อกมาบริเวณผิวสัมผัสของสับสเตรทและมีบทบาทต่อการช่วยทำลายพันธะในโครงสร้างของสับสเตรท ส่งผลให้การย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์พืชเกิดได้ดีขึ้น (Tomme และคณะ, 1995)

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

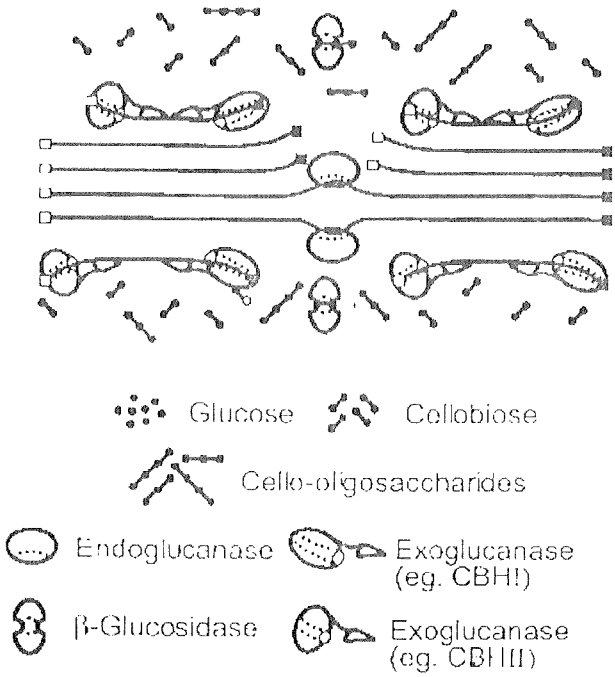
การย่อยสลายองค์ประกอบใน cellulosic material

การย่อยสลาย cellulosic material ที่ประกอบด้วยสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ซับซ้อนหลายชนิดให้สมบูรณ์ต้องอาศัยการทำงานร่วมกัน (synergistic action) ของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติก (cellulolytic) และไซลาโนไลติก (xylanolytic) (Beguin และ Aubert, 1994)

การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส (Cellulolytic enzyme systems)

การย่อยสลายเซลลูโลส ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกหลายชนิด จึงจะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายเซลลูโลส เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อตำแหน่งพันธะในสารประกอบเซลลูโลสที่เป็นสับสเตรทต่างกัน โดยเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสแบ่งได้ 3 ชนิด ตามหน้าที่การทำงานและลักษณะโครงสร้าง (Henrissat และคณะ, 1996) คือ (1) endoglucanases หรือ 1,4-β-D-glucan glucanohydrolase (EC 3.2.1.4) (2) exoglucanases ประกอบด้วย 1,4-β-D-glucanohydrolases หรือเรียกว่า cellodextrinases (EC 3.2.1.74) และ 1,4-β-glucan cellobiohydrolases (cellobiohydrolases) (EC 3.2.1.91) และ (3) β-glucosidase หรือ β-glucoside glucohydrolases (EC 3.2.1.21) ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้จะทำงานร่วมกันในการย่อยสลายเซลลูโลสดังแสดงในรูปที่ 1 (Lynd และคณะ, 2002) โดยในขั้นตอนแรกเอนไซม์ endoglucanase ทำหน้าที่ย่อยสลายแบบสุ่มบริเวณ amorphous ภายในสายโพลีเมอร์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโพลีเมอร์สายสั้นๆ คือ โอลิโกแซ็กคาไรด์และเซล-โลไบโอส ส่วน exoglucanase ย่อยสลายที่ส่วนปลายของสายโพลีเมอร์และโอลิโกเซลลูโลแซ็กคาไรด์ทั้งด้านปลาย reducing และ non-reducing ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและเซลโลไบโอส โดยการทำงานของ glucanohydrolases และ cellobiohydrolase ตามลำดับ นอกจากนี้ exoglucanase สามารถย่อยส่วนที่เป็น microcrystalline cellulose (Teeri, 1997) ซึ่งคาดว่าน่าจะย่อยสลายได้แค่บริเวณรอบนอก ต่อมา β-glucosidases จะย่อยสลายเซลโลเด็กซ์ทรินที่ละลายน้ำและเซลโลไบโอส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส หากแยกเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสออกจากกันแล้วนำเอนไซม์แต่ละชนิดไปย่อยสลายเซลลูโลสจะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง แต่เมื่อนำเอนไซม์แต่ละชนิดที่แยกจากกันกลับมารวมกันใหม่ พบว่าเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสเพิ่มขึ้นดังเดิม (Rixon และคณะ, 1996) อย่างไรก็ตามการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส มีประสิทธิภาพ

ในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีเฉพาะส่วนที่มีรูปแบบการจัดเรียงตัวแบบ amorphous แต่ในส่วนที่มีการเรียงตัวแบบ crystalline การย่อยสลายยังทำได้ไม่ดี

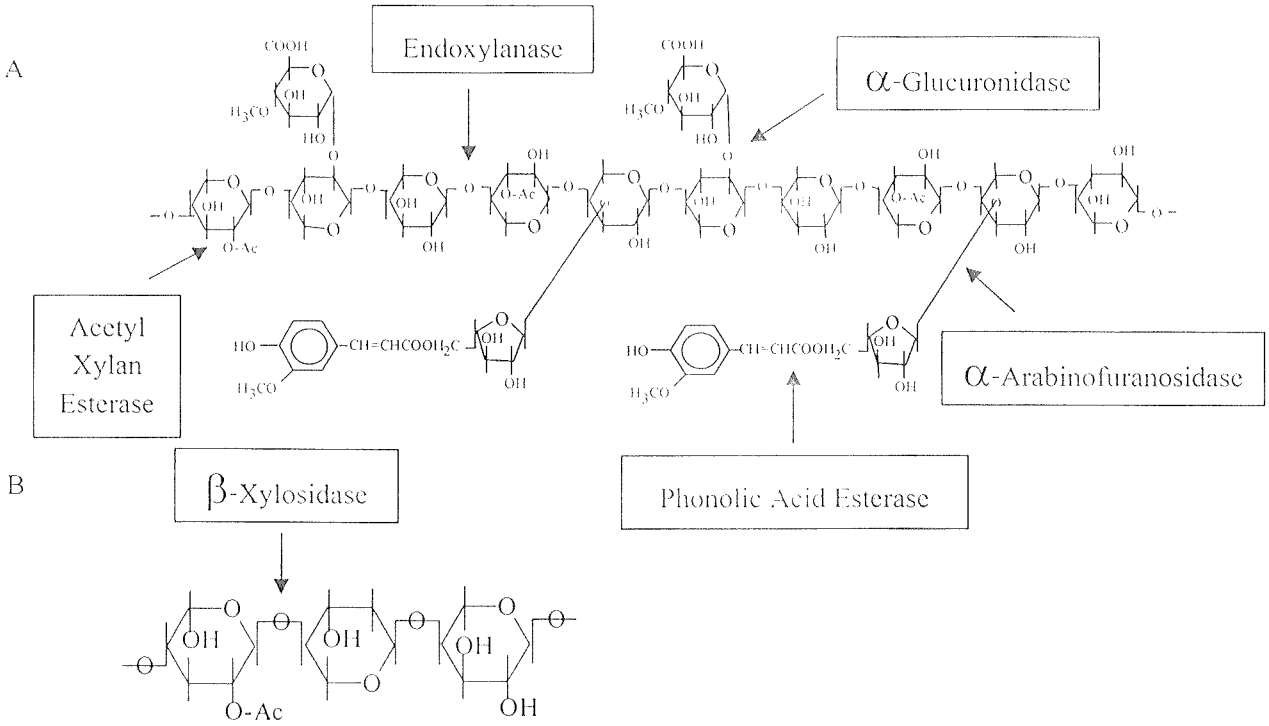


รูปที่ 1 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสต่อการย่อยสลายบริเวณ amorphous ของสายเซลลูโลส (Lynd และคณะ, 2002) เมื่อ CBH I, CBH II = exocellobiohydrolase I, II

การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาเนส (Xylanolytic enzyme systems)

เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลีเมอร์ที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งการย่อยสลายไซแลนที่มีโครงสร้างซับซ้อนให้สมบูรณ์ จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของไซลาโนไลติกเอนไซม์หลายชนิดทั้งในกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างหลักและเอนไซม์ที่ย่อยสลายส่วนที่เป็นกิ่งก้าน ดังแสดงในรูปที่ 2 (Coughlan และ Hazewood, 1993) โดยเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างหลักได้แก่ endoxylanase (1,4-β-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) ทำหน้าที่ย่อยสลาย xylosidic linkages ที่เชื่อมแต่ละหน่วยของไซโลสแบบสุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลโอลิโกเมอร์สายสั้นๆ β-xylosidase (β-D-xyloside xylanohydrolase; EC 3.2.1.37) หรือ Exoglucosidase จะย่อยสลายไซโล-โอลิโกเมอร์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส ส่วนเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างรอง (debranching enzyme) หรือส่วนที่เป็นกิ่งก้านได้แก่ α-arabinofuranosidase, α-glucuronidase, acetyl xylan esterase และ phenolic acid esterase ซึ่ง

จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ขึ้นกับสับสเตรทที่เป็นสายโพลี-เมอร์ส่วนกิ่งก้าน (Kosugi และคณะ, 2001; Lama และคณะ, 2004)



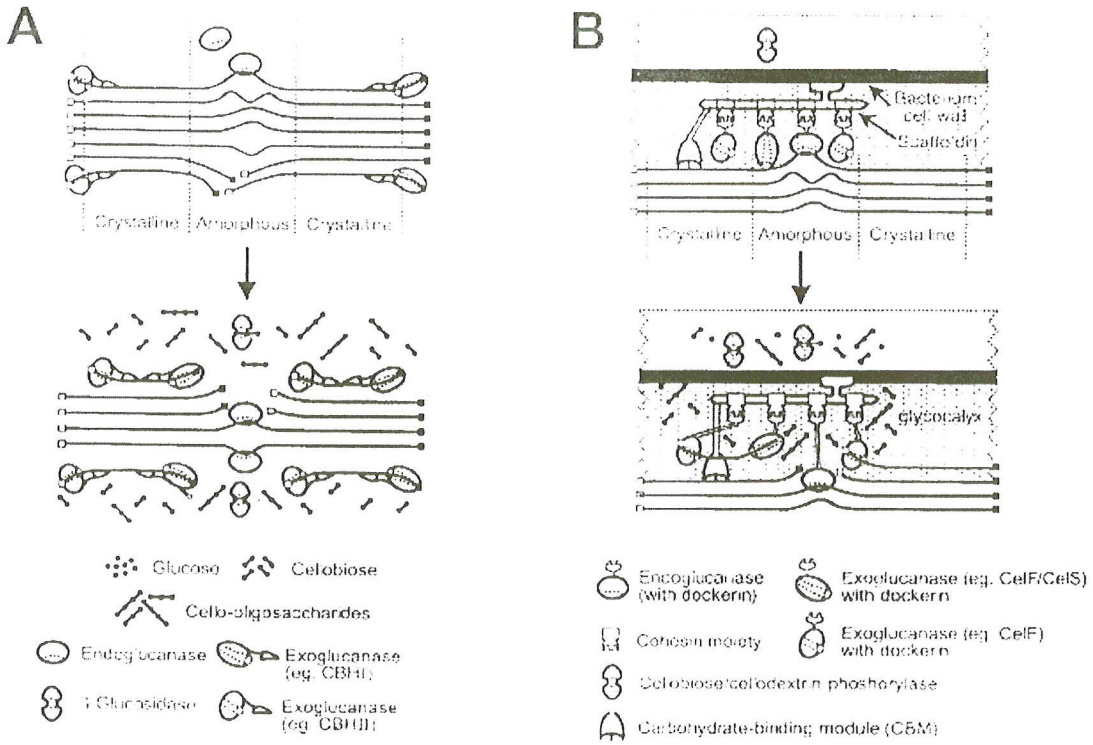
รูปที่ 2 (A) แสดงการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไซแลน (Sunna และ Antranikian, 1997) AC : Acetyl group

(B) แสดงการย่อยสลายไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์โดย β-xylosidase (Sunna และ Antranikian, 1997)

Multienzyme complex

เซลลูโลโซมเป็น multienzyme complexes ชนิดหนึ่ง เริ่มมีการศึกษาครั้งแรกโดย Lamed และคณะ (1983) ได้ศึกษาในเชื้อ *Clostridium thermocellum* ซึ่งเป็น anaerobic thermophilic bacterium พบว่า *C. thermocellum* ผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) และส่วนใหญ่เป็น cellulolytic enzymes โดยผลิตออกมารวมกันอยู่ที่ผนังเซลล์ มีมวลโมเลกุลสูง ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมี mode of action แตกต่างกัน และอยู่รวมกันอย่างมีเสถียรภาพจึงสามารถทำงานร่วมกัน (synergistic effect) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เซลลูโลโซมพบในจุลินทรีย์บางชนิด สามารถย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลโลสและเซลลูโลสซึ่งอัดตัวกันแน่น (crystalline) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสได้ (Doi และคณะ, 2003; Paulและคณะ 1986) เนื่องจากโครงสร้างของเซลลูโลโซมประกอบด้วยส่วนที่สามารถยึดเกาะกับเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ (cellulose-binding domain) ทำให้เซลลูโลโซมจับกับพื้นผิวของเซลลูโลสได้ ช่วยให้ส่วนที่ทำ

หน้าที่ย่อยสลาย (catalytic domains) ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและไซลาเนส หลายๆ ชนิดที่อยู่รวมกันเข้าใกล้สับสเตรท ทำให้การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำเกิดได้ง่ายและมีประสิทธิภาพสูงกว่าการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสอิสระ (Lynd และคณะ, 2002; Doi และ Kosugi, 2004, Flex และคณะ 1993) จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเอนไซม์อิสระ (free enzyme) ชนิดต่างๆ ที่ทำงานร่วมกันและเอนไซม์อิสระแต่ละชนิด พบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำได้จะต้องผลิต extracellular cellulase ทั้งในรูปที่เป็นเอนไซม์อิสระ (free enzyme) และที่ยึดเกาะกับเซลล์ (Lynd และคณะ, 2002) ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส (cellulase systems) พบได้มากมายจากแบคทีเรียที่หายใจแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน (aerobic and anaerobic bacteria) และจากเชื้อรา (fungi) โดยสมาชิกของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสจะแบ่งตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยา และแบ่งตามคุณสมบัติทางโครงสร้าง (Henrissat และคณะ, 2001) ซึ่งการที่เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสทำงานร่วมกัน (synergism) ในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยมีการฟอร์มตัวเป็นคอมเพล็กซ์ (complexes) ที่มีเสถียรภาพและมีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่เรียกว่าเซลลูโลโซม (cellulosomes) ส่งผลให้มีกิจกรรมการย่อยสลายเซลลูโลสสูงกว่าผลรวมการทำงานของเอนไซม์อิสระแต่ละชนิด (รูปที่ 3A) และเซลลูโลโซมสามารถย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณที่เรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ (รูปที่ 3B) (Shoham และคณะ, 1999; Lynd และคณะ, 2002)



รูปที่ 3 รูปแบบการย่อยสลายส่วน amorphous และ microcryatalline ของเซลลูโลส (Lynd และคณะ, 2002)
เมื่อรูป A คือ non-complex cellulase system และรูป B คือ complex cellulase system (cellulosome)

การที่เซลลูโลโซมมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลสน่าจะเป็นผลมาจาก 1) การมีอัตราส่วนของเอนไซม์ที่เหมาะสมใน catalytic domain ต่อการทำงานร่วมกัน (synergism) 2) ภายในเซลลูโลโซมมีการจัดสรรให้มีระยะห่างที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์หน่วยย่อยแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบ เพื่อให้เอื้อประโยชน์ต่อการทำงานร่วมกัน 3) การที่มีกิจกรรมต่างๆ ของเอนไซม์หลายชนิด (เซลลูโลไลติกหรือ เฮมิเซลลูโลไลติกเอนไซม์) ภายในเซลลูโลโซมทำให้สามารถขจัดพอลิแซ็กคาไรด์อื่นๆ ในผนังเซลล์พืชออกไปเพื่อไม่ให้ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ (physical hindrances) 4) หลีกเลี่ยงการแข่งขันระหว่างเอนไซม์เพื่อเข้าจับกับสับสเตรท โดยกระบวนการย่อยสลายจะมีปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมตลอดความยาวของสายเซลลูโลส (Karita และคณะ 2001, Schwarz, 2001; Lynd และคณะ, 2002; Desvaux, 2004, 2005)

จุลินทรีย์ประเภททนอุณหภูมิสูง

โดยทั่วไปเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในกลุ่มที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (psychrotophic) ผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ ส่วนจุลินทรีย์ในกลุ่มที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส (mesophilic) ผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิเดียวกัน และเช่นเดียวกันเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermophilic) มักผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิสูง โดยจุลินทรีย์ประเภททนอุณหภูมิสูงเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีอุณหภูมิเหมาะสมสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส (McKan's และ Kendel, 1996) ซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้กำลังเป็นที่สนใจอย่างมาก เนื่องจากจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานที่ใช้อุณหภูมิสูง โดยเอนไซม์ในกลุ่มที่ทนต่ออุณหภูมิสูงมีคุณสมบัติที่ดีกว่าเอนไซม์ที่พบทั่วไป เช่น มีกิจกรรมต่อการหมักที่อุณหภูมิสูง และสามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมที่ต้องใช้ความร้อนสูง

ข้อดีของการใช้จุลินทรีย์ประเภททนต่ออุณหภูมิสูง ในอุตสาหกรรมมีหลายประเด็นที่คาดว่ามีประโยชน์และเป็นจุดเด่นของกลุ่มจุลินทรีย์ประเภทนี้ (Wiegal, 1992) ได้แก่

1. ผลิตภัณฑ์โปรตีนที่มีความคงตัวต่อความร้อน
2. ลดความหนาแน่น แรงตึงผิวหน้า และความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. ผลิตภัณฑ์ที่ระเหยได้สามารถถูกนำกลับมาใช้ได้โดยตรงและง่ายต่อการแยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างที่มีกระบวนการหมัก
4. สามารถเพิ่มอัตราของการแพร่ การแตกตัว และการละลายของสารเคมีมากขึ้น
5. พลังงานความร้อนของกระบวนการเมตาบอไลต์จากชีวมวลที่แตกตัวและจากการกวนสามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักได้
6. มีการผลิตเป็นชีวมวลน้อย นำไปสู่อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ต่อซับสเตรทสูง
7. สิ่งมีชีวิตที่เป็นพิษถูกทำลายหรือสามารถเจริญเติบโตได้น้อยมาก
8. ไม่ต้องการการหล่อเย็นมากนักขณะทำการหมัก

24871