

## 2. การตรวจเอกสาร (Literature Review)

### 2.1 ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของข้าวโพด

#### 2.1.1 ลักษณะทั่วไป

ชื่อวิทยาศาสตร์ : ZEA MAYS L.

วงศ์ GRAMINEAE

ชื่อสามัญ MAIZE, CORN

ชื่ออื่น : ข้าวสาลี (ภาคเหนือ) คง (จังหวัดกระบี่) โปด (ภาคใต้) ปือเคสะ (ชาวกระเหรี่ยง-จังหวัดแม่ฮ่องสอน)

ลักษณะต้น เป็นพืชจำพวกหญ้า มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ ลำต้นตั้งตรงแข็งแรง เนื้อลำต้นภายในพามคล้ายฟองน้ำสูงประมาณ 1.4 เมตร ใบจะเป็นเส้นตรงปลายแหลม ยาวประมาณ 30-100 เซนติเมตร เส้นกลางของใบจะเห็นได้ชัด ตรงบริเวณขอบใบมีขนอ่อนๆ ดอกเพศตัวผู้และดอกเพศเมีย อยู่ในต้นเดียวกัน ช่อ ดอกตัวผู้อยู่ส่วนยอดของลำต้น ช่อดอก ตัวเมียอยู่ต่ำลงมาอยู่ระหว่างกาบของใบ และลำต้น ฝัก เกิดจากดอกตัวเมียที่เจริญเติบโตแล้ว ฝักอ่อนจะมีสีเขียว พอแก่เป็นสีนวล ซึ่งแสดงในภาพที่ 2.1



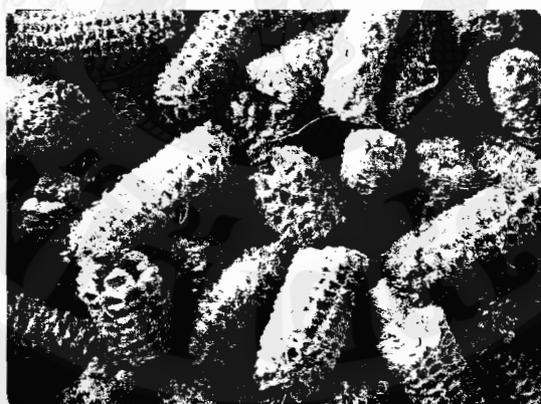
ภาพที่ 1 ลักษณะฝักและต้นข้าวโพด

ที่มา : พีชน้ำมัน. 2549 : ออนไลน์

ส่วนใหญ่ใช้เป็นอาหาร ฝักอ่อน ลวกจิ้ม น้ำพริก ผัด ใส่แกงเลียง แกงป่า ฝักแก่ ใช้ต้ม ปิ้ง รับประทานได้คุณค่าทางโภชนาการ ฝอยข้าวโพดสด ที่เก็บขณะเมล็ดข้าวโพดกำลังเป็นน้ำนมจะมี สารอัลคาลอยด์ที่ระเหยได้ มีน้ำตาล ชัน น้ำมันและอื่นๆ เมล็ดข้าวโพด ประกอบด้วยวิตามินเอ มี ธาตุฟอสฟอรัสสูง มีธาตุแมกนีเซียม แคลเซียม แป้ง น้ำตาลเด็กซ์ตริน โปรตีนเล็กน้อย และอื่นๆ ต้นและใบสามารถใช้เป็นยาโดยนำมาตากแห้งแล้วนำมาต้มน้ำกินรักษานิว นอกจากนี้ยังมี ส่วนประกอบน้ำมันข้าวโพด โดยสกัดได้จากเมล็ดข้าวโพดที่แก่และแห้ง ซึ่งน้ำมันข้าวโพด ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว และมีกรดไขมันที่จำเป็น คือ กรดไลโนเลอิกอยู่ปริมาณมาก น้ำมันข้าวโพดจัดเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพดีและมีประโยชน์เหมาะแก่การบริโภคมากชนิดหนึ่ง (พืช น้ำมัน. 2549 : ออนไลน์)

### 2.1.2 ชังข้าวโพด

ชังข้าวโพด คือ ส่วนแกนกลางของฝักข้าวโพด ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีดังนี้ คือ เซลลูโลส 34.1 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 42.5 เปอร์เซ็นต์ ลิกนิน 12.8 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 1.64 เปอร์เซ็นต์ และ เถ้า 5.46 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และลักษณะของชังข้าวโพดแสดงดัง ภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2 ลักษณะของชังข้าวโพดพันธุ์ซีพี 333

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	องค์ประกอบ (%)				
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	โปรตีน	เถ้า
เปลือกมัน สัมปะหลัง	13.08	11.00	7.20	7.20	14.20
ซังข้าวโพด	34.10	42.50	12.80	1.64	5.46
เปลือกข้าวโพด	38.20	44.50	6.60	1.90	2.80
เปลือกข้าวโอต	27.40-37.30	31.00-38.40	2.30-9.80	1.60-5.80	2.40-9.30
ชานอ้อย	44.00	23.00	20.00	2.00	3.50

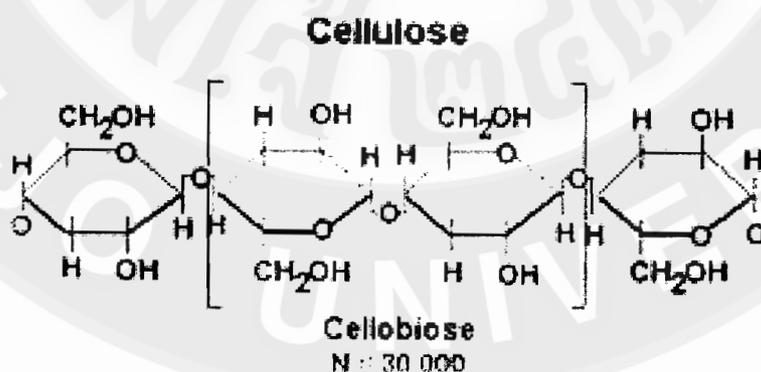
ที่มา : [Biotechnology and Environment](#). 2004: Online

#### 2.1.2.1 เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์เชิงเส้นของน้ำตาลกลูโคสชนิดหนึ่ง และเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดในโลกเพราะเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ในผนังเซลล์ของพืช โดยรวมตัวอยู่กับไซแลน (xylan) และลิกนิน (lignin) เซลลูโลสที่ได้จากแต่ละส่วนของพืชจะมีความแข็งแรงและความเหนียวแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอายุ และชนิดของพืช เช่น เส้นใยไม้ ปอ ป่าน และฝ้าย เป็นส่วนของพืชที่มีเซลลูโลสมาก โดยเฉพาะฝ้ายมีเซลลูโลสสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์เซลลูโลสสามารถละลายน้ำได้ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ร่างกายคนและสัตว์บางชนิดไม่มีเอนไซม์เซลลูเลสในระบบย่อยอาหาร ทำให้ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสจากพืชเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ สัตว์พวกที่กินพืชเป็นอาหาร (herbivorous animal) เช่น โค และกระบือ สามารถย่อยเซลลูโลสได้เนื่องจากในกระเพาะอาหารมีจุลินทรีย์ (rumen microflora) ซึ่งมีเอนไซม์เซลลูเลสช่วยย่อยเซลลูโลสได้โมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส เซลลูโลสประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสมาต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่ง  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) ซึ่งแตกต่างจากโมเลกุลของสตาร์ชที่น้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่ง  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) โมเลกุลของเซลลูโลสเป็นสายยาวไม่มีสายแขนง สายยาวจะมาเกาะกันตามแนวราบ ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ในโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสทำให้โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสเป็นพอลิคริสตัลไลน์ (polycrystalline) ที่แข็งแรงยึด

เกาะกันเป็นเส้นใยเซลลูโลสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณหนึ่งแสนถึงสองล้านสูตรโมเลกุลโดยย่อคือ  
 เซลลูโลส = (เซลโลไบโอส)<sub>n</sub>

เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสในแต่ละหน่วยของน้ำตาลกลูโคส ยังมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ ซึ่งจะเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายของพอลิเมอร์ ทำให้บางส่วนของโครงสร้างเป็นผลึกส่วนที่เกิดผลึกนี้จะมีความหนาแน่นมากกว่า จึงทนทานต่อการถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์และสารเคมีมากกว่าส่วนที่ไม่เป็นผลึก (noncrystalline หรือ amorphous) นอกจากนี้ส่วนที่เป็นผลึกยังดูดน้ำได้น้อยกว่า ทำให้ไม่สามารถละลายน้ำได้ โมเลกุลของเซลลูโลสที่มี degree of crystallinity สูง จะทำให้มีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้นและมีแรงต้าน (tensile strength) ของเส้นใยเซลลูโลสมากขึ้น ทำให้อาหารที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลสสูงมีลักษณะเหนียว (toughness) สำหรับส่วนของโมเลกุลเซลลูโลสที่ไม่เป็นผลึกหรือไม่มีรูปร่าง จะดูดน้ำได้มากและพองตัวออกเมื่อได้รับความร้อนจะทำให้พันธะไฮโดรเจนถูกทำลาย การดูดน้ำจะเพิ่มขึ้น ส่วนที่เป็นผลึกจะลดลงด้วย ในทางตรงกันข้ามการลดปริมาณน้ำให้น้อยลง เช่น การอบแห้ง อาจทำให้ส่วนที่ไม่เป็นผลึกเปลี่ยนเป็นผลึกได้ ผักอบแห้งจึงเหนียวมากขึ้นมีลักษณะคล้ายพลาสติก (plasticity) และการพองตัวลดลง โมเลกุลของเซลลูโลสสามารถถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase) ได้เป็นน้ำตาลเซลโลไบโอส และน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเซลลูโลสจะมี degree of polymerization (DP) สูง ประมาณ 10,000 หน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,620,000 ดาลตัน สูตรโครงสร้างของเซลลูโลสดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลสและเซลโลไบโอส

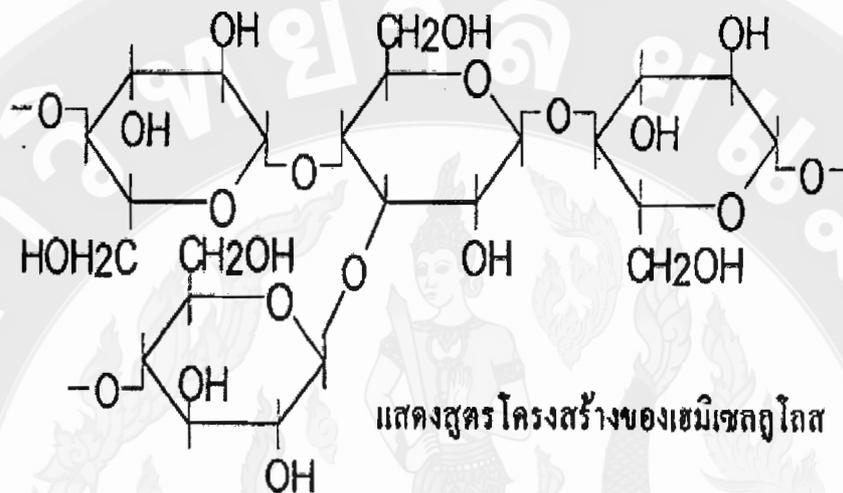
ที่มา : Wood Science and Engineering. 2004 : Online

การที่โมเลกุลของเซลลูโลสมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ ทำให้สามารถถูกแทนที่ได้ด้วย หมู่เมทิล เอทิล ไฮดรอกซีเมทิล ไฮดรอกซีเอทิล คาร์บอกซีเมทิล และ ไฮดรอกซี โพรพิลเมทิลได้ เป็น เมทิลเซลลูโลส (methylcellulose, MC) ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส(hydroxyethylcellulose, HEC) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose, CMC) และไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส (hydroxypropylmethyl cellulose, HPMC) เป็นต้น แต่ส่วนของโมเลกุลเซลลูโลสที่เป็นผลึกจะเกิดปฏิกิริยาทางเคมีได้ยาก อนุพันธ์ของเซลลูโลสเหล่านี้จัดเป็นเซลลูโลสดัดแปร (modified cellulose) โดยเฉพาะ CMC นำมาใช้เป็นกัมในอาหาร ผลิตได้โดยการนำเนื้อไม้ที่บริสุทธิ์มาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 18 เปอร์เซ็นต์ ได้เป็นเซลลูโลสที่มีสภาพเป็นด่าง (alkali cellulose) หลังจากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับเกลือโซเดียมของกรดคลอโรแอซิกได้เป็นเกลือโซเดียมของคาร์บอกซีเมทิลอีเทอร์ (cellulose-O-CH<sub>2</sub>-COONa) CMC ที่ผลิตเป็นการค้า มีค่า degree of substitution (DS) อยู่ในช่วง 0.4-0.8 ส่วน CMC ที่ใช้สำหรับอาหารมีค่า DS = 0.7 สำหรับ MC ผลิตได้โดยนำเซลลูโลสในสภาพต่างมาทำปฏิกิริยากับเมทิลคลอไรด์ ทำให้เกิดเมทิลอีเทอร์กับเซลลูโลส (cellulose-O-CH<sub>3</sub>) อนุพันธ์อีเทอร์ชนิดอื่น เช่น ไฮดรอกซีโพรพิลอีเทอร์ (cellulose-O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>3</sub>) (นิธิยา รัตนาปนนท์. 2545)

#### 2.1.2.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

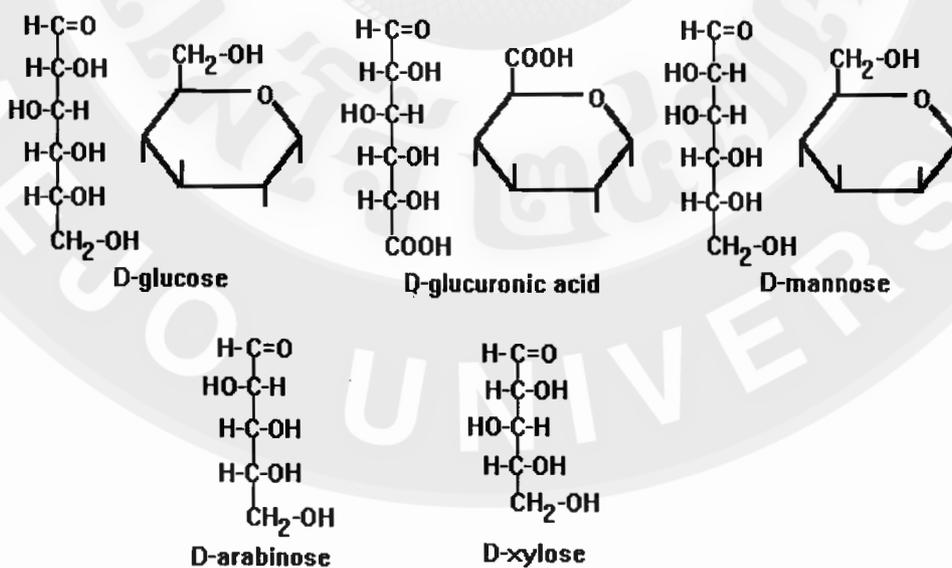
เฮมิเซลลูโลสไม่ใช่สารเริ่มต้นของเซลลูโลส และไม่ได้เป็นส่วนใดส่วนหนึ่งในกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลส แต่เฮมิเซลลูโลสเป็นกลุ่มของเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ในโมเลกุลประกอบด้วย น้ำตาลตั้งแต่ 2-4 ชนิดขึ้นไป มีทั้งน้ำตาลเฮกโซสและเพนโตส น้ำตาลที่พบมาก คือ น้ำตาลไซโลส (D-xylose) และอะราบินอส (L-arabinose) นอกจากนั้นยังพบน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) แมนโนส (D-mannose) กาแล็กโตส (D-galactose) กรดกลูคูโรนิก (D-glucuronic acid) และ 4-O-methyl-D-glucuronic acid อีกด้วย เฮมิเซลลูโลสจำแนกออกตามชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลได้เป็นไซแลน (xylans) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลส แมนแนน (mannans) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลแมนโนส กาแล็กแทน (galactans) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกาแล็กโตส อะราบินอกาแล็กแทน (arabinogalactans) กลูโคแมนแนน (glumannans) และอะราบินโนไซแลน (arabinoxylan) สำหรับไซแลนเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่ง  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) เฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของผนังเซลล์พืช โดยรวมอยู่กับลิกนินและเซลลูโลส มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในสารละลายต่าง ในรำข้าวสาลีจะประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลสประมาณ 43 เปอร์เซ็นต์ของคาร์โบไฮเดรต และโครงสร้างโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วย น้ำตาลอะราบินอส 59 เปอร์เซ็นต์ ไซโลส 38.5 เปอร์เซ็นต์ และกรดกลูคูโรนิก 9 เปอร์เซ็นต์ และเป็นสายแขนงของอะราบินโนไซแลน (araboxylan) เป็นส่วน

ใหญ่ ในโมเลกุลประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลประมาณ 300 หน่วย ซึ่งสูตรโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสและมอนอเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสแสดงดังภาพที่ 2.4 และ ภาพที่ 2.5 ตามลำดับ (นิธิยา รัตนापนนท์. 2545 )



ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา : [Biotechnology and Environment. 2004 : Online](#)

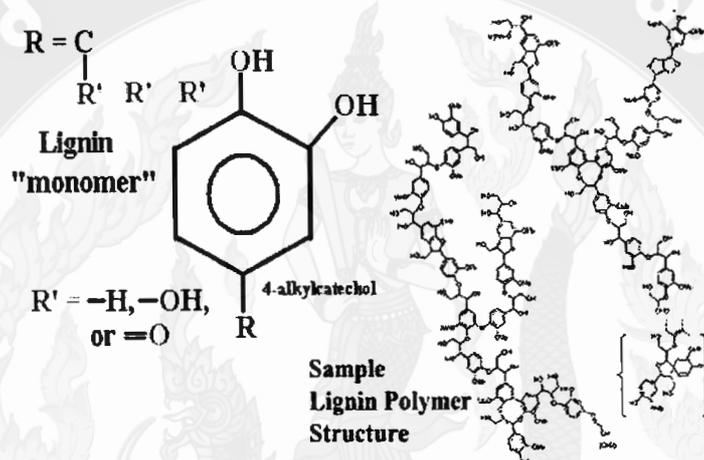


ภาพที่ 5 สูตรโครงสร้างชนิดมอนอเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา : [Biotechnology and Environment. 2004 : Online](#)

### 2.1.2.3 ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมักพบอยู่ร่วมกับเซลลูโลส ลิกนินเป็นสารที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน รวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิด ซึ่งเป็นสารอะโรมาติก ลิกนินไม่ละลายน้ำ ไม่มีสมบัติในการยืดหยุ่น เพราะฉะนั้น จึงทำให้พืชที่มี ลิกนินมากมีความแข็งแรงทนทาน เมื่อพืชตายลิกนินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ลิกเนส (lignase) หรือ ลิกนินเนส (ligninase) (นิธิยา รัตนาปนนท์. 2545) ซึ่งสูตรโครงสร้างของลิกนินแสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 สูตรโครงสร้างของลิกนิน

ที่มา : [Biotechnology and Environment. 2004 : Online](#)

## 2.2 ชนิดของเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลส

เอนไซม์หลักที่จัดอยู่ในกลุ่มของเซลลูเลส มีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิดคือ

2.2.1 เอนโด- $\beta$ -1,4-กลูคาเนส หรือ  $\beta$ -1,4-กลูแคน กลูคาโนไฮโดรเลส (Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase or  $\beta$ -1,4-Glucan Glucanohydrolase) (EC. 3.2.1.4) หรือ เรียกสั้นๆ ว่า เอนโดกลูคาเนส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส หรือ ซีเอ็มเซลลูเลส (Carboxymethyl cellulase or CM-cellulase)

เอนโดกลูคาเนส เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะ  $\beta$ -1,4-ไกลโคซิดิก ที่บริเวณภายในพอลิเมอร์เซลลูโลสได้ เอนโดกลูคาเนสที่บริสุทธิ์ จะไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่มีระดับชั้นของการเกิดพอลิเมอร์สูง ได้เป็น กลูโคส เซลโลไบโอส และเซลโลเดกซ์ทรินอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ ผลผลิตในขั้นสุดท้ายจากการไฮโดรไลซ์จะได้ กลูโคส เซลโลไบโอส และเซลโลไตรโอส ในปริมาณเล็กน้อย เอน

โดกลูคาเนส สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่พองตัวด้วยกรด (acidswollen cellulose) และอนุพันธ์เซลลูโลส (substituted or derivative cellulose) เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) และไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) ได้ดีการทำงานของเอนโดกลูคาเนส จะช่วยทำให้เซลโลไบโอไฮโดรเลสย่อยเซลลูโลสในสภาพผลึกได้ดียิ่งขึ้นลักษณะที่การทำงานของเอนโดกลูคาเนสไปเกื้อหนุนการทำงานของเซลโลไบโอไฮโดรเลสนี้เรียกว่า ปรากฏการณ์เสริมกันของเซลลูเลส (synergistic effect of cellulase)

2.2.2 เอกโซ  $\beta$ -1,4-กลูคาเนส หรือ  $\beta$ -1,4-กลูแคน เซลโลไบโอไฮโดรเลส (Exo- $\beta$ -1,4-Glucanase or  $\beta$ -1,4-Glucan Cellobiohydrolase) (EC. 3.2.292) หรือเรียกสั้นๆ ว่า เอกโซกลูคาเนส หรือ เซลโลไบโอไฮโดรเลส

เซลโลไบโอไฮโดรเลส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพอลิเมอร์ของเซลลูโลส โดยไปทำให้ปลายทางด้านที่ไม่ได้เป็นตัวรีดิวซ์ (non-reducing end) ของพอลิเมอร์เกิดการแตกตัวได้ผลผลิตเป็น เซลโลไบโอสเพียงอย่างเดียว เซลโลไบโอสและ กลูโคสสามารถยับยั้งการทำงานของเซลโลไบโอไฮโดรเลสได้ แต่กลูโคสจะยับยั้งการทำงานในขอบเขตที่น้อยกว่าเซลโลไบโอสนอกจากนั้นเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลสสามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่อยู่ในสภาพผลึกได้ดีกว่าเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสเอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์อนุพันธ์ของเซลลูโลสได้ในปริมาณที่จำกัดซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงกว่าเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส

2.2.3  $\beta$ -1,4-กลูโคซิเดส หรือ  $\beta$ -D-กลูโคไซด์ กลูโคไฮโดรเลส ( $\beta$ -1,4-Glucosidase or  $\beta$ -D-glucoside Clucohydrolase) (EC. 3.2.1.21) เรียกสั้นๆ ว่า  $\beta$ -กลูโคซิเดส หรือ เซลโลไบโอเอส

$\beta$ -กลูโคซิเดส มีบทบาทสำคัญในการไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอส ที่เป็นผลผลิตจากการย่อยพอลิเมอร์ของเซลลูโลสได้ผลผลิตขั้นสุดท้ายเป็นกลูโคส นอกจากนั้นยังมีความสำคัญต่อการควบคุมการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เซลลูเลส และต่อการควบคุมการย่อยเซลลูโลสเอนไซม์  $\beta$ -กลูโคซิเดสที่เซลล์สร้างขึ้นจะไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสนอกเซลล์ไปเป็นกลูโคส ซึ่งจะไปควบคุมระดับของกลูโคสและเซลโลไบโอสที่อยู่ในเซลล์ โดยจะไปมีผลต่อชีวสังเคราะห์เซลลูเลสโดยผ่านกลไกการเหนี่ยวนำและการกดดัน นอกเหนือจากประสิทธิภาพของเอนไซม์ชนิด หลักๆ ที่กล่าวข้างต้นแล้วยังพบเอนไซม์กลูแคนกลูโคไฮโดรเลส (glucan glucohydrolase or 1,4- $\beta$ -D-glucan glucohydrolase) (EC. 3.2.1.74) อยู่ในระบบเซลลูเลสด้วย เอนไซม์นี้มีหน้าที่เคลื่อนย้ายหน่วยกลูโคสออกจากปลายที่ไม่ได้เป็นตัวรีดิวซ์ของสายโซ่ เอนไซม์ดังกล่าวสามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่พองตัวอันเนื่องมาจากกรดฟอสฟอริก เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ และ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (ราบิน เดอร์ ศรีกิจจาภรณ์. 2531 : 4-6)

## 2.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเซลล์เลส

2.3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจสอบการทำงานของเซลล์เลส มีอยู่ด้วยกันสองประการ คือ

ประการแรกเอนไซม์ที่นำมาตรวจสอบส่วนมากจะไม่ใช่เอนไซม์ที่บริสุทธิ์มักจะเป็นสารละลายที่ประกอบด้วยเซลล์เลสหลายชนิดผสมกัน เนื่องจากกลุ่มเอนไซม์เหล่านี้มีการทำงานที่เกี่ยวพันซึ่งกันและกัน ดังนั้นสัดส่วนของเอนไซม์ชนิดต่างๆ จึงมีอิทธิพลอย่างมากต่อการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ ประการที่สองสับสเตรทที่นำมาใช้วัดนั้นมักเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งยากแก่การทำให้ได้มาตรฐาน สับสเตรทที่เหมาะสมควรเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ และมีความจำเพาะของเอนไซม์

### 2.3.2 แนวทางการพัฒนาวิธีการตรวจสอบประสิทธิภาพของเซลล์เลส

#### 2.3.2.1 แนวทางเชิงเทคนิค (Technical Approach)

การใช้เซลล์เลสเชิงเทคนิคที่สำคัญที่สุด ได้แก่ การผลิตกลูโคสจากวัสดุเซลล์เลสชนิดต่างๆ ดังนั้น ตามแนวทางนี้จึงทำให้เกิดวิธีการวัดการทำงานของเซลล์เลสโดยอาศัยสับสเตรทประเภทวัสดุเซลล์เลสที่เหมาะสม เช่น กระดาษกรอง และทำการวัดกลูโคสซึ่งเป็นผลผลิตขั้นสุดท้ายที่เกิดขึ้น โดยวิธีการนี้จะทำให้ได้ค่าประสิทธิภาพรวมในการทำงานของเซลล์เลส แต่ไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่า เอนไซม์ตัวใดที่เป็นตัวกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมี วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะใช้ตรวจวิเคราะห์ความสามารถของสารเชิงซ้อนเอนไซม์ชุดหนึ่งๆ ในการไฮโดรไลซ์เซลล์เลส

#### 2.3.2.2 แนวทางเชิงชีวเคมี (Biochemical Approach)

มีจุดมุ่งหมายเพื่อหาประสิทธิภาพของเอนไซม์แต่ละตัว เป็นวิธีสำหรับการค้นคว้าให้เข้าใจถึงกลไกการย่อยเซลล์เลสด้วยเอนไซม์ และเป็นประโยชน์อย่างมากในการนำมาใช้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลล์เลส รวมถึงการพัฒนาขบวนการผลิตเอนไซม์ สิ่งที่เป็นอุปสรรคต่อการพัฒนาวิธีการที่จะใช้วัดประสิทธิภาพของเอนไซม์แต่ละตัว ได้แก่ การขาดสับสเตรทหรือตัวยับยั้งที่จำเพาะ ที่จะใช้วัดประสิทธิภาพของเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่ง ในขณะที่มีเอนไซม์ชนิดอื่นๆ อยู่ด้วย

### 2.3.3 วิธีการตรวจสอบ

การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลส สับสเตรทที่นำมาใช้ในการตรวจสอบ ควรจะเป็นวัสดุเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ และถูกไฮโดรไลซ์ได้ไม่่ง่ายนัก แต่ในขณะเดียวกันต้องเป็นวัสดุที่สามารถทำให้ได้มาตรฐานได้ด้วย ปัจจัยอีกประการหนึ่งที่เกี่ยวข้องคือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากสับสเตรทเป็นวัสดุประเภทเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงต้องใช้ระยะเวลาให้เอนไซม์แพร่เข้าไปยังเส้นใยและให้ผลผลิตที่ได้จากการไฮโดรไลซ์แพร่ออกจากเส้นใยอุปสรรคประการหนึ่งที่เกิดขึ้นมาจากการที่เอนไซม์จะเข้าไปถึงพันธะกลูโคซิดิกที่บริเวณต่างๆ ของเส้นใยได้ยากง่ายต่างกัน ดังนั้นระยะเวลาในการวิเคราะห์ จึงต้องนานพอที่จะให้เอนไซม์เข้าไปไฮโดรไลซ์พันธะตรงบริเวณที่เอนไซม์เข้าไปได้ยาก สับสเตรทที่นำมาใช้เพื่อตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ ประกอบด้วย เส้นใยฝ้าย เควซล ซัลไฟท์พัลพ์ และกระดาษกรอง แต่สับสเตรทซึ่งมีการพิสูจน์แล้วว่ามีความเหมาะสมที่สุด คือ กระดาษกรอง ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ หนึ่งชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะมาตรฐาน การตรวจสอบประสิทธิภาพของ  $\beta$ -กลูโคซิเดส สับสเตรทที่ได้นำมาใช้ในการตรวจสอบ คือ เซลโลไบโอส ซาลิซิน และ  $\beta$ -ไนโตรพีนิล- $\beta$ -กลูไซด์ (ราบิน เดอร์ ศรีกิจจาภรณ์. 2531 : 6-7)

### 2.4 แหล่งของเซลลูเลส

จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการผลิตเซลลูเลส ควรมีความสมบัติเจริญเติบโตได้ง่าย ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง สามารถเคลื่อนย้ายเอนไซม์ที่ต้องการออกจากมวลเซลล์ได้ดี ไม่กลายพันธุ์ได้ง่าย และประการสำคัญต้องไม่ทำให้เกิดโรคหรือสร้างสารพิษ จุลินทรีย์ที่นำมาศึกษากันอย่างมากในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ *Trichoderma reesei* และ *Aspergillus niger* สำหรับเชื้อรา *T. reesei* เป็นเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลสทั้งระบบได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นเชื้อราที่มีการนำมาศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเซลลูเลสกันมากที่สุด สายพันธุ์ที่ใช้กันปัจจุบัน ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ปรับปรุงมาจาก *T. reesei* QM 6 A โดย US Army Natick Research and Development Command และโดยอาศัยสายพันธุ์นี้ได้มีการพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ QM 9213 และ QM 9414 ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้เพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 2.2 ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในน้ำหมักที่ได้จากเชื้อ *T. reesei* สามารถเก็บไว้ในที่เย็นหรือไลโอไฟไลเซชัน หรือผงอะซีโตนได้เป็นเวลาหลายเดือนโดยไม่สูญเสียคุณสมบัติ จุลินทรีย์ที่มีการดัดแปลงสายพันธุ์เหล่านี้ บางสปีชีส์สามารถสร้างโปรตีนภายนอกเซลล์ได้สูงถึง 10-20 กรัมต่อลิตร ส่วนประกอบหลักของโปรตีนชนิดนี้คือ เซลโลไบโอดีไฮโดรเลส ซึ่งมีอยู่ประมาณ 50-80 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนที่ขับออกมา นอกจากนี้มีเอน

โดกลูคาเนสอยู่ในสัดส่วนนี้น้อยกว่า และ  $\beta$ -กลูโคซิเดส อยู่ในระดับที่ต่ำมาก ดังตารางที่ 2.3 เพื่อที่จะขจัดปัญหาที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจาก การที่เอนไซม์ของ *T. reesei* มี  $\beta$ -กลูโคซิเดสต่ำ จึงมักทำการเติม  $\beta$ -กลูโคซิเดสที่ผลิตแยกต่างหากลงในระบบ เชื้อราที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ผลิต  $\beta$ -กลูโคซิเดส ได้แก่ *Aspergillus niger* ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อราดังกล่าวนี้สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ ในปริมาณที่สูงและมี ค่า Dissociation constant ( $K_d$ ) สูง ดังตารางที่ 2.3 และ 2.4 นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การใช้เซลล์ทั้งระบบที่ได้จาก *Aspergillus sp.* ร่วมกับเซลล์ที่ได้จาก *T. reesei* จะทำให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์สูงกว่าการใช้เฉพาะ  $\beta$ -กลูโคซิเดส ชนิดเดียวที่ได้จาก *Aspergillus sp.* (ราบิน เดอร์ ศรีกิจจาภรณ์. 2531 : 12).

## 2.5 คุณสมบัติของเซลล์

เซลล์ที่ได้จาก *T. reesei* เมื่อนำเซลล์ที่เตรียมได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *T. reesei* ไปแยกออกเป็นส่วและนำไปทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเซลล์ทั้งสามชนิดเกิดขึ้นหลายๆ แบบ ดังแสดงในตารางที่ 2.5 *T. reesei* มีการสร้างเอนโดกลูคาเนส I และ II เซลโลไบโอไฮโดรเลส CBHI และ CBHII เซลโลไบโอไฮโดรเลสแต่ละแบบจะมีปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกัน เซลโลไบโอไฮโดรเลส I (CBHI) สามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น 4 ไอโซไซม์ แต่ละ ไอโซไซม์มีมวลโมเลกุลเท่ากัน และมีชนิดของกรดอะมิโนเหมือนกันและมีปริมาณพอลิแซคคาไรด์อยู่ระหว่าง 1 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเซลล์ไฮโดรเลส II (CBHII) มี 2 ไอโซไซม์ (ราบิน เดอร์ ศรีกิจจาภรณ์. 2531 : 15)

ตารางที่ 2 การผลิตเซลลูเลสโดยเชื้อรา *T. reesei*<sup>1</sup>

สายพันธุ์ QM	น้ำหนัก แห้ง (mg/ml) <sup>2</sup>	โปรตีนใน สภาพ ละลายได้	ประสิทธิภาพของเซลลูเลส					
			Cx <sup>3</sup> (U/ml)		FP <sup>4</sup> (U/ml)		ฝ้าย (U/ml)	
			F <sup>5</sup>	H <sup>6</sup>	F <sup>5</sup>	H <sup>6</sup>	F <sup>5</sup>	H <sup>6</sup>
6a	2.4	0.7	8	10	0.3	0.3	1.9	1.6
9123	1.6	1.5	22	29	0.9	0.9	3.4	3.5
9414	1.1	1.5	31	32	1.0	1.0	3.0	2.9

ที่มา : ราบิน เดอร์ ศรีจางภรณ์. 2531 : 13

หมายเหตุ

- <sup>1</sup> คือ เชื้อที่เพาะอยู่บนถาด (plup) 1 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนเอส 0.1 เปอร์เซ็นต์ เปปโตเนอ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ทวีน 80 0.1 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็น ระยะเวลา 14 วัน
- <sup>2</sup> คือ รวมถึงเซลลูเลสที่ตกค้าง
- <sup>3</sup> คือ คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส
- <sup>4</sup> คือ กระดาษกรอง
- <sup>5</sup> คือ การวัดประสิทธิภาพจากสารละลายที่กรองได้
- <sup>6</sup> คือ การวัดประสิทธิภาพจากสารละลายที่กรองได้ + เชื้อ

ตารางที่ 3 ปริมาณสัมพัทธ์ของเซลลูเลสที่สร้างขึ้นโดย *T. reesei* และ *Aspergillus niger*

เอนไซม์	ปริมาณสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนนอกเซลล์ทั้งหมด)	
	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Aspergillus niger</i>
เซลโลไบโอไฮโดรเลส	50-80	0
เอนโดกลูคาเนส	8-12	2-3
$\beta$ -กลูโคซิเดส	0.2-1.0	2-3

ที่มา : ราบิน เดอร์ ศรีจางภรณ์. 2531 : 14

ตารางที่ 4 ค่า Michaelis-Menten ( $K_m$ ) และ  $K_i$  สำหรับ  $\beta$ -กลูโคซิเดส ที่แยกได้จาก

*T. reesei* และ *A. niger*

แหล่งที่มาของ $\beta$ -กลูโคซิเดส	$K_m$ (มิลลิโมลาร์)	$K_i$ สำหรับตัวยับยั้ง		$V_{max}^1$ in kat / เอนไซม์มิลลิกรัม
		กลูโคส (มิลลิโมลาร์) (มิลลิโมลาร์)	กลูโคโน - แลคโตน	
<i>Aspergillus niger</i>	0.8	2.1	0.04	1400
<i>Trichoderma reesei</i>	0.2	0.7	0.04	700

ที่มา : ราบิน เดอร์ ศรีกิจจาภรณ์. 2531 : 16

หมายเหตุ

<sup>1</sup> คือ อัตราเร็วสูงสุดของการเกิดปฏิกิริยา

ตารางที่ 5 เซลลูเลสชนิดต่างๆ ที่แยกได้จาก *T. reesei*

ชนิดเอนไซม์	มวลโมเลกุล	จุดไอโซอิเล็กทริก
เซลโลไบโอไฮโดรเลส	-	-
เซลโลไบโอไฮโดรเลส I (CBHI)	60,000	3.9
เซลโลไบโอไฮโดรเลส II (CBHII)	60,000	5.6
เอนโดกลูคาเนส	-	-
เอนโดกลูคาเนส I	20,000	7.5
เอนโดกลูคาเนส II	40,000	4.6
$\beta$ -กลูโคซิเดส	-	-
$\beta$ -กลูโคซิเดส I	47,700	5.74
$\beta$ -กลูโคซิเดส II	35,000	(-) <sup>1</sup>
$\beta$ -กลูโคซิเดส III	130,000	(-) <sup>1</sup>

ที่มา : ราบิน เดอร์ ศรีกิจจาภรณ์. 2531 : 17

หมายเหตุ

<sup>1</sup> คือ ไม่ได้ทำการตรวจสอบ

## 2.6 การสังเคราะห์เซลลูเลส (Cellulase Biosynthesis)

การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสเชื้อรา จะถูกควบคุมด้วยกลไกการเหนี่ยวนำการกดต้น (induction-repression mechanism) โดยเซลล์ของเชื้อราจะสร้างเอนไซม์เซลลูเลสนอกเซลล์ก็ต่อเมื่อมีสับสเตรทที่เหมาะสมอยู่ในอาหารเพาะเชื้อ และการสังเคราะห์เซลลูเลสนอกเซลล์ที่เกิดขึ้นหลังจากมีการเหนี่ยวนำ จะถูกยับยั้งได้เมื่อมีกลูโคสหรือน้ำตาลอื่นๆ บางชนิดอยู่ในอาหารเพาะเชื้อ นอกจากนี้ยังมีกลไกอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

### 2.6.1 กลไกการขนส่งที่ควบคุมการขับเอนไซม์เซลลูเลสออกนอกเซลล์

2.6.1.1 ระบบเอนไซม์ขนส่ง และ/หรือ ระบบไกลโคซิเดส ที่ควบคุมการขนส่งและการใช้ตัวเหนี่ยวนำพอแทนเซียม (potential inducer)

2.6.1.2 ระบบการขนส่งและกลูโคซิเดสที่ยึดจับบริเวณเยื่อเซลล์ซึ่งจะเป็นตัวควบคุมปริมาณของตัวเหนี่ยวนำที่เข้าสู่เซลล์ ในขณะที่กลูโคซิเดสในเซลล์จะเป็นตัวควบคุมปริมาณตัวเหนี่ยวนำแอคทีฟ (active inducer)

2.6.1.3 สัมพรรคภาพระหว่างตัวเหนี่ยวนำและตัวกดต้น (affinity of inducer-repressor) จะเป็นตัวกำหนดประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำ ในขณะที่การกดต้นแคทาบอลไลท์ และครึ่งชีวิตของ m-RNA จะเป็นตัวควบคุมประสิทธิภาพที่แท้จริงของการถอดรหัสและการแปลรหัส

2.6.1.4 ปริมาณกลูโคส และกลูโคโรแลกโตน (ผลผลิตที่ได้จากการออกซิเดชันกลูโคส) ในเซลล์ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์กลูโคซิเดสในเซลล์ (ราบิน เดอร์ ศรีกิจจา ภรณ์. 2531 : 22)

### 2.6.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เก็ดจิล เอ็น.เอ และคณะ (Gadgil, N.J e al. 1995 : 942-946) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อ *T. reesei* ที่กลายพันธุ์ พบว่าความต้องการสำหรับการปรับปรุงแหล่งพลังงานโดยใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสเป็นจุดที่น่าสนใจที่ เซลลูโลสสามารถย่อยให้เป็นน้ำตาลได้โดยเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรา *T. reesei* QM9414 ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้กลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเล็ต 45 นาที และโซเดียมไนไตรท์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อดังกล่าวสามารถต้านทานการ catabolite repression โดยกลูโคสและเซลโลไบโอส

นอกจากนั้นเร็กซี และคณะ (Reczey, K et al. 1996 : 25-30) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *T. reesei* พบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อดังกล่าวบนต้นหลิวที่

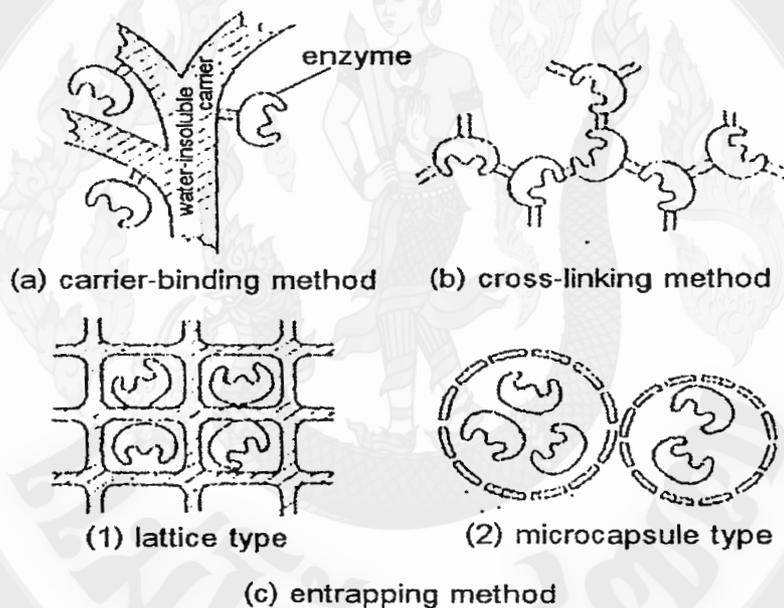
เตรียมด้วยไอน้ำ ซึ่งมีปริมาณเซลลูโลสในปริมาณที่แตกต่างกัน ในการหมักในขวดรูปชมพู่ที่เขย่าให้อากาศ และในถังหมักขนาด 4 ลิตร และ 22 ลิตร ความเข้มข้นของต้นหลิวที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร หลังจากหมักใน ถังหมักขนาด 22 ลิตร ได้ผลผลิตกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 108 FPU/g อย่างไรก็ตาม ผลผลิตกิจกรรมเอนไซม์ของการหมักในขวดรูปชมพู่ และในถังหมักขนาด 4 ลิตร ต่ำกว่า 100 FPU/g ต้นหลิวที่เตรียมด้วยไอน้ำ หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์พบว่าจะมีปริมาณเซลลูโลสต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ การใช้ต้นหลิวที่เตรียมโดยใช้ไอน้ำที่กำจัดลิกนินออกมาใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณต่ำ แสดงว่าลิกนินไม่ได้มีผลในการยับยั้งการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ลิหมิงและเพยลิน (Liming, X and Peilin, C. 1999 : 909-912) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยซึ่งหมักแบบใช้อาหารแข็งโดยใช้ขี้ข้าวโพดเหลืองทิ้งและเศษลิกนินเซลลูโลสจากอุตสาหกรรมการผลิตไซโลส โดยใช้เป็นสับสเตรทของเชื้อรา *T. reesei* ZU-02 กระบวนการหมักจะถูกศึกษาโดยใช้ถังหมักแบบ shallow tray fermenter กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่วัดได้สูงสุด คือ 158 IFPU/g ของโคจิจที่ได้จากการหมักครั้งที่ 2 เมื่อเพิ่มขนาดการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะต้องใช้ถังหมักที่มีความลึกและมีการให้อากาศร่วมด้วยจะได้กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส 128 IFPU/g ของโคจิจ หรือประมาณ 305 IFPU/g ของเซลลูโลส ภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 5 วัน การผลิตเอนไซม์จากโคจิจสามารถใช้ได้โดยตรงกับการย่อยขี้ข้าวโพดที่เหลืองทิ้งจากการเกษตร

เวนลี่ ซี และคณะ (Wen, Z et al. 2004 : 491-499) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากฟางข้าวในคอกปศุสัตว์ โดยใช้เชื้อ *T. reesei* RUT-C30 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่า *T. reesei* QM 9414 และการทำให้ปุ๋ยคอกโรงโคนมละเอียดเป็นชิ้นเล็กๆ โดยใช้เครื่องบดเพื่อลดขนาดเส้นใยทำให้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเกิดขึ้นได้สูง สภาวะการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของ *T. reesei* RUT-C30 บนปุ๋ยคอกโรงโคนมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดังนี้ ความเข้มข้นของปุ๋ยคอกโรงโคนม คือ 10 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิการหมัก 25.5 องศาเซลเซียส และ ค่าพีเอช 5.7 การกำจัดแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต แอมโมเนียม ยูเรีย และ แร่ธาตุ ออกจากวัสดุจะไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ขณะที่การกำจัดฟอสเฟตออกจะทำให้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสลดลง อาหารที่ใช้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *T. reesei* RUT-C30 จะเพิ่มโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ทวิน 80 และ  $\text{CoCl}_2$  เพาะเลี้ยงโดยใช้เวลา 6-8 วัน ได้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด เท่ากับ 1.74 IU/ml กิจกรรมเอนไซม์ CMCase เท่ากับ 12.22 IU/ml และ กิจกรรมเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase เท่ากับ 0.0978 IU/ml

## 2.7 การตรึงเซลล์

เซลล์ที่ถูกตรึง (immobilized cells) หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขตหรือสถานที่ทางฟิสิกส์ ให้อยู่ในบริเวณที่ทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง หรือใช้ได้อย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพแวดล้อมที่กำลังเจริญเติบโต เซลล์ระยะพักตัว หรือเซลล์ที่ตายแล้วก็ได้ ซึ่งวิธีการตรึงเซลล์แบ่งออกได้เป็น 3 วิธีใหญ่ๆ คือ การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking method) และการห่อหุ้ม (entrapping method) ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 รูปแบบการตรึงเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ

ที่มา : สมใจ ศิริโชค. 2547 : 222

### 2.7.1 วิธีการยึดด้วยตัวนำ (Carrier-Binding Method) หมายถึง

หมายถึงวิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยตรงกับตัวนำที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble carrier) ซึ่งอาจแบ่งย่อยได้ 2 วิธี คือ

#### 2.7.1.1 วิธีการแบบดูดซับ (Adsorption Method)

เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับอยู่กับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะ ไอออนิก พันธะไฮโดรโฟบิก หรือพันธะไฮโดรเจน โดยอาศัยหลักธรรมชาติทางเคมีเนื่องจากผนังเซลล์



### 2.7.2 การเชื่อมแบบไขว้ (Cross-Linking Method)

เป็นการเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าด้วยกันโดยใช้สารพวก multifunctional reagent เช่น glutaraldehyde และ toluene diisocyanate เป็นต้น การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะแตกต่างจากวิธีอื่นๆ คือ เซลล์ไม่ได้ถูกตรึงอยู่กับสารที่เป็นตัวดูดซับหรือถูกห่อหุ้มอยู่ในเนื้อเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) แต่เป็นการเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันโดยใช้สารเคมีภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง ทำให้เซลล์ได้ ดังนั้นการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับกรณีที่ต้องการใช้ปฏิกิริยาเชิงเดี่ยว (single reaction) เท่านั้น

### 2.7.3 การตรึงแบบห่อหุ้ม (Entrapping Method)

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ microencapsulation และ lactice type

#### 2.7.3.1 การห่อหุ้มเซลล์ไว้ในแคปซูล (Microencapsulation)

หมายถึง การห่อหุ้มเซลล์ไว้ในเนื้อเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) เช่น คอลโลอิดียน (colloidian) หรือซิลิโคน (silicone) ซึ่งเป็นการป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ แต่ยอมให้สับสเตรทหรือผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่ไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรม และอาจมีปัญหาการตกตะกอนของเซลล์เกิดขึ้นด้วย ดังนั้นการนำไปใช้ประโยชน์จึงมีข้อจำกัด นิยมใช้ในด้านอุตสาหกรรมยาและการวิเคราะห์เท่านั้น

#### 2.7.3.2 การตรึงเซลล์ให้อยู่ในช่องว่างสามมิติ (Lactice Type)

หมายถึง การตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ไว้ในช่องว่างสามมิติในเจลของสารพอลิเมอร์ กาดึงโดยวิธีการห่อหุ้มโดยทั่วไปจะหมายถึง แบบ lactice type ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและประสบผลสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากใช้ได้กับเซลล์เกือบทุกชนิด ในขณะที่วิธีอื่นมีข้อเสียเปรียบมากกว่าสำหรับสารที่นิยมใช้เป็นตัวห่อหุ้ม และประสบผลสำเร็จในการใช้ระดับอุตสาหกรรมแล้ว ได้แก่ โพลีอะคริลิไมด์ คาร์ราจีเนท และแคลเซียมอัลจิเนท

1) การตรึงเซลล์ด้วยโพลีอะคริลิไมด์ โพลีอะคริลิไมด์เป็นสารชนิดแรกที่น่านำมาใช้ในการตรึงเซลล์โดยวิธีการห่อหุ้มและได้รับความสำเร็จในการตรึงเซลล์ในระดับอุตสาหกรรมแล้ว การตรึงเซลล์ด้วยโพลีอะคริลิไมด์ทำได้โดยนำสารละลายของเซลล์ผสมลงในสารละลายโพลีอะคริลิไมด์โมโนเมอร์ แล้วทำให้เกิดการพอลิเมอร์ไรซ์โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับการเตรียมโพลีอะคริลิไมด์เจลในการทำอิเล็กโตรไฟริซิสโดยใช้ N,N'-methylenebisacrylamide เป็นตัวทำให้เกิดการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลของ อะคริลิไมด์ (cross linking agent) โดยใช้โฟแตสเซียมเปอร์ซัลเฟตหรือแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเพื่อทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) และเป็นสารเริ่มต้น (initiator) การเกิดพอลิเมอร์ โดยใช้  $\beta$ -dimethylaminopropionitrile หรือ

TEMED (N,N,N',N'-tetremethylenediamine) เป็นตัวเร่ง (accelerator) โพลีอะคริลาไมด์เจลที่เกิดขึ้นจะมีขนาดของรู (pore zone) ภายในเจล และความแข็งแรงของเจลจะแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์โมโนเมอร์ cross linking agent และปริมาณเซลล์ที่ใช้ ข้อเสียของการตรึงเซลล์โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์ คือ สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมเจลรวมทั้ง อะคริลาไมด์โมโนเมอร์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงต้องให้เซลล์สัมผัสกับสารต่างๆ เหล่านี้ใน เวลาสั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้ และในระหว่าง โพลีเมอไรซ์จะมีความร้อนเกิดขึ้น ซึ่งอาจมีผลต่อเซลล์ ได้ ดังนั้นการทำโพลีเมอไรซ์จึงควรทำที่อุณหภูมิต่ำ

2) การตรึงเซลล์ด้วยคาร์ราจีแนน เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล ประกอบด้วย  $\beta$ -D-dalactose sulfate และ 3,6-anhydro- $\alpha$ -D-galactose คาร์ราจีแนนที่สกัดได้จากสาหร่ายสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิดคือ kappa, iota และ lambda carrageenan แต่ที่สามารถเกิดเจลได้มี 2 ชนิด คือ kappa และ iota carrageenan แต่การตรึงเซลล์โดยทั่วไปนิยมใช้ kappa (K) carrageenan เนื่องจากสามารถทำให้เกิดเจลที่มีลักษณะแข็งแรง การตรึงเซลล์ด้วย คาร์ราจีแนนทำได้โดยใช้ความร้อนประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส ช่วยในการเตรียมสารละลาย คาร์ราจีแนน เพื่อให้คาร์ราจีแนนละลาย จากนั้นผสมสารละลายของเซลล์ลงไปที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่ลงในสารละลายเกลือไปแทสเซียม หรือเกลือแอมโมเนียมที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเกิดเจลขึ้น หลังจากนั้นอาจนำเจลที่ได้ใส่ลงใน hardening agent เช่น glutaraldehyde หรือ methylenediamine เพื่อทำให้เจลมีความคงตัวดีขึ้น การตรึงเซลล์ด้วยคาร์ราจีแนนมีข้อดี คือ วิธีการตรึงสามารถทำได้ง่ายสะดวก รวดเร็ว และมีความปลอดภัย เนื่องจาก คาร์ราจีแนนได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารมาเป็นเวลานานแล้ว และในการตรึง ไม่มีการใช้สารเคมีอื่นที่เป็นพิษ จึงทำให้ไม่เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเอนไซม์ นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมเจลได้หลายรูปแบบให้มีความเหมาะสมต่อสภาพการใช้งาน และเจลที่ได้ใน สารละลายน้ำเกลือ (normal saline) จึงสามารถศึกษาการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์ภายในเจลหลังการตรึงเซลล์ได้ สำหรับข้อเสียของวิธีการนี้ คือ คาร์ราจีแนนมีความแข็งแรง และความคงตัวต่ำกว่าอะคริลาไมด์เจล และเมื่ออยู่ในสภาพที่ไม่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดเจล (gel-inducing agent) เซลล์จะร่วงออกมาจากเจลได้

3) การตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนท อัลจิเนท เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย D-mannuronic acid และ L-guluronic acid สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล อัลจิเนทสามารถที่จะเกิดเจลได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีไอออนของโลหะโพลีวาเลนต์ เช่น  $Al^{3+}$  และ  $Ca^{2+}$  การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนทสามารถทำได้โดยการผสมสารละลายของเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนท แล้วนำไปหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์จากนั้น

จะเกิดแคลเซียมอัลจิเนทเจลขึ้นทันที หลังการตรึงเซลล์ควรแช่เจลไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เกิดเจลขึ้นอย่างสมบูรณ์ ตารางที่ 2.6 เป็นตัวอย่างเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนท ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของเซลล์ ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนท ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลและองค์ประกอบทางเคมี อัตราส่วนระหว่าง D-mannuronic acid และ L-guluronic acid ของอัลจิเนท ความเข้มข้นของอัลจิเนท (0.5–10 เปอร์เซ็นต์) และแคลเซียมคลอไรด์ (0.05–2 เปอร์เซ็นต์) อุณหภูมิที่ใช้ (0–80 องศาเซลเซียส) ขนาดของเม็ดเจล (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1–5 มิลลิเมตร) และปริมาณเซลล์ที่ใช้ (สูงสุดได้ถึง 30 กรัมต่อมิลลิลิตร) การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนทมีข้อดีหลายประการคือ ทำได้ง่ายภายใต้สภาวะปกติสะดวกและรวดเร็ว ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต นอกจากนี้การตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนทยังเป็นวิธีที่ปลอดภัย เนื่องจากอัลจิเนทได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารมานานแล้วเช่นเดียวกับคาร์ราจีแนน เซลล์ที่ถูกตรึงสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ภายในเจล ทำให้ใช้ได้เป็นเวลานาน และเจลที่ได้สามารถละลายได้ในน้ำเกลือจึงสามารถศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ภายในเจลหลังการตรึงเซลล์ได้ด้วย ข้อเสียของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนท คือ เจลไม่แข็งแรง เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีตัวจับแคลเซียม (calcium-chelating agent) เช่น ฟอสเฟต และ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ซึ่งสามารถดึง  $\text{Ca}^{2+}$  ได้ทำให้เจลไม่คงตัว เจลเกิดการละลายและเซลล์รั่วออกมาได้ นอกจากนี้เซลล์ยังอาจรั่วออกมานอกเจลได้ในกรณีที่เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นภายในเจล และเจลเกิดความเสียหายในกรณีใช้เซลล์ตรึงในถังหมักที่มีเครื่องกวนรุนแรง (สมใจ ศิริโชค. 2547 : 220-229)

ตารางที่ 6 ตัวอย่างเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนทและผลผลิตที่ได้

เซลล์ที่ถูกตรึง	ผลิตภัณฑ์ที่ได้
<i>Arthrobacter simplex</i>	Prednisolone
<i>Aspergillus niger</i>	Citric acid, Gluconic acid
<i>Clostridium butyricum</i>	Isopropanol, n-Butanol
<i>Lactobacillus delbruekii</i>	Lactic acid
<i>Lactobacillus lactis</i>	Lactic acid
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Ethanol
<i>Penicillium chysogenum</i>	Penicillin G
<i>Propionibacterium sp.</i>	Vitamin B12
<i>Saccharomyces cerevisiea</i>	Ethanol
<i>Saccharomyces formosensis</i>	Ethanol
<i>Streptomyces sp.</i>	Tyrosin
<i>Streptomyces tendae</i>	Nikkomycin
<i>Trigonopsis variabilis</i>	-Keto acid
<i>Zymomonas mobilis</i>	Ethanol

ที่มา : สมใจ ศิริโชค. 2547 : 228

## 2.8 ข้อดีและข้อเสียของเซลล์ที่ถูกตรึง

### 2.8.1 ข้อดีของเซลล์ที่ถูกตรึง

2.8.1.1 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมีเซลล์ที่ถูกตรึงจะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายในสภาวะปกติและให้พลังงานต่ำปฏิกิริยามีความจำเพาะ และเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูง และมีปัญหามลภาวะน้อยกว่าการใช้ตัวเร่งทางเคมี

2.8.1.2 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระเซลล์ที่ถูกตรึงจะสามารถใช้ซ้ำในระบบ การหมักแบบกะ (batch) หรือระบบต่อเนื่องได้ง่ายกว่ามีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้น้อยลง การแยกผลผลิตทำได้ง่ายกว่า เซลล์ที่ถูกตรึงซึ่งเป็นเซลล์ในระยะพักตัวต้องการพลังงานน้อย เพียงเพื่อรักษาสภาพความอยู่รอด ทำให้ได้ผลผลิตสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ

2.8.1.3 เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระเซลล์ที่ถูกตรึงจะสามารถใช้ซ้ำในระบบการหมักแบบกะ หรือระบบต่อเนื่องได้ และการแยกผลผลิตทำได้ง่ายกว่า ในขณะที่การแยกเอนไซม์ออกจากผลผลิตทำได้ยาก ทำให้การนำกลับมาใช้ซ้ำหรือการใช้อย่างต่อเนื่องทำได้ยาก

2.8.1.4 เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึงเซลล์ที่ถูกตรึงจะมีราคาถูกกว่า เนื่องจากไม่จำเป็นต้องสกัดเอนไซม์ออกจากตัวเซลล์ และไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ ช่วยลดการสูญเสียความสามารถของเอนไซม์ โดยเฉพาะเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ หรือเอนไซม์ที่เมื่อสกัดออกจากเซลล์แล้วไม่คงตัว สามารถเตรียมได้ปริมาณมากๆ และใช้ได้ในปฏิกิริยาที่ต้องใช้เอนไซม์หลายชนิด

#### 2.8.2 ข้อเสียของเซลล์ที่ถูกตรึง

2.8.2.1 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมีเซลล์ที่ถูกตรึงจะต้องการสารประกอบเชิงซ้อน เช่น โคแฟคเตอร์ และมีความคงทนน้อยกว่าตัวเร่งทางเคมี จึงต้องควบคุมสภาวะของปฏิกิริยาอย่างระมัดระวัง

2.8.2.2 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระเซลล์ที่ถูกตรึงจะเซลล์อาจสูญเสียความสามารถบางส่วนในระหว่างการตรึง

2.8.2.3 เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระเซลล์ที่ถูกตรึงจะเสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์ เซลล์อาจสูญเสียความสามารถบางส่วนในระหว่างการตรึง และการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงเนื่องจากภายในเซลล์มีเอนไซม์หลายชนิด

2.8.2.4 เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึงเซลล์ที่ถูกตรึงจะมีการจำกัดการซึมผ่านของสับสเตรทและผลผลิตผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ การเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงเนื่องจากภายในเซลล์มีเอนไซม์หลายชนิด ดังนั้นจึงอาจพบการปนเปื้อนของผลผลิตอื่นๆ จากตัวเซลล์ ในกรณีที่เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเองเมื่อถูกใช้เป็นเวลานาน หรือเซลล์รั่วไหลเนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงมีการเจริญเพิ่มจำนวนทำให้ความบริสุทธิ์และปริมาณของผลผลิตที่ได้น้อยกว่าการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง และไม่สามารถใช้ได้ในกระบวนการที่เกี่ยวกับเอนไซม์ภายนอกเซลล์ ยกเว้นกรณีที่สามารถปล่อยเอนไซม์ออกมาได้อย่างต่อเนื่องในขณะใช้งาน (สมใจ ศิริโชค. 2547 : 230-231)

#### 2.8.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kannan และคณะ ได้ศึกษาการพัฒนาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสโดยใช้เชื้อ *Zymomonas mobilis* ที่ดัดแปลงสายพันธุ์ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสโดยใช้เชื้อ *Z. mobilis* LSIA ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่มีเอนไซม์ levansucrase (SacB) และเอนไซม์ซูเครส (SacA) ซึ่งเป็นการศึกษาการหมักด้วยวิธีการตรึงเซลล์โดยใช้อัลจินาต (alginate) พบว่า

สามารถผลิตเอทานอลได้สูง 73.5 กรัมต่อลิตร สูงกว่าเชื้อ *Z. mobilis* B-806 คานัน ที อาร์ และคณะ (Kannan, T.R *et al.* 1998 : 179-184)

นอกจากนั้น Sreekumar และคณะ ได้ศึกษาองค์ประกอบของสารละลายสำหรับใช้ในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *Z. mobilis* พบว่ากลูโคสและสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เป็นองค์ประกอบสำคัญในสารละลายซึ่งมีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอล นอกจากนั้นปริมาณเชื้อเริ่มต้นแอมโมเนียมซัลเฟต และฟอสเฟต ปริมาณเพียงเล็กน้อยจะมีผลเช่นเดียวกับองค์ประกอบอื่นๆ เช่น กลูโคส 120.4 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.96 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.002 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 6.5 กรัมต่อลิตร และ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดคือ  $\log_{10} 8.4$  เซลล์ต่อลิตร หรือ 0.9243 เซลล์ต่อลิตร ศรีคุมา โอ และคณะ (Sreekumar, O *et al.* 1999 : 334-338)

Linda และคณะ ศึกษาการใช้เชื้อ *Z. mobilis* ZM4 เพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำหมักซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเอทานอลจากแป้งโดยมีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ของส่วนประกอบทั้งหมดการย่อยเอมิเซลลูโลส และเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาล และการเปลี่ยนสารดังกล่าวไปเป็นเอทานอลมีความเป็นไปได้ที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก การย่อยเศษฟาง ให้เป็นน้ำตาลโดยใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5.5 ชั่วโมง พบว่าได้น้ำตาล ไชโลส 18 กรัมต่อลิตร อะราบิโนส 11.5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลกลูโคส 6.5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้การย่อยโดยใช้เอนไซม์จะสามารถเพิ่มปริมาณกลูโคสได้ประมาณ 61 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าเฟอร์ฟูรอล (furfural) อะซีเตท และแลกเตท จะเป็นตัวยับยั้งหลักในการย่อยเศษฟางโดยกรด ส่วนสารยับยั้ง hydroxymethylfuraldehyde, hydroxybenzaldehyde, vanillin และ syringaldehyde ตรวจไม่พบซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการเติมปูนขาวลงไปจนได้ ค่า pH 5 จะสามารถลดปริมาณเฟอร์ฟูรอลลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ การหมักโดยการเพิ่มปริมาณกลูโคสเป็น 10 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *Z. mobilis* ZM4 สามารถผลิตเอทานอลได้ 11 กรัมต่อลิตร และเหลือไชโลส 12 กรัมต่อลิตร ในเวลา 70 ชั่วโมง ส่วนการเพิ่มสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร จะสามารถผลิตเอทานอลได้ถึง 28 กรัมต่อลิตร และเหลือไชโลส 2.6 กรัมต่อลิตร ในเวลา 18 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า *Z. mobilis* มีความเหมาะสมต่อการหมักโดยใช้กลูโคสและไชโลส ที่ได้จาก การย่อยเศษฟางโดยใช้กรด ลินดา ดาวิส และคณะ (Linda Davis *et al.* 2005 : 49-59)

## 2.9 เอทานอล (Ethanol)

เอทานอล (ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) คือสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เอทานอลเป็น แอลกอฮอล์ที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งเพื่อการบริโภค (beverage alcohol) ซึ่งหมายถึง รูปแบบใดๆ ของเอทานอลที่ถูกกลั่น และมีความเหมาะสมสำหรับการบริโภคของมนุษย์ตามกฎหมาย โดยมักจะมีข้อจำกัดว่าเป็นแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักด้วยกระบวนการทางธรรมชาติไม่ใช่กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี แอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นเชื้อเพลิง (fuel alcohol) fuel alcohol หมายถึง เอทานอลที่ถูกกำจัดน้ำออกเกือบหมด หรือเอทานอลไร้น้ำ (anhydrous ethanol) ที่มีความบริสุทธิ์สูงถึง 99.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถนำมาใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงได้ 3 รูปแบบ ได้แก่

1. ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงเพื่อทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล
2. ใช้ผสมกับน้ำมันเบนซิน เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (gasohol) หรือผสมกับน้ำมันดีเซล เรียกว่า ดีโซฮอล์ (diesohol)
3. ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนให้กับน้ำมันที่ใช้ในเครื่องยนต์ได้แก่ ethyl tertiary butyl ether (ETBE)

### 2.9.1 วิธีการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) และกระบวนการหมัก (fermentation)

2.9.1.1 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีเป็นการผลิตจากอนุพันธ์ของสารปิโตรเลียม เช่น เอทิลีนด้วยปฏิกิริยาการระเหยน้ำ (dehydration) เป็นต้น

2.9.1.2 กระบวนการหมัก เป็นการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์ จะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกยีสต์จะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) เป็นอาหารแล้วเปลี่ยนน้ำเป็นเอทานอลโดยกระบวนการ glycolysis ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนดังสมการ



ตามทฤษฎีน้ำตาลกลูโคส 100 เปอร์เซ็นต์ จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอล 48.89 และ 51.11 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดการสูญเสียได้สารประกอบอื่นๆ หรือใช้ในการสร้างเซลล์ของยีสต์ ทำให้ได้เอทานอลประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์

เมื่อได้เอทานอลแล้ว ขั้นตอนที่ 2 จึงเป็นการทำให้เอทานอลที่ได้มีความเข้มข้นและมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยวิธีการกลั่น

### 2.9.2 วัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล

ปัจจุบันการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมทั่วโลกประมาณ 93 เปอร์เซ็นต์ จะใช้กระบวนการหมัก ซึ่งวัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลจะเป็นสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอยู่ในโครงสร้างโมเลกุล สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

2.9.2.1 วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด ข้าวบาเลย์ มันฝรั่ง และมันเทศ ในการผลิตเอทานอลนั้นแป้งในวัตถุดิบจะต้องถูกย่อย (starch hydrolysis) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ยีสต์จึงจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลได้ ซึ่งการย่อยแป้งจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

1) การย่อยครั้งแรกหรือการทำให้เหลว (liquefaction) ขั้นตอนนี้จะใช้กรดหรือเอนไซม์กลุ่มแอลฟาอะมิเลส ( $\alpha$ -amylase) ที่มีกิจกรรมการย่อยแป้งที่อุณหภูมิสูงประมาณ 80 ถึง 95 องศาเซลเซียส ทำให้ได้โมเลกุลขนาดเล็กและมีความหนืดลดลง ของเหลวที่ได้จะมีค่าสมมูลเด็กซ์โทรส (dextrose equivalent, DE) อยู่ในช่วง 10-15 เรียกว่า เด็กซ์ทริน

2) การย่อยครั้งสุดท้ายหรือการทำให้หวาน (saccharification) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์กลูโคอะมิเลส (glucoamylase) ย่อยเด็กซ์ทรินเพื่อให้ได้น้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลเดี่ยวหรือเล็กที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งโดยทั่วไปเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงปานกลาง คือ 55 ถึง 65 องศาเซลเซียส

2.9.2.2 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย กากน้ำตาล ไฮเทสต์โมลาส ข้าวฟ่างหวาน หัวผักกาดหวาน ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลจากวัตถุดิบประเภทนี้ได้โดยตรง และไม่ต้องผ่านกระบวนการย่อยเพื่อให้น้ำตาล

2.9.2.3 วัตถุดิบที่เป็นผลพลอยได้จากภาคการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว กากอ้อย ชังข้าวโพด และของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 4 ชนิด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และสารประกอบอื่นๆ ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบกลุ่มนี้จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ ดังนี้

1) การเตรียมวัตถุดิบ (pretreatment) เป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของเซลลูโลส เพื่อให้เอนไซม์เซลลูเลสสามารถเข้าถึง และย่อยสลายเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น การเตรียมวัตถุดิบสามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมี ได้แก่ การย่อยโดยใช้กรดเจือจาง หรือกรดเข้มข้น หรือย่อย

ด้วยต่าง เป็นต้น ส่วนวิธีทางกายภาพ ได้แก่ การใช้ไอน้ำ เป็นต้น หรืออาจใช้ 2 วิธีร่วมกันได้ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ

2) การย่อย มี 2 วิธี คือ การย่อยด้วยกรดหรือการย่อยด้วยเอนไซม์ การย่อยด้วยกรดจะมี 2 ชั้น ชั้นแรกจะเป็นการย่อยเฮมิเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลเพนโตส จากนั้นชั้นที่สองจะเป็นการย่อยเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลกลูโคส ส่วนการย่อยด้วยเอนไซม์จะใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพื่อเป็นเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส

3) การหมักน้ำตาลที่ได้ให้เป็นเอทานอล โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลชนิดนั้นๆ ได้ (เก๋อกุล ปิยะจอมขวัญ และคณะ. 2548 : ออนไลน์)

2.9.3 กระบวนการผลิตเอทานอลประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ประการ คือ

2.9.3.1 การเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก

การเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมักขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ ถ้าเป็นวัตถุดิบที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย การจัดเตรียมก็ทำได้ง่าย เช่น กากน้ำตาล เพียงเจือจางด้วยน้ำ ปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมก็สามารถนำไปหมักได้ แต่ถ้าเป็นวัตถุดิบประเภทแป้งหรือเซลลูโลส ต้องผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลด้วยกรด หรือเอนไซม์ เพื่อให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมที่จะนำไปหมักต่อไป กระบวนการทางชีวเคมี เพื่อเปลี่ยนแป้งให้อยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส กระบวนการที่นิยมคือ วิธีการย่อยโดยใช้กรด (acid hydrolysis) เป็นวิธีการย่อยด้วยกรด และวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) เป็นวิธีการใช้เอนไซม์ในการย่อยแป้ง วิธีการย่อยด้วยเอนไซม์จะนิยมมากกว่าเนื่องจากมีความสะอาด ประหยัดต้นทุน ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และมีความจำเพาะต่อผลิตภัณฑ์

2.9.3.2 การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum) และกระบวนการหมัก (Fermentation)

ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่แข็งแรง ปริมาณมากพอสำหรับใช้ในกระบวนการหมัก ทั้งนี้ต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ เมื่อเตรียมหัวเชื้อเรียบร้อยแล้วจึงถ่ายลงในถังหมักผสมกับวัตถุดิบ จากนั้นทำการปรับและควบคุมสภาวะของการหมัก ชนิดของผลิตภัณฑ์ และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ เชื้อยีสต์ที่นำมาใช้จะเป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้ว เช่น *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น ซึ่งเมื่อใช้วัตถุดิบต่างประเภทกันแล้วจะต้องใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ต่างกันด้วย อย่างไรก็ตามขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อไม่จำเป็นต้องมีหากมีการนำเอาเชื้อยีสต์แห่งมาใช้แทนขั้นตอนการหมัก เมื่อเตรียมวัตถุดิบพร้อมแล้วนำมาถ่ายลงในถังหมัก (fermenter) วัตถุดิบอาจผ่าน หรือไม่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของการหมักหรือวัตถุดิบที่ใช้ ขั้นตอนการหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงาน

ของเชื้อยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และความร้อนเกิดขึ้น โดยทั่วไปจะใช้เวลาในการหมัก 2-3 วัน เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 8-12 เปอร์เซ็นต์ โดยประมาณ

### 2.9.3.3 การแยกผลิตภัณฑ์เอทานอล และการทำให้บริสุทธิ์ (Purification)

เป็นขั้นตอนการแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลที่มีความเข้มข้นประมาณ 8-12 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรออกจากน้ำหมัก หรือน้ำสาโดยใช้กระบวนการกลั่นลำดับส่วน ซึ่งแยกเอทานอลได้ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เพื่อวัตถุประสงค์ในการนำไปผลิตเชื้อเพลิงจึงต้องทำให้เอทานอลบริสุทธิ์ไม่ต่ำกว่า 99.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรที่มีชื่อเรียกว่า เอทานอลไร้น้ำ (anhydrous ethanol) จึงต้องมีกระบวนการแยกต่อเนื่องไปอีกดังนี้

1) กระบวนการแยกโดยวิธีการกลั่นสกัดแยกกับสารตัวที่สาม วิธีนี้เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้มานานปัจจุบันก็ใช้อยู่ แต่ได้มีการปรับเปลี่ยนสารตัวที่สามจากเดิมใช้เบนซินมาใช้ ไฮโคลเฮกเซนซึ่งมีอันตรายน้อยกว่า

2) กระบวนการแยกด้วยวิธีการใช้เมมเบรน

3) กระบวนการแยกด้วยวิธีโมเลกุลชาติ

### 2.9.4 การนำเอทานอลมาประยุกต์ใช้เป็นเชื้อเพลิง

การใช้เอทานอลบริสุทธิ์เป็นเชื้อเพลิงที่สะดวกในขณะนี้ โดยต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ คือการใช้ในรูปของการผสมกับน้ำมัน โดยที่เอทานอลที่ผสมในสัดส่วน 5-30 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร จะสามารถใช้ทดแทนสารเอ็มทีบีอี (methyl tertiary butyl ether; MTBE) ที่เป็นสารเพิ่มออกซิเจนและออกเทนในน้ำมันได้ ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงในหลายประเทศ เช่นบราซิลจะนำเอทานอลความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร มาผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วน 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร และให้ชื่อผลิตภัณฑ์ว่า proalcohol สหรัฐอเมริกาใช้เอทานอลผสมกับน้ำมันเบนซินไร้สารตะกั่วในอัตราส่วน 10:90 เรียกว่า แก๊สโซฮอลล์ (gasohol) ออสเตรเลียนำเอทานอลผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วน 15:85 และใช้เป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์ให้ชื่อผลิตภัณฑ์ว่า petranol ฟิลิปปินส์ผสมเอทานอลที่ผลิตจากอ้อยกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วน 20:80 เรียกว่า alcogas เป็นต้น สำหรับในประเทศไทยได้มีการใช้สูตร E 10 เพื่อเพิ่มค่าออกเทนซึ่งก็คือ น้ำมันเบนซิน 91 (90 เปอร์เซ็นต์) ผสมกับเอทานอล (10 เปอร์เซ็นต์) โดยปริมาตร ก็จะได้ไบโอเอทานอล (bio-ethanol) หรือน้ำมันเบนซิน 95 สามารถนำไปใช้กับเครื่องยนต์ ทั่วไปได้โดยไม่เกิดปัญหากับเครื่องยนต์ ความต้องการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีต่างๆเพื่อพัฒนาพลังงานทดแทนภายใน 20 ปี (สำนักวิทยาศาสตร์. 2544 : 17-19)