บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

การผลิตเอทธานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยทั่วไปเป็นการนำเอาวัสดุเหล่านี้มาย่อยสลายด้วยกรด หรือเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และหมักด้วยจุลินทรีย์ได้เป็นเอทธานอล ซึ่งวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรนี้มีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ ลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญพบได้ในพืชตามธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่ มีองค์ประกอบที่สำคัญคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนินในอัตราส่วน 4:3:3 โดยประมาณตามลำดับซึ่งขึ้นอยู่กับ ชนิดของพืช สรีรวิทยาของพืช อายุ สภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต และวิธีการวิเคราะห์ (Tangnu,1982; Kirk,1983) การนำลิกโนเซลลูโลสมาใช้ประโยชน์ จะต้องมีการแยกส่วนประกอบต่าง ๆ ออกจากกัน เซลลูโลส เป็นส่วนประกอบที่มีมากและเป็นอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรท เมื่อผ่านการย่อยสลายจะได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการหมัก เช่น การผลิตเอทธานอล (Spindler et al.,1988 ; Saddler,1992)

เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญพบได้ในพืชตามธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังได้จากอุตสาหกรรมแปรรูปพืช และ อุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น อุตสาหกรรมเส้นใย อุตสาหกรรมเชือก อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ (Rose,1980; Lyons,1981) ในแต่ละปีพืชจะสร้างเซลลูโลสประมาณ 5 พันล้านตัน (Ryu and Mandels, 1980) ปัจจุบันได้มีความสนใจนำเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต

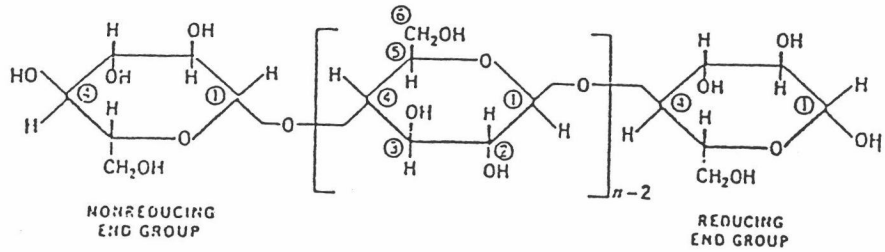
เชื้อเพลิงและสารเคมี ได้แก่ เอทธานอล (Saddler,1992) กรดอะซิติก (Singh et al., 1992) กรดแลคติก (Abe and Takagi, 1991) เป็นต้น การนำเซลลูโลสมาใช้ประโยชน์ จะต้องมีการย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อนโดยใช้สารเคมี เช่น กรดซัลฟุริก กรดไฮโดรคลอริก เป็นต้น หรือ เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส

ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

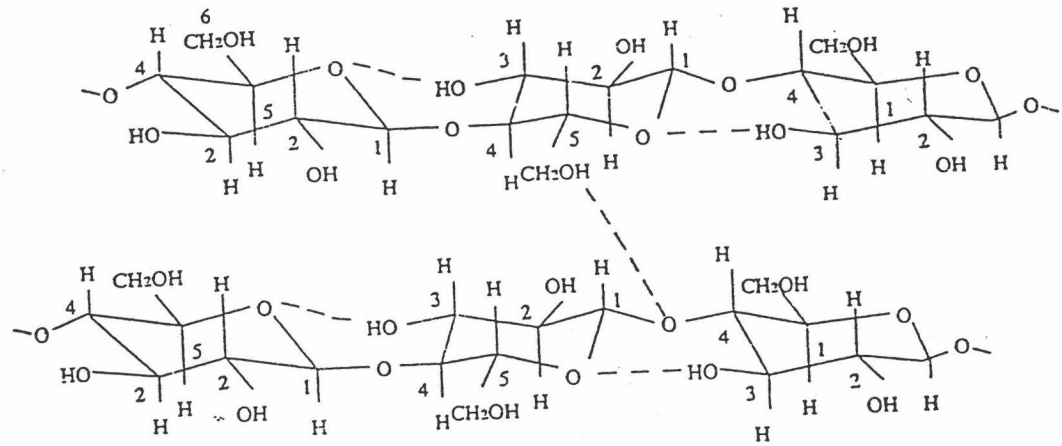
เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรทชนิดโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของ D-glucose ที่อยู่ในรูป D-anhydroglucopyranose มาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β-1,4 glucosidic อย่างมีระเบียบ จำนวนหน่วยย่อยของ D-glucose ต่อหนึ่งโมเลกุลจะมีอย่างน้อยประมาณ 15 หน่วย จนถึง ประมาณ 10,000-14,000 หน่วย (Cowling and Kirk,1976) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.5 MDa (เมกกะดาลตัน) ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เมื่อพิจารณาถึงโครงรูป (conformation) ในการจัดเรียงตัวของหน่วยย่อยที่เชื่อมต่อกัน จะอยู่ในลักษณะ chair form แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลส จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจน ที่อยู่ในวงแหวนของโมเลกุลถัดไป และเชื่อมต่อระหว่างสายเซลลูโลสที่ขนานกัน ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของ D-glucose ในอีกสายหนึ่ง (Zabriskie, Qutabucldin and Dowing, 1980; Sasaki,1982) (รูปที่ 1) ซึ่งจะทำให้สายเซลลูโลสเรียงตัวขนานกันอย่างมีระเบียบเป็นกลุ่มของผลึก(crystalline micelles) และกลุ่มเหล่านี้จะมาเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้น เรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril)

ในธรรมชาติโดยทั่วไปเซลลูโลสจะอยู่ในรูปของลิกโนเซลลูโลส โดยเชื่อมอยู่กับโพลีแซคคาไรด์อื่น ๆ เช่น เพคติน เฮมิเซลลูโลส แป้ง และฟีนอลิกโพลิเมอร์ของลิกนิน(Lutzen et al.,1983) จากการศึกษาโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส

ก



ข



รูปที่ 1 แสดงสูตรโมเลกุลและลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

ก.สูตรโมเลกุล

ข.ลักษณะโครงสร้าง

ที่มา : Nisizawa (1973)

พบว่าในส่วนของ secondary cell wall จะพบเซลลูโลสมากที่สุดและจะลดลงในส่วนของ middle lamella ส่วนเฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน จะพบมากในส่วนของ middle lamella และจะลดลงในส่วนของ secondary cell wall บริเวณที่มีการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลสอย่างมีระเบียบสูง เรียกบริเวณนี้ว่า คริสตัลไลน์ (crystalline) ส่วนบริเวณที่มีการจัดเรียงอย่างไม่เป็นระเบียบ หรือเป็นระเบียบน้อยกว่าเรียกว่าบริเวณอะมอร์ฟัส (amorphous) หรือพาราคริสตัลไลน์(Paracrystalline)(Cowling and Kirk,1976)โดยจะพบบริเวณที่เป็นคริสตัลไลน์ประมาณ 50-90 เปอร์เซนต์ ส่วนที่เหลือจะเป็นอะมอร์ฟัส ซึ่งแต่ละบริเวณจะแสดงคุณสมบัติในการยอมรับต่อกลไกการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างกัน โดยที่บริเวณอะมอร์ฟัสจะยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายง่ายกว่าบริเวณคริสตัลไลน์ (Sasaki, 1982)

<u>เอทธานอล</u>

เอทธานอล เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group)เป็นฟังก์ชัน มีชื่อเรียกเฉพาะว่า เอทธิล แอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ในการผลิตเอทธานอลสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี เป็นการสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม ใช้เอทธีลีนเป็นวัตถุดิบ โดยการดูดซับเอทธีลีนด้วยกรดซัลฟุริกเข้มข้นเพื่อให้ได้กรดเอทธิลซัลฟุริกแล้วเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลและกรดซัลฟุริก ดังสมการ

$$3\ C_2H_4 + 2\ H_2SO_4 \text{ --------> } CH_3CH_2OSO_3H + (CH_3CH_2)_2SO_4$$

ethylene ethyl sulfuric acid

$$CH_3CH_2OSO_3H + H_2O \text{ ----------> } CH_3CH_2OH + H_2SO_4$$

ethyl sulfuric acid ethanol

หรือโดยการเติมน้ำลงในเอทธิลีนโดยตรง โดยใช้กรดซัลฟุริก เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ความดัน 68 บรรยากาศ(100 spi)อุณหภูมิ 400^{o}ซ ปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังสมการ

$$C_2H_4 + H_2O \text{ ----------> } CH_3CH_2OH$$

2. วิธีทางชีวภาพ โดยอาศัยกระบวนการหมักที่เกิดจากกระบวนการทางเมตาบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน(anaerobe) ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันเนื่องจากวัสดุที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักมีจำนวนมาก หาได้ง่ายและมีราคาถูก กลไกในการหมักเกิดขึ้นดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \text{ ----------->} 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

glucose ethanol

<u>วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทธานอล</u>

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทธานอลด้วยวิธีการหมัก มีหลายประเภท คือ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้ง สารประกอบเซลลูโลส และผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น whey กากผลไม้จากโรงงานผลไม้กระป๋อง และน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ (sulfite liquor) เป็นต้น

วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ น้ำตาลจากอ้อย sugar beet และกากน้ำตาล (molasses)เป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตเอทธานอลในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะกากน้ำตาล เนื่องจากสามารถนำเข้าสู่กระบวนการหมักได้โดยตรง ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และให้ผลผลิตสูง

วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ข้าวโพด มันฝรั่ง มันสำปะหลัง ข้างฟ่าง และธัญญพืชต่าง ๆ เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของแป้ง ประกอบด้วย อะไมโลส และอะไมโลเพคติน ดังนั้นจึงต้องมีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ อัลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อนแล้วจึงนำไปหมักเป็นเอทธานอลต่อไป(วราวุฒิ ครูส่ง,2529) ซึ่งการใช้แป้งเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทธานอล อาจมีผลกระทบต่อปริมาณความต้องการวัตถุดิบและราคาสินค้าเกษตรที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบ เนื่องจากวัตถุดิบประเภทแป้งสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด ทั้งที่เป็นอาหารของมนุษย์และอาหารสัตว์ มีการนำมาแปรรูปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวาง

วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส ได้แก่ เศษไม้จากอุตสาหกรรมแปรรูปไม้ และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต่าง ๆ ซึ่งเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสเช่น ฟางข้าว

ชานอ้อย ซังข้าวโพด ซึ่งมีอยู่ในปริมาณมาก หาได้ง่าย และราคาถูก แต่การนำมาใช้ประโยชน์ยังอยู่ในวงจำกัด ปัจจุบันได้มีความสนใจนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงและสารเคมี (Saddler,1992) ซึ่งการที่มีเซลลูโลสอยู่เป็นจำนวนมากเมื่อไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ย่อมก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม (Arauji,1981)

<u>กระบวนการผลิตเอทธานอลจากสารประกอบลิกโนเซลลูโลส</u>

การผลิตเอทธานอลจากสารประกอบลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ดังนี้คือ การปรับสภาพสารประกอบเซลลูโลส (pretreatment) เพื่อให้มีโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการเข้าทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (enzyme production) กระบวนการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส (hydrolysis)ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส และกระบวนการหมัก (fermentation)โดยหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้ไปเป็นเอทธานอลด้วยเชื้อยีสต์

1. การปรับสภาพสารประกอบเซลลูโลส เป็นการทำให้สารประกอบเซลลูโลส มีโครงสร้างขนาดเล็กลง เพื่อเพิ่มพื้นที่การเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์บริเวณอะมอร์ฟัส (Fan,Gharpuray and Lee,1981) สามารถทำได้โดยวิธีทางกายภาพ ได้แก่ การใช้วิธีกล คือ การตัด บด รวมไปถึงการใช้รังสี และวิธีทางเคมี เช่นการใช้กรดซัลฟุริก (Mohagheghi et al.,1992) หรือ การใช้ด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งเป็นวิธีการที่เก่าแก่และยังให้ผลดี ไม่ต้องใช้ภาชนะทนกรดซึ่งมีราคาสูง การปรับสภาพนี้ อาจมีการใช้ทั้งวิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมีร่วมกัน โดยพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายให้สูงขึ้น

Acebal และคณะ (1986) ทำการปรับสภาพฟางข้าวโดยเปรียบเทียบวิธีทางกายภาพโดยการบด และวิธีทางกายภาพร่วมกับวิธีทางเคมี โดยการบดและแช่ใน 1 % NaOH (w/v) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 120 ^{o}ซ พบว่า การใช้วิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมีร่วมกันในการปรับสภาพฟางข้าว ทำให้มีเปอร์เซนต์ความเข้มข้นของเซลลูโลสสูงกว่าการใช้วิธีทางกายภาพเพียงอย่างเดียว คือ 0.557 % และ

0.243 % (w/v) ตามลำดับ

Okeke และ Obi (1995) รายงานว่าการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วย 0.5 M. NaOH ที่อุณหภูมิ 115°ซ เป็นเวลา 10 นาที ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทำให้ได้ผลผลิตน้ำตาลสูงขึ้น 24-53 เปอร์เซนต์

2. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดยเฉพาะเชื้อราในกลุ่ม cellulolytic fungi เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น *Trichoderma reesei*, *Aspergillus* sp. ได้รับความสนใจนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับอุตสาหกรรม แต่เมื่อวิเคราะห์ทางเศรษฐกิจ พบว่าต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ยังคงสูงอยู่ คิดเป็น 25 เปอร์เซนต์ของต้นทุนในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส (Wright et al., 1988) ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงประสิทธิภาพของเอนไซม์เพื่อลดต้นทุนในการผลิต ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีการ ได้แก่ การผลิตเอนไซม์โดยการตรึงเซล (Webb, Fukuda and Atkinson, 1986) การผลิตเอนไซม์โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน (Madamwar and Petal, 1992) การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยการทำให้เกิดมิวเตชั่นเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูง (Alberto, Ward and Souza, 1991) และการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง

Sandhu และ Arora (1985) ได้คัดแยกเชื้อราจากเปลือกไม้ Dalbergia ได้เชื้อราทั้งสิ้น 19 สายพันธุ์ และพบว่ามี 2 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้คือ *Acrophailophora* sp. และ *Thielavia* sp.

พรเทพ ถนนแก้ว และคณะ (2538) ได้คัดแยกเชื้อราจากดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ พบเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด คือ *Acrophialophora* sp. และศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 40°ซ ซึ่งนับว่าเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง โดยสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้ค่า filter paper activity (FPA) สูงสุดเท่ากับ 0.398 หน่วย/มล. และให้ค่า carboxymethyl

cellulase (CMCase) สูงสุดเท่ากับ 23.038 หน่วย/มล.

3. กระบวนการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส สามารถทำได้ 2 วิธีที่สำคัญคือ วิธีทางเคมี โดยใช้กรด และ วิธีทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส

3.1 การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสด้วยวิธีทางเคมี โดยการใช้กรด (acid hydrolysis)ได้แก่ การใช้กรดซัลฟุริกเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์หรือมากกว่า หรือการใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 เปอร์เซนต์หรือมากกว่า ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่เฉพาะเจาะจง ดังนั้นน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นบางส่วนจะทำปฏิกิริยากับกรดต่อไปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (by product)ชนิดอื่น เช่น furfural และกรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ติดมากับเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้โครงสร้างในส่วนที่เป็นคริสตัลลีนจำเป็นต้องใช้กรดที่มีความเข้มข้น และอุณหภูมิสูงในการย่อยสลายจึงจะได้น้ำตาลกลูโคส ปฏิกิริยาเกิดขึ้นแบบรุนแรง ภาชนะที่ใช้ต้องทนทานต่อการกัดกร่อน ซึ่งมีราคาแพงและกรดที่ผ่านการทำปฏิกิริยาแล้วยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย แต่วิธีนี้ปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ประมาณ 15-20 นาที (Goldstein,1981 ; Tsao and Chiang,1983)

3.2 การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยการใช้เอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นแบบเฉพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับสารประกอบเซลลูโลส ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ ปฏิกิริยาเกิดขึ้นแบบไม่รุนแรง ไม่จำเป็นต้องใช้ภาชนะที่ทนต่อการกัดกร่อน และไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่วิธีการนี้น้ำตาลกลูโคสที่ได้อยู่ในรูปสารละลายเจือจาง (Goldstein,1981) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นแบบต่อเนื่อง และใช้เวลานานกว่าวิธีทางเคมี

3.2.1 เอนไซม์เซลลูเลส จากการศึกษาระบบของเอนไซม์เซลลูเลสพบว่าเป็น multicomponent enzymes มีเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดมาทำงานพร้อมกัน (Ryu and Mandels,1980) ดังนี้คือ

ก.Exo β -1,4-glucan celiobiohydrolase หรือ exoglucanase หรือ C_1 (EC.3.2.1.91)

ทำหน้าที่ตัดพันธะของ β -1,4-glucosidic จากปลายด้านของ non-reducing ทำให้ได้เซลโลไบโอส และกลูโคส น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลาย จะมีการจัดเรียงตัวเป็น α -configuration (inversion)

ข.Endo β -1,4-glucan glucanohydrolase หรือ endoglucanase หรือ C_x (EC.3.2.1.4)

ทำหน้าที่ตัดพันธะ β -1,4-glucosidic ภายในสายเซลลูโลสในบริเวณที่เป็นอะมอร์ฟัส เอนไซม์จะตัดพันธะอย่างสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิดคือ กลูโคส และ เซลโลไบโอส โดยจะได้เซลโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

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

ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส

การทำงานของ C_1 และ C_x เป็นปฏิกิริยาที่เกิดภายนอกเซล ส่วนการทำงานของเอนไซม์ β -glucosidase เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในเซลโดยเอนไซม์ β -glucosidase จะย่อยสลายเซลโลไบโอสที่เกิดจากการทำงานของ C_1 และ C_x ที่ผ่านผนังเซลเข้าไปภายในเซล (Sin and Reese,1953)

3.2.2 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส จากการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า เซลลูเลสเป็น glycoprotein ประกอบด้วย โปรตีน และ คาร์โบไฮเดรท ในอัตราส่วน 1:1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000-60,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ co-factor หรือ โลหะอื่น ๆ ในการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์ จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 50°ซ นอกจากนี้ยังมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง ทนต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วงกว้างประมาณ 4.0-8.0 และ ทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 0°ซ และ 4°ซ ได้เป็นเวลาหลายปี หรือ เก็บโดยวิธี freeze dry หรือ ตกตะกอนด้วยอะซีโตน หรือ เอทธานอล โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติ (Ryu and Mandels,1980)

4. กระบวนการหมัก เกิดขึ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์จะทำการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทธานอล ในทางทฤษฎีเชื้อจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทธานอลได้ 51.1 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของน้ำตาล แต่ในทางปฏิบัติ น้ำตาลประมาณ 95 เปอร์เซนต์เท่านั้น ที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอล นอกนั้นจะใช้ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529) ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักเอทธานอล คือเชื้อยีสต์ เช่น ยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* sp. และ *Candida* sp. ซึ่งได้รับความนิยม นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวาง (Spindler et al., 1988 ; Palnitkar and Lachke, 1990 ; Sexana, Garg and Verma, 1992) จากการวิเคราะห์ทางเศรษฐกิจเปรียบเทียบราคาของเอทธานอลในการผลิตแบบ SSF โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *S. cerevisiae* และ *C. brassicae* ที่สภาวะเดียวกัน พบว่า *S. cerevisiae* ผลิตเอทธานอลได้เข้มข้น 3.5 เปอร์เซนต์ ให้ผลผลิต 73 เปอร์เซนต์ คิดเป็นราคาขาย 2.06 ดอลลาร์/แกลลอน และ *C. brassicae* ให้ผลผลิตได้ 79 เปอร์เซนต์ คิดเป็นราคาขายเท่ากับ 1.94 ดอลลาร์/แกลลอน (Wright et al.,1988)

<u>การผลิตเอทธานอลจากสารประกอบลิกโนเซลลูโลส</u>

กระบวนการผลิตเอทธานอลจากสารประกอบลิกโนเซลลูโลส ซึ่งประกอบด้วย กระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส และ กระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสเพื่อให้ได้เอทธานอลนั้น สามารถดำเนินการได้ดังนี้ คือ

กระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Separate Hydrolysis and Fermentation) เป็นการผลิตเอทธานอลโดยมีขั้นตอนที่สำคัญคือ การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และการหมักน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทธานอล ซึ่งวิธีการนี้ เมื่อย่อยสลายเซลลูโลสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสแล้วจะต้องแยกน้ำตาลกลูโคสที่ได้ มาทำให้เข้มข้นขึ้น ก่อนนำไปใช้หมักเป็นเอทธานอลต่อไป ซึ่งวิธีการนี้ ก่อให้เกิดปัญหาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ

กลูโคส และ เซลโลไบโอส ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมาก และมีอัตราเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสูง (Wright et al. ,1988) จึงเกิดแนวความคิดที่จะนำกระบวนการย่อยสลายและกระบวนการหมักมารวมกันเรียก กระบวนการนี้ว่า กระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง (Simultaneous Hydrolysis and Fermentation) เป็นการผลิตเอทธานอลโดยรวมขั้นตอน การย่อยสลายและการหมักไว้เป็นขั้นตอนที่ต่อเนื่องในถังหมักเดียวกัน Takagi และคณะ (1977) ได้พัฒนารูปแบบในการผลิตเอทธานอลเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น โดยพัฒนาเป็นแบบการผลิตน้ำตาลและการหมักแบบต่อเนื่อง (Simultaneous Saccharification and Fermentation หรือ SSF) ซึ่งวิธีการนี้ช่วยลดปัญหาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เนื่องจากยีสต์จะสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นหมักต่อเป็นเอทธานอลได้ ลดอัตราเสี่ยงต่อการปนเปื้อน และใช้ปริมาณเอนไซม์น้อยกว่าวิธีแรก (Blotkamp et al.,1981;Wright et al., 1988) ซึ่งกระบวนการนี้ได้รับความสนใจในการทำวิจัยอย่างกว้างขวางเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตเอทธานอลโดยกระบวนการหมักแบบ SSF ในรูปแบบแตกต่างกันไป

Blotkamp และคณะ (1981)ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอทธานอลด้วยกระบวนการ SSF เปรียบเทียบกับการย่อยสลายและการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในกระบวนการ SSF คือ 40^{o}ซ โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida brassicae* ในกระบวนการ SSF ไม่พบการสะสมของน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และมีผลผลิตเอทธานอลสูงกว่าในกระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

Spangler and Emert(1986)เปรียบเทียบการผลิตเอทธานอลด้วยกระบวนการ SSF โดยใช้เชื้อ *Zymomonas mobilis* และ *Candida brassicae* ที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ pH 5.0 พบว่า *C. brassicae* ผลิตเอทธานอลได้ 18.9 กรัม/ลิตร สูงกว่า *Z. mobilis* คือ 10.1 กรัม/ลิตร เมื่อใช้ Avicel 9 % (w/v) เป็นสารตั้งต้น

Punnapayak and Hoffmann(1994) ศึกษาการใช้ *Amsonia* spp. พืชทะเลทราย 3 ชนิด เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทธานอลด้วยกระบวนการ SSF โดย

ใช้เอนไซม์เซลลูเลส และยีสต์ *C. brassicae* พบว่าสามารถผลิตเอทธานอลได้ 0.46-0.51 g/g เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลกลูโคสด้วยเอนไซม์ พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้เพียง 0.22-0.39 g/g เท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำตาลกลูโคสที่ผลิตขึ้นมามีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการย่อยสลายจึงทำให้ได้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสน้อย

Spindler และคณะ (1988) คัดเลือกยีสต์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ 5 ชนิด คือ *S. cerevisiae* , *S. uvarum* , *C. acidothermophilum* , *C. lusitaniae* และ *C. brassicae* พบว่า *S. uvarum* และ *C. brassicae* มี conversion rate สูงที่อุณหภูมิ 43°ซ และสามารถทนได้ถึงอุณหภูมิ 45°ซ และเมื่อใช้ *S. uvarum* ผสมกับ *C. lusitaniae* และ *C. brassicae* ผสมกับ *C. lusitaniae* จะให้ผลผลิตเอทธานอลสูงกว่าการใช้เชื้อยีสต์แต่ละชนิดแยกกัน

Mohagheghi และคณะ (1992) ศึกษาการใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทธานอลด้วยกระบวนการ SSFแบบใช้สับสเตรทความเข้มข้นสูงโดยใช้เอนไซม์จาก *T.reesei* และ ยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ผลผลิตสูงสุด 57 กรัม/ลิตร จากฟางข้าวที่ปรับสภาพแล้ว 20เปอร์เซนต์ หรือมีปริมาณเซลลูโลส 12.5เปอร์เซนต์

Spindler และคณะ (1992) ศึกษาการใช้ยีสต์ *Brettanomyces custersii* ที่ย่อยสลายเซลโลไบโอส ในกระบวนการ SSF โดยใช้เซลลูโลส 75 กรัม/ลิตร ผลิตเอทธานอลได้ 32 กรัม/ลิตร ในเวลา 3 วัน คิดเป็น 70 เปอร์เซนต์ของผลผลิตทางทฤษฎี ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่ายีสต์ชนิดอื่น 16 เปอร์เซนต์

Roychoudhury และคณะ (1992) ใช้ระบบสูญญากาศในกระบวนการ SSF โดยศึกษาในถังหมักขนาด 30 ลิตร ใช้เอนไซม์ผสมและยีสต์ทนความร้อน พบว่าการใช้ระบบสูญญากาศในช่วงสั้น (15 นาที/รอบ) ให้ประสิทธิภาพดีกว่าใช้ในช่วงเวลานาน (60 นาที/รอบ)

การหมักแบบใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน(mixed culture or co-culture) เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนากระบวนการผลิตเอทธานอล โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อย

สลายเซลลูโลสและเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทธานอลร่วมกันในถังหมักเพียงถังเดียว ซึ่งอาศัยหลักการเดียวกับ กระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง เป็นการลดขั้นตอนการผลิตเอนไซม์ช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้ จากการวิเคราะห์ทางเศรษฐกิจโดย Wright และคณะ (1988) รายงานว่าต้นทุนในการผลิตเอนไซม์คิดเป็น 25 เปอร์เซนต์ของต้นทุนทั้งหมด ซึ่งนอกจากการนำมาใช้ในการผลิตเอทธานอลแล้ว ยังมีการนำไปใช้ในการผลิตสารเคมีชนิดอื่น ๆ อีก เช่น การผลิตกรดแลคติก (Dermirci, Pometto, and Johnson, 1993) การผลิตโปรตีนเซลเดียวจาก beet pulp (Ghanem, 1992) การเพิ่มโปรตีนในอาหารสัตว์จากชานอ้อย (Nigam,1990) และการเพิ่มโปรตีนในกากแอปเบิ้ล (Bhalla and Joshi, 1994)

Hagerdal and Haggstrom (1985)ศึกษาการผลิตเอทธานอลแบบเชื้อผสมโดยใช้เชื้อรา *T.reesei* C30ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีsolka floc BW 200 เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตเอทธานอลได้ 40 กรัม/ลิตร หรือประมาณ 83 เปอร์เซนต์ โดยพบว่าการจำกัดปริมาณออกซิเจนทำให้การผลิตเอทธานอลเพิ่มขึ้น

Wright และคณะ (1988) พบว่าการใช้เชื้อยีสต์ *B. clausenii* ร่วมกับ *S. cerevisiae* จะให้ผลผลิตสูงถึง 88 เปอร์เซนต์ โดยผลิตเอทธานอลได้เข้มข้น 4.5 เปอร์เซนต์ จากเซลลูโลส 10 เปอร์เซนต์

Spindler,Wyman and Grohmann(1989) ศึกษาการใช้ยีสต์ทนร้อนในกระบวนการ SSF พบว่าการใช้ยีสต์ร่วมกันระหว่าง *C. lusitaniae* และ *S. uvarum* ที่อุณหภูมิ 41^{o}ซ มีอัตราการหมัก ผลผลิต และอัตราการอยู่รอดสูง

Spindler,Wyman,Grohmann and Mohagheghi (1989) พบว่าเชื้อ *S.uvarum* และ *S. cerevisiae* สามารถให้ผลผลิตได้ดี เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์มากขึ้นและมีการเติม β -glucosidase จะเพิ่มประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นเอทธานอลได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น แต่ถ้าคิดในแง่เศรษฐกิจ การใช้ปริมาณเอนไซม์ที่น้อยลง และใช้เชื้อผสมระหว่าง *B. clausenii* และ *S. cerevisiae* จะให้ผลผลิตดีกว่าการใช้เชื้อยีสต์เพียงชนิดเดียว

Palnitkar and Lachke (1990) ศึกษาการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันใน

กระบวนการSSF โดยใช้เอนไซม์จาก *Sclerotium rolfsii* และยีสต์ 2 ชนิด คือ *C. shehatae* และ *S. cerevisiae* พบว่าการใช้ยีสต์ร่วมกันสามารถใช้น้ำตาลได้ดีกว่า 30-38 เปอร์เซนต์และผลิตเอทธานอลได้เพิ่มขึ้น 10-13เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับการใช้ยีสต์เพียงชนิดเดียว

Punnapayak, Kuhirun and Thanonkeo (1995) ศึกษาการใช้เส้นใยป่านศรนารายณ์เป็นวัสดุหมักในกระบวนการ SSF โดยเชื้อ *T. reesie* และ *S. cerevisiae* ให้ผลผลิตเอทธานอล 0.30 กรัม/กรัมสับสเตรท และทำการแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในธรรมชาติจากดินบริเวณปลูกป่านศรนารายณ์ ได้เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดคือ *Acrophialophora* sp. โดยที่อุณหภูมิ 45°ซ เชื้อรายังสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ เมื่อนำมาศึกษาใน SSF โดยใช้ *Acrophialophora* sp. และ *S. cerevisiae* ที่มีเส้นใยป่านศรนารายณ์ และกระดาษกรอง เป็นวัสดุหมักสามารถให้ผลผลิตเอทธานอลได้ 0.11 และ 0.17 กรัม/กรัมสับสเตรท ตามลำดับ