บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ปริมาณเศษวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม และยังเป็นประเทศผู้ผลิตอาหารที่สำคัญอีกด้วย ดังนั้นปริมาณเศษวัสดุอินทรีย์เหลือใช้ภายในประเทศจึงมีมากมาย จากการประเมินปริมาณเศษวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรในปี พศ. 2543 (ตารางที่ 1) และปริมาณเศษวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรบางประเภทในภาคเหนือของประเทศไทย พบว่าวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร ซึ่งได้แก่ ชานอ้อย แกลบ ฟาง เศษเหลือใช้จากปาล์มน้ำมัน มะพร้าว มันสำปะหลัง ข้าวโพด ถั่วต่างๆ ฝ้าย และข้าวฟ่างมีอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.069-15.5 ล้านตัน ส่วนวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรบางประเภทในภาคเหนือ ซึ่งได้แก่ แกลบ รำ ขี้เถ้าแกลบ กากอ้อย filter cake เปลือกสับปะรด เปลือกเงาะ เปลือกและซังข้าวโพด และกากถั่วเหลือง มีอยู่ในช่วงตั้งแต่ 9.6-70,000 ตัน/ปี

ปริมาณของเศษวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มีแนวโน้มว่าจะเพิ่มมากขึ้นทุกๆปี สำหรับวัสดุเหลือใช้บางประเภท เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย เส้นใยชานอ้อย และชานอ้อยส่วนแกน (ตารางที่ 2) ซึ่งมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ มีการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ (ตารางที่ 3) แต่ยังมีวัสดุเหลือใช้จำนวนมากที่ยังไม่มีการนำใช้ประโยชน์

ตารางที่ 1 ปริมาณวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรปี พ.ศ. 2543

ชนิด	วัสดุเหลือใช้	ปริมาณวัสดุเหลือใช้ (10^6 กก.)
1. อ้อย	ชานอ้อย	15,567
	ส่วนยอดและใบ	16,155
2. ข้าว	แกลบ	5,560
	ฟาง(ส่วนบน)	10,805
3. ปาล์มน้ำมัน	ทะลายปาล์มเปล่า	1,394
	เส้นใยปาล์ม	479
	กะลาปาล์ม	160
	ก้าน	8,479
	ทะลายตัวผู้	759

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 ปริมาณวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรปี พ.ศ. 2543(ต่อ)

ชนิด	วัสดุเหลือใช้	ปริมาณวัสดุเหลือใช้ (10^6 กก.)
4. มะพร้าว	เปลือก	507
	กะลามะพร้าว	224
	ทะลายมะพร้าว	69
	ทางมะพร้าว	315
5. มันสำปะหลัง	ลำต้น	1,678
6. ข้าวโพด	ซังข้าวโพด	1,170
7. ถั่วลิสง	เปลือก	45
8.ฝ้าย	ลำต้น	116
9. ถั่วเหลือง	ลำต้น,ใบ,เปลือก	849
10. ข้าวฟ่าง	ใบ,ต้น	178

ที่มา : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (2543)

ตารางที่ 2 ปริมาณของเซลลูโลสในสารประกอบต่าง ๆ

วัตถุดิบ	ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละ)
ฝ้าย	91.0
เนื้อไม้	40.0 – 45.0
กระดาษหนังสือพิมพ์	40.0 – 48.0
ฟางข้าวชนิดต่าง ๆ	
- ข้าวสาลี	30.5
- ข้าวจ้าว	32.1
- ข้าวบาเลย์	40.0
- ข้าวโอ๊ต	42.8
- ข้าวไรน์	34.0
ชานอ้อย	46.0
เส้นใยชานอ้อย	56.6
ชานอ้อยส่วนแกน	55.4

ที่มา : ดัดแปลงจาก Goksoyr and Eriksen (1980)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

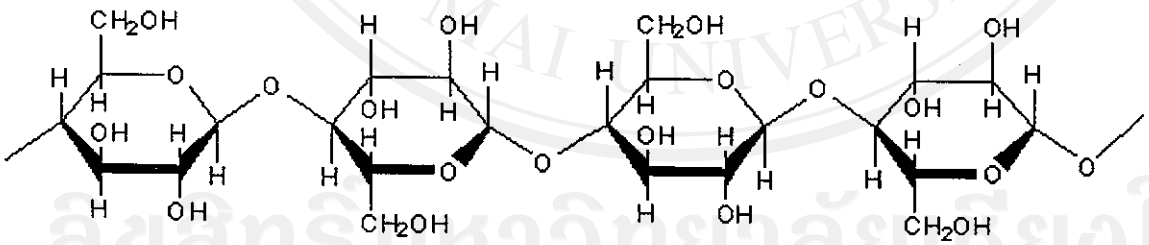
ตารางที่ 3 ตัวอย่างเศษวัสดุที่มีเซลลูโลสที่นำมาใช้ในปัจจุบัน

วัสดุเหลือใช้	การนำมาใช้ในปัจจุบัน
ชานอ้อย ฟางข้าว พืชไม้เนื้ออ่อน ไม้พุ่ม ไม้วงปีสั้น เศษไม้จากป่า พืท เส้นใยที่เหลือจากอุตสาหกรรมทำเยื่อ กระดาษและเศษเปลือกไม้ต่าง ๆ	1. อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ เชื้อเพลิง 2. อุตสาหกรรมทำเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมทำไม้อัด 3. อุตสาหกรรมทำเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมทำไม้อัด 4. เชื้อเพลิง 5. นำกลับมาใช้ในอุตสาหกรรมทำแผ่นกระดาษ 6. เชื้อเพลิง 7. เชื้อเพลิง ใช้ปรับปรุงคุณภาพของดิน

ที่มา : Goksoyr and Eriksen (1980)

เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลส ($C_6H_{10}O_5$) เป็นพวก polysaccharide ที่เป็นเส้นยาวประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคส (Glucose) ต่อกันเป็นโพลีเมอร์ (polymer) เชื่อมด้วยพันธะ β-(1-4) glycosidic (รูปที่ 1) มีจำนวนประมาณ 1,000 – 15,000 โมเลกุลและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000 – 2,400,000 ดาลตัน (Dalton) (จิตตเสน, 2527) โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสจะเรียงกันเป็นมัดๆ โดยจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน เรียกว่า fibril ซึ่งจะไม่ละลายน้ำ และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช ในธรรมชาติเซลลูโลส มักจะเกาะอยู่กับสาร จำพวก hemicellulose pectin และ lignin (วิภาภัทร, 2534) ซึ่งจะทำหน้าที่คล้ายซีเมนต์ให้ความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ ส่วนเซลลูโลสล้วนๆ จะมีความเหนียวแต่จะนิ่ม เช่น ฝ้าย



รูปที่ 1 โครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา : http://www.chemsoc.org/networks/learnnet/cfb/carbohydrates.htm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส มีวิธีที่นิยมใช้ 2 วิธี (สมภพ, 2529)

1. วิธีทางเคมี เป็นการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงภายใต้อุณหภูมิสูง ทำให้ได้กลูโคส แต่จะมีปริมาณต่ำและเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการด้วย
2. วิธีทางชีวภาพ เป็นการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ ที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย โดยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาสามารถไฮโดรไลส์ เซลลูโลสให้เป็นกลูโคส ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรงและไม่เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ เพราะเอนไซม์จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารประกอบเซลลูโลสมาก

เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

เอนไซม์เซลลูเลสเป็น complex enzyme ที่มีส่วนประกอบต่างๆ กัน ทำหน้าที่ร่วมกัน Mandels and Reese (1956) อธิบายว่าการย่อยเซลลูโลสเกิดจาก 2 ขั้นตอน ปฏิกิริยาขั้นตอนแรกเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่แทนด้วย C_1 ย่อยได้เซลลูโลสสลายสั้นลง ปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 คือการทำงานของเอนไซม์ที่แทนด้วย C_x ซึ่งจะไฮโดรไลซ์ cellulose derivative ที่เกิดจากการย่อยของ C_1 เอนไซม์ทั้งสองชนิดทำงานแยกกัน เอนไซม์ C_1 จะย่อย native cellulose ทำให้ได้เซลลูโลสสายสั้นๆ แล้วถูกย่อยต่อโดยเอนไซม์ C_x จนได้ cellobiose แต่หลักฐานการปรากฏของ C_1 และ C_x นั้นยังไม่ชัดเจน มีรายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อย degraded cellulose แต่ไม่สามารถย่อย native cellulose และมีจุลินทรีย์หลายชนิดผลิตได้เพียง C_x จึงไม่สามารถย่อยเซลลูโลสและมีเพียงไม่กี่ชนิดที่ผลิตได้ทั้ง C_1 และ C_x เรียกจุลินทรีย์นี้ว่า true cellulytic mocroorganism (Wood and Wilson, 1984)

องค์ประกอบและการทำงานของเซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลส ประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์ (complex enzyme) ที่ทำงานร่วมกัน(ตารางที่ 4) คือ

1. เอนไซม์ C_1 หรือ hydrogen bondase ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแตกสลายเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสม คือ ทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลง เพื่อเป็นซับสเตรทของเซลลูเลส
2. เอนไซม์ C_x หรือ β-1,4 glucanase เป็นเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายซับสเตรทที่มีโครงสร้างซับซ้อนมี 3 ชนิด คือ
    2.1 Endo-β-glucanase (β-D-glucan glucanohydrolase, EC.3.2.1.4) จะทำหน้าที่ย่อย β-glucosidic linkage แบบสุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์คือ กลูโคส เซลโลไตรโอส ไม่ย่อยเซลโลไบโอส แต่สามารถย่อยเซลโลเดกซ์ตริน (cellodextrin) เซลลูโลสที่เกิดการพองตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(swollen cellulose) carboxymethyl cellulose (CMC) และ hydroxyl-ethyl cellulose (HEC) ในการตรวจสอบเอนไซม์ชนิดนี้ใช้ CMC และ HEC เป็นซับสเตรท

2.2 Exo-β-glucanase (1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase EC.3.2.1.91) หรือ cellobiohydrolase ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้าน non-reducing end สามารถย่อยเซลลูโลสในรูปผลึก (crystalline cellulose) หรือย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble cellulose) ให้เป็นเซลโลเดกซ์ตรินและเซลโลไบโอส ตรวจสอบเอนไซม์ชนิดนี้โดยการใช้ฝ้าย อวิเซล (avicel) และ amorphous cellulose เป็นซับสเตรท

2.3 β-glucosidase (β-D-glucohydrolase EC.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอส และเซลโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (cello-oligosaccharide) ได้ผลิตภัณฑ์คือ กลูโคส ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสหรือเซลโลเดกซ์ตริน ทดสอบเอนไซม์ชนิดนี้โดยใช้เซลโลไบโอส, *p*-nitrophynyl-β-glucoside หรือ ซาลิซีน เป็นซับสเตรท

ตารางที่ 4 การย่อยสลายสารต่าง ๆ โดยเซลลูเลส

ชนิดของเอนไซม์	**ชนิดของสาร**				
	Crystalline cellulose	CMC	Amorphous cellulose	Cellotetraose	cellobiose
Endo-β-glucanase	-	+	+	+	-
Cellobiohydrolase	+	-	+	+	-
β-glucosidase	-	-	-	+	+

ที่มา : สมรักษ์ (2535)

กลไกการทำงานของเซลลูเลสเป็นการทำงานร่วมกันแบบ synergistic (ตารางที่ 5) เริ่มจากเซลลูโลสจะเกิดการบวมตัว (selling) พร้อมกับสลายพันธะไฮโดรเจนซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของ endo-β-glucanase และ exo-β-glucanse โดย endo-β-glucanase จะย่อยสลายเซลลูโลสด้านปลายรีดิวส์ ส่วน exo-β-glucanase ย่อยสลายเซลลูโลสด้าน reducing end จนได้น้ำตาลกลูโคส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเซลลูเลสที่มีการทำงานร่วมกันแบบ synergistic

ขั้นตอน	กลไก
1	native cellulose ⟶ cellulose เร่งปฏิกิริยาโดย endo-β-glucanase
2	Cellulose ⟶ cellobiose เร่งปฏิกิริยาโดย endo-β-glucanase
3	Cellobiose ⟶ 2 glucose เร่งปฏิกิริยาโดย β-glucosidase

การวัดการทำงานของเซลลูเลส

Goksoyr and Eriksen (1980) พบว่าในการวัดความสามารถในการทำงานของเซลลูเลสนั้นมีด้วยกันหลายวิธี แตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์ของงาน ความเหมาะสมและการนำไปใช้ประโยชน์ สำหรับระดับอุตสาหกรรม จะใช้วิธีที่สะดวกและมีข้อผิดพลาดน้อยที่สุด ในการวัดการทำงานของเซลลูเลสแบ่งได้ 2 วิธี คือ

1. Practical assay เป็นการวัดความสามารถในการทำงานของ complex enzyme ซึ่งได้จาก culture filtrate แบ่งเป็น 2 วิธี คือ

1.1 การสลายให้ได้น้ำตาล (saccharolytic method) เป็นการวัดปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง Mandels,(1977) ได้รวบรวมวิธีการวัดน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้ dinitrosalicylic acid reagent (DNS reagent) เป็นสารทดสอบ ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของซับสเตรท ดังนี้

1.1.1 Filter paper assay เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากกระดาษกรองสามารถเตรียมได้ง่าย วิธีการคือ ใช้กระดาษกรองขนาด 1 x 6 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) ใส่ในหลอดทดลองที่มีส่วนผสมของเอนไซม์และบัฟเฟอร์ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำหลอดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร หาปริมาณ reducing sugar เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย

1.1.2 Cotton assay คล้ายกับ Filter paper assay แต่ใช้เส้นใยฝ้าย 50 มิลลิกรัม เป็นซับสเตรท ทำปฏิกิริยากับบัฟเฟอร์และเอนไซม์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติม DNS regent เพื่อหาปริมาณ reducing sugar

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.3 CMC assay เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวัดการทำงานของเซลลูเลส เนื่องจาก CMC เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ดี จึงสะดวกต่อการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ (Miller, 1959) ในการวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะผสม 1% CMC ใน 0.05 citrate buffer pH 4.8 กับเอนไซม์แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม DNS reagent เพื่อหาปริมาณ reducing sugar

1.2 การตรวจสอบโครงสร้างของเซลลูโลสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังเกิดการย่อย

ในกรณีที่การย่อยสลายเซลลูโลสไม่สมบูรณ์หรือไม่เกิดน้ำตาลขึ้น จะตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส วิธีการที่ใช้ คือ การวัดความเหนียวของเส้นใยฝ้ายก่อนและหลังทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในเวลาที่กำหนด ซึ่งต้องใช้เครื่องมือและความละเอียดสูง นอกจากนี้ยังอาจตรวจสอบเส้นใยอิสระที่เกิดจากการย่อยสลายกระดาษกรอง และการหาน้ำหนักของซับสเตรทที่หายไป

การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส อาจทำได้โดยศึกษาการย่อยสลายในอาหารวุ้น Rautela และ Cowling (1966) ได้นำ Walseth cellulose มาผสมในอาหารวุ้น ในหลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร แล้วเพาะเชื้อราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร เป็นเวลา 35 วัน จึงวัดความลึกของส่วนใส ซึ่งพบว่าส่วนใสนี้เกิดจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ของเชื้อรา ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อราและปริมาณความเข้มข้นของอาหาร Hankin และ Anagnostakis (1977) ได้เสนอวิธีการวัดการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้อาหารแข็ง(Solid media) ซึ่งผสม carboxymethycellulose โดยใช้ CMC 0.5% (w/v) ผสมในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย yeast extract 0.1% (w/v) และอาหารวุ้น 1% (w/v) สำหรับอาหารวุ้นมีองค์ประกอบที่มีเกลือฟอสเฟต และมี ammonium sulphate เป็นแหล่งของไนโตรเจน เพาะเลี้ยงเชื้อให้เจริญบนอาหารดังกล่าวพอสมควร วัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี หลังจากนั้นเทสารละลาย hexadecytrimethyl ammonium bromide ซึ่งมีความเข้มข้นลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง เพื่อทำให้เกิดการตกตะกอนของ CMC ที่ถูกย่อยสลาย จากนั้นจึงวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone คำนวณหาอัตราส่วนระหว่างขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

นอกจากวิธีการดังกล่าวแล้ว Teacher และ Wood (1982) ยังได้เสนอวิธีการที่สะดวกต่อการตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี CMC เป็นส่วนประกอบ โดยการใช้สารละลาย congo red ที่มีความเข้มข้น 1 มก./มล. เททับลงบนอาหารที่ต้องการตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายดังกล่าวทิ้งไป เททับด้วย 1 M NaC1 ซึ่งจะทำให้สามารถเห็น clear zone ที่ไม่ติดสีของ congo red ที่เกิดจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์เซลลูเลสได้ชัดเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. Biochemical assay เป็นการวัดความสามารถในการทำงานของ complex cellulose เฉพาะแต่ละองค์ประกอบเท่านั้น ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

2.1 Exoglucanase นิยมใช้ CMC และ hydroxyethyl cellulose เป็นซับสเตรทโดยวัดจากค่าความหนืดที่เปลี่ยนไป ซึ่งมีค่าลดลงเมื่อเวลาของปฏิกิริยาเปลี่ยนไป เป็นวิธีที่ยุ่งยาก จึงใช้วิธีวัดปริมาณ reducing sugar ที่เกิดขึ้นแทน

2.2 Exoglucanase ไม่มีซับสเตรทที่จำเพาะต่อ exoglucanase การวัดความสามารถในการทำงานขององค์ประกอบนี้จึงจำเป็นต้องทำให้ได้ส่วนที่บริสุทธิ์ของ exoglucanase เสียก่อน แล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยากับซับสเตรทซึ่งจะใช้เซลลูโลสที่มีอัตรา polymerization ต่ำ ๆ เช่น อวิเซล และเซลลูโลสที่ผ่านการแช่ด้วยกรดฟอสฟอริค

2.3 β-glucosidase นิยมใช้เซลโลไบโอส และ *p*-nitrophenyl-β-D-glucoside (*p*NPG) เป็นซับสเตรทโดยการวัดปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยเซลโลไบโอส ส่วน *p*NPG เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้ว เติมโซเดียมคาร์บอเนต จากนั้นวัดปริมาณ reducing sugar ที่ปลดปล่อยออกมา

เอนไซม์เซลลูเลสเป็น complex enzyme ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์องค์ประกอบต่าง ๆ ทำหน้าที่ร่วมกันดังที่ได้กล่าวในหัวข้อ 1.2 การที่จะทำให้เกิดการย่อยสลายเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำโดยสมบูรณ์ ต้องอาศัย synergistic action ระหว่งเอนไซม์องค์ประกอบดังกล่าวข้างบนทั้งหมด ในการวัดการทำงานของเอนไซม์องค์ประกอบแต่ละชนิดต้องมีวิธีการที่สลับซับซ้อน เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสที่เตรียมได้ประกอบด้วยเอนไซม์องค์ประกอบต่าง ๆ ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งสภาวะการเจริญ การเก็บเกี่ยวและวิธีการทำ ดังที่ได้กล่าวมาข้างบน นอกจากนี้อัตราและปริมาณการย่อยสลายเซลลูโลสก็ยังแตกต่างกันไปด้วย

สับสเตรทที่นิยมใช้ในการวัดการทำงานของเซลลูเลส คือ carboxymethyl cellulose (CMC) และ hydroxyethlcellulose (HEC) CMC จะถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วแต่ไม่สามารถใช้เป็นสับสเตรทสากลได้ เนื่องจากเอนไซม์ทุกองค์ประกอบในสารละลายเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลสไม่สามารถย่อยสลาย CMC ได้อย่างไรก็ตามสารประกอบเหล่านี้เตรียมได้ยาก จึงได้มีผู้คิดวิธีการวัดการทำงานของเซลลูเลส โดยการใช้สับสเตรทต่าง ๆ กันและมีการกำหนดปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลสแตกต่างกันไปด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 น้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลสจากจุลินทรีย์

ชนิดของจุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (Daltons)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus oryzae	130,000	(Riou et al., 1998)
A. niger CCRC 31494	49,000	(Yan and Lin, 1997)
Cladosporium resinae	98,000	(Oh et al., 1999)
Steptomyces flavogriseus	45,000	(Mackenzie et al., 1984)
Trichoderma reesei	81,600	(Chirio and Brown, 1987)
Bacillus subtilis KSM-635	40,000	(Ozaki et al., 1995)
Bacteroides succinogene S85	43,000	(Shellhorn and Forsberg, 1984)
Clostridium thermocellum	60,000	(Ahsan et al., 1997)

ที่มา : สมภพ (2529)

จากการศึกษาเซลลูเลสที่ได้จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น ข้าวบาร์เลย์ ไส้เดือน ปลวก หอย ทากและจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเซลลูเลสที่สำคัญที่สุด เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ทำให้สะดวกต่อการสกัด สามารถผลิตได้ปริมาณมาก ไม่ต้องใช้พื้นที่และเวลามากเหมือนกับการผลิตโดยใช้พืชและสัตว์ทำให้ต้นทุนในการผลิตต่ำ ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลส (สมภพ, 2529) แสดงไว้ในตารางที่ 6

สำหรับเอนไซม์เซลลุโลสที่ได้จากจุลินทรีย์แต่ละชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลส

แบคทีเรีย	รา
Clostridium thermocellum	*Aspergillus niger*
Pseudomonasfluorescens	*Aspergillus phonicis*
Pseudomonas cellulose	*Myceliophthora thermohola*
Sporotophaga myxococcoides	*Pestalotiopsis versiocolor*
Streptomyces antivioticus	*Trichoderma viride*
Streptomyces flavogrisens	*Trichoderma reesei*

ที่มา : วิภาภัทร (2534)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอคติโนมัยซีสเป็นจุลินทรีย์ดินประเภทหนึ่งซึ่งมีมวลมาก (Atlas และBartha, 1993, อ้างโดย Valois และคณะ (1996) สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด ซึ่งใช้ย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวางภายนอกเซลล์ (Gilbert และคณะ 1995, อ้างโดย Valois และคณะ, 1996) ดังนั้นจุลินทรีย์ประเภทนี้ จึงมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอินทรียวัตถุในดิน นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ชอบเจริญอยู่ในบริเวณรากพืชด้วย ซึ่งลักษณะการอยู่อาศัยในบริเวณรากพืชของเชื้อแอคติโนมัยซีส บาง

ชนิดอาจก่อให้เกิดผลเสียหายในแง่ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชเช่น โรค Pox และScab (Locci, 1994;อ้างโดย Valois และคณะ, 1996) หรือขับสารบางอย่างที่มีฤทธิคล้ายสารกำจัดวัชพืช (Thibodeaee, 1991 อ้างโดย Valois และคณะ; 1996) แต่บางชนิดก็ใช้เป็นประโยชน์ในแง่ของการตรึงไนโตรเจน(Benson และ Silvester, 1993 อ้างโดย Valois และคณะ, 1996) หรือป้องกันรากพืชไม่ให้ถูกทำลาย โดยเชื้อสาเหตุโรคพืช (Weller, 1988 อ้างโดย Valois และคณะ, 1996)

DNA sequence analysis

DNA sequence analysis คือการตรวจหาการเรียงตัวของลำดับเบส เป็นการพิสูจน์ความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยตรง โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้งสี่ชนิดที่เป็นส่วนประกอบของ ดีเอ็นเอ ผลที่ได้จากการทำ DNA sequence สามารถบอกได้ถึงการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเกิด transversion transition silent หรือ selected ของยีน และยังใช้เป็นเครื่องวัดระดับ nucleotide base (Takamatsu, 1998) การใช้เทคนิค DNA sequence analysis ได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) ของเชื้อราหลาย ๆ ชนิดซึ่งเป็นการศึกษา หรือตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอโดยตรง ที่ให้ผลการตรวจสอบ หรือการศึกษาใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด

การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) มีหลายวิธีการด้วยกัน ซึ่งมีความแตกต่างกันในขั้นตอนการหาลำดับเบส ตัวอย่างเช่น ดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ที่ใช้ในการทำ polymerase chain reaction (PCR) การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ก่อนการวิเคราะห์หาลำดับเบส เป็นต้น วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสที่นิยมในปัจจุบันคือ การใช้ PCR product โดยตรงในการวิเคราะห์หาลำดับเบส และการใช้ PCR product ที่ผ่านการ clone เข้าสู่เวคเตอร์ก่อนการวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยทั้งสองวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันกล่าวคือ วิธีการใช้ PCR product โดยตรงในการวิเคราะห์หาลำดับเบสมีข้อดีกว่า วิธีการ clone เข้าสู่เวคเตอร์ คือ ลำดับเบสที่ได้จะไม่เกิดความเสียหายอันเนื่องจากกระบวนการทางเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิต และดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในการวิเคราะห์หาลำดับเบสสามารถเลือกใช้เฉพาะส่วนที่มีลำดับเบสที่ต้องการเท่านั้น ในขณะที่ขั้นตอนการ cloning ต้องใช้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสมากกว่าส่วนที่ต้องการ อย่างไรก็ตามวิธีการ clone มีความจำเป็นในการหา individual alleles หรือส่วนที่แตกต่างกันของยีน ในกลุ่มที่มีตำแหน่งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงกัน (coamplified) (Gyllensten *et al.*, 1992)

สำหรับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิด สามารถค้นหาได้จากเอกสารตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารต่าง ๆ และผ่านทางอินเตอร์เน็ต เนื่องจากในปัจจุบันมีการเก็บรวบรวมข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ และโปรตีน ที่มีรายงานการวิจัยไว้ในศูนย์เก็บข้อมูลซึ่งมีเครือข่ายทางอินเตอร์เน็ต (nucleotide database) โดยข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จะถูกเก็บรวบรวมไว้ในสี่ศูนย์ที่สำคัญ ประกอบด้วย the DNA databank of Japan (DDBJ) the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

European molecular biology laboratory (EMBL) the GenBank และ the genome sequence database (GSDB) ซึ่งทั้งสี่ศูนย์นี้จะมีการเชื่อมโยงข้อมูลเข้าด้วยกัน โดยผู้ที่ทำการศึกษา หรือผู้ที่สนใจเกี่ยวกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ สามารถเข้าไปค้นหาข้อมูลเพื่อใช้เปรียบเทียบ และอ้างอิงได้ นอกจากนี้ยังสามารถส่งข้อมูลไปเก็บไว้ในฐานข้อมูลของศูนย์ได้ (Burks, 1997)

nuclear ribosomal RNA genes (rDNA)

ลำดับเบสของ nuclear rRNA genes (rDNA) ใช้ในการจัดจำแนก และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นส่วนประกอบที่พบโดยทั่วไปในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และมีบทบาทสำคัญในเซลล์ ทำหน้าที่สังเคราะห์ rRNAs โดยตรง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นใน rDNA อาจเป็นผลที่เกิดจากการเกิดการวิวัฒนาการของจีโนมทั้งหมดในสิ่งมีชีวิต (Edel, 1997) กลุ่มของ rDNA พบได้ใน nuclei และ mitochondria ประกอบด้วยตำแหน่งที่เป็น highly conserved และ variable สำหรับ nuclear rRNA genes ของเชื้อรา มีลักษณะที่เป็นหน่วยที่เรียงซ้ำ ๆ ต่อกัน ซึ่งมีหลายร้อยชุดต่อจีโนม ลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ จะพบที่ตำแหน่ง large subunit (LSU) และ small subunit (SSU) ซึ่งในส่วนของ subunits นี้ได้มีการนำไปใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในระดับ orders และ kindoms ในสิ่งมีชีวิตพวก eukaryotes (Van der Auwera *et al.*, 1994 อ้างโดย Duncan *et al.*, 1998) และลำดับเบสส่วนที่เป็นมีความผันแปรคือ ตำแหน่ง spacer region ซึ่งส่วนที่อยู่ระหว่าง subunits จะเรียกว่า internal transcribed spacer (ITS) และที่อยู่ระหว่าง กลุ่มยีน (gene clusters) จะเรียกว่า intergenic spacer (IGS)ซึ่งในส่วน spacers เหล่านี้ใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในระดับ genera และ sub-species ได้ (Cooke and Duncan, 1997 อ้างโดย Duncan *et al.*, 1998)

ปัจจุบันได้มีการใช้ข้อมูลลำดับเบสของ rDNA ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางอนุกรมวิธาน และความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราหลายชนิดเช่น *Neurospora* (Taylor *et al.*, 1991 อ้างโดย Bruns *et al.*, 1991) *Fusarium* (Waalwijk *et al.*, 1996) powdery mildew (Takamatsu *et al.*, 1999) รวมทั้งเชื้อรา *Colletotrichum* (Freeman *et al.*, 2000) โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการเพิ่มปริมาณของ rDNA ตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์หาลำดับเบส และเปรียบเทียบผลที่ได้เพื่อสร้าง Phylogenetic Tree และนอกจากนี้ยังมีการใช้ข้อมูลลำดับเบสในส่วน mitochondrial DNA (mtDNA) ซึ่งพบว่าเป็นตำแหน่งที่มีความผันแปรของลำดับเบสมากกว่าในตำแหน่ง subunits และได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ (Bridge and Arora, 1998) และ/หรือ ระหว่างประชากรภายในสปีชีส์ (Hirata and Takamatsu, 1996; White *et al.*, 1990; Peterson, 1991)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Internal transcribed spacer (ITS)

ITS ประกอบด้วยตำแหน่ง non-coding variable region 2 ตำแหน่ง ซึ่งจะพบอยู่ในหน่วยที่ซ้ำ ๆ กันของ rRNA โดยพบอยู่ระหว่าง highly conserved small subunit rRNA gene, 5.85 subunit rRNA gene และ large subunit rRNA gene จากการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณ ITS สามารถใช้เพื่อในการจัดจำแนก และศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราหลายชนิดเนื่องจาก (Bridge and Arora, 1998) เพราะเหตุผลต่อไปนี้

1. ตำแหน่งของยีนมีขนาดเล็ก (500-800 คู่เบส (bp) และทำการ amplified ได้ง่ายด้วยเทคนิค PCR และสามารถใช้ universal primer เพียงตัวเดียวก็สามารถ amplified ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS และ conserved regions ของ rRNA subunits gene ได้
2. มีอยู่หลายร้อยชุดในเซลล์ทำให้ง่ายในการ amplify โดยที่แม้จะมี DNA sample น้อยก็สามารถศึกษาได้
3. ตำแหน่งยีนของ ITS อาจจะมีความผันแปรที่สูงมาก ระหว่างสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน ทำให้สามารถใช้ในการคาดเดา (estimate) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และ การจัดแบ่งกลุ่มรวมทั้งการศึกษาทาง phylogenetic ได้
4. การสร้าง ITS-probe สามารถทำได้เร็ว โดยไม่จำเป็นต้องมี chromosomal library และนักวิทยาศาสตร์หลายคนเลือกลำดับเบสจาก ITS region เพื่อใช้เป็น probe เพราะลำดับเบสมีหลายชุดที่เหมือนกันในสปีชีส์เดียวกัน และต่างกันในระหว่างสปีชีส์ของเชื้อรา

การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing)โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ

การหาลำดับเบสโดยใช้วิธีเอนไซม์นี้ได้มีการดัดแปลงไปอีกมากมายเพื่อให้สามารถอ่านลำดับเบสได้มากขึ้นในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง เช่น การใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นต่างกันแบบต่อเนื่อง (buffer gradient) ใช้เจลที่มีความเข้มข้นต่างกันแบบต่อเนื่อง (gradient gel) ใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าที่ต่างกันแบบต่อเนื่อง (field strength gradient) ใช้เจลที่มีความหนาบางไม่เท่ากัน (wedge shape gel) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงมาติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสี ซึ่งสามารถจะตรวจสอบผลได้ทันทีโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ อ่านลำดับเบส และบันทึกผลโดยคอมพิวเตอร์มี 2 กลุ่ม ที่นำระบบการหาลำดับเบสอัตโนมัติมาใช้ โดยมีผู้รู้จักอย่างกว้างขวาง และมีเครื่องมือนี้ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการหลายแห่ง

Smith และคณะ (1986) ได้ใช้สีเรืองแสง (fluorescent dye) 4 ชนิด นำมาต่อเข้ากับโมเลกุลของไพรเมอร์ เพื่อแยกไปทำปฏิกิริยาให้มีการหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สมที่เบสจำเพาะแต่ละชนิดในหลอด 4 หลอด แล้วรวมผลที่ได้จากปฏิกิริยาทั้งสี่เข้าด้วยกัน นำไปแยกโดยใช้อิเล็กโทรโฟรีซีส ชิ้นดีเอ็นเอแต่ละชิ้นที่ได้จากปฏิกิริยานั้นมีขนาดไม่เท่ากัน ขึ้นกับว่าจะหยุดการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สังเคราะห์ที่เบสตัวใดในสายนั้น นอกจากนี้ดีเอ็นเอสายที่มีการหยุดสังเคราะห์ที่เบสแต่ละตัวนี้จะมีสีเรืองแสงที่ติดอยู่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อชิ้นดีเอ็นเอสายที่มีขนาดสั้นที่สุดเคลื่อนที่ลงมา เครื่องตรวจจับที่เป็นระบบแสงเลเซอร์จะจับความยาวช่วงคลื่นของสีเรืองแสงแต่ละตัวได้ และจะบันทึกผลที่ออกมาว่าแถบดีเอ็นเอแถบแรกนั้นเป็นแถบที่มีปลายเป็นเบสตัวใด และตรวจจับแถบถัดมาเรื่อย ๆและเก็บข้อมูลไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์ เมื่อจบการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสก็สามารถอ่านข้อมูลของลำดับเบสได้ทันทีโดยไม่ต้องทำออโตเรดิโอกราฟ

กลุ่มนักวิจัยอีกกลุ่มหนึ่งนำโดย Prober และคณะ (1987) ได้พัฒนาวิธีการหาลำดับเบส โดยใช้เครื่องนั้ให้ทำได้ง่ายขึ้น โดยใช้สีเรืองแสง 4 ชนิดที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน เป็นสีในกลุ่ม succinylfluorescein สีทั้งสี่ชนิดต่างกันเพียงหมู่เมธิลหรือไฮโดรเจนเท่านั้น ทำให้ขนาดและการเคลื่อนที่ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสไม่แตกต่างกัน ใช้สีแต่ละตัวต่อเข้ากับไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์แต่ละตัว แล้วจึงทำปฏิกิริยาให้มีการหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยสุ่ม โดยใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ และไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ทั้งสี่ชนิดลงไปในหลอดเดียวกัน ให้มีการหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยสุ่ม โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ไม่ต้องแยกปฏิกิริยาเป็น 4 หลอดเหมือนที่ผ่านมา เนื่องจากไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดต่ออยู่กับสีเรืองแสงที่ต่างกันอยู่แล้ว เมื่อจบปฏิกิริยาแล้วจึงนำไปทำอิเล็กโทรโพรีซีส และตรวจจับคลื่นแสงที่เปล่งออกมาโดยสีแต่ละชนิดด้วยระบบเลเซอร์ บันทึกข้อมูลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม GENETYX-MAC (Software Development) ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างที่แยกได้ และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลจาก the DNA databank of Japan (DDBJ) ด้วยโปรแกรม Clustal V (Higgins *et al.*, 1992) จากนั้นทำการสร้าง phylogenetic tree โดยอาศัยโปรแกรม PAUP version 4.0 (D. Swofford, Smithsonian Institution, Washington D.C.) ซึ่งการวิเคราะห์หา tree จะใช้หลักการของ Distance method โดยวิธีการ neighbor-joining และหาค่าความเชื่อมั่นโดยคำนวณค่า bootstrap จากการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง หลังจากนั้นทำการคำนวณค่า distance codfficient โดยใช้โปรแกรม PAUP version 3.1 เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ภายในตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved