสจะต้องใช้สารประกอบโพลีเอธิลีนิมินเป็นตัวกระตุ้นตัวพยุง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับของเอนไซม์บนตัวพยุง ทั้งนี้พบว่าไม่ขึ้นกับความเป็นรูพรุนของตัวพยุงแต่อย่างใด การเตรียมตัวพยุงวิธีนี้ทำได้โดยง่าย ใช้ส่วนประกอบที่ไม่ยุ่งยาก ประหยัดต้นทุนและเวลาในการเตรียม และใช้ตัวพยุงแกนเป็นวัสดุชนิดใดก็ได้ไม่มีขีดจำกัดทางด้านรูปร่างและพื้นผิว ทำให้สามารถเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปด้วยพันธะไอออนิกที่มีความหนาของเอนไซม์บนผิวของตัวพยุงอย่างสม่ำเสมอ อย่างไรก็ดี Rohrbach มิได้รายงานถึงคุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปที่ได้แต่อย่างใด

โดยปกติการตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีเชื่อมกับตัวพยุงด้วยพันธะเชิงไอออนนี้กระทำได้ง่าย และไม่มีปฏิกิริยาเคมีที่รุนแรง จึงมักได้เอนไซม์ตรึงรูปที่มีแอคติวิตีอยู่ในระดับสูง แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จะหลุดจากตัวพยุงได้ง่ายเมื่อระบบมีการเปลี่ยนแปลงพีเอช และเมื่อระบบมีความเข้มข้นของเกลือหรือสับสเตรทที่สูงขึ้น

2.6.1.3 การเชื่อมกับตัวพยุงด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent binding)

การเชื่อมกับตัวพยุงด้วยวิธีนี้เอนไซม์จะเชื่อมกับตัวพยุงด้วยพันธะโคเวเลนต์ระหว่างหมู่ฟังก์ชัน (functional groups) ของเอนไซม์และหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive groups) ของตัวพยุง หมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์ได้แก่ หมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลที่ปลายสุดทั้งสองด้านของเอนไซม์ หมู่คาร์บอกซิลของสายรองจากกรดกลูตามิกและกรดแอสปาติก (β- และ γ-carboxyl groups) หมู่อะมิโนของไลซีน (ε-amino group) หมู่ซัลไฟดริล (sulphydryl group) ของซิสตีน หมู่ไฮดรอกซิลของเซรีนและธีโอนีน หมู่อิมิดาโซล (imidozol group) ของฮีสติดีน และหมู่ฟีนอลิก (phenolic group) ของไธโรซีน หมู่ฟังก์ชันเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาของตัวพยุง เช่น หมู่ไดอะโซเนียม (diaszonium) แอซิด เอไซด์ (acid azide) ไอโซไซยาเนต (isocyanate) และเฮไลด์ (halides)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสร้างพันธะโคเวเลนต์นี้ค่อนข้างซับซ้อนและใช้กระบวนการที่ค่อนข้างรุนแรงสำหรับเอนไซม์ ในบางกรณีกระบวนการตรึงรูปนี้อาจทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เสียไปเนื่องจากมีการเปลี่ยนโครงรูปของเอนไซม์เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามถ้าสามารถเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปด้วยวิธีนี้ในสภาวะที่เหมาะสมแล้วเอนไซม์ก็จะยังคงมีแอคติวิตีอยู่ และไม่หลุดออกจากตัวพยุงได้ง่าย เพราะพันธะโคเวเลนต์ที่ใช้เชื่อมมีแรงยึดเหนี่ยวที่แข็งแรงมาก การตรึงเอนไซม์โดยวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุด เช่น

ในปี ค.ศ. 1984 Fadda และคณะ (16) ได้ทดลองใช้ Sepharose ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไซยาโนเจนโบรไมด์ (CNBr-activated Sepharose) เป็นตัวพยุงเชื่อมกับเอนไซม์เซลลูเลสด้วยพันธะเปปไทด์ เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ (kinetic properties) ของเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปที่ได้โดยใช้เซลลูโลส เอเซอร์ (cellulose azure) และพารา-ไนโตรฟีนิล - บีตา-ดี-กลูโคไพแรโนไซด์ (p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside) เป็นสับสเตรทพบว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีค่าความเร็วการทำปฏิกิริยาสูงสุด (V_{max}) ลดลงเล็กน้อย และค่าคงที่ Michaelis (K_m) เพิ่มขึ้น เมื่อใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติ ได้แก่ อัลฟา-อัลฟา (Alfa-Alfa) ฟางข้าวสาลี และใบสน พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปสามารถทำงานได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ และมีความเสถียรมากกว่าด้วย นอกจากนี้ยังมีความต้านทานต่อการยับยั้งของทั้งกลูโคสและเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้นด้วย

ในปี ค.ศ. 1985 Chagamas และคณะ (17) ได้ทดลองใช้เดกซ์แทรนที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไซยาโนเจนโบรไมด์ (CNBr-activated dextran) เป็นตัวพยุง สร้างพันธะโคเวเลนต์กับหมู่อะมิโนของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปที่ได้มีแอคติวิตีเหลืออยู่ร้อยละ 70 เมื่อเทียบกับแอคติวิตีทั้งหมดของเอนไซม์เซลลูเลสเดิม (native cellulase) มีเสถียรภาพมากกว่าเอนไซม์อิสระ (free enzyme) ที่พีเอชเป็นกรดและมีความต้านทานต่อการเสียสภาพที่อุณหภูมิสูงได้ดีขึ้น ช่วงพีเอชที่เอนไซม์ตรึงรูปเสถียรมากที่สุดเท่ากับพีเอช 4.0-5.0 ซึ่งจะค่อนไปทางกรดประมาณ 0.5-1.0 หน่วยพีเอช (pH unit) เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ แต่ช่วงพีเอชที่เอนไซม์ตรึงรูป ทำงานได้ดี (pH activity profile) นั้นจะเป็นช่วงเดียวกับช่วงพีเอชของเอนไซม์อิสระ คืออยู่ในช่วงพีเอช 4.0-5.0 การที่เอนไซม์ตรึงรูปมีพีเอชที่เหมาะสม (optimum pH) ไม่ต่างไปจากของเอนไซม์เดิมนั้น ผู้วิจัยได้อธิบายว่าอาจเนื่องจาก

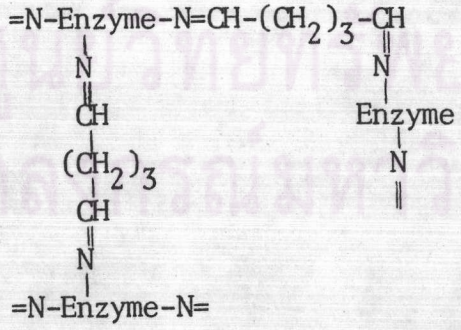
ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของตัวพยุงคาร์โบไฮเดรตที่จับกับเอนไซม์ก็เป็นได้

อย่างไรก็ตาม Rogalski และคณะ (18) ได้ให้ความเห็นว่าการใช้ตัวพยุงที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) เช่น Sepharose และเดกซ์แทรนนั้นไม่เหมาะสมสำหรับกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากตัวพยุงดังกล่าวไม่มีความต้านทานต่อการทำลายของจุลินทรีย์ ดังนั้น Rogalski และคณะจึงได้ทดลองตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ดี-ไซลาเนสเชิงซ้อน (cellulase and D-xylanase complexes) จาก *Aspergillus terreus* F-413 โดยใช้แก้วพรุน (controlled porosity glasses) เป็นตัวพยุง แก้วพรุนนั้นปกติมีข้อจำกัดคือมีความไวต่อปฏิกิริยาในการเกาะเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ผิวต่ำมาก ข้อจำกัดนี้สามารถแก้ไขได้โดยการให้ความร้อนที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 700 องศาเซลเซียส นาน 35 ชั่วโมง ต่อจากนั้นเติมหมู่ไฮดรอกซิล (rehydroxylation) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำให้โบรอนอะตอมและกลุ่มไฮดรอกซิลในซิลิกาแลตทิซ (silica lattice) แพร่ออกมาสู่ผิวของแก้วพรุน ทำให้แก้วพรุนสามารถทำหน้าที่เป็นตัวพยุงในการยึดเกาะกับเอนไซม์ด้วยพันธะเคมีได้ดีขึ้น เมื่อนำแก้วพรุนที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมสภาพดังกล่าวมากระตุ้นด้วยสารประกอบอะมิโนอัลคิลไซเลน เช่น อะมิโนโพรพิลไตรเอธอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane) หรือไกลโคเฟส (3-glycidoxypropyltrimethoxysilane) จากนั้นนำแก้วพรุนที่ผ่านการกระตุ้นมาเชื่อมกับเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) หรือโซเดียมบอโรไฮเดรท ($NaBH_4$) ตามลำดับ จากการวิจัยพบว่า อัตราการเกาะเกี่ยว (degree of binding) ของเอนไซม์เซลลูเลสบนแก้วพรุนจากการตรึงรูปทั้งสองวิธีมีค่าอยู่ในระหว่างร้อยละ 71.6-98.1 เมื่อวัดแอคติวิตีในรูปของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายเอไวเซล เซลลูโลส(Avicel cellulose) พบว่าการกระตุ้นแก้วพรุนด้วยอะมิโนโพรพิลไตรเอธอกซีไซเลนจะให้เอนไซม์ตรึงรูปที่มีแอคติวิตีสูงกว่าการกระตุ้นด้วยไกลโคเฟส เซลลูเลสตรึงรูปที่ได้แสดงแอคติวิตีในช่วงพีเอชที่กว้างขึ้นและในช่วงพีเอชที่เท่ากัน เอนไซม์ตรึงรูปจะมีแอคติวิตีสูงกว่าเอนไซม์อิสระ อัตราของการย่อยสลายเซลลูโลส (degree of cellulose saccharification) ของเอนไซม์ตรึงรูปบนแก้วพรุนที่ผ่านการกระตุ้นด้วยอะมิโนโพรพิลไตรเอธอกซีไซเลน (APTES-controled porous glass) เท่ากับร้อยละ 25 ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสอิสระและเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปบนแก้วพรุนที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไกลโคเฟส (glucophase-controlled porous glass) มีค่าดังกล่าวร้อยละ 22.5 และ 21 ตามลำดับ เมื่อย่อยสลายเซลลูโลสนาน 72 ชั่วโมง

การใช้แก้วพรุนเป็นตัวพยุงมีข้อดีหลายประการคือ แก้วพรุนทนทานต่อแรงกล การขัดสี และทนต่อแรงกดอัดในระดับสูง ไม่มีข้อจำกัดในการเลือกรูปร่าง มีรูปร่างถาวรและสะดวกต่อการใช้งาน ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชในช่วงกว้าง และสามารถนำกลับมาใช้เป็นตัวพยุงใหม่ได้หลายครั้ง แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวพยุงที่ให้คุณสมบัติที่ดีเช่นแก้วพรุนนี้มีราคาสูง ดังนั้นมีผลงานวิจัยไม่น้อยที่พยายามใช้วัสดุจากธรรมชาติ เช่น ทรายแม่น้ำ (river bed sand) ซึ่งมีมาก หาได้ง่าย และราคาถูก มาทดแทนการใช้แก้วพรุน โดย Thomplison และคณะ (19) ได้ชี้ให้เห็นว่า ทรายน่าจะเป็นตัวพยุงที่เหมาะสมและมีคุณสมบัติไม่ต่างไปจากแก้วพรุน และในปี ค.ศ. 1988 ปราณี และคณะ (20) ได้ทดลองใช้ทรายแม่น้ำเป็นตัวพยุงในการตรึงรูปเอนไซม์เรนนิน โดยมีอะมิโนโพรพิลไตรเอธอกซีไซเลนเป็นสารกระตุ้นและกลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมพันธะ ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์เรนนินตรึงรูปที่ได้มีแอคติวิตีและเสถียรภาพในระดับสูง

2.6.2 การตรึงรูปโดยวิธีเชื่อมข้าม (cross linking)

เป็นการทำให้โมเลกุลอิสระของเอนไซม์ในสารละลายเชื่อมข้ามกันเป็นร่างแห และมีขนาดใหญ่มากจนสามารถแยกตัวออกจากสารละลายได้ โดยต้องใช้สารอินทรีย์ที่มีหมู่ฟังก์ชันตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไปในโมเลกุลเดียวกันเป็นตัวเชื่อม สารอินทรีย์ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ กลูตารัลดีไฮด์ ทำหน้าที่เชื่อมเอนไซม์โดยหมู่อัลดีไฮด์ที่ปลายทั้งสองของกลูตารัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของเอนไซม์เกิดชิฟฟ์ เบส (Schiff bases) ขึ้น ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 การเชื่อมไขว้เอนไซม์โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมไขว้

เนื่องจากการเชื่อมข้ามเอนไซม์นี้เป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดพันธะโคเวเลนต์ จึงเป็นกระบวนการที่ค่อนข้างรุนแรงสำหรับเอนไซม์ ปกติแล้วจะมีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วย อย่างไรก็ตาม

เอนไซม์ที่เตรียมโดยวิธีนี้จะมีเสถียรภาพสูงเช่นเดียวกับการตรึงกับตัวพยุงด้วยพันธะโคเวเลนต์

2.6.3 การตรึงรูปโดยวิธีห่อหุ้ม (entrapment)

การตรึงรูปโดยวิธีนี้เอนไซม์จะไม่เชื่อมติดกับตัวพยุง แต่จะถูกห่อหุ้มอยู่ภายในร่างแหของโพลิเมอร์หรือภายในไมโครแคปซูล โดยโพลิเมอร์หรือผนังของไมโครแคปซูลจะยอมให้สารโมเลกุลเล็ก ๆ เช่น สับสเตรทและผลิตภัณฑ์ผ่านเข้าออกได้ แต่จะกักเอนไซม์ซึ่งมีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่าไว้ภายใน การกรองกั้นเอนไซม์โดยใช้อัลตราเมมเบรน (ultramembrane filter) ในปฏิกรณ์เอนไซม์ก็จัดว่าเป็นการตรึงเอนไซม์โดยวิธีห่อหุ้มเช่นกัน เพราะเอนไซม์ถูกจำกัดให้อยู่ในบริเวณหนึ่ง ๆ โดยเมมเบรนแต่ผลิตภัณฑ์ซึ่งมีโมเลกุลเล็กกว่าสามารถผ่านเมมเบรนออกไปได้ เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีห่อหุ้มนี้จะมีสมบัติเหมือนเอนไซม์อิสระในสารละลาย การห่อหุ้มเป็นวิธีการตรึงรูปที่นุ่มนวลสำหรับเอนไซม์ จึงมีการสูญเสียแอคติวิตีน้อยมาก แต่การห่อหุ้มนี้เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ที่มีสับสเตรทโมเลกุลเล็กพอที่จะผ่านรูพรุนของโพลีเมอร์หรือเยื่อหุ้มของไมโครแคปซูลเข้าไปได้เท่านั้น ในกรณีที่สับสเตรทมีขนาดโมเลกุลใหญ่เอนไซม์กับสับสเตรทจะไม่ได้พบกันเลย

การตรึงรูปโดยวิธีการห่อหุ้มแบ่งเป็น 3 วิธีคือ

2.6.3.1 การห่อหุ้มเอนไซม์ภายในร่างแหของโพลิเมอร์ (lacttice type)

2.6.3.2 การห่อหุ้มเอนไซม์ภายในไมโครแคปซูล (microcapsule type)

2.6.3.3 การห่อหุ้มเอนไซม์ด้วยอัลตราเมมเบรน (ultramembrane)

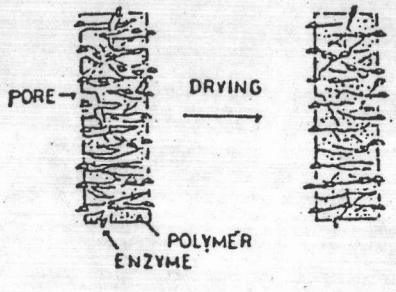
แม้ว่าเซลลูโลสจะเป็นสับสเตรทที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ อย่างไรก็ตาม มีผลงานวิจัยไม่น้อยที่พยายามตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธีการห่อหุ้ม ดังต่อไปนี้

2.6.3.1 การห่อหุ้มเอนไซม์ภายในร่างแหของโพลิเมอร์

ในปี ค.ศ. 1983 Kumakura และ Kaetsu (21) ได้ทดลองเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปโดยการห่อหุ้มด้วยโพลีเอธิลีนไกลคอลไดอะครีเลท (poly (ethylene glycol diacrylate) ซึ่งมีลักษณะเป็นโพลีเมอร์เมตริกซ์ที่มีรูพรุน (porous polymer matrix) โดยการฉายรังสีแกมมา ที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้เกิดปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชัน (radiation polymerization) ของโมโนเมอร์ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ (bifunctional

monomer) จากการศึกษาพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของโมโนเมอร์ จำนวนหน่วยของออกซีเอธิลีน (oxyethylene units) ซึ่งมีผลต่ออัตราการเกาะเกี่ยวของน้ำ (degree of hydration) บนโพลีเมอร์ และมีผลต่อขนาดของรูพรุนในโพลีเมอร์ด้วย โดยเอนไซม์ตรึงรูปจะมีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นตั้งต้นของโมโนเมอร์ไม่สูงเกินไปนัก และโมโนเมอร์ที่มีจำนวนหน่วยของออกซีเอธิลีนสูงจะทำให้โพลีเมอร์ที่ได้มีระดับการเกาะเกี่ยวกับน้ำสูง โพลีเมอร์มีการพองตัวมากทำให้เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้แสดงแอคติวิตีที่สูงด้วย

ต่อมาในปี ค.ศ. 1984 ทั้งสองพบว่า (22) การทำให้เกิดปฏิกิริยาโพลีเมไรเซชันโดยการฉายรังสีที่อุณหภูมิต่ำนั้น ถ้าเพิ่มขั้นตอนการทำแห้ง (drying) จะช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป ขั้นตอนแรกคือการเตรียมโพลีเมอร์เมตริกซ์ที่มีรูพรุนโดยการลดอุณหภูมิของสารละลายของโมโนเมอร์ซึ่งเป็นไฮโดรฟิลลิก โมโนเมอร์ (hydrophillic monomer) ในน้ำให้เป็น -78 องศาเซลเซียส แล้วฉายรังสีแกมมาขนาด 1.0 เมกะแร็ด (Mrad) จากนั้นนำโพลีเมอร์เมตริกที่ได้มาตัดเป็นชิ้นบาง ๆ แล้วใส่ชิ้นโพลีเมอร์ลงในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ที่ 25 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำชิ้นโพลีเมอร์ที่ได้มาทำแห้งในสภาวะสูญญากาศ (vacuum drying) ที่ 25 องศาเซลเซียส การฉายรังสีลงในสารละลายโมโนเมอร์ซึ่งผ่านการแช่แข็งแล้วนั้น จะทำให้เกิดโพลีเมอร์ และขณะเดียวกันรังสีทำให้น้ำแข็งที่แทรกอยู่ในสารละลายดังกล่าวละลายด้วย ดังนั้นร่างแหโพลีเมอร์ที่ได้จึงมีรูพรุนสำหรับกักเก็บเอนไซม์ได้ การทำแห้งช่วยทำให้ร่างแหโพลีเมอร์เกิดการหดตัว (Shrinking) และเปลี่ยนแปลงลักษณะจากเดิมเป็นเจล (gel) ยืดหยุ่นคล้ายฟองน้ำกลายเป็นร่างแหโพลีเมอร์ที่แข็งมีผลให้โพลีเมอร์ที่ได้สามารถกักเก็บเอนไซม์เซลลูเลสไว้ภายในได้แน่นขึ้น ลักษณะที่กล่าวนี้แสดงให้เห็นในรูปที่ 9



รูปที่ 9 ลักษณะการห่อหุ้มเอนไซม์เซลลูเลสโดยร่างแหโพลีเมอร์ก่อนและหลังการทำแห้ง

จากรูปที่ 9 จะเห็นว่าร่างแหโพลีเมอร์มีรูพรุน ทำให้สับสเตรทและผลิตภัณฑ์สามารถแพร่ผ่านได้ดี จากการศึกษาพบว่าขนาดของรูพรุนจะขึ้นกับความเข้มข้นของโมโนเมอร์เริ่มต้น โดยปริมาณและขนาดของรูจะลดลงเมื่อสารละลายโมโนเมอร์มีความเข้มข้นเริ่มต้นเพิ่มขึ้น (ปริมาณน้ำลดลง) และจะมีผลให้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกห่อหุ้มในรูพรุนลดลงด้วย นั่นคือแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสในร่างแหโพลีเมอร์ที่เตรียมจากสารละลายโมโนเมอร์ที่เข้มข้นน้อยกว่าจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่า ซึ่งสามารถอธิบายได้โดยอาศัยการเกิดน้ำแข็งของสารละลายโมโนเมอร์นั่นเอง อัตราการลดอุณหภูมิไปสู่ -78 องศาเซลเซียส มีผลต่อขนาดรูพรุนของโพลิเมอร์ด้วย ซึ่งอธิบายโดยใช้หลักการเกิดผลึกน้ำแข็งเช่นกันคือ ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างรวดเร็วจะทำให้ได้ก้อนน้ำแข็งขนาดเล็กมาก เป็นผลให้โพลิเมอร์ที่ได้มีขนาดของรูพรุนเล็กด้วย และส่งผลไปถึงแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้แล้วอัตราการเกาะเกี่ยวกับน้ำของร่างแหโพลีเมอร์ มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปด้วย กล่าวคือโพลิเมอร์ที่มีอัตราการเกาะเกี่ยวกับน้ำสูงก็จะทำให้โพลิเมอร์นั้นมีการพองตัว ทำให้รูพรุนมีขนาดใหญ่และส่งผลให้เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีแอคติวิตีสูงด้วย

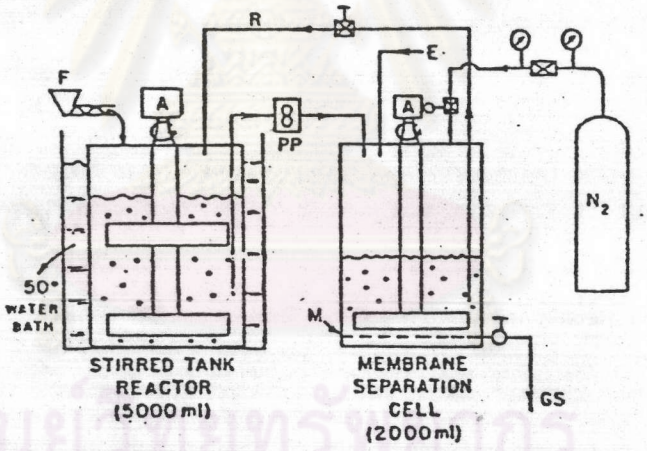
2.6.3.2 การห่อหุ้มเอนไซม์ภายในไมโครแคปซูล

Kumakura และ Kaetsu (23) ได้ทดลองตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* โดยการห่อหุ้มไว้ภายในไมโครแคปซูลซึ่งเตรียมโดยปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชันของ 2-ไฮดรอกซีเอธิล เมธาคริเลท (2-Hydroxyethyl methacrylate) และเตตระเอธิลีนไกลคอลไดอะคริเลท (tetraethyleneglycol diacrylate) โดยใช้รังสีแกมมาขนาด 1.0 Mrad ที่อุณหภูมิ -78 องศาเซลเซียส โดยมีการบดเอนไซม์ที่ผ่านการแช่แข็งแล้วให้แตกเป็นอนุภาคเล็ก ๆ ก่อนการทำปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชัน จากการทดลองพบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จะขึ้นกับความหนาของเมมเบรนคือ ถ้าเมมเบรนบางเกินไปแอคติวิตีจะต่ำเนื่องจากไมโครแคปซูลแตกในขณะที่นำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ ถ้าเมมเบรนมีความหนาเกินไปจะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปลดลงเช่นกัน เนื่องจากเมมเบรนเกิดแรงต้านทานการแพร่ผ่านของสับสเตรทมากขึ้น ความหนาของเมมเบรนที่พอเหมาะคือ 50-200 ไมครอน นอกจากนี้ขนาดของไมโครแคปซูลก็มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ด้วย เมื่อใช้เซลโลไบโอสเป็นสับสเตรทในเครื่องปฏิกรณ์คอลัมน์ ในกระบวนการย่อยสลายแบบต่อเนื่อง พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มขึ้นในตอนแรกและคงที่เมื่อ

การย่อยสลายเพิ่มขึ้น คิดเป็นร้อยละของการเปลี่ยน (% conversion) เท่ากับ 95 แต่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ได้ในการย่อยสลายติดต่อกันนาน 20 วัน พบว่าเมื่อใช้สับสเตรทเป็นสารละลายเซลโลไบโอสเข้มข้นร้อยละ 1 จะให้น้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นไม่เกินร้อยละ 1 เท่านั้น

2.6.3.3 การห่อหุ้มเอนไซม์โดยใช้อัลตราเมมเบรน

Ghose และ Kostick (24) ได้ทดลองใช้เครื่องปฏิกรณ์เมมเบรน (membrane reactor) ซึ่งประกอบด้วยเมมเบรนที่มีความสามารถในการกรองตามมวลโมเลกุล (molecular weight cut off) ต่าง ๆ กัน เช่น Amicon (PM-30) และ Abcor (HFA 300) ซึ่งสามารถกรองสารที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 30,000 ไว้ได้ โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์เมมเบรนนี้ร่วมกับเครื่องปฏิกรณ์ถังกวน (stirred tank reactor) ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 ระบบที่ใช้ย่อยเซลลูโลสโดยรวมปฏิกรณ์ถังกวนเข้ากับปฏิกรณ์เมมเบรน

A = เครื่องกวน (agitator)

PP = เครื่องสูบแบบเพอริสตอลติก (peristaltic pump)

GS = สารละลายน้ำตาลกลูโคสปราศจากเซลลูเลสและสับสเตรท

F = เซลลูโลสบดละเอียด

E = สารละลายเซลลูเลสในน้ำหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

R = ของผสมที่ย่อยแล้วส่งกลับสู่เครื่องปฏิกรณ์ถังกวนหลังการแยกกลูโคสออกแล้ว

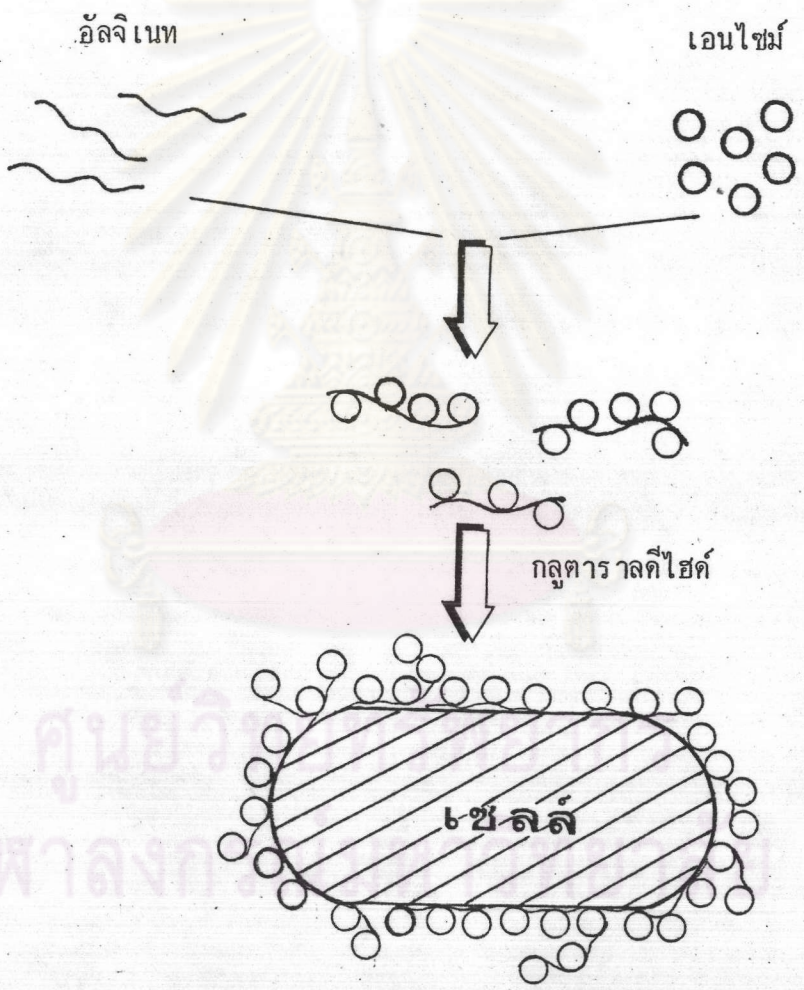
M = เมมเบรน

ในการทดลองนี้ใช้เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* (QM 9123) ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งถูกทำให้เข้มข้นขึ้น 8 เท่า โดยใช้อัลตราเมมเบรนสับสเตรทที่ใช้คือ ซอลกา ฟลอก (Solka Floc) บดละเอียดขนาดอนุภาคเล็กกว่า 25 ไมครอน เข้มข้นร้อยละ 30 โดยปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเริ่มที่เครื่องปฏิกรณ์ถังกวนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หลังจากการย่อยสลายดำเนินไป 48 ชั่วโมง ของเหลวจะถูกถ่ายไปสู่เครื่องปฏิกรณ์เมมเบรนขนาด 2000 มิลลิลิตร เกิดการกรองน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักออกภายใต้ความดัน 40 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้เวลาในการกรอง 5 ชั่วโมง ที่ 27 องศาเซลเซียส ของเหลวที่เหลือจะถูกถ่ายเทกลับไปสู่เครื่องปฏิกรณ์ถังกวนพร้อมกับมีการเติมเซลลูโลสใหม่เพิ่มอีก 95 กรัม จากนั้นการย่อยสลายและการกรองดำเนินต่อไปเช่นเดิม จากการย่อยสลายติดต่อกัน 10 วัน ผลได้ (yield) น้ำตาลกลูโคสเท่ากับร้อยละ 54.3 คิดเป็นร้อยละของการเปลี่ยนทั้งหมด (overall conversion) จากเซลลูโลสเป็นกลูโคสเท่ากับร้อยละ 71.14 โดยการย่อยในถังกวนจะทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 14 ภายในเวลาน้อยกว่า 50 ชั่วโมง และจากการใช้เทคนิคทางโครมาโตรกราฟีพบว่า ร้อยละ 70 ของผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ผลิตภัณฑ์ที่เหลือส่วนใหญ่เป็นเซลโลไบโอสและมีไซโลไบโอส (xylobiose) เพียงเล็กน้อย โดยที่ไม่พบว่ามีเอนไซม์เซลลูเลสและเซลลูโลสปะปนออกมากับผลิตภัณฑ์เลย

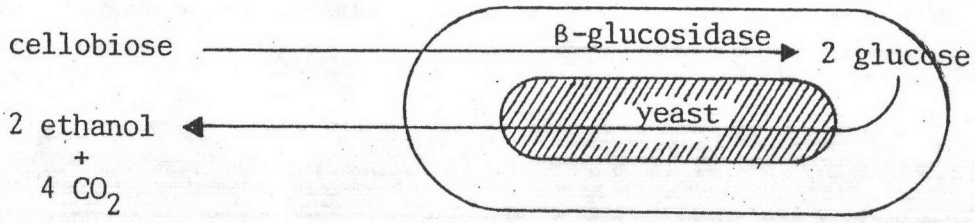
2.7 การตรึงรูปร่วม (coimmobilization)

การตรึงรูปร่วมเป็นการตรึงรูปที่รวมเอนไซม์หลายชนิดเข้าด้วยกัน หรือรวมเอนไซม์เข้ากับเซลล์จุลินทรีย์ โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะรวมคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biocatalytical properties) ของเอนไซม์และเซลล์จุลินทรีย์เข้าด้วยกัน เพื่อให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการจากปฏิกิริยาที่เกิดอย่างสมบูรณ์ในหน่วยเดียวกัน เช่น ผลการวิจัยของ Kamoto และคณะ (25) ในการตรึงรูปร่วมของเอนไซม์ยูริเคส (uricase, EC 1.7.3.3) เอนไซม์อัลแลนทอยเนส (allantoinase, EC 3.5.3.4) เอนไซม์อัลแลนทอยเคส (allantoicase, EC 3.5.2.5) และเอนไซม์คาทาเลส (catalase) โดยตรึงรูปร่วมบนไฟบรินเมมเบรนเชิงเดี่ยว (single fibrin membrane) ทำให้ได้เอนไซม์เชิงซ้อนตรึงรูป (immobilized multienzyme complex) ที่สามารถทำลายกรดยูริค (uric acid) ให้ยูเรีย (urea) และกรดไกลออกซิลิก (glyoxylic acid)

เทคนิคการตรึงรูปร่วมนั้น ปัจจุบันเป็นที่สนใจในระดับการศึกษาขั้นมูลฐาน (fundamental studies) หรือการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการ (laboratory scale) อย่างไรก็ตามระบบการตรึงรูปร่วมที่สามารถใช้ประโยชน์ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมได้แก่ การตรึงรูปร่วมระหว่าง *Zymomonas mobilis* และเอนไซม์ไกลโคสิเดส (glycosidases) (26) ดังรูปที่ 11 การตรึงรูปร่วมนี้ทำให้สามารถใช้เซลโลไบโอสเป็นสับสเตรทในการผลิตเอธานอลได้ ดังรูปที่ 12



รูปที่ 11 การตรึงรูปร่วมของเอนไซม์และเซลล์จุลินทรีย์



รูปที่ 12 การผลิตเอธานอลจากเซลโลไบโอสโดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปร่วมกับเอนไซม์บีตา-กลูโคสิเดส

2.8 เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด (fluidized bed reactor)

2.8.1 นิยาม

ฟลูอิไดเซชันคือ กระบวนการที่มีของแข็งลักษณะเป็นเม็ดหรือชิ้นสัมผัสกับของไหลที่ผ่านเข้ามาทางด้านล่างของตะแกรงรองรับภายในหอทดลอง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นทรงกระบอก โดยที่เมื่อของไหลมีความเร็วพอเหมาะค่าหนึ่งจะทำให้เม็ดของแข็งเกิดการขยับตัวและลอยตัวขึ้นอย่างอิสระไม่เกาะติดกัน . ของแข็งที่อยู่ในสภาวะเช่นนี้จะมีคุณสมบัติคล้ายของไหล กล่าวคือมีการไหลหมุนเวียนภายในเบดหรือภายในหอทดลอง หรือระหว่างเบดต่อเบดก็ได้ เราจึงเรียกของแข็งในสภาวะนี้ว่า ฟลูอิไดเซชัน (27)

2.8.2 ประเภทของฟลูอิไดเซชัน

ฟลูอิไดเซชันแบ่งเป็น 2 ประเภท ตามสถานะของสิ่งทดลองที่ใช้ภายในหอทดลองดังนี้

2.8.2.1 ฟลูอิไดเซชันสองสถานะ (two-phase fluidization) ภายในหอทดลองหรือเบดจะประกอบด้วยของสองสถานะคือ ของแข็งกับของไหล โดยที่ของไหลนี้อาจเป็นกาซหรือของเหลวก็ได้ ดังนั้นฟลูอิไดเซชั่นสองสถานะจึงแบ่งย่อยออกเป็น

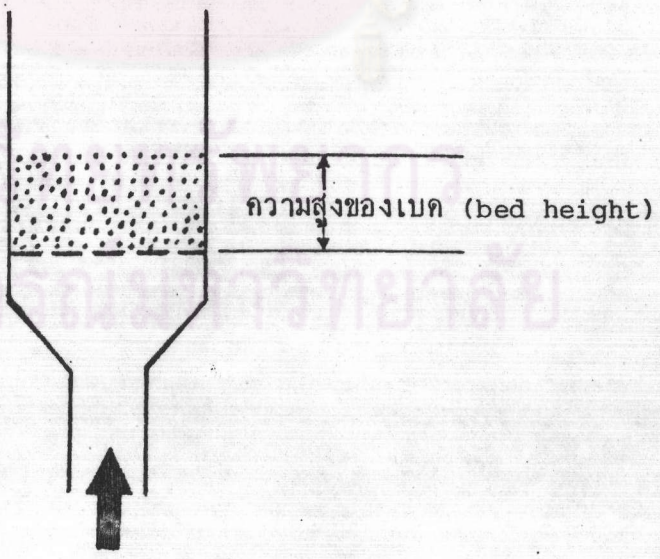
2.8.2.1.1 กาซฟลูอิไดเซชัน (gas fluidization)

2.8.2.1.2 ฟลูอิไดเซชันของเหลว (liquid fluidization)

2.8.2.2 ฟลูอิไดเซชันสามสถานะ (three-phase fluidization) ภายในหอทดลองหรือเบดจะประกอบด้วยของสามสถานะอยู่พร้อมกันคือ ของแข็ง ของเหลว และกาซ เป็นกระบวนการที่พัฒนาขึ้นจากฟลูอิไดเซชันสองสถานะ หอทดลองที่เป็นฟอง (bubble column) และหอทดลองที่บรรจุด้วยของแข็ง (packed bed column) จึงมีกลไกที่ซับซ้อนมากขึ้น

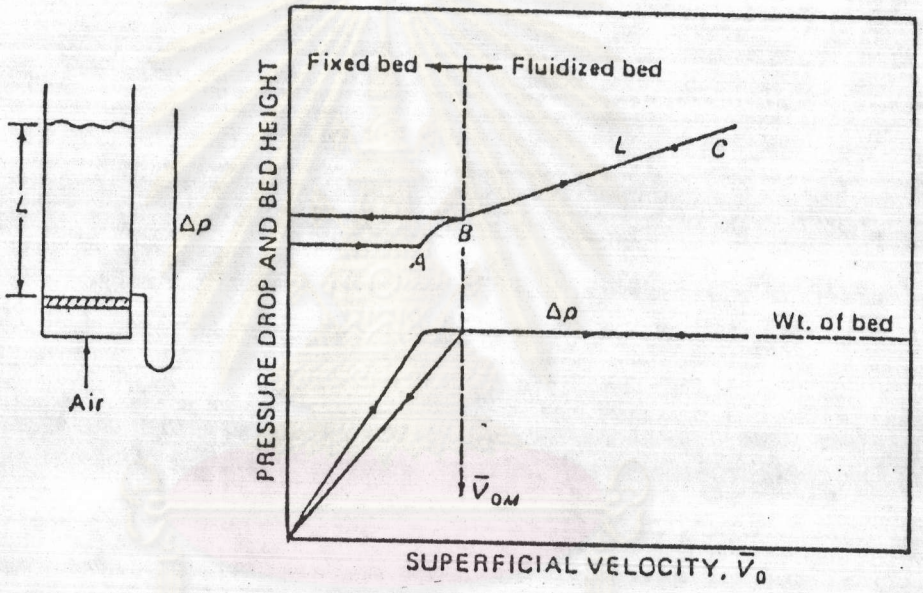
2.8.3 ลักษณะของฟลูอิไดซ์เบด

เบด หมายถึง อาณาเขตในหอทดลองที่มีเม็ดของแข็งบรรจุอยู่ ทั้งในขณะที่เม็ดของแข็งอยู่นิ่ง หรือกำลังเคลื่อนไหวภายในหอทดลอง โดยความสูงของเบดจะนับตั้งแต่ตะแกรงรองรับหรือตัวกระจายของไหล (distributer) จนถึงระดับสูงสุดหรือผิวหน้าของเม็ดของแข็งที่อยู่ในหอทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 ระดับของเบดภายในหอทดลอง

เมื่อปล่อยให้ของไหลเข้าทางด้านล่างของหอทดลอง ขณะที่ของไหลมีความเร็วต่ำ เม็ดของแข็งไม่มีการขยับตัวเบดลักษณะนี้เรียกว่า เบดนิ่ง (fixed bed) ในช่วงนี้ความดันตก (pressure drop) จะเพิ่มขึ้นพร้อม ๆ กับการเพิ่มความเร็วของของไหลทีละน้อย การที่เม็ดของแข็งไม่มีการเคลื่อนที่นี้ทำให้ความสูงของเบดยังมีค่าคงเดิม และถ้าเม็ดของแข็งมีขนาดค่อนข้างเล็กจะทำให้ของไหลที่ไหลผ่านช่องว่างระหว่างอนุภาคมีลักษณะเป็นแบบลามินาร์ (laminar flow) เมื่อเพิ่มความเร็วของของไหลไปจนถึงความเร็วค่าหนึ่ง ซึ่งทำให้ความดันตกมีค่าเท่ากับน้ำหนักของเบดแล้ว การเพิ่มความเร็วของของไหลอีกเพียงเล็กน้อยหลังจากจุดนี้จะทำให้เม็ดของแข็งเริ่มขยับตัว เบดในลักษณะนี้แทนด้วยจุด A ในรูปที่ 14 (28)



รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันตกและความสูงของเบด กับค่าความเร็วของของไหลในหอทดลองฟลูอิไดซ์เบด

ถ้าอัตราการเพิ่มความเร็วของของเหลวต่ำมากจะทำให้การขยายตัวของเบดเกิดขึ้นน้อยมากจนทำให้เม็ดของแข็งที่เกิดการขยับตัวนั้นยังมีการเกาะกลุ่มกันอยู่ แต่ความดันตกยังคงมีค่าคงที่ เมื่อมีการเพิ่มความเร็วของของไหลขึ้นอีกจะทำให้เม็ดของแข็งหลุดออกจากกันลอยตัวอย่างอิสระไปทั่วทั้งเบด ในจุด B นี้จะเป็นจุดที่เริ่มเกิดฟลูอิไดเซชันที่แท้จริง หลังจากจุดนี้แล้วความเร็วของของไหลที่เพิ่มขึ้นจะมีผลให้เบดขยายตัว ทำให้ความสูงของเบดเพิ่มขึ้นในขณะที่ความดันตกยังคงมีค่าคงที่ เมื่อลดความเร็วของของไหลลงความดันตกยังคงมีค่าคงที่อยู่ และความสูงของเบดมีค่าลดลงตามเส้น BC จากรูปที่ 14 จะเห็นได้ว่าเมื่อลดความเร็วของของไหลลงแล้ว

สุดท้ายเบดจะมีความสูงมากกว่าความสูงของเบดนิ่งในครั้งแรก เนื่องจากเม็ดของแข็งที่ผ่านสภาวะฟลูอิไดเซชัน เมื่อเกิดการตกลงอย่างช้า ๆ จะมีการเรียงตัวที่หลวมกว่าการเรียงตัวของเม็ดของแข็งในตอนต้น ดังนั้นค่าความดันตกในครั้งหลังนี้จะต่ำกว่าค่าความดันตกในเบดนิ่งครั้งแรก ค่าความเร็วของของไหลที่จุด B จะเป็นค่าความเร็วต่ำสุดของฟลูอิไดเซชัน (minimum fluidization velocity, U_{mf}) ในการวัดค่าความเร็วต่ำสุดของฟลูอิไดเซชันนี้จะต้องทำให้เบดเกิดฟลูอิไดเซชันอย่างรุนแรงเสียก่อน จากนั้นจึงปล่อยให้เกิดการตกของเม็ดของแข็งโดยการหยุดของไหลจากนั้นจึงค่อย ๆ เพิ่มความเร็วของของไหลขึ้นทีละน้อยอีกครั้งจนกระทั่งเบดเริ่มขยายตัว ความสัมพันธ์ของความดันตกของเบดและลักษณะของเบด กับค่าความเร็วของของไหลจะเป็นในลักษณะนี้เสมอ คือในช่วงที่เป็นฟลูอิไดซ์เบดจะมีค่าของความดันตกคงที่ เพราะค่าความดันตกในขณะนั้น ๆ จะมีค่าใกล้เคียงกับอัตราส่วนของน้ำหนักของเม็ดของแข็งที่บรรจุอยู่ต่อพื้นที่ภาคตัดขวางของหอทดลอง โดยแม้ว่าวัสดุที่ใช้เป็นเบดจะมีรูปร่างแตกต่างกันออกไปอย่างไร ความสัมพันธ์ดังกล่าวก็ยังคงเป็นเช่นนี้เสมอ

2.8.4 ข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของฟลูอิไดเซชัน (27)

2.8.4.1 ข้อได้เปรียบของฟลูอิไดเซชัน

2.8.4.1.1 เกิดการผสมกันอย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอ เนื่องจากเม็ดของแข็งมีการเคลื่อนที่ตลอดเวลา ดังนั้นอุณหภูมิภายในเบดจะคงที่และสม่ำเสมอทั่วทั้งเบด ซึ่งต่างจากเบดนิ่งหรือเบดบรรจุที่อุณหภูมิจะไม่เท่ากันตลอดทั้งเบด

2.8.4.1.2 เกิดแรงเสียดทานต่อการไหลของของไหลเกิดขึ้นน้อยกว่าเบดบรรจุมาก

2.8.4.1.3 คุณสมบัติที่คล้ายของไหลจึงสามารถทำงานแบบต่อเนื่องได้ และการควบคุมทำได้ง่าย

2.8.4.1.4 พื้นที่สัมผัสระหว่างเม็ดของแข็งกับของไหลจะมีมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเบดนิ่งที่ใช้จำนวนเม็ดของแข็งเท่ากัน

2.8.4.1.5 การทำงานด้วยฟลูอิไดซ์เบดจะเสียพลังงานน้อยกว่า เพราะเกิดแรงเสียดทานและความดันตกของเบดน้อยกว่าในเบดบรรจุมาก

2.8.4.2 ข้อเสียเปรียบของฟลูอิไดเซชัน

2.8.4.2.1 เวลาที่ของไหลสัมผัสกับเม็ดของแข็งสั้นมาก จึงต้องใช้เบดสูงหรือเบดหลายชั้น เปลืองเงินลงทุนมาก

2.8.4.2.2 การทำงานมีข้อจำกัด คือถ้าให้ความเร็วของของไหลสูงเกินไปเม็ดของแข็งก็จะออกไปจากเบดพร้อมกับของไหล

2.8.5 เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

Karube และคณะ (29) ได้ทดลองตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* โดยการห่อหุ้มในร่างแหคอลลาเจน ไฟบริล (collagen fibril matrix) ซึ่งเคลือบอยู่บนแก้วพรุนขนาด 60-80 เมช โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมพันธะ แล้วทดลองใช้เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปแบบเบดบรรจุเปรียบเทียบกับเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด โดยใช้เอไวเซล เอสเอฟ (Avicel SF) เป็นสับสเตรท ในกรณีของเครื่องปฏิกรณ์เบดบรรจุซึ่งสับสเตรทไหลเข้าทางด้านบนของเครื่องปฏิกรณ์กรณีนี้พบว่า ค่าความดันตกจะเพิ่มขึ้นตามค่าความเร็วของสับสเตรท และเนื่องจากมีการสะสมของเซลลูเลสที่ส่วนบนของคอลัมน์จึงทำให้คอลัมน์มีค่าความดันตกเพิ่มขึ้นด้วย แต่ในทางตรงข้ามการใช้เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบดความดันตกจะมีค่าต่ำมากและคงที่ โดยพบว่าค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันเท่ากับ 0.5 เซนติเมตรต่อวินาที และพบว่าอัตราการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบดมีค่าสูงกว่าการย่อยสลายโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์เบดบรรจุ ผู้ทดลองได้ให้ความเห็นว่า แม้ว่าเครื่องปฏิกรณ์เบดบรรจุเป็นอุปกรณ์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับเอนไซม์ตรึงรูป แต่เครื่องปฏิกรณ์ชนิดนี้ไม่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาที่ใช้สับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ เช่นเซลลูโลส

2.9 แอล-ไลซีน (L-lysine)

2.9.1 ความสำคัญและความเป็นมาของแอล-ไลซีน

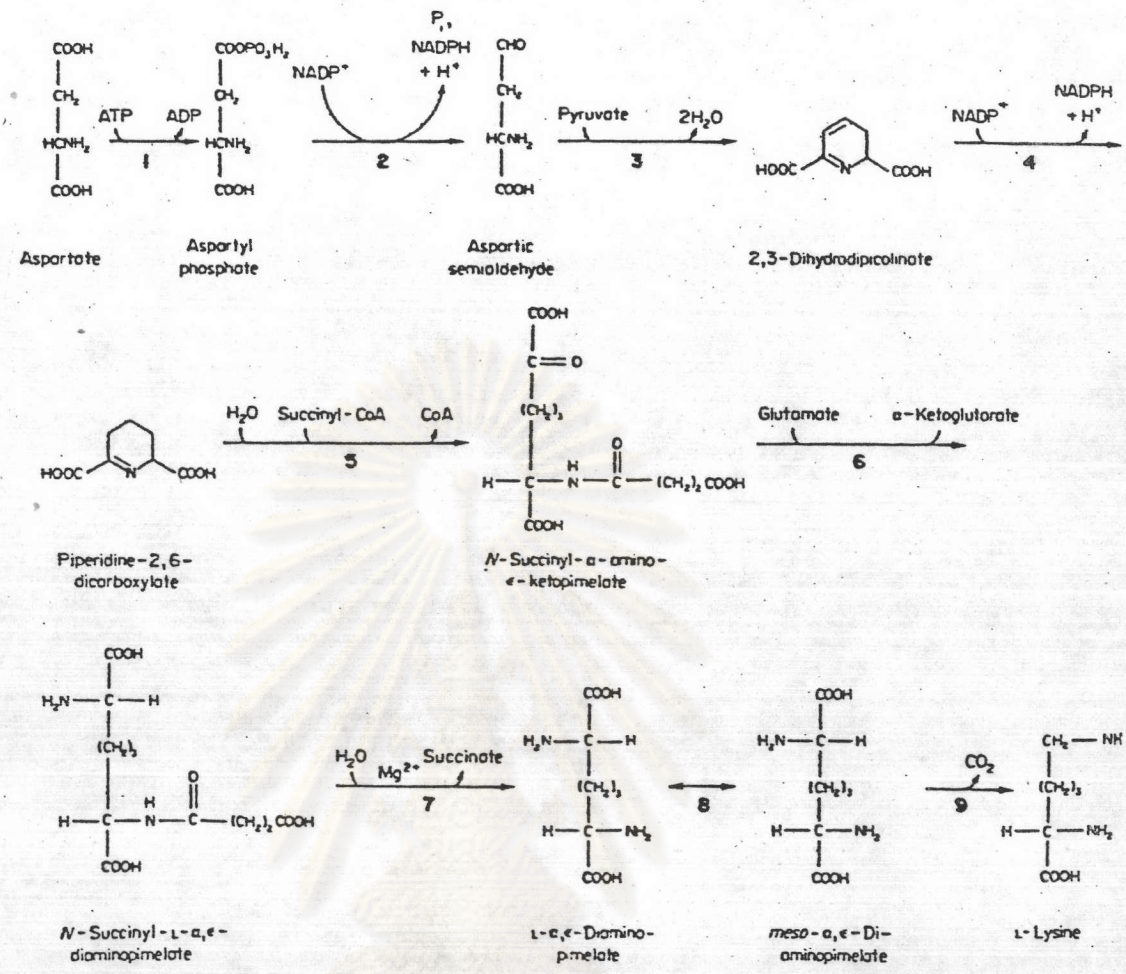
ไลซีน เมไธโอนีน ธรีโอนีน ทริปโตเฟน เป็นตัวอย่างของกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acids) คนและสัตว์จะได้รับกรดอะมิโนประเภทนี้จากอาหารเท่านั้น โดยร่างกายไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนเหล่านี้ขึ้นเองได้ โดยถ้าร่างกายของคนและสัตว์ได้รับกรดอะมิโนจำเป็นไม่เพียงพอจะทำให้ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนจากอาหารโดยร่างกายลดลง (30)

เนื่องจากแอล-ไลซีนเป็นกรดอะมิโนจำกัด (Limiting amino acid) ในอาหารที่มาจากธัญญพืช (cereal-based diets) ปัญหาการขาดแคลนแอล-ไลซีนในธัญญพืชจึงทำให้เกิดการค้นคว้าวิจัยเพื่อผลิตแอล-ไลซีนทั้งโดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีและวิธีการทางจุลชีววิทยา การผลิตแอล-ไลซีนในปริมาณมาก (large scale production) เริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1958 โดยกระบวนการหมักด้วยออกโซโทรฟิค มิวแทนท์ (auxotrophic mutant ของ *Corynebacterium glutamicum* โดยบริษัท Kyowa Hakko Kogyo ต่อมาบริษัท Ajinomoto ได้ทำการผลิตแอล-ไลซีนจากกระบวนการที่ใช้สายพันธุ์กลายควบคุม (regulatory mutant) ของ *Brevibacterium flavum* กระบวนการผลิตทั้งสองนี้มีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นโดยตลอดและเปลี่ยนเป็นการผลิตระดับอุตสาหกรรม ซึ่งสามารถผลิตแอล-ไลซีนได้ถึง 40,000 ตันต่อปี และต่อมาไม่นานนี้บริษัท Toray ได้พัฒนากระบวนการผลิตแอล-ไลซีนขึ้นโดยการสังเคราะห์อัลฟา-อะมิโนคาโปรแลคแทม (α-aminocaprolactam) จากไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) จากนั้นเปลี่ยนให้เป็นแอล-ไลซีนโดยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์แอล-อะมิโนคาโปรแลคแทม ไฮโดรเลส (L-aminocaprolactam hydrolase) และอะมิโนคาโปรแลคแทม เรซิเมส (aminocaprolactam racemase) (31)

2.9.2 วิถีการสังเคราะห์ไลซีนทางชีวภาพ (31) (Biosynthetic pathway of L-lysine)

การสังเคราะห์ไลซีนทางชีวภาพจัดอยู่ในกลุ่มของแอสพาร์เทท (aspartate family) ยกเว้นในเห็ดรา และการควบคุมการสังเคราะห์ไลซีนนั้นสัมพันธ์กับการควบคุมการสังเคราะห์กรดอะมิโนอื่น ๆ ในกลุ่มแอสพาร์เทท กลุ่มแอสพาร์เททประกอบด้วยแอสพาร์เท แอสพาราจีน เมไธโอนีน ธรีโอนีน ไลซีน และไอโซลิวซีน วิถีการสังเคราะห์ไลซีนในแบคทีเรียแสดงในรูปที่ 15

I17840120



รูปที่ 15 วิถีของการสังเคราะห์ไลซีนในแบคทีเรีย (วิถีไดอะมิโนไพมิลิค แอซิด) โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ

(1) บีตา-แอสพาร์โทไคเนส (β-aspartokinase)

(2) แอสพาร์ติค บีตา-เซไมอัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (aspartic β-semialdehyde dehydrogenase)

(3) ไดไฮโดรไดพิโคลิเนท ซินเธเทส (dihydrodipicolinate synthetase)

(4) ไดไฮโดรไดพิโคลิเนท รีดักเทส (dihydrodipicolinate reductase)

(5) เอน-ซักซินิล-เอปซิลอน-คีโต-แอล-อัลฟา-อะมิโนไพมิลิค แอซิด ซินเธเทส (N-succinyl-ε-keto-L-α-aminopimelic acid synthetase)

(6) เอน-ซักซินิลไดอะมิโนไพมิเลท ทรานสอะมิเนส (N-succinyldiaminopimelate transaminase)

(7) เอน-ซัคซินิลไดอะมิโนไพมิเลท ดีเอซีเลส (N-succinyldiamino-pimelate deacylase)

(8) ไดอะมิโนไพมิเลท อิพิเมอเรส (diaminopimelate epimerase)

(9) ไดอะมิโนไพมิเลท ดีคาร์บอกซีเลส (diaminopimelate decarboxylase)

การสังเคราะห์ไลซีนในแบคทีเรียนั้น ใช้วิถีไดอะมิโนไพมิลิค แอซิด แต่ในพวกเห็ดราการสังเคราะห์ไลซีนจะใช้วิถีอัลฟา-อะมิโนเอไดพิค แอซิด (α-aminoadipic acid) ในรูปที่ 15 การสังเคราะห์ไลซีนนี้เป็นสาขาหนึ่งของการสังเคราะห์กรดอะมิโนในกลุ่มแอสพาร์เทท ปฏิกิริยาที่ 1 สำหรับ *E. coli* การสร้างบีตา-แอสพาร์ทิล ฟอสเฟต (β-aspartyl phosphate) มีเอนไซม์แอสพาร์โทไคเนส 3 ชนิด ที่แตกต่างกันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์แต่ละชนิดนี้จะช่วยเร่งปฏิกิริยาการสร้าง ธรีโอนีน (และไอโซลิวซีน) เมไธโอนีน และไลซีน ตามลำดับ เอนไซม์แอสพาร์โทไคเนสที่มีแอคติวิตีสูงสุด (predominant aspartokinase) จะเป็นเอนไซม์ชนิดใดใน 3 ชนิดนั้น ขึ้นกับสายเชื้อ (strain) ของจุลินทรีย์ โดยในจุลินทรีย์สายพันธุ์หนึ่ง ๆ นั้น ถ้ามีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์แอสพาร์โทไคเนสหนึ่งหรือสองชนิดในสามชนิดที่ควรจะมีนั้นจะไม่ก่อให้เกิดออกโซโทรฟี (auxotrophy) เช่น การขาดเอนไซม์นี้หนึ่งชนิดจะชดเชยโดยมีการลดผลการระงับ (derepression) ของไอโซไซม์ (isozymes) หนึ่งหรือสองชนิดที่เหลือ ด้วยเหตุผลนี้แสดงว่าการสังเคราะห์บีตา-แอสพาร์ทิล ฟอสเฟตโดยการเร่งปฏิกิริยาของไอโซไซม์ทั้งสามนี้เป็นไปในลักษณะที่ก่อให้เกิดบีตา-แอสพาร์ทิล ฟอสเฟตสะสมในปริมาณมาก ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นได้ทั้งหมด

เอนไซม์แอสพาร์โทไคเนส I มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์โฮโมซีรีน ดีไฮโดรจีเนส I (homoserine dehydrogenase I) โดยทำงานร่วมกันเป็นเอนไซม์สองฟังก์ชัน (bifunctional enzyme) โดยเอนไซม์ทั้งสองจะถูกยับยั้งแอคติวิตีโดยธรีโอนีน แต่มีลักษณะต่างกันคือ การยับยั้งแอคติวิตีของแอสพาร์โทไคเนสนั้นเป็นการแข่งขัน (competitive) ของสับสเตรททั้งสองในขณะที่การยับยั้งในโฮโมซีรีน ดีไฮโดรจีเนสไม่เป็นเช่นนั้น ใน *E. coli* K12 และ *Salmonella typhimurium* (โดยสมมติฐาน) เอนไซม์แอสพาร์โทไคเนส II ก็มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์โฮโมซีรีน ดีไฮโดรจีเนสในโปรตีนสองฟังก์ชัน (bifunctional protein) เช่นกัน เอนไซม์แอสพาร์โทไคเนส III ในเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) ไม่มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์อื่นใดเลย ปฏิกิริยาที่ 1 นี้นอกจากจะควบคุม

โดยระบบเอนไซม์หลายชนิด (multiple enzymes systems) ดังกล่าวแล้ว ใน *Bacillus polymyxa* *Rhodopseudomonas capsulata* และ *pseudomonads* จะมีเอนไซม์แอสพาโทไคเนสเดี่ยว ๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมีการควบคุม (regulation) ด้วยการยับยั้งร่วมกันหรือเสริมกันของไลซีนและธรีโอนีนในกรณีนี้จะพบว่าเอนไซม์โฮโมซีรีน ดีไฮโดรจีเนสจะอยู่บนโปรตีนอีกส่วนหนึ่งซึ่งแยกออกไป โดยทั่วไปเอนไซม์โฮโมซีรีน ดีไฮโดรจีเนส จะถูกยับยั้งโดยธรีโอนีน ดังนั้นในจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จึงมีเอนไซม์โฮโมซีรีน ดีไฮโดรจีเนส 2 ชนิด โดยเอนไซม์ที่เหลือในวิถีคือ เอนไซม์บีตา-แอสพาร์ติก เซไมอัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของบีตา-แอสพาร์ทิล ฟอสเฟต (ปฏิกิริยาที่ 2) การรวมกัน (condensation) ของแอสพาร์ติก เซไมอัลดีไฮด์กับไพรูเวทในปฏิกิริยาที่ 3 ทำให้ได้สารประกอบซึ่งสามารถเกิดเป็นวง (cyclize) ได้เอง และจากนั้นถูกรีดิวซ์ในปฏิกิริยาที่มี NADPH (NADPH-linked reaction) ในปฏิกิริยาที่ 4 ในปฏิกิริยาที่ 5 นั้นวงแหวน (ring) ถูกเปิดออกแล้วมีการเติมซัคซินิล (succinylation) ลงไปในสายเปิดดังกล่าวใน *E. coli* หรือเติมกลุ่มอะเซทิล (acetylation) ลงในสายเปิดในพวกแบซิลไล (bacilli) หลังจากเกิดปฏิกิริยาทรานส-อะมิเนชั่น (transamination) ในปฏิกิริยาที่ 6 หมู่เอซิล (acyl group) จะถูกดึงออกทำให้ได้ แอล, แอล-ไดอะมิโนไพมิเลท (L,L-diaminopimelate) ในปฏิกิริยาที่ 7 ซึ่งอาจจะได้ในรูป (form) นี้ หรือได้ในรูปมีโซ (meso form) หรือได้ทั้งสองรูปก็ตาม ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ สารประกอบนี้จะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้รูปมีโซยังเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส (decarboxylase) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายของการสังเคราะห์ไลซีน (ปฏิกิริยาที่ 9)

2.9.3 การผลิตไลซีนโดยวิธีการหมัก

การผลิตแอล-ไลซีนโดยตรงจากสับสเตรทพวกคาร์โบไฮเดรตพัฒนาขึ้นเป็นครั้งแรกโดยใช้ออกโซโทรฟของ *C. glutamicum* ซึ่งต้องการโฮโมซีรีน หรือธรีโอนีน รวมถึงเมไธโอนีน (homoserine-or threonine-plus methionine-requiring auxotroph) นอกจากนี้ยังมีกระบวนการผลิตที่เหมือนกัน แต่ใช้ออกโซโทรฟของ *B. flavum* ที่ต้องการโฮโมซีรีน ออกโซโทรฟที่ต้องการโฮโมซีรีนนี้เป็นสายพันธุ์กลายที่ไวต่อธรีโอนีน เนื่องจากปริมาณของธรีโอนีนที่มากเกินไปจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทนี้ และการยับยั้งนี้จะลดลงโดยการเติมเมไธโอนีนลงไปด้วย ปรากฏการณ์นี้เกิดเนื่องจากการยับยั้งย้อนกลับ (feedback inhibition)

ของเอนไซม์โฮโมซีรีน ดีไฮโดรจีเนสโดยธรีโอนีน ออกโซโทรฟที่ต้องการโฮโมซีรีนของแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ก็สามารถผลิตแอล-ไลซีนได้เช่นกัน แต่ผลได้ (yield) มีค่าต่ำกว่าการใช้ออกโซโทรฟที่ต้องการโฮโมซีรีนของ Coryneform bacteria

ธรีโอนีน ออกโซโทรฟ และลิวซีน ออกโซโทรฟของ *C. glutamicum* ก็สามารถสร้างแอล-ไลซีนในปริมาณค่อนข้างสูง แต่อย่างไรก็ตามปริมาณที่ได้นี้ยังต่ำกว่าการผลิตแอล-ไลซีนของโฮโมซีรีน ออกโซโทรฟ นอกจากนี้ออกโซโทรฟอื่น ๆ ของ *C. glutamicum* ของแบคทีเรียอื่น ๆ จะผลิตแอล-ไลซีนปริมาณต่ำกว่าโฮโมซีรีน ออกโซโทรฟของ *C. glutamicum* ด้วย ออกโซโทรฟทวีคูณ (double auxotrophs) ซึ่งต้องการกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นจากโฮโมซีรีนอย่างน้อยอีก 1 ชนิด เช่น ธรีโอนีน ไอโซลิวซีน หรือ เมไธโอนีน สำหรับการเจริญพบว่าออกโซโทรฟนี้มีความเสถียรสูง คือมีแนวโน้มน้อยมากที่จะกลายเป็นสายพันธุ์เดิม (wild-type) คือเป็นพวกที่ไม่ต้องการโฮโมซีรีน นอกจากนี้ออกโซโทรฟเหล่านี้ยังสามารถผลิตไลซีนได้ในปริมาณสูงขึ้นด้วย

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตไลซีนระดับอุตสาหกรรมคือ กากน้ำตาลจากอ้อย (cane molasses) นอกจากนี้คาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ ที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้คือ กรดอะซิติก และเอธานอล โดยจะต้องรักษาระดับพีเอชของอาหารสำหรับหมักไว้ให้ใกล้พีเอชที่เป็นกลางระหว่างการหมัก โดยการเติมแอมโมเนียหรือยูเรียในกรณีที่จุลินทรีย์ที่ใช้มีเอนไซม์ยูรีเอส (urease) ในการหมักนั้น โฮโมซีรีนหรือธรีโอนีนและเมไธโอนีนจะทำหน้าที่เป็นปัจจัยสำหรับการเจริญ (growth factors) ซึ่งจะต้องมีในปริมาณที่เหมาะสมและจำกัด นอกจากนี้ไบโอติน (biotin) ในอาหารควรมีความเข้มข้นมากกว่า 30 ไมโครกรัมต่อลิตร ในกรณีที่ใช้กากน้ำตาลจากอ้อยหรือใช้ไฮโดรไลเสทจากแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนกากน้ำตาลจะเป็นแหล่งของไบโอตินที่ดีด้วย แต่ถ้าใช้กากน้ำตาลจากบีท (beet molasses hydrolysate) จำเป็นต้องเติมไบโอตินลงในอาหารด้วย โดยการใช้ *C. glutamicum* อาจได้ผลผลิตไลซีนในรูปโมโน-ไฮโดรคลอไรด์สูงถึงร้อยละ 30-40 เทียบกับความเข้มข้นตั้งต้นของน้ำตาลในอาหาร หลังจากการหมักแล้วสามารถแยกแอล-ไลซีนที่ได้ออกจากอาหารสำหรับหมัก (fermentation broth) ได้โดยการดูดซับ (adsorption) บนตัวแรกเปลี่ยนแคตไอออน (cation exchanger resin) แล้วชะออกด้วยด่างเจือจาง จากนั้นนำมาทำให้เป็นกลางด้วยกรดเกลือ แล้วทำให้เกิดผลึกแอล-ไลซีนโดยการทำให้เข้มข้นขึ้น

มีการทดลองใช้คาร์บอนจากแหล่งอื่น เช่น Pelechova และคณะ (32) ได้ทดลองใช้ไฮโดรไลเสทจากการย่อยเศษกระดาษ โดยใช้ *C. glutamicum* และ *Brevibacterium* sp. พบว่าได้ผลผลิตไลซีนต่ำ (10-12 กรัมต่อลิตร) หลังจากหมัก 72 ชั่วโมง เนื่องจากไฮโดรไลเสทมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ต่ำมาก คือมีน้ำตาลรีดิวซ์ 99.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น การเสริมน้ำตาลซูโครสลงในไฮโดรไลเสทจะทำให้ผลผลิตไลซีนเพิ่มเป็น 20-40 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ เสาวณี และคณะ (33) ได้ทดลองใช้อาหารสำหรับหมักที่มี GM1 หรือ PCH (Peanut cake hydrolysate) เป็นแหล่งของปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญ (growth factor) ของ *C. glutamicum* โดยใช้โฮโมซีรีน ออกโซโทรฟของ *C. glutamicum* GM1 เป็นผลพลอยได้ของการผลิตกรดกลูตามิกโดยประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด เช่น แอล-ธรีโอนีน และแอล-เมไธโอนีน และใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาพบว่าการใช้ GM1 เหมาะสมกว่า PCH เนื่องจากราคาถูกกว่า โดยผลผลิตไลซีนที่ได้จะสูงหรือต่ำขึ้นกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ และการใช้ GM1 จะให้ผลผลิตไลซีนสูงกว่าการใช้ PCH

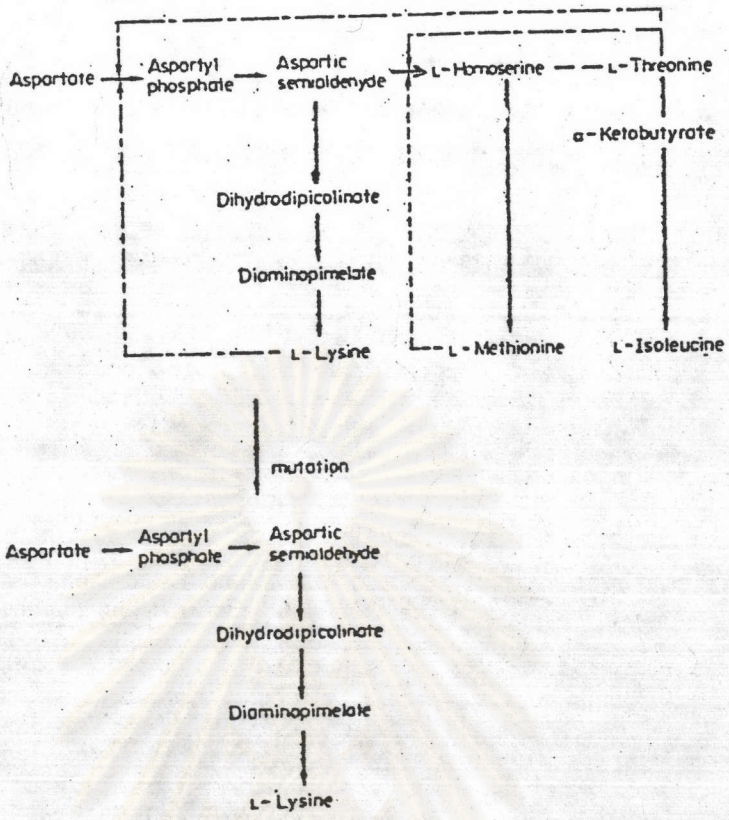
การผลิตแอล-ไลซีนโดยวิธีการหมักมีการพัฒนาขึ้นเป็นลำดับ โดยการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความต้านทานต่อการยับยั้งโดยปัจจัยต่าง ๆ เพิ่มขึ้น นอกจากนี้มีการใช้ความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรมโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นของบริษัทอะยิโนะโมะโตะ (Ajinomoto Co. Inc.) ในการใช้เทคนิคการรวมเซล (cell fusion techniques) ทำให้ได้สายพันธุ์ของ *B. lactofermentum* ซึ่งให้ผลผลิตแอล-ไลซีนสูงถึง 70-75 กรัมต่อลิตร ภายในเวลาของการหมักต่ำกว่า 40 ชั่วโมง (30) ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตแอล-ไลซีน

จุลินทรีย์	สายพันธุ์	Relevant characteristics	ผลผลิตแอล-ไลซีน (กรัมต่อลิตร)
C. glutamicum	ATCC 13286	hsr^-	6.7-20 (media dependent)
C. glutamicum	ATCC 13287 (parent)	hsr^-	42.1
	ATCC 21253	hsr^-, leu^-	54.6
B. flavum	ATCC 21129 (parent)	thr^-	17
	ATCC 21528	thr^-,AECr,AHVr	25
C. glutamicum	ATCC 21253 (parent)	hsr^-, leu^-	43.9
	ATCC 21513	hsr^-, leu^- penicillin resistant	53.2
C. glutamicum	ATCC 21543 (parent)		25
	FERM-P3633	AAHr	35
C. glutamicum	ATCC 21543 (parent)		25
	FERM-P3634	Sulfamethazine resistant	33
B. lactofermentum	Cell Fusant (By protoplast fusion)	High lysine, rapid fermentation (30-35 h)	70

2.9.4 การควบคุมการผลิตแอล-ไลซีนและผลการลดการควบคุมในสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง (overproducing mutants) (31)

กลไกการควบคุมการสังเคราะห์ไลซีนใน *C. glutamicum* แสดงในรูปที่ 16



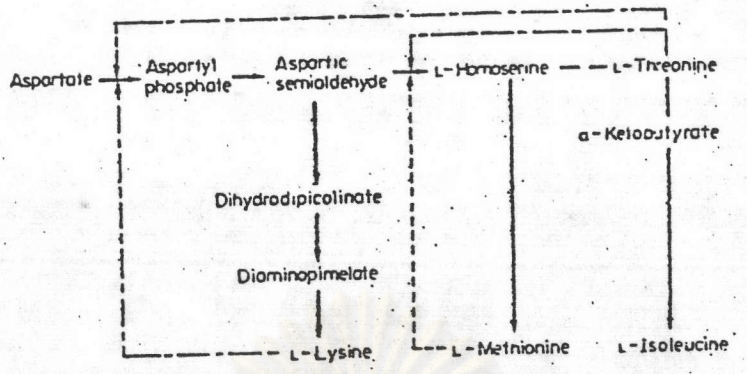
รูปที่ 16 การลดผลการควบคุม (deregulation) การสังเคราะห์ไลซีนในสายพันธุ์เปลี่ยนพวกโฮโมซีรีนออกโซโทรฟของ *C. glutamicum* ; ——→ คือการยับยั้งย้อนกลับ (feedback inhibition) และ ——→ คือการระงับ (repression)

รูปแบบการควบคุมการสังเคราะห์ไลซีนใน *B. flavum* ก็คล้ายคลึงกัน โดยปกติแล้วปฏิกิริยาที่ใช้ผลิตภัณฑ์เริ่มต้น (initial product) ในวิถีการสังเคราะห์นั้นมักเกิดการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end product inhibition) ใน *E. coli* พบว่ามีการยับยั้งโดยไลซีนต่อปฏิกิริยาการรวมกันของแอสพาร์ติก เซไมอัลดีไฮด์กับไพรูเวท แต่ใน *C. glutamicum* จะไม่พบทั้งการยับยั้งโดยไลซีนหรือกรดอะมิโนอื่น ๆ แม้ว่าในสภาวะที่มีกรดอะมิโนเข้มข้นถึง 10^{-2} โมลาร์ ใน *B. flavum* *Bacillus cereus* *Bacillus subtilis* และ *Streptococcus faecalis* พบว่าเอนไซม์ไดไฮโดรไดพิโคลิเนท ดีไฮโดรจีเนสก็ไม่ไวต่อการยับยั้งของไลซีนเช่นกัน และแม้ว่าทั้งใน *C. glutamicum* และ *B. flavum* นั้นเอนไซม์โฮโมซีรีน ดีไฮโดรจีเนสจะถูกยับยั้งโดยธรีโอนีนและถูกระงับโดยเมไธโอนีน แต่เอนไซม์แอสพาร์ติก- บีตา-เซไมอัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนสจะไม่ถูกยับยั้งหรือระงับโดยกรด

อะมิโนชนิดใดเลย จากรูปที่ 16 จะเห็นได้ว่าในพวกโฮโมซีรีนหรือธรีโอนีน ออกโซโทรฟนั้นจะไม่มีการสร้างธรีโอนีนทำให้จุลินทรีย์พวกนี้สามารถให้ผลผลิตไลซีนที่สูงขึ้น เนื่องจากมีการลดผลการยับยั้งเอนไซม์แอสพาร์โทไคเนสและมีการลดกลไกการควบคุมการสร้างไลซีนอื่น ๆ ด้วยดังรูป การที่มีการลดผลยับยั้งย้อนกลับโดยธรีโอนีนและไลซีนต่อเอนไซม์แอสพาร์โทไคเนส และการที่แอสพาร์ติก เซไมอัลดีไฮด์ที่ผลิตได้ถูกเปลี่ยนเป็นไลซีนโดยไม่มีการยับยั้งย้อนกลับที่พบในโฮโมซีรีนหรือธรีโอนีน ออกโซโทรฟของ *C. glutamicum* นี้จะคล้ายคลึงกับที่พบในออกโซโทรฟชนิดเดียวกันของ *B. subtilis* แต่จะไม่พบใน *E. coli*

ใน *C. glutamicum* จะมีการสะสมของไลซีนมากขึ้น เนื่องจากไลซีนที่ได้ไม่มีการสลายตัวต่อ หรือมีการดึงหมู่คาร์บอกซิลออก (decarboxylation) แต่ใน *E. coli* ไลซีนจะถูกดึงหมู่คาร์บอกซิลออกทำให้ได้คาดาวีรีน (cadaverine) ซึ่งทำให้ผลผลิตไลซีนลดลง การถ่าย (excretion) ออกก็เป็นปัจจัยสำคัญในการสะสมไลซีนด้วยเช่นกัน เมื่อมีการเติมเพนิซิลลิน (penicillin) ลงในตอนต้นของการหมักด้วยโฮโมซีรีนออกโซโทรฟของ *C. glutamicum* ของ *Brevibacterium* No. 22 จะพบว่ามีการผลิตกรดกลูตามิกแทนการผลิตไลซีน

นอกจากนี้สารเชิงอุปมานของกรดอะมิโน (amino acid analogs) จะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งย้อนกลับที่ไม่แท้จริง (pseudofeedback inhibitor) ในการยับยั้งการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้าย และจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้เนื่องจากไม่สามารถใช้สารเชิง-อุปมานนี้ แทนกรดอะมิโนในการเจริญได้ สายพันธุ์เปลี่ยนที่ต้านทานต่อสารเชิงอุปมานจะสามารถเจริญได้และผลิตไลซีนได้ในปริมาณสูง เช่น สายพันธุ์เปลี่ยนของ *B. flavum* ที่ต้านทานต่อเอส-(บีตา-อะมิโนเอธิล)-แอล-ซิสทีน (S-(β-aminoethyl)-L-cysteine, AEC) ซึ่งเป็นสารเชิงอุปมานของไลซีน ความต้านทานต่อ AEC เกิดจากการที่เอนไซม์แอสพาร์โทไคเนสมีความไวต่อการยับยั้งย้อนกลับลดลง จึงทำให้ผลการยับยั้งย้อนกลับต่าง ๆ ที่แสดงในรูปที่ 16 ลดลง การเปลี่ยนของแอสพาร์ทิค เซมิอัลดีไฮด์เป็นธรีโอนีนยังคงถูกยับยั้งโดยธรีโอนีน ดังนั้นวิถีของปฏิกิริยาการผลิตแอล-ไลซีนจึงเกิดได้อย่างเต็มที่ ทำให้ผลผลิตแอล-ไลซีนสูงขึ้น ดังรูปที่ 17



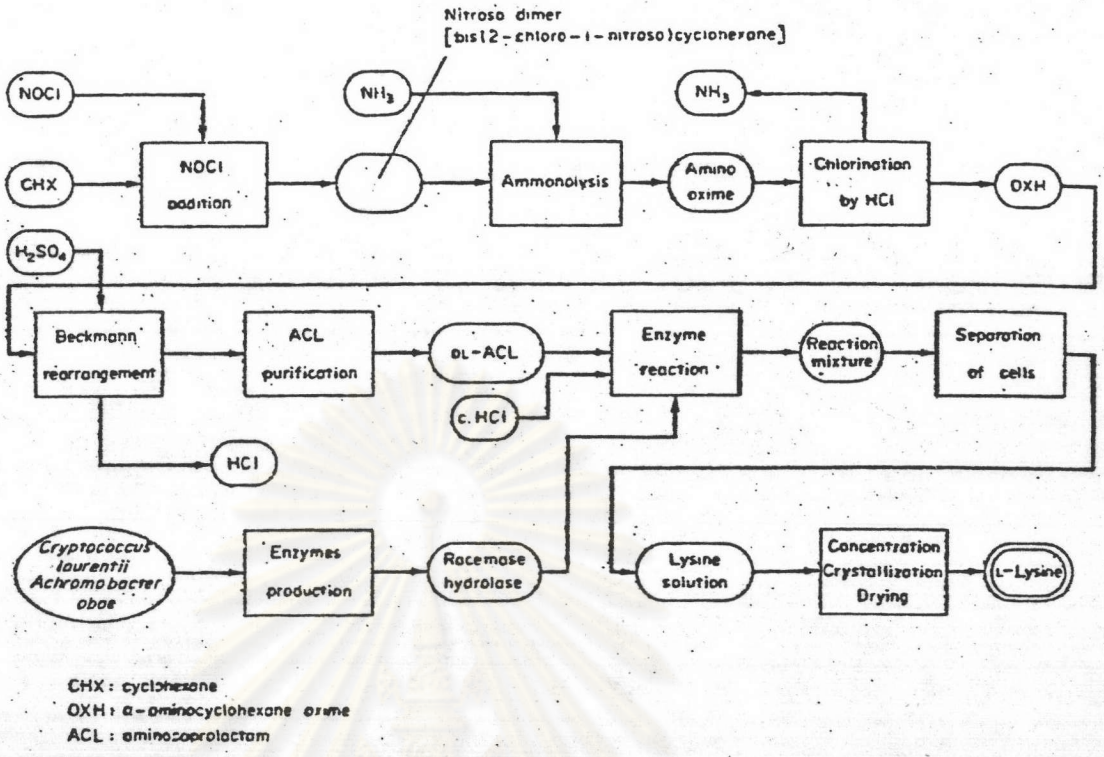
รูปที่ 17 ผลการลดการควบคุมการสังเคราะห์ไลซีนในสายพันธุ์เปลี่ยนของ *B. flavum* ซึ่งต้านทานต่อ เอส-(บีตา-อะมิโนเอธิล)-แอล-ซิสทีน (AEC); ——→ คือการการยับยั้งย้อนกลับ และ - - - - → คือการระงับ

2.9.5 การผลิตไลซีนโดยวิธีใช้เอนไซม์

$$\text{D-}\alpha\text{-Aminocaprolactam} \underset{\text{racemization}}{\rightleftharpoons} \text{L-aminocaprolactam} \xrightarrow{\text{hydrolysis}} \text{L-lysine} \qquad \text{--------(1)}$$

การผลิตแอล-ไลซีนจากดีแอล-อัลฟา-อะมิโนคาโปรแลคแทมนั้นได้มีการศึกษาครั้งแรกโดยใช้เชื้อราที่ชื่อ *Aspergillus ustus* ซึ่งสามารถย่อยสลายได้เฉพาะรูปแอล (L-form) ของสับสเตรท จึงต้องมีการทำปฏิกิริยาเรซีไมเซชั่น (racemization) ของสับสเตรทรูป D (D-form) ที่เหลือแล้วจึงนำกลับไปใช้เป็นสับสเตรทอีกครั้ง ดังสมการที่ 1 แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตไลซีนที่ได้ต่ำมาก

ปัจจุบันบริษัทโทเรย์ (Toray Company) ประเทศญี่ปุ่น ได้ผลิตไลซีนโดยใช้กระบวนการทางเอนไซม์ ความสามารถในการผลิตเป็น 7500 ตันต่อปี ในกระบวนการนี้ใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ในระยะพัก (resting cell) ทำให้ได้ผลผลิตแอล-ไลซีนที่มีคุณภาพสูง โดยผ่านกระบวนการที่ใช้คาร์บอน (carbon treatment) และทำให้เกิดผลึก (crystallization) ดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 กระบวนการผลิตแอล-ไลซีนโดยใช้เอนไซม์

2.9.6 การใช้กรดอะมิโนในอาหารสัตว์

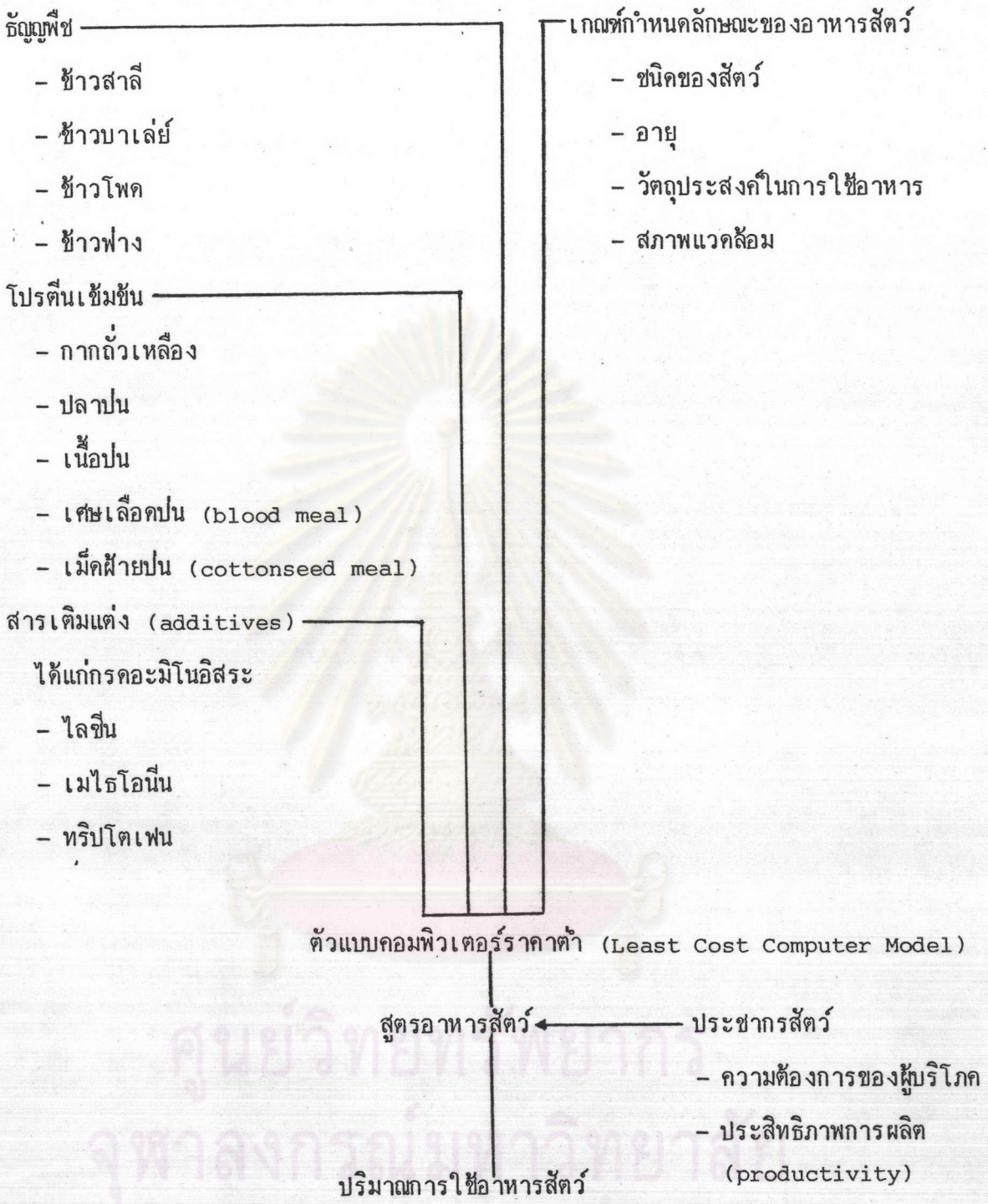
ดังได้กล่าวแล้วว่าแอล-ไลซีนเป็นกรดอะมิโนจำเป็นชนิดหนึ่ง ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ในร่างกายของคนและสัตว์ แต่จะได้รับจากอาหารถ้ามีการรับประทานโปรตีนจากเนื้อสัตว์อย่างเพียงพอ ในการผลิตอาหารสัตว์นั้นโปรตีนจากสัตว์ที่จะใช้มักมีราคาสูง จึงจำเป็นต้องใช้โปรตีนจากพืชเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งโปรตีนจากพืชจะขาดไลซีน (33) ในการที่จะปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเสริม (supplement) แอล-ไลซีนลงในสูตรอาหารที่ใช้พืชเป็นแหล่งพลังงานและโปรตีน โดยอาจใช้ไลซีนในรูปของกรดอะมิโนอิสระหรือเป็นองค์ประกอบในโปรตีนเข้มข้น (protein concentrate) ต่าง ๆ เช่น กากถั่วเหลืองป่น (Soya bean meal) ปลาป่น (fish meal) เนื้อป่น (meat meal) เป็นต้น

ตารางที่ 6 สัดส่วนของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในอาหารแต่ละชนิด

อาหาร	สัดส่วนของกรดอะมิโนคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักของอาหาร			
	ไลซีน	เมไธโอนีน	ทริปโตเฟน	ทรีโอนีน
ข้าวสาลี	0.38	0.16	0.13	0.35
ข้าวฟ่าง	0.18	0.12	0.13	0.28
ข้าวโพด	0.21	0.13	0.07	0.27
แกลบปนรำข้าวเจ้า (rice pollard)	0.47	0.17	0.10	0.35
กากถั่วเหลืองป่น	2.71	0.52	0.50	1.42
กากเม็ดฝ้ายป่น	1.81	0.40	0.42	1.29
เนื้อป่น	2.84	0.57	0.31	1.50
ปลาทูน่าป่น	3.54	1.26	0.48	2.19

ตัวอย่างหนึ่งในการเสริมกรดอะมิโนลงในอาหารสัตว์นั้นผู้ผลิตจะใช้ ตัวแบบคอมพิวเตอร์ที่ใช้ต้นทุนต่ำ ("Least cost" computer model) ดังแสดงในรูปที่ 19 ซึ่งคำนึงถึงเกณฑ์กำหนดลักษณะ (specification) ของอาหารสัตว์ ราคาของส่วนประกอบแต่ละส่วนในอาหารและปริมาณของกรดอะมิโนที่มีในส่วนประกอบแต่ละส่วน (30)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 การใช้ตัวแบบคอมพิวเตอร์ "Least Cost" ในการสร้างสูตรอาหารสัตว์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในออสเตรเลียการเสริมกรดอะมิโนในอาหารสัตว์ได้รับการยอมรับกันอย่างแพร่หลาย ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา นักวิทยาศาสตร์และองค์กรทางการเกษตรของรัฐมีการสนองตอบและเข้าใจในความสำคัญของกรดอะมิโนในอาหารสัตว์ โดยปริมาณการใช้แอล-ไลซีนในอาหารสัตว์ที่ใช้ในออสเตรเลียในปี 1985 มีดังนี้คือ ในอาหารสำหรับสุกร สุกรตัวเมีย ไก่อ่อน (broilers) และสัตว์ปีกอื่น ๆ เป็นร้อยละ 47.4, 3.9, 32.7 และ 3.3 ตามลำดับ (30)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย