หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

มันสำปะหลังเป็นพืชเขตร้อน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า มานิฮอท เอสคูเลนตา (Manihot esculenta Grantz) สามารถทนต่อความแห้งแล้งและเจริญได้ในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ จึงปลูกได้ตามเขตต่าง ๆ ทั่วโลก มีชื่อเรียกต่าง ๆ กันไปตามแหล่งปลูก เช่น คาซซาวา (cassava), มานิออค (Manioc) , ทาพิโอคา (tapioca), แมนดิโอคา (mandioca), ยูคา (yuca) เป็นต้น สำหรับประเทศไทย มันสำปะหลังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง ปลูกมากทางภาคตะวันออกและตะวันออกเฉียงเหนือ ผลผลิตของมันสำปะหลังส่วนมากใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ และใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น กาว, วุ้นเส้น, แป้งมัน, กระดาษ เป็นต้น บางส่วนส่งไปขายต่างประเทศในรูปของมันเส้น, แป้งมัน, มันอัดเม็ด แต่กระนั้นก็ตามยังปรากฏว่ามีเหลือ อยู่ในประเทศปีละมาก ๆ (1) ดังนั้นจึงควรหาวิธีแปรรูปไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นที่มีราคาแพงขึ้น เช่น น้ำตาลกลูโคส (2) ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำเชื่อมฟรุคโตส (fructose syrup) ที่มีความหวานมาก เหมาะที่จะนำไปใช้รับประทานหรือผสมอาหารอื่น ๆ หรือใช้ในกระบวนการหมัก (fermentation) เพื่อผลิตสารชนิดอื่น ๆ เช่น แอลกอฮอล์ (alcohol) กรดอะมิโน (amino acid) เป็นต้น (3)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แป้งเป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ชนิดหนึ่งที่สะสมในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เมล็ด, ราก, หัว, ลำต้น โพลีแซคคาไรด์ของแป้งประกอบด้วย อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกันทั้งโครงสร้าง และคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เช่น การละลายน้ำ, ขนาดโมเลกุล, การถูกย่อยโดยเอนไซม์ การให้สีกับสารละลายไอโอดีน (iodine solution) อะไมโลส (amylose) มีโมเลกุลเป็นเส้นตรง ประกอบด้วย ดี-กลูโคส (D-glucose) ประมาณ 500 โมเลกุลขึ้นไป เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา (1-4) กลูโคไซดิค (α (1-4) glucosidic bond) ส่วนอะไมโลเพคติน (amylopectin) ประกอบด้วย ดี-กลูโคส ต่อกันด้วยพันธะแอลฟา (1-4) กลูโคไซดิค และจะ

มีแขนงที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 20-25 โมเลกุลมาต่อด้วยพันธะแอลฟา (1-6) กลูโคไซดิค (α (1-6) glucosidic bond) แป้งต่างชนิดกันจะมีองค์ประกอบของอะไมเลส และอะไมโลเพคตินต่างกัน นอกจากนี้อาจมีส่วนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ปะปนมาเล็กน้อยจากพืชที่ใช้ในการผลิตหรือกระบวนการผลิต เช่น กรดไขมัน (fatty acid), ไขมัน (lipid), สารอนินทรีย์ (inorganic compound) จำพวก ฟอสฟอรัส (phosphorus) เป็นต้น (4)

ก่อน ค.ศ. 1960 การผลิตกลูโคสจากแป้งใช้วิธีย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) โดยใช้กรดเกลือ (hydrochloric acid), กรดซัลฟูริก (sulphuric acid) เป็นต้น แต่วิธีนี้ปฏิกิริยาการย่อยค่อนข้างรุนแรง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจมีรสขม, มีสีเข้ม หรือมีสารอื่นที่ไม่ต้องการปะปนมา ต่อมาได้เริ่มสนใจใช้เอนไซม์ (enzyme) เป็นตัวเร่ง (catalyst) แทน เนื่องจากให้ปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง, มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง (substrate specificity) และทำได้ง่าย (5) เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง (amylolytic enzyme) แบ่งได้ 2 กลุ่มคือ เอนโดอะไมเลส (endoamylase) และเอกโซอะไมเลส (exoamylase) เอนไซม์เอนโด-อะไมเลสจะย่อยพันธะแอลฟา (1-4) กลูโคสไซติคแบบสุ่ม (random) ทำให้ความหนืดของแป้งลดลงอย่างรวดเร็ว ได้ผลิตผลเป็น แอลฟา-ดี-กลูโคส (α -D-glucose), มอลโตส (maltose) และ แอลฟา-ลิมิต-เดกซตริน (α -limit dextrin) ที่มีความยาวต่าง ๆ กัน เอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มนี้คือ แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) [α (1-4) - glucan. gluconolydrolase) (E.C.3.2.1.1)] ส่วนเอนไซม์เอกโซอะไมเลสจะย่อยแป้งจากปลายที่ไม่มีคุณสมบัติในการรีดิวส์ (non-reducing end) ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 2 พวก คือ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) [(α (1-4) - glucan glucolydrolase) (E.C.3.2.1.3)] ซึ่งย่อยได้ทั้งพันธะแอลฟา (1-4), แอลฟา (1-6) กลูโคไซดิคของแป้งได้ผลลัพธ์เป็น แอลฟา-ดี-กลูโคส และ เอนไซม์เบตา-อะไมเลส (β -amylase) (β (1-4) glucan maltohydrolase) (E.C.3.2.1.2) ย่อยพันธะแอลฟา (1-4) ได้ผลลัพธ์เป็น เบตา-มอลโตส (β -maltose) และ เบตา-ลิมิต-เดกซตริน (β -limit dextrin) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (6, 7) หลังจากการย่อยของเอนไซม์อะไมเลสจะทำให้คุณสมบัติบางประการของแป้งเปลี่ยนแปลงไป เช่น การเกิดสีกับสารละลายไอโอดีน (iodine solution), ประมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) เพิ่มขึ้น และความหนืด

(viscosity) ของแป้งลดลง ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้สามารถใช้เป็นหลักในการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของเอนไซม์โดยวิธีต่าง ๆ กัน (7, 8, 9)

1.1 แหล่งของเอนไซม์

การผลิตเอนไซม์สามารถผลิตได้จากแหล่งต่าง ๆ คือ สัตว์, พืช, จุลินทรีย์ กล่าวคือ เบตา-อะไมเลสส่วนมากพบในเมล็ดธัญญพืชเช่น บาเลย์ (Barley), ข้าวสาลี (wheat), ไรย์ (rye), มอลต์ (malt), พืชอื่น ๆ เช่น ถั่วเหลือง (soy bean), มันเทศ (sweet potato) และจุลินทรีย์บางชนิด เช่น Bacillus polymyxa เป็นต้น แอลฟา-อะไมเลส พบในพืช เช่น มอลต์, น้ำลายของคนและสัตว์, จุลินทรีย์พวก Bacillus sp., Clostridium sp. Pseudomonas sp., Rhizopus sp., Aspergillus sp. และ Endomycopsis sp. เป็นต้น ส่วนกลูโคอะไมเลสผลิตได้จากราหลายชนิด เช่น Rhizopus sp., Aspergillus sp. ทั้ง Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Aspergillus awamori (7, 10) แม้ว่าการผลิตเอนไซม์สามารถทำจากแหล่งต่าง ๆ มากมาย แต่ปัจจุบันนิยมผลิตจากจุลินทรีย์ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทำได้ง่าย, ใช้ระยะเวลาสั้น, ไม่ขึ้นกับฤดูกาล, ใช้พื้นที่น้อย และสามารถเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ได้โดยการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ (cultural condition), การใช้วิศวกรรมพันธุศาสตร์ (genetic engineering), การผสมพันธุ์ใหม่ (recombination) และการผ่าเหล่า (mutation) เป็นต้น (11) สำหรับการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์มี 2 แบบคือ การเลี้ยงบนอาหารแข็ง (surface culture) และการเลี้ยงในอาหารเหลว (submerged culture) จุลินทรีย์ที่นิยมเลี้ยงบนอาหารแข็งคือ รา โดยเลี้ยงบนรำข้าวสาลี (wheat bran), ข้าว, มันสำปะหลัง เป็นต้น (12, 13, 14, 15) ส่วนการเลี้ยงในอาหารเหลวมักใช้ในการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียและราในถังหมัก (fermentor) ที่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมทางกายภาพ เช่น ความเป็นกรดด่าง (pH) อุณหภูมิ, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลว และสามารถทำในสภาพปลอดเชื้อได้

1.2 การย่อยแป้งดิบ

โดยทั่วไปการย่อยแป้งโดยเอนไซม์อะไมเลสจะใช้กับแป้งที่ถูกทำให้สุกก่อน (cooked starch) ต่อมาพบว่าเอนไซม์อะไมเลสบางชนิดสามารถย่อยแป้งดิบได้ แต่อัตราการย่อยช้ากว่าแป้งสุกเนื่องจากเม็ดแป้ง (starch granule) มีชั้นของ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

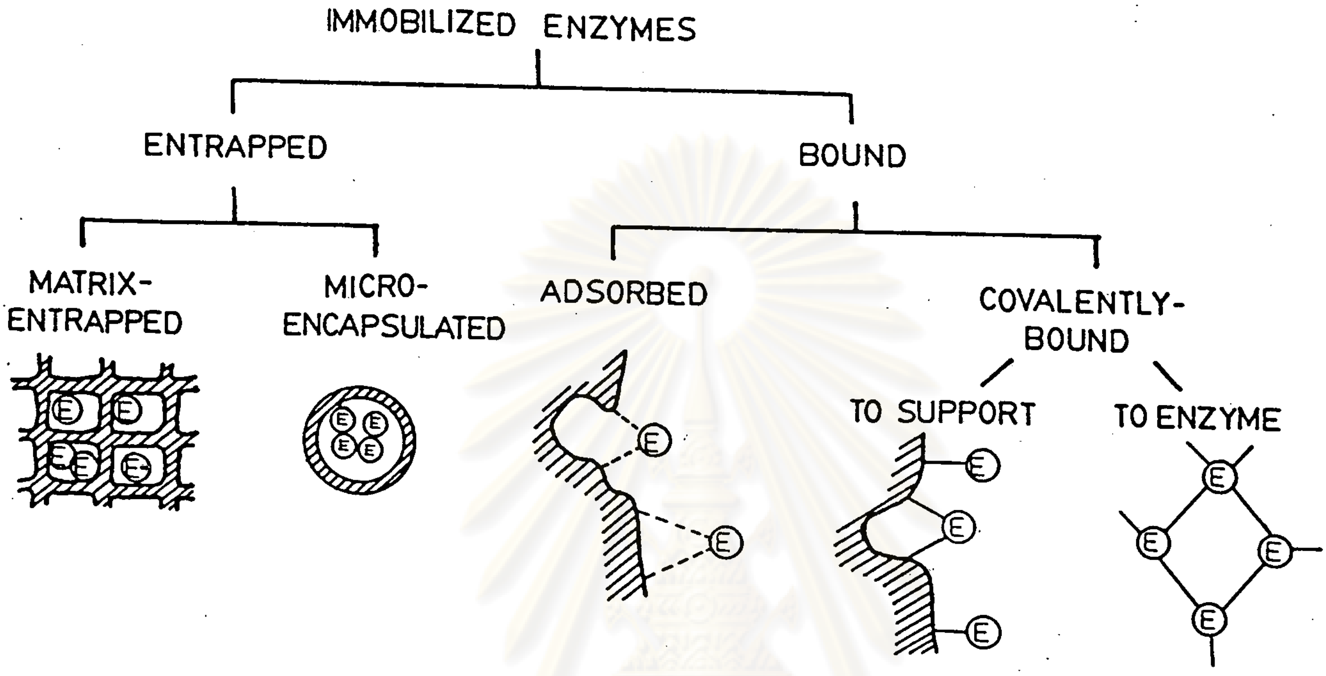
ไขมัน (fat) โปรตีน (protein) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) คลุมอยู่ (19) โดยในปี 1939 Stamberg O.E. และ Bailey พบว่า แอลฟา-อะไมเลส สามารถย่อยแป้งสาลีดิบ (raw wheat starch) ได้ 4-10 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ เบตา-อะไมเลส ย่อยได้เพียง 1.0 เปอร์เซ็นต์ (20) และในปี 1941 Kneen และคณะ ก็ศึกษาพบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากมอลต์เอกซ์แตรก (malt extract) สามารถย่อยแป้งสาลีดิบได้เช่นกัน (21) ต่อมาในปี 1945 Schwimmer (22) พบว่า การใช้ แอลฟา-อะไมเลสที่สกัดจากตับอ่อนร่วมกับมอลเตส (maltase) ที่ได้จากแป้งเชื้อ Aspergillus oryzae ร่วมกันในการย่อยแป้งดิบจะให้ผลผลิตสูงกว่าการใช้แอลฟา-อะไมเลสอย่างเดียว และได้ผลผลิตเป็นกลูโคสและมอลโตส จนกระทั่งปี 1975 Ueda รายงานว่าเอนไซม์อะไมเลสจากราดำ Aspergillus awamori var. hawachi จะมีคุณสมบัติในการย่อยแป้งดิบสูงกว่าอะไมเลสจาก Aspergillus oryzae และอะไมเลสจากข้าวมอลต์ (malt) เอนไซม์อะไมเลสของราดำมีทั้งชนิดที่เป็นแอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส แอลฟา-อะไมเลสมีความสามารถในการย่อยแป้งดิบต่ำกว่ากลูโคอะไมเลส แต่เมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันในการย่อยแป้งดิบ พบว่าความสามารถในการย่อยแป้งดิบเพิ่มขึ้นถึง 3 เท่าของผลรวมความสามารถในการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์แต่ละชนิด และจากการพัฒนาความสามารถในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสกลุ่มที่ 1 (glucoamylase I) ที่พบใน Aspergillus awamori, Aspergillus niger, Rhizopus sp. มีความสามารถในการย่อยแป้งดิบสูง ส่วนกลูโคอะไมเลสกลุ่มที่ 2 (glucoamylase II) ของจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความสามารถในการย่อยแป้งดิบต่ำ และกลูโคอะไมเลสทั้ง 5 กลุ่มที่พบใน Rhizopus niveus ก็มีความสามารถในการย่อยแป้งดิบได้สูงเช่นกัน (23, 24) เอนไซม์อะไมเลสจะมีความสามารถในการย่อยแป้งดิบได้ถ้ามีการดูดซับของเอนไซม์กับเม็ดแป้ง และความสามารถในการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์จะสูงถ้าเอนไซม์นั้นมีความสามารถในการย่อยพันธะ แอลฟา 1-6 สูง (debranching activity) (24, 25) โดยทั่วไปแป้งที่ได้จากธัญญพืช (cereal starch) จะถูกย่อยได้ง่ายกว่าแป้งที่ได้จากส่วนราก (root starch) เช่น มันเทศ มันฝรั่ง แต่สำหรับแป้งมันสำปะหลัง พบว่าถูกย่อยได้ง่ายเช่นเดียวกับแป้งจากธัญญพืช การย่อยแป้งดิบจะช่วยประหยัดพลังงานในการทำแป้งให้สุก ในการผลิตสารต่าง ๆ จากแป้ง เช่น แอลกอฮอล์ เป็นต้น (26, 27, 28)

1.3 การตรึงเอนไซม์

ในสมัยแรก ๆ การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์จะใช้ในรูปของเอนไซม์บริสุทธิ์ หรือการใช้เชื้อทำให้เกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ โดยตรง ซึ่งเป็นวิธีที่จะใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ได้เพียงครั้งเดียว (batch process) ไม่สามารถนำเอนไซม์นั้นกลับมาใช้อีก และยังไม่สามารถทำเป็นระบบต่อเนื่อง (continuous process) ได้อีกด้วย เนื่องจากเอนไซม์มีราคาแพง จึงพยายามหาวิธีในการใช้เอนไซม์อย่างคุ้มค่า และวิธีหนึ่งที่น่าสนใจคือ การตรึงเอนไซม์ (immobilized enzyme) ซึ่งหมายถึงการทำให้เอนไซม์เคลื่อนที่ไปมาไม่ได้ หรือเคลื่อนที่ไปมาได้ในพื้นที่จำกัด ทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปของเอนไซม์ที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble) เราก็จะสามารถนำกลับมาใช้ได้อีก (29) หลังจากการตรึงเอนไซม์แล้ว จะมีข้อได้เปรียบหลายประการ กล่าวคือ สามารถแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงออกจากสารละลายที่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น (reaction mixture) ได้ง่าย, สามารถนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ได้อีก, การผลิตโดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงสามารถทำในระบบต่อเนื่องได้ และเอนไซม์บางชนิดหลังจากตรึงไว้แล้วจะมีคุณสมบัติบางประการเปลี่ยนไปในทางที่จะเป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้ในอุตสาหกรรม เช่น ความเสถียรต่อความร้อน และการเก็บรักษา (thermal stability & storage), ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate specificity), ความไวในการตอบสนองต่อตัวยับยั้ง (sensitivity of inhibitor), อุณหภูมิ, ความเป็นกรดด่างที่มีความเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น (30)

วิธีการในการตรึงเอนไซม์มี 4 วิธีใหญ่ ๆ คือ การตรึงเอนไซม์โดยจำกัดเขตในพื้นที่จำกัด (entrapped) ซึ่งอาจเป็นการจำกัดเขตเอนไซม์ในแมทริก (matrix-entrapped) พวก โพลีอครีลามายด์ เจล (polyacrylamide gel) แคลเซียมอัลจิเนต (calcium algenate) แคปปา-คาร์ราจีแนน (K-carragenan) เป็นต้น หรือการจำกัดเขตเอนไซม์ไว้ในแคปซูลขนาดเล็ก (microencapsulated) ซึ่งทำจากวัสดุพวกคอลลอยเดียนเมมเบรน (colloidian membrane) และการตรึงเอนไซม์โดยให้เอนไซม์เกาะบนสารหลัก (bound) ซึ่งอาจเป็นการเกาะแบบธรรมดา (adsorbed) กับสารต่าง ๆ เช่น แก้ว ไม้ ถ่าน ดี.อี.เอ.อี.-เซฟาเดกซ (DEAE-Sephradex), ซี.เอม.-เซลลูโลส (C.M. Cellulose) เป็นต้น หรือให้เอนไซม์เกาะ โดยทำให้เกิดพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) กับสารหลัก หรือเกาะกันระหว่างเอนไซม์ด้วยกันเอง โดยใช้สารที่เป็น ไบ-ฟังชันนอล ครอสริงกิงเอเจน

(bifunctional crosslinking agent) เช่น กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เป็นต้น เป็นสารเชื่อม



รูปที่ 1.1 แสดงการตรึงเอนไซม์แบบต่าง ๆ (29)

จากการพัฒนาเทคนิคในการตรึงเอนไซม์ ได้นำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตและประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกในปี 1969 Tosa, T, และคณะ ผลิต แอล-อมิโน แอซิด (L-amono acid) จาก เอซิล-ดีแอล อมิโน แอซิด (acyl DL-amono acid) โดยใช้ แอสพาเทส ที่ถูกตรึง (immobilized aspartase) (33) จากความสำเร็จนี้เป็นแนวทางในการนำมาใช้กับเอนไซม์อื่น ๆ ในระดับอุตสาหกรรมมากมาย เช่น การผลิต 6-อมิโนเพนิซิลลินิค แอซิด (6-aminopenicillinic acid) จาก เพนิซิลลิน อะมิเดส (penicillin amidase) ที่ถูกตรึง, การผลิต แอล-แอสพาติค แอซิด (L-aspartic acid) จาก แอสพาเตส (aspartase) ที่ถูกตรึง เป็นต้น (34)

สำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง (starch-hydrolysis enzyme) มีรายงานการทดลองตรึง แอลฟา-อะไมเลส โดยวิธีเกาะแบบธรรมดาบนทราย, เบนโทไนต์

(Bentonite), คอลลาเจน (collagen) เป็นต้น การจำกัดเขตเอนไซม์ในแมตทริก พวกโพลี-อะครีลามาย์เจล และการให้เอนไซม์เกาะโดยเกิดพันธะโควาเลนท์ กับ ซีเอม-เซลลูโลส (C.M. -cellulose), ดี.อี.เอ.อี. - เดกซแทรน (D.E.A.E. - dextran) หรือเซฟาโรส (sepharose) เป็นต้น แต่การนำ แอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงไปใช้ในทางการค้ายังมีน้อย เพราะ แอลฟา-อะไมเลสที่ถูกตรึงแล้วยังไม่มีคุณสมบัติที่ดีพอที่จะนำไปใช้ เนื่องจากมีราคาแพง, ประสิทธิภาพต่ำ และมีความคงทน (stability) ต่ำ เมื่อเทียบกับเอนไซม์นี้เมื่ออยู่ในสภาพละลายน้ำ (soluble enzyme) ส่วนกลูโคอะไมเลสมีการทดลองตรึงกันอย่างกว้างขวาง ทั้งโดยวิธีการเกาะแบบธรรมดาบนสารเกาะอินทรีย์และอนินทรีย์ (organic & inarganic absorbents) เช่น อะลูมินา (alumina), ไดอะตอมเมเซียส เอร์ท (diatomaceous earth), โคลน (acid clay), ไฮโป-เอปาไตท์ (hypo-apartite), ดี.อี.เอ.อี. - เซฟาเดกซ (D.E.A.E- sephadex), ดี.อี.เอ.อี.-เซลลูโลส (D.E.A.E.-cellulose) เป็นต้น หรือโดยการขังเอนไซม์ในแมทริกพวก โพลีอะครีลามาย (polyacrylamide) หรือ โพลี-ไวนิล-แอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) นอกจากนี้อาจตรึงโดยใช้พันธะโควาเลนท์กับเซฟาโรส (sepharose), คอลลาเจน (collagen), ซีไรท์ (celite), ซีลิกา เจล (silica gel) โดยใช้กลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ช่วยในการเกาะติด โดยทดลองใช้กับหอปฏิกิริยา (reactor) แบบต่าง ๆ เช่น หอปฏิกิริยาแบบแพค-เบด (pack-bed reactor), หอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดซ (fluidized bed reactor) เป็นต้น (35, 36, 37, 38)

1.4 การตรึงเซล

ในระยะแรกของการศึกษาการตรึงเอนไซม์ มักสนใจระบบที่อาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์เพียงชนิดเดียวที่ไม่ต้องการเอนไซม์ร่วม (coenzyme) เช่น เอนไซม์ แอลฟาเตส เป็นต้น ต่อมาเริ่มสนใจระบบที่ต้องการเอนไซม์ร่วม และตรึงเอนไซม์ร่วมเพื่อใช้ในปฏิกิริยานั้น ๆ (39) แต่เนื่องจากในการผลิตสารบางชนิด เช่น การผลิตแอลกอฮอล์ จากกลูโคส ต้องการเอนไซม์หลายชนิดมาเกี่ยวข้องในปฏิกิริยา และต้องการเอนไซม์ร่วมด้วย จึงไม่เป็นการสะดวกที่จะตรึงเอนไซม์ทุก ๆ ตัว (40) นอกจากนี้การตรึงเอนไซม์ยังมีข้อเสียหลายประการคือ เอนไซม์ที่ตรึงแล้วไม่เสถียรเท่ากับเอนไซม์ที่อยู่ในสภาวะธรรมชาติภายในเซล และค่าใช้จ่ายในการตรึงเอนไซม์ค่อนข้างสูง เนื่องจากต้องผ่านขั้นตอนการสกัดและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ดังนั้นจึง

เริ่มสนใจศึกษาการตรึงเซลเพื่อลดปัญหาเหล่านี้ แต่อย่างไรก็ตาม การตรึงเซลจะใช้ได้ก็ต่อเมื่อเซลนั้นไม่มีเอนไซม์อื่นในปริมาณที่มากพอที่จะมากระทบการทำงานของเอนไซม์ที่ต้องการ หรือสามารถกำจัดเอนไซม์ที่ไม่ต้องการ (interfering enzyme) ได้ นอกจากนี้สารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ควรมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight) เพื่อสามารถผ่านเข้าออกในบริเวณที่มีเซลที่ถูกตรึงได้ (41) ขบวนการตรึงเซลไม่ใช่ขบวนการที่ค้นพบใหม่ แต่เป็นขบวนการที่เลียนแบบวิธีการที่พบในธรรมชาติ เช่น จุลินทรีย์ที่เกาะติดกับกองหิน, ทราย ซึ่งช่วยในการกำจัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมโดยกระบวนการทริกริง ฟิลเตอร์ (Trickling filter) ที่เรารู้จักกันมานาน (42)

การตรึงเซลมีด้วยกันหลายวิธี เช่นเดียวกับการตรึงเอนไซม์ คือ การตรึงเซลโดยไม่ใช้สารหลัก เช่น การใช้ความร้อน (heat treatment) ในการทำให้เซลของ <u>*Streptomyces*</u> sp. เกาะกลุ่มกันเพื่อให้เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสถูกตรึงอยู่ภายในเซล และสามารถนำไปใช้ในรูปของเอนไซม์ที่ถูกตรึง หรือการใช้สารอื่น ๆ ในการทำให้เซลเกาะตัวกัน (flocculate) เช่น โพลีเอมีน (polyamine), ไคโตแซน (chitosan) เป็นต้น นอกจากนี้ก็สามารถตรึงเซลโดยวิธีการจำกัดเขตในพื้นที่จำกัด, การเกาะแบบธรรมดา และการเกาะโดยพันธะโควาเลนท์ เช่นเดียวกับการตรึงเอนไซม์ (43, 44, 45) ถึงแม้ว่าการตรึงเซลจะมีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ การจำกัดเขตเซลในพื้นที่จำกัด โดยเลือกชนิดของสารที่นำมาใช้ตรึง (matrix) ให้เหมาะสม ให้มาล้อมรอบเซลแล้วมีคุณสมบัติยอมให้เกิดการผ่านเข้าออกของสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ได้ ในขณะเดียวกันก็สามารถขังเซลไว้ภายในได้ สารที่ใช้ในการขังเซลได้แก่ โซเดียมอัลจิเนต (sodium algenate), แคปาคาราจีแนน (K-carragenan), เยลาติน (gelatin), วุ้น (agar) เป็นต้น (46, 47) สำหรับโซเดียมอัลจิเนต เป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วย เบตา-ดี-แมนนูโรเนท (β -D-manuronate) และ แอลฟา-แอล-กูลูโลเนท (α -L-gululonate) ต่อกันเป็นสายใย (net work) การเกิดเป็นของแข็ง (gel) เกิดขึ้นโดย แคลเซียมไอออน (calcium ion) หรือแคตอิออนอื่น ๆ เช่น แบเรียม (barium), อลูมิเนียม (aluminium) เป็นต้น โดยไปสร้างสะพานไอออนิค (ionic bridge) ระหว่างกลุ่มคาร์บอกซีล (carboxyl group) ของ กูลูโลเนท และ แมนนูโรเนท เกิดเป็นตาข่ายที่แข็งตัว และสามารถกักเซลไว้ในช่องว่างภายใน โดยมีรูพรุนสำหรับให้สารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ผ่านเข้าออกได้ ซึ่งขนาดและปริมาณ

ของรูพรุนนี้จะขึ้นกับชนิดของไอออนของโลหะ (metal ion) ที่ใช้ รวมทั้งชนิดของอัลจิเนตที่ใช้ด้วย อัลจิเนตที่มีคุณสมบัติทนต่อแรงกดและการแตกหักได้ดีมักเป็นพวกที่มีปริมาณของกูลูโลเนทสูง แต่การใช้อัลจิเนตมีข้อจำกัด คือจะไม่เสถียรเมื่อมีแอนอิออนบางตัวในระบบ เช่น ฟอสเฟต (phosphate), แลคเตต (lactate), อี.ดี.ที.เอ.(EDTA) เป็นต้น การใช้อัลจิเนตในการจำกัดเขตของเซลนิยมใช้กันมากเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย, สะดวก, ราคาไม่แพง และปฏิกิริยาในการตรึงเซลเป็นปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง, ไม่มีพิษ (toxicity) ต่อเซล และเป็นแมทริก (matrix) ที่มีคุณสมบัติดีอีกด้วย (48, 49, 50)

การตรึงเซลในระยะแรกนิยมใช้กับเซลที่ไม่มีชีวิต (dead cell) เช่น การตรึงเซลของ <u>Streptomyces</u> sp. โดยใช้ความร้อนเพื่อใช้ในการผลิตน้ำตาลฟรุคโตสจากน้ำตาลกลูโคส โดยอาศัยเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่ถูกตรึงอยู่ภายในเซล ต่อมาพบว่าการตรึงเซลที่มีชีวิตเหมาะสมกว่า เนื่องจาก (51, 52)

1. สามารถทำให้เซลซึ่งใช้ไประยะหนึ่งและประสิทธิภาพการทำงานลดต่ำลง กลับสู่สภาพเดิมได้โดยเติมอาหารที่เหมาะสม

2. สามารถใช้ในการผลิตสารบางตัวที่จำเป็นต้องใช้ส่วนหนึ่งหรือทั้งหมดของกระบวนการเมตาโบลิซึม (metabolic pathway)

3. ใช้ในกระบวนการที่ต้องการเอนไซม์ร่วม โดยสามารถสร้างเอนไซม์และเอนไซม์ร่วมขึ้นมาใช้ใหม่ได้ตลอดเวลา

4. เซลที่ถูกตรึงแล้วสามารถสืบพันธุ์ได้

ตัวอย่างของกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมที่ประสบความสำเร็จโดยใช้เซลที่ถูกตรึงแล้ว คือการผลิตแอล-แอสพาติค แอซิด (L-aspartic acid) จากแอมโมเนียมฟูเมอเรท (ammonium fumerate) โดยการตรึงเซลของ <u>Escherichia</u> <u>coli</u> ที่มีเอนไซม์แอสพาเตส (aspartase) บนโพลีอะคริลามาย เจล (polyacrylamide gel) โดย Chibata และคณะในปี 1974 ซึ่งนับเป็นความสำเร็จครั้งแรกของโลกในการใช้เซลที่ถูกตรึงในระดับอุตสาหกรรม (53, 54) ต่อมาจึงใช้เซลที่ถูกตรึงในการผลิตสารต่าง ๆ ทางการค้า เช่น แอล-มาลิก แอซิด (L-malic acid), แอล-ซิทรูลิก แอซิด (L-citrullic acid) ยูโรคานิก แอซิด (urocanic acid) และ 6-อมิโนเพนนิซิลลินิก แอซิด (6-aminopeni-

cillinic acid) เป็นต้น (55, 56)

การตรึงเซลล์ส่วนใหญ่มักศึกษาในจุลินทรีย์ที่เป็นเซลเดียว (single cell) เช่น แบคทีเรีย, ยีสต์ เป็นส่วนใหญ่ สำหรับจุลินทรีย์ที่อยู่ในลักษณะหลายเซลต่อกัน เช่น รา (fungi) ยังมีผู้ศึกษากันน้อย การตรึงเซลของรานั้นอาจตรึงในรูปของสายใย (mycelium) หรือตรึงสปอร์ (spore) แล้วชักนำให้เกิดการงอกเป็นสายใยภายหลังการตรึง ตัวอย่างการตรึงราสายพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อใช้ในการผลิตสารต่าง ๆ ได้แก่ การตรึงสายใยของ Rhizopus nigricans (57), Curvularia lunata (58), Rhizopus stolonifer (59) หรือตรึงสปอร์ของ Curvularia lunata (60) ในสารเกาะชนิดต่าง ๆ กัน แล้วชักนำให้เกิดการงอกเพื่อใช้ในการผลิต เสตียรอยด์ (steroid) ชนิดต่าง ๆ เป็นต้น ในปี 1979 Morikawa และคณะ พบว่าสายใยของ Penicillin chrysogenum ที่ถูกตรึงในโพลีอะคริลามาย เจล สามารถผลิตยาเพนนิซิลลินจี (Penicillin G) แบบต่อเนื่องได้โดยความสามารถในการผลิตจะสูงและคงทนกว่าการใช้สายใยที่ไม่ตรึง โดยมีระยะครึ่งชีวิต 5 วัน (61) ในปี 1983 Horitsu และคณะ ผลิตอิทาโคนิค แอซิด (itaconic acid) โดยใช้ Aspergillus terreus ที่ถูกตรึงในโพลีอะครีลามายแบบต่อเนื่อง โดยมีระยะครึ่งชีวิต 10 วัน (62)

การนำเอนไซม์หรือเซลที่ถูกตรึงมาใช้ในกระบวนการผลิตมักจะทำในหอปฏิกิริยา (reactor) ซึ่งสามารถออกแบบได้หลายอย่างคือ หอปฏิกิริยาแบบไม่ต่อเนื่อง (batch reactor), หอปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องและมีการกวนสม่ำเสมอ (continuous stirred tank reactor), หอปฏิกิริยาแบบเบดอยู่กับที่ (fixed bed reactor) และหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดเบด (fluidized bed reactor) (63) สำหรับฟลูอิดไดเซชั่นเป็นเทคนิคที่ทำให้เม็ดของแข็งในหอปฏิกิริยามีคุณสมบัติคล้ายของไหลเมื่อมีก๊าซหรือของเหลวผ่านมาด้านล่าง โดยอาจเป็นฟลูอิดไดเซชัน 2 สถานะ คือก๊าซฟลูอิดไดเซชัน (gas fluidization) หรือฟลูอิดไดเซชันของของเหลว (liquid fluidization) หรือเป็นฟลูอิดไดเซชัน 3 สถานะระหว่างของแข็ง ของเหลว ก๊าซก็ได้ ข้อดีของการทำฟลูอิดไดเซชันคือ มีการเคลื่อนที่ของเม็ดของแข็งตลอดเวลา อุณหภูมิเท่ากันตลอด และสามารถทำงานแบบต่อเนื่องได้ โดยไม่เปลืองพลังงานมากเมื่อเทียบกับหอปฏิกิริยาแบบอื่น (64)

ตัวอย่างการนำหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดเซชันมาใช้ในระบบของเซลที่ถูกตรึง เช่น Wada และคณะ ในปี 1979 ทดลองผลิต แอล-ไอโซลิวซีน (L-isolencine) จาก

Serratia marcescens ที่ถูกตรึงในแคปปา-คาราจีแนน (K-carragenan) และการผลิตแอล-ซอโบส (L-sorbose) จาก Acetobacter suboxydans ที่ถูกตรึง (65) ในปี 1981 Yoshida และคณะ ทดลองผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เซลของ Aspergillus oryzae Var brunneus Wos และ Saccharomyces cerevisiae 13 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต ในหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดเซชัน พบว่า เซลที่ถูกตรึงสามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ของทฤษฎี (threoretical yield) โดยผลผลิตไม่มีการลดลงภายหลังการทดลอง 5 วัน (66) และในปี 1983 Damronglerd ศึกษาการใช้เซล Aspergillus oryzae Var brunneus Wos และ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตร่วมกับการใช้ Saccharomyces cerevisiae ที่ถูกตรึงในการเปลี่ยนแป้งละลายน้ำ (soluble starch) ให้เป็นเอทานอล เปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ถูกตรึงร่วมกับ Saccharomyces cerevisiae ที่ถูกตรึงในหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดเซชัน พบว่าการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ถูกตรึง และ Saccharomyces cerevisiae ที่ถูกตรึงร่วมกัน จะมีความคงทน (stability) สูงสุด กล่าวคือ ผลผลิตของเอทานอลลดลงเพียง 13 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตเริ่มต้นในระยะเวลา 27 วัน ความเข้มข้นของเอทานอล 20 กรัมต่อลิตร (67)

จากงานวิจัยที่กล่าวแล้วแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการตรึงเซลของราเพื่อใช้ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีอยู่มากในประเทศไทยให้เป็นน้ำตาลที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตสารอื่น ๆ มากมาย โดยงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงการตรึงเซลของราในแคลเซียมอัลจิเนต และการศึกษาคุณสมบัติในการย่อยแป้งของเชื้อราที่ถูกตรึง และประสิทธิภาพในการย่อยในหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดเซชัน