บทที่ 2

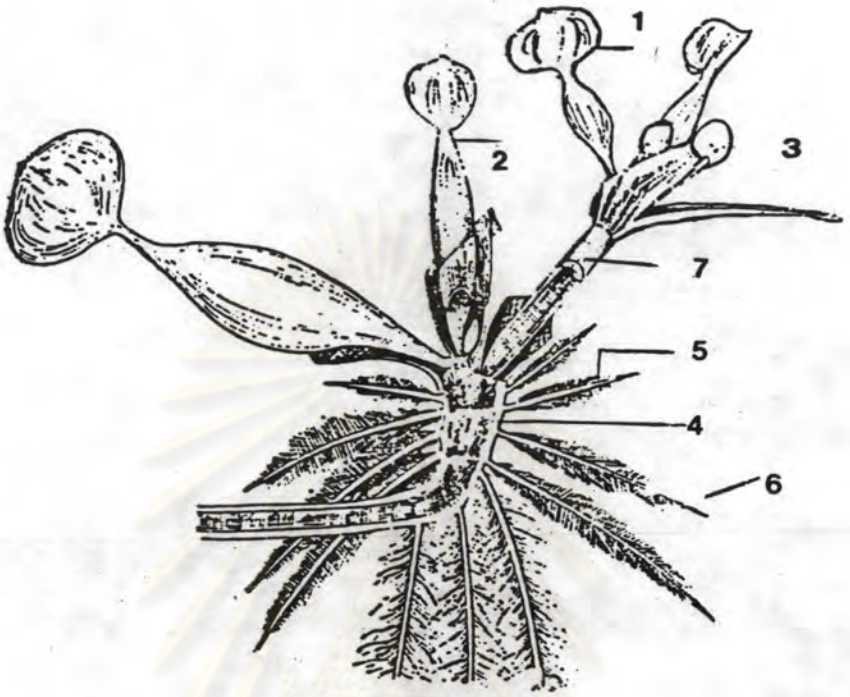
การตรวจเอกสาร

ผักตบชวา (Water Hyacinth, Eichhornia Crassipes (Mart.) Solms.) เป็นวัชชพืชลอยน้ำ ซึ่งจัดเป็นพืชประเภทใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ Pontederiaceae (1) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศบราซิล ทวีปอเมริกาใต้ (2) พบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2367 โดย Karl Von Matius (19) และมีการแพร่ระบาดไปยังประเทศในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน ก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากมายในด้านการกำจัด ซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วยเนื่องจากมีการนำเข้ามาจากประเทศอินโดนีเซียในปี พ.ศ. 2444 (19) พบว่าปัจจุบันมีการแพร่กระจายของผักตบชวาอยู่ทั่วไปตามแหล่งน้ำต่าง ๆ ใน 64 จังหวัดทั่วประเทศ

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของผักตบชวา (20, 21)

ผักตบชวาเป็นวัชชพืชข้ามปี ประกอบด้วยลำต้นที่มีหัวราก (rhizomatous system) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-6 เซนติเมตร และยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ลำต้นมีสีม่วงแดง มีขนาดแตกต่างกัน ประกอบด้วยกลุ่มใบเรียงกันเป็นกลีบชั้น (rosettes) ก้านใบมีลักษณะกลมพองออก ภายในมีเนื้อพรุนคล้ายฟองน้ำเป็นเครื่องพยุงให้ต้นลอยน้ำได้ ผักตบชวามีระบบรากเป็นรากฝอย โดยแตกออกจากข้อบนลำต้น มีความยาวตั้งแต่ 10-90 เซนติเมตร และมีประสิทธิภาพสูงในการดูดซึมธาตุอาหารต่าง ๆ ที่ปะปนในน้ำ ส่วนดอกมีสีม่วงฟ้าลักษณะเป็นช่อดอกมีประมาณ 6-12 ดอก ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 1

ผักตบชวาจัดเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้เร็วที่สุด โดยสามารถขยายพันธุ์ได้ทั้งแบบไม่ใช้เพศ (vegetative propagation) และแบบใช้เพศ (sexual reproduction) แต่โดยทั่วไปมักจะขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อเป็นต้นใหม่โดยสามารถเพิ่มการครอบคลุมพื้นที่ได้เป็น 2 เท่า ทุกระยะเวลา 62 วัน (22) หรือเพิ่มจำนวนจาก 10 ต้น เป็น 6 แสนต้น ภายในเวลาเพียง 8 เดือน (23) สำหรับการขยายพันธุ์โดยใช้เพศจะผสมเกสรภายในตัวเอง (self-pollination) แต่บางครั้งสามารถผสมข้ามต้นได้ โดยจะเกิดขึ้นเฉพาะในฤดูแล้งเท่านั้น (24)



รูปที่ 1 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของผักตบชวา (20)

1. แผ่นใบ
2. ทุ่นพยุงลำต้น
3. ลิกิวล์
4. เหง้า
5. ขนราก
6. หมวกราก
7. ลำต้น

เนื่องจากผักตบชวาเป็นพืชน้ำที่โตเร็วจึงก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ ต่อแหล่งน้ำ ปัจจุบันจึงมีการดำเนินการควบคุมได้ 2 วิธีการหลัก คือ

1. **การทำลายโดยตรง** ได้แก่ การใช้สารเคมี การใช้วิธีกล และใช้ระบบชีววิธี

1.1 การใช้สารเคมี สารเคมีที่ใช้มีหลายชนิด เช่น Dalapon, Diquat, Paraquat เป็นต้น เป็นวิธีที่ได้ผลรวดเร็วแต่ก่อให้เกิดปัญหาทางมลภาวะโดยสารเคมีสามารถทำอันตรายต่อสัตว์น้ำตลอดจนการนำน้ำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น (25)

1.2 การใช้วิธีกล โดยการใช้แรงงานคน หรือ เครื่องจักรกล วิธีการนี้มีปัญหาคือ สิ้นเปลืองแรงงานและเสียเวลามาก เหมาะสำหรับใช้ในพื้นที่แคบ ๆ เท่านั้น (26)

1.3 **การใช้วิธีชีวภาพ** โดยการใช้แบคทีเรีย, รา, ไวรัส และแมลง เป็นต้น แม้ผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมน้อย แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จถึงขั้นมาใช้ประโยชน์ได้ อีกทั้งต้องคำนึงถึงปัญหาด้านค่าใช้จ่ายด้วย (28)

2. **การควบคุมโดยการนำไปใช้ประโยชน์** (1, 20, 21)

2.1 ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย เพื่อลดมลสาร (pollutants) ต่าง ๆ ที่อยู่ในน้ำเสีย อันได้แก่ สารอินทรีย์ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โลหะหนักและสารพิษ

2.2 ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแก๊สชีวภาพ (biogas)

2.3 ใช้เป็นปุ๋ยสำหรับพืช

2.4 ใช้เป็นอาหารสัตว์

2.5 ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารที่มีประโยชน์ เช่น ใช้ในการผลิตเอนไซม์-เซลลูเลส หรือนำมาแปรรูปโดยการย่อยสลายไม่ว่าจะเป็นโดยวิธีการเคมีหรือเอนไซม์ จะได้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ซึ่งใช้ในการหมักโดยจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดออคซาลิค เอธิลแอลกอฮอล วิตามิน ยาปฏิชีวนะ ฯลฯ

2. องค์ประกอบของผักตบชวา

ต้นผักตบชวา 100 กิโลกรัม หลังจากตากให้แห้งจะมีน้ำหนักเหลือประมาณ 5 กิโลกรัม คิดเป็นน้ำหนักของกากแห้งเฉลี่ยร้อยละ 5 ของน้ำหนักทั้งหมด (28) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบพบว่า ผักตบชวาประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน และแร่ธาตุต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 (29)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบของผักตบชวาแห้ง (29)

องค์ประกอบ	สัดส่วน (เปอร์เซ็นต์)
ลิกนิน	12-13
เซลลูโลส	43-44
เพนโตแซน	14-15
เถ้า	20-21
คาร์บอน	32-35
ไฮโดรเจน	5.4-5.8
ไนโตรเจน	2.8-3.5
โซเดียม	1.5-2.5
โปแตสเซี่ยม	2.0-3.5
แคลเซี่ยม	0.6-1.3

และองค์ประกอบทางโปรตีนผักตบชวาแสดงอยู่ในตารางที่ 2

2.1 เซลลูโลส

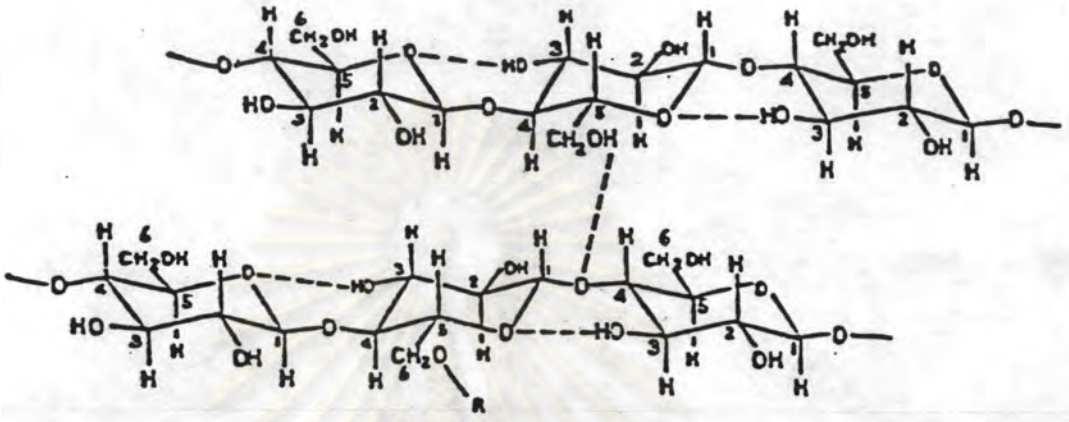
เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของดี-กลูโคส (D-glucose) ในรูปเบต้า-ดี-กลูโคไพราโนส (B-D-glucopyranose) เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ในโมเลกุลถัดไป

หน่วยย่อยของ ดี-กลูโคส ต่อ 1 โมเลกุลเซลลูโลส (degree of polymerization) จะมีตั้งแต่ 15 หน่วยจนถึง 14,000 หน่วย น้ำหนักโมเลกุลมีค่า 0.2-2x10^5 ดาลตัน (น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสเท่ากับ 180.16 ดาลตัน) ความยาวของหน่วยย่อย ดี-กลูโคส 0.515 nm และความยาวทั้งหมดของโมเลกุลเซลลูโลสมีค่ามากกว่า 5 um

ตารางที่ 2 องค์ประกอบโปรตีนของผักตบชวาแห้งเปรียบเทียบกับองค์ประกอบโปรตีนมาตรฐานของ FAO

กรดอมิโน	องค์ประกอบโปรตีนมาตรฐานของ (FAO) (กรัม/100 กรัมโปรตีนดิบ)	องค์ประกอบของโปรตีนดิบจากผักตบชวา (กรัม/100 กรัมโปรตีนดิบ)		
		จากใบ	จากใบสดเขียว	จากใบอบแห้ง
ไลซีน	5.4	5.7	6.60	5.96
เมทไธโอนีน + ซีสทีน	3.5	2.7	2.06	1.47
ทรีโอนีน	4.0	4.3	4.99	4.56
ไอโซลิวซีน	4.0	4.7	4.92	4.09
ลิวซีน	7.0	8.3	9.20	8.68
แวลลีน	5.0	5.6	5.84	5.03
ฟีนีลอะลานีน + ไทโรซีน	6.1	8.8	10.77	9.25
ทริปโทเฟน	0.96	1.0	1.50	1.04
ฮิสทิดีน	-	2.2	-	-
อาร์จินีน	-	5.2	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างเซลลูโลส (31)

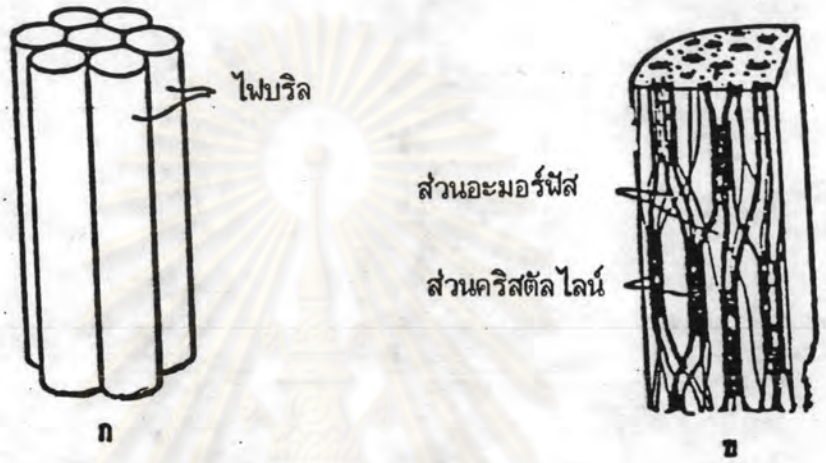
รูปแบบ (Conformation) ของการจัดเรียงตัวของหน่วยดี-กลูโคสจะอยู่ในลักษณะ chair form แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (Intra molecule H-bond) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, - OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวน (ring) ของโมเลกุลถัดไป และเชื่อมต่อระหว่างสายเซลลูโลสที่ขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (Intermolecule H-bond) ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลดี-กลูโคส ในอีกสายหนึ่ง ดังรูปที่ 2

จากการจัดเรียงตัวเหล่านี้ทำให้สายเซลลูโลสเรียงตัวขนานชิดกันและกันอย่างมีระเบียบ ในลักษณะที่เรียกว่า คริสตัลไลน์ไมเซล (Crystalline micelles) โดยแต่ละไมเซลประกอบด้วยโมเลกุลเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุล มีรูปร่างเป็นแถบหนา ไมเซลประมาณ 10-20 ไมเซลจะมาเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้น เรียกว่า ไมโครไฟบริล (Microfibril) ซึ่งสามารถจะแบ่งลักษณะโครงสร้างเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชตามการจัดเรียงตัวของไมโครไฟบริลได้ 3 ลักษณะ (31) คือ

1. Fringe micelles ในไมโครไฟบริลประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (Crystalline) และ อะมอร์ฟัส (Amorphous) (รูป 4 ก)

2. โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส (รูป 4 ข)

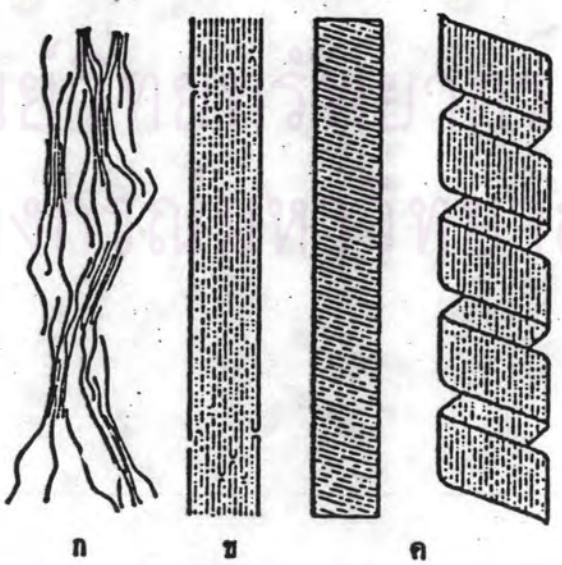
3. โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นริบบินหนา เกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้งฉากกับแกนของริบบิน และริบบินจะม้วนเป็นเกลียว (helix) (รูป 4 ค)



รูปที่ 3 ลักษณะของไฟบริล

ก. Bundle ของส่วน amorphous หรือ Paralelled fibril

ข. ภาพตัดด้านข้างของ 1 ไฟบริล



รูปที่ 4 โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป (17)

ผนังเซลล์ของพืชจะมีเซลลูโลสจัดเรียงตัวเป็นแถบ ๆ ไม่ติดต่อกันโดยตลอด เมื่อเซลล์แก่เต็มที่ภายในช่องว่างจะเต็มไปด้วยลิกนิน (lignin) นอกจากนี้ยังมีโพลีแซคคาไรด์อื่น ๆ ที่ปะปนอยู่กับเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ได้แก่ ไซแลน (xylan) แมนแนน (mannan) โพลียูโรไนด์ (polyuronide) อะราแบน (araban) และกาแลคแตน (galactan) โดยมักพบในปริมาณที่น้อยกว่าเซลลูโลส (32)

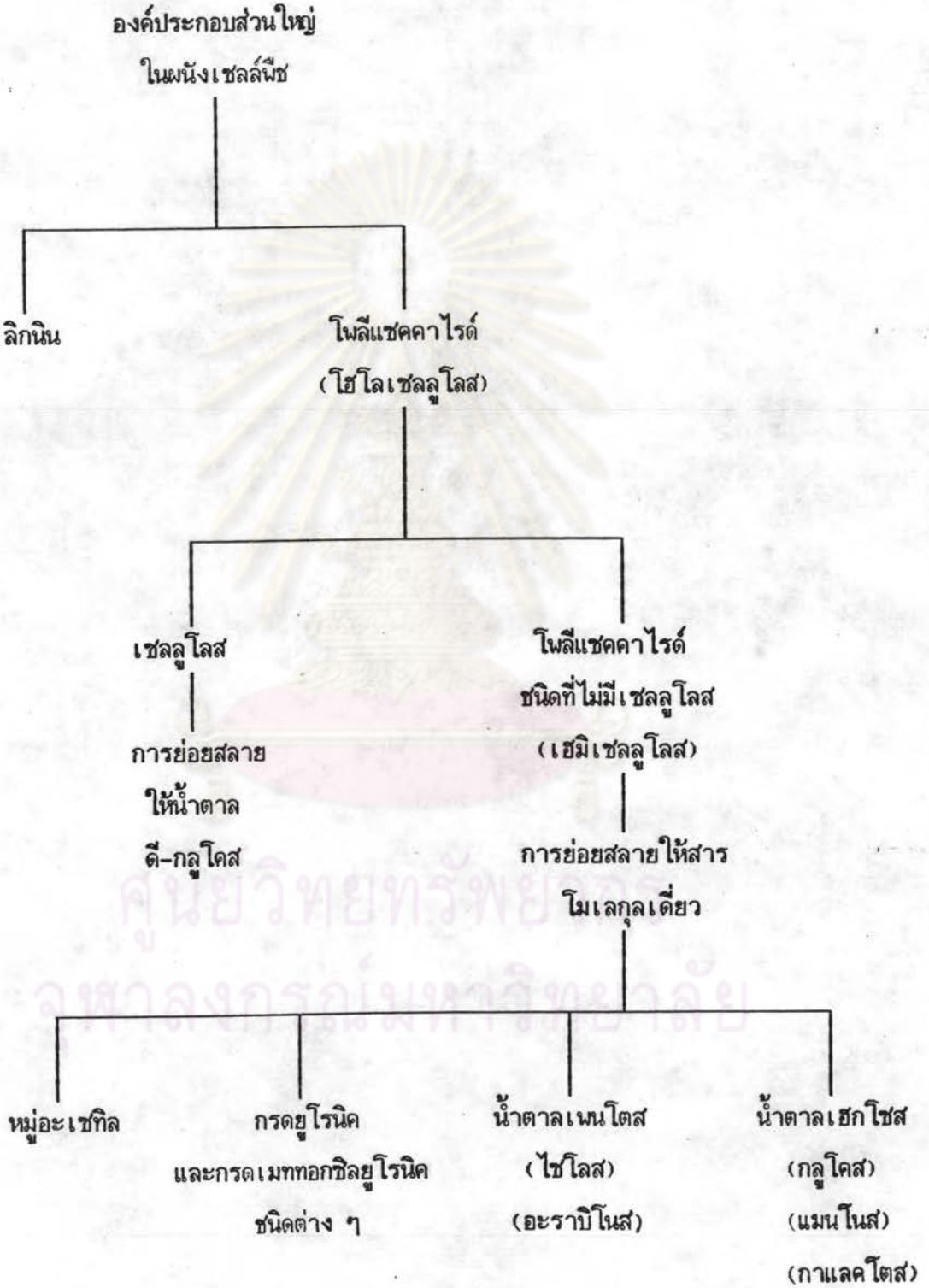
เซลลูโลสไม่ละลายในน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายด่างอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในกรด หรือด่างแก่ ดังนั้นจึงสามารถจะแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามลักษณะการละลายในกรดหรือด่างได้เป็น 3 ชนิด

1. แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 17.5 เปอร์เซ็นต์

2. เบต้า-เซลลูโลส (β-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 17.5 เปอร์เซ็นต์

3. แกมมา-เซลลูโลส (γ- cellulose) เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายได้ดีทั้งในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 17.5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายกรดเจือจาง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



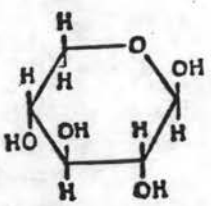
รูปที่ 5 แสดงการแยกองค์ประกอบในเซลล์พืช (33)

2.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

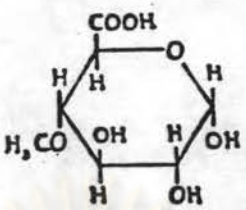
เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (pentoses) ที่มีลักษณะเป็น Heterogenous โดยประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดมารวมกัน ลักษณะโครงสร้างเป็นกิ่งก้านสาขาแตกต่างจากเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง น้ำหนักโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสจะต่ำกว่าเซลลูโลส ขนาดของโมเลกุลมีความยาว 30-50 หน่วย และมีองค์ประกอบหลักคือ ไซแลน นอกจากนี้ก็ยังมี กลูแคน (glucan), แมนแนน (mannan), กาแลคแตน, เฮมิเซลลูโลส เมื่อถูกย่อยสลายจะได้น้ำตาลที่เป็นเพนโตสและเฮกโซส ได้แก่ ไซโลส, แมนโนส, กาแลคโตส, อะราบิโนส ดังรูปที่ 6 (35)

สำหรับไซแลน ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิโซลลูโลสนั้นเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะเบตา-1,4-ไซโลซิดิค (β-1,4-xylosidic linkage) อาจเป็นเส้นตรงที่มีเฉพาะไซโลสอย่างเดียว หรือมีกิ่งก้านสาขาที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่น ๆ ปนอยู่เช่น แอล-อะราบานิโนฟูราโนส (L-arabinofuranose) เชื่อมต่อกับดี-ไซโลสที่มีตำแหน่ง 0-3 และดีกลูคูโรนิค แอซิด (D-glucuronic acid) หรือ 4-0-เมทิล-กลูคูโรนิค แอซิด (4-0-methyl-glucuronic acid) ซึ่งต่อกับดี-ไซโลสที่ตำแหน่ง 0-2 ดังแสดงในรูปที่ 7 (35)

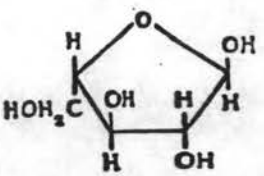
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



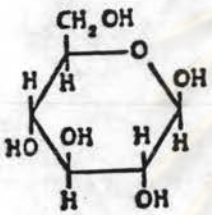
เบต้า-ดี-ไซโลไพราโนส



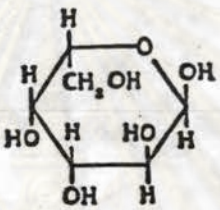
4-ออร์โธ-เมทธิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิค แอซิด



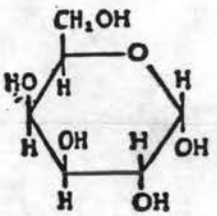
แอลฟา-แอล-อะราบิฟูราโนส



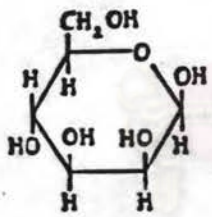
เบต้า-ดี-กลูโคไพราโนส



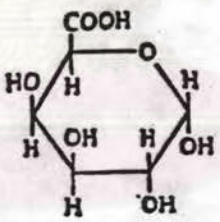
แอลฟา-แอล-ฟูโคไพราโนส



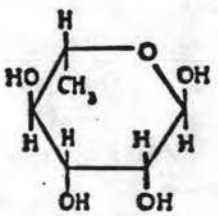
แอลฟา-ดี-กาแลคโตไพราโนส



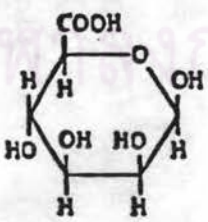
เบต้า-ดี-แมนโนไพราโนส



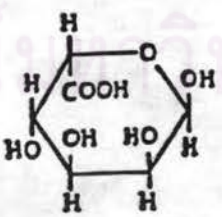
แอลฟา-ดี-กาแลคทูโรนิคแอซิด



แอลฟา-แอล-แรมโนไพราโนส

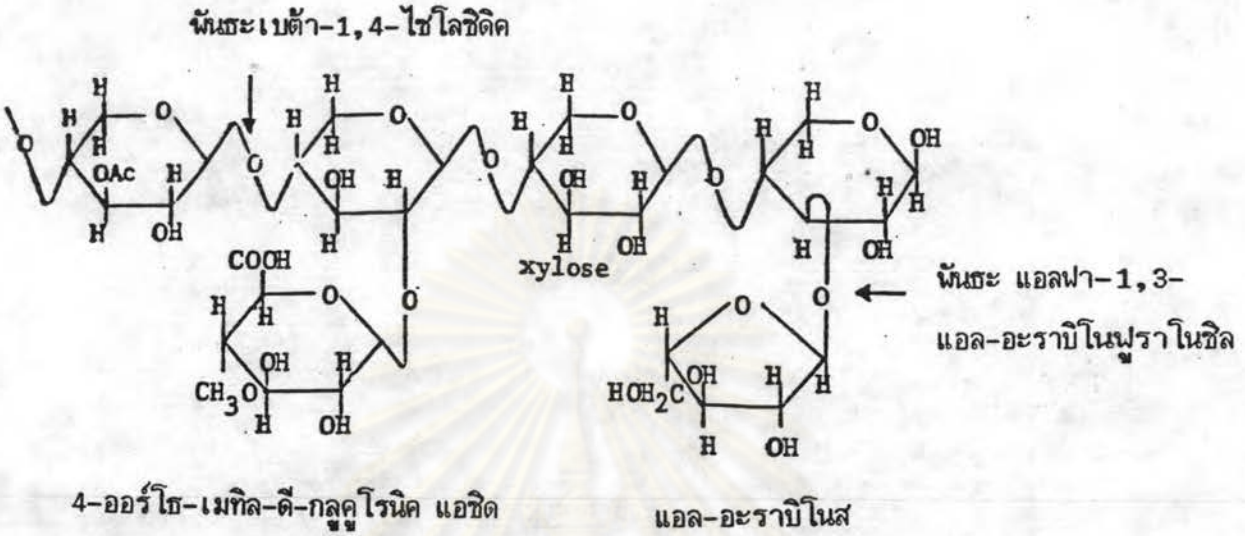


เบต้า-ดี-แมนนูโรนิคแอซิด



แอลฟา-แอล-กูลูโรนิค แอซิด

รูปที่ 6 ชนิดของน้ำตาลและกรดยูโรนิคที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส (34)



รูปที่ 7 โครงสร้างของไซแลน (35)

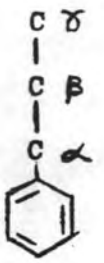
Ac = Acetyl group

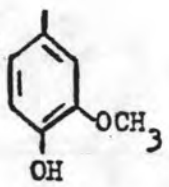
เฮมิเซลลูโลส จะไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายในด่างและถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าเซลลูโลส

2.3 ลิกนิน (Lignin)

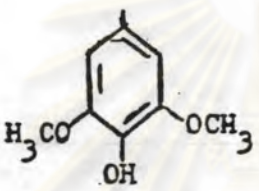
เป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) ที่ประกอบด้วยหมู่เมทอกซิล (methoxyl group, $-OCH_3$) หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) และส่วนที่เป็นฟีโนลิก (phenolic) โดยปกติไม่สามารถระบุได้ว่าลิกนินเป็นสารประกอบประเภทใด เพราะไม่สามารถกำหนดโครงสร้างที่แน่นอนได้ ทั้งนี้เนื่องจากลิกนินจะไม่อยู่ในลักษณะตัวเดียว แต่จะเกาะเป็นสายยาวซึ่งมีอยู่หลายแบบซึ่งประกอบด้วยหน่วยเหล่านี้คือ

แบบฟีนิล โพรเพน (phenyl propane type)





ก้วอิอะซีล ยูนิต



ไซรินกิล ยูนิต

พารา-ไฮดรอกซี่ ฟีนิล ยูนิต

รูปที่ 8 หน่วยย่อยในโครงสร้างของลิกนิน (37)

ลักษณะการจับ (link) ของหน่วยฟีนิล โพรเพน อาจเชื่อมกันที่ตำแหน่งแอลฟา, เบต้า หรือแกมม่า กับ side chain ของหน่วยอื่น หรือที่ตำแหน่ง 4 และ 5 ของวงแหวนฟีนิล (phenyl ring) ได้เป็นรูปร่างเส้นตรง, วงกลม หรือมีกิ่งก้านสาขาก็ได้

ลิกนินไม่ละลายในน้ำ และสารอินทรีย์ชนิดใด จะอยู่ภายในโครงสร้างของพืช โดยอยู่รอบ ๆ เซลลูโลส และป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยสลาย

3. การย่อยสลายผักตบชวา

เนื่องจากผักตบชวามีสารพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบอยู่ ดังนั้นเมื่อนำมาทำการย่อยสลายจะได้น้ำตาลออกมา โดยถ้าทำการย่อยสลายเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวคือกลูโคส แต่ถ้าการย่อยสลายเกิดไม่สมบูรณ์จะได้ทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส (cellobiose) และพวกโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ปนกัน ส่วนเฮมิเซลลูโลสเมื่อย่อยสลายจะได้น้ำตาลหลายชนิดปนกันขึ้นกับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลส

015304

การย่อยสลายสามารถทำได้ 2 วิธีการ คือ

1. การย่อยสลายด้วยสารเคมี (Chemical Hydrolysis)
2. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis)

3.1 การย่อยสลายด้วยสารเคมี (Chemical Hydrolysis) (38)

เป็นการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่าง โดยจะไปทำลายพันธะไกลโคซิดิกระหว่างคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจนอะตอม ส่วนใหญ่การย่อยสลายแบบนี้ต้องการสภาวะที่รุนแรง

3.1.1 การย่อยสลายด้วยกรด อาจแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการ คือ

3.1.1.1 Homogenous process เป็นกระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟูริคเข้มข้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่วิธีการนี้จะต้องมีการแยกกรดออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้และการนำกรดกลับมาใช้ใหม่ (recycle) รวมทั้งปัญหาการสูญเสียกรดไปกับส่วนที่ไม่ถูกย่อยสลาย และการผุกร่อนของเครื่องมือจากการใช้กรดแก่ (38)

3.1.1.2 Heterogenous process เป็นกระบวนการที่ใช้กรดอ่อนกว่า ทำให้เซลลูโลสยังมีโครงสร้างเป็นเส้นใยอยู่ (fibrous structure) วิธีการนี้จะไม่สามารถนำกรดกลับมาใช้ใหม่ แต่จะถูกทำให้เป็นกลางด้วย ปูนขาว หรือ แคลเซียมคาร์บอเนต และตะกอน แคลเซียมซัลเฟตที่เกิดขึ้นจะถูกกรองทิ้งไป นิยมใช้กันมากในอุตสาหกรรมการผลิต Hydrocellulose และ gel-form microcystalline cellulose แต่ก็มีปัญหาการให้ผลผลิตต่ำ (50-55เปอร์เซ็นต์) ประกอบกับการที่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและสิ้นเปลืองพลังงานจำนวนมากอีกทั้งยังมีปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษด้วย

3.1.2 การย่อยสลายด้วยด่าง (Alkaline Hydrolysis)

สารเคมีที่นิยมใช้ คือ สารละลายเจือจางของโซเดียมไฮดรอกไซด์, แอมโมเนีย และ เอทิลลีน ไดอะมีน เป็นต้น จะมีผลทำให้สายของโพลิแซคคาไรด์สั้นลง ปฏิกิริยานี้จะเกิดในสภาพอุณหภูมิสูงประมาณ 160-180 องศาเซลเซียส และต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อย ซึ่งใช้ในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส

การย่อยสลายด้วยสารเคมีนั้น ปฏิกิริยาที่เกิดจะไม่เฉพาะเจาะจงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่บริสุทธิ์ ผลิตภัณฑ์บางส่วนถูกเปลี่ยนไปกลายเป็นสารอื่น เช่น เฟอร์ฟูรัล (furfural) และไฮดรอกซิล เมทิล เฟอร์ฟูรัล (Hydroxyl methyl furfural) (39) (40)

3.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis)

เป็นการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิดโดยมากเป็นราและแบคทีเรีย ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่สภาวะซึ่งไม่รุนแรง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่ถูกสลายต่อไป นอกจากนี้เอนไซม์มีความจำเพาะ (specificity) ต่อวัตถุดิบที่จะย่อยสลาย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดปัญหาการผุกร่อนของเครื่องมืออีกด้วย

สำหรับการย่อยสลายเซลลูโลสนั้น . เนื่องจากในผนังเซลล์ของพืชในธรรมชาติยังมีสารประกอบอื่น ๆ เช่น ลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมีโครงสร้างที่ซับซ้อนมากจะมีผลขัดขวางการแพร่ผ่าน (diffusion) ของเอนไซม์ที่จะเข้าไปทำการย่อยสลาย ดังนั้น ในการย่อยสลายจึงต้องมีการปรับสภาพเบื้องต้น เพื่อกำจัดสารเหล่านี้ออกไปทำให้เอนไซม์ทำงานได้สะดวกขึ้น (41)

4. การปรับสภาพเบื้องต้นของวัตถุดิบ (Pretreatment)

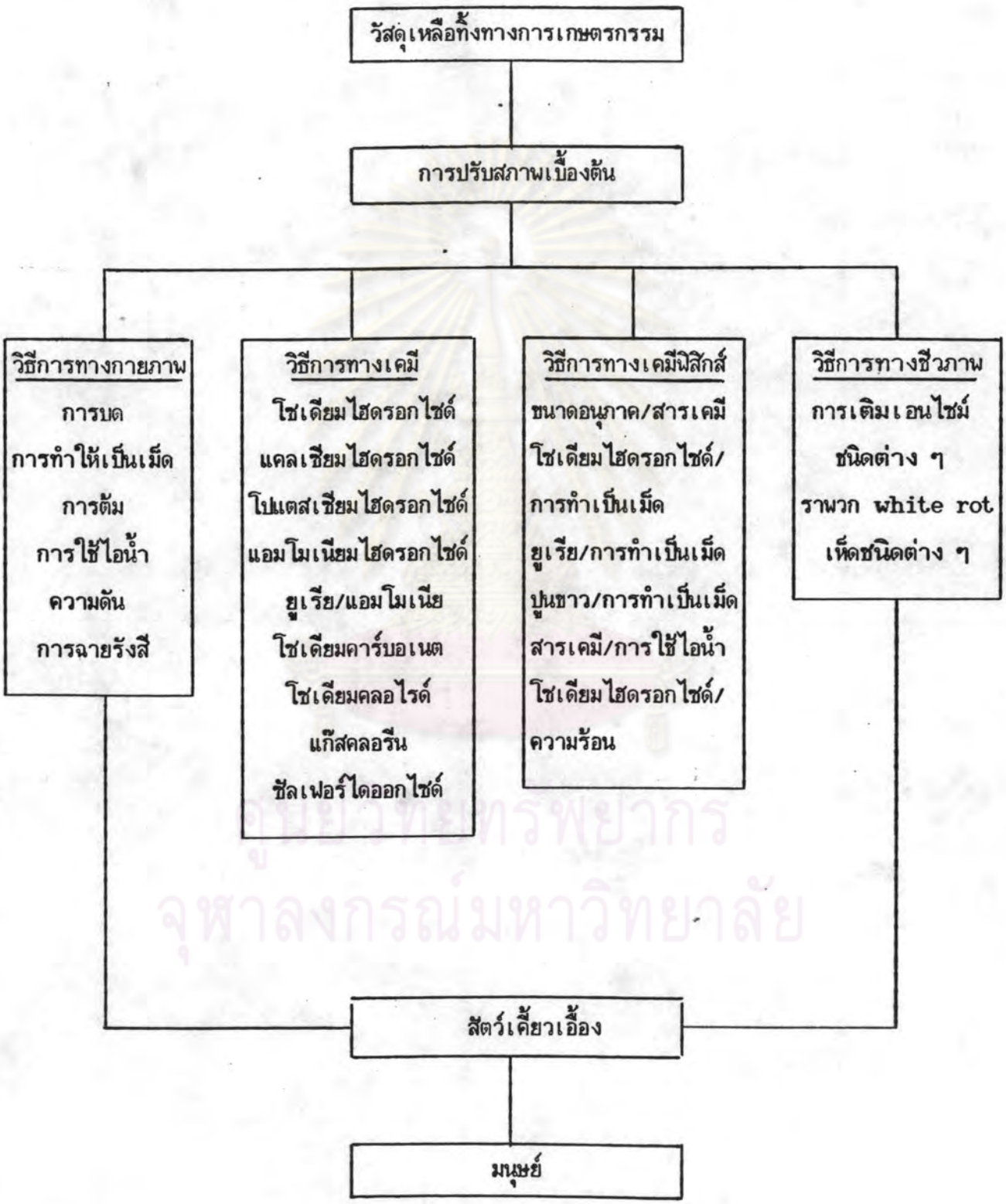
โดยทั่วไป แบ่งเป็น 4 วิธีการดังนี้

4.1 วิธีการทางกายภาพ (Physical Pretreatment)

4.1.1 การใช้ความร้อนและความดัน และการฉายรังสี

4.1.2 การลดขนาดของสารโดยวิธีบดหรือโม่บด

เป็นการบดผลึก (Crystalline) ของเส้นใยที่ประกอบด้วยไมโครไฟบริล จำนวนมากซึ่งในแต่ละไมโครไฟบริลนั้นประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (Crystalline region) ให้แตกออก เพื่อให้เอนไซม์ย่อยสลายได้ง่ายขึ้นรวมทั้งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ ทำให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น



รูปที่ 9 แสดงวิธีการในการปรับสภาพวัตถุดิบ (54)

Puri (42) ได้ทดลองใช้การบดด้วยลูกบอล (Ball-milling) บดฟ้าย พบว่า ความเป็นผลึกจะลดลงจากร้อยละ 80 ในตอนเริ่มต้น เหลือร้อยละ 68 หลังจากการบดเป็นเวลา 15 นาที

4.1.3 กระบวนการใช้ไอน้ำความดันสูง ทำให้เส้นใยแตก (Steam Explosion Process)

หลักการ คือ การทำให้วัตถุดิบที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบนั้นอิ่มตัวด้วยไอน้ำ ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง แล้วลดความดันลงทันที ทำให้น้ำระเหยอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้เส้นใยแยกออกจากกัน เป็นการเพิ่มขนาด เพื่อให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยา ความชื้นและอุณหภูมิสูงจะทำให้พืชปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมา ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นกรดอะเซติค (acetic acid) ออกมายังผลให้เกิดการกระตุ้นการย่อยสลายของเฮมิเซลลูโลสให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ และน้ำตาลเพนโตสบางส่วนจะกลายเป็นเฟอฟูรัล (furfural) รวมทั้งน้ำตาลเฮกโซสบางส่วนก็เปลี่ยนเป็นไฮดรอกซิล เมทธิล เฟอฟูรัล (hydroxyl methyl furfural) วิธีนี้จึงจะเป็นผลร่วมของทั้งทางฟิสิกส์และเคมี (43)

Jurgen (44) ใช้การปรับสภาพไม้บริช (Brich wood) โดยวิธีใช้ไอน้ำความดันสูง พบว่า จะช่วยลดความยาวของสายโพลิเมอร์ของเซลลูโลส และเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัส ทำให้ผลผลิตจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จาก Trichoderma reesei และ Aspergillus niger เพิ่มจาก 40 เปอร์เซ็นต์ เป็น 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 170-210 องศาเซลเซียส และอบโดยไอน้ำ 10 นาที

Mes-Martree (45) ใช้วิธีนี้กับเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรพวกฟางข้าว บาร์เล่ย์ ฟางข้าวสาลี ต้นข้าวโพด และต้น alfalfa ก่อนจะนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากเชื้อ Trichoderma harizaamun E58 พบว่า จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ดี

4.2 วิธีการเคมี (Chemical Pretreatment) แบ่งได้เป็น

4.2.1 การใช้กรด (Acid Pretreatment)

เมื่อใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลฟูริก จะทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายน้ำออกมา

4.2.2 การใช้ด่าง (Alkali Pretreatment)

เมื่อใช้ด่าง โซเดียมไฮดรอกไซด์จะมีผลทำให้ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสละลายน้ำออกมา รวมทั้งทำให้เกิดการพองตัว (swelling) เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ

Ginnivan (46) พบว่าการปรับสภาพหญ้าและฟางข้าวบาร์เล่ย์ ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเชื้อ Thermomonospora fusca และ Pseudonorcardia thermophila เกิดได้ดีขึ้น

Rao (48) ได้ทำการทดลองโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ กับชานอ้อย พบว่าจะช่วยเพิ่มการย่อยสลายเป็นน้ำตาลของเอนไซม์เซลลูเลสของ Penicillium funiculosum จาก 17 เปอร์เซนต์ เป็น 63 เปอร์เซนต์

4.2.3 การใช้สาร Oxidant

สารเคมีที่ใช้ได้แก่ SO_2, ตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ ที่สามารถกำจัดลิกนิน เช่น $NaClO_2$, KB_2O_2, KIO_3, SO_3 โดยจะมีผลต่อการละลายของลิกนิน

Millet (48) ได้รายงานว่า การใช้แก๊ส SO_2 ในสภาพของไอน้ำนั้นจะมีผลทำให้เกิดการละลายของลิกนินบางส่วน ทำให้โครงสร้างในผนังเซลล์พืชมีช่องว่างง่ายต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

แต่วิธีการนี้จะมีปัญหาทางสิ่งแวดล้อม โดยจะเกิดสาร lignosulphonate ขึ้น ซึ่งไม่สามารถใช้ในการหมักได้เลย จึงต้องถูกกำจัดออกจากระบบ เป็นปัญหาเดียวกับในอุตสาหกรรม Sulphite pulding (49)

4.3 วิธีการทางเคมีฟิสิกส์ (Physico-Chemical Mean)

เป็นการปรับสภาพโดยใช้วิธีการทางกายภาพร่วมกับวิธีการทางเคมี เช่น การบดร่วมกับวิธีการทางกายภาพ

Vidand (50) ได้ทำการทดลองพบว่า การบด (grinding) และตามด้วยการใช้ความร้อน 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์ได้มาก

Mishra (51) ได้ทำการบด (milling) ชานอ้อยและเยื่อไม้ และทำการปรับสภาพโดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์, สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์, 1 เปอร์เซ็นต์ของอะเซทิล ไตรเมทิล แอมโนเนียมโบรไมด์ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์, สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ สารละลายเอธิลลีนไดอามีน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่ละการทดลองใช้เวลา 18 ชั่วโมงที่ 28 องศาเซลเซียส และสุดท้ายตามด้วยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.25 โมลาร์ 60 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์ จะทำให้การย่อยสลายวัตถุโดยเอนไซม์จากเชื้อ Penicillium funiculosum จะทำให้เกิดน้ำตาลได้ดีที่สุด

4.4 วิธีการทางชีวภาพ (Biological Pretreatment)

เป็นการใช้จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ เพื่อปรับสภาพวัตถุดิบให้ง่ายต่อการสลายเป็นน้ำตาล เช่น การใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสธรรมชาติให้เป็นสายยาว ช่วยลดความเป็นผลึก หรือใช้จุลินทรีย์พวกที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ เป็นต้น

Detroy (52) ได้ใช้ราพวก Pleurotus Ostreatus ช่วยลดปริมาณลิกนินในฟางข้าวสาลีลงได้ประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ช่วยเพิ่มการสลายวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลได้เพิ่มขึ้น

Ander (53) ทำการทดลองโดยใช้รา Sporatrichum pulverulentum ในการปรับสภาพเศษไม้ เพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลส

แต่จุลินทรีย์พวกนี้จะมีการใช้คาร์โบไฮเดรตบางส่วนในการเจริญเติบโต และการย่อยสลายลิกนินจึงต้องสูญเสียวัตถุดิบและน้ำตาลไปส่วนหนึ่ง จนกว่าจะลดปริมาณลิกนินได้พอที่จะใช้ในการเจริญเติบโตประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วน S. pulverulentum ซึ่งเป็น Cellulase-less mutant ของพวกรา white rot จะย่อยสลายเฉพาะลิกนินและเฮมิเซลลูโลสเท่านั้น และจะไม่ใช้เซลลูโลส

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 การปรับสภาพและการย่อยสลายวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส

ชนิดวัตถุดิบ	การปรับสภาพเบื้องต้น	เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย	% การเปลี่ยนวัตถุดิบเป็นน้ำตาล	เอกสารอ้างอิง
ฟางข้าวสาลี	5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, 250 องศาเซลเซียส, 4 ชั่วโมง และสกัดด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายเอธิลลีนไดอามีน	Trichoderma viride	98.0	55
ฟางข้าวสาลี	5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, 25 องศาเซลเซียส, 4 ชั่วโมง ตามด้วย 25 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	Trichoderma viride	55.0	55
ฟางข้าวสาลี	5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, 90 องศาเซลเซียส, 4 ชั่วโมง ตามด้วย 28 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายเอธิลลีนไดอามีน	Trichoderma viride	59.0	55
ฟางข้าวสาลี	5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, 90 องศาเซลเซียส, 4 ชั่วโมง ตามด้วย 25 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	Trichoderma viride	30.0	55
ฟางข้าวสาลี	96 เปอร์เซ็นต์ ของเอธานอล แล้วสกัดด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์, ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส 30 นาที	Trichoderma reesei F 522	95.0	57
ฟางข้าวสาลี	การใช้ไอน้ำที่ 180 องศาเซลเซียส, 30 นาที	Trichoderma viride	72.8	58

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชนิดวัตถุดิบ	การปรับสภาพเบื้องต้น	เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย	% การเปลี่ยนวัตถุดิบเป็นน้ำตาล	เอกสารอ้างอิง
ฟางข้าวสาลี	2 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, 130 องศาเซลเซียส, 1 ชั่วโมง	Trichoderma viride	71.0	58
ฟางข้าวสาลี	การใช้ไอน้ำที่ 180 องศาเซลเซียส, 30 นาที ตามด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 70 องศาเซลเซียส, 30 นาที	Trichoderma viride	77.9	58
ฟางข้าวสาลี	1 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายไฮโดรเจน-เปอร์ออกไซด์, อุณหภูมิห้อง, 24 ชั่วโมง	Trichoderma viride	97.5	58
ฟางข้าวสาลี	1 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์, ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ตามด้วย 28 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายเอธิลลีนไดอามีน	Trichoderma viride	61.0	79
ฟางข้าวสาลี	1 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์, ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ตามด้วย 25 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายเอธิลลีนไดอามีน	Trichoderma viride	70.0	55
ฟางข้าวสาลี	1 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์, ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ตามด้วย 28 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายเอธิลลีนไดอามีน	Trichoderma viride	72.0	55
ฟางข้าวสาลี	1 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์, ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ตามด้วย 25 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	Trichoderma viride	80.0	55
ฟางข้าวสาลี	การใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิ 200-250 องศาเซลเซียส 2-3 นาที	Trichoderma reesei	29.0-65.0	56
ฟางข้าวสาลี	5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, 150 องศาเซลเซียส, 1 ชั่วโมง	Trichoderma reesei	50.0	56

5. เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

เอนไซม์ที่ย่อยสารประกอบเซลลูโลส คือ เซลลูเลส ปัจจุบันมีการวิจัยกันอย่างกว้างขวาง โดยเน้นถึงการพัฒนากระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสในวัสดุเหลือทิ้งต่าง ๆ และวัชชพืชให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่าง ๆ ได้มากมายดังแสดงในตารางที่ 4 (59)

แหล่งของเอนไซม์ที่หาง่าย และมีความสามารถสูงในการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสนี้ โดยมากจะมาจากจุลินทรีย์ซึ่งมีอยู่หลายชนิด โดยมากจะเป็นรา โดยพบว่า Trichoderma reseei เป็นราที่นิยมใช้กันมากที่สุด (60) (61)

เอนไซม์เซลลูเลสนี้มีสมบัติเป็น multicomponent enzyme โดยมีองค์ประกอบของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกัน ดังนี้

1. Endo β-1, 4-glucan glucanohydrolase หรือ Endoglucanase หรือ Cx (EC. 3.2.1.4)

ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส ได้เซลโลไบโอส (cellobiose), โอลิโกเซลลูโลส (oligocellulose) และกลูโคส (ในปริมาณที่น้อยมาก) ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดแบบการย่อยสลายจากด้านในของสายเซลลูโลส และเป็นแบบสุ่ม (random)

2. Exo β-1, 4-glucan cellobiohydrolase หรือ Exoglucanase หรือ C_1 (EC. 3.2.1.91)

ทำหน้าที่ย่อมสลายเซลลูโลสและโอลิโกเซลลูโลส ไปเป็นเซลโลไบโอส ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดแบบการย่อยสลายที่ด้านปลายของเซลลูโลส

3. β-glucosidase หรือ cellobiase (EC. 3.2.1.21)

ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสเป็นกลูโคส

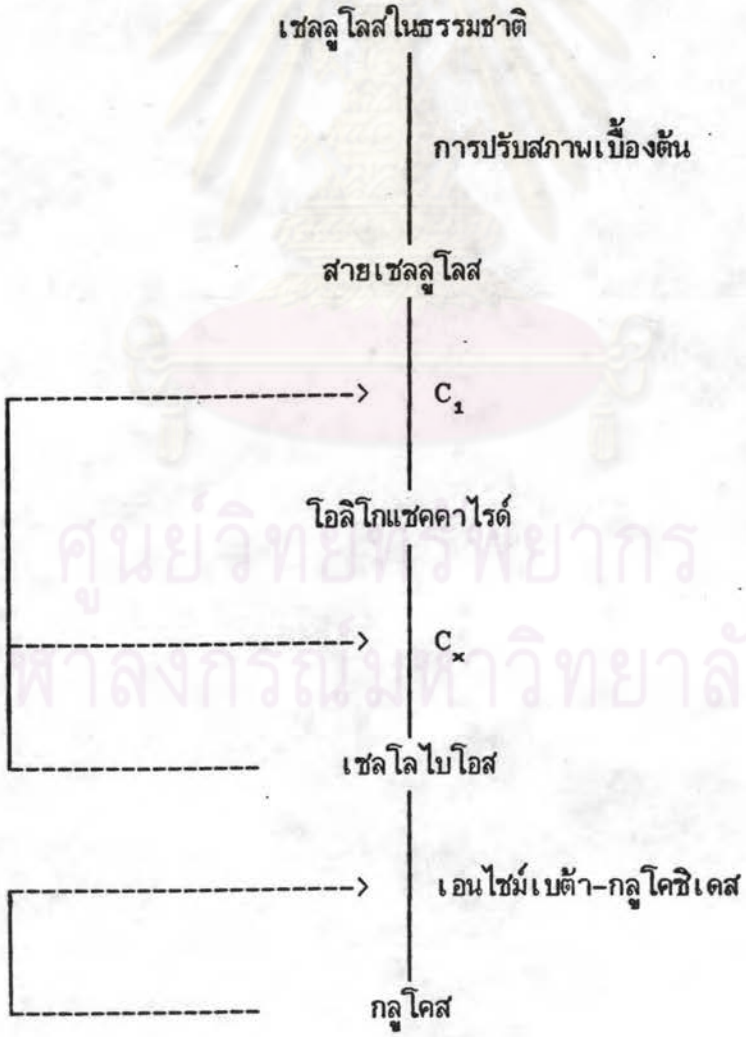
ตารางที่ 4 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (60, 61)

รา	แบคทีเรีย	แอคติโนมัยซีติส
Alternaria	Bacillus	Micromonospora
Aspergillus	Cellulomonas	Nocardia
Chaetomium	Clostridium	Streptomyces
Corprinus	Corynebacterium	Streotasporangium
Foames	Cytophaga	
Fusarium	Polyangium	
Myrothecium	Pseudomonas	
Penicillium	Sporocytophaga	
Polyporus	Vibrio	
Rhizoctonia		
Rhizopus		
Sporotrichum		
Thielavia		
Trametes		
Trichoderma		
Trichothecium		
Verticillium		
Zygorhynchus		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำงานของ Cx จะย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นสายยาวในรูปสายตรง (linear chain) และ Cx จะย่อยสลายสายยาว ได้เซลโลไบโอส ทั้งหมดนี้เป็นปฏิกิริยาภายนอกเซลจากนั้นเซลโลไบโอสจะผ่านผนังเซลเข้าภายในเซล แล้วเอนไซม์ β-glucosidase ภายในเซลจะย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เป็นกลูโคสอีกที

การทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ จะถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จะถูกยับยั้งโดยกลูโคส ส่วน C_1 และ Cx จะถูกยับยั้งโดยเซลโลไบโอส ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 การย่อยสลายและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (62)

จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ต้องทำงานร่วมกันจึงจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้สูง เมื่อแยกเอนไซม์ออกจากกันจะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง และเมื่อนำเอนไซม์ แต่ละชนิดมารวมกันใหม่จะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงขึ้น (63) ดังแสดงในตารางที่ 5

ชนิดของเอนไซม์ (เอนไซม์ 0.5 ml, สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5, 1 ml)	(%) การละลาย	แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์-เซลลูเลส	การคืนสภาพของแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส (%)
$C_1 + C_x$	47.70	0.25	104.00
C_1	1.00	< 0.01	1.00
CM-cellulase	3.20	0.01	4.00
Cellobiase	0.80	< 0.01	< 1.00
Cm-cellulase+cellobiase	1.80	< 0.01	2.00
C_1 + CM - cellulase	21.00	0.08	35.00
C_1 + cellobiase	14.00	0.05	20.60
C_1 + cellobiase+CM-cellulase	47.20	0.25	104.00

ตารางที่ 5 การย่อยสลายฝ้าย ของเอนไซม์เซลลูเสลชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากเชื้อ Trichoderma reesei

Lee และ คณะ (64) ศึกษากลไกการย่อยสลายโดยเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจะเข้าทำปฏิกิริยากับเซลลูโลส ในบริเวณอะมอร์ฟัส และ คริสตัลไลน์พร้อม ๆ กัน แต่บริเวณอะมอร์ฟัสมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลไม่เป็นระเบียบ ดังนั้นโมเลกุลของเอนไซม์สามารถ

ผ่านเข้าไปย่อยสลายได้ง่ายกว่าบริเวณคริสตัลไลน์การย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ที่บริเวณผิว และย่อยสลายที่ละชั้นของไมโครไฟบริล

Teao และคณะ (65) กล่าวว่าการย่อยสลายเกิดขึ้นได้เร็วหรือช้าขึ้นกับโครงสร้างธรรมชาติของเซลลูโลส ระบบเอนไซม์ที่เข้าย่อยสลาย และอิทธิพลของสารยับยั้ง (50) ในแง่ของโครงสร้างเซลลูเลส พบว่า เซลลูเลสประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต (glycoprotein) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000-60,000 ดาลตัน (51) มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ Co-factor หรือโลหะอื่น ๆ ในการปฏิกิริยา โดยทั่วไปการที่เอนไซม์จะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อทำงานที่อุณหภูมิที่เหมาะสม นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์นี้มีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง คงทนต่อความเป็นกรดด่างได้กว้างระหว่างค่า 4.0-8.0 และคงทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส และ 4 องศงเซลเซียสได้เป็นเวลาหลายปี หรือสามารถเก็บโดยวิธี freeze dry หรือตกตะกอนด้วยอาซีโตนหรือเอธานอล โดยไม่เสียคุณสมบัติ (66)

6. การใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส

วัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสส่วนใหญ่มักเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทฟาง ข้าว แกลบ กากอ้อย ขุยมะพร้าว และเศษไม้ เป็นต้น ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากและหาได้ง่ายในทุกฤดูกาล วัสดุเหล่านี้ประกอบด้วยเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก (8) สามารถนำมาใช้ประโยชน์โดยตรงในอุตสาหกรรมหลายประเภท ดังแสดงในตารางที่ 5 นอกจากนี้ยังสามารถนำมาย่อยสลาย โดยวิธีทางเคมีหรือการใช้ประโยชน์ จะให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคสส่วนใหญ่ น้ำตาลกลูโคสนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อผลิตสารที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรม เช่น โปรตีนเซลล์เดี่ยว, ไวตามิน, กรดอินทรีย์ ยาปฏิชีวนะ และเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ (10) รวมทั้งใช้ในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล โดยเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มคลอสตริเดียม ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดในกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นบิวทานอล อาซีโตนและเอธานอล (11, 12)

ตารางที่ 6 การใช้ประโยชน์จากสารประกอบเซลลูโลสในปัจจุบัน (8)

วัสดุเซลลูโลสเหลือใช้	การใช้ประโยชน์ในปัจจุบัน
ชานอ้อย, ฟางข้าว, พืชไม้เนื้ออ่อน	อุตสาหกรรมการทำเยื่อและกระดาษเชื้อเพลิง อุตสาหกรรมการย่อยสลายด้วยกรด
ไม้พุ่ม, วงปีสั้น	อุตสาหกรรมการทำเยื่อและกระดาษ อุตสาหกรรมไม้อัด
เศษไม้จากในป่า	อุตสาหกรรมการทำเยื่อและกระดาษ อุตสาหกรรมไม้อัด
พีต (Peat)	เชื้อเพลิง เป็นตัวปรับปรุงคุณภาพดิน
เส้นใยเหลือใช้จากโรงทำเยื่อ	นำกลับมาใช้ในอุตสาหกรรมแผ่นกระดาษ
กระดาษ	เชื้อเพลิง
เศษกระดาษ	นำกลับมาใช้ในอุตสาหกรรมทำแผ่นกระดาษ อุตสาหกรรมการย่อยสลายด้วยกรด
เศษเปลือกไม้ต่าง ๆ	เชื้อเพลิง เป็นตัวปรับปรุงคุณภาพดิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. ประวัติการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล โดยการหมัก

ปี ค.ศ. 1801 Pasture เป็นบุคคลแรกที่ค้นพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตบิวทานอล และให้ชื่อว่า butyric acid-producing bacteria (67)

ปี ค.ศ. 1912 Dr.Chain Weizman ได้ศึกษากระบวนการหมักถึง 2 ปี และสามารถแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตอาซีโตนและบิวทานอล โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นวัตถุดิบและให้ชื่อว่า Clostridium acetobutylicum นับเป็นปีเริ่มต้นการหมักอาซีโตน-บิวทานอลในระดับอุตสาหกรรม (68)

ในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 ได้มีการผลิตอาซีโตนเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการทำวัตถุระเบิด ส่วนบิวทานอลได้ถูกเปลี่ยนเป็น butadien เพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมผลิตยางสังเคราะห์ (69)

ปี ค.ศ. 1930 ได้มีการแยก Clostridium saccharoacetobutylicum ที่ใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นวัตถุดิบในการหมักสำเร็จ (70)

ต่อมาปี ค.ศ. 1950-1970 เป็นช่วงที่ซบเซาของการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลจากการหมักเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของราคากากน้ำตาลและธัญญพืชที่เป็นวัตถุดิบมีราคาประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ของราคาผลผลิตที่ได้รวมทั้งน้ำมันดิบมีราคาถูกลง ทั่วโลกจึงหันไปสนใจผลิตบิวทานอลโดยการสังเคราะห์จากผลิตภัณฑ์น้ำมันปิโตรเลียมแทน (69, 71)

ปี ค.ศ. 1970 มีการเพิ่มของราคาน้ำมันดิบเป็น 4 เท่า ทำให้หันมานิยมที่จะใช้กระบวนการหมัก เพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอลอีกครั้ง (69)

8. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

จุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobicc Bacteria) ที่ใช้ในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลมีหลายชนิด (55) ได้แก่ แบคทีเรียที่อยู่ใน

8.1 ตระกูลบาซิลัส (Bacillus) ตัวอย่างเช่น Bacillus tetryl, Bacillus butacone และ Bacillus licheniformis เป็นต้น

8.2 ตระกูลคลอสตริเดียม (Clostridium) มีมากกว่า 20 สายพันธุ์ เช่น Clostridium acetobutylicum, Cl. butylicum และ Cl. pasteurianum เป็นต้น

ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตบิวทานอล (56) แสดงไว้ในตารางที่ 7

คลอสตริเดียมเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน น้ำ และตามต้นพืช เจริญได้ดีในอาหารคาร์โบไฮเดรต ทั้งที่เป็นโมเลกุลเดี่ยวและเป็นโพลีเมอร์ สามารถใช้โมเลกุลของไนโตรเจนในอากาศได้โดยตรง (ใช้กระบวนการตรึงไนโตรเจน) หรือใช้ในรูปอื่น เช่น แอมโมเนียมอิออน และกรดอะมิโน คลอสตริเดียมไม่ย่อยสลายเซลลูโลส เพราะไม่มีเอนไซม์เซลลูเลส นอกจากนี้ยังไม่มีเอนไซม์ไลเปส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตที่ทั่วไปคือ 35-37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 7 ชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตบิวทานอล (56)

หมายเลขสิทธิบัตรอเมริกัน	ชื่อของแบคทีเรีย	วัตถุดิบ	สัดส่วนตัวทำละลาย %			
			บิวทานอล	เอธานอล	อาซีโตน	ไอโซโพรพานอล
1,725,083	Bacillus saccharobutylicum beta	กากน้ำตาลชนิดอินเวอร์สและแคลเซียมคาร์บอเนต	75	-	3	35
1,908,361	Clostridium saccharobutylicum-gamma	กากน้ำตาลชนิดแบลคสทรันและแคลเซียมคาร์บอเนต	65-80	-	18-34	1-2
1,922,921	Cl. saccharobutyl-acetonicum	กากน้ำตาลชนิดแบลสทรันและโปรตีนจากข้าวโพดและแอมโมเนียมซัลเฟต	64	-	36	
2,017,572	Cl. viscifaciens	กากน้ำตาลชนิดอินเวอร์สและแคลเซียมคาร์บอเนต	66	-	3	31
2,050,219	Cl. saccharoacetobutylicum beta and gamma	กากน้ำตาลจากอ้อย และโปรตีนพวกแอมโมเนียหรือกากน้ำตาลที่เหลือจากการกลั่นเหล้า	68-73	1-3	26-32	
2,063,448	Cl. propyl butylicum	กากน้ำตาลชนิดอินเวอร์ส, แอมโมเนีย และแคลเซียมคาร์บอเนต	69-70	-	4-17	14-28 ผลรวมของไอโซโพรพานอลและเอธานอล
2,073,125	Cl. invertoacetobutylicum	กากน้ำตาลชนิดอินเวอร์ส และเกลือแอมโนเนียมหรือด่าง	66-70	2-3	27-31	
2,089,522	Cl. saccharoacetobutylicum	กากน้ำตาลชนิดอินเวอร์ส, แอมโมเนียมซัลเฟตและแคลเซียมคาร์บอนเนต	68-73	1-3	26-32	

ตารางที่ 7 (ต่อ)

หมายเลขสิทธิบัตรอเมริกัน	ชื่อของแบคทีเรีย	วัตถุดิบ	สัดส่วนตัวทำละลาย %			
			บิวทานอล	เอธานอล	อาซีโตน	ไอโซโพรพานอล
2,132,039	Cl. propyl butylicum alpha	กากน้ำตาลชนิดอินเวอร์ส, แอมโมเนียมซัลเฟต แคลเซียมคาร์บอนเนต, โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกเนเซียมซัลเฟต	65-70		5-10	16-26
2,139,108	Cl. saccharobutyl-acctonicum-liquefaciens -gamma and delta	กากน้ำตาลชนิดแบลคสทรัพ, แอมโมเนียมซัลเฟต แคลเซียมคาร์บอนเนต และไดฟอสฟอรัสเพนตะออกไซด์	58-74	2-6	24-36	
2,139,111	Cl. saccharobutyl acctonicum-liquefaciens -gamma and delta	กากน้ำตาลชนิดอินเวอร์ส, แอมโมเนียมซัลเฟต แคลเซียมคาร์บอนเนต และไดฟอสฟอรัสเพนตะออกไซด์	60-69	3-4.5	26-35	
2,147,487	B. butacone	กากน้ำตาลชนิดแบลคสทรัพ และโปรตีนจากสัตว์และพืช	65	-	28	
2,169,246	Cl. celerifactor	กากน้ำตาลชนิดอินเวอร์ส, แอมโมเนีย และแคลเซียมคาร์บอนเนต	60	2	38	
2,195,629	Cl. granulobacter acetobutylicum	กากน้ำตาล, โปรตีนจากข้าวโพด, เกลือแอมโมเนียม และแคลเซียมคาร์บอนเนต	60-75	1-10	25-30	
2,219,426	Cl. saccharobuly isopropyl acetonicum beta	กากน้ำตาลจากอ้อย และหัวบีท แอมโมเนียมซัลเฟต และแคลเซียมคาร์บอนเนต	60-85	-	15-40	0.1-4.0

ตารางที่ 7 (ต่อ)

หมายเลขสิทธิบัตรอเมริกัน	ชื่อของแบคทีเรีย	วัตถุดิบ	สัดส่วนตัวทำละลาย %			
			บิวทานอล	เอธานอล	อาซีโตน	ไอโซโพรพานอล
2,398,837	Cl. madisonii	กากน้ำตาลชนิดแบลคสทรัพ, แอมโนเนียม-ไฮดรอกไซด์, แอมโมเนียมซัลเฟต และแคลเซียมซัลเฟต	75-76	4-6	17-20	
2,420,998	Cl. amylosaccharobutyl-propylicum	กากน้ำตาลชนิดอินเวอร์ส, แอมโมเนียมซัลเฟต แคลเซียมคาร์บอนเนต และไดฟอสฟอรัสเพนตะ-ออกไซด์ หรือแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และไดฟอสฟอรัสเพนตะออกไซด์	65-72	น้อยมาก	2-4	26-32
2,439,791	Cl. saccharoaceloperbutylicum	กากน้ำตาลชนิดอินเวอร์ส, แอมโมเนียมซัลเฟต แคลเซียมคาร์บอนเนต และไดฟอสฟอรัสเพนตะ-ออกไซด์ หรือแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และไดฟอสฟอรัสเพนตะออกไซด์	69-76	2-7	18-25	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาซิโตน-บิวทานอล

เนื่องจากคลอสตริเดียมเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีทั้งในอาหารที่มีน้ำตาลเฮกโซส และเพนโตส ได้หลายชนิด (70) วัตถุดิบที่ใช้จึงเป็นคาร์โบไฮเดรตทั้งที่เป็นโมเลกุลเดี่ยวและเป็นโพลีเมอร์ โดยพวกที่เป็นลิกโนเซลลูโลส เมื่อผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์ ก็จะได้น้ำตาลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับคลอสตริเดียมได้ เราสามารถจำแนกชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักได้ดังนี้ (71)

1. ผลผลิตทางเกษตรกรรม เช่น ข้าวสาลี มันฝรั่ง มันสำปะหลัง บีท (beet) แป้งข้าวโพด (maize) และข้าวชนิดต่าง ๆ เป็นต้น

2. วัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น กากน้ำตาล (molasses) หางนม (whey) กากจากโรงงานผลิตเบียร์ (brewing bagasses) น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ (sulfite liguor) เป็นต้น

3. วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรกรรม เช่น ฟางข้าวต่าง ๆ ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ขี้เลื่อยหรือเศษไม้เป็นต้น

ชนิดของน้ำตาลที่ใช้ในการหมักบิวทานอลโดยเชื้อคลอสตริเดียมแสดงไว้ในตารางที่ 8

สำหรับการใช้วัถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสนั้น ได้เริ่มทำการศึกษามาโดยในช่วงแรกจะใช้การย่อยสลายด้วยกรดที่สภาวะรุนแรง เพื่อให้ได้น้ำตาลจำนวนมาก แต่มักประสบปัญหาเนื่องจากน้ำตาลที่ได้เหล่านี้บางส่วนถูกทำปฏิกริยากับกรดกลายเป็นสารยับยั้ง (Inhibitor) ต่อการเจริญเติบโตของคลอสตริเดียม (75) จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้น้ำตาลจากการย่อยสลาย (Hydrolyzate) ได้โดยตรง จึงมีการหาวิธีการกำจัด เช่น การเติมปูนขาว เพื่อตกตะกอน (73) สารยับยั้งเหล่านี้การใช้ไอน้ำผ่านและการใช้ผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon) (74) เป็นต้น แม้จะให้ผลดีต่อการเจริญเติบโตแต่ก็มีการสูญเสียน้ำตาลส่วนหนึ่งไปกับกระบวนการกำจัด ในช่วงต่อมาจึงมีการใช้เอนไซม์มาช่วยในการย่อยสลาย โดยจะให้น้ำตาลที่บริสุทธิ์มากกว่า (76) ไม่มีปัญหายุ่งยากในการกำจัดสารยับยั้ง เพราะการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะทำในภาวะที่ไม่รุนแรง จึงไม่มีสารยับยั้งเกิดขึ้น

Baba และคณะ (77) ได้ทำการศึกษาโดยใช้กากน้ำตาล (blackstrap molasses) ที่มีน้ำตาลซูโครส 50-55 เปอร์เซ็นต์ เป็นวัตถุดิบในการหมักอาซิโตน-บิวทานอล โดยเชื้อ Cl. toanum ได้ผลผลิตเป็นบิวทานอล 52.92, อาซีโตน 42.74, 2-โปรปานอล 42.74 และเอธานอล 3.20 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 8 ชนิดของน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยเชื้อคลอสตริเดียม

สารอาหาร	จุลินทรีย์	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	% การเปลี่ยนเป็นผลผลิต	ตัวทำละลายรวม (กรัม/ลิตร)	ชนิดของผลิตภัณฑ์ (กรัม/ลิตร)			เอกสารอ้างอิง
					บิวทานอล	อาซิโตน	เอธานอล	
กลูโคส	Cl. acetobutylicum ATCC 824	96	32	20.8	15.0	4.5	1.3	74
กลูโคส	Cl. butylicum NRRL B592	110	28.2	14.1	ม.	ม.	ม.	74
กลูโคส	Cl. acetobutylicum P262	58	32	12.7	9.0	3.4	0.3	78
ไซโลส	Cl. acetobutylicum ATCC 824	144	28	28.0	8.9	3.9	1.3	74
อราบิโนส	Cl. acetobutylicum ATCC 824	99	29	16.5	10.5	4.5	1.5	74
แลคโตส	Cl. acetobutylicum P 262	96	38	9.5	6.7	2.6	0.2	71
กาแลคโตส	Cl. acetobutylicum P 262	42	31	10.0	7.1	2.7	0.2	71

หมายเหตุ : ม. = ไม่ได้รายงานไว้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล

วัตถุดิบ	จุลินทรีย์	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	% การเปลี่ยนเป็นผลผลิต	ตัวทำละลายรวม (กรัม/ลิตร)	ชนิดของผลิตภัณฑ์ (กรัม/ลิตร)			เอกสารอ้างอิง
					บิวทานอล	อาซิโตน	เอธานอล	
หางนม (whey)	Cl. acetobutylicum P 262	39	42	9.5	7.0	2.5	-	78
แป้งข้าวโพด	Cl. acetobutylicum No. 105	72	26.7	13.3	7.2	4.3	1.8	83
กากน้ำตาล (molasses)	Cl. acetobutylicum P262	30-36	31-32	16-18	ม.	ม.	ม.	92
แป้งมันมันสำปะหลัง	Clostridium No. 8p-2	25-30	29.22	14.03	9.82	3.95	0.25	93
แป้งมันมันสำปะหลัง	Cl. butylicum NRRL B592	68.5	39.73	14.63	9.51	4.86	0.26	94

หมายเหตุ : ม. = ไม่ได้รายงานไว้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Wiley (77) ก็ทดลองใช้น้ำเสียที่มีซัลไฟต์ (waste sulfite liquor) ผลิตอาซีโตน-บิวทานอล โดยใช้เชื้อ Cl. butylicum และใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าให้ผลผลิตเป็นบิวทานอล 75, อาซีโตน 20 และเอธานอล 5 เปอร์เซ็นต์

Sjolander และคณะ (73) ศึกษาการใช้น้ำตาลจากการย่อยสลายเศษไม้พวกแฮมล็อค และบีชด้วยกรดที่อุณหภูมิสูง แล้วปรับสภาพน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายด้วยปูนขาว ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ Cl. felsineum และ Cl. butylicum ที่คัดแยกได้เอง จากผลการศึกษาพบว่าสามารถให้ปริมาณผลผลิตเป็นบิวทานอลสูง

Leonard และคณะ (76) ศึกษาใช้ไม้เมเปิลที่ย่อยสลายด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ สารละลายกรดซัลฟูริกที่อุณหภูมิ 181 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และย่อยไม้โอ๊คและไม้เฟอร์ด้วย 1.8 เปอร์เซ็นต์ สารละลายกรดซัลฟูริกที่ 173 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที ใช้ในการผลิตบิวทานนอล โดยเปรียบเทียบความสามารถการผลิตบิวทานอลระหว่างเชื้อ Cl. butylicum สายพันธุ์ No.39, Cl. butylicum No.3, Cl. butylicum No.61, Cl. beijerinki, No.67 และ Cl. felsinum Carbon No.41 พบว่าเชื่อ Cl. butylicum No.39 ให้ผลผลิตดีที่สุด

Langlykke (77) ได้ศึกษาการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลโดยใช้น้ำตาลจากการย่อยสลายซังข้าวโพดด้วยกรดตามวิธีของ Dunning และ Lathrop โดยใช้เชื้อ Cl. butylicum NRRL B-592 ผลผลิตที่ได้เป็นบิวทานอล 61.7, อาซีโตน 31.8 และเอธานอล 61 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการเกิดสารยับยั้งจากกระบวนการย่อยสลายด้วยกรด พบว่ามีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Cl. butylicum

Abe, Suzuki และคณะ (79) ศึกษาการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล จากเส้นใยของเซลลูโลส ใช้เอนไซม์เซลลูเลสช่วยในการย่อยสลายเส้นใย โดยใช้เชื้อ Cl. acetobutylicum ทำการหมักที่สภาวะ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้ผลผลิตเป็นบิวทานอล 7.53 กรัมต่อลิตร และ อาซีโตน 4.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Compere และคณะ (80) ศึกษาการผลิตอาซีโตนและบิวทานอลจากคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ โดยใช้เชื้อคลอสตริเดียม 5 สายพันธุ์ ได้แก่ Cl. acetobutylicum NRRL B527 และ NRRL B3179 Cl. pasteurianum NRRL B598 ทำการหมักร่วมกับเชื้อ Klebsiella pneumoniae NRRL B427

Guibet และคณะ (81) ได้นำวัสดุเหลือทิ้งพวกเซลลูโลสเช่นเศษกระดาษ, ฟาง หรือเศษไม้ต่าง ๆ มาตากแห้งและย่อยสลายด้วย 6 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วหมักที่ 25-40 องศาเซลเซียส ในช่วงความเป็นกรดด่างระหว่าง 4-7.5 ใช้เชื้อ Cl. acetobutylicum สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 เปอร์เซ็นต์ เพื่อผลิตบิวทานอล และเชื้อ Cl. propylbutylicum เพื่อผลิตไอโซโพรพานอลและบิวทานอล

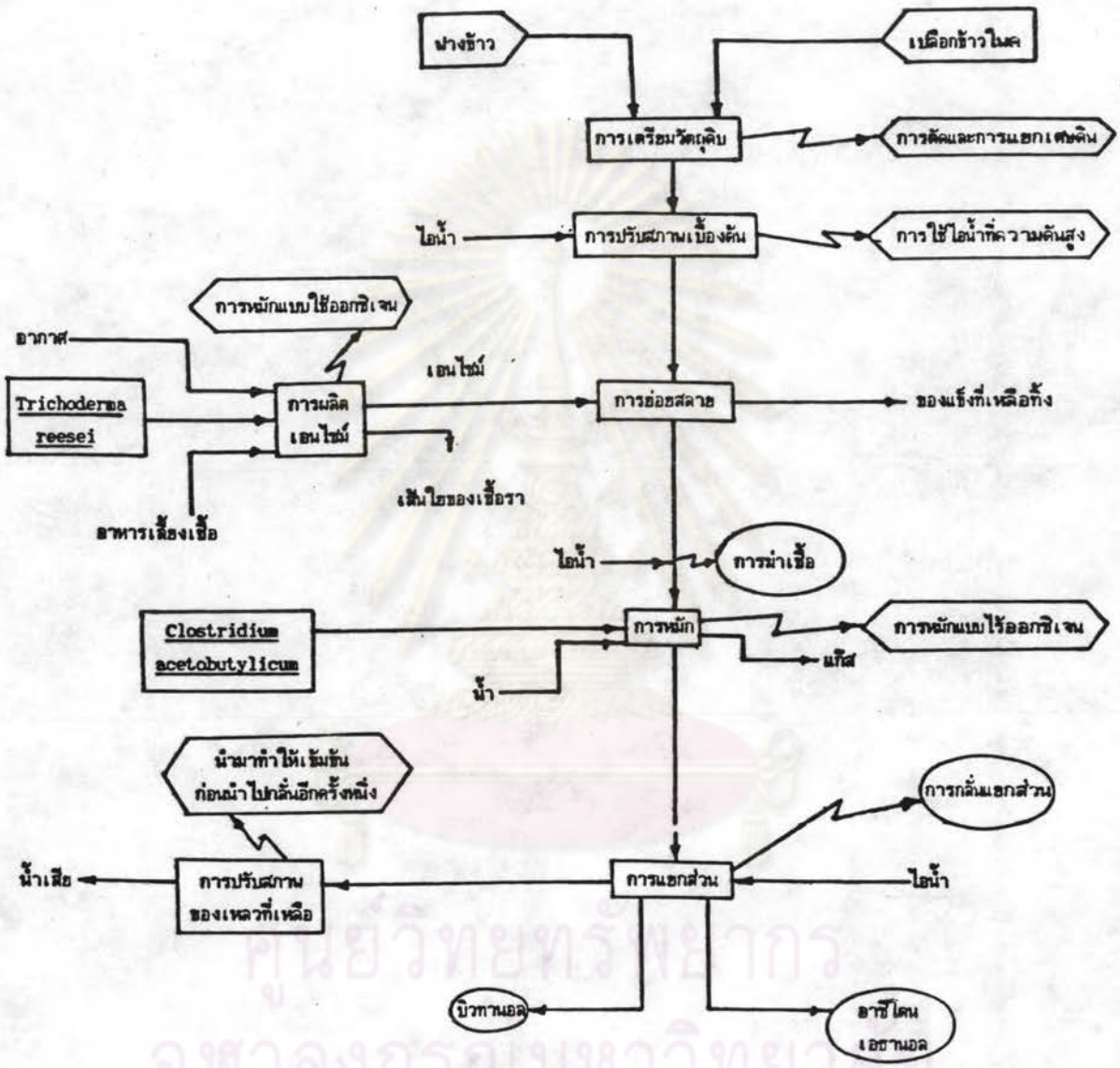
Mes-Hartree และคณะ (82) ใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบในการหมักของเชื้อ Cl. acetobutylicum จากการศึกษาพบว่า เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นวัตถุดิบ เชื้อจะสามารถผลิตปริมาณบิวทานอลได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้น้ำตาลชนิดอื่นจะให้ผลผลิตรองลงมาตามลำดับ คือ แมนโนส > ไซโลส > กาแลคโตส และยังพบอีกว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มความสามารถของเชื้อในการใช้น้ำตาลไซโลส

Peterson และคณะ (83) ใช้แป้งข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในการหมักของเชื้อ Cl. acetobutylicum No.105 พบว่าสามารถผลิตบิวทานอลได้ 72, อาซีโตน 4.3 และเอธานอล 1.8 กรัมต่อลิตร

Saddler และคณะ (84) ได้ทำการศึกษาการหมักโดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายไม้แอสเพนเป็นวัตถุดิบของเชื้อ Cl. acetobutylicum และ Klebsiella pneumoniae จากการทดลองพบว่า Cl. acetobutylicum จะผลิตบิวทานอลในปริมาณที่น้อย ส่วน K. Pneumoniae จะได้ 2, 3-บิวทานีไดออล, เอธานอล, กรดอะเซติก ได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลผลิตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

Maddox (85) ทำการย่อยสลายไม้ ไพนัส เรดิเอต้า ได้น้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการหมักอาซิโตน-บิวทานอล โดยใช้เชื้อ Cl. acetobutylicum ได้ปริมาณบิวทานอลหลังการหมัก 5.7 กรัมต่อลิตร และการเปลี่ยนเป็นผลผลิตมีค่า 17 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำตาลจากการย่อยสลายที่มีการปรับสภาพ โดยใช้การผ่านด้วยไอน้ำและผงถ่านกัมมันต์แล้ว เนื่องจากเชื้อไม่สามารถหมักน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายที่ได้โดยตรง

Yu และคณะ (86) ศึกษาการใช้น้ำตาลจากการย่อยสลายไม้แอสเพน โดยทำการหมักเชื้อ Cl. acetobutylicum ได้ผลผลิตเป็นบิวทานอล 9 กรัมต่อลิตร เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลผลิตมีค่า 26 และยังทำการหมักร่วมกับเชื้อ K. pneumoniae ได้ผลผลิต



รูปที่ 11 แสดงกระบวนการเปลี่ยนวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสให้เป็นอาซีโตน-บิวทานอล (89)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 การผลิตอาซิโตน-บิวทานอล จากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส

ชนิดของวัตถุดิบ	การย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์	จุลินทรีย์	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	% การเปลี่ยนเป็นผลผลิต	ตัวทำละลายรวม (กรัม/ลิตร)	ชนิดของผลิตภัณฑ์ (กรัม/ลิตร)			เอกสารอ้างอิง
						บิวทานอล	อาซิโตน	เอธานอล	
ไม้เมเปิ้ล	3 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, 181 องศาเซลเซียส, 30 นาที	Cl. butylicum No. 39	120	38.0	12.27	9.0	3.4	0.1	80
ไม้โอ๊ค	1.8 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส, 5 นาที	Cl. butylicum No. 39	120	29.0	9.41	6.1	2.92	0.39	80
ไม้สน	1.8 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, ที่อุณหภูมิ 173 องศาเซลเซียส, 5 นาที	Cl. butylicum No. 39	120	32	5.02	3.21	1.59	0.22	80
ไม้แฮมลอค	0.2-1.0 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, 2-3 นาที	Cl. felsineum ที่คัดแยกได้	120	34.0	7.23	4.26	1.74	1.23	84
ไม้บีช	0.2-1.0 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, 2-3 นาที	Cl. felsineum ที่คัดแยกได้	120	31.0	7.69	4.31	1.38	2.0	84
ไม้แฮมลอค	0.2-1.0 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, 2-3 นาที	Cl. butylicum ที่คัดแยกได้	120	24.91	7.22	5.92	0.40	0.90	84
ไม้บีช	0.2-1.0 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, 2-3 นาที	Cl. butylicum ที่คัดแยกได้	120	21.50	5.47	4.47	0.33	0.67	84

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ชนิดของวัตถุดิบ	การย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์	จุลินทรีย์	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	% การเปลี่ยนเป็นผลผลิต	ตัวทำละลายรวม (กรัม/ลิตร)	ชนิดของผลิตภัณฑ์ (กรัม/ลิตร)			เอกสารอ้างอิง
						บิวทานอล	อาซิโตน	เอธานอล	
ไม้สนที่ผ่านไอน้ำที่ 148 องศาเซลเซียส, 35 นาที	0.5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, ที่อุณหภูมิ 185 องศาเซลเซียส, 140 นาที	Cl. acetobutylicum NCIB 2951	120-168	17.0	6.2	5.7	0.5	-	94
ไม้แอสเพนที่ผ่านไอน้ำ 240 องศาเซลเซียส, 30 นาที	3 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก, ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส, 4 ชั่วโมง	Cl. acetobutylicum ATCC 824	48	26.0	13.17	9.0	3.03	1.14	86
กากทิ้งจากโรงงานเบียร์	0.3 โมลาร์ ของสารละลายไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส, 5 ชั่วโมง	Cl. acetobutylicum ATCC 824	60	11.21	1.30	0.94	0.25	0.11	95
ฟางข้าวสาลีที่ผ่านไอน้ำในสภาพกรด 200 องศาเซลเซียส, 2 นาที	เอนไซม์ของ T. reesei CL 847	Cl. acetobutylicum ที่คัดแยกได้	60	35.7	19.0	10.1	7.9	1.0	91
เส้นใยเซลลูโลสบริสุทธิ์	เอนไซม์ของ T. reesei	Cl. acetobutylicum ที่คัดแยกได้	48	40	11.96	7.53	4.43	-	79

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ชนิดของวัตถุดิบ	การย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์	จุลินทรีย์	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	% การเปลี่ยนเป็นผลผลิต	ตัวทำละลายรวม (กรัม/ลิตร)	ชนิดของผลิตภัณฑ์ (กรัม/ลิตร)			เอกสารอ้างอิง
						บิวทานอล	อาซิโตน	เอทานอล	
ฟางข้าวสาลีที่ปรับสภาพด้วย 10% โซเดียมไฮดรอกไซด์, 30 นาที	เอนไซม์ของ T. reesei	Cl. acetobutylicum ที่คัดแยกได้	36	18.3	17.3	10.3	7.4	0.1	91

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็น 2, 3-butanediol ประมาณ 20 กรัมต่อลิตร เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลผลิตมีค่า 50

Marchal และคณะ (90) ใช้ฟางข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อรา Trichoderma ressei ย่อยสลายได้น้ำตาลสำหรับเชื้อ Cl. acetobutylicum IFP 921 จากผลการทดลองพบว่าจะได้ปริมาณตัวทำละลายรวม 17.3 กรัมต่อลิตร ในเวลา 36 ชั่วโมง

Forsberg (88) ได้ใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการย่อยสลายไม้ peat เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาซิโตน-บิวทานอล น้ำตาลเหล่านี้ได้แก่ น้ำตาลกาแลคโตส, กลูโคส, ไซโลส, แมนโนส, อะราบิโนส และเซลโลไบโลส พบว่าเชื้อ Cl. acetobutylicum และ Cl. butylicum จะใช้น้ำตาลกาแลคโตสได้ช้าที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น ส่วน Cl. thermohydrosulfuricum ก็ใช้น้ำตาลการแลคโตสได้ช้าเช่นเดียวกับเชื้อทั้งสองในการผลิตเอธานอล

Marchal (91) ได้นำวัตถุเหลือทิ้งจากการเกษตรพวกฟางข้าวสาลีและเปลือกข้าวโพดมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ได้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสเป็นส่วนใหญ่ ทำการผลิตอาซิโตน-บิวทานอล โดยใช้เชื้อ Cl. acetobutylicum

Voget และคณะ (89) ได้ใช้น้ำและกากแอปเปิลเป็นวัตถุดิบในการหมักโดยเชื้อ Cl. acetobutylicum NRRL B596, Cl. butylicum NRRL B592 และ Cl. butylicum NRRL B593 พบว่าจะให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลผลิตมีค่าเป็น 22, 25 และ 26 ตามลำดับ โดยน้ำและกากแอปเปิลนี้จะประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตส 67, กลูโคส 23 และซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์

Marchal และคณะ (87) ใช้ผักเจอรูซาเลม อาร์ติโชค (jerusalem artichoke) มาย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกใช้ในการหมักของเชื้อ Cl. acetobutylicum พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลผลิตมีค่า 35.7

10. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตอาซิโตน-บิวทานอล

ในกระบวนการหมักจะได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด โดยผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นแก๊สประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ตัวทำละลาย 30 เปอร์เซ็นต์ นอกนั้นเป็นการคอนทรีย์พวกกรดบิวทีริคและ

กรดอะเซติก อะเซทิลเมธิลคาร์บินอล (acetylmethylcarbinol) เยลโลว์ออยล์ (yellow oils) การที่เหลือจากการหมักจะเป็นพวกโปรตีน วิตามินบีและไรโบฟลาวิน (77)

ปริมาณผลิตภัณฑ์ได้จากการหมักวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก เมื่อใช้วัตถุดิบเป็นกากน้ำตาล และแป้งข้าวโพด

วัตถุดิบ	ผลิตภัณฑ์ (%)		อัตราส่วนของตัวทำละลาย (%)			องค์ประกอบของแก๊ส (%)	
	ตัวทำละลาย	แก๊ส	บิวทานอล	อาซิโตน	เอธานอล	คาร์บอนไดออกไซด์	ไฮโดรเจน
กากน้ำตาล	30	70	76-61	20-25	4	67	33
แป้งข้าวโพด	30	70	60	30	10	60	40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. การศึกษาเกี่ยวกับ Cl. acetobutylicum

11.1 ลักษณะทั่วไป

Cl. acetobutylicum เป็นแบคทีเรียย้อมติดสีกรัมบวก รูปร่างเป็นแท่งขนาด 0.6-0.9 ไมโครเมตร x ขนาด 2.4-4.7 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลารอบเซลล์ (Peritrichous flagella) สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่ (Oval) มีตำแหน่งของเอนโดสปอร์ค่อนข้างไปทางปลายเซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง (Subterminal) ไม่มีเอกโซสปอร์เรียม (Exosporium) ไม่มีระยางค์ (appendage) ผนังเซลล์ประกอบด้วย DL-diaminopimelie acid ลักษณะโคโลนีกลม (circular) ขอบไม่เรียบ (irregular) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร สีของโคโลนีเป็นสีครีม ผิวเป็นมันและโปร่งแสง เจริญได้ดีในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต ในภาวะไร้ออกซิเจน ผลผลิตจากการหมักคาร์โบไฮเดรตจะได้กรดบิวทีริค กรดอะเซติก บิวทานอล อาซีโตนและเอธานอล สามารถตริงไนโตรเจนได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แหล่งที่พบสามารถพบได้ทั่วไปในดิน (96)

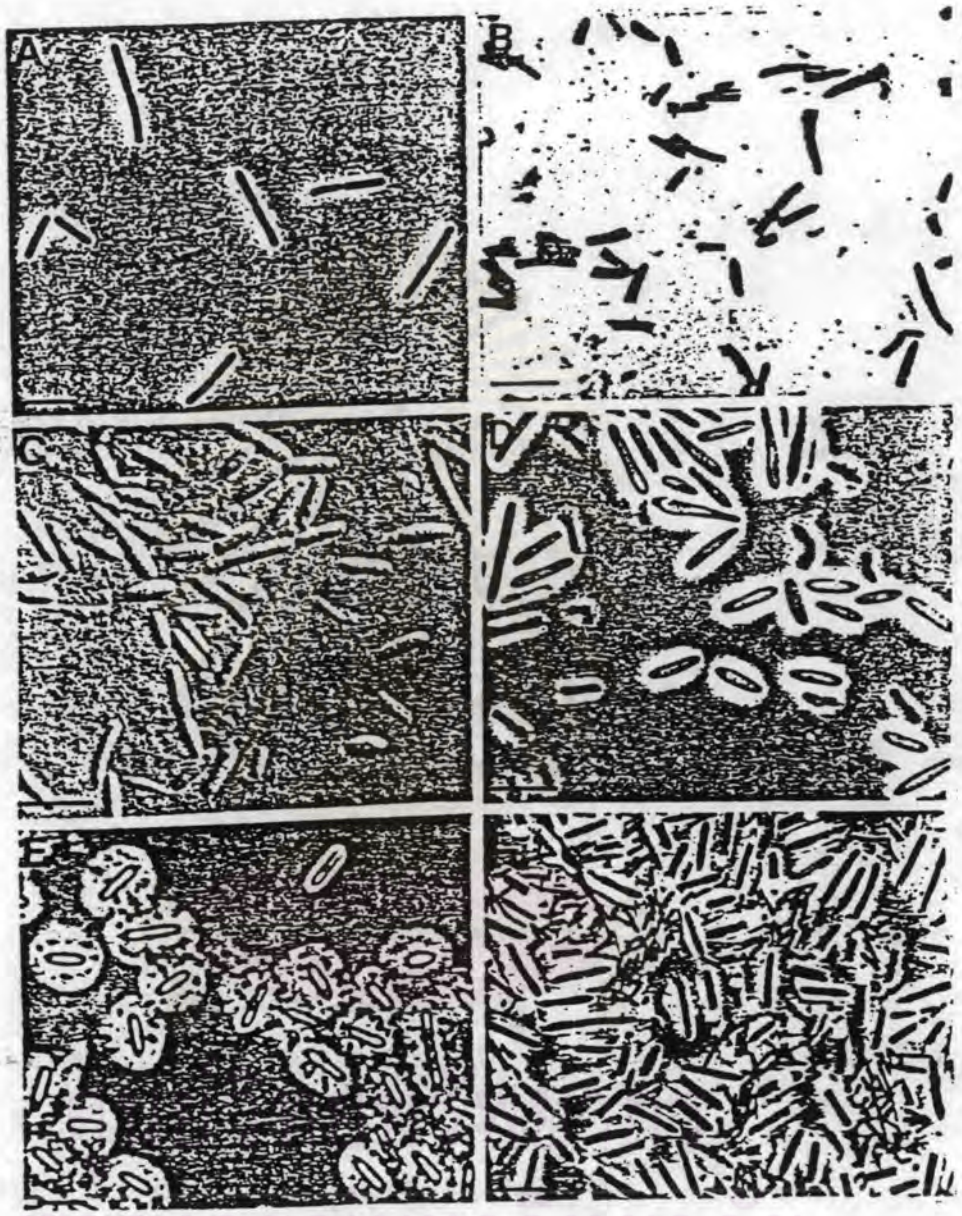
11.2 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาในระหว่างการหมัก

Peterson และ Fred (97) ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ Cl. acetobutylicum ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่าในช่วงแรกของภาวะการเจริญเติบโตสูงสุด จะได้เซลล์รูปร่างเป็นแท่งยาว (rod) อายุน้อยแข็งแรงและสามารถแบ่งตัวได้รวดเร็ว มีความยาวประมาณ 4.7 ไมครอน และความกว้าง 0.72 ไมครอน เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้นและผ่านช่วงการแบ่งตัวได้ปริมาณเซลสูงสุด ในราวชั่วโมงที่ 27-30 ของการเติมกล้าเชื้อ (Inoculate) เซลล์จะมีขนาดลดลง โดยมีความยาวเฉลี่ย 3.7 ไมครอนและความกว้าง 0.72 ไมครอน เซลล์ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนรูปร่างเป็น club-shaped cell (Clostridia form) ที่มีขนาดใหญ่กว่า vegetative cell คือ มีขนาด 4.7 ไมครอน x 1.6 ไมครอน จับตัวกันเป็นแพไม่เคลื่อนที่ และเมื่อเชื้ออายุได้ 60-70 ชั่วโมง พวก vegetative cell จะลดจำนวนลงกลายเป็นพวกที่มีลักษณะ Clostridia ทั้งหมดและเกิดสปอร์ (spore) ภายในเซลล์มีขนาด 2.4 ไมครอน x 1.2 ไมครอน ลักษณะการจับกลุ่มเป็นแพจะหายไปในช่วงนี้

John และคณะ (95) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแบบสัณฐานวิทยาของเชื้อ Cl. acetobutylicum P262 ที่แตกต่างกันไปตามอายุของจุลินทรีย์ ในระหว่างการผลิตอาซีโตนและบิวทานอลระดับอุตสาหกรรม ซึ่งสรุปไว้ในตารางที่ 12 และรูปที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ Cl. acetobutylicum P262 ตามระยะเวลาของการหมัก (95)

ระยะเวลา (ชม.)	สัณฐานวิทยา (morphology)
0 - 6	เซลล์รูปร่างเป็นแท่งอยู่เดี่ยว ๆ หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ มีการเคลื่อนที่ช้า
6 - 14	เซลล์เริ่มมีการแบ่งตัว มีขนาดยาว และเคลื่อนที่รวดเร็ว
14 - 18	เซลล์มีขนาดสั้นลง และเริ่มสร้าง granulose ขึ้นภายในเซลล์และเคลื่อนที่เร็ว
18 - 20	เซลล์ส่วนใหญ่จะสร้าง granulose ภายในเซลล์มีรูปร่างโตขึ้นและไม่มีการเคลื่อนที่
20 - 36	เซลล์จะพองออก (swollen) กลายเป็นแบบ Clostridial form หรือรูปร่างแบบซิการ์และบางเซลล์เริ่มสร้างเอนโดสปอร์
36 ชม. ขึ้นไป	เซลล์ทั้งหมดจะสร้างเอนโดสปอร์ และในที่สุดจะสลายตัวเหลือแต่สปอร์



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ Cl. acetobutylicum P262 (95)

A : เซลล์ที่มีรูปร่างเป็นแท่ง อายุน้อย และเคลื่อนที่รวดเร็ว

B : เซลล์มีการสร้าง granulose ขึ้นภายในเซลล์

C : เซลล์พองออกกลายเป็นรูปซิการ์ (cigar) เรียกว่าลักษณะ clostridial

D : เกิด endospore ภายในเซลล์

E, F : สปอร์และเซลล์ที่สลายตัว

11.3 ลักษณะการเคลื่อนที่ของคลอสตริเดียม

ความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของเซลล์กับการผลิตแอลกอฮอลได้ถูกศึกษามาเป็นเวลานานแล้วว่า ถ้าเซลล์ไม่มีการเคลื่อนที่เลยตลอดการหมักจะให้ผลผลิตที่ต่ำ เช่นเดียวการหมักที่มีการเคลื่อนที่ของเซลล์น้อย (99)

การเคลื่อนที่ของเชื้อคลอสตริเดียมจะอพยพจากที่มีความแตกต่างของความเข้มข้นของ attractant (positive chemotaxis) และ repellants (negative chemotaxis) (97) โดยพวก attractant ที่สำคัญจะเป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ และกรดอะมิโนบางชนิด (98, 96, 99) ในขณะที่ repellents จะได้แก่พวกแอลกอฮอล และกรดอ่อน (75) ซึ่งสามารถแบ่งลักษณะการเคลื่อนที่ของเชื้อได้ 2 ลักษณะ

1. การวิ่งในลักษณะเป็นเส้นตรงประมาณ 2-3 วินาที

2. การหกคะเมน (tumbles) ในช่วงเสี้ยววินาที

โดยเซลล์จะอพยพไปในทิศทางที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของattractant จะเคลื่อนที่ในลักษณะการวิ่งที่นานขึ้น และมีการหกคะเมนน้อยลง ส่วนในสภาวะที่มีrepellents เซลล์จะมีการหกคะเมนมากขึ้น

Gutierez และ Maddox (100) ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ Cl. acetobutylicum ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง โดยใช้กล้าเชื้อที่มีอายุน้อยประกอบด้วยเซลล์ที่มีการเคลื่อนที่ทั้งหมด ภายหลังการเติมกล้าเชื้อ เซลล์ส่วนใหญ่จะหยุดการเคลื่อนที่ ต่อมาภายหลังชั่วโมงที่ 2 เซลล์จะคืนตัวและมีการเคลื่อนที่โดยการวิ่งอย่างรวดเร็วในระยะเวลานานโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงทิศทางในชั่วโมงที่ 6 ก็จะเริ่มมีการหกคะเมนเล็กน้อย ในช่วงที่ 10 เซลล์ ส่วนใหญ่จะหกคะเมน ยกเว้นบางเซลล์ที่ยังคงมีการวิ่งอยู่ และภายหลังชั่วโมงที่ 24 เซลล์จะเริ่มเปลี่ยนรูปร่างเป็น Clostridia ซึ่งไม่มีการเคลื่อนที่

ดังนั้น การวิ่งของเซลล์จะเกิดควบคู่ไปกับภาวะการใช้น้ำตาล และการสร้างกรด ส่วนการหกคะเมนจะเพิ่มจำนวนครั้งมากขึ้นเมื่อมีการสร้างแอลกอฮอล

11.4 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงการชีวเคมีของการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล

Prescott และ Dunn (110) ได้ทำการศึกษาชีวเคมีของการหมักของเชื้อ Cl. acetobutylicum โดยสรุปว่า กระบวนการหมักนั้น จะเกิดขึ้นเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

11.4.1 ขั้นการสร้างกรดอินทรีย์ (acidogenesis)

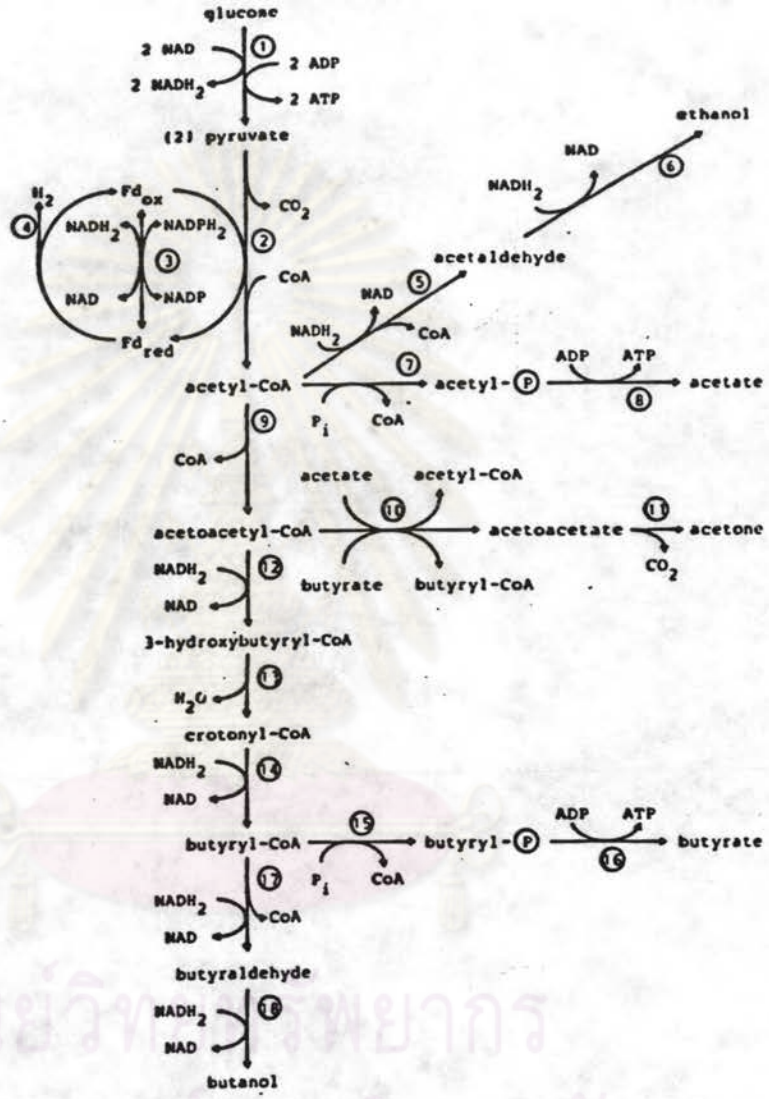
ในขั้นตอนนี้คลอสตริเดียมจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (exponential growth) เริ่มการสร้างกรดอะเซติกและตามด้วยการสร้างบิวทีริคปล่อยออกมานอกเซลล์ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าลดลงเรื่อย ๆ ตามปริมาณกรดที่เกิดขึ้น จนกระทั่งถึงจุดหนึ่งที่ค่าความเป็นกรดด่างมีค่าต่ำสุด เรียกว่าจุดหัก (break point) ของการหมักจะเริ่มเข้าสู่ขั้นที่ 2 ในขั้นตอนการสร้างกรดนี้ จุลินทรีย์จะผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนออกมาตลอดเวลา ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นนี้จะผลยับยั้งทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลง

11.4.2 ขั้นตอนการสร้างตัวทำละลาย (solventogenesis)

จุลินทรีย์จะสร้างกรดน้อยลง เนื่องจากถูกยับยั้งการเจริญเติบโตจากปริมาณกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์จะเริ่มใช้กรดเหล่านี้ร่วมกับแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณกรดบางส่วนที่ถูกใช้ไปนี้จะมีผลทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารสูงขึ้น กรดจะถูกเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายคือ บิวทานอล อาซิโตน และเอธานอล ส่วนแก๊สยังสร้างขึ้นเรื่อย ๆ แต่ในปริมาณที่น้อยลงจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก โดยคลอสตริเดียมจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตจากความเข้มข้นของตัวทำลายที่ผลิต

11.5 ชีวเคมีของกระบวนการผลิตอาซิโตน-บิวทานอลโดยการหมัก

ในการสร้างผลิตภัณฑ์ กลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (pyruvate) โดยวงจร Embdem-Meyerhof-Parnas (EMP) หลังจากนั้นไพรูเวทถูกเปลี่ยนเป็นอะเซทิล-โคเอ (acetyl-CoA) พร้อมกับใช้แก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออไซด์ออกจาก อะเซทิล-โคเอ ซึ่งเป็นตัวกลางจะถูกเปลี่ยนอีกทีให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ อาซิโตน บิวทานอล เอธานอล ดังแสดงไว้ในรูปที่ 13



รูปที่ 13 วิถีเมตาบอลิซึมของการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 13 เขียนเป็นสมการหลักของปฏิกิริยาที่สำคัญของการสร้างผลิตภัณฑ์ (สมการสมดุลย์เฉพาะคาร์บอน, ATP, $NADH_2$ และ FdH_2) และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ตามหมายเลขของปฏิกิริยา ได้ดังนี้

1. การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นไพรูเวท โดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof Panas (ปฏิกิริยา 1)

$C_6H_{12}O_6$ ——Phosphoenolpyruvate, Phosphotransferase system——> $2CH_3COCOOH + 2ATP + 2NADH$

กลูโคส — ไพรูเวท

2. การสร้างอะเซทิล-โคเอ จากไพรูเวท (ปฏิกิริยา 2)

$CH_3COCOOH$ ——Pyruvate-ferredoxin Oxidoreductase——> $CH_3COCoA + FdH_2 + CO_2$

ไพรูเวท — อะเซทิล-โคเอ

3. การสร้างไฮโดรเจนจากเฟอริดอกซินรูปรีดิวซ์ (FdH_2) (ปฏิกิริยา 3)

FdH_2 ⟸ Hydrogenase ⟹ H_2

เฟอริดอกซิน — ไฮโดรเจน

4. ปฏิกิริยารีดักชันของ NAD โดยเฟอริดอกซินรูปรีดิวซ์ (ปฏิกิริยา 4)

FdH_{12} ⟸ NADH-ferredoxin Oxidoreductase ⟹ $NADH_2$

5. การสร้างกรดอะเซติกจากอะเซทิล โคเอ (ปฏิกิริยา 13-14)

CH_3COCaA ----------> $CH_3COOH + ATP$

Phosphotransaceylase (ปฏิกิริยาที่ 13)

acetate kinase (ปฏิกิริยาที่ 14)

6. การสร้างบิวทิริล โคเอ จากอะเซทิล โคเอ (ปฏิกิริยา 5-8)

$3CH_3COCoA + 2NADH_2$ ----------> $CH_3CH_2CH_2CoA$

อะเซทิล โคเอ บิวทิริล โคเอ

acetyl-CoA-acetyl transferase (ปฏิกิริยา 5)

L(+)-B-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (6)

L-3-hydroxyacyl-CoA hydrolase (ปฏิกิริยา 7)

butyryl-CoA dehydrogenase (ปฏิกิริยา 8)

7. การสร้างกรดบิวทิริคจากบิวทิริล โคเอ มี 2 วิถี

7.1 การสร้างกรดบิวทิริคจากบิวทิริลโคเอและกรดอะซิติก (ปฏิกิริยา 9)

$CH_3CH_2CH_2COCoA + CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3CH_2CH_2COOH + CH_3COCoA$

COA transferase

บิวทิริล โคเอ อะเซติก บิวทิริค อะเซทิล โคเอ

7.2 การสร้างกรดบิวทิริคจากบิวทิริล โคเอ โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์

Phosphotransbutyrylase (ปฏิกิริยา 11) butyrate kinase (ปฏิกิริยา 12)

$CH_3CH_2CH_2CoA$ ----------> $CH_3CH_2CH_2COOH + ATP$

บิวทิริล โคเอ บิวทิริค

8. การสร้างบิวทานอลจากบิวทิริล โคเอ (ปฏิกิริยา 18-19)

$CH_3CH_2CH_2COCoA + 2NADH_2 \longrightarrow CH_3CH_2CH_2CH_2OH$

บิวทิริล โคเอ — บิวทานอล

butyraldehyde dehydrogenase (ปฏิกิริยา 18)

butanol dehydrogenase (ปฏิกิริยา 19)

9. การสร้างอาซีโตนจากอะเซทิล โคเอ (ปฏิกิริยา 5, 15, และ 16)

$CH_3COCoA + CH_3COOH \longrightarrow CH_3COCH_3$

อะเซทิล โคเอ — อาซีโตน

acetyl-CoA transferase (ปฏิกิริยา 5)

CoA transferase (ปฏิกิริยา 15)

acetoacetate decarboxylase (ปฏิกิริยา 16)

10. การสร้างเอธานอลจากอะเซทิล โคเอ (ปฏิกิริยา 20-21)

$CH_3COCoA + 2NADH_2 \longrightarrow CH_3CHOH$

อะเซทิล โคเอ — เอธานอล

acetaldehyde dehydrogenase (ปฏิกิริยา 20)

ethanol dehydrogenase (ปฏิกิริยา 21)

12. ปัญหาการผลิตอาซิโตน-บิวทานอล

12.1 การยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ (Product Inhibition)

เชื้อ Cl. acetobutylicum ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมักส่วนใหญ่เป็นบิวทานอลรองลงมาคือ อาซิโตน และเอธานอลตามลำดับ จากการศึกษาพบว่า บิวทานอลมีผลยับยั้งการเจริญ (106) เติบโตของเซลล์ โดยทั่วไปเชื้อสามารถทนทานต่อความเข้มข้นของบิวทานอลได้ไม่เกิน 13-15 กรัมต่อลิตร ความเป็นพิษเนื่องจากบิวทานอล (solvent toxicity) เนื่องจาก บิวทานอลจะไปละลายไลโปโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้มีผลต่อความเป็นของไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ (107) และหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ (108)

Ounine และคณะ (109) พบว่า ความเข้มข้นของบิวทานอลที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์โดยสมบูรณ์คือ 14 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนและเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลส เชื้อสามารถทนทานต่อความเข้มข้นบิวทานอลได้เพียง 8 กรัมต่อลิตร ส่วนอาซิโตนและเอธานอลไม่มีผลเลยแม้จะเพิ่มความเข้มข้นถึง 20 กรัมต่อลิตร

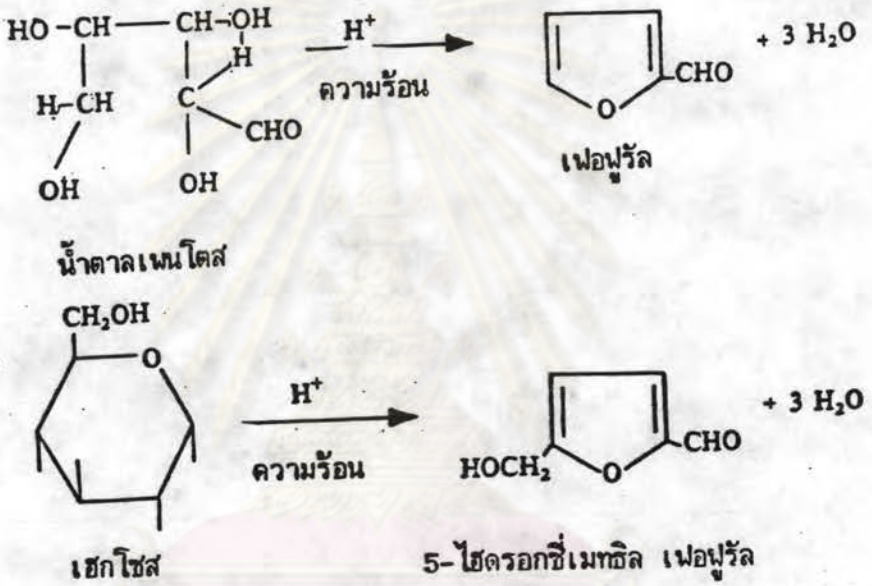
Linda และคณะ (102) รายงานว่า บิวทานอลมีผลต่อเชื้อ Cl. acetobutylicum สูงมาก โดยที่ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเจริญของเซลล์และทำลายความสามารถของเซลล์ในการรักษาภาวะความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ให้คงที่ ทำให้ระดับ ATP ลดลง และยับยั้งการใช้น้ำตาลกลูโคส

Lin และคณะ (111) ศึกษาการเพิ่มความทนทานต่อบิวทานอล โดยการเลี้ยงเชื้อคลอสตริเดียม ในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของบิวทานอลสูงขึ้นเรื่อย ๆ จะได้พวกสายพันธุ์กลายที่ทนทานต่อความเข้มข้นบิวทานอลได้ถึง 15 กรัมต่อลิตร และสายพันธุ์กลายที่ได้นี้ผลิตบิวทานอลได้มากกว่าสายพันธุ์เดิม 5-14 เปอร์เซ็นต์

Grottschall และคณะ (104) รายงานว่า ความเข้มข้นของบิวทานอลในช่วง 7-16 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้เซลล์เพิ่มอัตราการย่อยตัวเอง (autolysis) แต่จะไม่มีผลต่อสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการฉายรังสีอุตราไวโอเลตซึ่งเป็นพวกที่บกพร่องในการย่อยตัวเอง (autolysis-deficient mutant) โดยสายพันธุ์กลายเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตได้ดี ในสภาพที่มีความเข้มข้นของบิวทานอลสูง

12.2 สารประกอบเฟอฟูรัล หรือ อนุพันธ์ของเฟอฟูรัล

น้ำตาลเพนโตสและเฮกโซสถูกทำลายภายใต้ภาวะที่เป็นกรดในอุณหภูมิสูง น้ำตาลจะสลายน้ำออกมาแล้วเกิดไซโคลเซชันเป็นสารประกอบต่าง ๆ ดังรูป



รูปที่ 14 ลักษณะโครงสร้างของเฟอร์ฟูรัลและอนุพันธุ์เฟอร์ฟูรัล

Sjolander และคณะ (10) ศึกษาการใช้น้ำตาลจากการย่อยสลายเศษไม้ด้วยกรดซัลฟูริกที่อุณหภูมิสูง พบว่า เฟอฟูรัลที่เกิดจากน้ำตาลไซโลสมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Cl. acetobutylicum ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ เชื้อจะลดความสามารถในการใช้น้ำตาลจาก 80.5 เป็น 30.2 เปอร์เซ็นต์ แม้แต่ในภาวะที่นำอาหารมาอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที ก็มีผลให้เกิดเฟอฟูรัลถึง 0.05 เปอร์เซ็นต์ การใช้แคลเซียมคาร์บอนเนตและปูนขาวปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาเขย่ารวมกับผงถ่านกัมมันต์เป็นเวลา 1 คืน จะช่วยกำจัดเฟอฟูรัลได้

Moddox และ Murray (85) ศึกษาวิธีการต่าง ๆ ที่สามารถลดปริมาณเฟอฟูรัล พบว่าการใช้ไอน้ำผ่านน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยการใช้ผงถ่านกัมมันต์เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากแต่สูญเสียน้ำตาลบางส่วนไปถึง

30 เปอร์เซ็นต์ในกระบวนการปรับสภาพนี้ ส่วนการใช้ cation exchange หรือ anion exchange ไม่ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำตาล และสามารถให้บิวทานอลหลังจากหมักถึง 5.7 กรัมต่อลิตร เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลผลิตเท่ากับ 17.0

Baugh (105) ศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส พบว่า การใช้กรดร่วมกับความร้อน มีผลทำให้เกิดการเสียสภาพของน้ำตาล โดยที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำ ๆ น้ำตาลในเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสถูกเปลี่ยนสภาพเป็นสารประกอบเฟอฟูรัล และถ้าที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ทั้งน้ำตาล และเฟอฟูรัลจะกลายสภาพเป็นกรดลิวรูลินิค

Grohmann และคณะ (106) ศึกษาการย่อยสลายฟางข้าวสาลีโดยใช้กรดซัลฟูริคที่อุณหภูมิในช่วง 95-100 องศาเซลเซียส พบว่า การเพิ่มเวลาและอุณหภูมิมีผลต่อปริมาณเฟอฟูรัล โดยเพิ่มจากตั้งแต่ 0.04-0.56 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย