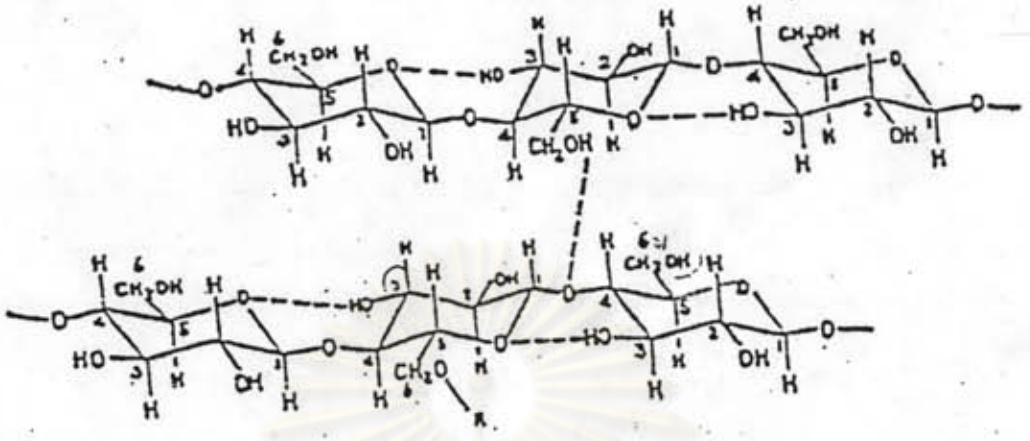
# บทที่ 2

## วารสารปริทัศน์

**เซลลูโลส** (Cellulose)

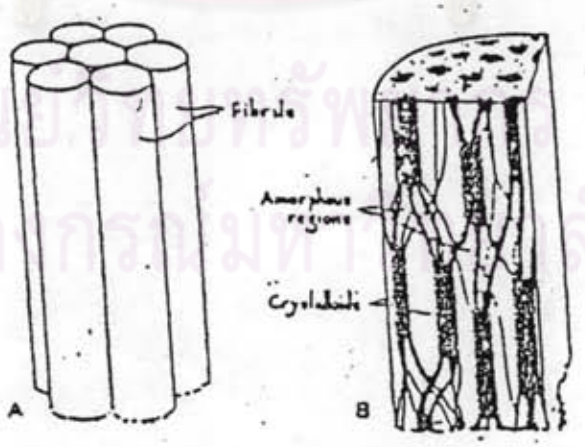
เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลีแซ็กคาไรด์ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติสามารถเปลี่ยนกลับมาใช้ประโยชน์ได้อีก เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในพืช ในแต่ละปีจะพบว่ามีเซลลูโลสจากพืชประมาณ $11.4 \times 10^{15}$ กิโลกรัม (Bassham, 1975) ที่ผนังเซลล์ของพืชมีเซลลูโลสประมาณร้อยละ 50 ส่วนที่เหลือเป็นเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน ไขมัน แทนนิน เรซิน กรดไขมัน เทอร์พีนอัลคาลอยด์ น้ำตาลที่ละลายได้ (soluble saccharides) แป้ง และสารอื่น ๆ (Ander, 1979; Cowling, 1975; Cowling และ Kirk, 1976) โมเลกุลของเซลลูโลสประกอบด้วย ดี-แอนไฮโดรกลูโคไพราโนส (D-anhydroglucopyranose) เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ 1-4 กลูโคซิดิค (1-4-glucosidic bonds) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 ของกลูโคสโมเลกุลกับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ของกลูโคสโมเลกุลถัดไป จำนวนกลูโคสใน 1 โมเลกุล (degree of polymerization - DP) มีตั้งแต่จำนวนน้อยกว่า 15 หน่วย จนกระทั่งสูงมากถึง 14,000 หน่วย (Cowling และ Kirk, 1976) น้ำหนักโมเลกุลมีค่าอยู่ระหว่าง 50,000 - 2,500,000 ดาลตัน (Norkrans, 1967) และความยาวทั้งหมดของโมเลกุลเซลลูโลสมีค่ามากกว่า 5 ไมโครเมตร สามารถแสดงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลได้ดังแสดงในรูปที่ 1

รูปแบบ (conformation) ของการจัดเรียงตัวของหน่วย ดี-กลูโคสในสายเซลลูโลสจะมีลักษณะเป็นรูปเก้าอี้ (chair form) แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลส (intramolecule) จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) สองแห่งคือ ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวน (ring) ของโมเลกุลถัดไป และระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับ 2 ของโมเลกุลถัดไป นอกจากนี้ยังมีการเชื่อมต่อ (link) ระหว่างสายเซลลูโลส (intermolecule) ที่ขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ในอีกสายหนึ่ง



รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างเซลลูโลส (Nisizawa, 1973)

การจัดเรียงตัวเหล่านี้ทำให้สายเซลลูโลสขนานกันเป็นชั้น ๆ อย่างมีระเบียบในลักษณะที่เรียกว่า คริสตัลไลน์ไมเซลล์ (crystalline micelles) โดยแต่ละไมเซลล์ประกอบด้วยโมเลกุลเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุล มีรูปร่างเป็นแถบหนา ไมเซลล์ประมาณ 10 - 20 ไมเซลล์จะมาเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้น เรียกว่าไมโครไฟบริล (microfibril) ดังรูปที่ 2




รูปที่ 2 ลักษณะของไมโครไฟบริล (Nisizawa, 1973)

A : กลุ่มไมโครไฟบริลที่เรียงตัวขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน

B : ภาพตัดตามยาวของไมโครไฟบริล

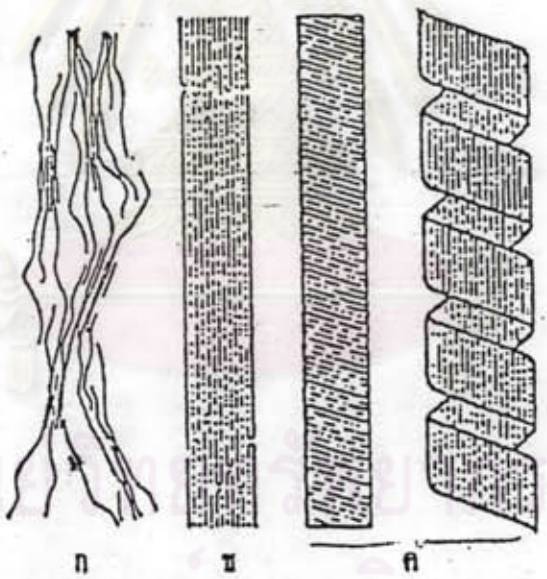
สามารถแบ่งลักษณะโครงสร้างเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืช ตามการจัดเรียงตัวของไมโครไฟบริลได้ 3 ลักษณะ คือ

1. ฟริงจ์ไมเซลล์ (fringe micelles) คือไมโครไฟบริลที่เรียงตัวเป็นริ้ว ๆ ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) และอสัณฐาน (amorphous) รูปที่ 3 ก.

2. โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส รูปที่ 3 ข.

3. โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นริบบินหนา เกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้งฉากกับแกนของริบบิน และริบบินจะม้วนเป็นเกลียว (helix) รูปที่ 3 ค.

ผนังเซลล์ของพืชจะมีเซลลูโลสจัดเรียงตัวเป็นแถบ ๆ ไม่ติดต่อกันโดยตลอด เมื่อเซลล์แก่เต็มที่ภายในช่องว่างจะเต็มไปด้วยลิกนิน นอกจากนี้ยังมีโพลีแซ็กคาไรด์อื่น ๆ ที่ปนอยู่กับเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ได้แก่ ไซแลน (xylan), แมนแนน (mannan), โพลียูโรไนด์ (polyuronide), อะระแบน (araban), กาแลคแตน (galactan) โพลีแซ็กคาไรด์เหล่านี้มักพบในปริมาณที่น้อยกว่าเซลลูโลส




สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป

(Nisizawa, 1973)

ก. ฟริงจ์ไมเซลล์ (fringe micelles) ในไมโครไฟบริล

ข. โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส

ค. โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นริบบินหนา

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปกติเซลลูโลสไม่ละลายน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือ สารละลายด่างอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในกรดหรือด่างแก่ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามลักษณะการละลายในกรดหรือด่างได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. แอลฟา-เซลลูโลส ($\alpha$-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ความเข้มข้นร้อยละ 17.5

2. เบต้า-เซลลูโลส ($\beta$-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 17.5

3. แกมมา-เซลลูโลส ($\gamma$-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สุด สามารถละลายได้ดีทั้งในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 และสารละลายกรดเจือจาง

**เฮมิเซลลูโลส** (Hemicellulose)

เป็นอินทรีย์สารที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส และถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ (polymer) ของน้ำตาลเพนโตส (pentose) มีลักษณะเป็นเฮเทอร์โรจีเนียส (heterogenous) โดยประกอบด้วยโพลีแซ็กคาไรด์หลายชนิดมารวมกัน มีลักษณะโครงสร้างเป็นกิ่งก้านสาขา ซึ่งแตกต่างจากเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงอย่างมีระเบียบ น้ำหนักโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสจะต่ำกว่าเซลลูโลส ขนาดของโมเลกุลมีความยาว 30 - 50 หน่วย และมีองค์ประกอบหลักคือ ไซแลน นอกจากนี้ยังมี กลูแคน (glucan) แมนแนน และ กาแลคแตน เฮมิเซลลูโลสเมื่อถูกย่อยสลายจะได้เป็นน้ำตาลเพนโตส และเฮกโซส (hexose) ได้แก่ ไซโลส (xylose) แมนโนส (mannose) กาแลคโตส (galactose) และ อะราบิโนส (arabinose)

**ลิกนิน** (Lignin)

เป็นสารประกอบที่มีอยู่ในพืช รองลงมาจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส พบใน secondary layer ของผนังเซลล์และใน middle lamella ของพืช ในพืชที่อ่อนอยู่มีลิกนินเพียงเล็กน้อย และจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อพืชแก่ขึ้น โครงสร้างของลิกนินเป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) ที่ประกอบด้วยหมู่เมทธอกซี (methoxy group, $-OCH_3$) หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) และส่วนที่เป็นสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compound) โดยปกติไม่สามารถระบุได้ว่าลิกนินเป็นสารประกอบประเภทใด เพราะไม่สามารถกำหนดโครงสร้างที่แน่นอนได้ ทั้งนี้เนื่องจากลิกนินจะไม่อยู่ในลักษณะตัวเดียวโดด ๆ แต่จะเกาะกันเป็นสายยาวซึ่งมีอยู่หลายแบบ ลิกนินไม่ละลายในน้ำและสารอินทรีย์ทุก

ชนิด โดยทั่วไปลิกนินจะอยู่ภายในโครงสร้างของพืช บริเวณรอบ ๆ เซลลูโลสและจะช่วยป้องกันเซลลูโลสจากการถูกย่อยสลาย

**การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส**

ลักษณะโครงสร้างทางกายภาพของเซลลูโลสที่ปรากฏแตกต่างกัน ขึ้นกับพันธะภายในโมเลกุล พันธะภายนอกโมเลกุล พันธะระหว่างสายโซ่กลูโคส และการรวมตัวกับเอมิ-เซลลูโลส ลิกนิน เรซิน เกลือแร่ (Rockwell, 1976) จึงพบมีเซลลูโลสทั้งในรูปผลึก (crystalline) และรูปอสัณฐาน (paracrystalline or amorphous) เซลลูโลสรูปผลึกมีโครงสร้างที่แน่นหนามาก ทำให้สารละลายกรด และเอนไซม์ ซึมเข้าย่อยสลายยาก ซึ่งแตกต่างกับชนิดอสัณฐาน จุลินทรีย์ที่ค้นพบส่วนใหญ่ให้เซลลูเลสที่ย่อยสลายเซลลูโลสรูปอสัณฐาน แต่ส่วนน้อยที่สามารถย่อยเซลลูโลสรูปผลึกซึ่งเป็นเซลลูโลสตามธรรมชาติ ดังนั้นการศึกษาจึงมักเน้นความสำคัญที่เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลาย เซลลูโลสรูปผลึก

การย่อยสลายเซลลูโลสคือการลดจำนวนกลูโคสที่เรียงต่อกันในโมเลกุลของเซลลูโลสให้สั้นลง เมื่อถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะมีเพียงชนิดเดียวคือกลูโคส แต่ถ้าการย่อยสลายเกิดไม่สมบูรณ์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะประกอบไปด้วย กลูโคส เซลโลไบโอส และ โอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ McBurney (1954) ได้อธิบายว่า การย่อยสลายเซลลูโลสสามารถเกิดขึ้นได้ 4 ลักษณะคือ

1. การย่อยสลายแบบไฮโดรไลติก (Hydrolytic degradation) เซลลูโลสถูกย่อยทำให้มีความสามารถในการรีดิวซ์มากขึ้น

2. การย่อยสลายแบบออกซิเดทีฟ (Oxidative degradation) เซลลูโลสถูกย่อยเล็กลงและมีหมู่คาร์บอนิล และคาร์บอกซิลเพิ่มขึ้น

3. การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ (Microbiological degradation) เซลลูโลสถูกย่อยเล็กลง แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลลดลง

4. การย่อยสลายทางกล (Mechanical degradation) โมเลกุลเซลลูโลสจะมีขนาดเล็กลงได้ ถ้าใช้วิธีทางกายภาพที่รุนแรง เช่น ใช้แรงบด

โดยทั่วไปการย่อยสารประกอบเซลลูโลสสามารถทำได้ 2 วิธีคือ

1. การย่อยสลายด้วยสารเคมี (chemical hydrolysis) เป็นการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริค (hydrochloric acid) หรือกรดซัลฟุริค (sulfuric acid) กรดเหล่านี้มีความเข้มข้น และความสามารถในการกัดกร่อนสูง ฉะนั้น

อุปกรณ์ที่ใช้จะต้องทนต่อกรดได้เป็นอย่างดี อุปกรณ์ส่วนใหญ่จะมีราคาค่อนข้างแพง ทำให้การผลิตกลูโคสโดยวิธีนี้ต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก เซลลูโลสที่มีโครงสร้างเป็นผลึก (crystalline structure) มีความต้านทานต่อกรดได้สูงมาก จึงต้องใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงในการย่อยสลาย อีกทั้งจะต้องใช้อุณหภูมิสูงเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส ภายใต้สภาวะเช่นนี้ กลูโคสที่เกิดขึ้นบางส่วนจะทำปฏิกิริยากับกรดที่ใช้ในการย่อยสลาย เกิดเป็นสารประกอบชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ เช่น เฟอร์ฟูรัล (furfural) และ ไฮดรอกซี เมทธิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxy methyl furfural) นอกจากนี้ กรดที่ใช้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่น ๆ ที่ปนมากับเซลลูโลสได้ด้วย นั่นก็คือ ปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยใช้กรดจะไม่มีความจำเพาะ (nonspecificity) ต่อเซลลูโลส จากการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรดดังกล่าวข้างต้นทำให้ได้กลูโคสในปริมาณต่ำ รวมทั้งมีผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการปะปนอยู่ด้วย วิธีการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยสารเคมีจึงไม่เป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

2. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเหล่านี้ส่วนใหญ่จะได้จากเชื้อรา (fungi) และแบคทีเรีย (bacteria) เอนไซม์เซลลูเลสจะย่อยสลายเซลลูโลสได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกลูโคส เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่สภาวะไม่รุนแรงจึงจำเป็นต้องใช้เวลาในการย่อยสลายเป็นเวลาหลายชั่วโมงถึงหลายวัน แต่การใช้เอนไซม์นี้มีข้อดีกว่าการใช้กรด คือเอนไซม์มีความจำเพาะ (specificity) ต่อสารประกอบเซลลูโลส โดยไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลส ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ นอกจากนี้กลูโคสที่เกิดขึ้นจะถูกใช้ต่อไปภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ได้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันไปตามธรรมชาติของจุลินทรีย์

**ผลจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์**

จากการศึกษาแหล่งของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิด ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และ แอคติโนมัยซิส (actinomyces) จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้แตกต่างกัน ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน ทั้งนี้สภาพแวดล้อมจะเป็นปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุพวกเซลลูโลสแตกต่างกันออกไป เมื่อเซลลูโลสถูกย่อยสลายให้เป็นโมเลกุลเล็ก ๆ ที่ละลายน้ำได้ (soluble fragment) โมเลกุลเหล่านี้จะถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ เพื่อนำไปใช้ในการสร้างพลังงานและสารประกอบคาร์บอนภายในเซลล์ ผลที่ได้จากการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจน ได้แก่ ก๊าซคาร์บอน-ไดออกไซด์ สารประกอบไฮโดรคาร์บอน นอกจากนี้ยังมีสารตัวกลาง (intermediate

product) อื่น ๆ ในปริมาณที่ไม่มากนัก (Prescott และDunn, 1959) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้ จะต่างจากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน เพราะการย่อยสลายจะเกิดไม่สมบูรณ์ มีสารตัวกลางเกิดขึ้นในปริมาณมาก เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen gas) เอทธานอล (ethanol) กรดน้ำส้ม (acetic acid) กรดฟอร์มิค (formic acid) กรดซัคซินิค (succinic acid) กรดบิวทิริค (butyric acid) และ กรดแลคติค (lactic acid) (Alexander, 1977)

**การพัฒนาการผลิตเซลลูเลส**

ระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 กองทัพทหารของสหรัฐอเมริกาซึ่งประจำอยู่ที่แปซิฟิคใต้ประสบความเสียหายอย่างรุนแรงจากการทำลายสิ่งของเครื่องใช้โดยเชื้อรา เนื่องจากภูมิอากาศแถบนั้นเป็นแบบร้อนและชื้น ได้ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์และคัดเลือกเก็บไว้ Reese และ Mandels (1984) ได้นำเชื้อ Tridroderma reesei จากส่วนที่เก็บไว้นี้ มาศึกษาการผลิตเซลลูเลส นอกจากนี้การศึกษาการผลิตเซลลูเลสมักคัดเลือกจากเชื้อที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสในธรรมชาติได้ เช่น Penicillium purpurogenum (Takao และคณะ, 1985) T.reesei QM 6A เป็นเชื้อต้นแบบในการผลิตเซลลูเลส Reese และ Mandels (1984) ศึกษาและพัฒนาการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อนี้ รวมทั้งเชื้อสายพันธุ์อื่นที่พัฒนาจากเชื้อชนิดนี้ T.reesei ได้รับการยอมรับว่าเป็นเชื้อราที่สามารถผลิตเอนโดกลูคาเนส เช่น CMCase ได้ดีที่สุด และ Penicillium funiculosum ได้รับการยอมรับว่าเป็นเชื้อราที่สามารถผลิต glucosidase ได้ดีที่สุด

การผลิตเซลลูเลสในขั้นอุตสาหกรรมต้องใช้สารอาหารที่มีความเข้มข้นสูง ทำให้ยุ่งยากในการผสม จึงใช้ส่วนประกอบของอาหารเป็นคาร์บอนที่ละลายน้ำได้ ซึ่งเมื่อคาร์บอนถูกย่อยโดยเอนไซม์ได้กลูโคสซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการสร้างเอนไซม์ จึงพยายามแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นโดย

1. การกลายพันธุ์โดยวิธีการต่าง ๆ เช่น การฉายแสง UV, ใช้สารเคมี เช่น คาบิซิดิน, ไนโตรโซกัวนิดิน (Allen, 1983), เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต (Fennington และคณะ, 1984), 1-เมทธิล-3, ไนโตร-ไนโตรโซกัวนิดิน (Lachke และคณะ, 1986), ใช้รังสีแกมมาที่ได้จากโคบอลต์ 60 (Macris, 1984; Macris และ Panayotou, 1986) ทำให้ได้สายพันธุ์ใหม่จากสายพันธุ์เดิมที่ทนต่อการยับยั้งการผลิตเอนไซม์โดยกลูโคส (Warzywoda และคณะ, 1983) เช่น สายพันธุ์ใหม่จากเชื้อ Thermomonospora curvata (Fennington และคณะ, 1984), Penicillium funiculosum (Hoffman และ

Wood, 1985), T. reesei QM 9414 (Mishra และคณะ, 1982) และ T.reesei KY 746 (Kawamori และคณะ, 1985b)

2. กระตุ้นการสร้างเซลลูเลสโดยเติมสารกระตุ้นลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ เช่น ใช้ แลคโตส โซฟอโรส เซลโลไบโอส Mandel และ Webber (1969) ทดลองใช้ เซลลูโลสกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสโดย T.reesei Warzywoda และคณะ (1983) พบว่า แลคโตสและเซลโลไบโอสเป็นสารกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสที่ด้อยกว่าเซลลูโลสเมื่อใช้กับสายพันธุ์ดั้งเดิม (native strain) แต่เป็นสารกระตุ้นที่ดีกว่าในเชื้อกลายพันธุ์ Kawamori และคณะ (1985a) ใช้ แอล-ซอโบสกระตุ้นการทำงานของ CMCase ที่ผลิตโดย T.reesei Eriksen และ Goksoyr (1976) ใช้ไซแลนและเซลลูโลสกระตุ้นการผลิตเอนโดกลูคาเนสโดย Chaetomium thermophile

3. กรรมวิธีการหมักและเลือกใช้อาหารที่เหมาะสม การผลิตเซลลูเลสโดย T. reesei สามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งและอาหารเหลว Toyama และ Ogawa (1978) เปรียบเทียบการผลิตเซลลูเลสจาก T.reesei ระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งและอาหารเหลว พบว่าเซลลูเลสที่ผลิตได้มีคุณสมบัติเหมือนกัน แต่ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งจะมีความเข้มข้นมากกว่า และผลิตได้มากกว่า (Chahal, 1985) การเพิ่มการสร้างเซลลูเลสต้องดัดแปลงส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ โดย

3.1 ความชื้น Kim และคณะ (1985) ทดลองเพาะเลี้ยง T.reesei , Sporotrichum cellulophilum ในอาหารแข็งที่มีความชื้น 50% เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี แต่ความชื้นที่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อคือ 57% และ 70% ตามลำดับ

3.2 อุณหภูมิ Deschamps และ Huet (1984a, b) พบว่า Aspergillus phoenicis ผลิต β-glucosidase ในอาหารแข็งได้ดีที่อุณหภูมิสูง ๆ

3.3 วิธีการเติมสารอาหารลงในถังหมัก Ghose และ Sahai (1979) ทดลองเพาะเลี้ยง T.reesei QM 9414 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเซลลูโลส พบว่าถ้าค่อย ๆ เติมสารอาหารทุกอย่างลงในถังหมักให้มีความเข้มข้นคงที่ตลอดเวลาจะผลิตเซลลูเลสได้ดีที่สุด Allen (1983) ทดลองใช้ lactose แทนเซลลูโลสได้ผลดีเช่นเดียวกัน Hendy และคณะ (1984) ได้สรุปการผลิตเซลลูเลสโดย T.reesei C 30 ว่าจะผลิตได้มากที่สุด และอัตราการผลิตดีที่สุดเมื่อควบคุมปริมาณเซลลูโลสที่ใช้เป็นสารอาหารให้เหมาะสม (fed-batch fermentation)

4. เพาะเลี้ยงเชื้อในสารอาหารที่ประกอบด้วยของเหลวที่ไม่ผสมกัน เพื่อให้เอนไซม์ที่ผลิตได้แยกละลายในของเหลวส่วนหนึ่ง สารอาหารที่เหลือและเชื้ออยู่ในของเหลวอีกส่วนหนึ่ง เพื่อป้องกันการยับยั้งการผลิตเอนไซม์โดยกลูโคส Persson และคณะ (1984) ใช้สารผสมของ เดกซ์ทราน-โพลีเอทธิลลีน-ไกลคอล ในสารอาหาร ทำให้สามารถแยกเซลลูเลสได้ในส่วน โพลีเอทธิลลีน-ไกลคอล ซึ่งอยู่ในส่วนบนของสารผสม แต่วิธีการนี้ยุ่งยากไม่เป็นที่นิยมใช้

5. เติมสารจำเป็นที่ใช้จำนวนน้อยลงในสารอาหาร ซึ่งสารจำเป็นเหล่านี้ไม่ช่วยส่งเสริมการเจริญ แต่ทำให้ผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น เช่น แคลเซียม เหล็ก มังกานีส สังกะสี โคบอลต์ (Mandel และ Reese, 1957) Sternberg (1976a) ศึกษาส่วนประกอบของสารเหล่านี้ ซึ่งแสดงในตารางข้างล่างนี้

ตารางที่ 1 แสดงสูตรสารอาหารของห้องปฏิบัติการกองทัพอากาศสหรัฐอเมริกาสำหรับ T.reesei (Sternberg, 1976a)

| ส่วนประกอบ | ความเข้มข้นที่ใช้ (กรัม/ลิตร) |
|---|---|
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1.4 |
| $KH_2PO_4$ | 2.0 |
| Urea | 0.3 |
| $CaCl_2$ | 0.3 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.3 |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 0.005 |
| $MnSO_4.H_2O$ | 0.0016 |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 0.0014 |
| $CeCl_2$ | 0.002 |
| Proteose peptone | 0.75 |
| Tween 80 | 2.0 |
| Cellulose | 7.5 |
| ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น | 5.5-6.0 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เปปโตน ทวีน 80 และเซลลูโลส ในส่วนผสมมักจะจำกัดให้มีปริมาณน้อยที่สุด (Mandels และ Weber, 1969; Mandels และ Sternberg, 1976; Mandels และ Andreotti, 1978) Kubicek (1981), Robinson (1984), Trivedi และ Desai (1984) ได้นำสูตรสารตามตารางไปใช้เพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลลูเลสโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ พบว่าได้ผลดี มีการทดลองดัดแปลงส่วนประกอบบ้างเล็กน้อย เช่น Desai และคณะ (1982), Warzywoda และคณะ (1983), Loewenberg (1984), Chahal (1985), Durand และคณะ (1984) พบว่าถ้าเพิ่มเซลลูโลสในสารอาหารผลผลิตเอนไซม์จะเพิ่มมากขึ้น Hendy และคณะ (1984) พบว่า อาจเพิ่มการผลิตเอนไซม์โดยการเพิ่มส่วนประกอบอื่นได้เช่นเดียวกับเซลลูโลส

6. เลือกสารที่นำมาใช้ให้เหมาะสม เซลลูโลสที่บริสุทธิ์ใช้เป็นสารอาหารที่เพิ่มการผลิตเซลลูเลสได้ดีกว่าเซลลูโลสที่มีในธรรมชาติ (Gupta และคณะ, 1972) ปริมาณเซลลูโลสที่ใช้ไม่ควรมากกว่า 10% (Mandels และ Andreotti, 1978) เนื่องจากเซลลูโลสในความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อการหมุนของใบพัดในถังเพาะเลี้ยงเชื้อ ถ้าสามารถควบคุมปริมาณเซลลูโลสที่จะเติมให้เหมาะสม (fed-batch fermentation) ทีละน้อยจะทำให้ใช้เซลลูโลสในปริมาณมากกว่า 10% ได้ (Hendy และคณะ, 1984) Mandels และ Weber (1969) ใช้เปปโตนกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสโดย T.reesei QM 6a Allen(1983) พบว่า เชื้อที่กลายพันธุ์จากสายพันธุ์เดิมสามารถใช้แอมโมเนียมไอออนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ Warzywoda และคณะ (1983) พบว่าอาจใช้สารสกัดจากยีสต์แทนเปปโตนได้ ทำให้สามารถผลิตเซลลูเลสได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูก

Coutts และ Smith (1976) ใช้ 1% ซอลก้า-ฟลอค (solka floc) ในการผลิตเซลลูเลสโดย Sporotrichum thermophile ได้ผลดี และพบว่า แอมโมเนียม-ไอออนยับยั้งการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ แต่ไม่ยับยั้งการผลิต CMCase ไนเตรตและยูเรียเป็นสารอาหารประเภทไนโตรเจนที่กระตุ้นการผลิตเอนไซม์ได้ดี สารประกอบเซลลูโลสเช่น เพคติน แป้ง แลคโตส สามารถกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสโดย Aspergillus fumigatus (Trivedi และ Rao, 1979) แต่กลูโคส อะราบิโนส ซูโครส มอลโตส ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสได้ เซลโลไบโอสกระตุ้นการผลิตเซลลูเลสโดย T.reesei แต่เมื่อใช้กับเชื้อ A. fumigatus จะกระตุ้นการผลิต β-glucosidase เท่านั้น Wase และคณะ (1985b) ศึกษารูปแบบการทดลองการจัดหาสารที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส พบว่าส่วนประกอบของสารอาหารที่เหมาะสมคือ เซลลูโลส 35 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 24 กรัม โปแตสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต 35 กรัม แคลเซียม คลอไรด์ 1.4 กรัม เปปโตน 0.92 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.37 กรัม

Penicillium funiculosum ใช้ยูเรียผลิตเซลลูเลสได้ดีกว่า ใช้สารให้ไนโตรเจนชนิดอื่น (Joglekar และ Karanth, 1984) Takao และคณะ (1985) ได้ดัดแปลงสูตรสารอาหารที่ใช้ในห้องปฏิบัติการกองทัพอากาศสหรัฐอเมริกากับเชื้อ Penicillium purpurogenum โดยเลือกใช้เซลลูโลส และสารให้ไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าส่วนประกอบที่ดีที่สุดคือ แอมโมเนียมซัลเฟต 4.2 กรัม/ลิตร เปปโตน 1 กรัม/ลิตร อะวิเซล 4 กรัม/ลิตร เซลโลไบโอส-ออกตะ-อะซิเตรต 6 กรัม/ลิตร กากข้าวสาลี 10 กรัม/ลิตร ในทางการค้า endo-β-1, 4-glucanases ผลิตจาก A. niger (Vidmar และคณะ, 1984) ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย กรดซิตริค แต่เป็นเอนไซม์ที่ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสรูปผลึก จึงต้องมีการพัฒนาการผลิตต่อไปให้ได้เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพตามต้องการ

7. ใช้สารลดแรงตึงผิวใส่ในสารอาหารเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ เช่น ทวีน 80 (Mandels และ Weber, 1969) การเพิ่มการสร้างเซลลูเลสโดยสารลดแรงตึงผิวนี้อาจเนื่องมาจาก เมื่อเซลลูเลสถูกสร้างขึ้นใน rough endoplasmic reticulum แล้วถูกนำไปเก็บใน golgi apparatus ใน cytoplasm ก่อนจึงปล่อยออกภายนอกเซลโดยขบวนการ exocytosis หรือ autolytic process (Berg และ Petterson, 1977) สารลดแรงตึงผิวจะไปเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านผนังเซลล์ (cell membrane permeability) ของเอนไซม์ (Blanch และ Wilke, 1983) Desai และคณะ, (1982) ทดลองเพาะเลี้ยง Scytalidium lignicola ในสารอาหารที่มีทวีน 80 เป็นส่วนผสมพบว่าสามารถผลิตเซลลูเลสได้มากขึ้น

8. จัดหาปริมาณออกซิเจนในถังหมักให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ Wase และคณะ (1985 a) ทดลองเพาะเลี้ยง Aspergillus fumigatus ในถังคนเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในถังที่สามารถควบคุมปริมาณออกซิเจนได้ พบว่าในถังคนให้ผลิตผลน้อยกว่า เพราะกระจุกเส้นใยของเชื้อราถูกใบพัดในถังคนทำลาย Andren และ Nystrom (1976) พบว่าการเพาะเลี้ยง T.reesei ในอาหารที่มีออกซิเจนละลายอยู่น้อยกว่าร้อยละ 10 (dissolved oxygen tension, DOT) จะลดการเจริญของเชื้อและลดการผลิตเซลลูเลส Robinson (1984) ทดลองเลี้ยง T.reesei Rut C 30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมี DOT ร้อยละ 10 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี

9. จำกัดปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ พบว่าถ้าใช้เซลลูโลสร้อยละ 0.75 เพาะเลี้ยง T.reesei ความเป็นกรด-ด่างจะลดลงจาก 5.7 เป็น 2.7 ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตและทำให้เอนไซม์เสียสภาพ (Mandels และ Andreotti, 1978) ความเข้มข้นของเซลลูโลสที่เหมาะสมควรมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 0.5 - 1.0

10. ค่าความเป็นกรด-ด่าง Brown และ Zainudeen (1977) ทดลองเพาะเลี้ยง T.reesei QM 9123 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคส พบว่าผลิตเซลลูเลสได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 ถ้าสามารถควบคุมความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ที่ 3 จะทำให้ผลิตเซลลูเลสได้มากขึ้น แต่เชื้อจะเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 3 (Mandels และ Andreotti, 1978; Allen, 1983) จึงควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ แล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์ ดังเช่นงานทดลองของ Gallo และคณะ (1981) และ Ryu และคณะ (1979)

11. ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อที่ใช้ ถ้าใช้สปอร์ของ T.reesei ในการผลิตเซลลูเลสจะใช้เวลาในการผลิต 7-8 วัน แต่ถ้าใช้เซลล์ที่เจริญแล้วจะใช้เวลาในการผลิตเอนไซม์ให้ได้มากที่สุดเพียง 4-5 วัน (Sternberg, 1976a)

**เซลลูเลส**

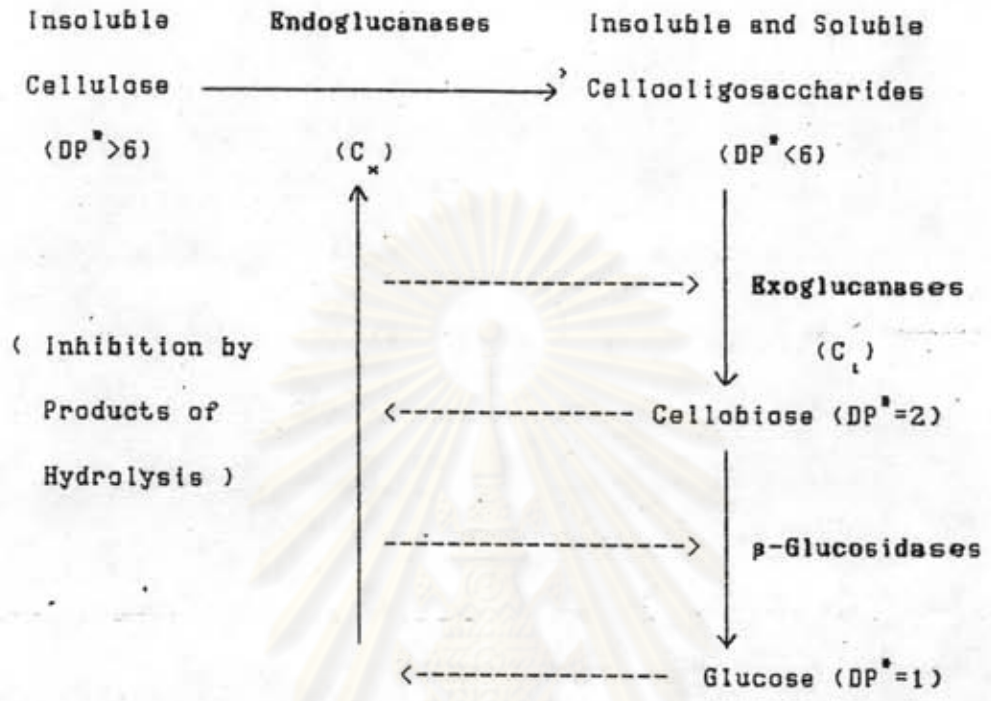
การศึกษาการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสได้เริ่มขึ้นใน ปี ค.ศ. 1950 โดยสมมุติฐานของ Reese ดังสมการ

$$\text{cellulose} \xrightarrow{C_1} \text{long } \beta\text{-1, 4 anhydroglucose chain}$$

$$\text{long } \beta\text{-1, 4 anhydroglucose chain} \xrightarrow{C_x} \text{cellobiose} \quad \text{(extracellular)}$$

$$\text{cellobiose} \xrightarrow{\beta\text{-Glucosidase}} \text{glucose (intracellular)}$$

สมมุติฐานนี้แสดงให้เห็นว่า เซลลูโลสถูกย่อยโดยน้ำย่อย $C_1$ ให้เป็นเซลลูโลส เส้นตรงยาวซึ่งประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสหลายหน่วยต่อเข้าด้วยกัน ต่อมาน้ำย่อย $C_x$ จะย่อยสลายอนุพันธ์เซลลูโลสที่เกิดจากการย่อยสลายของ $C_1$ ให้กลายเป็นเซลโลไบโอสทั้งหมดนี้เป็นปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ เอนไซม์เซลลูเลสจึงประกอบด้วย $C_1 + C_x$ หลังจากนั้นเซลโลไบโอสซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดเล็กจะซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ เอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส ($\beta$-glucosidase) ก็จะย่อยสลายเซลโลไบโอสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสต่อไป และจากการทดลองของ Levinson Mandels และ Reese ในปี 1951 ซึ่งก็พบว่าเซลโลไบโอสเป็นน้ำตาลที่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของเชื้อราได้ และในการย่อยสลายเซลลูโลสจะมีกลูโคสเป็นผลิตผลสุดท้าย การทดลองนี้เป็นการสนับสนุนข้อสมมุติฐานของ Reese




ENDOGLUCANASES : G-G-G-G-G-G-G-G

C x

Random Action

EXOGLUCANASES : G-G-G-G-G-G

C 1

Endwise Action

β-GLUCOSIDASES : G-G

β-G

Hydrolysis of Cellobiose to Glucose

DP* = Degree of Polymerization

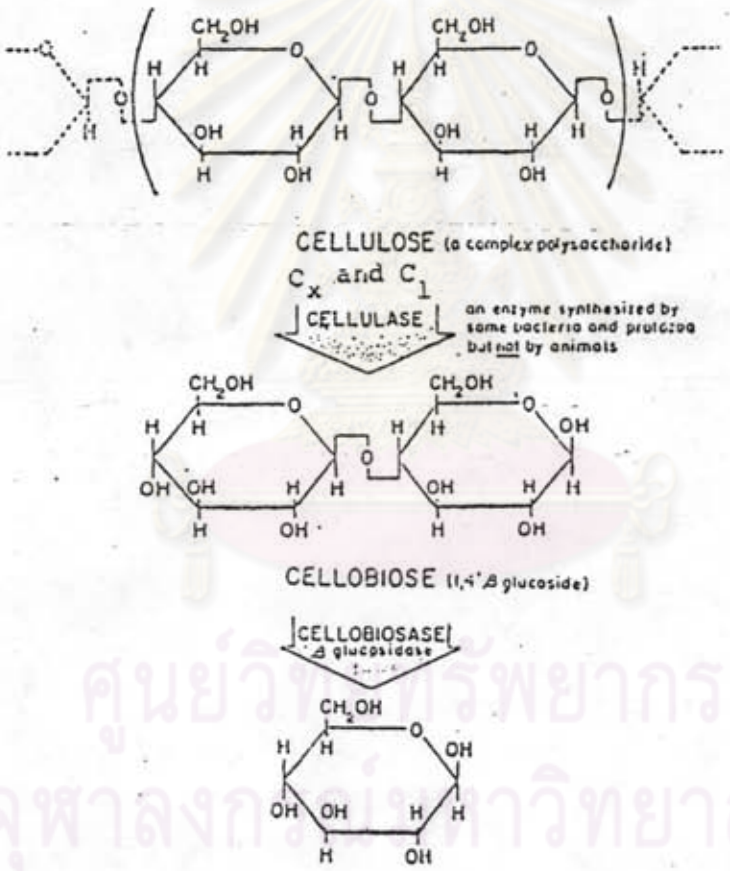
รูปที่ 4 แสดงลำดับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส (Tangnu, 1982)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018139

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสตามธรรมชาติได้จะผลิต extracellular enzyme ที่มี $C_1$ เพื่อย่อยสลายเส้นใยเซลลูโลสให้มีขนาดเล็กลง จากนั้น $C_x$ จะทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปนี้ จนกระทั่งเป็นเซลโลไบโอส จากนั้นเบตา-กลูโคซิเดสจะย่อยเซลโลไบโอสให้ได้กลูโคส 2 โมเลกุล แล้วกลูโคสจะถูกนำเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นพลังงาน อันเป็นการย่อยสลายเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์ (Strazenberger และคณะ, 1970)

Ghose ได้อธิบายถึงกลไกการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ดังแสดงในรูปที่ 5




รูปที่ 5 แสดงกลไกการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Ghose, 1977)

ในเวลาต่อมา ได้มีการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจาก Trichoderma viride พบว่าองค์ประกอบแต่ละส่วนของเอนไซม์ในเชื้อรานี้ให้ผลที่แตกต่างไปจากสมมุติฐานของ Reese (Selby และ Maitland, 1967; Petterson, 1975) คือ $C_x$ จะเข้าทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสที่พบในธรรมชาติก่อน จากนั้นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะถูกย่อยสลายต่อด้วย $C_1$ ดังรูปที่ 4 นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของเอนไซม์ จะถูกยับยั้งด้วยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยเอนไซม์ $C_x$, $C_1$ และเบตา-กลูโคซิเดส จะถูกยับยั้งโดยกลูโคส ส่วนเซลโลไบโอสจะยับยั้งการทำงานของ $C_x$ และ $C_1$

**ส่วนประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส**

จากการศึกษาระบบเอนไซม์ของเชื้อรา พอจะสรุปได้ว่า เอนไซม์เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ แล้วปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีหลายองค์ประกอบ (multicomponent enzyme) โดยมีองค์ประกอบของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกัน (Siu and Reese, 1953; Sternberg, 1976; Ooshima และคณะ, 1985; Beldman และคณะ, 1987 ดังนี้

1. เอนโด-เบตา-1, 4-กลูแคน กลูคาโนไฮโดรเลส (endo-β-1, 4-glucan glucanohydrolase) หรือ เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) หรือ $C_x$ (EC. 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยสลายขั้นต้นมาก่อน หรือย่อยสลายสารพวก swollen soluble แต่ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสที่พบในธรรมชาติ (native cellulose) เช่น ใยฝ้ายได้ โดยเอนไซม์ดังกล่าวนี้ จะตัดพันธะเบตา-1,4 ($\beta$-1,4-linkage) ภายในสายเซลลูโลส ตรงบริเวณโครงสร้างส่วนที่เป็นอสัณฐานอย่างสุ่ม (randomly acting) ซึ่งจะทำให้ความยาวของสายเซลลูโลสสั้นลงอย่างรวดเร็วบริเวณปลายสายของเซลลูโลสที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ จะเป็นบริเวณที่มีคุณสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายคือ โอลิโกแซ็กคาไรด์ เซลโลไบโอส และกลูโคสในปริมาณที่น้อยมาก

การจำแนกเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสนี้ โดยทั่วไปจะอาศัยความจำเพาะของเอนไซม์ที่มีต่อสารตั้งต้น สารตั้งต้นที่นิยมใช้คือคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose, CMC) การวัดแอคทิวิตี (activity) ของเอนไซม์สามารถทำได้ 2 วิธี คือ การวัดความหนืดที่ลดลงของสารละลาย CMC และการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในการย่อยสารละลาย CMC

2. เอกโซ-เบตา-1,4-กลูแคน กลูคาโนไฮโดรเลส (exo-$\beta$-1,4-Glucan glucanohydrolase) หรือ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) หรือ $C_1$ (EC. 3.2.1.91) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสและโอลิโกแซ็กคาไรด์ ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดจากปลายด้านที่ไม่มีความสามารถในการรีดิวซ์ (non-reducing end) ของสายเซลลูโลส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเซลโลไบโอส

3. เบตา-กลูโคซิเดส ($\beta$-glucosidase) หรือ เซลโลไบเอส (cellobiase) (EC. 3.2.1.21) จะเป็นตัวเสริมการทำงานของเอนไซม์ เอนโดกลูคาเนส และ เอกโซ-กลูคาเนส โดยทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส

จะเห็นว่าการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย เป็นกลูโคสนั้น จะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ จึงจะเกิดการย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ เพื่อให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์และกลไกการย่อยสลายเซลลูโลส การแยกองค์ประกอบของเอนไซม์ให้เป็นเอนไซม์เดี่ยว ๆ แต่ละชนิดในรูปที่บริสุทธิ์ จึงเป็นสิ่งสำคัญอันดับแรก จากนั้นจึงศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์นั้น

ทำการแยกเอนโดกลูคาเนสได้ 3 ชนิดจาก Trichoderma viride โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี CMC เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน เอนโดกลูคาเนสทั้ง 3 ชนิด มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีลำดับขั้นของการเกิดโพลิเมอร์แตกต่างกัน และให้ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าการย่อยสลายกระดาษกรองเป็นน้ำตาลกลูโคสเป็นการทำงานร่วมกันของเอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนส (Shoemaker และ Brown, 1978)

การศึกษาลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อรา พบว่า เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญมากในการทำให้เกิดการหมุนเวียนของคาร์บอนในธรรมชาติ เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ย่อย ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งมีผลทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นกลูโคสเกิดได้อย่างสมบูรณ์ และพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในช่วง 4 - 6 (Sen และคณะ, 1982)

สกัดเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง Trichoderma koningii และจากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธี เจล ฟิลเตรชัน บน Sephadex G-75 โครมาโทกราฟีแบบแลกไอออน บน DEAE-Sephadax และ Isoelectric focusing พบว่าสามารถแยกเอนโด-กลูคาเนสได้ 4 ชนิดซึ่งเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มีอัตราการจับกับสารตั้งต้นต่างกัน การย่อยสลาย

ใยฝ้ายเป็นไปได้น้อย แต่การย่อยสลายใยฝ้ายจะเกิดขึ้นสมบูรณ์เมื่อมีการทำงานร่วมกับเอกโซ-กลูคาเนส (Wood and McCrae, 1978)

จากการศึกษาเอนไซม์ CMCase ที่สกัดจาก Erwinia chrysanthemi ซึ่งเป็นแอคติโนมัยซิส ที่เจริญได้ในที่มีอากาศ และทนอุณหภูมิสูงได้ โดยมี Solka floc เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน พบว่า สามารถแยกเอนโดกลูคาเนสให้มีความบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) เจลฟิลเตรชันบน Ultrogel AcA 34 โครมาโทกราฟีแบบแลกไอออน บน DEAE-Sephadex A-50 และ hydroxylapatite เอนโดกลูคาเนสทั้ง 2 ชนิด แม้ว่าจะมี CMCase activity เหมือนกัน แต่จะมีคุณสมบัติทางกายภาพแตกต่างกัน $E_1$ มีน้ำหนักโมเลกุล 94,000 ดาลตัน แอคทิวิตีจำเพาะ (sepcific activity) ต่อ CMC มีมากกว่า 700 หน่วยต่อมิลลิกรัม จุดไอโซอิเล็กตริก เท่ากับ 3.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์คือ 74 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม เท่ากับ 6 การทำงานของเอนไซม์ถูกกระตุ้นด้วย $Ca^{++}$, $Mg^{++}$ และถูกยับยั้งถ้ามี $Hg^{++}$, $E_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 46,000 ดาลตัน แอคทิวิตีจำเพาะต่อ CMC มีค่า 77 หน่วยต่อมิลลิกรัม จุดไอโซอิเล็กตริก เท่ากับ 4.5 อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่พอเหมาะสำหรับเอนไซม์คือ 58 องศาเซลเซียส และ 6 ตามลำดับ การทำงานของเอนไซม์นี้ถูกยับยั้งโดย $Ca^{++}$, $Mg^{++}$ และถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดย $Hg^{++}$ (Calza และคณะ, 1985)

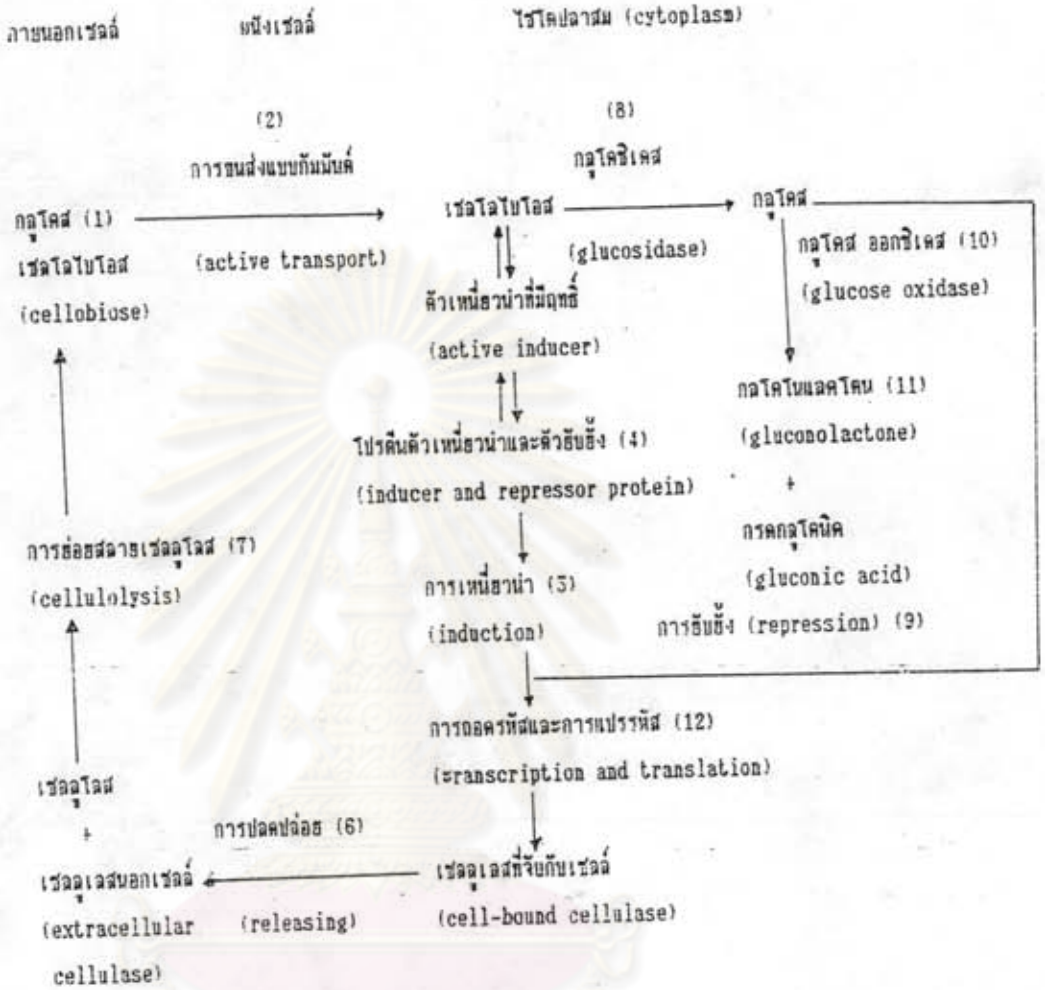
การแยกส่วนประกอบของเซลลูเลสจาก Trichoderma viride โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า (commercial cellulase) "Maxazyme" จากการใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีบน Bio-Gel, DEAE-Bio-Gel A, SE-Sephadex และวิธี สัมพรรคภาพ (affinity) พบว่าสามารถแยกเอนโดกลูคาเนสได้ 6 ชนิด มี 1 ชนิดที่มีแอคทิวิตีต่อเซลลูโลสรูปผลึก มีน้ำหนักโมเลกุล 58,000 ดาลตัน อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ คือ 60 องศาเซลเซียส (Beldman และคณะ, 1985)

การสกัดเอนไซม์ CMCase จาก Erwinia chrysanthemi ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลีเซอรอล (glycerol) เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน เอนไซม์ที่สกัดได้ นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ DEAE-Trisacryl ได้ CMCase ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3 เท่า เอนไซม์ที่ได้เป็น monomeric มีน้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม สำหรับการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 6.2 - 7.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 52 องศาเซลเซียส (Boyer และคณะ, 1984)

Petterson (1975) ได้ทดลองแยกส่วนประกอบของเซลลูเลสที่ผลิตจาก T. viride ได้เป็น 4 ชนิด โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี คือ เจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี โครมาโทกราฟีแบบแลกไอออน (ion-exchange chromatography) ไบโอสเปคซิฟิค โครมาโทกราฟี (biospecific chromatography) และ ไอโซอิเล็กตริก โฟคัสซิ่ง (isoelectric focusing) พบว่า ส่วนประกอบย่อยมีคุณสมบัติเป็น endoglucanases 2 ชนิด เป็น exoglucanase 1 ชนิด และ cellobiase 1 ชนิด

**การกระตุ้นและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์**
(induction and repression on enzyme activity)

พบว่า สารตั้งต้นประเภทคาร์บอน เช่น กลูโคส กลีเซอรอลสามารถกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสได้ จึงอาจกล่าวได้ว่าเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นให้เกิดขึ้นได้ (inducible enzymes) (Mandels และ Reese, 1957; Nisizawa, 1971a) เซลลูโลสเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำจึงไม่สามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์ ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้เป็นสารกระตุ้นการสร้างเซลลูเลส (Mandels และ Reese, 1960) แต่สามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนกับเชื้อเพื่อผลิตเซลลูเลสได้ตามสมมติฐานที่ว่าเกิดมีเซลลูเลสจำนวนน้อย ค่อย ๆ ย่อยสลายเซลลูโลสทีละน้อยทำให้เกิดมีการกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสในขั้นต่อไป พบว่าเซลลูเลสถูกสร้างขึ้นเมื่อเชื้อราบางชนิดเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยเซลลูโลส อนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose derivative) แลคโตส และ เซลโลไบโอส (Nisizawa และคณะ, 1971b) การสร้างเซลลูเลสถูกยับยั้งโดยกลูโคส ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการสร้างเซลลูเลสถูกควบคุมโดยการกระตุ้นการสร้าง (induction) และการยับยั้งการสร้างโดยสารที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลส (catabolic repression) พบมีสารตัวอื่นที่สามารถกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสได้ดีคือ โซฟอโรส (sophorose) (2-O-D-gluco-pyranosyl-D-glucose) (Mandels และคณะ, 1962; Sternberg และ Mandels, 1980) ซึ่งสารตัวนี้อาจมีปนอยู่กับกลูโคสที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายแป้ง (Nisizawa, 1971a) แต่ไม่สามารถสรุปได้ว่าโซฟอโรส มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างเซลลูเลสในธรรมชาติ สารกระตุ้นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลลูเลสในธรรมชาติคือ เซลโลไบโอส (cellobiose) (Mandels และ Reese, 1960) พบว่า เซลโลไบโอสจะกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสได้มากขึ้นถ้าเพาะเลี้ยงเชื้อราในสภาวะที่ไม่เหมาะสม (suboptimal conditions) (Nisizawa, 1973) อาจสรุปแผนผังการควบคุมการสร้างเซลลูเลสจากเชื้อรา ได้ดังรูปที่ 6




รูปที่ 6 แสดงการควบคุมการสร้างเซลลูเลสโดยเชื้อรา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**สรุปการควบคุมการสร้างเซลลูเลส**

1. $\beta$-1,4-glucosidase มีส่วนสำคัญในการควบคุมระดับของกลูโคส เซลโลไบโอสภายในเซลล์

2. เซลลูเลสจำนวนน้อยที่ถูกสร้างขึ้นก่อนทำให้เกิดตัวกระตุ้นเริ่มต้น คือ เซลโลไบโอส เพื่อใช้กระตุ้นการสร้างเซลลูเลสโดยสารประกอบคาร์บอนตัวอื่น

3. การควบคุมการผลิต gene สำหรับสร้างส่วนประกอบ $C_1$ และ $C_x$ (coordinate gene expression for $C_1$, $C_x$)

4. กลูโคสยับยั้งการสร้างเซลลูเลสในระยะการแปรรหัส (translation)

5. ผนังเซลล์ กลูโคส กลูโคโนแลคโตน และ glucosidase ที่มีอยู่ภายในเซลล์จะควบคุมระดับของเซลโลไบโอสภายในเซลล์

6. กลไกการปลดปล่อยเซลลูเลสออกภายนอกเซลล์ (active releasing mechanism) จะควบคุมระดับเซลลูเลสภายนอกเซลล์

7. กลไกการย่อยสลายโปรตีนที่เกิดขึ้นภายหลัง ทำให้จำนวนเซลลูเลสที่เกิดขึ้นมีปริมาณลดลง (post-translational proteolytic modification of cellulase)

การจัดสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ทำได้โดย

1. ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง

พบว่าเมื่อมีการใช้เซลลูโลสโดยเอนไซม์ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลง และพบมีเซลลูเลสมากขึ้น Mandel และ Sternberg (1976) ได้อธิบายว่า เชื้อราจะผลิตกรดได้ดีเมื่อใช้ สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตไปเล็กน้อย และความเป็นกรด-ด่าง จะสูงขึ้นหลังการใช้คาร์โบไฮเดรตไประยะหนึ่ง ซึ่งจะทำให้การผลิตและการทำงานของเอนไซม์ลดลง (Kosaric, 1980) ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมควรอยู่ประมาณ 5 (Mandel และ Reese, 1959)

2. ใช้จุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกันในการผลิตเซลลูเลส

**การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลส**

สารเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมอาหารที่มีมากคือ เซลลูโลส (Rockwell, 1976) สามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์โดยผลิตเป็นโปรตีนสำหรับเลี้ยงสัตว์ ผลิตสารเคมี และผลิตสารก่อพลังงาน ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อเศรษฐกิจของชาติ เป็นการ

แก้วิกฤตการณ์ขาดแคลนอาหารและพลังงานซึ่งเกิดขึ้นตั้งแต่ ค.ศ. 1970 (Spano, 1976) และการนำสารเหลือทิ้งกลับมาใช้ประโยชน์นี้เป็นการรักษาสิ่งแวดล้อมที่ดีอีกวิธีหนึ่งด้วย

การย่อยสลายเซลลูโลสทำได้โดยวิธีทางอุณหเคมี (thermochemical method) และวิธีทางชีววิทยา ดูรูปที่ 7 โดยวิธีทางอุณหเคมีนั้นต้องใช้ความร้อนสูงร่วมกับกรด ปฏิกิริยาจึงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและรุนแรง สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อย แต่ไม่มีความจำเพาะเจาะจง กลูโคสบางส่วนที่เกิดขึ้นอาจทำปฏิกิริยากับกรด ได้ผลิตภัณฑ์อื่นหรืออาจมีสารอื่นที่ติดมากับเซลลูโลสเข้าทำปฏิกิริยากับกรดที่ใช้เป็นสารตั้งต้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการและกลูโคสที่ได้มีกลิ่น รสชาดไม่ดี แต่ในทางชีววิทยาใช้อุณหภูมิในการย่อยสลายต่ำ ผลิตผลที่ได้มีน้อยชนิด

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลสสามารถแบ่งประเภทตามวิธีของ Mandels และ Andreotti (1978) ได้ตามตารางที่ 2

จุลินทรีย์สามารถผลิตเซลลูเลสเพื่อเปลี่ยนแปลงเซลลูโลสโดยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่อง ไม่รุนแรง มีความจำเพาะเจาะจงสูง ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกลูโคสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ ปราศจากสิ่งแปลกปลอมที่อาจมีได้ถ้าใช้ขบวนการทางเคมี สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อย และอาจเปลี่ยนแปลงให้ต่อเนื่องจนกระทั่งสามารถผลิตเอทธานอล กรดน้ำส้ม อะซีโตน (acetone) บิวทานอล (butanol) โดยเสียค่าใช้จ่ายถูกกว่าการผลิตจากเอธิลลีน แผนผังแสดงการเปลี่ยนแปลงชีวสารโดยวิธีทางชีววิทยาอาจแสดงได้ดังรูปที่ 8

ตามรูปที่ 8. ถ้าผลิตน้ำตาลจากเซลลูโลสโดยใช้กรดจะมีสารยับยั้งปนมาในผลิตภัณฑ์ซึ่งขัดขวางการทำงานของจุลินทรีย์ในขั้นต่อไป ทำให้ไม่สามารถผลิตสารให้พลังงาน สารยับยั้งเหล่านี้อาจเกิดได้จากสารตั้งต้น 4 ชนิดคือ

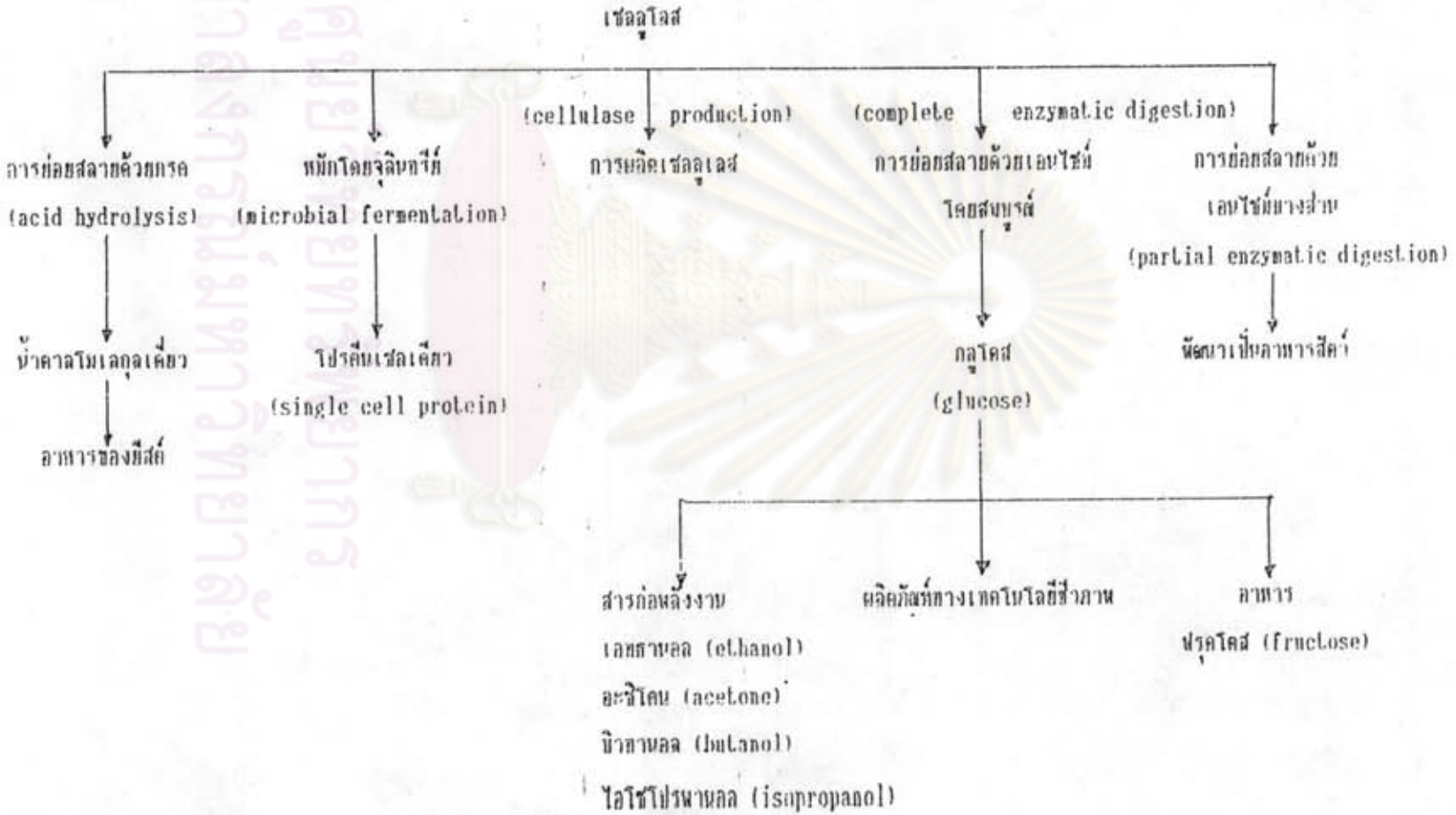
1. เฟอฟูรัล (furfurals) จากการสลายตัวของน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม
2. ฟีนอล (phenol) จากการสลายตัวของลิกนินชนิดละลายน้ำ
3. เทอร์พีน (terpene) จากกรดแทนนิค ซึ่งเป็นสารประกอบในเนื้อไม้
4. อนุมูลโลหะ เช่น เหล็ก โครเมียม นิเกิล จากเครื่องมือที่ใช้เนื่องจากถูกกรดกัดเซาะ

ซึ่งปัญหาการขจัดสารเหล่านั้นทำได้โดยการผลิตน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส เซลลูโลสที่พบในธรรมชาติมีลักษณะเป็นเซลลูโลสรูปอสัณฐาน (amorphous) และเซลลูโลสรูปผลึกซึ่งยากต่อการย่อยสลายด้วยเซลลูเลสชนิดใดชนิดหนึ่ง แต่ต้องเป็นการทำงานร่วมกันของเซลลูเลส 2

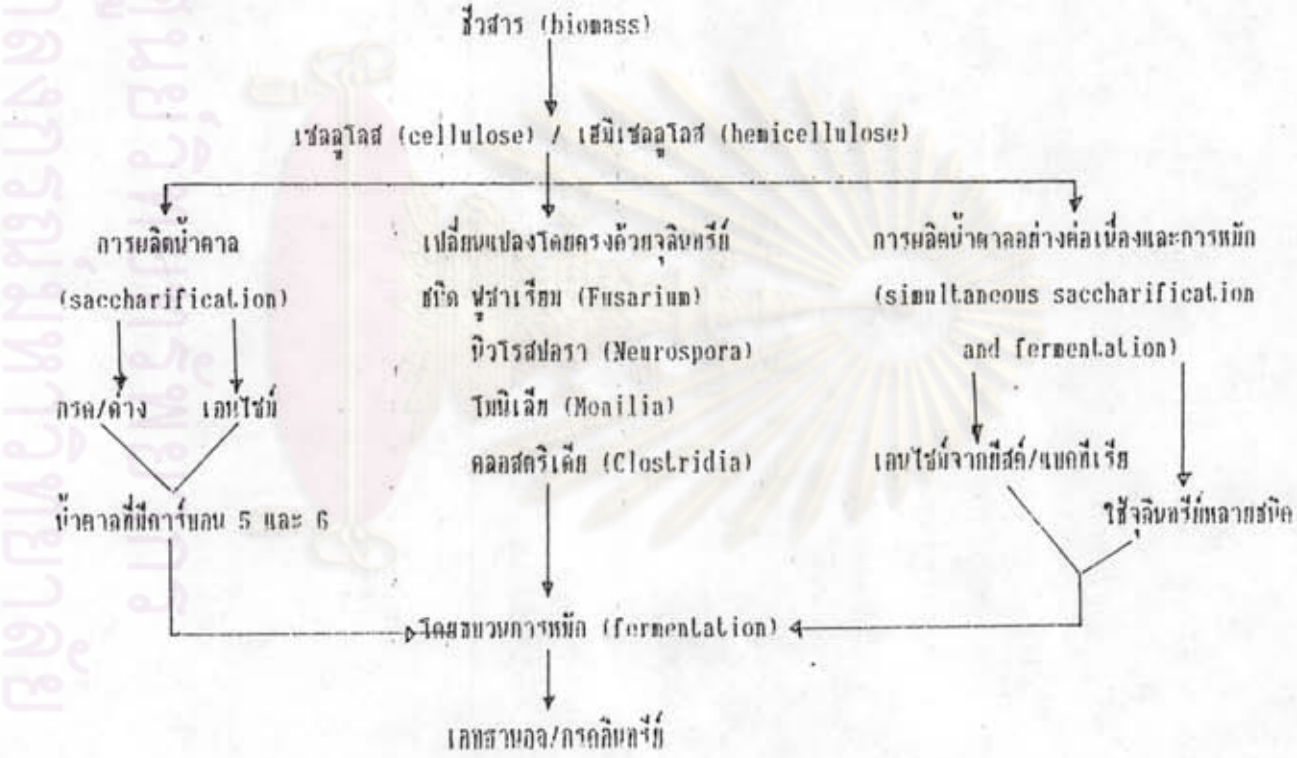
ตารางที่ 2 เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลส (Mandels และ Andreotti, 1978)

| ชื่อเชื้อจุลินทรีย์ | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|
| Clostridium thermocellum | NG และคณะ, 1977 |
| Trichosporon cutaneum | Stevens และ Payne, 1977 |
| Sporotrichum cellulophilum | Komura และคณะ, 1978 |
| Thielavia terrestris | Skinner และ Tokuyama, 1978 |
| Aspergillus aculeatus | Murao และคณะ, 1979 |
| Aspergillus fumigatus | Trivedi และ Rao, 1979 |
| Thermoascus aurantiacus | Tong และคณะ, 1980 |
| Penicillium janthinellum | Rapp และคณะ, 1981 |
| Scytalidium lignicola | Desai และคณะ, 1982 |
| Alternaria alternata | Macris, 1984 |
| Cellulomonas uda | Nakamura และ Kitamura, 1985 |
| Penicillium purpurogenum | Takao และคณะ, 1985 |
| Aspergillus ustus | Macris และ Galiotou-Panayatou, 1986 |
| Trichoderma hazianum | Macris และ Galiotou-Panayatou, 1986 |
| Dichomitus squalens | Rovau และ Odier, 1986a |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 7 แสดงวิธีการใช้ประโยชน์สารเหลือทิ้งเซลลูโลส




รูปที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงชีวสารโดยวิธีทางชีววิทยา (Singh & Kumar, 1991)

ชนิดขึ้นไป (Calza และคณะ, 1985) คือ Endo-1,4-β-D-glucanases (endo-1,4-β-D-glucan 4-glucanohydrolase), exo-1,4-β-D-glucanases (cellobiohydrolases, 1,4-β-D-glucan 4-glucanohydrolases (Wood และ McCrae, 1982), cellobiose oxidase (Ayers และคณะ, 1978) cellobiose dehydrogenases (Westermark และ Eriksson, 1974) เชื่อกันว่าส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดในการย่อยผลึกเซลลูโลสคือ cellobiohydrolase โดยสันนิษฐานจากราที่มีสีขาวที่ขึ้นตามสิ่งผุพัง (soft-white-rot fungi) และราสีน้ำตาลที่ขึ้นตามสิ่งผุพังที่ผลิตได้แต่ endoglucanases ไม่สามารถย่อยสลายผลึกเซลลูโลสได้ (Eriksson และ Wood, 1985) endo-1,4-β-D-glucanases ย่อยเซลลูโลสได้ เซลโลไบโอส (cellobiose) และกลูโคส (glucose) และ β-glucosidase จะทำการเปลี่ยน cello-oligosaccharide เป็นกลูโคส จะเห็นว่าการทำงานของเซลลูเลสมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ตามตารางที่ 3

**การทำงานของ endoglucanases**

endoglucanases เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่ละลายน้ำ เซลลูโลสรูปอสัณฐาน (Eriksson และ Wood, 1985) บางชนิดสามารถย่อยสลายเซลลูโลสรูปผลึกได้ เช่น E.III จาก T. viride (Beldman และคณะ, 1985) และพบว่ามีบางชนิดที่ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสรูปอสัณฐานคือ endoglucanase จาก T.reesei (Nummi และคณะ, 1985) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการทำงานของ endoglucanase จะเกิดขึ้นหลังจาก cellobiohydrolase ได้ย่อยเซลลูโลสรูปอสัณฐานจนเกิดเป็นสารละลาย cellooligosaccharide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ เพื่อให้ endoglucanases ทำหน้าที่ย่อยสลายในขั้นต่อไป จะเห็นว่าเซลลูเลสจากแหล่งกำเนิดต่างชนิดกันมีสมบัติแตกต่างกัน ดังนั้นน่าจะมี endoglucanase อย่างน้อย 2 ชนิด ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเซลลูโลสรูปผลึก (Wood, 1981) ความแตกต่างในโครงสร้างเซลลูเลสอาจเกิดขึ้นจาก

1. กรรมพันธุ์ เชื้อต่างชนิดกันจะผลิตเซลลูเลสได้ต่างกัน
2. การสลายตัวของโปรตีน (proteolysis) (Nakayama และคณะ, 1976) พบว่า protease จาก S. pulverulentum ช่วยทำให้ endoglucanase ทำงานได้ดีขึ้น (Eriksson และ Petterson, 1982)
3. การสร้างพันธะไกลโคไซด์ของสายโซ่เปปไทด์ (glycosylation of polypeptide chain) (Gum และ Brown, 1977; Moloney และคณะ, 1985)

ตารางที่ 3 แสดงความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเซลลูเลส

| Enzyme | Crystalline cellulose | Amorphous cellulose | CM cellulose | Cellooligosaccharides | Cellobiose |
|---|---|---|---|---|---|
| Exoglucanases | slow | very active | nil | active | nil |
| Endoglucanases | nil | very active | very active | active | nil |
| B-glucosidases | nil | nil | nil | active | active |

นอกจากนี้ยังพบว่าผลการทำงานรวมของเอนไซม์ต่างชนิดกันในการย่อยสลายสารตั้งต้นที่เป็นเซลลูโลสรูปผลึกเอนไซม์จะทำงานเสริมฤทธิ์กัน แต่ถ้าใช้เซลลูโลสรูปอสัณฐานการเสริมฤทธิ์กันจะลดลง และจะไม่มีผลต่อกันเลยเมื่อใช้กับอนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำ (Wood และ McCrae 1979) ถ้าตั้งอยู่บนสมมุติฐานที่ว่าการย่อยเซลลูโลสรูปผลึกจำเป็นต้องใช้ทั้ง cellobiohydrolase และ endoglucanase สามารถสรุปโดย Wood และคณะ (1988) ได้ว่า endoglucanases จะทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสรูปผลึกได้เซลลูโลสที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์ที่ปลายโมเลกุล (non-reducing end) 2 ชนิด ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อ cellobiohydrolase I หรือ II เท่านั้น (ตามรูปที่ 9)

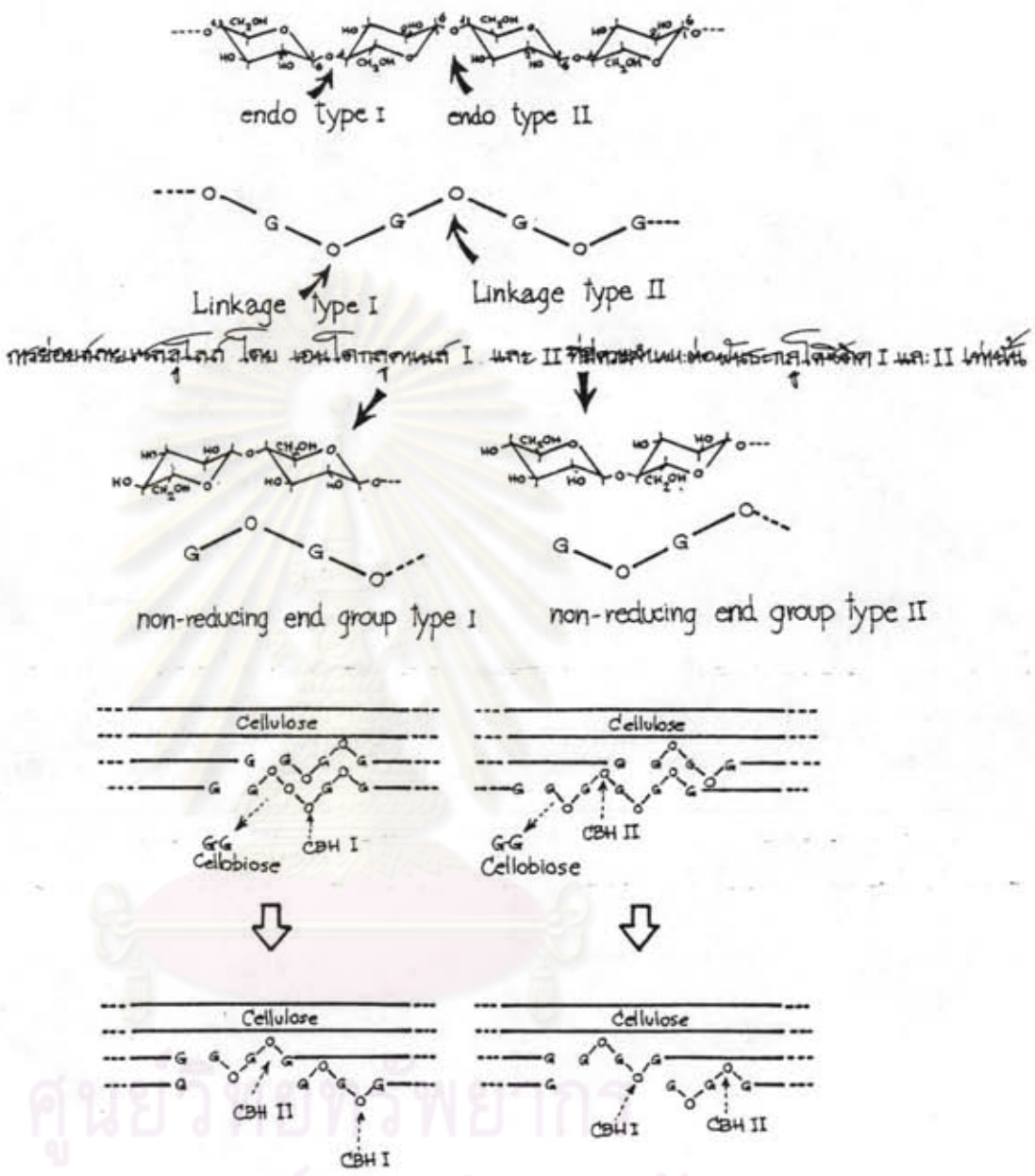
**การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูเลส** (Cellulase Assays)

ตามที่กล่าวมาข้างต้นว่าเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ย่อยหลายชนิดที่สำคัญคือ endo-β-glucanases, exo-β-glucanases และ cellobiases การย่อยจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เมื่อส่วนประกอบย่อยทำงานร่วมกัน แต่เนื่องจากเซลลูเลสจากแหล่งผลิตต่างกันจะมีสัดส่วนของส่วนประกอบเอนไซม์ต่างกันขึ้นอยู่กับสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ สภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ การเก็บเกี่ยวเชื้อ และขบวนการเก็บรักษาเอนไซม์ ดังนั้นความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจะแตกต่างกัน การตรวจวัดประสิทธิภาพของเอนไซม์จึงนำมาเปรียบเทียบกันได้ยากขึ้นกับสารตั้งต้นที่ใช้เป็นมาตรฐาน สารที่เหมาะสมเป็นสารตั้งต้นมาตรฐานควรมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและควรมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลาย ซึ่งเป็นการยากที่จะหาสารที่มีสมบัติดังกล่าว ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูเลสชนิดต่าง ๆ อาจทำได้ตามตารางที่ 4 (Mandels และคณะ, 1976)

**การตรวจวัดปริมาณเซลลูเลสทั้งระบบ**

สามารถตรวจวัดได้โดยใช้สารตั้งต้นมาตรฐานเป็นเซลลูโลสที่ถูกย่อยสลายตามธรรมชาติได้โดยเซลลูเลส แต่สิ่งที่ต้องระวังในการตรวจวัดปริมาณเซลลูเลสทั้งระบบคือ เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งต้องเพียงพอที่จะให้เอนไซม์ซึมผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อเซลลูโลส และต้องมีเวลาให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายไหลออกมาจากเนื้อเยื่อเพื่อให้ตรวจวัดได้ สารตั้งต้นที่นิยมใช้มากที่สุดคือ ผ้ายและอื่น ๆ เช่น กระดาษกรอง

Mandels และ Weber (1969) ได้เสนอการตรวจหาปริมาณเซลลูเลสทั้งระบบโดยวัดจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมมาตรฐาน ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 1 ชั่วโมง ซึ่งวิธีนี้เป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง เมื่อเพิ่มจำนวนเอนไซม์ หรือ จำนวนสารตั้ง




**รูปที่ 9**

**แสดงความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ของ เซลโลไบโอไฮโดรเลส I,II**

**Wood และ เพื่อน (1988)**

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงการวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูเลสด้วยสารตั้งต้นที่เหมาะสม

(Mandels และคณะ 1976)

| Enzyme | Substrate | Product measured |
|---|---|---|
| Cellobiase | | |
| ß-glucosidase | cellobiose | glucose |
| | cellodextrin | |
| | salicin | saligenin |
| | p-nitrophenyl ß-glucoside | p-nitrophenol |
| Endo ß-1,4, glucanase | | |
| $C_x$ | Carboxymethyl cellulose | loss in viscosity |
| CMCase | Amorphous cellulose | reducing sugar |
| | Walseth | |
| | Sweco | |
| | Cellodextrin | |
| Exo ß 1,4 glucanase | | |
| A glucocellulase | amorphous cellulose | glucose (A) |
| | valseth | |
| B cellobiohydrolase | crystalline cellulose | cellobiose (B) |
| CBH | avicel | |
| $C_1$ | cellodextrin | |
| Cellulase | | |
| $C_1 + C_x$ | crystalline cellulose | loss in weight |
| avicellase | avicel | reducing sugar |
| hydrocellulase | hydrocellulose | reduction in OD |
| FPase | cellodextrin | |
| | cotton | |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต้นมาตรฐานทำให้ผลิตน้ำตาลได้มากขึ้น แต่ต้องใช้เวลาในการทดลองนานขึ้นและกราฟแสดงการเพิ่มการผลิตน้ำตาลกับปริมาณเอนไซม์ไม่เป็นเส้นตรง เนื่องจากสารตั้งต้นมาตรฐานจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลรีดิวซ์มากเฉพาะขณะเริ่มทำปฏิกิริยา (Mandels, 1975) Griffin (1973) พบว่าปริมาณเอนไซม์จะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เมื่อ 1) ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำ 2) ความเข้มข้นของสารตั้งต้นมาตรฐานสูง 3) ลดเวลาในการทำปฏิกิริยา

**การตรวจหาปริมาณ $C_1$**

ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลสที่ยากที่สุดคือ ขั้นตอนการละลาย ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลลูเลสชนิด $C_1$ วิธีการตรวจหาประสิทธิภาพในการละลายนั้นมักใช้สารตั้งต้นมาตรฐาน คือ ไยฝ้าย อะวิเซล (avicel) หรือ ไฮโดรเซลลูโลส แล้ววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ (Mandels และ Weber, 1969) หรือหาน้ำหนักที่ลดลงของสารตั้งต้น (Halliwell และ Riaz, 1970) หรือวัดการดูดกลืนแสง (optical absorbance) ของสารแขวนตะกอนเซลลูโลสที่ลดลง (King, 1965)

**การตรวจหาปริมาณของ Endo-β-glucanase**

Endo-β-1,4-glucanase จะทำลายพันธะ β-1,4 ที่มีอยู่ในโมเลกุลของ CMC (carboxymethyl cellulose) หรือเซลลูโลสชนิดอื่นที่ละลายน้ำ CMC เป็นสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะต่อ endo-β-1,4 glucanase (Enari และ Markkanen, 1977) จึงนิยมใช้มากที่สุด โดยวัดความหนืดที่ลดลง (Mandels, 1975) หรือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ (Mandel และ Weber, 1969)

**การตรวจหาปริมาณของ β-glucosidases**

สามารถตรวจหาปริมาณของ β-glucosidase ได้สะดวก มีข้อกำหนดในการทำปฏิกิริยาน้อย โดยใช้เซลโลไบโอส (cellobiose) หรืออาจใช้สาลิซิน (salicin) (Selby และ Maitland, 1971) หรือ พารา-ไนโตรฟีนิล-เบต้า-กลูโคไซด์ (p-nitrophenyl-β-glucoside) (Wood, 1968) เป็นสารตั้งต้น และตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

## จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

1. รา

รา 2 - 3 ชนิด ที่พิสูจน์ได้ว่าสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ คือ T. viride, T. lignosum, T. koningii (Mandel และ Weber, 1969; Toyama, 1976; Wood, 1972; Wood และ McCrae, 1972) Penicillium funiculosum (Sudo และคณะ, 1973) และ P. iriensis (Boretti และคณะ, 1972) Fusarium solani (Wood, 1972) Pellicularia filamentosa (Tanaka และคณะ, 1977) Irpex lacteus (Kawai และคณะ, 1978) และ Puricularia oryzae (Sudo และคณะ, 1973) ซึ่งเชื้อราส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายได้แต่เฉพาะเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับด่างให้ง่ายต่อการย่อยสลายมาก่อน แต่ถ้าเป็นเซลลูโลสรูปผลึกการย่อยอาจเกิดขึ้นได้โดยเชื้อราชนิดที่ทนความร้อนสูงคือ Ascomycetes เช่น Chaetomium thermophile ชนิด dissitum (Enari และ Markkanen, 1977) Sporotrichum thermophilium และ Thermoascus aurantiacus

2. แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่พบว่าย่อยสลายเซลลูโลสได้คือ Pseudomonas sp. (Suzuki และคณะ, 1969) Cellulomonas sp. (Han และ Srinivasan, 1968) และ Clostridium sp. (Ait และคณะ, 1979)

เซลลูเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียมีการศึกษาน้อยกว่าที่ผลิตโดยรา พบว่าเซลลูเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียมีทั้งชนิดที่เกิดขึ้นภายนอกเซลล์ (extracellular) และชนิดที่ติดอยู่กับเซลล์ (cellbound components) (Ayers, 1959; Hulcher และ King, 1968; Sata และ Takahashi, 1967; Sih และคณะ, 1959; Suzuki และคณะ, 1969) แบคทีเรียบางชนิดผลิตเอนไซม์ที่มีเฉพาะ $C_x$ และบางชนิดผลิตเอนไซม์ที่ประกอบด้วย $C_1$ และ $C_x$ ทำให้สามารถย่อยสลายเซลลูโลสรูปผลึกได้พบว่า Clostridium thermocellum สามารถผลิตเซลลูเลสที่ใช้ย่อยได้ทั้งเซลลูโลสและเฮมิ-เซลลูโลส (Ait และคณะ, 1979)

**การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์**

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์และขับออกสู่สภาพแวดล้อมภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) หลังจากผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดแล้วสามารถแยกส่วนของเซลล์และส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ต้องการออกได้โดยการปั่นแยก (centrifugation) การกรอง (cross-flow filtration) แล้วจึงทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการกรองผ่านเนื้อเยื่อที่มีรูขนาดเล็ก (ultrafiltration) ซึ่งจะช่วยขจัดสารที่มีขนาดเล็กมาก ๆ เช่น โซเดียมคลอไรด์ น้ำตาลออกไปได้ด้วย ทำให้ค่าประจุบนเอนไซม์ไม่ถูกรบกวนซึ่งจะมีประโยชน์ในการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไปโดยเทคนิคโครมาโทกราฟี

1) ไอออน-เอกเชนจ์ โครมาโทกราฟี (Ion-exchange chromatography)

วิธีทางโครมาโทกราฟี เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในทางชีวเคมี เพื่อใช้แยกสารโมเลกุลใหญ่ออกจากกัน ในการทดลองเลือกใช้ ดีอีเออี-ไบโอ-เจล-เอ (DEAE-Bio gel A) ไอออน-เอกเชนจ์ โครมาโทกราฟี เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออนลบชนิดด่างอย่างอ่อนระหว่างตัวดูดซับกับโปรตีนที่ต้องการแยก (weakly basic anion exchange) ตัวดูดซับมีโครงสร้างหลักเป็นอะกาโรสมีหมู่ไดเอทธิลอะมิโนเอทธิลเกาะอยู่กับโครงสร้างหลักของอะกาโรส มีสมบัติคือ มีความจุไอออน (ionic capacity) 0.020 ± 0.005 มิลลิอิควิวาเลนท์ต่อมิลลิลิตรเจล และสามารถดูดซับฮีโมโกลบิน (hemoglobin capacity) 45 ± 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดลองใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่าง 6.8 ซึ่งค่อนข้างสูงเพื่อให้โปรตีนมีประจุรวมเป็นลบ สามารถแลกเปลี่ยนไอออนลบกับคลอไรด์ไอออนได้ และเมื่อใช้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงขึ้นล้างดูดซับคอลัมน์ โปรตีนที่จับกับตัวดูดซับจะถูกแทนที่ด้วยคลอไรด์ไอออนของโซเดียมคลอไรด์ทำให้แยกโปรตีนที่มีความเข้มข้นไอออนต่างกันออกจากกันได้ โปรตีนที่มีค่าความเข้มข้นของไอออนลบต่ำจะออกมาก่อนและสูงขึ้น ตามลำดับ ความสำคัญของเทคนิคการทำไอออนเอกเชนจ์ โครมาโทกราฟี ขึ้นกับ

1. การเลือกคอลัมน์ ควรใช้วัสดุที่เฉื่อยไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ต้องการจะแยก ขนาดของคอลัมน์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโปรตีนที่จะแยก ปริมาตรของตัวอย่างและประสิทธิภาพในการดูดซับของตัวดูดซับ คอลัมน์ควรจะมีขนาดพอเหมาะ หากมีขนาดใหญ่เกินไป จะทำให้เกิดการแพร่ (diffusion) ของแถบโปรตีน ทำให้แยกได้ไม่ดี นิยมใช้คอลัมน์ที่มีความยาวเป็น 4 - 5 เท่าของเส้นผ่าศูนย์กลาง

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับ โปรตีนที่จะนำมาทำให้บริสุทธิ์นั้นควรจะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของประจุเหมือนหรือใกล้เคียงกับบัฟเฟอร์ที่ใช้ ซึ่งทำได้โดยการทำไดแอลิซิส (dialysis) ก่อนนำไปผ่านคอลัมน์ ไม่ควรใช้โปรตีนความเข้มข้นสูงเพราะควบคุมสภาวะที่อาจเปลี่ยนแปลงระหว่างการทำการทดลองได้ยากกว่า ทำให้การทำซ้ำไม่มีความเที่ยงตรง แต่ถ้าเจือจางไปจะทำให้การดูดซับไม่ดี ไม่สามารถแยกโปรตีนออกจากกันได้ ความเข้มข้นที่เหมาะสมมีค่าอยู่ระหว่าง 5 - 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเจล

3. อัตราการล้างดูดซับ ต้องเลือกให้เหมาะสมกับขนาดของคอลัมน์ ลักษณะทางกายภาพของตัวดูดซับ และส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ ถ้าอัตราการล้างดูดซับต่ำเกินไปจะทำให้เกิดการแพร่ (diffusion effect) แต่ถ้ามากเกินไปจะทำให้กราฟการแยกไม่สมดุลย์ (trailing effect)

4. การเตรียมเจลที่เป็นตัวดูดซับ เพื่อให้สามารถจับกับสารโมเลกุลใหญ่ได้เต็มที่ ในการทดลองใช้เจลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ ลักษณะเป็นของเหลวข้น (gel slurrys) ก่อนใช้ควรไล่อากาศในเม็ดเจลออก กำจัดฝุ่นหรือเจลที่แตกสลายออกก่อนเติมเจลลงในคอลัมน์ เพื่อให้การแยกเป็นไปด้วยดีความเป็นกรดด่างของเจลควรเท่ากับบัฟเฟอร์ที่ใช้ โดยล้างเจลด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้หลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งน้ำที่ใช้ล้างทิ้งมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับบัฟเฟอร์

5. การเติมเจลลงในคอลัมน์

- ตั้งคอลัมน์ให้ตรง ใส่บัฟเฟอร์ที่ต้องการลงไปจนเต็มคอลัมน์ ใส่ใยแก้วลงไปที่ปลายคอลัมน์ด้านที่ต่อไปยังเครื่องเก็บตัวอย่าง (fraction collector) ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ

- ปล่อยให้บัฟเฟอร์ไหลออกจากคอลัมน์จนมีเหลืออยู่เพียง 20% ของปริมาตรคอลัมน์ ปิดวาล์ว

- เติมเจลลงในคอลัมน์เบา ๆ จนเต็ม ทิ้งไว้จนเห็นว่าเจลด้านล่างเรียงตัวเป็นชั้นหนา 2 - 3 เซนติเมตร เปิดวาล์วให้บัฟเฟอร์ไหลออกตามอัตราการล้างดูดซับที่ต้องการค่อย ๆ เติมเจลจนได้ความสูงตามต้องการ ติดปลายคอลัมน์ด้านนี้ต่อเข้ากับบัฟเฟอร์ที่ต้องการใช้

- ปล่อยให้บัฟเฟอร์ล้างดูดซับเจลที่บรรจุในคอลัมน์เรียบร้อยแล้ว ปริมาณ 2 เท่าปริมาตรคอลัมน์ หรือจนกระทั่งความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ที่ไหลผ่านเจลเป็นค่าเดียวกับบัฟเฟอร์ที่ต้องการใช้

I14556928.

6. การใส่สารละลายเอนไซม์ ละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่ต้องการค่อย ๆ เติมเอนไซม์ที่ส่วนบนของคอลัมน์จนหมด แล้วเติมบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันลงในคอลัมน์อีก 2 เท่าของปริมาตรสารตัวอย่าง แล้วจึงล้างดูดซับด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระหว่าง 0 - 1 โมลาร์

โปรตีนเป็นสารประกอบที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน ประจุบวกเกิดเนื่องจากส่วนที่เป็นกรดอะมิโนชนิดไลซีน อะจีนีน ประจุลบเกิดขึ้นจากส่วนที่เป็นกรดอะมิโนชนิดแอสปาติค กลูตามิค ซึ่งประจุรวมจะเป็นชนิดใดนั้นขึ้นกับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย

การเลือกใช้บัฟเฟอร์เป็นสิ่งสำคัญในการแยกโปรตีน เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างประจุของตัวดูดซับและเอนไซม์ขึ้นกับความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย ถ้าใช้บัฟเฟอร์ที่มีความแรงไอออนสูงจะเข้าไปแลกเปลี่ยนประจุกับตัวดูดซับแทนโปรตีน ต้องเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับตัวดูดซับบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจึงควรมีประจุชนิดเดียวกับตัวดูดซับ มีความแรงไอออนต่ำ (low ionic strength) เพื่อให้โปรตีนจับกับตัวดูดซับได้แม้มีแรงดึงดูดระหว่างประจุเพียงเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามบัฟเฟอร์ที่ใช้นั้นต้องสามารถควบคุมความเป็นกรด-ด่างของสารละลายไว้ได้

การเลือกบัฟเฟอร์สามารถทำได้ภายใต้เงื่อนไข 3 ประการ คือ

1. ค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัวของบัฟเฟอร์ (pKa) ควรมีค่าต่างจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการแยกเอนไซม์น้อยกว่า 0.5

2. อนุมูลที่ประกอบเป็นบัฟเฟอร์อย่างน้อย 1 ชนิด เป็นชนิดที่ไม่มีประจุ ไม่มีความแรงไอออน

3. อนุมูลที่ประกอบเป็นบัฟเฟอร์ 1 ชนิด ควรเป็นชนิดเดียวกับไอออนที่จะใช้แลกเปลี่ยน (counter ion) ประจุ

นอกจากนี้ต้องคำนึงถึงอุณหภูมิขณะทำการทดลองเพราะที่อุณหภูมิต่างกันค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัวของบัฟเฟอร์จะเปลี่ยนไป ทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับเปลี่ยนแปลงไปด้วย

2. **เจล นิลเตรชั่น** (Gel filtration)

อาจเรียกว่า เจล เพอมีเอชั่น (gel permeation) โมเลคกูลา ซีนวิงล์ (molecular sieving) เป็นการแยกโปรตีนออกจากกันตามขนาดของโมเลกุล เริ่มนำมาใช้โดย Porath และ Flodin ตัวดูดซับมีโครงสร้างเป็นเดกซ์ทราน ปัจจุบันได้มีการพัฒนามาก

ขึ้นเพื่อให้สามารถลดเวลาในการทำการทดลองและใช้กับโปรตีนได้มากชนิดขึ้น ตัวดูดซับที่ใช้จะมีลักษณะเป็นรูพรุน โครงสร้างโมเลกุลแบบสามมิติจะสานกันเป็นร่างแห รูพรุนโดยรอบตัวดูดซับนั้นจะมีขนาดต่างกันเพื่อให้สามารถแยกโปรตีนที่มีขนาดแตกต่างกันได้ โปรตีนที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าในโครงสร้างร่างแหหรือรูพรุนจะถูกล้างดูดซับออกมาก่อน โดยทั่วไปมักเลือกตัวดูดซับที่มีขนาดเล็กเพื่อที่จะเลือกใช้อัตราการล้างดูดซับสูงได้ โดยไม่มีผลต่อโครงสร้างโมเลกุลของตัวดูดซับ ทำให้สามารถทำการทดลองได้ภายในระยะเวลาสั้น ๆ แต่มีข้อเสียคือต้องใช้แรงดันสูง ซึ่งถ้าสูงมากเกินไปอาจทำให้ตัวดูดซับมีรูปร่างผิดปกติไปขัดขวางการไหล ความสามารถแยกโปรตีนของตัวดูดซับขึ้นกับค่าสัมประสิทธิ์ของการแยก ($K_{av}$ = partition coefficient) ซึ่งมีค่าเท่ากับ

$$K_{av} = (Ve - Vo)/(Vt - Vo)$$

Vo = ปริมาตรนอกตัวดูดซับที่มีอยู่ในคอลัมน์
Vt = ปริมาตรคอลัมน์
Ve = ปริมาตรที่สารถูกล้างดูดซับออกมาจากคอลัมน์

ความสามารถในการแยกโปรตีนมีความเกี่ยวพันกับบัฟเฟอร์ที่ใช้แยกโปรตีนเนื่องจากความแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (ionic strength) จะทำให้โปรตีนสามารถจับกับตัวดูดซับด้วยแรงจับทางไฟฟ้า หรือแรงวาล เดอ วาล์ว จึงไม่สามารถแยกออกมาได้ และสิ่งที่สำคัญที่ต้องคำนึงถึงอีกคือ สัดส่วนของความยาวกับเส้นผ่าศูนย์กลางคอลัมน์ถ้าจะให้แยกได้ผลดีควรมีค่าอยู่ระหว่าง 20 - 100 ในการทดลองใช้ เซฟาคริล เอส-200 เอชอาร์ (Sephacryl S-200 HR) สามารถใช้แยกโปรตีนที่มีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 5 - 600 กิโลดาลตัน (KDa) โดยใช้อัตราการล้างดูดซับได้เร็วถึง 15 เซนติเมตรต่อชั่วโมง ในการทำการทดลองหากมีปัญหาในลักษณะต่อไปนี้อาจแก้ไขได้โดย

1. การแยกได้ไม่ดี แก้ไขโดย
   ลดอัตราการล้างดูดซับ
   เลือกใช้ตัวดูดซับที่มีขนาดเล็กลง
   เลือกตัวดูดซับที่มีความสามารถแยกโปรตีนในขอบเขตแคบ
2. อัตราการล้างดูดซับต่ำ ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ล้างคอลัมน์ หรือบรรจุใหม่
3. กราฟการแยกไม่สมดุลย์ โดยมากเกิดจากการเติมสารตัวอย่างลงในคอลัมน์ไม่ดี หรือโปรตีนถูกดูดซับไว้อย่างแน่นหนาที่ผิวตัวดูดซับ หรือการรวมตัวกันของโปรตีนทำให้น้ำหนักโมเลกุลเปลี่ยนแปลงไป รูปแบบการล้างดูดซับจึงเปลี่ยนแปลง ดังนั้นต้องศึกษาให้ทราบสาเหตุและแก้ไขให้ถูกต้อง

4. โปรตีนหายไประหว่างถูกดูดซับ (disappearance of desired protein) อาจเกิดจากโปรตีนถูกดูดซับที่ผิวของตัวดูดซับแน่นเกินไป ต้องเปลี่ยนบัฟเฟอร์เพื่อล้างดูดซับโปรตีนออกมา

**ฟาสต์-โปรตีน-ลิควิด-โครมาโทกราฟี**
(Fast-protein-liquid chromatography, FPLC)

เป็นวิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์ทางชีวเคมีโดยใช้ความแตกต่างของชนิด และจำนวนประจุบนสารที่ต้องการจะแยก สามารถกระทำได้ภายในระยะเวลาสั้นเพียง 1 ชั่วโมงต่อหนึ่งตัวอย่าง สารจะแยกออกจากกันได้อย่างเด่นชัดเพราะใช้อัตราการล้างดูดซับสูง จึงลดปัญหาการแพร่ (diffusion) ของแถบสารที่แยกได้อันมักเกิดขึ้นเสมอเมื่อใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟี สามารถทำได้สะดวก ให้ผลแม่นยำ มีประสิทธิภาพสูงใช้ได้ดีแม้แยกสารในปริมาณน้อย (Hayn และ Esterbauer, 1985) โดยการจัดสภาวะการทดลองให้เหมาะสมกับความต้องการ ให้สอดคล้องกับการเลือกชนิดคอลัมน์ แต่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อนยุ่งยากประกอบด้วยเครื่องสูบ (pump) ที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถให้แรงดันสูงเพียงพอให้สารไหลผ่านตัวดูดซับที่อัดแน่นอยู่ในคอลัมน์ได้ ตัวดูดซับต้องมีความคงทนต่อแรงดันทั้งขณะทำการแยกสารและระหว่างการบรรจุลงในคอลัมน์ และการบรรจุตัวดูดซับลงในคอลัมน์ต้องระมัดระวังและยุ่งยากมากกว่า Bronnenmeier และ Standenbauer (1988) ใช้เทคนิค FPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด Mono Q ซึ่งเป็น คอลัมน์แบบแลกไอออน แยกเซลลูเลสที่ผลิตจาก Ruminococus albus ได้เอนไซม์ย่อย 3 ชนิด Hayn และ Esterbauer, (1985) ใช้คอลัมน์ Mono P แยกเซลลูเลสที่ผลิตจาก เชื้อรา T.reesei MCG 77 ได้เอนไซม์ย่อย 5 ชนิด โดยทำการแยกในสภาพความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 3 - 6.5 ใช้ปริมาตรในการล้างดูดซับทั้งหมด 80 มิลลิลิตร ใช้เวลาเพียง 80 นาที ดังนั้นความสำคัญของการทดลองอยู่ที่การเลือกช่วงความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยก ความแรงไอออนของบัฟเฟอร์ ชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวล้างดูดซับ อัตราเร็วในการล้างดูดซับ เพื่อให้สามารถทำการทดลองให้แล้วเสร็จได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว และสามารถแยกโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่พบรวมอยู่กับเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์

Hostomska และ Mikes (1983) พบว่า การล้างดูดซับสารออกจากคอลัมน์อาจใช้วิธีisocratic elution หรือวิธี linear gradient โดยเลือกความเข้มข้นและชนิดของไอออนให้สอดคล้องกับชนิดของคอลัมน์ และพบว่า คอลัมน์ที่เหมาะสำหรับแยกเซลลูเลสคือชนิดที่เป็นอนุพันธ์ของ DEAE ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ Mono Q HR

**การเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า** (Electrophoresis)

เป็นวิธีการทางชีวเคมีที่แยกสารในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของชนิดและปริมาณประจุในบางกรณีก็รวมทั้งขนาดและรูปร่างของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วย นอกจากนี้ยังมีปัจจัยร่วมอื่น ๆ ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสารในการทำการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า อาจสรุปได้ดังนี้

1. สมบัติของสารตัวอย่าง

1.1 ชนิดและปริมาณของประจุ

ชนิดของประจุจะกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ ปริมาณประจุมีผลต่ออัตราเร็วในการเคลื่อนที่ ซึ่งทั้งชนิดและปริมาณมีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายสารตัวอย่างที่นำมาทดลอง

1.2 ขนาดของโมเลกุล

โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมีแรงเสียดทาน และดึงดูดทางไฟฟ้ากับสภาวะแวดล้อมสูงกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็กทำให้เคลื่อนที่ช้ากว่า

1.3 รูปร่างของโมเลกุล

โมเลกุลที่มีรูปร่างกลมจะเคลื่อนที่ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มีรูปร่างยาวรี หรือรูปร่างเป็นเส้น (fibrous shape) ทั้งนี้เนื่องจากแรงเสียดทาน และแรงดึงดูดทางไฟฟ้าที่เกิดกับสารที่มีรูปร่างต่างกันจะแตกต่างกัน

2. สนามไฟฟ้า อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ และระยะเวลาในการทำการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า แต่แปรผกผันกับความต้านทานไฟฟ้า แต่การใช้กำลังไฟฟ้าที่สูงเกินไปทำให้เกิดผลเสียคือ เกิดการระเหยของสารละลายเกิดความร้อนสูงซึ่งทำให้เกิดการแพร่ (diffusion) ของโมเลกุลและผลการแยกสารจะได้ไม่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่ถูกทำลายง่ายโดยความร้อน เช่น เอนไซม์อาจเสียสภาพและหมดประสิทธิภาพในการทำงาน ในทางตรงข้ามหากใช้กำลังไฟฟ้าต่ำเกินไป ผลการทดลองจะไม่ดี เนื่องจากใช้เวลาในการทำการทดลองนาน ทำให้เกิดการแพร่มาก ดังนั้นต้องเลือกกระแสไฟฟ้าและความต่างศักย์ที่เหมาะสม

3. บัฟเฟอร์ ทำหน้าที่รักษาสภาวะความเป็นกรด-ด่างของเจลที่ใช้เป็นตัวกลางค้ำจุน (supporting medium) เป็นตัวทำละลายของสารตัวอย่าง และเป็นส่วนสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้ากล่าวคือ

3.1 ความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์มีผลต่อการกำหนดชนิดและปริมาณของประจุของสาร ซึ่งมีค่าการแตกตัว (dissociation constant, pK) ต่างกัน การแตกตัวของประจุเหล่านี้ขึ้นกับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย เช่น ไกลซีน มีหมู่อะมิโนและคาร์บอกซิล ซึ่งมีค่าการแตกตัวที่ 9.6 และ 3.24 ประจุสุทธิของไกลซีนจะเปลี่ยนแปลงไปเมื่ออยู่ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกัน

3.2 ความแรงไอออนของบัฟเฟอร์ (ionic strength of buffer) การเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุในสนามไฟฟ้าแปรผกผันกับรากที่สองของความแรงไอออน นั่นคือสารชนิดเดียวกันจะเคลื่อนที่ในบัฟเฟอร์ที่มีความแรงไอออนต่ำได้ดีกว่าในบัฟเฟอร์ที่มีความแรงไอออนสูง แต่แถบของการแยกจะชัดเจนน้อยกว่า เกิดความร้อนระหว่างทดลองน้อยกว่า ในกรณีที่มีความร้อนสูงจะไปลดความหนืดของตัวกลางค้ำจุน ทำให้ความต้านทานไฟฟ้าลดลง ซึ่งเป็นผลให้กระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น ความร้อนจึงเพิ่มขึ้นต่อเนื่องไปอีก ดังนั้นต้องเลือกให้มีความแรงไอออนพอเหมาะ ปกติจะใช้อยู่ในระหว่าง 0.05 - 0.1 โมล/ลิตร

4. ตัวกลางค้ำจุน ตัวกลางค้ำจุนบางชนิดอาจทำให้เกิดการดูดซับ (adsorption) ระหว่างสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุน หรืออาจมีการแลกเปลี่ยนประจุของสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุนได้ นอกจากนี้ความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (inhomogeneities) ของตัวกลางค้ำจุนยังมีผลต่อการแยกสารด้วย ตัวกลางค้ำจุนที่ดีควรมีลักษณะทั่วไปดังนี้คือ

- ไม่ไวในการทำปฏิกิริยา
- ยอมให้สารตัวอย่างผ่านได้อย่างรวดเร็ว
- สามารถแยกสารตัวอย่างได้ชัดเจน
- สามารถถูกแยกเป็นส่วน ๆ ได้ง่าย

ตัวกลางค้ำจุนมีหลายชนิด จะเลือกใช้ชนิดใดขึ้นอยู่กับลักษณะของการทดลองและชนิดของสารที่ต้องการแยกดังแสดงในตารางที่ 5

**SDS-polyacrylamide gel electrophoresis** (SDS-PAGE)

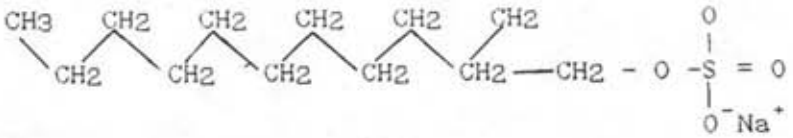
SDS-PAGE เป็นวิธีวิเคราะห์โปรตีนที่มีประสิทธิภาพสูง และใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งยังใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้อีกด้วย

ตารางที่ 5 แสดงชนิดของ electrophoresis จำแนกตามชนิดของตัวกลางค้ำจุน

| ชนิดของอิเล็กโตรฟอริซิส | ความเหมาะสมของงานในการใช้แยกสาร | หมายเหตุ |
|---|---|---|
| paper | กรดอะมิโน เปปไทด์ นิวคลีโอไทด์ | ราคาถูก แต่ไม่สามารถทนต่อกรดหรือด่างแก่ได้ |
| cellulose acetate | ใช้แยกสารในซีรั่ม เช่น ไกลโคโปรตีน ไลโปโปรตีน ฮีโมโกลบิน และ antibodies | ดูดซึมสารตัวอย่างได้ในปริมาณน้อย การแยกค่อนข้างแน่นอน และมีผลเจนต่อกระแสไฟฟ้าสูง นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป และห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาล |
| thin-layer | ใช้แยกสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ เช่นเดียวกับ paper electrophoresis รวมทั้งใช้แยกสารประกอบ amines, napthols และและสารอนินทรีย์ | เป็นแผ่นแก้วเคลือบด้วย silica, alumina หรือ cellulose ทนต่อกระแสไฟฟ้าสูง ๆ ได้ เหมาะสำหรับการทำ high-voltage electrophoresis |
| starch gel | เหมาะสำหรับแยกสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิค เป็นต้น | เป็น polysaccharide ที่มีลักษณะเป็นสายแตกแขนงสามารถเตรียมให้มีความเข้มข้น (% w/v) ต่าง ๆ กันได้ |
| agar หรือ agarose gel | นิยมใช้ในการแยกสารจำพวก antigens antibodies DNA RNA เป็นต้น | เป็น agarose และ agarosepectin ซึ่งเป็น galactose polyser |
| polyacrylamide gel | ใช้แยกสารชีวโมเลกุลได้เช่นเดียวกับ starch gel และ agarose gel นอกจากนี้ยังนิยมใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารอีกด้วย | ใช้แพร่หลายในห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ให้ผลการแยกสารที่แน่นอน วัดเจนและสามารถปรับขนาดของ gel ตามความต้องการได้ มีความเหนียวและยืดหยุ่นดี สามารถทำให้แห้งเป็นแผ่นเนื้อทำ autoradiography และ fluorography ได้ |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สูตรโครงสร้าง SDS



หลักการของ SDS-PAGE

SDS- เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุ สามารถจับกับโปรตีนในอัตราส่วน SDS 1.4 กรัม : โปรตีน 1 กรัม หรือ 1 SDS : 3 พันธะเปปไทด์ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะจับกับ SDS ได้มากกว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย เนื่องจาก SDS เป็นสารที่มีประจุลบ การจับของ SDS กับโปรตีนในอัตราส่วนที่สูงทำให้ประจุที่แท้จริงของโปรตีนถูกบดบังและโปรตีนทุกตัวจะแสดงประจุลบเหมือนกันหมด และเนื่องจากการจับของ SDS กับโปรตีนมีอัตราส่วนคงที่ ดังนั้นเมื่อคิดอัตราส่วนของประจุต่อมวลของโปรตีนไม่ว่าจะเป็นโปรตีนชนิดใดจะคงที่ด้วยเสมอ นั่นคือโปรตีนทุกตัวจะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้าเดียวกัน นอกจากนี้ SDS ยังทำให้โปรตีนซึ่งมีรูปร่างต่าง ๆ กันเสียสภาพธรรมชาติและอยู่ในรูปแท่งทรงกระบอก (rodlike structure) เหมือนกันหมด ดังนั้นการแยกโปรตีนด้วยวิธีนี้ จึงอาศัยความแตกต่างของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของสารเป็นหลักสำคัญเพียงอย่างเดียว และทำให้เราสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารโดยวิธี SDS-PAGE ได้

**ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับ SDS-PAGE**

1. ความเข้มข้นของโพลีเอคริลเลไมด์ เจล
(polyacrylamide gel concentration)

เจลจะมีสมบัติเป็นตาข่ายหรือตะแกรงทำหน้าที่กักหรือกรองสารที่มีขนาดต่าง ๆ กันออกจากกัน ความเข้มข้นของเจลที่ใช้จะบอกถึงขนาดของตะแกรงที่เหมาะสมกับงานทดลองนั้น ๆ

การสร้างตาข่ายนั้นเกิดขึ้นโดยการรวมตัวของ เอคริลเลไมด์หลาย ๆ โมเลกุล ต่อเป็นสายยาว โดยมี N, N'-methylene-bis-acrylamide (Bis, บิส) เป็นตัวเชื่อมระหว่างสาย ทำให้ได้ร่างแหสามมิติ ความเข้มข้นของเอคริลเลไมด์และบิส จะเป็นตัวกำหนดความยาวของสายโพลีเมอร์และขนาดของรูตาข่ายที่เกิดขึ้นทำให้สามารถกรองสารขนาดต่างกันออกจากกันได้

ตารางที่ 6 แสดงความเข้มข้นของ acrylamide (% T) ที่ใช้ในการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน

| % T | ขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสม |
|---|---|
| 3 - 5 | มากกว่า 100,000 |
| 5 - 12 | 20,000 - 150,000 |
| 10 - 15 | 10,000 - 80,000 |
| 15 | ต่ำกว่า 15,000 |

2. การเกิดการรวมตัวของเจล (polymerization)

เกิดจากอนุมูลอิสระ (free radical) ที่ได้จากแอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) โดยมี N, N, N', N'-tetramethylenediamine (TEMED) เป็นตัวกระตุ้น ปริมาณของ แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต และตัวกระตุ้นที่ใช้มีผลต่อการรวมตัวของเจล ถ้าไม่พอเหมาะการสร้างเจลจะไม่สมบูรณ์ ทำให้แยกสารไม่ดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมเจล

| ส่วนประกอบ | ปริมาณของสารที่ต้องการใช้ในการเตรียม | | |
|---|---|---|---|
| | เจล 5% | เจล 7.5% | เจล 10% |
| เอคริลเลไมด์ | 4.75 ก | 7.125 ก | 9.50 ก |
| บิส | 0.25 ก | 0.375 ก | 0.50 ก |
| TEMED | 0.05 มล | 0.05 มล | 0.05 มล |
| แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต | 0.05 ก | 0.05 ก | 0.05 ก |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย