บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

เอทธานอล เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) เป็นฟังค์ชันมีชื่อเรียกเฉพาะว่า ethyl alcohol คุณสมบัติที่สำคัญของเอทธานอลคือ จุดเดือด 78.3 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว -115 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นที่ 20 องศาเซลเซียส (g/cm^3) = 0.789 น้ำหนักโมเลกุล 46 และความสามารถในการละลายน้ำ (g/100 g H_2O) ละลายได้ดี (ร่าไพ ศิริมนกุล, 2534) การผลิตเอทธานอลทำได้ทั้งการสังเคราะห์ทางเคมี โดยสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมใช้เอทธีลีนเป็นวัตถุดิบ และผลิตจากกระบวนการทางวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีชีวภาพโดยการหมักสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรท ซึ่งเกิดขึ้นโดยกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพที่ไร้ออกซิเจน (ร่าไพ สิริมนกุล, 2534)

การหมักแอลกอฮอล์ (alcoholic fermentation) เป็นแนวทางหนึ่งของการผลิตเอทธานอลที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันนอกเหนือจากการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเฉพาะในกลุ่มของประเทศเกษตรกรรม เพราะวัตถุดิบมีจำนวนมากและราคาถูก (วราวุฒ ครูส่ง, 2529) การหมักแอลกอฮอล์ผลิตเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมและผลิตเพื่อใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงวัตถุดิบที่ใช้มากคือกากน้ำตาล (molasse) จากโรงงานน้ำตาล (วราวุฒ ครูส่ง และคณะ, 2531) ซึ่งกากน้ำตาลพบว่ามีน้ำตาลประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ (พูนสุข อัตถะสัมปุณณะ, 2533) ปัจจุบันเอทธานอลมีการใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ใช้ผสมเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ สาเก นอกจากนั้นยังใช้เป็นตัวทำละลายทางเคมี ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการซึ่งโดยทั่วไปใช้ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางค์ ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเคมีภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ ประเทศสหรัฐอเมริกาและบราซิลใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินสำหรับใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ที่เรียกกันว่า gasohol (Prave et al., 1987)

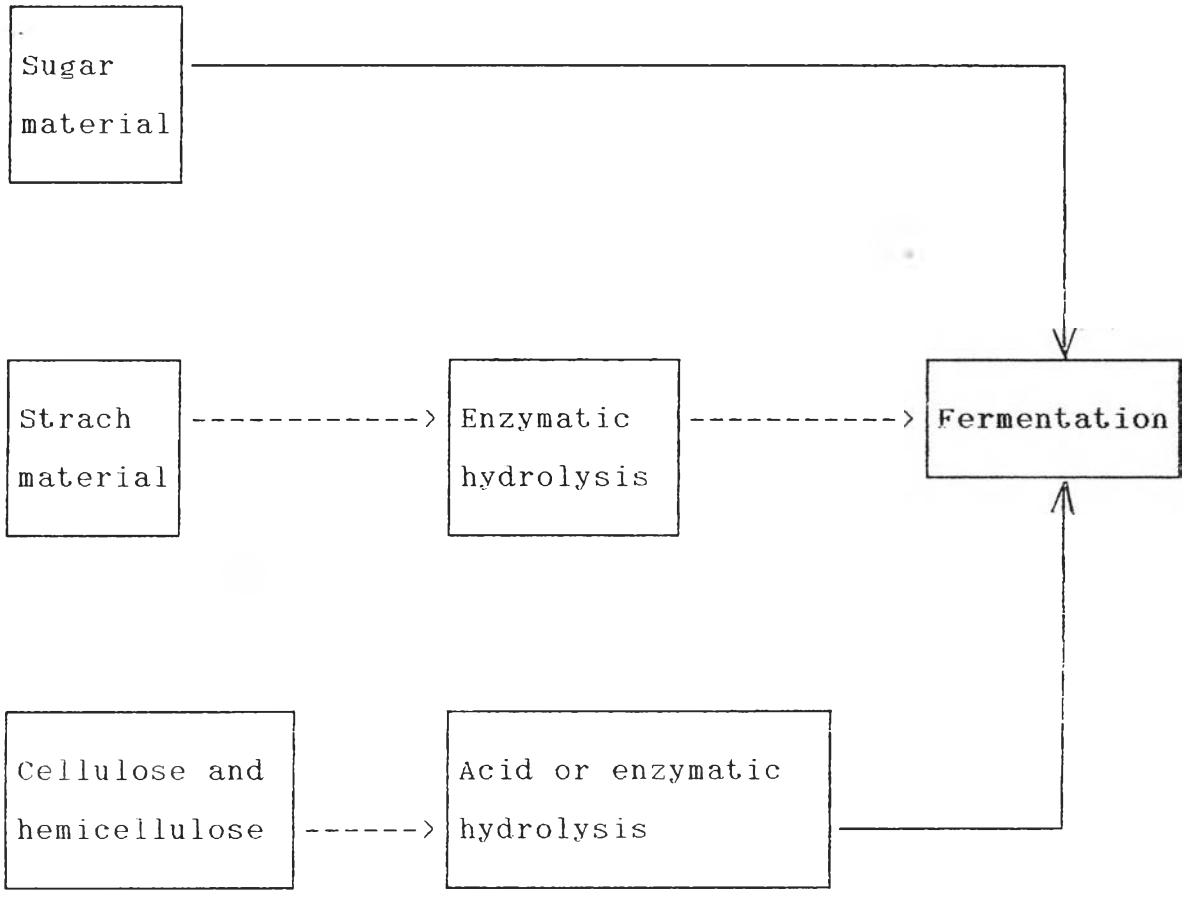
Gasohol คือส่วนผสมของน้ำมันเบนซินชนิดธรรมดากับแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ซึ่งสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(วท.) ได้พัฒนาการผลิตแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลังมีความเข้มข้นสูงถึง 99.5 เปอร์เซ็นต์ นำมาผสมกับน้ำมันเบนซินเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยไม่ต้องมีการดัดแปลงเครื่องยนต์ ประโยชน์ของ gasohol คือ ลดความสิ้นเปลืองของน้ำมันเชื้อเพลิง ลดมลภาวะอันเกิดจากสารตะกั่ว ลดปริมาณคาร์บอนมอนอกไซด์ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2530) การใช้เอทธานอลเพื่อเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงเริ่มมีการใช้ตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 โดยสหรัฐอเมริกาได้ผลิตเอทธานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิงในกองทัพ และญี่ปุ่นก็ได้ใช้เอทธานอลเป็นเชื้อเพลิงสำหรับการขับเคลื่อนเครื่องบิน (พูนสุข อัตถะสัมปุณณะ, 2533)
โดย U.S. Operated ethanol plants in Omaha ใช้ในเครื่องยนต์ของ Army Natic Lab (Lyons, 1981)

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทธานอล

การหมักเอทธานอลจากผลผลิตทางการเกษตร ประเภทของวัตถุดิบได้ 3 ประเภท คือ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล วัตถุดิบประเภทแป้ง และวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (อิทธิฤทธิ์ อึ้งวิเชียร, 2531) (ภาพที่ 1) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น น้ำอ้อย sugar beet น้ำองุ่น สามารถนำมาหมักเอทธานอลได้โดยตรง ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก เมื่อสกัดน้ำตาลได้ก็นำมาสู่ขั้นตอนของการหมักโดยใช้ยีสต์ ผลผลิตสุดท้ายที่เกิดขึ้นคือเอทธานอลและคาร์บอนไดออกไซด์

วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี เมล็ดข้าวฟ่าง ข้าวบาเลย์ และมันฝรั่ง จะต้องนำมาผ่านขั้นตอนการย่อยสลายก่อนแล้วจึงนำไปสู่ขั้นตอนของการหมัก การใช้แป้งเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทธานอลอาจมีผลกระทบต่อราคาของผลผลิตทางการเกษตร เนื่องจากแป้งนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง ดังนั้นจึงได้ให้ความสนใจในการหาวัสดุที่นำมาใช้ในการผลิตเอทธานอลแทนแป้ง ลิกโนเซลลูโลสเป็นที่ยอมรับว่าเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่น่าสนใจ เพราะมีอยู่เป็นจำนวนมากบนพื้นโลก และการนำมาใช้ประโยชน์ยังอยู่ในของเขตที่จำกัด (Lyons, 1981)



ภาพที่ 1 แผนภูมิการผลิตเอทธานอลจากผลผลิตทางการเกษตร (Stout, 1984)

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose)

ลิกโนเซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในพืชบก ในผลพลอยได้จากการเกษตร เช่น ชานอ้อย ฟางข้าวในแต่ละปีพบว่ามีอยู่เป็นจำนวนมาก การนำเอามาใช้ประโยชน์ยังมีน้อยและอยู่ในวงจำกัด ส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน อัตราส่วนของทั้ง 3 อย่างมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช (ตารางที่ 1) การนำเอามาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพคือการเปลี่ยนเป็นสารเคมีที่มีราคาสูงขึ้น ปัญหาในการนำมาใช้ประโยชน์เกิดขึ้นเนื่องจากมีลิกนิน ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้โครงสร้างของพืชมีความแข็งแรง เป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่จะเข้าไปย่อยสลาย ดังนั้นจึงต้องมีวิธีที่เหมาะสมในการสกัดน้ำตาลจากสารประกอบประเภทลิกโนเซลลูโลส

การใช้ประโยชน์จากลิกโนเซลลูโลสต้องมีการแยกส่วนประกอบต่าง ๆ ออกจากกัน เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่มีมากและเป็นอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรท เมื่อนำมาผ่านการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์ก็จะได้น้ำตาลกลูโคส เฮมิเซลลูโลสเมื่อนำมาย่อยสลายก็จะได้น้ำตาลไซโลส ซึ่งน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดมีประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง เช่นใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการหมักเอทธานอล ดังนั้นเซลลูโลสจึงนับว่าเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่น่าสนใจในการนำมาเป็นวัตถุดิบเพื่อการใช้ประโยชน์มากที่สุด

เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่พบเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของพืช เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์แสง (Rose, 1980; Lyons, 1981) ส่วนใหญ่ได้มาจากผลิตผลทางการเกษตร มีจำนวนมากและมีราคาถูก ปัจจุบันได้ให้ความสนใจในการนำมาเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเชื้อเพลิงและสารเคมี (James, 1991) การที่เซลลูโลสมีอยู่เป็นจำนวนมากเมื่อไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ก็อาจก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม (Arauji, 1980)

เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารชีวมวลจากพืชพบได้ในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหลายประเภทเช่น ต้นข้าวโพด เปลือกถั่วลิสง ฟางข้าว ต้นมันสำปะหลัง ฯลฯ วัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมป่าไม้ (ปิ่น-ฉวี เวชชานุ

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรบางชนิด

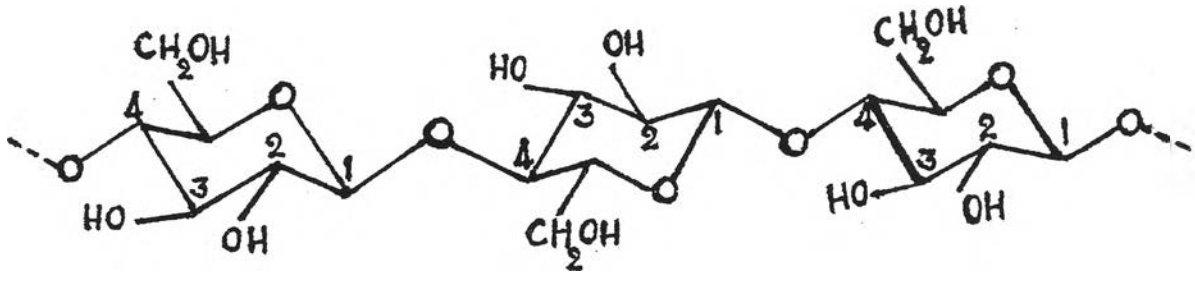
ชนิดของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	ส่วนประกอบทางเคมี (%)				เอกสารอ้างอิง
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า	
ฟางข้าว	32.1	24.0	12.5	17.5	ปิ่น-ฉวี เวชชานุเคราะห์ (2526)
	46-49	23-25	12-14	14.2	Staniforth (1979)
ชานอ้อย	33.4	30.0	18.9	2.4	ปิ่น-ฉวี เวชชานุเคราะห์ (2526)
ฟางข้าวสาลี	30.5	28.4	18.0	11.0	
ต้นมันสำปะหลัง	32.2	13.85	26.96	-	ณรงค์ เพ็งปรีชา (2521)
ต้นข้าวโพด	45	-	-	-	Swaminathan (1982)
ซังข้าวโพด	45	35	15		Parisi (1989)

เคราะห์, 2526) ประมาณได้ว่าในแต่ละปีมีการผลิตเซลลูโลสจำนวน 10^{14} ตัน/ปี พลังงานในเซลลูโลสถ่ายทอดมาจากดวงอาทิตย์โดยการสังเคราะห์แสง (Lyons, 1981) เซลลูโลสพบในเนื้อไม้ประมาณ 40-45 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง บริเวณที่พบคือ secondary cell wall (Fero, 1981) การนำเซลลูโลสมาใช้ประโยชน์ ในขั้นแรกต้องย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลโดยใช้สารเคมีหรือใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่ผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเซลลูโลสได้ (Colin, 1977)

ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรทชนิดโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย polymer molecule ของหน่วยย่อยของ D-anhydroglucopyranose มาเชื่อมเป็นสายยาวด้วยพันธะ β-1,4 glucosidic อย่างระเบียบ เป็นสายตรงไม่มีแขนง สูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เป็นองค์ประกอบที่ให้ความแข็งแรงแก่พืช โดยธรรมชาติจะพบเซลลูโลสอยู่ร่วมกับสารอื่น เช่น ลิกนิน, เฮมิเซลลูโลส จำนวนหน่วยของเซลลูโลสไม่ทราบจำนวนที่แท้จริง ประมาณได้ว่าต้องมีมากตั้งแต่ 1,000-10,000 หน่วยกลูโคส (Tsao และ Chiang, 1983) ซึ่งแตกต่างกันตามชนิดของพืช ถ้าพิจารณาถึงรูปแบบ (conformation) ของการจัดเรียงของหน่วยย่อยที่เชื่อมต่อกันจะอยู่ในลักษณะ chair form ซึ่งแต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (intramolecular H-bonds) ระหว่าง hydroxyl group (-OH) ที่ตำแหน่ง C-atom ที่ 3 กับ ring oxygen ของโมเลกุลถัดไป และเชื่อมต่อระหว่างสายเซลลูโลสที่ขนานกันด้วย (intermolucular H-bonds) ระหว่าง hydroxyl group (-OH) ที่ตำแหน่ง C-atom ที่ 6 กับ O-atom ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของ D-anhydroglupyranose ในอีกสายหนึ่ง (ภาพที่ 4) ซึ่งทำให้เซลลูโลสมีโครงสร้างซับซ้อนขึ้น มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ยากต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และสารเคมี

โดยทั่วไปธรรมชาติของเซลลูโลส (native cellulose) จะอยู่ในรูปของลิกโนเซลลูโลส เซลลูโลสจะเชื่อมอยู่กับโพลีแซคคาไรด์อื่น ๆ เช่น เพคติน เฮมิเซลลูโลส แป้ง และ phenolic polymer ของลิกนิน Cowling และ Kirk (1976) ศึกษาถึงโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส พบว่าในส่วนของ secondary cell wall จะเป็นส่วนที่พบว่าเซลลูโลสมากที่สุดและจะมีปริมาณลดลงในส่วนของ



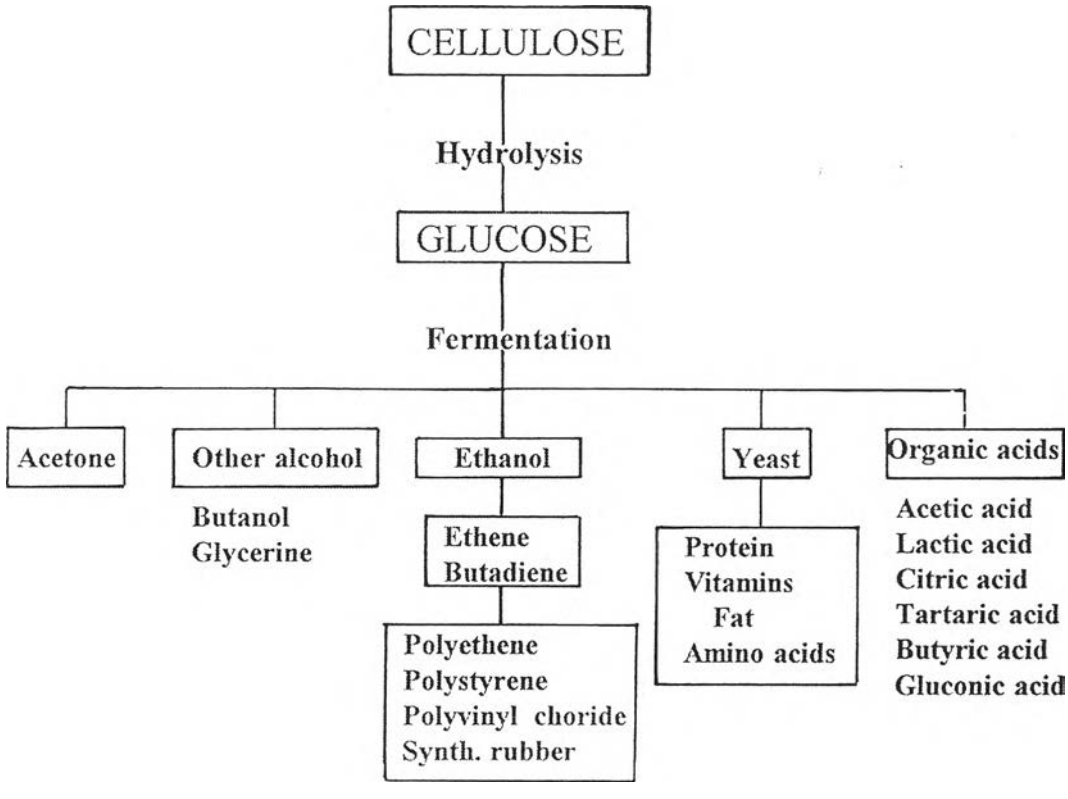
ภาพที่ 2 โครงสร้างของเซลลูโลส (Nisizawa, 1973)

middle lamella ส่วนเฮมิเซลลูโลสและลิกนินจะพบมากในส่วน middle lamella และจะมีปริมาณลดลงในส่วนของ secondary cell wall ในส่วนของ secondary cell wall เซลลูโลสและส่วนประกอบชนิดอื่น ๆ ของผนังเซลพืชจะเรียงตัวเป็นกลุ่มยาวเรียก microfibrils และ microfibril แต่ละสายจะเชื่อมต่อระหว่างสายที่ขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน บริเวณที่มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลของเซลลูโลสอย่างเป็นระเบียบสูงเรียกบริเวณนี้ว่า crystalline ส่วนบริเวณที่มีการจัดเรียงไม่เป็นระเบียบหรือเป็นระเบียบน้อยกว่าเรียกว่าบริเวณ amorphous หรือ paracrystalline บริเวณที่เป็น cryltalline จะมีประมาณ 50-90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือจะเป็น amorphous แต่ละบริเวณจะแสดงคุณสมบัติการยอมรับต่อกลไกการเข้าทำปฏิกริยาของเอนไซม์ต่างกัน โดยที่บริเวณ amorphous ยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกริยาการย่อยสลายง่ายกว่าบริเวณ crystalline ดังนั้นกลไกการย่อยสลายจะเกิดขึ้นที่บริเวณ amorphous ได้เร็วกว่าเกิดขึ้นที่บริเวณ crystalline

ประโยชน์ของเซลลูโลส

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม จึงมีวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร ประเภทฟางข้าว แกลบ ชี้เลื่อย ชานอ้อย และต้นมันสำปะหลังเป็นจำนวนมาก วัสดุเหล่านี้หาได้ง่ายนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ และยังนำมาแปรรูปโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์เช่น เซลลูโลสเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะได้กลูโคสเป็นส่วนใหญ่ ต้นข้าวโพดมีเซลลูโลสประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย่อยสลายพบว่าได้น้ำตาลกลูโคสประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของเซลลูโลส น้ำตาลกลูโคสเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น การผลิต single cell protein เอทธานอล ไวตามิน กรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด กรดอินทรีย์ และเคมีภัณฑ์อีกหลายอย่าง (ภาพที่ 3)

ในธรรมชาติการเสื่อมสภาพของเซลลูโลสเกิดได้ช้า เพราะมีสิ่งกีดขวางโดยเฉพาะลิกนิน มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้โดยการสร้างเอนไซม์และขับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เอนไซม์เซลลูเลสจัดว่าเป็น extracellular enzyme (Liese, 1975 ; Scragy, 1988) เชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญคือ เชื้อรา ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ เชื้อราในกลุ่มนี้มีชื่อเรียกว่า cellulolytic fungi จึงมีผู้ให้ความสนใจและนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับอุตสาหกรรม เช่น T. reesei (เดิมเรียกว่า T. viride) (Mandels and Sternberg,1979), Aspergillus niger (Kassim, 1976; Toyama, 1976)



ภาพที่ 3 การใช้กลูโคสเพื่อการผลิตเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ

ที่มา : Gerd Wegener (1983)

การย่อยสลายสารลิกโนเซลลูโลส

การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสทำได้ 2 วิธี

1. การย่อยสลายโดยใช้กรด (acid hydrolysis)

การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสด้วยกรด เช่น การใช้กรดซัลฟูริคเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า ไฮโดรคลอริค 40 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า เครื่องมือที่ใช้จะต้องทนทานต่อการกัดกร่อน ซึ่งเครื่องมือประเภทนี้มีราคาแพง นอกจากนี้โครงสร้างที่เป็นผลึกจำเป็นต้องใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูง และต้องใช้อุณหภูมิสูงในการย่อยสลายจึงจะได้น้ำตาลกลูโคส ปฏิกริยาการย่อยจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 15-20 นาที ปฏิกริยาการใช้กรดเกิดขึ้นไม่จำเพาะเจาะจง ดังนั้นกลูโคสบางส่วนที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกริยากับกรดต่อไปทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงชนิดอื่น เช่น furfural และกรดยังทำปฏิกริยากับสารประกอบอื่นที่ติดมากับเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการอีกด้วย

2. การย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น หอยทาก (Helix pomaita) และจุลชีพต่าง ๆ เช่น โปรโตซัว แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส และเชื้อรา เป็นต้น ลักษณะการย่อยสลายโดยเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์และเซลลูโลส จะไม่ทำปฏิกริยากับสารอื่นที่ปะปนมา ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรง น้ำตาลกลูโคสจะไม่ถูกสลายต่อไป ฉะนั้นการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายเซลลูโลสจึงได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลที่ค่อนข้างจะบริสุทธิ์และไม่มีผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการปะปนออกมา

Lee และคณะ (1983) ศึกษากลไกการเข้าย่อยสลายโดยเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจะเข้าทำปฏิกริยากับเซลลูโลสในบริเวณ amorphous และ crystalline พร้อม ๆ กัน แต่บริเวณ amorphous มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลไม่เป็นระเบียบ ดังนั้นโมเลกุลของเอนไซม์สามารถผ่านเข้าไปสลายได้ง่ายกว่าบริเวณ crystalline การย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ที่บริเวณผิวและย่อยสลายทีละชั้นของ microfibril

ในธรรมชาติการย่อยสลายเซลลูโลสจะเกิดโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกัน ในสภาพที่มีออกซิเจนผลของการย่อยสลายจะได้คาร์บอนไดออกไซด์ ฮิวมัส ความร้อน และจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น โดยจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นนี้จะได้มาจากการย่อย

สลายสารประกอบเซลลูโลสในสภาพที่เหมาะสม การระบายอากาศและอุณหภูมิเหมาะสมมีแหล่งอาหารหลัก (macronutrient) เพียงพอกับการนำไปสร้างพลังงานเพื่อใช้ในระบบเมตาบอลิซึม และการเพิ่มจำนวนเซล ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนการย่อยสลายเซลลูโลสจะได้ คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน เอทธานอล acetic formic succinic butyric และ lactic acid (Jacquse, 1977)

<u>การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส</u>

ขบวนการย่อยสลายเซลลูโลสในธรรมชาติ เป็นขบวนการที่ซับซ้อน ต้องการระบบเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน Reese และคณะ (1950) ตั้งสมมติฐานเพื่ออธิบายกลไกการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลส เรียกว่าสมมติฐาน C_1-C_x มีกลไกการทำงานดังนี้

crystalline cellulose ---C_1---> reactive cellulose (amorphous) ---C_x---> cellobiose + glucose ---cellobiase---> glucose

C_1 เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่เข้าย่อยสลาย โดยทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายเซลลูโลสทำให้ได้สายของ D-anhydroglucose ที่สั้นลง ซึ่งเหมาะต่อการย่อยสลายต่อด้วย C_x

C_x จะย่อยสลายพันธะ β-1,4 glucosidic อย่างสุ่ม ทำให้ได้ cellobiose และกลูโคส cellobiose จะถูกย่อยสลายต่อโดย cellobiase ทำให้ได้กลูโคส

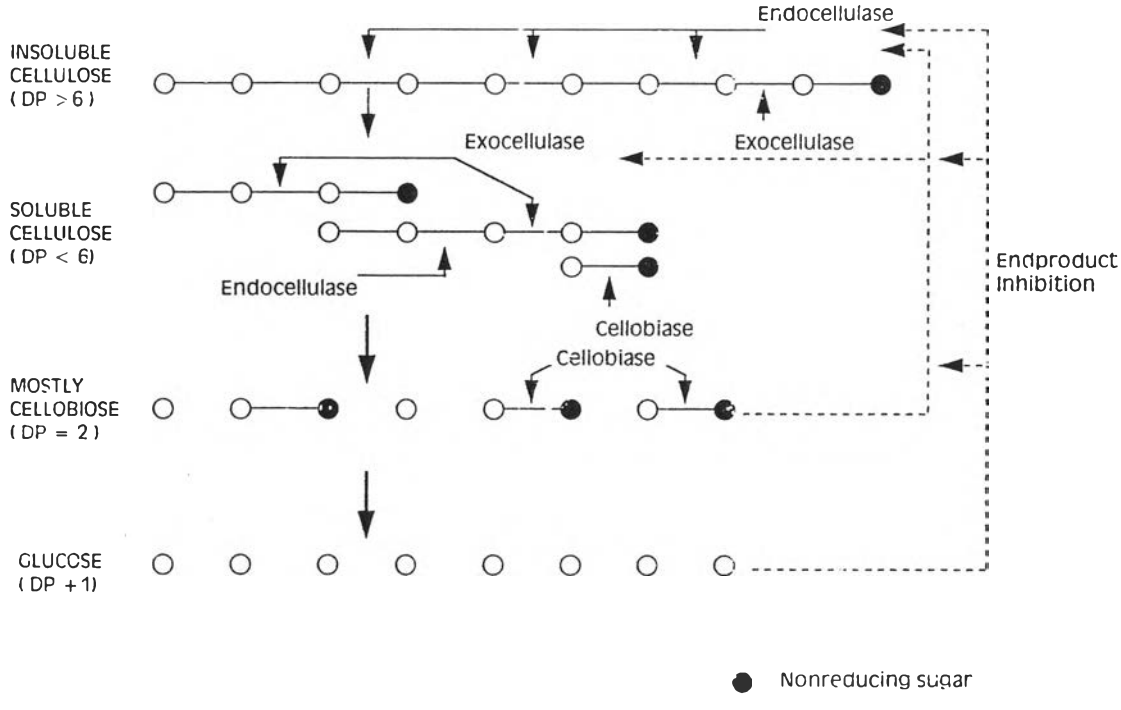
Reese (1976) ได้พัฒนาแนวความคิด C_1-C_x โดยการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์มากขึ้น พบองค์ประกอบใหม่ คือ cellobiohydrolase (CBH) เอนไซม์นี้จะทำหน้าที่ตัดพันธะ β-1,4 glucosidic จากปลายด้าน non-reducing ทีละ 2 หน่วย ทำให้ได้ cellobiose จากการศึกษาคุณสมบัติของ CBH และ C_1 เชื่อว่าเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกัน

จากการศึกษาโดยการแยกและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาระบบเอนไซม์ พบว่าเซลลูเลสเป็น multicomponent enzyme มีระบบเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดมาทำงานร่วมกัน (Lee et al., 1983) ดังนี้ คือ

1. Endo β-1,4 glucan glucanohydrolase หรือ endoglucanase หรือ C_x การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ตัดพันธะ β-1,4 glucosidic ภายในสายเซลลูโลสบริเวณที่เป็น amorphous เอนไซม์นี้จะตัดพันธะอย่างสุ่ม (random) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ กลูโคสและเซลโลไบโอส โดยจะได้เซลโลไบโอสเป็นหลัก

2. Exo β-1,4 glucan cellobiohydrolase หรือ exoglucanase หรือ C_1 เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดพันธะ β-1,4 glucosidic จากปลายด้านที่เป็น non-reducing ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอส น้ำตาลที่ได้จากการย่อยจะมีการจัดเรียงตัวเป็น α configuration (inversion)

3. β-1,4 glucosidase หรือ cellobiase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย cellbiose และ cellodextrins ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส



ภาพที่ 4 ลำดับการเข้าทำปฏิกริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส

ที่มา : Saddler et al. (1987)

คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาถึงโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเป็น glycoprotein ประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรท ในอัตราส่วน 1:1 (Ryu and Mandels, 1980) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000-60,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ cofactor หรือโลหะอื่น ๆ ในการทำปฏิกริยา โดยทั่ว ๆ ไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีอุณหภูมิที่พอเหมาะในการทำงาน (optimum temperature) ประมาณ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีความทนต่ออุณหภูมิสูง คงทนต่อ pH ได้กว้าง (ระหว่าง 4.0-8.0) และคงทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสและ 4 องศาเซลเซียสได้นานหลายปี หรือสามารถเก็บโดยวิธี freeze dry หรือตกตะกอนด้วย acetone หรือ เอทธานอล โดยไม่มีการสูญเสียคุณสมบัติ (Ryu and Mandel, 1980)

การหมักเอทธานอลจากเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก มีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งของอาหาร เชื้อเพลิงและสารเคมี (James, 1991) การใช้ประโยชน์ในขั้นแรกต้องทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลกลูโคส จากนั้นใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารเพื่อการบริโภคของมนุษย์และสัตว์ ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีชนิดอื่น ๆ ที่ไม่สามารถผลิตได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม (Lyons, 1981)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องและมีความสำคัญคือ ชนิดของวัตถุดิบที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลส ซึ่งวัตถุดิบแต่ละชนิดมีส่วนประกอบเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินแตกต่างกัน โดยทั่วไปพบว่ามีเซลลูโลสประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบทั้งหมด (William and Catherine, 1990) อัตราส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินประมาณ 4:3:3 เช่น ในต้นข้าวโพดมีเซลลูโลส 40 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 35 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 15 เปอร์เซ็นต์ ในไม้เนื้ออ่อนมีเซลลูโลส 43 เปอร์เซนต์ เฮมิเซลลูโลส 19 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 29 เปอร์เซ็นต์ (Jeffries, 1984) จากส่วนประกอบที่แตกต่างกันจึงต้องมีการแยกส่วนประกอบบางส่วนออกไปอันจะทำให้การย่อยสลายเกิดได้ง่ายขึ้น วัตถุดิบเมื่อผ่านขั้นตอนการปรับสภาพแล้วจะมีโครงสร้างที่อ่อนแอง่ายต่อการย่อยสลาย (Lyons, 1981; Downing et al., 1987; Prave et al., 1987)

วัตถุดิบเมื่อผ่านการปรับสภาพแล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะได้ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น (Saddler, 1982) การปรับสภาพโดยใช้ไอร้อน (Beltrame et al., 1991) เป็นวิธีที่ใช้อย่างกว้างขวางในไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง ฟางข้าว สาลี ชานอ้อย วิธีการดังกล่าวทำให้เกิดการแยกตัวของเซลลูโลส และเกิดส่วนที่เป็น cellulose residues เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนของการ hydrolysis เกิดเป็นน้ำตาลกลูโคส

ตามปกติการสลายตัวของเซลลูโลสในธรรมชาติเกิดได้ช้า เพราะโครงสร้างที่เป็นผลึกทำให้เกิดความต้านทาน และลิกนินที่อยู่รอบ ๆ ยังเป็นตัวกีดขวางการเกาะของเอนไซม์ นอกจากนั้นบริเวณที่เอนไซม์จะเข้าเกาะเพื่อทำปฏิกริยายังมีจำกัด ขั้นตอนของการปรับสภาพยังเป็นการเพิ่มบริเวณที่เกาะของเอนไซม์ที่เรียก amorphous region (Fan et al., 1981) การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพได้แก่การใช้วิธีกลทุกชนิด รวมถึงการใช้รังสี ทำให้โครงสร้างมีขนาดเล็กลง ส่วนวิธีทางเคมีที่เป็นวิธีเก่าแก่และได้ผลดีคือ การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ได้มีการทดลองปรับสภาพชานอ้อยซึ่งมีเซลลูโลส 45-55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ทางกายภาพร่วมกับการใช้วิธีทางเคมี พบว่าย่อยสลายได้สูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ (Esser, 1982) ฟางข้าวตัดให้มีขนาด 1.5-3.0 ซม. นำไปบด จากนั้นนำไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1:6 (w/v) นาน 1 ชั่วโมง เมื่อนำไปย่อยสลายด้วย crude enzyme cellulase เป็นเวลา 2-5 วัน ได้น้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ และย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้าได้น้ำตาลถึง 6-10 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 48 ชั่วโมง (Araujo and Sauza, 1981)

การแยกน้ำตาลหรือ saccharification โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกระบวนการย่อยสลายที่เฉพาะจำเพาะเจาะจง ปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ อุณหภูมิ pH (Prave, 1987) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานอยู่ในช่วง 40-50 องศาเซลเซียส และ pH ประมาณ 5.0 (Eriksson et al, 1989) Tanaka และคณะ (1980) ได้ทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราหลายชนิด พบว่าที่ pH เริ่มต้น 4.7 ให้ผลผลิตของเอนไซม์สูงสุด เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่สำคัญคือ Trichoderma sp., A. niger (Scragy, 1988) และเชื้อราที่ใช้เพื่อการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมคือ T. reesei (Neway,1989 ; Shin, 1978) เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคงที่ มี activity สูงเจริญเติบโตได้รวดเร็วที่อุณหภูมิปานกลาง (Bellamy and Schenectaly, 1978) และเอนไซม์สามารถย่อยเซลลูโลสได้อย่างสมบูรณ์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(Linko, 1987) แหล่งของเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์นับว่ามีความสำคัญมาก ผลิตได้ครั้งละจำนวนมาก สามารถเลือกชนิดของเอนไซม์ที่จะผลิตได้และยังผลิตได้ในสภาพแวดล้อมทั่วไป การผลิตเอนไซม์จำเป็นต้องทดสอบให้ได้เชื้อที่มีความเหมาะสมในแต่ละสภาพแวดล้อมนั้น ๆ Tanaka และคณะ (1980) ได้ทดสอบการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราที่มีความสามารถหลายชนิด คือ Trichoderma, Irpex, Penicillium และ Cellomonas เชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้สูงคือ T. reesei ซึ่งได้รับการปรับปรุงพันธุ์มาจาก T. viride

Trichoderma reesei เป็นเชื้อราใน Class Deuteromycetes เส้นใยมีผนังกั้น ก้านชูคอนิเดียมีผนังกั้น แตกกิ่งก้านสาขามากมาย sterigma ก้านสุดท้ายทำหน้าที่สร้างคอนิเดียรูปไข่ สีเขียว มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยเซลลูโลส (ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์, 2524)

เชื้อจุลินทรีย์ เป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งนับตั้งแต่เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเชื้อยีสต์เพื่อการหมักกลูโคสเป็นเอทธานอล คุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ควรประกอบด้วย สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณสูงและสม่ำเสมอภายใต้การควบคุมขบวนการผลิตที่เหมาะสม ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ และรักษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและให้ประสิทธิภาพในการผลิตที่แน่นอน ใช้วัตถุดิบราคาถูก ใช้ระยะเวลาในการสร้างผลผลิตสั้น มีประสิทธิภาพในการแปรสภาพวัตถุดิบไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงไม่เกิดการสะสมของ intermediate product ที่ไม่ต้องการมากเกินไป

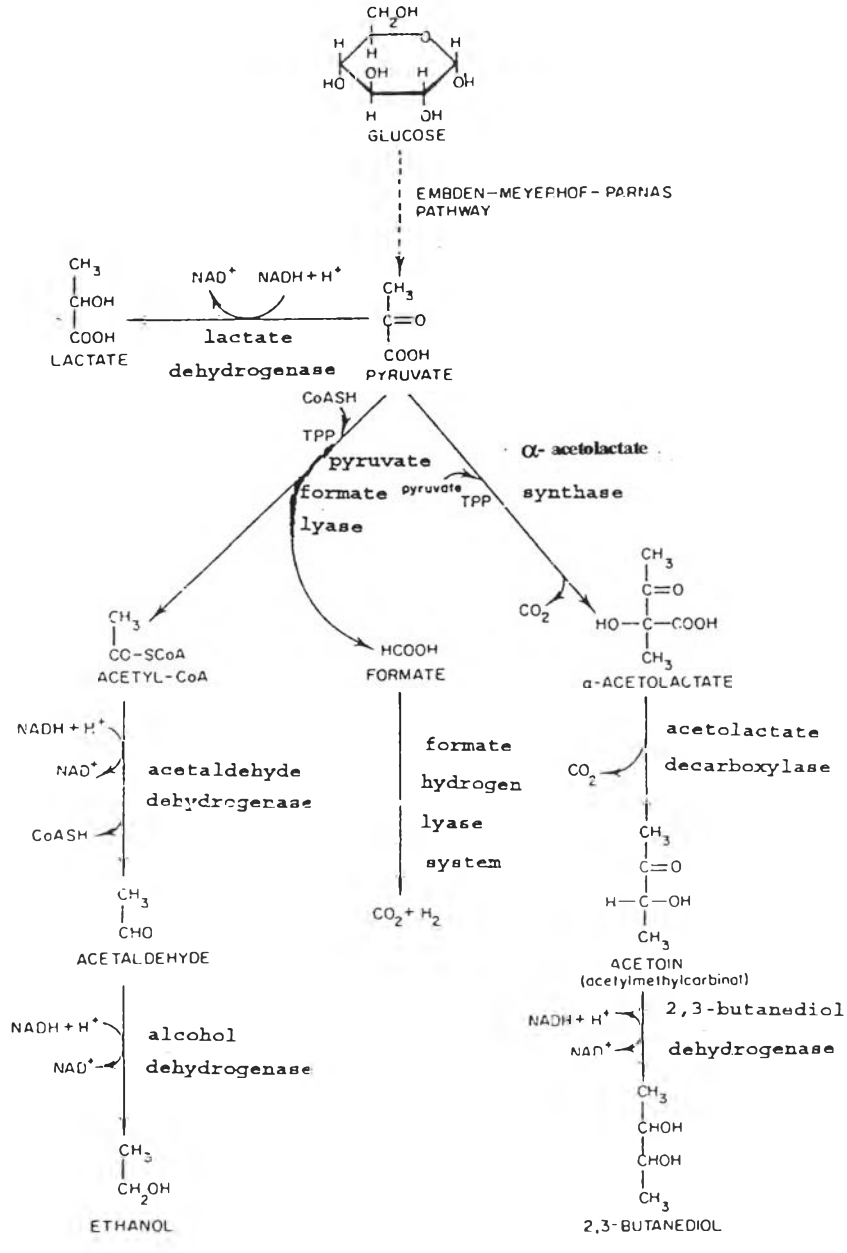
การหมักเอทธานอล เชื้อยีสต์นับว่ามีบทบาทสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง S. cerevisiae ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดี น้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งโดยทั่วไปเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส (Lyons, 1981; Neway, 1989; Peter Kotter and Michale, 1983) ดังนั้นจึงนิยมใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักเอทธานอลจากน้ำตาลกลูโคส (Tsao, 1985)

ยีสต์เป็นเชื้อราที่อยู่ในสกุล Saccharomyces เป็นเชื้อราเซลล์เดียว เติบโตโดยการแตกหน่อหรือ budding แอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของยีสต์ใช้เป็นเครื่องดื่มได้ S. cerevisiae เป็นสายพันธุ์ที่คัดแล้วว่าเหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์ ผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงมีความสามารถในการใช้น้ำตาล hexose ได้ดี

ซึ่งตามทฤษฎีจะได้ 51 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนไดออกไซด์ 49 เปอร์เซ็นต์ (ปรียา วิบูลย์เศรณี, 2534)

ในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ แอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากกระบวนการทางชีวเคมี หรือเมทบอลิซึม โดยผ่าน Embden-Meyerhof-Parnass pathway จะได้ pyruvic acid และในขั้นตอนสุดท้ายก็จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอล ดังภาพที่ 6 (Jacques and Riviere, 1977)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักการคือ การเปลี่ยนแปลงของ pH ซึ่ง pH จะลดลงตลอดช่วงระยะเวลาการหมัก การรวมตัวของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ (Frederick, 1983) นอกจากนั้นยังอาจเกิดการสะสมของผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอีกด้วย (Saddler, 1983)



ภาพที่ 5 วิถีการเกิดเอทธานอลในกระบวนการทางชีวเคมี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้เชื้อราประเภทเส้นใย 2 ชนิด 3 สายพันธุ์

2. เพื่อให้ทราบถึงกระบวนการผลิตเอทธานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในระดับห้องปฏิบัติการ และข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา และนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในรูปของอุตสาหกรรมต่อไป

2. สามารถนำเอาวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีอยู่ในท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์โดยเปลี่ยนเป็นเอทธานอล

3. เป็นการกำจัดวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งมีผลดีต่อสภาพแวดล้อม

ขอบเขตของการศึกษา

1. คัดเลือกและทดสอบคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในเชื้อรา 2 ชนิด 3 สายพันธุ์

   Trichoderma reesei QM 9414

   Trichoderma reesei QM 6a

   Aspergillus sp. No. 3335

2. ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแล้ว จากนั้นนำไปใช้ย่อยสารประกอบประเภทเซลลูโลส

3. การย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 4 ชนิด คือ ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพดและต้นมันสำปะหลัง โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส

4. การหมักน้ำตาลที่สกัดได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* เพื่อให้เกิดเอทธานอล

5. การวิเคราะห์ปริมาณเอทธานอล กลูโคส ในระหว่างการหมัก