

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เอทานอลเป็นสิ่งที่ต้องการสำหรับการนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนเป็นอย่างมาก เช่น การนำไปผสมในน้ำมันเบนซินเป็นแกสโซฮอล์หรือผสมในน้ำมันดีเซลเป็นดีโซฮอล์ [1] เอทานอลที่ได้ส่วนใหญ่มาจากอุตสาหกรรมการหมักที่ใช้กากน้ำตาลและอ้อยเป็นสารตั้งต้นหรือสับสเตรทและใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล กรณีที่ใช้มันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นต้องการเอนไซม์มากกว่าหนึ่งชนิดในการผลิตเอทานอล ผลได้จากการหมักเอทานอลขึ้นกับปัจจัยต่าง คือ ชนิดของสับสเตรท ความเข้มข้นของเอนไซม์และชนิดของเอนไซม์ หรือสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ ระยะเวลาที่ใช้หมัก พีเอช และอุณหภูมิ

วัสดุลิกโนเซลลูโลสได้รับความนิยมนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตเอทานอลด้านเชื้อเพลิงชีวภาพเพราะราคาถูก ส่วนใหญ่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมเกษตร สามารถนำมาใช้หมุนเวียนได้ใหม่ และเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่มากมาย การย่อยสลายวัสดุเซลลูโลสเพื่อผลิตน้ำตาลก่อนทำการหมักเอทานอลมีต้นทุนสูง เพราะองค์ประกอบทางเคมีซับซ้อน จึงต้องผ่านการปรับสภาพเพื่อกำจัดลิกนินซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่นำมาใช้ย่อยสลาย อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาและพัฒนาองค์ความรู้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพวัสดุเซลลูโลสต่างๆ ด้วยกรดหรือด่างหรือความร้อนจากไอน้ำ เช่น ชังข้าวโพด [2] ลำต้นข้าวโพด [3] เปลือกข้าวหรือแกลบ [4] ลำต้นฝ้าย [5] ฟางข้าวสาลี [6] ฟางเรพซีด (rapeseed straw) [7] เปลือกหุ้มเมล็ดทานตะวัน [8] และอิริคา [9] งานวิจัยดังกล่าวใช้สารเคมีที่เป็นกรดหรือด่าง เกิดน้ำเสียจากกระบวนการปรับสภาพที่ต้องนำไปบำบัดต่อหรือการนำมาปรับค่าพีเอชและใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมย่อยสลายให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการซึ่งเป็นต้นทุนที่เพิ่มขึ้น การใช้เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสแทนการใช้สารเคมีโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมในถังหมักชีวภาพจนผสมแบบกึ่งกะเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์จะลดผลกระทบของมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม [10]

การใช้เชื้อราย่อยสลายตามด้วยขั้นตอนการหมักเอทานอลจากเส้นใยข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยด่างและไอน้ำ พบว่า ไตรโคเดอร์มา รีซีอี (*Trichoderma reesei*) ให้เอนไซม์จากการย่อยสลายหลังจากการหมัก 4 วัน จากนั้นใช้ยีสต์หมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยา (Simultaneous Saccharification Fermentation, SSF) ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่าเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* และ *Gloeophyllum trabeum* แต่น้อยกว่าเซลลูเลสเอนไซม์ทางการค้าชื่อ Spezyme-CP เชื้อราไตรโคเดอร์มา รีซีอีย่อยสลายเซลลูโลสได้น้ำตาลเฮกโซสได้ดี และย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้น้ำตาลเพนโตส จากนั้นยีสต์ได้เปลี่ยนน้ำตาลทั้งสองเป็นเอทานอล การปรับสภาพด้วยด่าง

และไอน้ำไม่ได้ทำให้ผลได้ของเอทานอลเพิ่มขึ้น แต่เป็นการกำจัดแบ่งออกไป การหมักแข็งเอทานอลให้ผลดีกว่าการหมักเหลว [11]

งานวิจัยที่ผ่านมาได้รวบรวมกระบวนการการปรับสภาพ การย่อยสลาย และการหมักเอทานอลของการผลิตเอทานอลชีวภาพจากฟางข้าวสาลีชั้นสูง พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการขึ้นกับวิธีการการปรับสภาพที่นำมาใช้กับฟางข้าวสาลี ได้ศึกษาการหมักเอทานอลจากแบคทีเรีย ยีสต์และราหลายสายพันธุ์ ยีสต์ธรรมชาติให้ผลดีที่สุด สายพันธุ์ที่ตัดแต่งพันธุกรรมเหมาะสำหรับการขยายขนาดเพื่อเอาน้ำหมักทางการค้า [12]

บทวิจารณ์งานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับเอมิเซลลูโลสสำหรับการผลิตเอทานอล กุญแจสำคัญอย่างน้อยคือ 3 ขั้นตอนคือ การปรับสภาพวัตถุดิบ การย่อยสลาย และการหมักที่เป็นปัจจัยทำให้เพิ่มผลได้ของเอทานอลชีวภาพ กำลังการผลิต ลดต้นทุนและค่าดำเนินงาน การเปลี่ยนเซลลูโลส เอมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลได้มากที่สุดทำให้เอทานอลที่ได้เพิ่มขึ้น ปัจจุบันจึงให้ความสนใจเอมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในวัสดุลิกโนเซลลูลิก บทวิจารณ์นี้ได้กล่าวถึงโครงสร้างทางเคมีของเอมิเซลลูโลส เปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสียของการปรับสภาพวัสดุเซลลูลิกที่ใช้กระบวนการต่างกัน การย่อยสลายเอมิเซลลูโลสด้วยจุลินทรีย์ตัดแต่งพันธุกรรม เช่น ไตรโคเดอร์มา รีสีอี เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตไซแลเนส (xylanases) ได้ การปรับสภาพวัตถุดิบจะได้ของเหลวถูกแยกออกจากตะกอนฟาง ของเหลวนี้นี้เรียกว่า hydrolysate ซึ่งมีเอมิเซลลูโลสอยู่ด้วย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลจึงได้มีการนำของเหลวนี้นี้หมักด้วยจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ เช่น *E.coli*, *Z. mobilis*, *S. cerevisiae* และ *P. stipitis* ที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลเพิ่มขึ้น หรือใช้เชื้อรา *Fusarium*, *Trichoderma* และ *Aspergillus* ย่อยสลาย hydrolysate เป็น monosaccharide และ disaccharide ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการนำ *T. reesei* ผลิต D-xylose permease การผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ผ่านการตัดแต่งยีนส์ร่วมกับ *T. reesei* เพื่อใช้ย่อยสลายเอมิเซลลูโลส และการใช้กระบวนการที่บูรณาการขึ้นมาใหม่ที่ใช้บทบาทของจุลินทรีย์สำหรับการย่อยสลายวัตถุดิบเป็นน้ำตาลและเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเดี่ยวเรียกว่า Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation (SSCF) [13]

งานวิจัยที่ใช้เลียนแบบการย่อยสลายของสัตว์เคี้ยวเอื้องเพื่อทดแทนการปรับสภาพเซลลูโลสโดยใช้สารเคมี แต่ใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ คือ consolidated bioprocessing (CBP) ของชานอ้อยและปุยมูลไก่ด้วยจุลินทรีย์ผสมที่คัดสายพันธุ์จากทะเลลึก [14]

จากงานวิจัยและพัฒนาที่ผ่านมาเกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูลิกได้นำเสนอแนวทางใหม่มาใช้ในการผลิตเอทานอลซึ่งคือการหมักแบบรวมปฏิกิริยาสองขั้นตอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเดี่ยวหรือเรียกว่า Two-step Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation (two-step SSCF) ประกอบด้วย 2 กระบวนการคือหนึ่งกระบวนการปรับสภาพ คือเริ่มจากกระบวนการปรับสภาพอาจจะใช้สารเคมีและหรือไอน้ำ จุลินทรีย์ที่เหมาะสมและอาจจะเป็น

เอนไซม์ทางการค้าตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ทำการย่อยสลายให้ได้เซลลูโลสเพิ่มขึ้นและอาจจะเหลือลิกนินผสมอยู่ด้วยกันบ้าง แยกของเหลวที่เกิดจากการปรับสภาพที่เรียกว่า hydrolysate ซึ่งคือเฮมิเซลลูโลสและทำการปรับพีเอช จากนั้นจึงรวมเซลลูโลส ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสที่ได้ผ่านการปรับสภาพแล้วเข้าสู่กระบวนการที่สอง คือกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซแลนเนส และเพคติเนสเปลี่ยนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพคตินไปเป็นน้ำตาลซึ่งเกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์เดี่ยวพร้อมๆ กันกับการเปลี่ยนน้ำตาลด้วยเอนไซม์เฉพาะไปเป็นเอทานอล เมื่อครบระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมจะได้เอทานอลในน้ำหมัก ทำการแยกเอทานอลที่ได้และลิกนิน ออกจากกันโดยใช้การกลั่น [15]

กระบวนการการหมักแบบรวมปฏิกิริยาหนึ่งขั้นตอนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเดี่ยวหรือเรียกว่า Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation (SSCF) ประกอบด้วย 3 กระบวนการคือ กระบวนการที่หนึ่งเป็นการปรับสภาพวัตถุดิบซึ่งมีวิธีการเหมือนกระบวนการที่หนึ่งของ two-step SSCF กระบวนการที่สองเป็นการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส กระบวนการที่สามเป็นการใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ย่อยสลายเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสแบบรวมปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลในถังปฏิกรณ์ ทำการแยกเอทานอลที่ได้และลิกนินออกจากกันโดยใช้การกลั่น

กระบวนการหมักแบบแยกปฏิกิริยาหรือเรียกว่า Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) ประกอบด้วย 4 กระบวนการ คือ กระบวนการที่หนึ่งเป็นการปรับสภาพวัตถุดิบ จากนั้นทำการแยกเซลลูโลสซึ่งมีลิกนินอยู่ด้วยออกจากเฮมิเซลลูโลส กระบวนการที่สองเป็นการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส กระบวนการที่สามการนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาใช้อย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล จากนั้นทำการแยกลิกนินออกจากน้ำตาล ในกระบวนการที่สามนี้ใช้เฉพาะเซลลูโลส ส่วนเฮมิเซลลูโลสที่ถูกแยกออกไปในขั้นตอนการปรับสภาพไม่ได้นำมาใช้และกลายเป็นน้ำเสียของกระบวนการซึ่งต้องนำไปบำบัด กระบวนการที่สี่เป็นการหมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการที่สองด้วยยีสต์ เอทานอลที่ได้ในน้ำหมักนำไปกลั่นเพื่อเพิ่มความเข้มข้น

จากความแตกต่างของการผลิตเอทานอลทั้ง 3 แบบ พบว่า กระบวนการ two-step SSCF ทำให้ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นและลดต้นทุนการผลิตเอทานอล กระบวนการดังกล่าวใช้เอนไซม์ผสม เช่น ไซแลนเนส เพคติเนส และเซลลูเลส ที่เกิดจากการผลิตของ จุลินทรีย์ต่างๆ ร่วมกันกับการหมักที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสหรือไซโลส และเซลลูโลสที่ผ่านการปรับสภาพให้เป็นน้ำตาลเพนโตสและเฮกโซสและเปลี่ยนน้ำตาลดังกล่าวเป็นเอทานอลในน้ำหมักจากนั้นจึงแยกเอทานอลและลิกนินออกจากกันโดยใช้กระบวนการกลั่น [15]

กระบวนการ SSCF สองขั้นตอนได้นำไปใช้กับการผลิตเอทานอลจาก switchgrass ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยแอมโมเนีย (AFEX) เปรียบเทียบกับ SSCF ขั้นตอนเดียวโดยใช้เอนไซม์ทางการค้า 4

ชนิด พบว่า กระบวนการ SSCF สองขั้นตอนเป็นการปรับปรุงประสิทธิภาพของการใช้ไซโลสและผลได้ของเอทานอลระหว่างการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และการหมัก [16]

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพ และมูลค่าของวัสดุเซลลูโลสในการผลิตเอทานอลจากกากผลไม้เหลือทิ้งอุตสาหกรรมด้วยเอนไซม์ผสมที่ผลิตได้ตามธรรมชาติจากกระบวนการหมักแข็งระหว่างเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีสอี RT-P1 และเชื้อยีสต์แซคคาโรมายซิส ซีรีวีลีส RT-P2 บนกากผลไม้เหลือทิ้ง [17] ซึ่งเอนไซม์ผสมดังกล่าวที่ได้จากการวิจัยและพัฒนาการผลิตเซลล์ของเชื้อราเดี่ยวไตรโคเดอร์มา รีสอี RT-P1 จากการหมักแข็ง [18] และ [19] งานวิจัยนี้จะใช้กระบวนการหมักแนวทางใหม่คือกระบวนการหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาสองขั้นตอน (two-step SSCF) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นวัตถุดิบ ความเข้มข้นเอนไซม์ผสม และระยะเวลาของกระบวนการหมักที่ให้ผลได้ของเอทานอลมากที่สุด

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 หาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์ผสมเซลล์ูเลส-แมนแนนเนส-ไซแลนเนสจากของเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรด้วยเชื้อผสมระหว่างเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีสอี RT-P1 และเชื้อยีสต์แซคคาโรมายซิส ซีรีวีลีส RT-P2
- 1.2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากของเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรด้วยผงเอนไซม์ผสม

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1.3.1 การผลิตเอนไซม์ผสม (TY) ที่ได้จากการหมักแข็งบนสับสเตรทที่เป็นกากผลไม้ของเชื้อผสมระหว่างเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีสอี RT-P1 และเชื้อยีสต์แซคคาโรมายซิส ซีรีวีลีส RT-P2 [17]
- 1.3.2 หาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายกากผลไม้เหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรโดยใช้เอนไซม์ผสม (TY) ด้วยวิธีการทดลองออร์โธโกนอลที่มีปัจจัยควบคุม 3 ตัวแปร คือความเข้มข้นของเอนไซม์ ระยะเวลาที่ใช้ย่อยสลาย และความเข้มข้นของวัตถุดิบ กำหนดให้ปริมาตรอาหารเหลว พีเอช และอุณหภูมิที่ใช้บ่มคงที่ ทำการหมักในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL ปิดจุกขวดด้วยสำลี วางบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ [20] กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส แอคติวิตี [21] ไซแลนเนสและแมนแนนเนส [22] ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ [23] และเอทานอลที่ได้ [24]
- 1.3.3 การหมักเหลวเอทานอลแบบสองขั้นตอนจากกากผลไม้เหลือทิ้งอุตสาหกรรมที่สภาวะเหมาะสมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเดี่ยว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ได้องค์ความรู้การนำเอนไซม์ผสมที่ผลิตได้ไปใช้เพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อผลิตเอทานอลชีวภาพเป็นพลังงานทดแทน
- 1.4.2 ทำการเผยแพร่ในวารสารวิจัยที่มีชื่อเสียงในระดับสากลอย่างน้อย 1 เรื่อง
- 1.4.3 ภาคเอกชนหรือชุมชนซึ่งทำการผลิตเอทานอลชีวภาพต้องการใช้เอนไซม์ย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่ผลิตได้ในประเทศทดแทนการนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศ