บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทฤษฎีหรือแนวคิดที่เกี่ยวข้อง

1. เอนไซม์

เอนไซม์ เป็นชีวโมเลกุลที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในระบบชีวภาพ สามารถเปลี่ยนแปลงสับสเตรท (substrate) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ในสภาวะที่ไม่รุนแรง โดยปริมาณเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลง (เปี่ยมสุข, 2551)

1.1 เอนไซม์เซลลูเลส

1.1.1 ลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ผสม (multicomponent enzyme) ที่ประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกันดังนี้

1) เอนไซม์ C_1 หรือไฮโดรเจน บอนเดส (hydrogen bondase) ทำหน้าที่กระตุ้นหรือย่อยเซลลูโลสในสภาพธรรมชาติให้เป็นสายโพลีแซคคาไรด์สั้นๆ ทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลงและมีสภาพที่เหมาะสมสำหรับเป็นสับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์เซลลูเลสอันดับต่อไป คือ β – 1,4 – glucanase

2) เอนไซม์ Cx หรือบีต้า-1,4-กลูคาเนส (β– 1,4 – glucanase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโพลีแซคคาไรด์สายสั้นๆ จนได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ จะสามารถย่อยสลายอนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ ยกตัวอย่างเช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (carboxymethylcellulase, CMC) ไฮดรอกซีเมทิลเซลลูเลส (hydroxymethylcellulase) แต่ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรทที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ เอนไซม์กลุ่มนี้แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

2.1) เอนโด-บีต้า-1,4-กลูคาเนส (Endo - β – 1,4 – glucanase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลสทั้งที่มีโครงสร้างที่มีการจัดเรียงตัวแบบไม่เป็นระเบียบ (amorphous) และแบบเป็นระเบียบ (crystalline) ซึ่งจะทำลายพันธะที่ตำแหน่ง β – 1,4 – glucosidic linkage บริเวณที่เป็น amorphous หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และเซลโลไบโอสสายสั้นๆ แบบสุ่ม ทำให้ได้กลูโคสและโอลิโกเมอร์ชนิดเซลโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

2.2) เอกโซ-บีต้า-กลูคาเนส (Exo - β – 1,4 – glucanase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารโพลิเมอร์ของ β – 1,4 – glucosidic จากปลายด้านที่เป็นนอนรีดิวซ์ (non – reducing) และ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

รีดิวซ์ (reducing end) ทีละโมเลกุลอย่างจำเพาะกับโครงสร้างในลักษณะ crystalline cellulose และมีการเปลี่ยนแปลง configuration ของสารจาก β – configuration ไปเป็น α – configuration ทำให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลเซลโลไบโอสและกลูโคส

3) เอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดส (β – glucosidase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก Cx ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จะย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอสและเซลโลเฮกโซส (cellohexose คือกลูโคสจาก 2 – 6 ยูนิต) ได้เป็นกลูโคส สามารถย่อยสลายกรดเซลลูไบโอนิก (cellubionic acid) ให้เป็นกลูโคโนแลกโตน (gluconolactone) และกลูโคส เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญในการทำงานร่วมกับเอนไซม์เอนโดและเอกโซ-บีต้า-1,4-กลูคาเนส ที่จะย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส

1.1.2 คุณสมบัติทั่วไปของเอนไซม์เซลลูเลส (สุดาวดี, 2543)

1) เอนไซม์ Cx มีมวลโมเลกุล 42,000 เอนไซม์เอนโด-บีต้า-กลูคาเนสมีมวลโมเลกุล 23,000 – 58,000 เอนไซม์เอกโซ-บีต้า-กลูคาเนสมีมวลโมเลกุล 60,000 – 62,000 และเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดสมีมวลโมเลกุล 76,000

2) เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส ยกเว้นจุลินทรีย์ทนความร้อนบางชนิด มีความคงทนต่อ pH ในช่วงระหว่าง pH 4.0 – 9.0 แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ และความคงทนต่อสารเคมี

3) ละลายน้ำได้แต่ถูกยับยั้งด้วยไอออนของโลหะหนัก –SH reagents, oxidizing reducing agents และโดยผลผลิตตัวเอง คือ กลูโคส

4) สามารถวัดกิจกรรมการทำงานจากการวัดหมู่รีดิวซ์ที่เกิด นิยมใช้สับสเตรทที่ละลายน้ำได้ดี คือ สับสเตรทสังเคราะห์ เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส

5) เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะเจริญได้ในช่วงระดับ pH 3.5 – 8.0 และที่อุณหภูมิระหว่าง 30 – 80 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ ที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด

6) สามารถเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส และที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นานหลายปี หรือเก็บโดยวิธี Freeze dry หรือตกตะกอนด้วยอะซีโตนหรือเอทธานอล โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติ

1.2 เอนไซม์ไซลาเนส

1.2.1 ลักษณะของเอนไซม์ไซลาเนส (เปี่ยมสุข, 2551)

ไซลาเนสมี 2 ชนิด คือ endo - 1,4 - β (E.C. 3.2.1.8, ชื่อตามระบบคือ β - 1,4 -xylan xylanohydrolase) เร่งปฏิกิริยาการย่อยแบบสุ่มในสายโพลิเมอร์ของไซแลน ซึ่งมีแกนหลัก

ไซโลส (xylose) ต่อกันด้วยพันธะ β - 1,4 ได้โอลิโกแซคคาไรด์ของไซโลส และชนิด exo-1,4 - β (E.C. 3.2.1.37, ชื่อตามระบบคือ β - 1,4 - xylan xylohydrolase) ซึ่งย่อยโอลิโกแซคคาไรด์จากปลายนอนรีดิวซ์ให้ความยาวสายสั้นลง เอกโซไซแลนที่ชอบย่อยไซโลไบโอสให้ได้ไซโลสมีชื่อเฉพาะว่า บีต้า-ไซโลซิเดส (β - xylosidase)

เนื่องจากโครงสร้างไซแลนมีความแตกต่างกันมากขึ้นกับแหล่งที่พบ เช่น ในหญ้ามีโครงสร้างหลักเป็นโฮโมโพลิเมอร์ของไซโลส ในขณะที่ไซแลนในเมล็ดธัญพืชมีโครงสร้างที่เป็นกิ่งก้านมาก คือ เป็นเฮเทอโรโพลิเมอร์ มีกลุ่มอื่นต่อที่โซ่กิ่งของแกนหลักซึ่งส่วนใหญ่เป็นอะราบิโนสและกรดกลูโคโรนิก ดังนั้น การย่อยไซแลนให้สมบูรณ์นอกจากจะต้องใช้เอนไซม์ไซลาเนสชนิดเอนโดและเอกโซแล้ว ยังต้องใช้เอนไซม์ที่ย่อยโซ่กิ่งอีกด้วย เอนไซม์ทั้งระบบนี้รวมเรียกว่า เอนไซม์ไซลาโนไลติก (xylanolytic enzymes)

1) เอนโดไซลาเนส

แหล่งของไซลาเนส คือ ราและแบคทีเรีย โดยมีรา *Trichoderma* spp. และ *Aspergillus* spp. เป็นแหล่งสำคัญของเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม และเอนไซม์เอนโด - ไซลาเนส (EX) เป็นเอนไซม์ที่ถูกนำมาใช้มากที่สุดในกลุ่มเอนไซม์ย่อยไซแลน เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของ EX จากแหล่งต่างๆ พบว่า EX มี 2 กลุ่มใหญ่ คือ EXs ในไกลโคซิลไฮโดรเลส สกุลที่ 10 และ 11 เอนไซม์ EXs สกุลที่ 10 จะใช้สับสเตรทได้หลากหลายมากกว่า EXs สกุลที่ 11 และสามารถย่อยสับสเตรทไซแลนใกล้ตำแหน่งที่มีการแทนที่ หรือมีการต่อโซ่ข้างได้ดีกว่า ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ขนาดเล็กกว่า

2) เอกโซไซลาเนส

เนื่องจากความชอบสับสเตรทของเอกโซไซลาเนสที่ชอบย่อยโอลิโกแซคคาไรด์สายยาวกับบีต้า - ไซโลซิเดสที่ชอบย่อยเซลโลไบโอสไม่มีการแยกขอบเขตที่ชัดเจน ในรายงานส่วนใหญ่จะใช้ชื่อบีต้า - ไซโลซิเดส (BXL) แทนเอนไซม์ทุกชนิดที่ย่อยบีต้าไซโลสจากปลายนอนรีดิวซ์ BXLs มีขนาดใหญ่กว่า EXs มีน้ำหนักโมเลกุล 26 - 360 กิโลดาลตัน อาจมี 1, 2 หรือ 4 หน่วยย่อย BXLs ในแบคทีเรียและยีสต์ส่วนใหญ่ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบ และเป็นเอนไซม์ในเซลล์ เช่น BXL จาก *Bacillus pumilus* ซึ่งเป็นเอนไซม์ในเซลล์ที่มีการศึกษากันมากและถูกจัดไว้ในสกุลที่ 43 ของไกลโคซิลไฮโดรเลส ในขณะที่ BXLs จากราที่มีการศึกษามากที่สุด คือ จาก *Aspergillus* spp. และ *Trichoderma* spp. เป็นเอนไซม์นอกเซลล์ที่ถูกจัดไว้ในไกลโคซิลไฮโดรเลส สกุลที่ 3

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2. การผลิตเอนไซม์ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง

การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมเป็นแหล่งอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์เป็นแนวทางหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ การผลิตเอนไซม์โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมเป็นแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อมีทั้งในสภาพการหมักแบบแข็ง (solid state Fermentation) และการหมักในสภาพของเหลว (Liquid Fermentation) ข้อได้เปรียบของการหมักในสภาพของเหลวเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบแข็ง คือ สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในระหว่างกระบวนการหมักได้ดีและง่ายกว่า อย่างไรก็ตามการหมักบนอาหารแข็งมีข้อดีเหนือกว่าการหมักในสภาพของเหลว คือ สามารถให้ผลผลิตต่อหน่วยวัสดุหมักสูงกว่า ไม่ค่อยพบปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปของสปอร์ จึงไม่จำเป็นต้องใช้ถังเตรียมเชื้อเริ่มต้น (seed tank) เทคนิคการให้อากาศในวัสดุหมักทำได้ง่ายกว่าในสภาพการหมักแบบเหลว นอกจากนั้นการหมักแบบแข็งซึ่งเป็นการเจริญของจุลินทรีย์บนวัสดุแข็งที่ไม่มีน้ำในรูปอิสระ แต่จะอยู่ในลักษณะดูดซึมนั้นจะเหมาะสมกับเชื้อรา ซึ่งมีความสามารถในการชอนไชไปตามวัสดุหมักอันมีผลทำให้สามารถสัมผัสกับอาหารได้อย่างใกล้ชิดมีผลทำให้การสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่าการหมักในสภาพของเหลว

2.1 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง (ชลนิชา, 2548)

ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เอนไซม์ในกระบวนการหมักแบบแข็งนั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้แล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น ปัจจัยทางกายภาพ องค์ประกอบของอาหาร ตลอดจนการสร้างสปอร์ของเชื้อรา

2.1.1 ปัจจัยทางกายภาพ (Physical factor)

ปัจจัยทางกายภาพเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ควบคุมการหมักบนอาหารแข็ง ปัจจัยเหล่านี้ได้แก่ อัตราการไหลเวียนของอากาศ ความชื้นของวัสดุหมัก ขนาดและรูปร่างของวัสดุหมัก ปริมาณของวัสดุหมักและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง วัสดุหมักที่มีขนาดเหมาะสมจะมีพื้นที่ผิวให้จุลินทรีย์ยึดเกาะได้มาก แต่ถ้ามีขนาดเล็กเกินไปจะทำให้เกิดปัญหาการถ่ายเทอากาศไม่ดี ความชื้นและอุณหภูมิเป็นปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญที่สุดในการควบคุมระบบการหมักแบบอาหารแข็ง โดยเป็นปัจจัยควบคุมการสร้างเอนไซม์ การไหลเวียนอากาศจะเปลี่ยนแปลงไปพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงความชื้นของวัสดุหมัก

2.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดของสับสเตรตและสารเหนี่ยวนำ วัสดุหมักที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งเป็นประเภทลิกโนเซลลูโลส และเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ชนิดเหนี่ยวนำ (inducible enzymes) การเติมสารเหนี่ยวนำ (inducer) ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีอิทธิพลทำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้น

2.2.1 แหล่งคาร์บอน

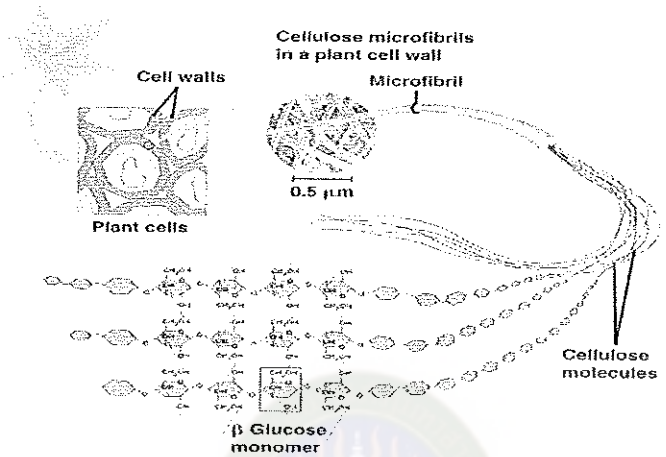
สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* นั้นมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ คือ ถ้าเชื้อมีการเจริญเติบโตดีจะมีการผลิตเอนไซม์สูง ดังนั้นอาหารเพาะเลี้ยงต้องมีความเหมาะสมสนับสนุนการเจริญ และอาจมีส่วนของสารที่ก่อให้เกิดการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เซลูเลสและไซลาเนส อาหารที่เพาะเลี้ยงส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุต่างๆ พืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆจะมีเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose), เซลลูโลส (Cellulose) และสารประกอบเพกติน (Pectic substances) เป็นองค์ประกอบอยู่มาก สารประกอบพวกเฮมิเซลลูโลส, เซลลูโลส และเพกติน เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่พบมากในผนังเซลล์ (Cell wall) ของพืชขณะที่พืชยังมีชีวิตและอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์จะไม่ถูกทำลายโดยจุลินทรีย์ต่างๆ เนื่องจากมีสารที่ยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ แต่หลังจากที่พืชตายหรือมีบาดแผลเกิดขึ้น สารยับยั้งจะถูกทำลายโครงสร้างของพืชก็จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์

สารที่เป็นองค์ประกอบในพืช ได้แก่

1) เซลลูโลส (Cellulose) เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ ที่มีประมาณ40-50 เปอร์เซ็นต์ในผนังเซลล์พืช ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสหลายๆ หน่วยมาต่อกันเป็นเส้นยาวด้วยพันธะแบบ β -1,4 - glycosidic bond ลักษณะเป็นโพลีเมอร์สายตรง ไม่มีกิ่งก้านสาขา และเป็นโฮโมโพลีเมอร์ (homopolymer) ของ β – D - glucose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β - 1,4 - glucosidic linkage โดยมีค่า degree of polymerization อยู่ในช่วงประมาณ 100 ถึงมากกว่า 10,000 ซึ่งเกาะรวมกันภายใน crystallinemicrofibrils เซลลูโลสมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20,000 ถึง 750,000 ดาลตันซึ่งเท่ากับ 100 - 4,000 หน่วยกลูโคส โมเลกุลของเซลลูโลสเรียงตัวเป็นมัดเรียกว่า ไฟบริล (fibril) โดยมีพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่ไฮดรอก-ซิลของน้ำตาลกลูโคสที่อยู่ใกล้กันของเซลลูโลสสายหนึ่งกับเซลลูโลสอีกสายหนึ่งเชื่อมต่อกันเป็นไฟบริล นอกจากนั้นเซลลูโลสที่พบในทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งมีความทนต่อกรดได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

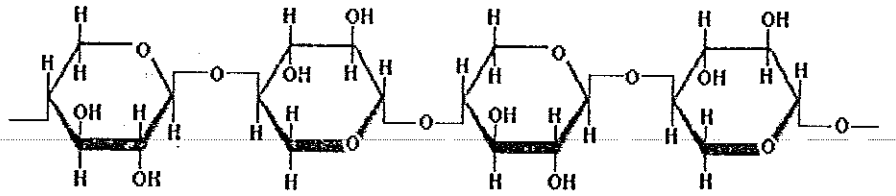
มากกว่าเฮมิเซลลูโลส เมื่อเกิดการย่อยสลายโดยสมบูรณ์ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าย่อยสลายไม่สมบูรณ์จะได้เซลโลไบโอส



ภาพที่ 1 โครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา : http:// www.learners.in.th/filc/dawood/view/83293&docid=ZcGFUhf6v-VJjM&imgurl

2) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส โดยพบประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ในผนังเซลล์พืช สามารถสกัดได้ด้วยสารละลายที่เป็นด่าง เฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide) ประกอบด้วยไซแลน (xylan) กลูโคแมนแนน (glucomannans) กาแลกแตน (galactans) และกลูแคน (glucan) ไซแลนเป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุดในเฮมิเซลลูโลส โดยมีโครงสร้างหลักที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-linkage ของน้ำตาลไซโลส และมีกิ่งก้านเป็นน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลต่างๆ พบเป็นองค์ประกอบประมาณ 7 - 30 เปอร์เซ็นต์ในผนังเซลล์ของพืช ลักษณะโครงสร้างหลักของไซแลนคือโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลส ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วย 1,4- ß -linkage มีสูตรทางเคมี คือ $C_5H_8O_4$



ภาพที่ 2 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา : http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates2.html

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างเป็นกิ่งก้านสาขา และประกอบด้วยน้ำตาลหลายๆ ชนิด ดังนั้นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสให้สมบูรณ์จึงมีมากกว่าเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส เอนไซม์ที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจะเรียกว่า เฮมิเซลลูเลส ซึ่งได้แก่ อะราบินาเนส (L–arabinanases), กาแลกตาเนส (D-galactanases), แมนนาเนส (D-mannanases), ไซลาเนส (D-xylanases) และอื่นๆ เป็นต้น โดยทั่วไปเฮมิเซลลูโลสในพืชจะมีโครงสร้างหลักเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วย 1,4- β -linkage โดยมีกิ่งก้านเป็นน้ำตาลเพนโตส เฮกโซส หรือกรดยูโรนิคอื่นๆ การย่อยสลายโครงสร้างหลักที่เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันจะต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไซลาเนส โดยพบว่าเอนไซม์ไซลาเนสประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ทำงานร่วมกันคือ

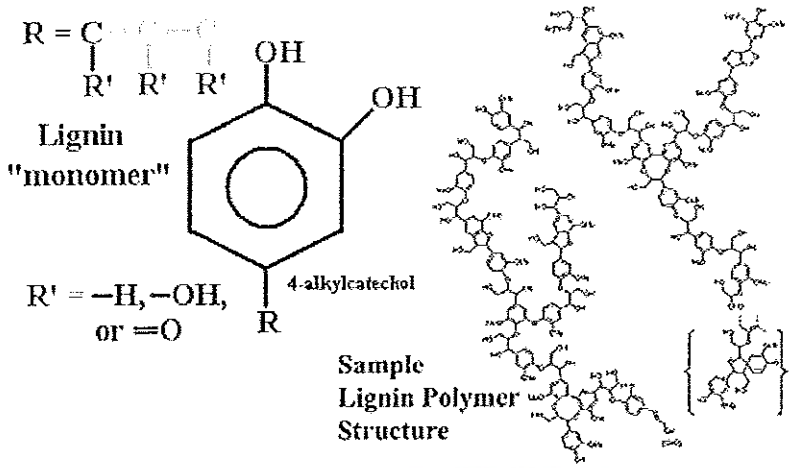
2.1) เอนโดไซลาเนส (Endo-xylanases) (1⟶ 4 - β – D - xylan xylohydrolases; EC 3.2.1.8) การเข้าทำการย่อยสลายพันธะ 1,4 -glycosidic bond ของ β – D - xylopyranoside บริเวณด้านในของสายไซแลน ปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่อสับเสตรตจะขึ้นอยู่กับความยาวของสายโพลีเมอร์น้ำตาลไซโลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ชนิดนี้ คือ ไซโลไบโอส (Xylobiose), ไซโลไตรโอส (Xylotriose) และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylo-oligosaccharides)

2.2) เอกโซไซลาเนส (Exo-xylanases) (1⟶ 4 - β -D-xylan xylohydrolases; EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายไซแลน และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีสายยาวๆ ไปเป็นไซโลสได้ดี แต่จะย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นสายสั้นๆ ได้น้อย

2.3) บีต้า-ไซโลซิเดส (β - xylosidases) (Xylobiaises; Exo - 1,4 - β –D - xylosidases; EC 3.2.1.37) เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีสายสั้นๆ ไปเป็นไซโลส

3) ลิกนิน (Lignin) เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่มีอยู่ในพืชซึ่งจัดเป็นโพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) เกิดจากฟีนิลโพรเพนแต่ละหน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ และคาร์บอน - คาร์บอน ลิกนินในโครงสร้างไม้มีอยู่ประมาณ 20-35 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลสูง และไม่มีโครงสร้างที่แน่นอน ในธรรมชาติสามารถสร้างพันธะโควาเลนท์กับหมู่ L- arabinosyl และ glucuronosyl residue ของไซแลน จึงเป็นไปได้ว่ามีการสร้าง cross - link ระหว่างลิกนินกับไซแลน หรือไซแลนกับโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ ลิกนินในเนื้อไม้มีหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างเยื่อชั้นนอก (outer layer) ของเส้นใย (fiber) และเป็นสิ่งที่เพิ่มความแข็งแรงให้แก่เส้นใย

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ 3 โครงสร้างของลิกนิน

ที่มา : http://www. withfriendship.com/user/levis/lignin.php

สำหรับการทดลองนี้เลือกใช้แหล่งคาร์บอนจาก 2 แหล่ง คือ

1) ซังข้าวโพด

ลักษณะทั่วไป : ซังข้าวโพดได้จากการสีข้าวโพดเพื่อนำเมล็ดมาใช้งานส่วนใหญ่เป็นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในส่วนของลำต้นจะถูกตัดหลังจากการเก็บเกี่ยวแล้ว

แหล่ง : ปัจจุบันการสีข้าวโพดจะใช้เครื่องจักรที่สามารถเคลื่อนที่ไปตามไร่ข้าวโพด ดังนั้นจะสามารถหาซังข้าวโพดและต้นข้าวโพดได้ตามไร่ข้าวโพดทั่วไป

การนำไปใช้งาน : ซังข้าวโพดมีประโยชน์หลายอย่าง นำไปเป็นวัตถุดิบผลิตแอลกอฮอล์ เป็นเชื้อเพลิงผสมกับโมลาสเพื่อเลี้ยงสัตว์ เป็นต้น ส่วนลำต้นนำไปเลี้ยงสัตว์ได้เช่นกัน

จุดเด่น : ซังข้าวโพดมีค่าความร้อนสูง เมื่อเทียบกับชีวมวลอื่นๆ ส่วนลำต้นข้าวโพดมีส่วนหนึ่งที่ไม่ได้นำไปใช้งานชาวไร่ข้าวโพดจะไถฝังกลบในไร่

จุดด้อย : ซังข้าวโพดมีการนำไปใช้ประโยชน์หลายอย่าง ดังนั้นต้องพิจารณาถึงแหล่งที่มีการนำไปใช้งานน้อยที่สุด เพื่อไม่ให้มีการแก่งแย่งกันซื้อ ส่วนลำต้น ข้าวโพดจะเก็บรวบรวมลำบากต้องใช้แรงคนมาก

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2) ชานอ้อย

ลักษณะทั่วไป : ชานอ้อย หมายถึงส่วนของลำต้นอ้อยที่หีบเอาน้ำอ้อยหรือน้ำตาลออกแล้ว องค์ประกอบของชานอ้อย จะประกอบไปด้วย ลิกนิน และน้ำตาล น้ำตาลก็จะมีทั้งน้ำตาลไซโลส กลูโคส อะราบิโนส

แหล่ง : ชานอ้อยสามารถหาได้จากโรงงานน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่หลังกระบวนการหีบอ้อย และตามร้านขายน้ำอ้อยทั่วไป

การนำไปใช้งาน : ชานอ้อยมีการนำไปใช้ประโยชน์ดังนี้

(ที่มา : http://guru.sanook.com/search/knowledge_search.php)

<u>การใช้ประโยชน์โดยตรง</u>

ก) ใช้เป็นอาหารมนุษย์ ส่วนของลำต้นที่เก็บน้ำตาลสามารถนำมาเป็นอาหารของมนุษย์ได้เช่นทำเป็นอ้อยควั่น หรือบีบเอาน้ำอ้อยเพื่อบริโภคโดยตรงหรือทำเป็นไอศครีมเป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ลำต้นประกอบอาหาร เช่น ต้มเค็มปลาได้อีกด้วย

ข) ใช้เป็นอาหารสัตว์ ใบ ยอด และส่วนของลำต้นที่ยังอ่อนใช้เป็นอาหารสัตว์ เช่น วัวควายได้โดยตรง แต่ถ้าต้องการให้ได้ผลดีควรใช้วิธีหมักก่อนให้สัตว์กิน

ค) ใช้เป็นเชื้อเพลิง ในอนาคตเมื่อเชื้อเพลิงที่ได้จากไม้หายาก ใบอ้อยแห้ง (trash) อาจจะเป็นแหล่งของพลังงานและเชื้อเพลิงที่สำคัญ ทั้งนี้เพราะใบอ้อยแห้งให้พลังงานค่อนข้างสูงมาก กล่าวกันว่าคุณค่าของพลังงานที่ได้จากใบอ้อยแห้งของอ้อยที่ให้ผลผลิตไร่ละ 16 ตัน นั้นเพียงพอสำหรับรถแทรกเตอร์ขนาดกลางทำงานได้ถึง 80 ชั่วโมง

ง) ใช้เป็นวัตถุคลุมดินหรือบำรุงดิน ใบอ้อยแห้งเมื่อใช้คลุมดินจะช่วยรักษาความชื้นและป้องกันวัชพืชด้วย ในขณะเดียวกันก็จะกลายเป็นอาหารของจุลินทรีย์ต่างๆ ซึ่งบางพวกสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ทำให้ไนโตรเจนในดินเพิ่มขึ้นอันเป็นผลดีแก่อ้อย นอกจากนี้รากและเหง้าที่อยู่ในดินเมื่อเน่าเปื่อยผุพังก็จะเป็นปุ๋ยแก่ดินนั้นต่อไป

<u>การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม</u>

ก) ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำตาล ในทางเคมีน้ำตาลส่วนใหญ่ที่ได้จากอ้อยเป็นน้ำตาลซูโครส นอกจากนี้ก็มีน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตสอยู่ด้วย ซึ่งทั้งสองชนิดนี้รวมเรียกว่าน้ำตาลอินเวิร์ต (invert sugar) ในทางการค้าน้ำตาลจากอ้อยมีชื่อเรียกต่างๆ กันตามความบริสุทธิ์และกรรมวิธีในการผลิต เช่น น้ำตาลแดงหรือน้ำตาลทรายแดง (brown sugar, gur, jaggery, muscovado) น้ำตาลดิบหรือน้ำตาลทรายดิบ (raw sugar) น้ำตาลทรายขาว (white sugar หรือ plantation white sugar) น้ำตาลทรายบริสุทธิ์ หรือน้ำตาล

ทรายขาวบริสุทธิ์ (refined sugar)

ข) ใช้เป็นเชื้อเพลิง สำหรับผลิตไอน้ำและกระแสไฟฟ้าสำหรับใช้ภายในโรงงาน น้ำตาลชานอ้อยสามารถใช้แทนน้ำมันเชื้อเพลิง (fuel oil)ได้ดี ชานอ้อยที่มีความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์หนัก 3 ตันเมื่อเผาจะให้พลังงานไล่เลี่ยกับน้ำมันเชื้อเพลิงหนัก 1 ตัน

ค) ใช้ผลิตวัสดุก่อสร้างโดยอาศัยกาว เช่นอัดเป็นแผ่น (particle board) ไม้อัดผิวเส้นใย(fiber-overlaid plywood) และแผ่นกันความร้อน (insulating board) เป็นต้น

ง) ใช้ผลิตเยื่อกระดาษ (pulp) และกระดาษชนิดต่างๆ ชานอ้อยส่วนใหญ่ประกอบด้วย ลิกนิน และมีเซลลูโลสอยู่บ้างเล็กน้อย ไฟเบอร์ของชานอ้อยค่อนข้างสั้น คือมีความยาวเฉลี่ยเพียง 1.4 มิลลิเมตร เท่านั้น

จ) ใช้เป็นอาหารสัตว์ ชานอ้อยถ้าให้สัตว์กินโดยตรงมักจะเกิดปัญหาเกี่ยวกับรสชาติ การย่อยของสัตว์ ตลอดจนมีอัตราส่วนต่ำระหว่างอาหารที่สัตว์กินกับน้ำหนักตัวที่เพิ่ม วิธีที่ดีก็คือนำมาหมักก่อนที่จะให้สัตว์กิน

ฉ) ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมผลิตสารเฟอร์ฟูราล (furfural), เฟอร์ฟูริลแอลกอฮอล์ (furfuryl alcohol) และไซลิทอล (xylitol)

ช) ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตไข (wax) ประมาณครึ่งหนึ่งของไขที่มีอยู่บนต้นอ้อย จะปะปนอยู่ในกากตะกอน ประมาณกันว่าทุกๆ ตันของอ้อยที่เข้าหีบจะให้ไขประมาณ 450 กรัม ตัวเลขดังกล่าวแตกต่างกันไปตามพันธุ์อ้อยและบริเวณที่ปลูก ไขที่ได้จากอ้อยสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายอย่าง เช่น อุตสาหกรรมผลิตสารขัดเงา ผลิตหมึกสำหรับกระดาษคาร์บอน และผลิตลิปสติก เป็นต้น

จุดเด่น : สามารถย่อยสลายได้ง่าย และมีคุณสมบัติทางเคมีที่ดี

จุดด้อย : มีราคาสูง และการนำไปใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่โดยการเป็นเชื้อเพลิง

2.2.2 แหล่งไนโตรเจน (สุวดี, 2550)

สำหรับแหล่งไนโตรเจนเป็นส่วนที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน แหล่งไนโตรเจนมักจะเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) มากกว่าแต่ธาตุไนโตรเจน (inorganic nitrogen) โดยทั่วไปจะใช้สารพวกแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) และสารละลายแอมโมเนียม (ammonia solution) เป็นส่วนประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับเชื้อ *T. reesei* จากงานวิจัยของ Haltrich (1996) พบว่าสารพวกไนเตรท (nitrate) และยูเรีย (urea) ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเมื่อผสมลงในอาหารเพาะเลี้ยง และจากงานวิจัยของ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Haapala (1996) พบว่าเปปโตน (peptone) และยีสต์สกัด (yeast extract) มีส่วนช่วยในการเจริญของเชื้อ *T. reesei* และยังเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์

สำหรับการทดลองนี้เลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจาก 2 แหล่ง คือ

1) รำข้าวแยกออกเป็น 2 ชนิด คือ รำหยาบและรำละเอียด รำหยาบมีส่วนผสมของแกลบปน ทำให้คุณค่าต่ำกว่ารำละเอียดเพราะมีเยื่อใยสูงและมีแร่ซิลิกาปนในแกลบมาก รำเป็นส่วนผสมของ pericarp, aleuron layer, germ และบางส่วนของ endosperm ของเมล็ด รำหยาบมีโปรตีนประมาณ 8 – 10 เปอร์เซ็นต์ ไขมันประมาณ 7 – 8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนรำละเอียดมีโปรตีนประมาณ 12 – 15 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 12 – 13 เปอร์เซ็นต์ รำมีไขมันสูงจึงไม่ควรเก็บรำไว้นานเกิน 15 –20 วัน เพราะจะมีกลิ่นจากการหืน รำข้าวที่ได้จากการสีข้าวเก่ามีความชื้นต่ำทำให้เก็บได้นานกว่ารำข้าวใหม่ที่มีความชื้นสูง เชื้อราขึ้นง่ายและเหม็นหืนเร็ว ส่วน รำข้าวนาปรังอาจมีสารตกค้างของยาฆ่าแมลงปะปนมาด้วย รำข้าวเป็นอาหารคาร์โบไฮเดรตที่มีกรดอะมิโนค่อนข้างสมดุล มีคุณค่าทางอาหารสูง มีวิตามินบีค่อนข้างมาก รำที่สกัดน้ำมันออกโดยกรรมวิธีต่างๆ เช่น รำอัดน้ำมัน (hydraulic press) หรือรำสกัดน้ำมัน (solvent extract) จะเก็บได้นานกว่า และมีปริมาณของโปรตีนสูงกว่ารำข้าวธรรมดาเมื่อคิดต่อหน่วยน้ำหนัก แต่ปริมาณไขมันต่ำกว่า คุณภาพของรำสกัดน้ำมันขึ้นอยู่กับกรรมวิธี เพราะถ้าร้อนเกินไปทำให้คุณค่าทางอาหารเสื่อม โดยเฉพาะกรดอะมิโนและวิตามินบีต่างๆ ปัญหาในการใช้พบว่ามักมี หินฝุ่นหรือดินขาวปนมา ทำให้คุณค่าทางอาหารต่ำลง หรืออาจมียากำจัดแมลง สารเคมี หรือมีแกลบปะปน

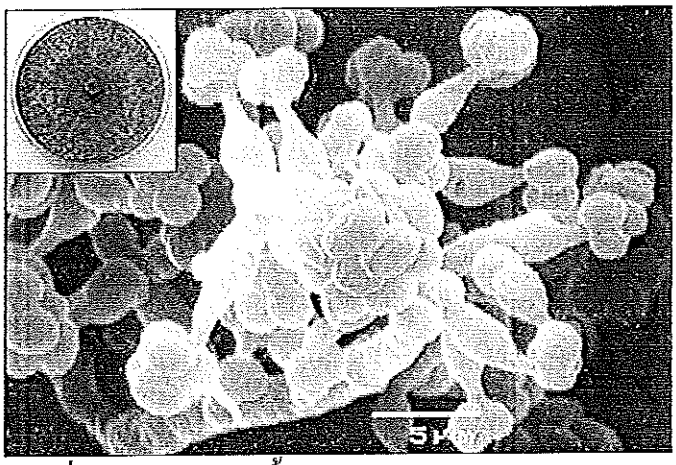
2) แกลบ ประกอบไปด้วย โปรตีน ไขมัน เยื่อใย คาร์โบไฮเดรต เถ้า สารซิลิกา แคลเซียม ฟอสฟอรัส ลิกนิน เซลลูโลส เพนโตแซน เฮมิเซลลูโลส และอื่นๆ เราสามารถนำแกลบไปใช้งานได้หลายอย่าง เช่น ทำปุ๋ยใส่ต้นไม้ นำไปเผาใช้เป็นพลังงานความร้อนได้ เป็นขี้เถ้าใช้ทำสบู่หรือใส่ในนาข้าวเพื่อปรับสภาพดิน และช่วยลดการทำลายของโรคและแมลงศัตรูข้าว ใช้ผสมดินเหนียวเป็นส่วนประกอบของอิฐ ฯลฯ

3. จุลินทรีย์ (สุวดี, 2550)

ไตรโคเดอร์มา สปีชีส์ (*Trichoderma* spp.) มีชื่อเรียกในทางราชการคือ "ไตรโคเดอร์มา" เป็นเชื้อราจำพวก ซาโปรไฟต์ (Saprophyte) ดำรงชีวิตอยู่ในดิน อาศัยเศษซากพืช และซากสัตว์และแหล่งอินทรีย์วัตถุเป็นแหล่งอาหาร สามารถพบได้โดยทั่วไป และทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินธรรมชาติได้ง่าย เจริญได้รวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา สร้างเส้นใยสีขาวและผลิต

โคนิเดีย (Conidia) หรือสปอร์ รวมเป็นกลุ่มเห็นเป็นสีขาว เชื้อไตรโคเดอร์มาเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุของโรคพืชหลายชนิด โดยวิธีปรสิต (mycoparasite) โดยการพันรัดหรือแทงเข้าสู่ภายในเส้นใยของเชื้อโรค การแข่งขันการใช้อาหารกับเชื้อโรค (Competition) สามารถผลิตสารปฏิชีวนะสาร (Antibiotic) สารพิษ (Toxins) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถชักนำให้ต้นพืชมีความต้านทานต่อเชื้อโรคพืชได้

เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้นั้นพบทั้งในแบคทีเรียและรา สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้นั้นมีหลายสายพันธุ์ เช่น *Pseudomonads* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ *Bacillus* spp. และ *Cellulomonas* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้อากาศหรือไม่ใช้ก็ได้ และ *Clostridium* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ เป็นต้น เชื้อ *Clostridium* spp.เป็นแบคทีเรียที่มีอัตราการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด แต่ส่วนมากไม่นิยมนำแบคทีเรียมาใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เนื่องจากมีอัตราการผลิตเอนไซม์ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการใช้เชื้อรา ส่วนเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสนั้นพบได้ในเชื้อราหลายสายพันธุ์ เช่น *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. และ *Phanerochaete chrysosporium* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสนั้นนิยมใช้เชื้อ *Trichoderma* spp. ในการผลิตเนื่องจากมีอัตราการผลิตเอนไซม์และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่น แต่สำหรับการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมนั้นจะไม่ใช้สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) นิยมใช้สายพันธุ์ที่มีการดัดแปร (mutant strain) เพื่อให้มีอัตราการผลิตเอนไซม์สูงขึ้นและเหมาะสมสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมตัวอย่างเชื้อที่มีการศึกษา เช่น เชื้อ *T. reesei* QM 6a ทำการดัดแปรได้เป็นเชื้อ *T. reesei* QM 9414 ซึ่งมีความพิเศษต่างจากเชื้อดั้งเดิมคือมีอัตราการปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอกสูงกว่า จากนั้นทำการดัดแปรพันธุกรรมด้วยแสงยูวี และสารเคมีต่างๆ ได้เป็นเชื้อ *T. reesei* MCG 77 ซึ่งมีระยะช่วงก่อนเพิ่มจำนวน (lag phase) สั้นกว่าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม , *T. reesei* Rut NG 14 มีอัตราการผลิตเอนไซม์มากกว่าสายพันธุ์ถึง 3 เท่า และ *T. reesei* Rut C30 เป็นสายพันธุ์ที่มีการดัดแปรพันธุกรรมให้ทนต่อการเกิด carbon catabolite repression เป็นต้น



ภาพที่ 4 ลักษณะของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ที่มา : http://www.themushroompeople.com/showArticle.asp

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Chinedu and Okochi (n.d.) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* และ *Trichoderma harzianum* โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งเป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ขี้เลื่อย, ชานอ้อย และซังข้าวโพด จากการทดลองวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์โดยการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing-sugar method) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของ *A. niger*, *P. chrysogenum* และ *T. harzianum* มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.54, 0.67 และ 0.39 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลา 36, 12 และ 60 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า *P. chrysogenum* เป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด และใช้เวลาสั้นที่สุด นอกจากนี้พบว่าวัสดุเหลือทิ้งที่มีความเหมาะสมในการใช้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดและมีต้นทุนต่ำ ได้แก่ ขี้เลื่อย

Yusoff *et al.* (2000) ศึกษาการย่อยสลายชานอ้อยโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma reesei* ร่วมกับ *Aspergillus terreus* ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง (solid substrate) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.68 IU/ ml, เอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดสเท่ากับ 0.08 IU/ ml และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยอัตราส่วนของเชื้อผสม *T. reesei* : *A. terreus* เท่ากับ 2 : 1 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าอัตราส่วน 1 : 2 และ 1 : 1 และมีการย่อยสลายชานอ้อยได้ 22 เปอร์เซ็นต์

Shiahmorteza *et al.* (2003) เปรียบเทียบความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma reesei* (CBS 383.73) และ *Botrytis* sp. ในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ชานอ้อย, เปลือกข้าวบาร์เล่ย์, เปลือกข้าวสาลี และขี้เลื่อย พบว่าเมื่อ treat วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเหนี่ยวนำให้ *T. reesei* มีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ของ *Botrytis* sp. การจะให้เชื้อ *Botrytis* sp. มีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นต้อง treat วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์

Baig (2005) ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้เชื้อรา *Trichoderma lignorum* บนวัสดุเหลือทิ้งที่ได้จากกล้วย พบว่า เชื้อราจะให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดสเท่ากับ 0.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ได้แก่ ใบตอง และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ได้แก่ ถั่วเหลือง โดยมีพีเอชเท่ากับ 5.6-5.8 และอุณหภูมิในการหมักเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส

Deshpande *et al.* (2008) ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนสของเชื้อรา *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* และเชื้อผสมโดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งซึ่งมีพีชไฮยาซินเป็นส่วนผสม พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราแบบเดี่ยว *T. reesei* เป็นสายพันธุ์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า โดยใช้เวลาหมัก 10 วันจะมีการสร้างเอนไซม์ได้สูงสุด และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในถังหมักจะมีการสร้างเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเชื้อราผสมทั้งสองสายพันธุ์จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้เพิ่มมากขึ้น

Ahmed *et al.* (2009) ศึกษาความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการสร้างเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลส ได้แก่ เอกโซกลูคาเนส, เอนโดกลูคาเนส และบีต้า-กลูโคซิเดส ในสภาวะพีเอช 5 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเวลา 120 ชั่วโมง จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 49.22, 0.63 และ 0.35 IU/ ml ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ในสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด

Shafique *et al.* (2009) ศึกษาการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Trichoderma* spp. พบว่า จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) *T. viride* สายพันธุ์ FCBP-142 และ FCBP-232, *T.reesei* สายพันธุ์ FCBP-271 และ FCBP-364, *T. harzianum* สายพันธุ์ FCBP-210 และ FCBP-325 มีความสามารถในการสร้าง

เอนไซม์กลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวเป็นเวลา 72 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส พีเอช 4

Castro *et al.* (2010) ศึกษาความสามารถของเชื้อรา *T. harzianum* IOC-3844 ในการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสโดยการย่อยสลายชานอ้อยในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลว (Submerge) ซึ่งเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ได้เท่ากับ 6,358 ยูนิตต่อลิตร โดยใช้เวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ crude enzyme ที่สกัดได้จากการย่อยสลายชานอ้อยไปบ่มที่อุณหภูมิ 37, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงสุด 50 องศาเซลเซียส ซึ่งการทนอุณหภูมิสูงในระดับดังกล่าวจะมีส่วนสำคัญสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสต่อไป

Malik *et al.* (2010) ศึกษาสภาวะที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Trichoderma viride* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบอาหารเหลว พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดท่ากับ 1.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที เมื่อหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.5 และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และอัตราส่วนของเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์

Malik *et al.* (2010) ศึกษาความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma viride* ในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายชานอ้อยที่ถูก treat ด้วยวิธีทางฟิสิกส์ คือ การใช้ไอน้ำร้อนอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และ 200 องศาเซลเซียส และวิธีทางเคมีโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์, กรดซัลฟิวริก, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และโซเดียมไฮโปคลอรัส หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลว เพื่อเปรียบเทียบผลผลิตของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า วิธี treat ด้วยไอน้ำร้อนอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียสจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 1.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที และปริมาณชานอ้อยที่เหมาะสมในการผสมในอาหารเหลวเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์

Maeda *et al.* (2011) ใช้เชื้อรา *Penicillium funiculosum* และ *Trichoderma harzianum* ในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายชานอ้อย พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* ให้ผลในการย่อยสลายชานอ้อยเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ซึ่งสูงกว่า *P. funiculosum* ซึ่งย่อยสลายชานอ้อยเท่ากับ 88.5 เปอร์เซ็นต์ ผลของการย่อยสลายชานอ้อยที่เพิ่มสูงขึ้นนอกจากจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแล้วยังสัมพันธ์กับกิจกรรมของทั้งเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดสและไซลาเนสอีกด้วย

กรอบแนวคิดในการวิจัย

การที่เชื้อราจะสามารถย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้เป็นผลมาจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส เนื่องจากในพืชจะประกอบด้วยเซลลูโลส และเฮมิ-เซลลูโลสเป็นหลัก ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้นอกจากจะเป็นการวัดความสามารถในการสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดแล้วยังเป็นการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่เชื้อราใช้ในการย่อยสลายเพื่อให้ได้แหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY