บทความวิชาการ

เซลลูโลโซม: กุญแจสำคัญสู่การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ

ชมภูนุช วิรุณานนท์[1,2] และ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล[1,2*]

บทคัดย่อ

การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพในปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธี การหมักเพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพถือเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจเนื่องมาจากเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม กระบวนการหมักโดยมีชีวมวลเป็นสารตั้งต้นนั้นจำเป็นต้องอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวภาพมาช่วยในการเร่งปฏิกิริยาเพื่อย่อยสารประกอบประเภทเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน สารประกอบเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตเชื้อเพลิง ดังนั้น ตัวเร่งปฏิกิริยาจึงเป็นปัจจัยสำคัญยิ่งที่จะทำให้การผลิตดำเนินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในบทความนี้กล่าวถึงการนำเซลลูโลโซมซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพมาประยุกต์ใช้ด้านพลังงาน โดยจะกล่าวถึงความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเซลลูโลโซม จุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูโลโซมและสามารถใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพได้ในเวลาเดียวกัน ซึ่งเป็นที่รู้จักในวงการอุตสาหกรรมมาช้านานกว่าร้อยปีในชื่อสกุล *Clostridium* รวมถึงหัวข้อยีนที่เกี่ยวข้องและการเพิ่มประสิทธิภาพเซลลูโลโซม โดยสังเขปเพื่อที่ผู้อ่านจะสามารถติดตามศึกษาค้นคว้าได้ต่อไป

คำสำคัญ: เซลลูโลโซม เชื้อเพลิงชีวภาพ *Clostridium*

[1] ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[2] หน่วยวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: warawut.c@chula.ac.th

Cellulosome: An Important Key to Biofuel Production

Chompunuch Virunanon[1,2] and Warawut Chulalaksananukul[1,2*]

ABSTRACT

Biofuel production currently can be performed in many ways. Fermentation for biofuel production is one of the interested processes since it is environmental friendly-process. Fermentation of biomass substrates needs chemical catalyst or biocatalyst to catalyze reaction of cellulose, hemicelluloses and lignin degradation. These compounds will be changed to be monosaccharide before pass to fuel production process. Therefore, catalyst is a critical important factor to let the efficient of production process. In this article, cellulosome which is a biocatalyst is discussed in fuel application point view. The basic knowledge about cellulosome, cellulosome producing bacteria which can be use to produce biofuel in parallel is discussed. This bacterium is a well-known for a long time more than a hundred years in genus of *Clostridium.* The topic includes related gene and cellulosome efficiency promotion by brief for readers to follow all documents in future.

Keywords: cellulosome, biofuel production, *Clostridium*

[1]Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University

[2]Biofuel Production by Biocatalyst Research Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University

*Corresponding author, e-mail:warawut.c@chula.ac.th

บทนำ

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีการนำมาใช้ในงานอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง พบได้ในพืช สัตว์ และจุลชีพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในราและแบคทีเรีย [1] แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสมีหลายสปีชีส์ ทั้งชนิดที่เติบโตในภาวะที่มีออกซิเจนและภาวะไร้ออกซิเจน หนึ่งในกลุ่มแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจมากที่สุดในกระบวนการอุตสาหกรรมได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกในสกุล *Clostridium*

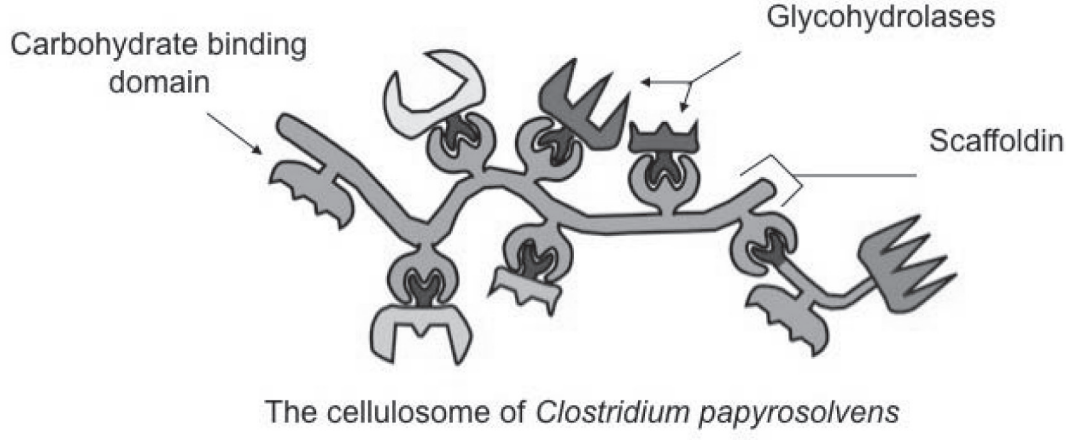
แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างท่อน (rods) สามารถเจริญได้ดีในภาวะที่ไร้ออกซิเจน (strictly anaerobe) หรือเป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจ แต่ออกซิเจนก็ไม่ทำให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้ตาย (aerotolerant) บางสปีชีส์เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสิ่งมีชีวิต (pathogenic) โดยการผลิตสารพิษ (toxin) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แบคทีเรียมีการสร้างสปอร์ การเจริญของสปอร์ *Clostridium* สามารถถูกยับยั้งได้โดยแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น แบคทีเรียแลกติก [2] ส่วนกลุ่มที่เป็น non-pathogenic สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ บางสปีชีส์มีความสามารถในการหมักเพื่อให้เกิดตัวทำละลายในกระบวนการอุตสาหกรรมได้หลายชนิด เช่น อะซิโทน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งมนุษย์มีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นเวลาช้านาน กระบวนการหมักอะซิโทน บิวทานอล และเอทานอล (Acetone, Butanol and Ethanol fermentation; ABE fermentation) มีประวัติมาช้านาน ตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1914 เมื่อ Weizmann สามารถคัดแยกเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ได้สำเร็จและนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอะซิโทนเพื่อผลิตดินปืนในสงคราม ทำให้โรงงานหมัก ABE เกิดขึ้นอย่างแพร่หลายทั่วยุโรป และแม้ว่าสงครามโลกครั้งที่ 1 จะยุติไป แต่การทำวิจัยในกระบวนการหมัก ABE ก็ยังคงดำเนินต่อไป เนื่องจากความต้องการใช้ตัวทำละลายประเภทเอทานอลและบิวทานอลก็ยังคงมีอยู่ในอุตสาหกรรมประเภทสีและเคมีภัณฑ์ ตัวอย่างของสปีชีส์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมสำหรับแบคทีเรียสกุลนี้ได้แก่ *C. acetobutylicum, C. beijerinckii, C. butyricum, C. amylolyticum* เป็นต้น สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลายคือ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่มีการพัฒนาสายพันธุ์แล้วจะมีอัตราส่วนในการผลิต acetone: butanol: ethanol เท่ากับ 3: 6: 1 [3]

กระบวนการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายในอุตสาหกรรมเหล่านี้ มักจะใช้น้ำตาลเป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิต น้ำตาลที่ถูกนำมาใช้โดยจุลินทรีย์ในสกุลนี้นั้น สามารถเป็นได้ทั้งน้ำตาล C-5 เช่น น้ำตาลเพนโทส และน้ำตาล C-6 เช่น น้ำตาลกลูโคสได้ แต่อย่างไรก็ตาม ต้นทุนในการผลิตตัวทำละลายโดยแบคทีเรียสกุล *Clostridium* ซึ่งมีน้ำตาลโมโนเมอร์เป็นสารตั้งต้นในการหมักนั้นพบว่า มีราคาแพง ไม่คุ้มค่าต่อกระบวนการ ทางเลือกที่ดีเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวคือ ต้นทุนในการผลิตจะต้องน้อยกว่าเดิมอย่างน้อยถึงสิบเท่า จึงจะสามารถทำโดยมีจุดคุ้มทุนได้ ดังนั้นการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกกว่าได้นั้น จึงเป็นงานที่นักวิจัยให้ความสนใจเสมอ แหล่งคาร์บอนหนึ่งที่สามารถหาได้ง่ายและมีราคาถูกนั้นก็คือ สารประกอบประเภทเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเซลล์พืชรวมถึงชีวมวลมากกว่าร้อยละ 50 [4] ดังนั้น แบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้ชีวมวลเป็นแหล่งอาหาร เพื่อการเจริญและผลิตตัวทำละลายในปริมาณสูงได้จึงมีศักยภาพที่จะแข่งขันกับราคาต้นทุนในกระบวนการได้

แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* ในบางสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้สารประกอบประเภทเซลลูโลส ไซโลส รวมถึงพอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเซลล์ได้ [5] โดยแบคทีเรียซึ่งสามารถใช้เซลลูโลสมาเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นจะมีเอนไซม์ในกลุ่มของเอนไซม์ประเภทเซลลูเลสเพื่อการย่อย

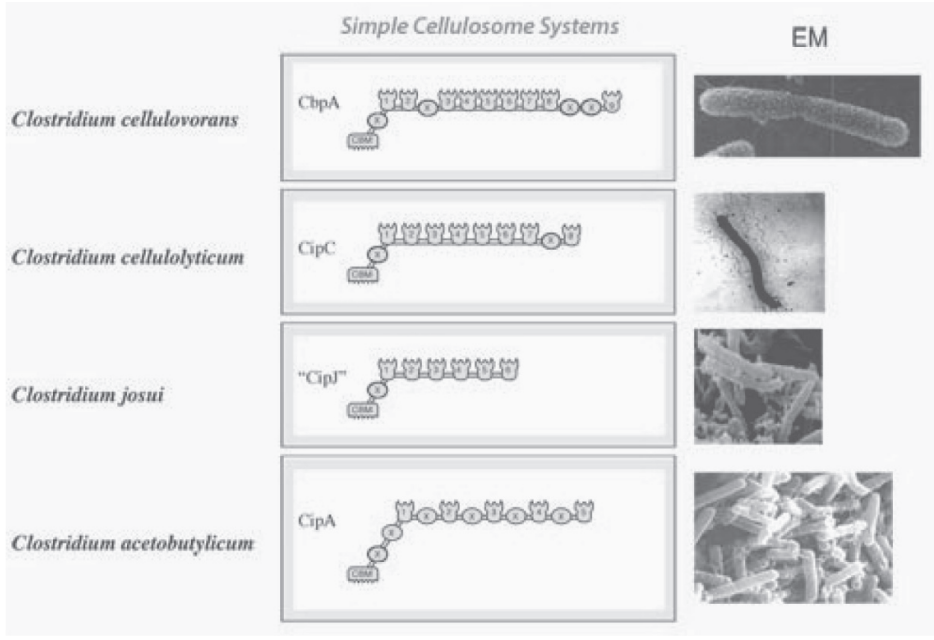
สลายแหล่งคาร์บอนดังกล่าว แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* จะมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในรูปของเอนไซม์คอมเพล็กซ์ เรียกว่า เซลลูโลโซม (cellulosome) (รูปที่ 1) องค์ประกอบของเซลลูโลโซมโดยหลักแล้ว ประกอบด้วย

i) โปรตีนสแคฟโฟล (scaffolding protein, scaffoldin)
ii) หน่วยยึดเกาะคาร์โบไฮเดรตแบบจำเพาะ (carbohydrate binding domain, CBD/CBM)
iii) เอนไซม์ไกลโคไฮโดรเลส (glycohydrolase, GH)



รูปที่ 1 เซลลูโลโซมของ *Clostridium papyrosolvens* [6]

องค์ประกอบของเซลลูโลโซม โดยทั่วไปมีองค์ประกอบหลักสามส่วนดังกล่าว โปรตีนสแคฟโฟลเป็นส่วนที่เป็นโปรตีนยูนิตซึ่งไม่ได้มีแอคทิวิทีต่อเซลลูโลส แต่เกี่ยวข้องกับการยึดเหนี่ยวโครงสร้างของเซลลูโลโซม โดยมีหน่วยยึดเกาะคาร์โบไฮเดรตแบบจำเพาะและเอนไซม์ไกลโคไฮโดรเลสประกอบเข้ากับส่วนของโปรตีนสแคฟโฟล ในขณะที่อีกด้านหนึ่งประกอบด้วยหน่วย surface layer homology (SLH) ซึ่งมักยึดกับโปรตีนบนผิวเซลล์ ส่วนที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของเซลลูโลโซมมากที่สุด คือ เอนไซม์ไกลโค-ไฮโดรเลส โดยปกติแล้วเอนไซม์นี้เมื่ออยู่ในรูปของเซลลูเลสอิสระจะประกอบด้วยสองส่วนคือ catalytic domain และ cellulose binding module (CBM) แต่เมื่ออยู่ในรูปของเอนไซม์คอมเพล็กซ์ เช่น เซลลูโลโซมแล้ว เซลลูเลสจะประกอบด้วย catalytic domain และหน่วยที่เรียกว่าดอกเคอริน (dockerin) การยึดเกาะระหว่างโปรตีนสแคฟโฟลและเอนไซม์ไกลโคไฮโดรเลสจะเกิดขึ้นอย่างเฉพาะเจาะจง โดยหน่วยย่อยดอกเคอริน (dockerin domain) ซึ่งอยู่บนเอนไซม์ไกลโคไฮโดรเลสยึดจับกับหน่วยโคฮีซิน (cohesin) ซึ่งอยู่บนโปรตีนสแคฟโฟล การยึดระหว่างโปรตีนสแคฟโฟลและเอนไซม์ไกลโคไฮโดรเลสนี้จะเป็นการยึดเกาะที่เฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรียแต่ละสปีชีส์ ส่งผลให้เซลลูโลโซมในแบคทีเรียแต่ละสปีชีส์มีโครงสร้างที่เฉพาะเจาะจงแตกต่างกันไป (รูปที่ 2)



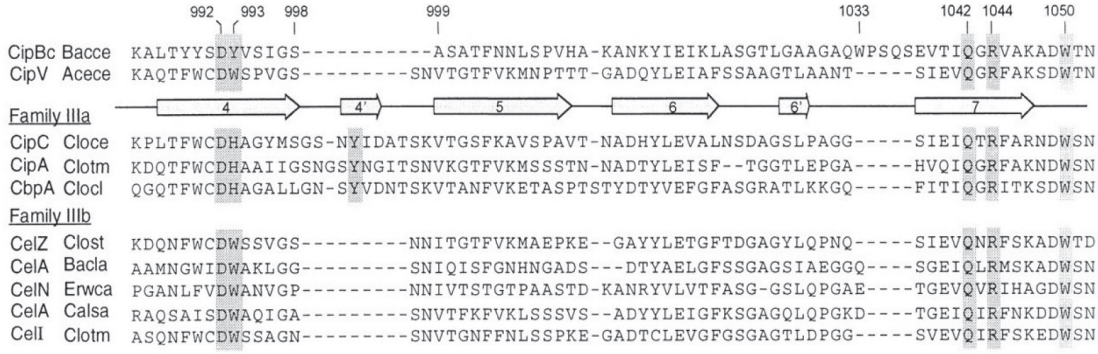
รูปที่ 2 การประกอบตัวของเซลลูโลโซมใน *Clostridium* sp. ที่แตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ โปรตีนสแคฟโฟล (Cip/Cbp protein) ในแต่ละสปีชีส์มีชื่อเรียกต่างกันไป [7]

เซลลูโลโซมในแบคทีเรียสกุล *Clostridium*

เซลลูโลโซม หมายถึง เอนไซม์คอมเพล็กซ์ขนาดใหญ่ที่มีการส่งออกภายนอกเซลล์ซึ่งมีความสามารถที่จะย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและเพคติน เอนไซม์คอมเพล็กซ์เหล่านี้สามารถสร้างได้โดยแบคทีเรียในสกุล *Clostridium, Acetovibrio, Bacteroides* [8] และ *Ruminococcus* [9] แบคทีเรียเหล่านี้สามารถคัดแยกได้จากธรรมชาติ ทั้งในแหล่งน้ำเสีย กระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง [10] ดิน [11] เลนก้นทะเลสาบ [12] ซากย่อยสลาย ม้วนกระดาษ ชานอ้อยและรากของพืชบางชนิด [13] บางชนิดสามารถคัดแยกได้จากแหล่งที่มีสภาวะแวดล้อมรุนแรง เช่น น้ำพุร้อน ก้นทะเล แบคทีเรียจากแหล่งเหล่านี้เองที่สามารถนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีเอนไซม์ที่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมเหล่านั้น เช่น เอนไซม์เซลลูเลสทนร้อนที่สร้างจาก *C. thermocellum* เป็นต้น โดยแบคทีเรียในสกุล *Clostridium* ที่รู้จักกันว่าเป็นแบคทีเรียที่ใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน (true cellulosic organism) ได้แก่ *C. cellulolyticum, C. cellulovorans, C. josui, C. papyrosolvens* และ C. *thermocellum* [14]

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลลูโลโซมใน *Clostridium*

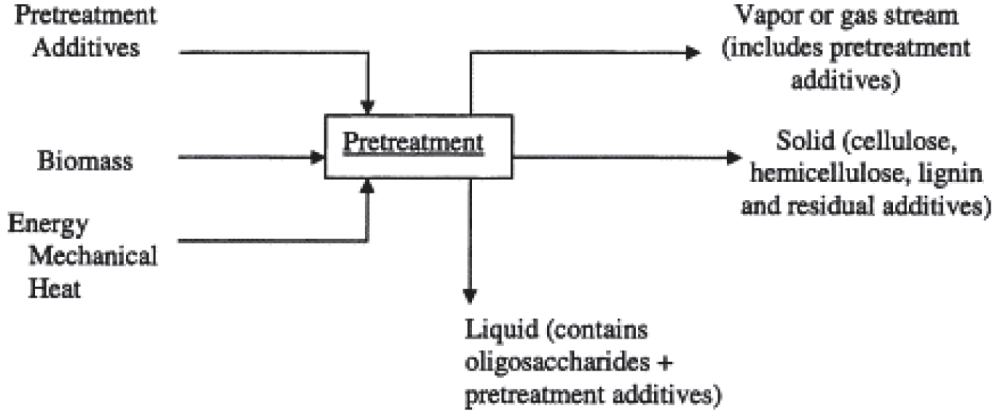
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูโลโซมนั้นมักจะพบว่าอยู่เป็นคลัสเตอร์ (cluster) ขนาดใหญ่ในจีโนม โดยมากลำดับการจัดเรียงตัวจะมีความแตกต่างกันเล็กน้อยในแต่ละสปีชีส์ ชื่อของยีนแต่ละตัวนั้นเป็นยีนในตระกูลเซลลูเลสและไกลโคไฮโดรเลส โดยแต่ละสปีชีส์ยีนแต่ละยีนอาจทำหน้าที่เดียวกันแต่มีชื่อที่แตกต่างเป็นโฮโมโลกัสกัน เช่น ในกรณีของ *C. cellulolyticum* จะมีการจัดเรียงตัวเป็น *cipC-celF-**celC**-celG-celE-celH-celJ-celK* ในขณะที่ *C. cellulovorans* มีการจัดเรียงเป็น *cbpA-exgS-**engH**-engK-hbpA-engL-manA-engM-engN* เป็นต้น โดยที่ทั้ง *celC* ของ *C. cellulolyticum* และ *engH* ใน *C. cellulovorans* ต่างก็ประกอบด้วยลำดับของยีนที่แปลรหัสให้โปรตีนที่เป็น catalytic domain ของไกลโคซิลไฮโดรเลสในแฟมิลี 9 (GH9) เช่นเดียวกัน ทั้งนี้ยังมีองค์ประกอบอื่นที่แสดงให้เห็นว่าลำดับของนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนในเซลลูโลโซมในสิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์มีข้อแตกต่างกันมากบ้างน้อยบ้างตามธรรมชาติ (รูปที่ 3) ซึ่งข้อแตกต่างแม้เพียงเล็กน้อยเหล่านี้ ส่งผลให้แอคทิวิทีของเซลลูโลโซมในสิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์แตกต่างกันเป็นอย่างมาก โดยอาจส่งผลต่อแอคทิวิทีโดยตรง หรืออาจส่งผลต่อแรงยึดเกาะระหว่างหน่วยในการประกอบตัวของเซลลูโลโซม



รูปที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนใน cellulose binding domain (CBD) ในตระกูล III ของสแคฟโฟลดินในแต่ละสปีชีส์ จุดที่แรเงาแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนซึ่งเกี่ยวข้องกับการจับกับเซลลูโลส CipBc Bacce หมายถึง สแคฟโฟลดิน CipBc ของ *Bacteroides cellulosolvens;* CipV Acece หมายถึง สแคฟโฟลดิน CipV ของ *Acetovibrio cellulolyticus;* CipC Cloce หมายถึง สแคฟโฟลดิน CipC ของ *C. cellulolyticum;* CipA Clotm หมายถึง สแคฟโฟลดิน CipA ของ *C. thermocellum;* CelZ Clost หมายถึง เซลลูเลส CelZ ของ *C. stercorarium;* CelA Bacla หมายถึง เซลลูเลส CelA ของ *Bacillus lautus;* CelN Erwca หมายถึง เซลลูเลส CelZ ของ *Erwinia carotovora;* CelA Calsa หมายถึง เซลลูเลส CelA ของ *Caldocellum saccharolyticum;* CelI Clotm หมายถึง เซลลูเลส CelI ของ *C. thermocellum* [8]

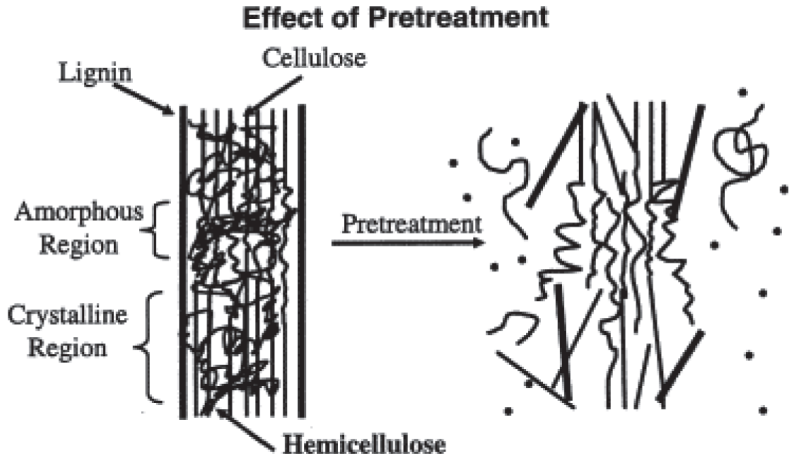
การนำแบคทีเรียที่สร้างเซลลูโลโซมไปใช้ในทางอุตสาหกรรม

เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์อื่นในตระกูลเซลลูเลสมีบทบาทเป็นอย่างมากในกระบวนการทางอุตสาหกรรมและทางการแพทย์ มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เช่น ในกระบวนการกำจัดลิกนินในโรงงานกระดาษ (delignification) ในโรงงานผลิตยา อุตสาหกรรมน้ำผลไม้ ตัวอย่างของเอนไซม์ในตระกูลนี้ที่ใช้กันแพร่หลาย เช่น เพคติเนส ช่วยย่อยเนื้อผลไม้ในโรงงานอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ปรุงแต่ง เอนไซม์ไซลาเนสในอุตสาหกรรมขนมปังและการผลิตไซลิทอล [15] และตัวอย่างอื่นๆ ทั้งในด้านพลังงานและทางด้านการเกษตร ตัวอย่างที่ชัดเจนที่สุดคือ ด้านพลังงาน ได้แก่ การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพโดยอาศัยการใช้ชีวมวล ในระบบนี้วิธีที่เป็นวิธีดั้งเดิมที่ทำกันมาช้านานแล้ว ได้แก่ การย่อยสลายชีวมวลด้วยกรด [16] เบสจุลินทรีย์ หรือเอนไซม์ก่อนที่จะนำน้ำตาลหรือน้ำเชื่อมจากการย่อยมาเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น เอทานอลที่ผลิตจากเซลล์ยีสต์ การผลิตก๊าซมีเทนจาก *Methanosarcina* spp. [17, 18] เป็นต้น ล้วนแต่มีหลักการเบื้องต้นที่คล้ายคลึงกัน คือ ขั้นตอนการย่อยชีวมวลด้วยสารเคมี ความร้อน หรือเอนไซม์ (pretreatment) (รูปที่ 4) แล้วจึงมาถึงขั้นตอนการหมัก (fermentation) ขั้นตอนการแยกผลิตภัณฑ์ (separation) และการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ (purification) ซึ่งในทางปฏิบัติแล้วขั้นตอนแรกเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด เนื่องจากจะกำหนดปัจจัยและความเร็วของการเกิดกระบวนการทั้งหมด โดยปกติแล้ว ขั้นตอนนี้ต้องใช้สารเคมีที่ปฏิกิริยามีความรุนแรงและใช้พลังงานสูง ซึ่งทำให้เกิดทั้งมลภาวะและเป็นการสิ้นเปลืองพลังงาน ดังนั้น การทำปฏิกิริยาที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมจึงจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี กรด เบส และความร้อน ดังนั้น เอนไซม์เซลลูเลสในทางการค้าจึงถูกพัฒนาและผลิตขึ้นเพื่อประโยชน์ในข้อนี้และมีชื่อเรียกหลากหลาย เช่น Celluclase, Novozyme เป็นต้น



รูปที่ 4 ขั้นตอนการย่อย (pretreatment) ของชีวมวล [19]

ชีวมวลที่นำมาใช้ในกระบวนการดังกล่าวนั้นมีหลากหลายและมีการศึกษาแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของผลผลิตทางการเกษตรหลักในแต่ละพื้นที่ เช่น ในสหรัฐอเมริกามีการวิจัยข้าวโพด [16, 20, 21] ในอเมริกาใต้มีการใช้อ้อยและชานอ้อย [22-24] ผลของการทำ pretreatment ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการทางเคมีหรือชีวภาพโดยใช้ชีวมวลเป็นสารตั้งต้น จะทำให้พันธะต่างๆ ของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมีการแตกตัวมากขึ้น ดังรูปที่ 5 และได้น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) หรือเดี่ยว (monosaccharide) ออกมาได้ด้วยบางส่วน ซึ่งปริมาณน้ำตาลที่ได้นั้นจะมากน้อยแตกต่างกันไปตามกระบวนการและประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่นำมาใช้



รูปที่ 5 แสดงผลของการพรีทรีทเมนต์ชีวมวลด้วยเซลลูเลส [27]

การนำเซลลูโลโซมหรือจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ตระกูลเซลลูเลสและเซลลูโลโซมมาใช้ในอุตสาหกรรมมีข้อดีคือ เอนไซม์มีความเสถียรมากกว่าในรูปแบบเดี่ยวหรือแบบอิสระ (free enzyme) อีกประการหนึ่งคือ เซลลูโลโซมจะมีการทำงานแบบร่วมกันของเอนไซม์ (synergistic action) แต่ละเอนไซม์สามารถเข้าร่วมกันทำงานกันได้ เนื่องจากโดยธรรมชาติแล้ว ส่วนที่เป็นชีวมวลของพืชนั้น ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมีลักษณะเป็นเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide) มากกว่าโฮโมโพลีแซคคาไรด์ [25] ดังนั้น เอนไซม์ที่จะมาย่อยนั้นไม่ควรเป็นเอนไซม์ในรูปอิสระที่ตัดได้แต่เพียงพันธะ β-1,4-glucosidic เท่านั้น แต่ควรอาศัยการทำงานร่วมกันของไกลโคไฮโดรไลติกเอนไซม์หลายๆ ชนิด

การนำเซลลูโลโซมไปใช้เป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมมีตัวอย่างหลากหลาย เช่น ดัดแปลงสำหรับทำ affinity tag ซึ่งเป็นเทคนิคที่เชื่อมต่อชิ้นส่วนยีนที่มีคุณสมบัติยึดเกาะกับสารดูดซับแบบจำเพาะเข้ากับยีนของโปรตีนเป้าหมาย ในกระบวนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ (protein purification) และใช้สำหรับเป็นวิธีการตรึงเอนไซม์โดยไม่ใช้สารเคมี (non-chemical method of immobilization) บนเซลลูโลส [26] โดยเฉพาะการศึกษาใน *C. thermocellum* โดยอาศัยความสามารถในการจดจำที่เฉพาะเจาะจงกันใน cohesin-dockerin [27, 28] จากความรู้ดังกล่าว ทำให้มีการนำมาประยุกต์ใช้ตามมา Craig และคณะ

(2006) [27] ได้พัฒนาระบบ affinity tag สำหรับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ cohesin-dockerin interaction จาก *C. thermocellum* มีรายงานการนำ cellulosomic affinity domain ไปใช้ในการตรึง micro-particle และ nano-particle [29] และมีการนำอนุภาคของเซลลูโลสเลือบด้วยเปปไทด์ที่ติดฉลาก CBM (CBM-tagged peptides) ใช้สำหรับการวิเคราะห์ในทางภูมิคุ้มกันวิทยา [30] นอกจากนี้ มีรายงานการนำ *Clostridium* จากแหล่งธรรมชาติซึ่งสามารถคัดแยกได้จากแหล่งในประเทศไทย [31] ที่ผลิตเซลลูโลโซมมาประยุกต์ใช้กับการผลิตพลังงานชีวภาพโดยมีสารตั้งต้นเป็นน้ำเสียจากกระบวนการอุตสาหกรรม เช่น น้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลังและของเสียจากโรงงานสับปะรด [32, 33] ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ทางด้านพลังงานทดแทนและการกำจัดของเสียไปในเวลาเดียวกัน

เชื้อเพลิงชีวภาพและเซลลูโลโซม

เชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) หมายถึง เชื้อเพลิงที่ได้จากชีวมวล ซึ่งเป็นวัสดุหรือสารอินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นพลังงานได้ [34] หรือผลิตผลจากการสร้างและสลายของสิ่งมีชีวิต (metabolic by products) เช่น นำมูลวัวมาหมักผลิตพลังงานทดแทน (renewable energy) เช่น แก๊สมีเทน (CH_4) ซึ่งมีความแตกต่างจากพลังงานจากแหล่งธรรมชาติประเภทปิโตรเลียม ถ่านหิน และพลังงานนิวเคลียร์ ข้อแตกต่างจากเชื้อเพลิงประเภทปิโตรเลียมที่สำคัญ คือ เชื้อเพลิงชีวภาพเป็นพลังงานหมุนเวียนที่สามารถสร้างขึ้นหรือหมุนเวียนใหม่ได้โดยไม่ต้องอาศัยระยะเวลาที่ยาวนานเช่นปิโตรเลียม ตราบเท่าที่ระบบนิเวศของพืชยังมีความสมดุล กล่าวคือ ไม่ถูกทำลายไปรวดเร็วจนพืชที่มาจากการปลูกทดแทนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ทัน ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้เป็นหลายประเภท คือ ประเภทของแข็ง เช่น ถ่านไม้ ประเภทของเหลว ได้แก่ แอลกอฮอล์และน้ำมันชีวภาพ ประเภทแก๊ส เช่น มีเทน ไฮโดรเจน ซึ่งจากการที่เชื้อเพลิงชีวภาพมีสถานะหลายประเภท ทั้งของแข็ง ของเหลว และแก๊สนั้น ทำให้มีข้อดี คือ สะดวกต่อการนำไปใช้งานตามวัตถุประสงค์ได้หลากหลาย และยังไม่ก่อให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นในระบบนิเวศ เป็นการรักษาสภาพแวดล้อมอีกทางหนึ่ง

ปัจจุบันเชื้อเพลิงชีวภาพได้รับความสนใจจากนักวิจัยและบุคคลทั่วไปมาก เนื่องมาจากการบริโภคพลังงานเชื้อเพลิงในตลาดโลกซึ่งมีความผันผวนและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น [35] ปัญหาอุณหภูมิของโลกที่เพิ่มขึ้น เนื่องมาจากปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ล้วนเป็นประเด็นนำไปสู่การวิจัยเพื่อพลังงานทดแทนทั้งสิ้น กระบวนการหนึ่งที่ได้รับความสนใจก็คือการหมักชีวมวลเพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพซึ่งในขั้นตอนการpretreatment ต้องอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งทำได้ทั้งทางเคมีและชีวภาพ ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีสามารถให้ผลผลิตได้อย่างรวดเร็ว เหมาะกับอุตสาหกรรม แต่ก็สร้างปัญหามลภาวะทางเคมีซึ่งต้องบำบัดตามมาซึ่งถือเป็นค่าใช้จ่าย (cost) ของกระบวนการเกิดขึ้น ในขณะที่กระบวนการหมักด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพต้องอาศัยเวลา แต่การกำจัดของเสียหลังสิ้นสุดกระบวนการสามารถทำได้ง่าย เช่น การนำกากที่เหลือจากการหมักแก๊สชีวภาพด้วยน้ำแป้งไปทำเป็นอาหารสัตว์ได้ ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีอยู่สองรูปแบบ คือ เอนไซม์ และแบบใช้เซลล์ (whole cells) [36]

เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญยิ่งสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากชีวมวล เนื่องมาจากชีวมวลมีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และโปรตีน ตามลำดับ [37] ปกติเซลลูเลสที่พบในจุลชีพมีสองรูปแบบคือ แบบอิสระ (free enzyme) และแบบเชิงซ้อน (complex)

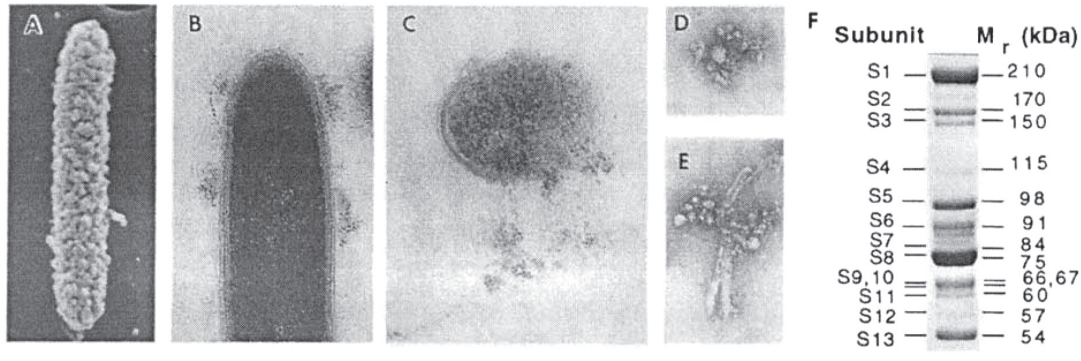
ในแบบเชิงซ้อนนั้นเอนไซม์จะมีลักษณะการประกอบเป็นเซลลูโลโซม เซลลูโลโซมของแบคทีเรียจะมีความสามารถย่อยเซลลูโลโลสคริสตัลลีน (crystalline cellulose) ให้ผลิตภัณฑ์สองแบบคือ เซลโลไบโอส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ของกลูโคส และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส การประยุกต์ใช้เซลลูโลโซมในด้านการผลิตเชื้อเพลิงจากชีวมวลมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เอนไซม์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งหลายประการดังนี้

1. เซลลูโลโซมเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าถึงแหล่งอาหารของเซลล์ได้มากกว่า เนื่องจากแหล่งอาหารพวกเซลลูโลสสามารถอยู่ใกล้กับเซลล์ได้ในสภาวะที่มีเซลลูโลโซมเข้าจับให้ติดกับผิวเซลล์ (รูปที่ 6) ในขณะที่เซลลูโลโซมอีกส่วนสามารถปล่อยออกจากเซลล์ได้ กระจายเข้าสู่เซลลูโลสอย่างอิสระ การที่เซลลูโลสถูกยึดติดกับผิวเซลล์ช่วยเพิ่มโอกาสในการนำน้ำตาลกระบวนการย่อยเข้าสู่เซลล์ง่ายขึ้น

2. เซลลูโลโซมมีแอคทิวิทีสูงแต่ผลิตในปริมาณต่ำ ในขณะที่เซลลูเลสที่เป็นแบบอิสระจะมีแอคทิวิทีต่ำกว่าเซลลูโลโซม แต่ผลิตได้ในปริมาณสูง

3. เซลลูโลโซมมีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบในเซลล์พืชได้หลากหลายมากกว่าเนื่องจากเป็นการทำงานร่วมกัน (synergistic action) ระหว่างกลุ่มของเอนไซม์มากกว่าการใช้เอนไซม์เดี่ยวๆ

4. เซลลูโลโซมมีหน่วยยึดเกาะ substrate ซึ่งเป็นเซลลูโลสโดยเฉพาะที่เรียกว่า cellulose binding-domain (CBD) ทำให้การเข้าจับกับ substrate เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 6 A) แสดงภาพที่ถ่ายโดย scanning electron micrograph (SEM) ของเซลล์แบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่มี protubozyme ติดที่ผิวเซลล์ ที่กำลังขยาย x20,000

B) transmission electron micrograph (TEM) ของเซลล์ที่ติดฉลากด้วยแอนทิเซลลูโลโซมที่กำลังขยาย x50,000

C) TEM ของเซลล์แบคทีเรียติดฉลากที่เข้าจับกับเซลลูโลส แสดงให้เห็น protubozyme ที่เชื่อมระหว่างเซลล์กับเซลลูโลส ที่กำลังขยาย x50,000

D) ภาพแสดงเซลลูโลโซมที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ที่กำลังขยาย x220,000

E) เซลลูโลโซมที่จับกับเซลลูโลส ที่กำลังขยาย x220,000

F) หน่วยย่อยของเซลลูโลโซมที่แสดงด้วย sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [38]

การเพิ่มประสิทธิภาพของเซลลูโลโซม

การเพิ่มประสิทธิภาพของเซลลูโลโซมสามารถทำได้หลายวิธี วิธีการที่สามารถทำได้มีทั้งแบบการทำ *in vitro* construction และ *in vivo* construction [4] ในส่วนของวิธี *in vitro* construction สามารถทำได้คือ การออกแบบ mini-cellulosome [39,40,41] ซึ่งการออกแบบ mini-cellulosome เหล่านี้มีพื้นฐานเบื้องต้นมาจากการศึกษาการทำงานร่วมกันระหว่าง scaffoldin, dockerin, cohesin และ catalytic domain จากการศึกษาพบว่า ส่วนสำคัญที่สุดต่อแอคทิวิทีจำเพาะได้แก่ส่วนที่เรียกว่า catalytic domain ซึ่งเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยเซลลูโลส อีกส่วนหนึ่งที่มีความสำคัญไม่ยิ่งหย่อนไปกว่ากันคือส่วน CBD (cellulose binding domain) พบว่า mini-cellulosome ที่ประกอบ CBD เข้าไปร่วมด้วยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด มากกว่า mini-cellulosome ที่ไม่มี CBD [5] ส่วนวิธี *in vivo* construction เป็นความพยายามที่จะโคลนยีนที่สร้างเซลลูโลโซมเข้าไปในสิ่งมีชีวิตที่มีการสร้างผลผลิตที่น่าสนใจและมีมูลค่า เช่น เอทานอล หรือกรดอะมิโน โดยมีเป้าหมายของการใช้เซลลูโลสหรือชีวมวลเป็นสารตั้งต้น ซึ่งประหยัดกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาก่อนหน้าของ Sabathé และ Soucai lle (2002) [42] ซึ่งพยายามโคลนยีนที่สร้างเซลลูโลโซม (ขนาด 85.9 kDa) เข้าใน *C. acetobutylicum* ซึ่งตามธรรมชาติสร้างเซลลูโลโซมขนาด 665 kDa แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส พบว่า หลังจากการโคลนแบคทีเรียมีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนขึ้น แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นยังไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสคริสตัลลีนได้ Mingardon และคณะ (2005) [43] ศึกษาการนำยีน *man5K* ซึ่งสร้างเอนไซม์ mannanase ใน *C. cellulovorans* เข้าสู่ *C. acetobutylicum* พบว่าโปรตีนรีคอมบิแนนท์มีการผลิตอย่างไม่ครบสมบูรณ์ (truncated protein) แต่ยังคงมีแอคทิวิทีต่อกาแลกโตแมนแนน

สรุป

แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* เป็นที่รู้จักกันมาช้านาน ทั้งในวงการแพทย์และวงการอุตสาหกรรม สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคนั้น ได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตตัวทำละลาย ABE (Acetone-Butanol-Ethanol) เพื่อใช้ในการผลิตดินปืนในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 หลังจากสงครามโลกสิ้นสุดไปจึงทำให้โรงงานผลิตอะซิโทนในยุโรปก็ปิดตัวลงไปด้วย อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันราคาเชื้อเพลิงปิโตรเลียมในตลาดโลกสูงขึ้นและไม่แน่นอน การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากชีวมวลเป็นที่สนใจอย่างยิ่ง เนื่องจากชีวมวลมีปริมาณมากมาย ราคาถูกและบางครั้งไม่มีมูลค่า จนเป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งพบว่าชีวมวลเหล่านี้สามารถนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพนี้อยู่ที่ความสามารถในการปรับเปลี่ยนชีวมวลเหล่านี้ให้เป็นสารตั้งต้นโมเลกุลขนาดเล็กก่อน เช่น ปรับเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคส เป็นต้น โดยแบคทีเรียในสกุล *Clostridium* เองสามารถผลิตเซลลูเลสคอมเพล็กซ์ที่เรียกว่า เซลลูโลโซม ซึ่งมีคุณสมบัติและมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสารโมเลกุลขนาดใหญ่ของมวลชีวภาพให้มีขนาดเล็กลงเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำคัญในการผลิตเชื้อเพลิงเหลวต่อไป จึงนับเป็นกุญแจสำคัญไขสู่ความสำเร็จในการผลิตเชื้อเพลิงทางชีวภาพจากชีวมวล จนสามารถสร้างตัวทำละลายทั้งสามชนิด คือ อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล ได้สูงในระยะเวลาอันสั้น และเอทานอลและบิวทานอลนี้เองที่เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่สำคัญอย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

1. Thongwai, N., and Chaimongkol, N. 2007. Bacterial Cellulase. 33rd Congress on Science and Technology of Thailand. 18-20 October 2007. Walailak University. Nakhon Si Thammarat. Thailand.
2. อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว* 23(2): 145-160.
3. Chiao, J. S., and Sun, Z. H. 2007. History of the Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation Industry in China: Development of Continuous Production Technology. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13: 12-14.
4. Hazelwood, G. P., Davidson, K., Laurie, J. I., Huskison, N. S., and Gilbert, H. J. 1993. Gene Sequence and Properties of CelI, a Family E Endoglucanase from *Clostridium thermocellum: Journal of General Microbiology* 139: 307-316.
5. Doi, R. H., Kosugi, A., Murashima, K., Tamaru, Y., and Han, S. O. 2003. Cellulosomes from Mesophilic Bacteria. *Journal of Bacteriology* 185: 5907-5914.
6. Phillips, C., and Beeson, W. 2009. Cellulose Degradation. Available from URL: http:// www. Cchem.berkeley.edu/mmargrp/Cellulase/Cellulose.html. 20 March 2009.
7. Bayer, E., Morag, E., Barak, Y., Haimovitz, R., Karpol, A., Caspi, J., Noach, I., Gilary, H., Ouanounou, S., and Yoav, S. 2006. Designer Cellulosomes for Future Production of Biofuels and Biomaterials: Life Science 2006. Available from URL: http://www.weizmann.ac.il/ Biology/open_day_ 2006/book/Abstracts/Ed_Bayer.pdf. 10 April 2009.
8. Ding, S. Y., Bayer, E. A., Steiner, D., Shoham, Y., and Lamed, R. 2000. A Scaffoldin of the *Bacteroides cellulosolvens* Cellulosome That Contains 11 Type II Cohesins. *Journal of Bacteriology* 182: 4915-4925.
9. Ding, S. Y., Rincon, M. T., Lamed, R., Martin, J. C., McCrae, S. I., Aurilia, V., Shoham, Y., Bayer, E. A., and Flint, H. J. 2001. Cellulosomal Scaffoldin-Like Proteins from *Ruminococcus flavefaciens. Journal of Bacteriology* 183: 1945-1953.
10. Berger, E., Jones, W. A., Jones, D. T., and Woods, D. R. 1990. Sequencing and Expression of a Cellodextrinase (*ced1*) Gene from *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c Cloned in *Escherichia coli. Molecular General Genetics* 223: 310-318.
11. Wiegel, J., Ljungdahl, L. G., and Rawson, J. R. 1979. Isolation from Soil and Properties of the Extreme Thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum. Journal of Bacteriology* 139: 800-810.
12. Smith, C. J., and Moryson, C. J. 1975. *Clostridium botulinum* in the Lakes and Waterways of London. *The Journal of Hygiene* 75: 371-379.

13. Makoto, I., Susumu, A., Yoshitetsu, M., and Makoto, K. 2003. Bacterial Communities Associated with Nodal Roots of Rice Plants along with the Growth Stages: Estimation by PCR-DGGE and Sequence Analyses. *Soil Science and Plant Nutrition.* 49: 591-602.
14. Tamaru, Y., Karita, S., Ibrahim, A., Chan, H., and Doi, R. H. 2000. A Large Gene Cluster for the *Clostridium cellulovorans* Cellulosome. *Journal of Bacteriology* 182: 5906-5910.
15. Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Teranzi, H. F., Jorge, J. A., and Amorim, B. S. 2005. Xylanase from Fungi: Properties and Industrial Application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 577-591.
16. Grohmann, K., Torget, R., and Himmel, M. 1986. Optimization of Dilute Acid Pretreatment of Biomass. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 15: 59-80.
17. Ferry, J. G. 1997. Enzymology of the Fermentation of Acetate to Methane by *Methanosarcina thermophila. BioFactors* 6: 25-35.
18. Sowers, K. R., Baron, S. F., and Ferry, J. G. 1984. *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an Acetotrophic Methane-Producing Bacterium Isolated from Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 971-978.
19. Allen, M. S., Coors, J. G., and Roth, G. W. 2003. Corn Silage. In: Buxton, D. R., Muck, R. E., and Harrison. J. H. Editors. Silage Science and Technology, Agronomy Monograph. Madison WI. American Society of Agronomy, Crop Science Society.
20. Wallace, R., Ibsen, K., McAloon, A., and Lee, W. 2005. Feasibility Study for Co-Locating and Integrating Ethanol Production Plants from Corn Starch and Lignocellulosic Feedstocks. Available from URL: http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/37092.pdf. 10 April 2009.
21. Mapemba, L. D., Epplin, F. M., and Huhnke, R. L. 2006. Environmental Consequences of Ethanol from Corn Grain, Ethanol from Lignocellulosic Biomass, and Conventional Gasoline. American Agricultural Economics Association 2006 Annual Meeting. 23-26 July 2006. Long Beach. California.
22. Geller, H. S. 1985. Ethanol Fuel From Sugarcane in Brazil. *Annual Review of Energy* 10: 135-164.
23. Martines-Filho, J., Burnquist, H. L., and Vian, C. E. F. 2006. Bioenergy and the Rise of Sugarcane-Based Ethanol in Brazil. *American Agricultural Economics Association* 21: 91-96.
24. Rohter, L. 2006. With Big Boost From Sugar Cane, Brazil Is Satisfying Its Fuel Needs. Available from URL: http://www.nytimes.com/2006/04/10/world/americas/10brazil.html?. 8 April 2009.
25. Eriksson, K. E. L. 1990. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. *Wood Science and Technology* 24: 79-101.

26. Nordon R. E., Craig, S. J., and Foong, F. C. 2009. Molecular Engineering of the Cellulosome Complex for Affinity and Bioenergy Application. *Biotechnology Letters* 31: 465-476.
27. Craig, S. J., Shu, A., and Xu, Y. 2007. Chimeric Protein for Selective Cell Attachment onto Cellulosic Substrates. *Protein Engineering Design and Selection* 20: 235-241.
28. Haimovitz, R., Barak, Y., and Morag, E. 2008. Cohesin-Dockerin Microarray: Diverse Specificities between two Complementary Families of Interacting Protein Modules. *Proteomics* 8: 968-979.
29. Zhang, P. 2006. Investigation of Novel Quantum Dots/Proteins/Cellulose Bioconjugate Using NSOM and Fluorescence. *Journal Fluorescence* 16: 349-353.
30. Maurice, S., Dekel, M., and Shoseyov, O. 2003. Cellulose Beads Bound to Cellulose Binding Domain-Fused Recombinant Proteins; an Adjuvant System for Parenteral Vaccination of Fish. *Vaccine* 21: 3200-3207.
31. Virunanon, C., Chantaroopamai, S., Dendoungbaripant, J., and Chulalaksananukul, W. 2008. Solventogenic-Cellulolytic Clostridia from 4-Step-Screening Process in Agricultural Waste and Cow Intestinal Tract. *Anaerobe* 14: 109-117.
32. Ouephanit, C., Virunanon, C., Burapatana, V., and Chulalaksananukul, W. 2009. Butanol and Ethanol Production from Tapioca Starch Wastewater by Clostridia strains of Thailand. การประชุมวิชาการ พันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16: พันธุศาสตร์แก้วิกฤตพลังงานชาติ. 25-27 มีนาคม 2552. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต. ปทุมธานี. หน้า 197-200.
33. Virunanon, C., Ouephanit, C., Burapatana, V., and Chulalaksananukul, W. 2009. Biobutanol Production from Pineapple Waste in Thailand. การประชุมเชิงปฏิบัติการ JSPS-NRCT Summer School: Biomass Energy in Asia. 21-23 กุมภาพันธ์ 2552. โรงแรม Grand Mercure Park Avenue. กรุงเทพฯ.
34. กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2008. ศักยภาพชีวมวลในประเทศไทย. ได้จาก http://www.dede.go.th/dede/. 1 มิถุนายน 2552.
35. BP Statistical Review of World Energy. 2008. Available from: http://www.bp.com. 1 June 2009.
36. Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., and Witholt, B. 2001. Industrial Biocatalysis Today and Tomorrow. *Nature* 409: 258-168.
37. Darvill, N. M., and Albersheim, P. 1980. The Primary Cell Walls of Flowering Plant. In: Tolbert, N. E., Editor. The Biochemistry of Plants Vol. 1. New York. Academic Press. p. 91-162.
38. Bayer, E. A., Morag, E., and Lamed, R. 1994. The Cellulosome-A Treasure-Trove for Biotechnology. *Trends in Biotechnology* 12: 379-386.
39. Fierobe, II. P., Bayer, E. A., Tardif, C., Czjzek, M., Mechaly, A., Belaich, A., Lamed, R.,

Shoham, Y., and Belaich., J. P. 2002. Degradation of Cellulose Substrates by Cellulosome Chimeras. *Journal of Biological Chemistry* 277: 49621-49630.

40. Murashima, K., Kosugi, A., and Doi, R. H. 2002. Synergistic Effects on Crystalline Cellulose Degradation between Cellulosomal Cellulases from *Clostridium cellulovorans. Journal of Bacteriology* 184: 5088-5095.
41. Murashima, K., Kosugi, A., and Doi, R. H. 2003. Synergistic Effects of Cellulosomal Xylanase and Cellulases from *Clostridium cellulovorans* on Plant Cell Wall Degradation. *Journal of Bacteriology* 185: 1518-1524.
42. Sabathé, F., and Soucaille, P. 2003. Characterization of the CipA Scaffolding Protein and *in vivo* Production of a Minicellulosome in *Clostridium acetobutylicum. Journal of Bacteriology* 185: 1092-1096.
43. Mingardon, F., Perret, S., Bélaïch, A., Tardif, C., Bélaïch, J. P., and Fierobe, H. P. 2005. Heterologous Production, Assembly, and Secretion of a Minicellulosome by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1215-1222.

ได้รับบทความวันที่ 27 เมษายน 2552
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 11 มิถุนายน 2552