# บทที่ 2

## การตรวจเอกสาร

เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์พวกคาร์โบไฮเดรท มีหน่วยย่อยที่สุด คือ น้ำตาลเบตา - ดี - กลูโคส (β - D - glucose) เซลลูโลสจะไม่ละลายน้ำแต่สามารถละลายได้ดีในกรดแก่ เบสแก่และสารละลายเกลือเข้มข้น (Zabriskie, et al. , 1980, Goldstein, 1981 , Sasaki, 1982) เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์พืชชั้นสูง จึงเป็นแหล่งของสารอินทรีย์ที่มีจำนวนมาก โดยพบว่ามีปริมาณมากถึง 50 เปอร์เซนต์ ของมวลชีวภาพทั้งหมดที่ผลิตได้ 100 ล้านตันต่อปี (Goldstein, 1981) ในปัจจุบันจะเห็นได้ว่ามีการนำเอาเซลลูโลสมาเปลี่ยนให้เป็นวัสดุที่มีค่าทางเศรษฐกิจในรูปแบบต่าง ๆ

ผลการย่อยสลายเซลลูโลสทำให้ได้สารที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ วิธีการย่อยสลายเซลลูโลสอาจทำได้โดย วิธีทางเคมี เป็นการย่อยเซลลูโลสด้วยกรด การย่อยวิธีนี้เป็นการย่อยที่ไม่เฉพาะเจาะจง คือกรดจะย่อยองค์ประกอบของเซลลูโลสทุกองค์ประกอบ เพราะจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิที่สูง จึงทำให้เกิดข้อเสีย คือ ต้องใช้พลังงานมาก ภาชนะที่ใช้ต้องทนต่อการกัดกร่อนของกรดและทำให้สภาพแวดล้อมเสียหาย สำหรับข้อดีก็ คือ ปฏิกริยาเกิดขึ้นเร็วและได้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น (Tsao and Chiang, 1983; Goldstein, 1981) หรือโดยวิธีทางชีวภาพ เป็นการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส การย่อยด้วยวิธีนี้มีความเฉพาะเจาะจงสูงมาก ทำให้ได้ผลผลิตที่ดีไม่มีผลผลิตที่ไม่ต้องการปนเปื้อนออกมา ทำให้เกิดข้อดีคือปฏิกริยาเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิที่สิ่งมีชีวิตสามารถเจริญได้ ไม่ต้องใช้พลังงานมากปฏิกริยาก็ไม่รุนแรง ไม่ต้องใช้ภาชนะทนกรด เหตุนี้ค่าใช้จ่ายจึงถูกกว่าและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมหากแต่ปฏิกริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และน้ำตาลกลูโคสที่ได้อยู่ในรูปของสารละลายเจือจาง (Mandels and Stenberg, 1976; Goldstein, 1981)

เอนไซม์เซลลูเลสนั้นอาจได้มาจาก สิ่งมีชีวิตชั้นสูงคือ หอยทาก (Helix pomatia) ซึ่งพบได้ในน้ำย่อย (Walseth, 1952) กับจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยเซลลูโลส ได้แก่ แบคทีเรียและเชื้อรา จุลินทรีย์เหล่านี้จะเป็นตัวการทำให้เกิดกระบวนการที่เรียกว่า เซลลูโลไลติค (cellulolytic process) เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ( Dunlap and Lin-Chang, 1979)

ในปี ค.ศ. 1950 Reese และคณะ ได้เสนอว่าเอนไซม์เซลลูเลสจะต้องมีองค์ประกอบหลัก 3 องค์ประกอบ แต่ละองค์ประกอบคือเอนไซม์แต่ละชนิดที่มาร่วมกันทำงานเป็นเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้สามารถย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ องค์ประกอบทั้ง 3 นี้ ได้แก่ เบต้า - 1,4-กลูแคน กลูแคโนไฮโดรเลส [β-1,4-glucanohydrolase (E C 3.2.1.4)]หรือเอนโดรกลูแคเนส (endoglucanase) หรือ $C_x$ เบต้า - 1,4 - กลูแคน เซลโลไบโอไฮโดรเลส [β-1,4-glucan cellobiohydrolase (E C 3.2.1.19)] หรือเอกโซกลูแคเนส (exoglucanase) หรือ $C_1$ และเบต้า กลูโคซิเดส [β-glucosidase (E C 3.2.1.21)] หรือเซลโลไบเอส (cellobiase) ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้จะทำหน้าที่ร่วมกันโดยที่เอนไซม์เอนโดกลูแคเนสจะเข้าทำลายพันธะ β-glucosidic bonde ภายในสายเซลลูโลสอย่างอิสระทำให้เกิดสายโพลิเมอร์เส้นสั้นๆ ขึ้นมาใหม่ จากนั้นเอนไซม์เอกโซกลูแคเนสจะเข้าทำปฏิกริยาที่ปลายสายโพลิเมอร์ที่เป็น non-reducing end ทำให้เกิดเซลโลไบโอส และจากนั้นเอนไซม์ เบต้ากลูโคซิเดส จะย่อยเซลโลไบโอสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส (Wilke, 1983)

ในปี ค.ศ. 1988 Lin และ David ได้กล่าวว่าทั้งแบคทีเรีย และราที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ต้องมีการสังเคราะห์เอนไซม์ออกมา โดยทั่วๆ ไปแล้วการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลสจะมีการควบคุมเป็น 2 แบบ ซึ่งแต่ละแบบจะเป็นอิสระต่อกัน คือ แบบชักนำให้เกิด (induction) และแบบยับยั้ง (repression) ซึ่ง Masaki (1983) ได้เสนอว่าเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีหลายองค์ประกอบ ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณมาก ๆ จึงขึ้นกับชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้เพราะแหล่งคาร์บอนที่ใช้มีหลายชนิดที่สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยเฉพาะเซลลูโลสชนิดที่ไม่ละลายน้ำจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการชักนำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสได้ทุกองค์ประกอบและเอนไซม์ที่สังเคราะห์ได้นี้ยังสามารถนำไปย่อยผลึกเซลลูโลสที่มีอยู่ในธรรมชาติได้ดีอีกด้วย แต่ถ้าแหล่งคาร์บอนเป็นพวกไดแซคคาร์ไรด์ (disaccharide) โซโฟโลส (sopholose) ที่ละลายน้ำได้ เช่น แลคโตส และเซลโลไบโอส หรือ แม้แต่อะนาลอคของเซลโลไบโอส เช่น ไธโอเซลโลไบโอส (Thiocellobiose) และ เซลโลไบโออะซีเตท (cellobioacetate) ก็สามารถนำมาใช้เป็นตัวชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ได้แต่ไม่ค่อยดีนัก สำหรับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ชนิดนี้ได้เลย สำหรับรายละเอียดของการสังเคราะห์เอนไซม์นั้นยังไม่เป็นที่รู้กันโดยแน่ชัด Lin และ David (1988) ได้กล่าวว่าการศึกษากลไก และการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสในระดับโมเลกุลเป็นไปได้ยากและซับซ้อนมาก เนื่องจากจุลินทรีย์มีจีนที่ทำที่หน้าควบคุมการสังเคราะห์หลายจีน ในอดีตก็ได้มีรายงานว่าเชื้อราที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ ถูกจัดอยู่ในพวก Deuteromycetes เช่น Fusarium sp. Penicillium sp. และTrichoderma sp. และอีกพวกหนึ่ง คือ Basidiomycetes เช่น Phanerochaete sp. และ Schizophyllum sp. แต่ส่วนใหญ่

เชื้อราที่นำมาศึกษา ได้แก่ Trichoderma sp. และ Phanerochaete sp. สำหรับ Trichoderma sp. นั้นสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่มีองค์ประกอบย่อย ๆ หลายองค์ประกอบด้วยกันคือเอนไซม์เอนโดกลูแคเนส (endoglucanase) มีองค์ประกอบย่อย 4 องค์ประกอบ คือ EG I EG II EG III และ EG IV (Shoemaker and Brown,1978 a,b) และเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส (Cellobiohidrolase) มีองค์ประกอบย่อย 2 องค์ประกอบ คือ CBH I และ CBH II (Gritzali and Brown,1979; Fogerstam and Pettersson,1979,1980) ต่อมา Wood and McCrae (1972,1975) ได้นำ Trichoderma konigii มาศึกษา และสามารถแยกองค์ประกอบย่อยของเอนไซม์เซลลูเลสออกมาได้ 8 องค์ประกอบ คือ มีเอนไซม์เอกโซกลูแคเนส 1 องค์ประกอบ เอนโดกลูแคเนส 5 องค์ประกอบ และเบต้ากลูโคซิเดส 2 องค์ประกอบ Paice และคณะ (1984) ได้รายงานว่า Schizophyllum sp. สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้แล้วยังพบว่าเอนไซม์เอนโดกลูแคเนสมีองค์ประกอบย่อย 2 องค์ประกอบ คือ EGI และ EGII เท่านั้น ซึ่งทั้ง 2 องค์ประกอบย่อยที่กล่าวมาแล้วนั้น จะมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพคล้ายคลึงกันผิดกันแต่โครงสร้างของสายโปรตีนเท่านั้น โดยที่สายโปรตีนของ EGI ทางด้าน $NH_2$-terminal จะมีกรดอมิโนชนิดอะลานิน มาก (alanin-rich) กว่า EGII 16 ตำแหน่ง ซึ่ง Bland และ Douglas (1985) ได้เสนอว่า EGII นี้ อาจเกิดจากกระบวนการ posttranslational proteolytic cleavage ของ EGI ต่อมา Eriksson (1978) และ Ayers และคณะ (1978) ได้รายงานว่า Phanerochaete chrysosporium มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่ประกอบไปด้วยองค์ประกอบย่อย ๆ 9 องค์ประกอบ คือเอนไซม์เอกโซกลูแคเนส 1 องค์ประกอบ เอนโดกลูแคเนส 5 องค์ประกอบ เบตา กลูโคซิเดส 2 องค์ประกอบ และเซลโลไบโอสออกซิเดส (cellobiose oxidase) อีก 1 องค์ประกอบ Hirayama และคณะ(1978) ได้รายงานว่า Pyricularia oryzae มีการสร้างเอนไซม์ เบตา กลูโคซิเดส ประกอบไปด้วยองค์ประกอบย่อย ๆ 3 องค์ประกอบ คือ GA GB I และ GB II และในปีเดียวกัน Kanda และคณะ (1978) ได้เสนอว่า Irpex lacteus (Polyporus tulipiferae) สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เอนโดกลูแคนเนส ที่ประกอบด้วยองค์ประกอบย่อย ๆ 3 องค์ประกอบ คือ FI FII และ SI ต่อมา Bland และ Douglas (1985) ได้รายงานว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลสนั้นขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ประการแรกได้แก่สัดส่วนของเอนไซม์เอนโดกลูแคเนสและเอกโซกลูแคเนล นอกจากนี้ยังขึ้นกับความยาวของสายโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosacharides) Sasaki และคณะ (1983) ได้รายงานว่าเชื้อรา T.viride สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงและมีประสิทธิภาพมาก จึงได้มีการผลิตและจำหน่ายเป็นสินค้าออกทำรายได้ให้กับประเทศญี่ปุ่นประมาณปีละ 170 ล้านเยน (Goksoyr and Eriksen, 1980)

วิธีการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสได้นั้นมีอยู่หลายวิธีด้วยกันโดยแต่ละวิธีก็มีหลักการใหญ่ ๆ ในการแยกเชื้อที่คล้ายคลึงกัน วิธีการคัดแยกเชื้อราส่วนใหญ่ดัดแปลงมาจากวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลสได้ (cellulolytic bacteria) สำหรับการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเชื้อราได้เริ่มต้นมาจากความสนใจของนักโรคพืชตั้งแต่ศตวรรษที่ 19 (สุนทร วงค์สวัสดี 2516) Waksman (1932) ได้รวบรวมผลงานของนักวิจัยซึ่งได้ทำไว้ในสมัยแรกๆ ที่เริ่มมีความสนใจในการรวบรวมและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์และได้การรายงานว่านักโรคพืชได้ค้นพบเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) และเชื้อรา ที่เป็นตัวการที่ทำให้ต้นพืชเกิดโรค โดยการย่อยสลายเซลลูโลสตรงบริเวณที่เชื้อจุลินทรีย์เข้าทำอันตราย หลังจากนั้นจึงได้มีการค้นคว้าหาสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูโลสเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินและส่วนที่ถูกจุลินทรีย์เข้าทำอันตราย (infected meterials) จากนั้นมาก็ได้มีการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสออกมามากมายจนถึงปัจจุบัน เช่น Chavanich และคณะ (1981) ได้คัดแยกเชื้อราจากกองขยะโรงงานกระดาษชานเมืองกรุงเทพ ฯ ได้เชื้อรา Cephalosporium sp. Aspergillus sp. Humicola sp. Talaromyces sp. และ Thermonascus sp. Abdel-Hafez (1982) ได้คัดแยกเชื้อราจากดินในทะเลทรายประเทศซาอุดิอารเบีย ได้เชื้อรา Aspergillus sp. Alternaria sp. Stachybotrys sp. Penicillium sp. และ Botryotrichum sp.

McBeth (1916) ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้จากดินในแถบตอนใต้ของรัฐคาลิฟอเนียในประเทศอเมริกา ได้เชื้อแบคทีเรียพวก Bacillus sp. ชนิดต่าง ๆ 20 ชนิด Pseudomonas sp. และแบคทีเรีย ชนิดอื่น ๆ 7 ชนิด Hungate (1947) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส จากกระเพาะวัวได้เชื้อ Bacteroides succinogenes ต่อมาก็ได้มีการค้นพบและเก็บรวบรวมแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส ได้เพิ่มมากขึ้น เช่น Actinomyces cellulosae Angiococcus cellulosum B.cellulosae Cellulomonas acidula C.aurogena C.fimi C.biazotea Clostridium cellulosovens Polyangium cellulosum Sporangium cellulosum Streptomyces celluloflavus (Dunlap and Lin-Chang.1979) Ruminococcus albus (Kawai et al. 1987)

การหมัก (Fermentation) มีคำจำกัดความอยู่ 2 ความหมาย คือทางสรีระวิทยาหมายถึงกระบวนการเมตาบอลิซึมที่ได้พลังงานมาจากการใช้สารประกอบอินทรีย์ ทำหน้าที่เป็นทั้งตัวให้และรับอิเลคตรอนขั้นสุดท้าย แต่ความหมายนี้แม้จะไม่ครอบคลุมการหมักทุกชนิด เช่นการหมักกรดโปรพิโอนิคและกรดบิวทายริก เป็นต้น แต่ก็ยังเป็นคำจำกัดความที่นิยมใช้กันโดยทั่ว ๆ ไป ส่วนกระบวนการทางไบโอเทคโนโลยีและทางอุตสาหกรรม ได้ให้คำจำกัดความการหมักว่า หมายถึงกระบวนการต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์เป็นตัวการทำให้เกิดขึ้นในสภาวะที่มีการใช้ออกซิเจน(aerobe)

เช่นการผลิตกรดซิตริก หรือสภาวะที่ไม่มีการใช้ออกซิเจน (anaerobe) ซึ่งแอลกอฮอล์ หรือ เอทธานอล ก็เป็นผลผลิตที่เกิดจากเมตาโบลิซึมในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน (พวงพร,2530) สำหรับจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์ คือ ยีสต์และแบคทีเรีย ซึ่งทั้งยีสต์และแบคทีเรีย จะมีจีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์มาเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสในกระบวนการเมตาโบลิซึมสำหรับจุลินทรีย์ที่น่าสนใจศึกษาได้แก่ ยีสต์ เช่น Saccharomyces sp. และ Candida sp. แบคทีเรีย ได้แก่ Zymomonas sp. และ Clostridium sp. เป็นต้น

ในกลุ่มเอนไซม์ของยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไกลโคไลซีส และการหมักแอลกอฮอล์ จะมีเอนไซม์เพียงตัวเดียว คือ alcohol dehydrogenase หรือ ADH เท่านั้นที่เป็นลักษณะเฉพาะทางพันธุ์กรรมของยีสต์ เพราะยีสต์ที่มีการกลายพันธุ์(mutant)ของจีนนี้จะไม่สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้เลย (Ciriacy,1976) เมื่อได้ทำการศึกษาทางด้านเอนไซม์และพันธุกรรมไปพร้อมกัน พบว่ากระบวนการสร้างเอนไซม์ alcohol dehydrogenase จะถูกควบคุมโดยจีนที่ต่างกัน โดยที่เอนไซม์ ADH I และ ADH II เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในไซโตพลาสซึม เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีลำดับของกรดอมิโนที่คล้ายคลึงกันและแต่ละชนิดของเอนไซม์จะประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วย แต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37,000 นอกจากนี้หน่วยย่อยของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ยังสามารถที่จะรวมกันเป็นเอนไซม์ลูกผสมได้ เรียก เอนไซม์ชนิดนี้ว่า tetrameric alcohol dehydrogenase และยังสามารถทำงานได้เหมือนกับเอนไซม์ alcohol dehydrogenase เช่นเดิม อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเหล่านี้ก็ยังไม่ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ที่ทำให้หน่วยย่อย เหล่านี้มารวมกันและทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ADH เหมือนเดิม (Ciriacy,1975) สำหรับ ADH I นั้นเป็นเอนไซม์ที่ทำให้มีการสร้างเอทธานอลจาก acetaldehyde และ NADH เอนไซม์ ADH I จะถูกสร้างขึ้นมากที่สุดเมื่อยีสต์ถูกนำไปเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะทำให้กระบวนการไกลโคไลซีสดำเนินต่อไปแต่กระบวนการย้อนกลับ ADH II จะเป็นตัวการทำให้เกิดการออกซิเดชันของเอทธานอลให้กลับไปเป็น acetaldehyde ในกรณีที่มีเอทธานอลหรือกลีเซอร์รอลเป็นแหล่งคาร์บอน (Denis et al, 1981) สำหรับเอนไซม์ alcohol dehydrogenase อีกชนิดหนึ่งคือ m ADH เป็นเอนไซม์ที่พบในไมโตคอนเดรีย สำหรับรายละเอียดและความสัมพันธ์ระหว่างสรีระวิทยากับพันธุกรรมของ m ADH ในยีสต์นั้นยังไม่เป็นที่ทราบกันแน่นอน (Bennetzen and Benjamin,1982) Will และ Jornvall (1979) ได้ศึกษาหาลำดับกรดอมิโนของเอนไซม์ ADHI และ ADHII พบว่ามีลำดับกรดอมิโนที่แตกต่างกัน สำหรับจีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ alcohol dehydrogenase มีอยู่ด้วยกัน 2 จีน คือจีน ADC 1 หรือ ADH I ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ADH I และจีน ADR 2 หรือ ADH II ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ADH II ในปี ค.ศ.1982 Bennetzen และ Benjamin ได้ศึกษาหาลำดับเบสที่อยู่บน ดี เอน เอ (DNA) ของจีน ADC I ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ADH I

จากยีสต์ S.cerevisiae พบว่าจีนนี้ไม่มีอินทรอน (intron) อยู่ในจีนเลยและเมื่อทำการพิจารณาลำดับกรดอะมิโนที่ Wills และ Jornvall (1979) ได้เสนอมาก่อนแล้วโดยการนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาได้ พบว่ามีลำดับเบสที่แตกต่างจากลำดับกรดอมิโนของเอนไซม์ ADH I ถึง 5 ตำแหน่ง จากทั้งหมด 347 ตำแหน่ง ซึ่ง Bennetzen และ Benjamin ได้เสนอว่าสาเหตุที่แตกต่างกันก็อาจเนื่องมาจากสายโปรตีนของเอนไซม์ ADH I อาจมาจากยีสต์คนละสายพันธุ์ หรืออาจเนื่องมาจากเทคนิคในการวิเคราะห์ลำดับก็ได้

การหมักแอลกอฮอล์ (เอทธานอล) จากสารประกอบพวกลิกโนเซลลูโลสนั้นอาจมีขั้นตอนต่างๆ คือ กระบวนการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสและกระบวนการหมักด้วยยีสต์หรือแบคทีเรีย

ในการหมักแอลกอฮอล์ ได้มีการพัฒนาวิธีการขึ้นมาเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์จากเซลลูโลสอย่างต่อเนื่อง เรียกวิธีการนี้ว่า Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) เป็นการหมักที่ได้รวบรวมเอากระบวนการไฮโดรไลซีสกับกระบวนการหมักของจุลินทรีย์เอาไว้ในภาชนะเดียวกัน โดยไม่ต้องแยกเอาน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการไฮโดรไลซีสออกมา ดังนั้นกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์จึงดำเนินต่อไปได้อย่างต่อเนื่อง(Wilke, 1983) ในปี ค.ศ. 1981 Ueda และคณะ ได้ทดลองเอาหัวมันสัมปะหลังดิบๆ เป็นวัสดุหมักในการผลิตแอลกอฮอล์ และเพื่อเป็นการลดขั้นตอนต่าง ๆ จึงได้รวมขั้นตอนไฮโดรไลซีสแป้งให้เป็นน้ำตาลและขั้นตอนการหมักแอลกอฮอล์ไว้ด้วยกัน โดยการเอาเอนไซม์ amyloglucosidase จากลูกแป้ง koji ของ Aspergillus niger มาคลุกรวมกับมันสำปะหลังและยีสต์โดยไม่ต้องใช้ความร้อนฆ่าเชื้อ แต่ปรับ pH เริ่มต้นให้เป็น 3.5 แล้วนำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงถึง 80-99.6 เปอร์เซนต์ Lee และคณะ(1983) ทดลองผลิตแอลกอฮอล์ด้วยวิธี SSF โดยใช้แป้งเปียกเป็นวัสดุหมักและใช้เอ็มไซม์ amyloglucosidase ไฮโดรไลซ์แป้งให้เป็นน้ำตาลแล้วหมักต่อเนื่องไปเลยด้วย Zymomonas mobolis Lee ได้ตรึงเซลล์และเอนไซม์เอาไว้บน ultrafiltration membrane เพื่อนำเอาเซลล์และเอนไซม์กลับมาใช้ได้อีก ซึ่งวิธีนี้สามารถผลิตเอทธานอลได้ 60 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง เมื่อคิดเป็นความเข้มข้นได้ 60-65 กรัม/ลิตร และช่วยลดปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ได้ด้วย Ooshima และคณะ (1985) ได้เสนอว่ากระบวนการหมักแบบ SSF เซลลูโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทธานอลได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงได้ทดลองศึกษาหาผลกระทบของเอทธานอลที่จะมีเอนไซม์เซลลูเลส และสามารถผลการทดลองได้ดังนี้คือ กระบวนการไฮโดรไลซีสเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงเมื่อมีการเติมเอทธานอลลงไปในวัสดุหมักอย่างน้อย 0.2 M. แต่สำหรับเอทธานอลที่ต่ำกว่า 0.4 M. จะไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ B-glucosidase และ endoglucanase ดังนั้นจึงได้เสนอว่า เอทธานอลจะเป็นตัวการไปยับยั้งไม่ให้เอนไซม์ exoglucanase และ

endoglucanase มาดูดซึมที่ผิวของเซลลูโลส และเอทธานอลจะมีผลกระทบต่อกระบวนการ SSF ในระยะหลัง มากกว่าในระยะเริ่มต้น Spangler และ Emert (1986) ได้ทดลองเอายีสต์ Candida brassicae และ Zymomonas mobilis มาเป็นตัวการในการหมักแอลกอฮอล์ด้วยกระบวนการ SSF เพื่อเปรียบเทียบผลิตผลที่เกิดขึ้น พบว่า Z.mobilis ผลิตเอทธานอลได้ต่ำกว่า C.brassicae เนื่องจากมีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่มาก ดังนั้นจึงเสนอว่าน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่นี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส Punnapayak และ Emert (1986) ได้ทดลองนำยีสต์ 2 สายพันธุ์คือ Pachysolen tannophilus และ C.brassicae เป็นตัวการหมักแบบ SSF โดย ใช้เศษเหลือใช้จากการเกษตรพวกฟางข้าว ซังข้าวโพด ที่ถูกพรีทรีตด้วยด่างเป็นวัสดุหมัก โดยเปรียบเทียบกับวัสดุหมักที่เป็นน้ำตาลกลูโคสกับไซโลส พบว่า P.tannophilus ผลิตเอทธานอลได้สูงกว่า C.brassicae Lee และคณะ (1987) เอาแป้งสาคู (sago starch) เป็นวัสดุหมักในกระบวนการ SSF ด้วยเอนไซม์ amyloglucosidase ไฮโดรไลซ์แป้งให้เป็นน้ำตาลและใช้แบคทีเรีย Z.mobilis เป็นตัวการทำให้เกิดแอลกอฮอล์ แล้วนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับการหมักแอลกอฮอล์แบบแยกไฮโดรไลซ์แป้งให้เป็นน้ำตาลแล้วแยกเอาน้ำตาลไปหมักต่ออีกครั้งหนึ่ง ผลปรากฏว่ากระบวนการหมักแบบ SSF ใช้เวลาน้อยกว่าครึ่งหนึ่ง Szczodrak (1988) ใช้ฟางข้าวที่พรีทรีตด้วยด่างเป็นวัสดุหมักในกระบวนการ SSF โดยใช้ยีสต์ Kluyveromyces fragilis สายพันธุ์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีและผลิตเอทธานอลได้สูง จากการทดสอบพบว่ายีสต์สายพันธุ์นี้ทนต่อเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงถึง 400 FPU และที่สภาวะเดียวกันก็สามารถทนเอทธานอลได้ดีที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส Wayman และคณะ (1987) ได้ทดลองขยายผลการทดลองแบบ SSF ขึ้นไปในระดับโรงงานเพื่อผลิตเอทธานอลโดยใช้เศษไม้สนและเศษไม้ต้น aspen ที่ถูกพรีทรีตด้วย $SO_2$ เป็นวัสดุหมัก แล้วใช้เชื้อผสม 2 ชนิดคือ Brettanomyces clausenii กับ Pichia stipitis จากผลการทดลองพบว่าใช้เวลาหมักน้อยลงและยังผลิตเอทธานอลได้ 369-396 ลิตร/ตัน สาเหตุเนื่องมาจาก B.clausenii สามารถเปลี่ยนเซลโลไบโอสไปเป็นเอทธานอลได้เลยโดยไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ B-glucosidase มาย่อยให้เป็นน้ำกลูโคสก่อน แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเพนโตสไปเป็นเอทธานอลได้ส่วน P stipitis สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเพนโตสไปเป็นเอทธานอลได้เลย และยังสามารถเปลี่ยนเซลโลไบโอสให้เป็นเอทธานอลได้แต่น้อยกว่า Szczodrak และ Trogonski (1988) ได้ทดลองคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพื่อให้ได้ยีสต์ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์เซลลูเลส คือ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณภูมิที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบ SSF พบว่า ยีสต์ Fabospora frogilis สามารถผลิตเอทธานอลได้ 40 กรัม/ ลิตร ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส

ยีสต์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องอย่างมากกับอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์โดยทั่วๆ ไปคือ ยีสต์ Saccharomyces cerevisiae (Kunkee and Anerine,1970;สมศรี ศิริพิทยางกูร, 2524) สำหรับมาตรฐานในการคัดแยกยีสต์จะพิจารณาในแง่ต่าง ๆ เช่น อัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วที่สุดของจุลินทรีย์ ความคงทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาล ความสามารถในการเปลี่ยนสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรทไปเป็นแอลกอฮอล์ได้สูง ความคงทนต่อการเปลี่ยนอุณหภูมิและเปลี่ยนสภาพความเป็นกรดด่าง และความดัน เป็นต้น (Underkofler et al,1954) สำหรับยีสต์นั้นโดยธรรมชาติจะพบยีสต์ได้จากพืชและผลไม้ต่าง ๆ เช่น ในน้ำตาลสด น้ำตาลเมา Ahmad และคณะ(1954) ได้คัดแยกยีสต์จากน้ำตาลโตนดสด ในแถบอินโด-ปากีสถาน พบยีสต์ Schizosaccharomyces pombe Saccharomyces chevalieri และ S.ludwigii Shehata (1960) ได้คัดแยกเชื้อยีสต์จากน้ำอ้อย จากโรงงานในรัฐ Sao Paulo ในประเทศบราซิล ได้เชื้อยีสต์ Saccharomyces sp. Pichia sp. Candida sp. Torulopsis sp. Okafor (1972) ได้คัดแยกเชื้อยีสต์จาก palm-wine ในประเทศไนจีเรีย ได้ยีสต์ Saccharomyces sp. 12 ชนิด Candida sp. 4 ชนิดและ Endomycopsis sp. 1 ชนิด Ehiraj และคณะ (1980) ได้คัดแยกเชื้อยีสต์จากดอกไม้ Mahua flower ซึ่งในประเทศอินเดียใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักแอลกอฮอล์ ได้ยีสต์ Kloeckela sp. Candida sp. Torulopsis sp. Pichia sp. และ Sacchraomyces sp. Kumnuanta และคณะ (1981) ได้คัดแยกเชื้อยีสต์จากกากน้ำตาล (molasses) ในประเทศไทยได้เชื้อยีสต์ Saccharomyces cerevisiae No.327.

สำหรับแบคทีเรียที่นำมาเป็นตัวการในการหมักแอลกอฮอล์ที่ดีที่สุดคือ Z.mobilis เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่ง Laudrin-Seiller และคณะ (1984) นำมาใช้ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นแอลกอฮอล์ พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคลไปแอลกอฮอล์ได้เร็วและมากกว่ากว่ายีสต์เมื่อมีน้ำตาลกลูโคลเท่ากัน แต่จะได้เปรียบยีสต์ตรงที่สามารถใช้น้ำตาลได้มากชนิดกว่า เช่นน้ำตาล C-2 C-3 C-5 และ C-6 และยังใช้พลังงานน้อยกว่ายีสต์ครึ่งหนึ่ง สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกอีกชนิดหนึ่งที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นแอลกอฮอล์ คือพวก Enterobacteriaceae สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคลไปเป็นแอลกอฮอล์ได้ ได้แก่ Clostridium thermocellum C.thermosaccharolyticum และแบคทีเรียพวก heterolactic acid ซึ่งแบคทีเรียที่กล่าวมาแล้วเหล่านี้จะมีกระบวนการเมตาโบลิซึมที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ และยังมีความแตกต่างจากยีสต์ด้วย (Detroy,1981)

**วัตถุประสงค์**

1. เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทธิลแอลกอฮอล์ จากแหล่งที่มีการปลูกปานศรนารายณ์ โดยการศึกษาและรวบรวมจุลินทรีย์เหล่านี้ไว้ เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรม

2. เพื่อให้ทราบถึงกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากวัสดุเหลือทิ้งของโรงงานผลิตเชือกปานศรนารายณ์ในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตแอลกอฮอล์ในระดับโรงงานอุตสาหกรรมต่อไป ซึ่งต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. สามารถใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เป็นแหล่งเชื้อพันธุ์ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

2. สามารถคัดเอาจุลินทรีย์ ที่มีคุณสมบัติดีที่สุดไปใช้เพื่อการแนะนำเข้าสู่ระบบอุตสาหกรรมต่อไป

3. สามารถนำเอาจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ไปประยุกต์ใช้กับวัตถุดิบที่เป็นลิกโนเซลลูโลสชนิดอื่นๆ ได้

**ขอบเขตของการศึกษา**

การวิจัยนี้จะทำการศึกษาคัดเลือกและจัดจำแนกถึงระดับสกุลของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ในการหมักให้เกิดเอทธานอล โดยการใช้วัสดุเหลือทิ้งของปานศรนารายณ์