



บทที่ 2

การทบทวนเอกสารงานวิจัย

การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของวัสดุเหลือทิ้งจำพวกลิกโนเซลลูโลส

จากการเพิ่มขึ้นของประชากรของโลกก่อให้เกิดความต้องการอาหารเพิ่มสูงขึ้น จึงจำเป็นต้องเพิ่มการผลิตผลผลิตทางการเกษตร ก่อให้เกิดการสะสมของวัสดุเหลือทิ้งจำพวกลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic residues) ปริมาณมากทั่วโลก ลิกโนเซลลูโลสเป็นแหล่งของสารอินทรีย์ (organic material) ที่สำคัญ อาจมากถึงร้อยละ 50 ของชีวมวลของพืชทั้งหมด เป็นผลึกเชิงซ้อนที่ยึดกันแน่นหนาของเยื่อใยจุลภาค (micro fiber) ของพอลิแซคคาไรด์ในรูปของเซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และในบางกรณีอาจเป็นเพกติน (pectin) ที่ถูกห่อหุ้มล้อมด้วยชั้นของลิกนิน (lignin) การเปลี่ยนเชิงชีวภาพโดยอาศัยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่เป็นไปได้ในทางปฏิบัติ เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้เหมาะกับการใช้เป็นอาหารเสริมหรืออาหารทดแทนการใช้อาหารสำเร็จรูป และเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ ทั้งนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการเปลี่ยนเชิงชีวภาพที่ได้มักมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น สัตว์สามารถย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสได้ดีขึ้น และปรับปรุงให้อาหารแข็งมีสมบัติทางกายภาพเป็นที่ชื่นชอบของสัตว์มากขึ้น (Villas-Boas et al., 2002)

เซลลูโลสเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) ที่ประกอบไปด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสจำนวนมากที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (β -1,4-glucosidic linkage) มีค่าดีกรีของการเกิดพอลิเมอร์เชชัน (degree of polymerization) สูงมาก (8,000-15,000) โดยโครงสร้างของเซลลูโลสมีทั้งแบบจัดเรียงอย่างเป็นระเบียบของส่วนที่เป็นผลึก (crystalline region) และจัดเรียงอย่างไม่เป็นระเบียบของส่วนที่เป็นอสัณฐาน (amorphous region) ซึ่งดีกรีของการเกิดเป็นผลึก (degree of crystallinity) เป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งของความยากง่ายต่อการย่อยสลายเซลลูโลสอย่างไรก็ตาม เนื่องจากในสัตว์ที่มีกระเพาะอาหารเดี่ยว (herbivorous animal) ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้โดยตรงเพื่อเป็นอาหารสัตว์ เพราะสัตว์ไม่สามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งของคาร์บอนหรือพลังงานได้ นอกจากพวกสัตว์เคี้ยวเอื้องที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อใช้เป็นแหล่งของพลังงานได้ โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ในกระเพาะอาหารช่วยย่อยสลายเซลลูโลส จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้จะผลิตเอนไซม์ขึ้นมา 1 ชุดที่ทำงานร่วมกันเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) และเป็นกลูโคสในที่สุด โดยทั่วไปกลุ่มของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลสจะเรียกว่า เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดคือ เซลโลไบโอไฮดรอลเลส (cellulobiohydrolase; CBH) เอนโดเบตาไกลูคาเนส (endo- β -glucanase; EG) และ เบตาไกลูโคซิเดส (β -glucosidase; β G) โดยเอนไซม์ทั้งสามชนิดจะทำงานร่วมกัน (synergistic action) ในการย่อยสลายเซลลูโลส

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่..... 7 ส.ค. 2555
เลขทะเบียน..... 190926
เลขเรียกหนังสือ.....

ราหลายสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) จึงสามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตได้ ได้แก่ *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. *Chaetomium* sp. และ *Neurospora* sp. เป็นต้น (Petre et al., 1999; Lukshimkant and Mathur, 1990; Mandels et al., 1974; Yazdi et al., 1990; Aiello et al., 1996; Nigam and Singh, 1996) ในทางปฏิบัติ จุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ง่ายนัก ทั้งนี้เพราะนอกจากเซลลูโลสแล้ว ในผนังเซลล์ของพืชยังประกอบไปด้วยเฮมิเซลลูโลสและลิกนินด้วย โดยเซลลูโลสจะถูกห้อมล้อมด้วยลิกนิน ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เซลลูโลสถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ จึงจำเป็นต้องทำลายลิกนิน (delignification) ก่อนโดยใช้การจัดการเบื้องต้น (pretreatment) เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น โดยอาศัยกระบวนการทางเคมี เช่น การใช้กรด (Gretthelin, 1985) เบส (Abiola et al., 2002) แอมโมเนีย (Weil et al., 1994) และ ยูเรีย (Van Soets, 1994) หรือโดยอาศัยกระบวนการทางกายภาพ เช่น การบด (Fahey et al., 1992) และการใช้ไอน้ำ (Sawada et al., 1995) เป็นต้น กระบวนการเหล่านี้จะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของเซลลูโลสทำให้เอนไซม์สามารถเข้ากระทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีขึ้น (Gharpuray et al., 1983) แต่ขั้นตอนดังกล่าวมีข้อจำกัดในเรื่องของค่าใช้จ่าย ซึ่งไม่เหมาะสมอย่างยิ่งต่อประเทศกำลังพัฒนา

การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของวัสดุเหลือทิ้งจำพวกลิกโนเซลลูโลสสามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องผ่านการจัดการเบื้องต้น (pretreatment) ทางเคมีหรือทางชีวเคมี หรือจะให้มันถูกไฮโดรไลซ์ก่อนกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ก็ได้ การจัดการด้วยสารเคมีมักให้ผลพลอยได้ที่มีผลทางลบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในขั้นตอนการหมัก แต่ถ้ามีการกำจัดผลพลอยได้ออก แล้วต่อด้วยการหมักก็จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณโปรตีนสูงและมีการย่อยได้สูงด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุเหลือทิ้งที่ไม่ผ่านการหมัก โดยใช้เวลาในการหมักที่สั้นกว่า (Gupta et al., 1986; Tentratian and Fields, 1990; Singh et al., 1991; Ashour et al., 1993) นอกจากนี้การไฮโดรไลซิสทางเคมีก็จะทำให้มีต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น เนื่องจากจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (purification) หลังผ่านกระบวนการจัดการเบื้องต้น ดังนั้นถึงแม้ใช้สับสเตรทที่ไม่ผ่านขั้นตอนการไฮโดรไลซ์ทางเคมีจะใช้เวลาในการหมักนานกว่า แต่ก็มักไม่เกิดสารที่เป็นพิษที่อาจเป็นอันตรายต่อสัตว์ (Ortega et al., 1992; Jwanny et al., 1995; Karunandaa et al., 1995; Adamovic et al., 1998)

การที่จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจำพวกลิกโนเซลลูโลสเป็นแหล่งอาหารและพลังงานได้โดยตรง เพราะสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้ในธรรมชาติ (Arora, 1995; Asiegbu et al., 1996; Castillo et al., 1999; Panda et al., 1983; Wan Yusoff and Thayan, 1991; Gutierrez-Correa and Tengerdy, 1997; 1998) โดยการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และ/หรือ ลิกนินให้เป็นกลูโคส หรืออยู่ในรูปของคาร์บอนที่เมตาบอลิไตได้ง่าย (easily metabolite carbon) ให้เซลล์ที่มีปริมาณโปรตีนสูงปนอยู่กับสับสเตรทหลังผ่านกระบวนการหมัก จึงทำให้มีปริมาณโปรตีนสูงขึ้น ในทางตรงกันข้าม การปรับปรุงการย่อยได้ของสับสเตรทต้องใช้เวลาในการหมักนานขึ้น เนื่องจากจำเป็นต้องย่อยสลายลิกนินพอลิเมอร์ของสับสเตรท ซึ่งจะเกิดขึ้นระหว่างการเกิดเมตาบอลิซึมทุติยภูมิของจุลินทรีย์ (microbial secondary metabolism) ซึ่งมักจะเกิดขึ้นในช่วงสแตชันนารีเฟส (stationary phase) ที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตเต็มที่และผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายลิกนิน ในระหว่างช่วงการเจริญเติบโต (active growth phase) เอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้จะถูกใช้เป็น

แหล่งของคาร์บอน ในขณะที่เซลลูโลสมักไม่ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในช่วงนี้ และมักคงปริมาณของเซลลูโลสไว้เพื่อเพิ่มการย่อยสลายได้ของสารลิกโนเซลลูโลส (Morson and Verachert, 1991)

การใช้วัสดุเหลือทิ้งจำพวกลิกโนเซลลูโลสเพื่อเป็นอาหารสัตว์ที่มีเฉพาะเดี่ยว จำเป็นต้องคำนึงถึงว่าสัตว์จำพวกนี้ไม่สามารถเมตาบอลิซึมเยื่อใยธรรมชาติที่เป็นองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือทิ้งจำพวกลิกโนเซลลูโลสได้ ดังนั้นกระบวนการเปลี่ยนเชิงชีวภาพจึงมักถูกใช้เพื่อเปลี่ยนแปลง (transform) เยื่อใยเหล่านี้ให้เป็นองค์ประกอบที่สามารถย่อยสลายได้ โดยให้วัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ผ่านกระบวนการหมักโดยตรงหรืออาจผ่านกระบวนการจัดการทางเคมีก่อนก็ได้ มีรายงานวิจัยจำนวนมากที่มุ่งเน้นในการใช้การเปลี่ยนเชิงชีวภาพเพื่อให้ได้อาหารสัตว์ที่มีปริมาณโปรตีนสูง ตัวอย่างเช่น การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของฟางข้าวสาลี (wheat straw) เป็นอาหารสัตว์โดยใช้ *P. ostreatus* จะทำให้มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 89 ใน 21 วันของการหมัก (Tripathi and Yadav, 1992) ในขณะที่ Pressoa et al. (1996) ให้ขานอ้อยผ่านการจัดการเบื้องต้นทางเคมีก่อนด้วยกรดซัลฟูริก จากนั้นจึงตามด้วยการหมักด้วย *Candida tropicalis* พบว่าจะให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นร้อยละ 31.3 ภายหลังจากใช้เวลาหมัก 5 วัน นอกจากนี้ยังมีการใช้ร่วมกันของราและยีสต์ในสับสเตรทที่มีปริมาณน้ำตาลสูง เช่น วัสดุเหลือทิ้งจากผลไม้ โดยเมื่อใช้การเพาะเลี้ยงผสมของ *C. utilis* กับ *A. niger* จะให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นมากถึงร้อยละ 200 เมื่อใช้การหมักแบบสภาพอาหารแข็งเป็นเวลา 7 วัน (Bhalla and Joshi, 1994) อย่างไรก็ตาม วัตถุประสงค์ของการปรับปรุงการย่อยสลายได้ (digestibility) และการเพิ่มปริมาณโปรตีนของลิกโนเซลลูโลสสับสเตรทไม่ควรจะปะปนกัน ทั้งนี้เนื่องจากหลักการพื้นฐานของทั้งสองกระบวนการนี้แตกต่างกัน ส่งผลให้มีปัจจัยที่มีอิทธิพลต่างกันไปด้วย

ยีสต์อาหารสัตว์ (Feed yeasts)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากตั้งแต่สมัย เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อสัตว์ ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีการนำยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ เป็นแหล่งโปรตีนที่เราเรียกว่า โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีปริมาณโปรตีนภายในเซลล์สูง โดยเฉลี่ยมีประมาณ 47-50% ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะใช้สำหรับเป็นอาหารเสริมโปรตีน นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก ไขมัน และวิตามินหลายชนิด เช่น วิตามินบีรวม การใช้ยีสต์ในอาหารของคนนั้น มักใช้เพื่อปรุงแต่ง เพิ่มกลิ่นรสของอาหาร เช่น ใช้เติมใน อาหารประเภทซูป ในปัจจุบันมีการใช้แพร่หลายมากขึ้น ทั้งในสัตว์เคี้ยวเอื้อง สัตว์ปีก ตลอดจนคนสัตว์เลี้ยงในบ้าน

เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานว่า การใช้ยีสต์เป็นอีกหนึ่งทางเลือกของการทดแทนการใช้ยาแอนติไบโอติก (antibiotic-based drugs) ในอาหารสำหรับเลี้ยงไก่ (Hooge et al., 2003; Stanley et al., 2004; Zhang et al., 2005) การใช้ยีสต์จะช่วยให้สัตว์เจริญเติบโตได้ดี ทดแทนการใช้สารแอนติไบโอติก (antibiotics) ซึ่งเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ได้ สามารถทดแทนการใช้สารแอนติไบโอติกจากต่างประเทศ ที่ต้องใช้ผสมในอาหารสัตว์ได้ปีหนึ่ง ๆ มากกว่า 200 ล้านบาท ทั้งนี้เนื่องจากในอดีตได้มีการใช้สารแอนติไบโอติกกันอย่างแพร่หลายในการเลี้ยงสัตว์ แต่ผลเสียที่ติดตามมาคือ การตกค้างของสารต่าง ๆ ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและชีวิตของผู้บริโภค จึงก่อให้เกิดความพยายามที่จะหาแหล่งทดแทนที่มีสมบัติใกล้เคียงกัน การใช้ยีสต์ผสมในอาหารสัตว์ไม่เป็นเพียง แต่ช่วยให้สัตว์โตเร็ว

เท่านั้น แต่ยังช่วยป้องกันการชะงักการเจริญเติบโต และทำให้สัตว์แข็งแรงปราศจากโรคหลายชนิดอีกด้วย โดยที่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisie* เป็นสายพันธ์ที่มีการใช้อย่างกว้างขวางในการเป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์

เบตาไกลูแคนที่มาจากผนังเซลล์ของยีสต์และรามีสสมบัติด้านการเกิดเนื้องอก (antitumor) และต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) โดยไปเพิ่มภูมิคุ้มกันของสัตว์ (the host immune function) ซึ่งใช้ได้กับสัตว์หลายประเภท ได้แก่ หมู (weaned pig) (Mowat, 1987; Stokes et al. 1987) โดยเมื่อเติมเบตาไกลูแคนทดแทนในอาหารสัตว์ที่ สัตว์ส่วนร้อยละ 0.025 นอกจากจะช่วยให้เพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตแล้ว ยังทำให้ไว (increased the susceptibility) ต่อการติดเชื้อ *Streptococcus suis* ด้วย (Driz et al., 1995) กลไกของเบตาไกลูแคนที่ช่วยในเรื่องการเจริญเติบโตของสัตว์ และประสิทธิภาพการใช้อาหารของหมู สามารถอธิบายได้ว่าเกิดจากการยึดจับของโมเลกุล $(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-glucan}$ ที่ทำให้เกิดการยับยั้ง (inactivation) ของแมโครฟาส์ที่เป็นพิษ (toxic macrophages) ช่วยเหลือ ทีเซลล์ (T-cell) และเซลล์ที่เป็นตัวฆ่าตามธรรมชาติ (natural killer cell) ให้สามารถแบ่งเซลล์และทำงานได้ดีขึ้นในเส้นทางอื่น (alternative complement pathway) (Bohn and BeMiller, 1995) นอกจากนั้นยังพบผลของการกระตุ้น (stimulatory effects) ของเบตาไกลูแคนกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ (specific and non-specific immune responses) ในหนู (Suzuki et al., 1990) ไนปลา (Robertsen et al., 1990; Jeney and Anderson, 1993) ในหมู (Schoenherr et al., 1994; Dritz et al., 1995) และในไก่ (Chae et al., 2006)

ดังนั้นเมื่อในปัจจุบันมีความพยายามที่จะเลือกใช้สารตามธรรมชาติทดแทนสารแอนติไบโอติกเพื่อเพิ่มการเจริญของสัตว์และช่วยให้สัตว์มีสุขภาพที่ดี ดังนั้นการใช้เซลล์ยีสต์จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกเนื่องจากมีองค์ประกอบของผนังเซลล์เป็นเบตา-กลูแคนมากถึงร้อยละ 50-60 ของปริมาณพอลิแซคราไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ทั้งหมด และเป็นสารที่ทำหน้าที่เป็น biological response modifier ซึ่งมีรายงานว่า $(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-glucan}$ จะช่วยเพิ่มความสามารถในการทำหน้าที่ของแมโครฟาส์ (macrophages) และนิวโทรฟิลล์ (neutrophils) ดัดแปลงการกดภูมิคุ้มกัน (modify immunosuppression) และเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อของแบคทีเรียแกรมลบ (Kogan and Hocher, 2007) อย่างไรก็ตามผลการทดลองต่อประสิทธิภาพการผลิตไข่ที่ได้ยังไม่เป็นไปในทางเดียวกัน ทั้งมีรายงานว่า การเสริมอาหารสัตว์ด้วยยีสต์กับไก่เพิ่มน้ำหนักและอัตราการแลกเปลี่ยนอาหาร (Bonomi an Vassa, 1978; Ignacio, 1995; Onifade et al., 1998) แต่ในทางตรงกันข้ามก็มีรายงานว่ายีสต์ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญของไก่ (Madriqal et al., 1993) โดยให้น้ำหนักไก่เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีผลต่ออัตราแลกเนื้อ (Kanat and Calialar, 1996) ในขณะที่ในบางรายงานกลับเป็นการใช้ยีสต์สามารถเพิ่มอัตราแลกเนื้อ แต่ไม่เพิ่มอัตราการเจริญของไก่ (Valdivie, 1975; Onifade et al., 1999)

