บทที่ 1

บทนำ

เนื่องจากภาวะการขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงในปี 1973 จึงได้มีความพยายามคิดค้นวิจัยแหล่งพลังงานอื่นขึ้นมาทดแทน วัสดุลิกโนเซลลูโลสได้แก่เศษไม้จากอุตสาหกรรมแปรรูปไม้และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพดเป็นต้น เป็นวัสดุที่หาได้ง่าย มีปริมาณมาก และราคาถูก จึงเป็นแหล่งวัตถุดิบที่น่าสนใจในการนำมาผลิตเอทธานอล เพื่อนำมาใช้ทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิง โดยนำเอทธานอลมาใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงโดยตรงหรือนำเอทธานอลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 95 เปอร์เซนต์มาผสมในน้ำมันเบนซิน เพื่อเพิ่มค่าออกเทน เป็นการลดการใช้สารตะกั่ว และช่วยลดการเกิดมลพิษทางอากาศ โดยลดการเกิดกาซคาร์บอนมอนอกไซด์ (Wyman, Spindler and Grohmann,1992; Hunt,1981)ซึ่งเป็นการช่วยรักษาสภาพแวดล้อมอีกทางหนึ่งด้วย

การผลิตเอทธานอลสามารถทำได้หลายวิธีการ เช่น การสังเคราะห์ทางเคมีจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม โดยใช้เอทธิลีนเป็นวัตถุดิบ หรือวิธีการทางชีวภาพโดยอาศัยกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobe) โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักมีหลายประเภทคือ น้ำตาล แป้ง และวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นวัสดุที่ได้รับความสนใจในการนำมาผลิตเอทธานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิงโดยไม่มีผลกระทบต่อแหล่งอาหารของมนุษย์และสัตว์

องค์ประกอบที่สำคัญของวัสดุลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน ในอัตราส่วน 4:3:3 โดยประมาณตามลำดับ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช สรีรวิทยาของพืช อายุ สภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต และวิธีการวิเคราะห์ (Tangnu, 1982; Kirk, 1983)

การนำลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทธานอลต้องประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญดังนี้คือ การปรับสภาพสารประกอบเซลลูโลส (pretreatment) เพื่อให้มีโครงสร้างที่เหมาะสม และเพิ่มพื้นที่ในการเข้าทำงานของเอนไซม์ การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส (hydrolysis) ด้วยกรดหรือเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส และการหมัก (fermentation) โดยหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้ไปเป็นเอทธานอลด้วยเชื้อยีสต์

กระบวนการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส ที่ได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาวิจัยคือกระบวนการผลิตที่ใช้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) ซึ่งอาจทำได้โดย กระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Separated Hydrolysis and Fermentation) วิธีการนี้เมื่อย่อยสลายเซลลูโลสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสแล้ว จะต้องทำน้ำตาลกลูโคสที่ได้ให้เข้มข้นขึ้นก่อนนำไปใช้หมักเป็นเอทธานอลต่อไป ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (end product inhibition) คือ กลูโคส และเซลโลไบโอส ทำให้ต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมากและมีอัตราเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสูง ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการผลิตเอทธานอลเป็นแบบ กระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง (Simultaneous Hydrolysis and Fermentation) เป็นการผลิตเอทธานอลโดยการรวมปฏิกิริยาการย่อยสลายและการหมักไว้เป็นขั้นตอนต่อเนื่องในถังหมักเดียวกันโดยเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส จากนั้นยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสที่ได้ไปเป็นเอทธานอลอย่างรวดเร็ว โดยผ่านกระบวนการหมัก Takagi และคณะ (1977) ได้พัฒนารูปแบบในการผลิตเป็นแบบการผลิตน้ำตาลควบคู่กับการหมักแบบต่อเนื่อง (Simultaneous Saccharification and Fermentation หรือ SSF) ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในกระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง ซึ่งมีข้อได้เปรียบ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้น้อยกว่า ปฏิกิริยาเกิดอย่างรวดเร็ว ลดปัญหาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นทำให้ได้ผลผลิตสูงกว่า นอกจากนี้ ยังลดอัตราการปนเปื้อนอีกด้วย (Blotkamp et al.,1981; Wright, Wyman and Grohmann,1988) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อจำกัดคืออุณหภูมิที่เหมาะสม

ในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในช่วงประมาณ 45-50°ซ (Mandels and Sternberg,1976)แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของยีสต์อยู่ในช่วง 30-35°ซ (Roger,Lee and Tribe,1980) Ghosh และ Kundu (1982) รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกระบวนการ SSF ที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. reesei* และ *S. cerevisiae* ที่ 35°ซ Huang and Chen(1989)ได้รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมในกระบวนการหมักแบบ SSF คือ 37°ซ ในขณะที่ Blotkamp และคณะ (1981) รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมในกระบวนการ SSF โดยเชื้อ *Candida brassicae* ที่ 40°ซ Spindler และคณะ(1988)ได้รายงานว่า *Candida brassicae* สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37°ซ ในกระบวนการ SSF และสามารถทนอุณหภูมิได้สูง 43°ซ โดยที่ความสามารถในการผลิตเอทธานอลสูงถึง 86เปอร์เซนต์ ทางทฤษฎี

ในปัจจุบันยังคงมีการศึกษาเพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตเอทธานอลโดยกระบวนการหมักแบบ SSFในรูปแบบแตกต่างกันไปเช่น การใช้ระบบสูญญากาศในกระบวนการหมักแบบ SSF โดยใช้เอนไซม์ผสมและยีสต์ทนความร้อน (Roychoudhury, Ghose and Ghosh,1992)การใช้สายพันธุ์ยีสต์ที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสในกระบวนการหมักแบบ SSF(Hui et al.,1992) และการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันในกระบวนการหมักแบบ SSF (Palnitkar and Lachke,1990;Laplace et al.,1991) ซึ่งการหมักแบบใช้จุลินทรีย์ร่วมกัน เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนากระบวนการผลิตเอทธานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันในถังหมักเพียงถังเดียวและลดขั้นตอนการผลิตเอนไซม์ ซึ่งจะสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้ จากการวิเคราะห์ทางเศรษฐกิจของ Wrightและคณะ (1988) รายงานว่าต้นทุนในการผลิตเอนไซม์คิดเป็น 25เปอร์เซนต์ของต้นทุนทั้งหมด จึงมีการค้นคว้าวิจัยเพื่อที่จะลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ โดยการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์หรือการปรับปรุงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ซึ่งการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้สูงในธรรมชาติ เป็นวิธีการหนึ่งที่สำคัญในการพบสายพันธุ์ใหม่ ๆ ของเชื้อจุลินทรีย์ Sandhu และ Arora(1985)ได้คัดแยกเชื้อราจากเปลือกไม้ Dalbergia ได้เชื้อราทั้งสิ้น 19 สายพันธุ์และพบว่ามี 2 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ได้คือ *Acrophialophora* sp. และ *Thielavia* sp. พรเทพ ถนนแก้ว, หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และมุกดา ดูหิรัญ (2538) ได้คัดแยกเชื้อราจากดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ พบเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดคือ *Acrophialophora* sp. เมื่อศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 40°ซ และยังสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 45°ซ ซึ่งเป็นลักษณะที่ค่อนข้างทนร้อน ในขณะที่เชื้อราที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยทั่วไป เช่น *Trichoderma* sp. และ *Aspergillus* sp. จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อยู่ในช่วง 28-35°ซ (Acebal et al., 1986 ; Panda, 1989 ; Madamwar and Patel, 1992)

ป่านศรนารายณ์ (*Agave sisalana* Perrine.) เป็นพืชเส้นใยที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมเชือก และ ใช้ในงานหัตถกรรมต่าง ๆ เช่น กระเป๋า รองเท้า พรม ผ้ารองพรม เป็นต้น (อัจฉราพร ไศละสูต,2528) นอกเหนือจากการใช้ประโยชน์จากเส้นใยป่านโดยตรงแล้ว เศษเนื้อเยื่อที่ได้จากการขูดเส้นใย และเนื้อเยื่อจากลำต้นของป่านสามารถใช้แทนปุ๋ยพืชสดใส่ลงในแปลงปลูกพืชโดยตรง หรือนำไปทำให้แห้งแล้วเผา จะได้เถ้าที่มีเปอร์เซนต์ธาตุอาหารสูง ได้แก่ ไลม์คาร์บอเนต (carbonate of lime) 80 เปอร์เซนต์ โปแตสคาร์บอเนต 11 เปอร์เซนต์ และไลม์ฟอสเฟต 4 เปอร์เซนต์ หรือ นำเศษเนื้อเยื่อไปทำแห้งแล้วผสมกับอาหารเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์ หรือ นำไปสกัดเพื่อสังเคราะห์สารเคมีอื่น ๆ เช่น กรดออกซาลิก (oxalic acid) และ ขี้ผึ้งคาร์นัวบา (carnauba wax) และสามารถนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทธานอลโดยอาศัยกระบวนการของเชื้อจุลินทรีย์ (พิสุทธิ์ ศาลากิจ ,2528)

Lock (1969) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยป่านศรนารายณ์ พบว่าประกอบด้วย เซลลูโลส 62 เปอร์เซนต์ แพนโทแซน 16 เปอร์เซนต์ คาร์โบไฮเดรทชนิดอื่น 10 เปอร์เซนต์ ขี้ผึ้ง 2 เปอร์เซนต์ และ FAO (1974) รายงานว่า เส้นใยป่านศรนารายณ์มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ เซลลูโลส 78

เปอร์เซนต์ เฮมิเซลลูโลส 10 เปอร์เซนต์ ลิกนินและองค์ประกอบอื่นๆ 8เปอร์เซนต์ จะเห็นได้ว่าป่านศรนารายณ์มีปริมาณเซลลูโลสสูงเพียงพอ ที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาแนวทางการพัฒนาการผลิตเอทธานอลด้วย วิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง (Simultaneous Hydrolysis and Fermenta-tion)โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อราสายพันธุ์ *Acrophialophora* sp. ที่คัดเลือกได้จากดินบริเวณที่ปลูกป่านศรนารายณ์ร่วมกับยีสต์ *Candida brassicae* โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทธานอลด้วยกระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง และแนวทางการผลิตเอทธานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันระหว่างเชื้อทั้งสองในกระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยกระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่อง โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราสายพันธุ์ *Acrophialophora* sp. ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณที่ปลูกป่านศรนารายณ์ และเชื้อยีสต์ *Candida brassicae*

2. เพื่อศึกษาแนวทางการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันระหว่างเชื้อราสายพันธุ์ *Acrophialophora* sp. และยีสต์ *Candida brassicae* ในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยกระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องในระดับห้องปฏิบัติการ และนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

2. ทราบแนวทางในการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันระหว่างเชื้อราสายพันธุ์ *Acrophialophora* sp. และยีสต์ *Candida brassicae* ในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส เพื่อพัฒนาความสามารถในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกันต่อไป

ขอบเขตของการศึกษา

1. ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยกระบวนการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องโดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้ คือ ปริมาณเอนไซม์ ความเข้มข้นของเชื้อยีสต์เริ่มต้น ความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้น อุณหภูมิ และการเติมอาหารเสริม (supplement)

2. ศึกษาแนวทางการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน ในการผลิตเอทธานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส โดยศึกษาอายุเชื้อราเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเติมยีสต์ ความเข้มข้นของยีสต์เริ่มต้น และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก