

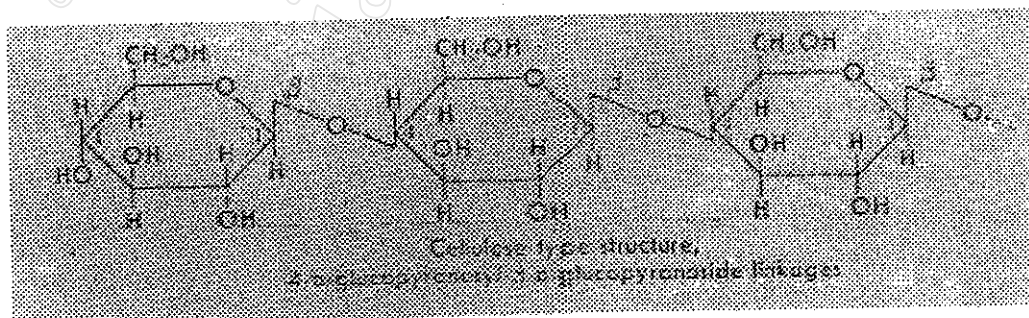
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เซลลูโลส (cellulose) (Goksor and Eriksen, 1980)

เซลลูโลสเป็น polysaccharide ที่มีขนาดเล็กมาก (submicroscopic) ลักษณะเป็น rod-shaped units ที่เรียกว่า micells บางครั้งประกอบเป็นหน่วยใหญ่จาก micells 10 ถึง 20 หน่วย เป็น microfibril ซึ่งโครงสร้างมีลักษณะส่วนใหญ่เป็นผลึก (cystalline) จึงถูกย่อยสลายได้ยาก เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชและสะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ เช่น ฝ้าย มีส่วนประกอบของเซลลูโลสมากกว่า 97-99 % จัดว่าเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ ประกอบด้วย polymer chain เรียงขนานและยึดกันด้วย dispersion force และ hydrogen bond ภายในโมเลกุลเซลลูโลสจึงยึดติดกันแน่น ทำให้เซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ได้ช้า เพราะสารจะไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลลูโลสได้ ยังพบในสาหร่ายและพืชหลายชนิด นอกจากนี้ ยังพบในสัตว์ทะเลบางชนิด เนื่องจากเซลลูโลสสามารถถูกย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อมโดยจุลินทรีย์ จึงเป็นสารประกอบที่มีความสำคัญต่อวัฏจักรคาร์บอน

ในด้านโครงสร้าง เซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ กลูโคสหลายๆ โมเลกุลต่อกันเป็นโพลิเมอร์ด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic ระหว่าง alcoholic hydroxyl groups โดยโมเลกุลสายยาวของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส 1,400 ถึง 10,000 โมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลผันแปรตามชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 200,000 ถึงเกือบ 2 ล้าน (ภาพ 1)



ภาพ 1 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบเซลลูโลส (West et al., 1968)

การย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose hydrolysis) (ยุพดี, 2527)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์หรือเป็น linear homopolymer ของกลูโคสที่จับกันด้วย β -1,4-glucosidic linkage ซึ่งยากต่อการย่อยสลาย นอกจากนี้โดยธรรมชาติจะมี lignin จับเป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยาการย่อยสลาย

การย่อยสลายเซลลูโลสทำได้ 2 วิธี คือ

1. วิธีการทางเคมีหรือการย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง (acid hydrolysis) เช่น กรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งต้องทำภายใต้อุณหภูมิสูง วิธีนี้จะมีข้อจำกัดในการแยกน้ำตาลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ออกจากกรด และเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ

2. วิธีการทางชีวภาพหรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymic hydrolysis) ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงคือที่อุณหภูมิประมาณ 50°C ความดันบรรยากาศ เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะต่อเซลลูโลส ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ และการสูญเสียกลูโคสระหว่างการเกิดปฏิกิริยา

พืช สัตว์ และจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ (Klyosov, 1990) พืช ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวมอลต์ รากและใบต้นยาสูบ สัตว์ ได้แก่ ไล่เดือนบางชนิดและปลวก (ฉวีวรรณ, 2530) จุลินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์ เช่น *Kluyveromyces marxianus* เชื้อราเช่น *Trichoderma viride* แอคติโนไมซีต เช่น *Talaromyces thermophilus* (Fergus, 1969) แบคทีเรีย เช่น *Clostridium cellobiopsrus*

เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เพาะเลี้ยงง่าย และผลิตเอนไซม์ได้มาก จึงมีการศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอย่างกว้างขวาง

ทั้ง aerobic bacteria และ anaerobic bacteria สามารถย่อยเซลลูโลสได้ aerobic bacteria จะย่อยเซลลูโลสได้ผลิตภัณฑ์หลัก 2 ชนิด คือ CO_2 และสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบเซลล์ ส่วนฟังไจและแอคติโนไมซีต จะย่อยได้ CO_2 เป็นหลัก และเกิดกรดอินทรีย์ในปริมาณน้อย อัตราการย่อยเริ่มต้นจะถูกจำกัดด้วยกระบวนการ oxidation ของคาร์โบไฮเดรต เพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของสารตัวกลาง ซึ่งจะเกิดขึ้นขณะมีการใช้น้ำตาล ส่วน mesophilic และ thermophilic anaerobe ไม่สามารถย่อยสลายสเตรตอย่างสมบูรณ์ได้ สารเคมีหลายๆ ชนิดจึงถูกขับออกมาเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเกิดการสะสมของ CO_2 , H_2 , ethanol และกรดอินทรีย์ เช่น กรด acetic, fumaric, succinic, butyric และ lactic (ตาราง 1)

ตาราง 1 ผลลัพธ์จากการย่อยเซลลูโลส

Bacteria	Products
Mesophiles	
<i>Clostridium cellobiopsrus</i>	CO ₂ , H ₂ , ethanol, acetic, lactic, and formic acids
<i>Bacteriodes succinogenes</i>	CO ₂ , acetic, and succinic acids
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	acetic, formic, and succinic acids
Thermophiles	
<i>Clostridium thermocellum</i>	CO ₂ , H ₂ , ethanol, acetic, lactic, formic, and succinic acids

การย่อยเซลลูโลสขั้นต้นเกิดจากการที่โมเลกุลถูก hydrolyse โดยเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์จะย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ แต่ข้อจำกัดในการทำงานของเอนไซม์เกิดจากการที่สับสเตรตละลายน้ำได้น้อย เมื่อย่อยได้ cellulose derivative ก็จะถูกย่อยต่อ ผลจากการย่อยได้ monosaccharide หรือ disaccharide ผลผลิตจากขั้นตอนต่อมาของการย่อยจะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ aerobe จะสลายน้ำตาลได้ CO₂ ส่วน anaerobe จะสลายได้กรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์

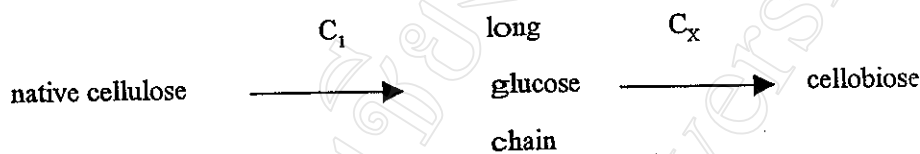
เนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้น จุลินทรีย์จึงต้องขับเอนไซม์ออกสู่เซลล์เพื่อย่อยเซลลูโลสจนได้น้ำตาลที่ละลายน้ำ แล้วดูดซึมสู่ภายในเซลล์ เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนใช้ในกิจกรรมของเซลล์ต่อไป

เซลลูเลสจะทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์ β -1,4-glucoside ในโมเลกุล สารที่ประกอบด้วยโครงสร้างนี้ได้แก่ cellobiose, cellotriose, cellotetraose และ cellulose ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยกลูโคสตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไปตามลำดับ

เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

เซลลูเลสเป็น complex enzyme ที่มีส่วนประกอบต่างๆ กัน ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกัน

Mandels and Reese (1956)อธิบายว่าการย่อยเซลลูโลสเกิดจาก 2 ขั้นตอนปฏิกิริยาแรกเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่แทนด้วย C_1 ย่อยได้เซลลูโลสสายสั้นลง เอนไซม์ขั้นที่ 2 ของปฏิกิริยาคือ C_x จะไปไฮโดรไลซ์ cellulose derivative ที่เกิดจากการย่อยของ C_1 เอนไซม์สองชนิดนี้ทำงานแยกกัน ได้มีรายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อย degraded cellulose แต่ไม่สามารถย่อย native cellulose นั่นคือ C_1 จะย่อย native cellulose ได้เซลลูโลสสายสั้น แล้วถูกย่อยต่อโดย C_x จนได้ cellobiose แต่หลักฐานการปรากฏของ C_1 และ C_x นั้นยังไม่ชัดเจน



พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดผลิตได้เพียง C_x จึงไม่สามารถย่อยเซลลูโลส และมีเพียงไม่กี่ชนิดที่ผลิตได้ทั้ง C_1 และ C_x เรียกจุลินทรีย์นี้ว่า true cellulytic microorganism (Wood and Wilson, 1984)

จากการศึกษาในระยะหลังได้สรุปส่วนประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสต่างจาก Reese กล่าวคือ cellulolytic enzyme เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกระบวนการ hydrolysis ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กที่สามารถละลายน้ำและผ่านผนังเซลล์ ในจุลินทรีย์บางชนิดจะมี hydrolytic enzyme ที่เป็น oxidative และ phosphorolytic enzyme ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส พบว่ามีอย่างน้อย 3 ชนิดหลักๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยเซลลูโลส ได้แก่

1. endoglucanases หรือ C_x (endo-1,4- β -glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.4 ; EG)

ทำหน้าที่ย่อย cellulose chain ตรงตำแหน่ง β -1,4-glucosidic linkage อย่างสุ่ม

2. exoglucanases หรือ cellobiohydrolases หรือ C_1 (exo-1,4- β -D-glucan-4-cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91; CBH) จะทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสจากปลาย non-reducing ได้ cellobiose หรือกลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์

3. β -glucosidase หรือ cellobiase (EC 3.2.1.21) จะไฮโดรไลซ์ cellobiose และ cellodextrin ที่ละลายน้ำตัวอื่นเป็นกลูโคส ซึ่งจะส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิดแรก

มีสับสเตรตหลายชนิดที่ใช้ในการศึกษาการทำงานของ cellulolytic enzyme ส่วนมากใช้ cotton fiber, avicel (microcrystalline cellulose), phosphoric acid-swollen cellulose, carboxymethyl cellulose (CMC), hydroxyethyl cellulose (HEC), cellobiose และ cellodextrin โดยคุณสมบัติของเอนไซม์แต่ละชนิดมีดังนี้

cellobiohydrolases จะย่อยเซลลูโลสโดย hydrolyse cellobiose units จากปลาย non-reducing และจำกัดการทำปฏิกิริยากับสับสเตรต เช่น CMC และ HEC และทำงานได้ดีกับ swollen อย่างไรก็ตามการทำงานจะลดลงเมื่อ chain สั้นลง เอนไซม์นี้จะไม่ย่อย crystalline cellobiose และจะเกิดปฏิกิริยาด้านการทำงานเมื่อมี endoglucanase

เซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด มีการศึกษาใน *Trichoderma reesei* และ *P. pinophilum* พบว่ามีเอนไซม์นี้สองชนิดที่ต่างกันตาม immunology คือ CBH I และ CBH II ซึ่งตรวจสอบได้จาก extracellular medium ที่ใช้เลี้ยง

T. reesei ทั้งสองชนิดเป็น glycoprotein ที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่จับกับโปรตีนและ amino acid ต่างกัน แต่ธรรมชาติและการเกิดของเอนไซม์นี้ยังไม่เข้าใจ อาจเกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรม proteolysis หรือ glycosilation ที่ต่างกัน

endoglucanase จะ hydrolyse CMC หรือ swollen-cellulose อย่างนุ่ม ผลจากการย่อยทำให้สายของโมเลกุลเซลลูโลสสั้นลงอย่างรวดเร็ว ขณะที่หมักรดักจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ นอกจากนี้เอนไซม์ยังย่อย cellodextrin และปฏิกิริยาจะลดลงเมื่อสายโมเลกุลเซลลูโลสสั้นลง endoglucanase 3 ชนิดที่ *T. reesei* ผลิตขึ้นได้แก่ EG I, EG II และ EG III ซึ่งต่างกันตามชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์

การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส (Singh and Hayashi, 1995)

การสังเคราะห์เซลลูเลสเกิดจาก 2 กระบวนการคือการควบคุมทางชีวเคมีและทางพันธุกรรมในการควบคุมการสร้างเอนไซม์จะต้องควบคุมการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูเลส โดยกระบวนการ induction, repression และ catabolite repression เซลลูเลสเป็น inducible enzyme โดยมีตัวชักนำที่ดี ได้แก่ cellulose, cellobiose, thiocellulose, lactose และ sophorose (2-O- β -D-glycopyranosyl-D-glucose) และสารที่เกิดจากการสังเคราะห์ทางเคมี เช่น palmitate, acetate ester ของ disaccharide จากการศึกษาในจุลินทรีย์พบว่า การสังเคราะห์เอนไซม์จะถูกเหนี่ยวนำโดยเซลลูโลสที่อยู่ในรูปที่ละลายน้ำและสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ ปกติเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์จะเป็น extracellular enzyme แต่บางครั้งพบที่ผนังเซลล์หรือที่เชื่อมหุ้มเซลล์ พบว่า

T. reesei QM9414 ผลิตเซลลูเลสขับออกสู่ภายนอกเซลล์ปริมาณมากในอาหารที่มี cellobiose ความเข้มข้นต่ำหรือพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเพื่อให้เกิดการผลิต β -glucosidase ซึ่งจะถูกขับออกมาเมื่อเซลล์เกิดการ autolysis

การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

Goksoyr และ Eriksen (1980) ได้แบ่งการทำงานของเอนไซม์เป็น 2 วิธี ตามความซับซ้อนของลักษณะเอนไซม์คือ

1. การวัดความสามารถในการทำงานของ complex enzyme ที่ได้จาก culture filtrate ประกอบด้วย 2 วิธีคือ

1.1 การสลายให้ได้น้ำตาล เป็นการวัดปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อโดย complex enzyme โดย Mandels (1977) ได้รวบรวมวิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเซลลูโลส โดยใช้ DNS reagent เป็นสารทดสอบ ซึ่งสับสเตรดที่นิยมใช้ได้แก่ กระดาษกรอง เส้นใยฝ้าย และ CMC

CMC assay เป็นวิธีที่นิยมใช้วัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส เนื่องจากเตรียมง่าย จากการที่ CMC เป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี จึงง่ายต่อการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ วิธีการนี้ทำโดยเตรียม 1% CMC ละลายใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ทำโดยผสม 1% CMC กับ crude enzyme บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม DNS reagent คั้นในน้ำเดือด 15 นาที แล้ววัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1.2 การตรวจสอบโครงสร้างของเซลลูเลสที่เปลี่ยนแปลงหลังเกิดการย่อยสลาย ในกรณีที่มีการย่อยสลายเซลลูโลสไม่สมบูรณ์หรือไม่เกิดน้ำตาลขึ้น วิธีการที่ให้ผลเชื่อถือได้มากที่สุดคือ การวัดความเหนียวของเส้นใยฝ้ายก่อนและหลังทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในเวลาที่กำหนด ซึ่งต้องอาศัยเครื่องมือที่มีความละเอียดสูง และยังสามารถตรวจสอบเส้นใยอิสระที่เกิดจากการย่อยสลายกระดาษกรอง และหน้าหน้าหนักของสับสเตรดที่หายไป

การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส อาจทำได้โดยศึกษาการย่อยสลายในอาหารวุ้น Teather and Wood (1982) ได้เสนอวิธีการตรวจสอบความสามารถในการย่อยของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งที่มี CMC เป็นส่วนประกอบ เททับด้วย 0.1% congo red เป็นเวลา 15 นาที เททิ้งแล้วเททับด้วย 1 M NaCl จะปรากฏวงใสที่ไม่ติดสีของ congo red ที่เกิดจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์เซลลูเลส

2. การวัดการทำงานของเอนไซม์แต่ละองค์ประกอบ

2.1 Endoglucanase นิยมใช้ CMC และ hydroxyethylcellulose เป็นสับสเตรด โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

2.2 Exoglucanase วิธีการนี้ยังไม่มีสับสเตรดที่จำเพาะต่อเอนไซม์ การวัดการทำงานขององค์ประกอบนี้ยังต้องทำให้ได้ exoglucanase ที่บริสุทธิ์ก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับสเตรด ซึ่งสับสเตรดที่นิยมใช้ได้แก่ Avicel และ เซลลูโลสที่ผ่านการแช่ด้วยกรดฟอสฟอริก

2.3 β -glucosidase นิยมใช้ cellobiose และ p-nitrophenyl- β -D-glucosidase (pNPG) เป็น ตัวบ่งชี้ โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกมา

ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยเซลลูโลส

การเปลี่ยนแปลงของเซลลูโลสขึ้นกับอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ในโตรเจน ปริมาณออกซิเจน ความชื้น อุณหภูมิ pH องค์ประกอบของคาร์บอนชนิดอื่น และอัตราส่วนของลิกนินที่ประกอบในเซลลูโลส การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีในสิ่งแวดล้อม ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้น จึงมีผลต่ออัตราการย่อยสลายสารในธรรมชาติด้วย

อากาศหรือออกซิเจนมีผลต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์แตกต่างกันตามความต้องการตามชนิดของเชื้อ anaerobe จะย่อยเซลลูโลสในสภาวะที่ขาดออกซิเจน เช่นในดินที่มีความชื้นสูง พบว่าปริมาณ anaerobic cellulolytic bacteria จะมีมากกว่าปริมาณของฟังไจและแอคติโนไมซีตที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส แต่ในระดับความชื้นปานกลางพบว่า cellulolytic fungi และ aerobic bacteria จะเจริญได้ดี Forsberg and Groleau (1982) ได้ศึกษาความเสถียรของ endo- β -1,4-glucanase และ β -1,4-glucosidase (cellobiase) ที่ผลิตจาก *Bacteroid succinogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี cellobiose เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสลดลงเมื่อ carboxymethylcellulase (CMCase) และ cellobiase มีความเสถียรลดลง จากการทำ CMCase และ cellobiase assay เพื่อหา enzyme activity พบว่าการเติม merthiolate จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ merthiolate ที่เข้มข้น $40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ทำให้ CMCase สูญเสียการทำงาน 20% ระหว่าง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ส่วน cellobiase จะถูกยับยั้งการทำงานอย่างรวดเร็ว หลังการเพาะเลี้ยงเพียง 7 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 39°C แต่เอนไซม์สามารถทำงานได้ในสภาวะที่ขาดออกซิเจน และจะเสถียรเมื่อมี dithiothreitol ในบรรยากาศที่มีไนโตรเจน จากผลการทดลองพอจะสรุปได้ว่า cellobiase ต้องการหมู่ sulphydryl เพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

Tabassum *et al.* (1990) ได้ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ anaerobic mixed culture ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติ 3 แหล่งคือ ของเหลวในกระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ชากพืชที่ทับถม และจากสิ่งปฏิกูล พบว่าจุลินทรีย์จากสิ่งปฏิกูล สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด และเอนไซม์จะมีความเสถียรในสภาวะไร้ออกซิเจน

ตามรายงานการทดลองของ Barron *et al.* (1995) ระบุว่าเชื้อ *Cluyvermyces marxianus* IMB3 สามารถผลิต ethanol เมื่อเจริญในอาหารที่มีการเติมเอนไซม์เซลลูเลส และมี milled paper เป็นส่วนประกอบ ที่อุณหภูมิ 45°C พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน shake-flask culture ได้ผลิตแก๊สเพิ่มขึ้น

21% และเมื่อเพาะเลี้ยงในระบบ batch ซึ่งมีการให้อากาศมากกว่าได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 39% ของผลผลิตที่คาดว่าจะได้รับตามทฤษฎี

นอกจากนี้ Keskar (1992) พบว่าเชื้อ *Penicillium janthinellum* NCIM 1169 สามารถผลิตเซลลูเลสได้เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อเปลี่ยนมาเพาะเลี้ยงใน fermenter ขนาด 14 ลิตร แทนการเพาะเลี้ยงใน shake-flasks

เซลลูเลสสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิค่าใกล้เคียงกันคือประมาณ 5 °C ถึงอุณหภูมิสูงที่ 65°C โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะย่อยสารที่อุณหภูมิต่างกัน mesophile จะย่อยที่อุณหภูมิปานกลาง ขณะที่ thermophile จะปรับตัวให้เกิดการย่อยอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 °C นอกจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะมีผลต่อองค์ประกอบของจุลินทรีย์แล้ว ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โดยตรงด้วย

ในสถานะที่เป็นกลางถึงเป็นด่างพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลาย polysaccharide แต่โดยปกติในฟังไจที่เป็นเส้นสายจะย่อยเซลลูโลสในสถานะที่เป็นกรด

วนิดา (2527) ได้ทำการศึกษาสถานะต่างๆ เพื่อหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อรา *Myceliophthora thermophila* โดยใช้ solid culture พบว่าอาหารที่ประกอบด้วยรำข้าวผสมฟางข้าวในอัตราส่วน 8:2 เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเซลลูเลส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 45 °C และเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60°C ที่ pH 5

Shewale and Sadana (1978) ได้สรุปผลจากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสใน *Trichoderma viride* กล่าวคือ เชื้อจะให้ผลการทำงานของ CMCase cellobiase และ β -glucosidase สูงสุดที่อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมต่างกันคือ CMCase มีค่าการทำงานสูงสุดที่อุณหภูมิ 35°C ที่ pH 3.7 สำหรับ cellobiase และ β -glucosidase ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55°C ที่ pH 4.3-4.5 และที่อุณหภูมิ 70°C pH 4.5 ตามลำดับ

Horikoshi *et al.* (1984) ได้รายงานถึงสถานะการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Bacillus* sp. No. N-4 ที่แยกได้จากดิน เมื่อเพาะเลี้ยงใน CMC medium พบว่าเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C ที่ pH 10 แต่ pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือ pH 9.5 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ Ca^{2+} เพิ่มขึ้น 1 mM จะมีผลกระตุ้นการผลิตเอนไซม์

Hudson *et al.* (1991) ได้แยกเชื้อจาก New Zealand hot spring มาเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า การทำงานของ carboxymethylcellulase จาก H173 ซึ่งเป็น extremely thermophilic anaerobe พบว่ามี pH ที่เหมาะสมคือ 6.5-7.0 และการทำงานของเอนไซม์จะเสถียร โดยการเติม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ มีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 80°C นั่นคือ

เอนไซม์จะเหลือความสามารถในการทำงาน 77% ของการทำงานเริ่มต้น ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 90°C การทำงานของเอนไซม์จะลดลงเหลือ 50% ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 นาที และเหลือความสามารถในการทำงานเพียง 3% ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Mathrani *et al.* (1993) ได้ศึกษาอิทธิพลของ pH และอุณหภูมิต่อการย่อยสลายเซลลูโลส และ hemicellulose ของ thermophilic anaerobic bacteria ที่แยกได้จากน้ำพุร้อน Hverager ในประเทศไอซ์แลนด์ จากสิ่งแวดล้อมที่มี pH 7 และ 9 และที่อุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลาย xylan และเซลลูโลส ซึ่งเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มี pH 7 และ 9 ที่อุณหภูมิ 37 ถึง 90°C และจากการตรวจนับเชื้อโดยวิธี most-probable-number (MPN) พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อสูงสุดจากตัวอย่างน้ำที่มีค่าความเป็นด่าง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 80 °C และตัวอย่างน้ำที่มีค่าความเป็นกลาง เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C แต่ไม่พบการเจริญของเชื้อจากตัวอย่างน้ำที่มีค่าความเป็นด่าง เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C และตัวอย่างน้ำที่มีค่าความเป็นกลาง ภายใต้อุณหภูมิการเพาะเลี้ยงที่ 80°C จากน้ำพุทุกๆ ตัวอย่าง เมื่อนำมาเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 90°C หรือเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี pH 9 จะไม่พบการเจริญของเชื้อ อย่างไรก็ตาม พบว่าเชื้อสามารถจะย่อยสลาย xylan ได้ที่อุณหภูมิ 90°C เมื่ออาหารมี pH 9

จากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีเซลลูโลส ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเดียว แต่เมื่อให้พืชเป็นแหล่งอาหารพบว่าเชื้อสามารถย่อยสลาย polysaccharide ได้ดี เช่น แบคทีเรียจะย่อยเซลลูโลสใน corn stalk ได้ดีกว่า และเมื่อเพิ่ม xylan และคาร์โบไฮเดรตอื่นร่วมด้วย จุลินทรีย์จะย่อยเซลลูโลสได้ดียิ่งขึ้น

จิตตเสน (2529) ได้แยกเชื้อ *Humicola nigrescens* CM 33B มาศึกษาผลของปัจจัยเป็นบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนและมีโพแทสเซียมไนเตรด (KNO₃) เป็นแหล่งไนโตรเจน

ระพีพรรณ (2536) ได้แยกแบคทีเรียจากของเหลวในกระเพาะหมักของโคพื้นเมืองที่สลายเซลลูโลสด้วย cellulose agar ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาพไร้ออกซิเจน ได้เชื้อทั้งหมด 101 ไอโซเลท เมื่อนำมาตรวจสอบความสามารถในการสลายเซลลูโลสโดยวัดค่าการทำงานของเอนไซม์เมื่อเพาะเลี้ยงใน cellulose broth ในสภาพไร้ออกซิเจน และศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูเลสโดย filter paper assay พบว่า *Ruminococcus albus* 21Aa ผลิตเอนไซม์สูงสุดในอาหารที่มี Whatman No.1 filter paper pulp เป็นแหล่งคาร์บอน มี tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจน pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.0166 U/ml

ผลการทดลองของ Takao *et al.* (1985) ระบุว่า *Penicillium purpurogenum* P-26 ซึ่งแยกได้จากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติในประเทศไทยและญี่ปุ่น จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดเมื่อเจริญในอาหารที่มี cellobiose-octaacetate 0.6% และมี Avicel 0.4% เป็นแหล่งคาร์บอน

Abhaykumar and Dube (1992) ได้ทดสอบความสามารถในการผลิตเซลลูเลสของ *Vibrio agarliquefaciens* โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด ที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนคือ Kadota Mandels and Sternberg และ Zobell media เพื่อหา cellulase activity จากการทดลองพบว่า เอนไซม์แต่ละชนิดจะทำงานที่อุณหภูมิและสภาวะของกรดด่างที่เหมาะสมต่างกัน และผลจากการเติม NaCl เพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ เชื่อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในอาหารทั้ง 3 ชนิด แต่จะไม่ผลิต complete cellulase เอนไซม์จะมี complete activity สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Zobell ซึ่งมี exoglucanase activity สูงสุดที่ pH 8 หลังการเพาะเลี้ยง 8 วัน มี endoglucanase activity สูงสุดที่ pH 6 ในเวลา 9 วัน ส่วน β -glucosidase activity จะสูงสุดที่ pH 5 ถึง 9 ภายหลังการเพาะเลี้ยง 10 วัน และมี complete activity ของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 7 ในเวลา 8 วัน จึงสรุปว่าการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด จะมีค่ามากในสภาวะของการเพาะเลี้ยงที่ pH 7 ถึง 9 ภายหลังการเพาะเลี้ยง 8 วัน

การนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ (Han and Erikson, 1980 และ Pennisi, 1997)

จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ จึงมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตสารสำคัญต่างๆ วัตถุดิบที่สำคัญได้แก่ เซลลูโลส เนื่องจากหาง่ายและเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อม แต่การนำเอนไซม์ไปใช้นั้นก็มีความยุ่งยาก ทั้งการนำไปใช้และกระบวนการผลิตที่อาศัยการเตรียมการและต้องลงทุนสูง การเตรียมวัตถุดิบต้องอาศัยวิธีการทางเคมี และวิธีการเพื่อลดขนาดวัตถุดิบลง นอกจากนี้ ผลกระทบจากการย่อยสลายของเอนไซม์ยังมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์ด้วย ด้วยเหตุนี้การใช้เซลลูเลสจึงมีข้อจำกัด ดังนั้นในด้านของการนำไปใช้จึงมักใช้ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่น

Kadam and Schmidt (1997) ศึกษาความสามารถในการผลิต ethanol ของเชื้อ *Candida acidothermophilum* ที่เจริญใน lignocellulosic biomass เปรียบเทียบกับผลของการเจริญและการผลิต ethanol ของ *Saccharomyces cerevisiae* D₅A เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37, 40 และ 42°C โดยใช้ต้น poplar ที่ผ่านการ treat ด้วยกรดอ่อนเป็นสับสเตรต พบว่าที่อุณหภูมิ 40°C *C. acidothermophilum* ผลิต ethanol ได้สูงถึง 80% ซึ่งเป็นปริมาณมากกว่า *S. cerevisiae* D₅A สามารถผลิตได้ที่อุณหภูมิเดียวกัน และที่อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งเชื้อนี้เจริญได้ดีและผลิต ethanol ได้สูงสุด อย่างไรก็ตาม พบว่าที่อุณหภูมิ 42°C *C. acidothermophilum* จะมีการเจริญลดลงช้าๆ และเชื่อจะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ลดลงประมาณ 16% ที่อุณหภูมิ 40°C

ตัวอย่างอื่นของการนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ได้แก่ ใช้สกัดสารในใบชา ถั่วเหลือง มันเทศ แป้งข้าวโพด และวุ้น ใช้ผลิตน้ำส้มสายชูจากเชื้อสั้ม และเยลลี่จากสาหร่าย ใช้ย่อยเปลือกถั่วเหลือง ใช้เปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่ออาหารของผัก ข้าวเจ้า และข้าวเหนียว ช่วยแยก unicell ของพืช และ protoplast ในรูป active ช่วยเพิ่มความเหนียวให้กับเยื่อกระดาษ ใช้เป็นส่วนผสมในผงซักฟอก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการจัดความสกปรกและไม่ทำลายเส้นใยผ้า นอกจากนี้ ยังได้นำกลูโคสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการทำงานของเอนไซม์ไปใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตอัลกอฮอล์ และผลิต single cell protein (SCP) (Han and Callihan, 1974)

การประยุกต์ใช้เอนไซม์ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อพืชทางอุตสาหกรรม เพื่อการ
ผลิตสารสำคัญต่างๆ แสดงดังตาราง 2

ตาราง 2 ตัวอย่างการนำเอนไซม์เซลลูเลสไปประยุกต์ใช้

การนำไปใช้	วิธีการประยุกต์ใช้
Alginates	Extraction and/or rehydration
Animal feeds	Silage production, Direct feed
Baking	Dough and gluten modification
Citrus juice	Reduction of viscosity of gums for concentrtrion
Colour extration	Release of coloured compounds
Cooking	Cereal, beans and pulses pretreated to give rapid cooking
Fiber	Deactivation of protease inhibitor, processing and amylase
Plant crop	Breaking dormacy, spray seeding, seed cleansing
Soya products	Improved milks and fermentations
Tanning agents, Tea production	Extraction, fermentation extract viscosity control

ที่มา : Godfrey and Reichlt, 1983