

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัญหาสำคัญของประเทศไทยและโลกปัจจุบันอันหนึ่งคือปัญหาด้านพลังงาน พลังงานส่วนใหญ่ในโลกปัจจุบันเป็นพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิล อันได้แก่ น้ำมันปิโตรเลียม และก๊าซธรรมชาติ เป็นต้น ซึ่งพลังงานดังกล่าวนอกจากก่อมลพิษกับสิ่งแวดล้อมแล้ว ยังนับวันจะหมดไปจากโลก ซึ่งทำให้มีราคาแพงขึ้นเรื่อยๆ ปัจจุบันจึงมีความพยายามที่จะหาพลังงานทดแทนที่มีราคาถูกกว่า สามารถผลิตขึ้นทดแทนได้ และไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษ ดังเห็นได้จากประเทศไทยมีนโยบายการวิจัย ในการสนับสนุนให้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาพลังงานทดแทน และให้ระดับความสำคัญไว้ในอันดับต้นๆ เพราะประเทศไทยใช้งบประมาณจำนวนมากในการซื้อเชื้อเพลิงจากต่างประเทศ

พลังงานเป็นปริมาณพื้นฐานอย่างหนึ่งของกระบวนการในระบบทางกายภาพชนิด พลังงานในระบบเหล่านี้ ที่สภาวะหนึ่งๆจะทำให้ได้งาน ที่ต้องใช้ในการเปลี่ยนจากสภาวะแรกเริ่ม ไปยังสภาวะต่าง ๆ และปัจจุบันพลังงานหลักที่มนุษย์นำมาใช้ ได้มาจากฟอสซิล (น้ำมันปิโตรเลียม แก๊สธรรมชาติ และถ่านหิน) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลก ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต อีกทั้งยังมีราคาแพงและกำลังจะหมดสิ้นไป ดังนั้นการพัฒนาพลังงานทดแทนที่เราสามารถผลิตได้เองมาใช้ทดแทนพลังงานที่กำลังจะหมดไป จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการบรรเทาปัญหาและแก้ปัญหาต่างๆ ที่เป็นผลมาจากการใช้พลังงานฟอสซิล รวมทั้งช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อภาวะโลกร้อน และยกระดับคุณภาพชีวิตของประชาชน พลังงานสะอาดเป็นทางเลือกหนึ่งของการใช้พลังงานที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งส่วนใหญ่พลังงานสะอาดได้มาจากพลังงานหมุนเวียน (renewable energy) เช่น พลังงานชีวมวล พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังงานน้ำ และพลังงานความร้อนใต้พิภพ เป็นต้น หนึ่งในยุทธศาสตร์การพัฒนาพลังงานทดแทน คือการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuels) ซึ่งหลายหน่วยงานให้ความสำคัญ ทั้งยังมีความพยายามในการพัฒนาการผลิตและการใช้ประโยชน์พลังงานทดแทนในเชิงพาณิชย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ไบโอดีเซล (biodiesel) และไบโอเอทานอล (bio-ethanol) ผสมในน้ำมันสำเร็จรูป ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยมีศักยภาพในด้านวัตถุดิบที่ได้จากผลผลิตทางการเกษตรสำหรับใช้ในการผลิตไบโอดีเซลและไบโอเอทานอล สามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนพลังงานจากฟอสซิลได้เป็นอย่างดี เช่น เอทานอล ที่ผลิตได้จากมันสำปะหลัง อ้อย และกากน้ำตาล ไบโอดีเซลจากปาล์ม น้ำมัน และสบู่ดำ เป็นต้น

พลังงานทดแทน (alternative energy) หมายถึง พลังงานที่นำมาใช้แทนน้ำมันเชื้อเพลิงและก๊าซธรรมชาติสามารถแบ่งตาม แหล่งที่ได้มาออกเป็น 2 ประเภท คือ พลังงานทดแทนจากแหล่งที่ใช้แล้วหมดไป เรียกว่า พลังงานสิ้นเปลือง (nonrenewable energy) ได้แก่ ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ นิวเคลียร์หินน้ำมัน และทรายน้ำมัน เป็นต้น และพลังงานทดแทนอีกประเภทหนึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้แล้ว สามารถหมุนเวียนมาใช้ได้อีกเรียกว่า พลังงานหมุนเวียน (renewable energy) ได้แก่ แสงอาทิตย์ลม ชีวมวล น้ำและไฮโดรเจน เป็นต้น พลังงานทดแทน ประเภทที่ 2 เป็นพลังงานที่สะอาด ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นแหล่งพลังงานที่มีอยู่ในท้องถิ่น การพัฒนาพลังงานทดแทนเป็นการศึกษา ค้นคว้า ทดสอบ พัฒนา และสาธิต ตลอดจนส่งเสริมและเผยแพร่ เพื่อให้มีการผลิตและการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายมีประสิทธิภาพ และมีความเหมาะสมทั้งทางด้านเทคนิคเศรษฐกิจ และสังคม

ความสำคัญของพลังงานทดแทน พลังงานหลักที่มนุษย์ใช้เป็นสิ่งอำนวยความสะดวกในชีวิตประจำวันคือ พลังงานปิโตรเลียม โดยเฉพาะพลังงานจากน้ำมันเชื้อเพลิง ซึ่งในปัจจุบันมีความต้องการใช้น้ำมันเป็นจำนวนมาก แต่ปริมาณน้ำมันมีจำนวนจำกัดทำให้ราคาน้ำมันดิบสูงขึ้นมาก และคาดการณ์ว่าอาจจะทะลุเลยบาร์เรลละ 100 เหรียญสหรัฐอเมริกาได้ นอกจากนี้ปริมาณการใช้อาจจะไม่เกิน 40 ปี ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการกระตุ้นการคิดค้น พัฒนารูปแบบของพลังงานเชื้อเพลิงต่างๆ ขึ้นมาทดแทน โดยเฉพาะเชื้อเพลิงทดแทนซึ่งในปัจจุบันเริ่มมีการนำทดแทนใช้เป็นเชื้อเพลิงจากก๊าซชีวภาพ (Bioglass Fuel) น้ำมันแก๊ซโซฮอลล์ น้ำมันไบโอดีเซล

พลังงานทดแทนที่เหมาะสมควรมีคุณสมบัติ ดังต่อไปนี้

1. สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง ใช้เชื้อเพลิงและวัตถุดิบที่สามารถหมุนเวียนมาใช้ได้อย่างไม่มีวันหยุด
2. สะอาด เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ไม่กระทบต่อสมดุลของระบบนิเวศ
3. สามารถถ่ายทอดความรู้และเทคโนโลยี เพื่อให้ชาวบ้านผลิตมาใช้เองได้ เชื่อมโยงถึงเศรษฐกิจพอเพียง
4. มีประสิทธิภาพ ประหยัดทั้งทรัพยากร แรงงานค่าใช้จ่าย
5. ง่าย เป็นเทคโนโลยีที่ไม่ซับซ้อน ชุมชนสามารถจัดการเองได้

จากตัวเลขสถิติจากกรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงอุตสาหกรรม ประเทศไทยมีความต้องการใช้น้ำมันดีเซลในปี พ.ศ. 2547 ถึง 28,201 ล้านลิตร ดังนั้นเราสามารถส่งเสริมและสนับสนุนให้มีการใช้น้ำมันพืชในการผลิตไบโอดีเซลแล้ว จะมีผลต่อการรักษาเงินตราของประเทศ สร้างความมั่นคงและสามารถพึ่งพาตนเองด้านพลังงานของประเทศ อีกทั้งช่วยสร้างตลาดที่มั่นคงให้กับผลผลิตทางการเกษตรอีกด้วย นอกจากนี้การนำเอาพลังงานทดแทนโดยเฉพาะพลังงานทดแทนประเภทหมุนเวียน เป็นพลังงานจากแสงอาทิตย์ , น้ำ , ลม จะช่วยป้องกันการเกิดก๊าซเรือนกระจก ซึ่งจะเป็นแนวทางในการรณรงค์ช่วยกันรักษาภาวะโลกร้อนได้อีกทางหนึ่งด้วย โดยการใช้พลังงานทดแทนจะมีประโยชน์ในแง่ต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ทางด้านเศรษฐกิจ ทำให้ภาวะของเศรษฐกิจของประเทศดีขึ้น เพราะสามารถใช้ผลิตผลทางธรรมชาติและทางการเกษตรที่ประเทศเราสามารถผลิตได้เองทดแทนการนำเข้าของประเทศนำเข้าเชื้อเพลิงจากต่างประเทศได้อีกด้วย

2. ผลิตผลทางการเกษตร มีมูลค่าสูงขึ้นและสามารถใช้ประโยชน์มากขึ้นในแง่ต่างๆ กัน เช่น ผลิตถั่วที่เหลือจากการสีข้าวคือ แกลบ สามารถนำมาทำเป็นเชื้อเพลิงประเภทชีวมวลได้ , มันสำปะหลังซึ่งมีราคาตกต่ำสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล เพื่อเป็นส่วนผสมในการทำน้ำมันแก๊ซโซฮอลล์ เป็นต้น

3. ด้านการรักษาสิ่งแวดล้อม การลดมลพิษต่างๆ ที่เกิดจากการใช้เชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม เช่น มลพิษทางอากาศ สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์โลกร้อนขึ้นได้

4. ด้านการสาธารณสุขเป็นภาค เป็นการส่งเสริมให้ชุมชนหรือเอกชนสามารถใช้พลังงานทดแทน อำนวยความสะดวกด้านสาธารณสุขได้ เช่นการที่เอกชนหรือชุมชนทำการผลิตไฟฟ้าจากพลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานไฟฟ้าจากน้ำตก เป็นต้น



รูปที่ 1.1 พลังงานทดแทน

(ที่มา: <http://www.yellowgreenthailand.com/article/topic.php?id=ART1001903>)

พลังงานทางเลือกต่างๆ ที่มีการศึกษาเช่น พลังงานเชื้อเพลิงแอลกอฮอล์ หรือ พลังงานจากไบโอดีเซล ซึ่งกำลังมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและผลิตเอโนไซม์มีราคาสูง ประกอบกับปัจจุบันจึงได้มีผลผลิตทางการเกษตรมากมาย เช่น น้ำอ้อย แป้งและแป้งมันสำปะหลัง และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร การเกษตร เช่น ฟางข้าว เป็นต้น ดังนั้นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาย่อยสลายโดยใช้ เซลลูโลสไลติกเอโนไซม์ เพื่อให้ได้น้ำตาล ซึ่งเป็นแหล่งอาหารสำหรับยีสต์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล จะเป็นการทำให้ผลผลิตทางการเกษตรที่มีราคาต่ำของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้ผลผลิตดังกล่าวอีกด้วย

พลังงานเชื้อเพลิง เช่น เอทานอล กำลังจะกลายเป็นพลังงานทางเลือกแทนน้ำมันจากฟอสซิล เนื่องจากมีราคาแพงและเริ่มจะหมดไป ดังนั้นการศึกษาหาแหล่งพลังงานใหม่ๆ และพลังงานทางเลือกจึงเป็นที่นิยม การผลิตพลังงานชีวภาพจากผลผลิตและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกำลังเป็นที่นิยมและได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ตลอดจนมีแหล่งทุนจากหลายๆ แห่งให้การสนับสนุนการวิจัยสำหรับงานวิจัยทางด้านพลังงานทดแทน เอทานอลเป็นพลังงานทางเลือกอีกแหล่งหนึ่งที่กำลังได้รับความนิยมและเป็นแหล่งงานที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นพลังงานที่สะอาดและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันเอทานอลผลิตมาจากกระบวนการหมักโดยใช้น้ำอ้อยหรือแป้งเป็นวัตถุดิบ แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากน้ำอ้อยและแป้งเป็นอาหาร และใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบจำนวนมากในโรงงานอุตสาหกรรม หากนำมาใช้ในการผลิตพลังงานทดแทนอาจจะทำให้เกิดภาวะขาดแคลนอาหารหรือทำให้อาหารมีราคาสูงขึ้น ดังนั้นการผลิตพลังงานควรผลิตจากวัตถุดิบที่ไม่ใช่อาหารและราคาถูก

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อเพิ่มศักยภาพการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยเซลล์โลไลติกเอนไซม์จากยีสต์และราเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถได้ยีสต์และราที่สามารถผลิตเซลล์โลไลติกเอนไซม์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

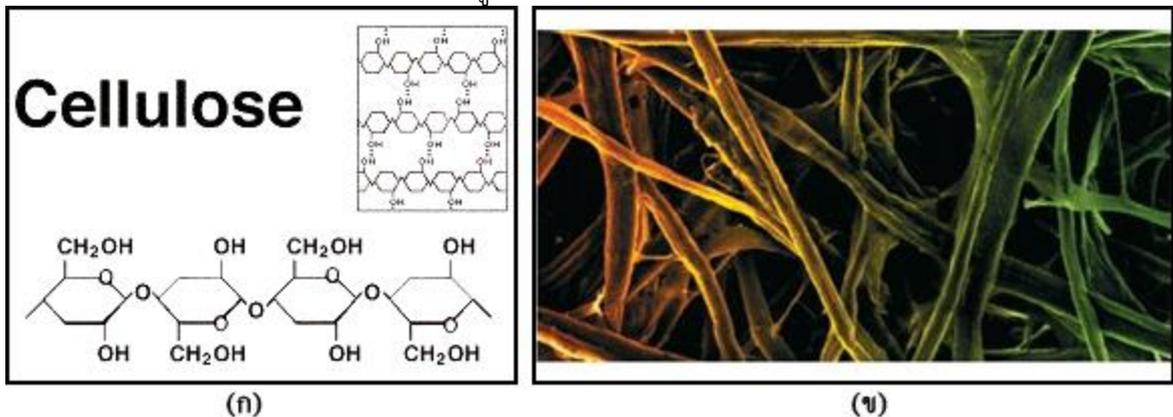
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลล์โลไลติกจากราและยีสต์ เมื่อใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหาร และศึกษาความสามารถในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจากแหล่งต่างๆ ร่วมกับการผลิตเอทานอล

บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส

ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ D - anhydroglucopyranose ต่อกันด้วยพันธะ β - 1,4 glycosidic โดยต่อเรียงกันเป็นสายตรงต่อเรื่อยๆ เกิดเป็นโพลีเมอร์สายยาวที่ไม่มีกิ่งก้านสาขา (unbranched polymer) จำนวนของหน่วยย่อยที่มาต่อกันจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช ตั้งแต่ 200 ถึง 15,000 หน่วย ถ้าพิจารณาภาพเป็นรูปสามมิติของสาย β - 1,4 linked glucopyranose พบว่ากลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl group) กลุ่มไฮดรอกซีเมทิล (CH_2OH group) และพันธะ glycosidic จะอยู่ในแนวระนาบเดียวกัน พบว่าหน่วยย่อย D - anhydroglucopyranose นี้ส่วนใหญ่มีรูปร่าง (conformation) เป็นแบบ chair form พบประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ของหน่วยย่อยนี้ที่อยู่ในรูป boat หรือ skew form และเนื่องจากสายของ glucan ที่ได้นี้มีผิวหน้าเป็นไฮโดรเจนอะตอมส่วนใหญ่ฉะนั้นโมเลกุลของสาย glucan นี้จึงมีสมบัติเป็น hydrophobic คือไม่ชอบน้ำ ด้วยการต่อกันด้วยพันธะ beta - 1,4 นี้จึงเกิดแรงที่ทำให้สาย glucan หมุนบิดตัว (rotate) ได้ 180 องศา รอบแกนจึงทำให้แต่ละสายมีรูปร่างลักษณะที่เปรียบเสมือนแผ่นริบบิ้น (flat ribbon) สาย glucan แต่ละสายจะมาเรียงต่อกันเป็นไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งเมื่อมาเรียงต่อกันเป็นไมโครไฟบริลแล้วพบพันธะไฮโดรเจนเกิดระหว่างกลุ่ม ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนในวงแหวนของโมเลกุลหน่วยย่อยในสายถัดไป นอกจากนี้ยังพบพันธะไฮโดรเจนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของหน่วยย่อยในสายหนึ่งกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของหน่วยย่อยในอีกสายหนึ่งด้วยสายของ β - 1,4 linked glucan ที่ขนานกันนั้นยึดกันอยู่ด้วยพันธะไฮโดรเจนจำนวนมาก ซึ่งมีส่วนช่วยให้โครงสร้างของเซลลูโลสซับซ้อนมันคงและยากต่อการย่อยสลายมากยิ่งขึ้น (รูป 2.1)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส ก) โครงสร้างโมเลกุล ข) ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ที่มา: www.scienceclarified.com/Ca-Ch/Cellulose.html

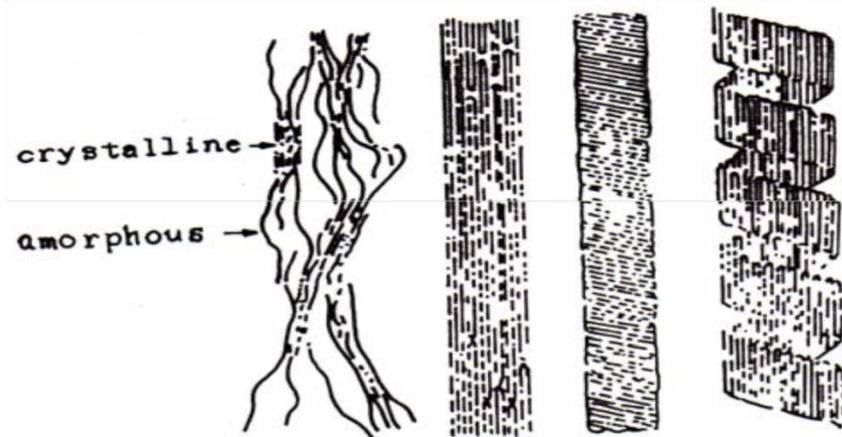
www.risoe.dk/bem/Bioethanol.htm

ปริมาณเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็งจะมีมากกว่าในไม้เนื้ออ่อน อย่างไรก็ตามปริมาณเซลลูโลสในต้นพืชยังมีความแตกต่างตามอายุของต้นพืช การเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของผนังเซลล์พืช และชนิดของพืช พบเซลลูโลสมากที่สุดที่ secondary cell wall คือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเซลลูโลสทั้งหมดที่ primary cell wall ประมาณ 10 - 20 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเซลลูโลสทั้งหมด ในส่วนของ secondary

cell wall เซลลูโลสและ สารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นที่เป็นองค์ประกอบรวมของผนังเซลล์พืช ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเพคติน แต่ละชนิดจะรวมตัวกันเป็นไมโครไฟบริล แต่ละสายของไมโครไฟบริลจะเรียงขนานกันและยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยไมโครไฟบริลเหล่านั้นอาจจะม้วนหรือพับไปตามแกนของเส้นใย ไมโครไฟบริลของเซลลูโลส หรือม้วนทับกันเป็นเกลียวรอบแกนของเส้นใยเซลลูโลส ทำให้รูปร่างของเซลลูโลสในผนังเซลล์มีรูปร่างต่างกัน 3 แบบ (Nisizawa, 1973) จากการศึกษาโดยใช้วิธีการ X – ray diffraction พบว่า ไมโครไฟบริลบางส่วนมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบเรียกส่วนนี้ว่า crystalline ซึ่งมีปริมาณ 50- 90 เปอร์เซ็นต์ ของทั้งหมด ส่วนที่เหลือเป็นไมโครไฟบริลที่มีการจัดเรียงตัวที่ไม่เป็นระเบียบ เรียกส่วนนี้ว่า amorphous (Fan และ Lee, 1983) การจัดเรียงตัวของไมโครไฟบริลในลักษณะที่แตกต่างกันนี้จะมีผลต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทำให้อัตราในการย่อยสลายเซลลูโลสบริเวณต่างๆ มีความแตกต่างกัน กล่าวคือส่วนที่เป็น amorphous จะถูกย่อยสลายโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ง่ายกว่าส่วนที่เป็น crystalline

โครงสร้างของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชชั้นสูง มี 3 แบบ คือ (รูปที่ 2.2)

1. Fringe micelle ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) และส่วนที่เป็นอสัณฐาน (amorphous)
2. โครงสร้างของเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส
3. โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นแบบริบบิ้นและม้วนเป็นเกลียว

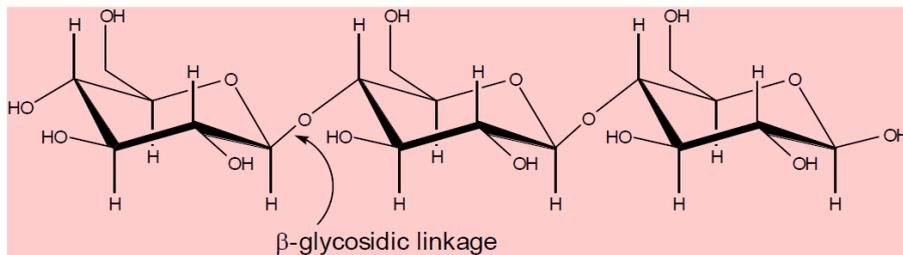


รูปที่ 2.2 เส้นใยเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชชั้นสูง (Goksoyr and Eriksen, 1980)

- ก. แบบ Fringe micelle
- ข. แบบที่ม้วนหรือพับไปตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส
- ค. แบบริบบิ้นและม้วนเป็นเกลียว

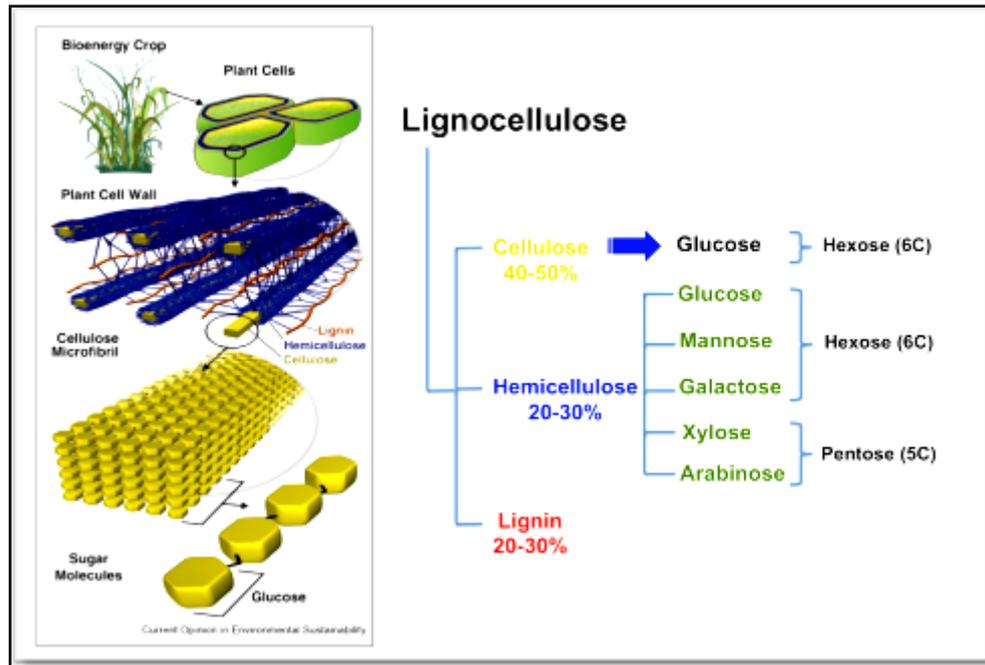
โครงสร้างที่แตกต่างกัน 3 แบบ ก่อให้เกิดช่องว่างระหว่างโมเลกุล ทำให้โมเลกุลไม่ต่อเนื่อง ในธรรมชาติจึงไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่มีรวมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลสเพนโตแซน กัม แทนนิน และ ไชมัน เป็นต้นในด้านโครงสร้างทางเคมี เซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส (glucose) จำนวน 1,000-10,000 โมเลกุล ต่อกันเป็นโพลิเมอร์ (polymer) เชื่อมกันด้วย β -1, 4-glycosidic bond ระหว่าง alcoholic hydroxyl groups โดยโมเลกุลสายยาวของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส 2,000-15,000 โมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000-2,400,000 ดาลตัน (Dalton) การเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีแขนงย่อยมีสูตรเคมีทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เมื่อ n คือ จำนวนหน่วยกลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง (Fan *et al.*, 1987)

เซลลูโลส เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณ 45% ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่สะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ในพืชชั้นสูงทุกชนิด ซึ่งมีวนประกอบของเซลลูโลสมากกว่า 97-99% จัดว่าเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ประกอบด้วย polymer chain เรียงขนานกัน และยึดกันด้วย dispersion force และ hydrogen bond ภายในโมเลกุลเซลลูโลสจึงยึดติดกันแน่น ทำให้เซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ได้ช้า เซลลูโลสใน primary cell wall ประกอบด้วยกลูโคสยาวประมาณ 2,000 โมเลกุลและไม่ต่ำกว่า 14,000 โมเลกุลใน secondary cell wall โดยโมเลกุลของเซลลูโลสจะเกาะกันเป็นคอตามยาวและเรียงขนานกันเป็นกลุ่ม 40 คูเรียกว่า ไมโครไฟบริล(microfibril) เพื่อให้ความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ของพืช (Fan et al., 1987)



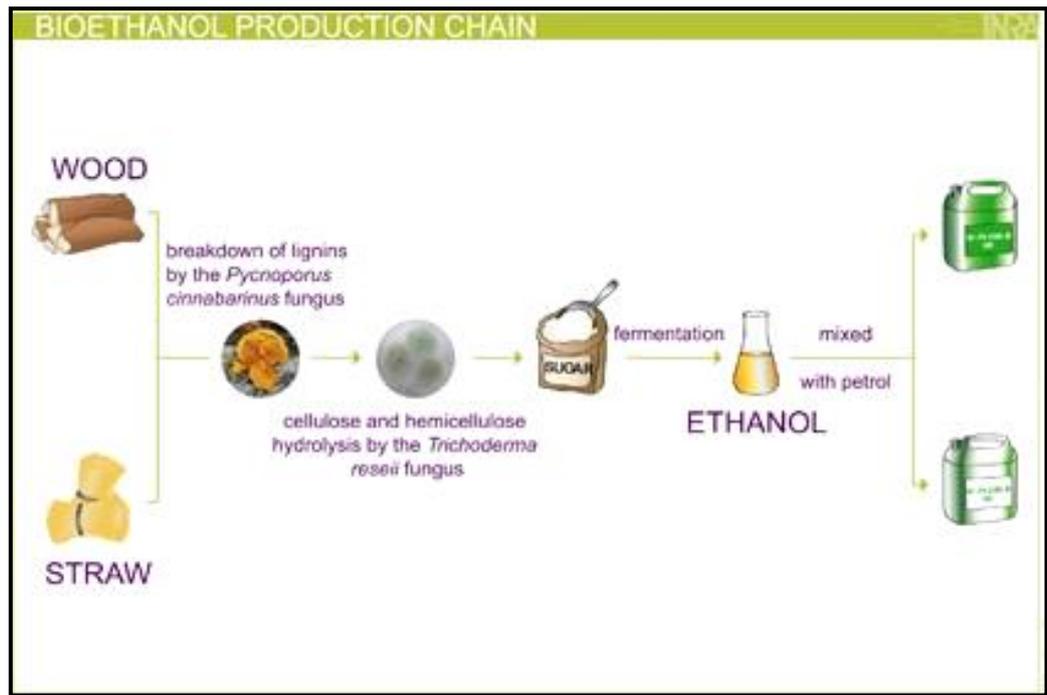
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นเส้นใยที่ละลายน้ำยาก พบใน cell wall ของพืช เซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของ β -D-glucose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β 1,4-glycosidic linkage ซึ่งต่างจากโพลิเมอร์ของ amylose และ amylopectin พันธะ β -1,4 ทำให้ โพลิเมอร์ของเซลลูโลสมีลักษณะยึดออกเป็นเส้นตรง ในขณะที่พันธะ α -1,4 จะทำให้เกิดการขดเป็นวง (helix) นอกจากนี้การเกิด inter-และ intra-chain hydrogen bond ยิ่งทำให้เซลลูโลสมีความแข็งแรง และทนแรงดึงได้สูง α -amylase สามารถย่อย glycogen และ starch ในอาหารได้ แต่ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ ยกเว้นปลวกซึ่งมีเอนไซม์ cellulase ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย Triconympha ซึ่งอาศัยอยู่ในลำไส้ปลวกซึ่งสามารถย่อย β 1,4 linkage สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ ได้แก่ วัว ควาย แกะ แพะ อูฐ และ ยีราฟ ซึ่งมีแบคทีเรียและโปรติสท์ในลำไส้เช่นเดียวกับปลวก ซึ่งพืชแต่ละชนิดก็มีสัดส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินแตกต่างกัน การผลิตแอลกอฮอล์จากไบโอแมสคือต้องทำให้ขนาดของไบโอแมสเล็กลงแยกเอาเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออก ด้วยการอบด้วยไอน้ำเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้ย่อยง่ายขึ้นและทำปฏิกิริยาของกรดหรือเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลแล้วหมักด้วยยีสต์จนได้แอลกอฮอล์



รูปที่ 2.4 องค์ประกอบของเซลลูโลสในพืช

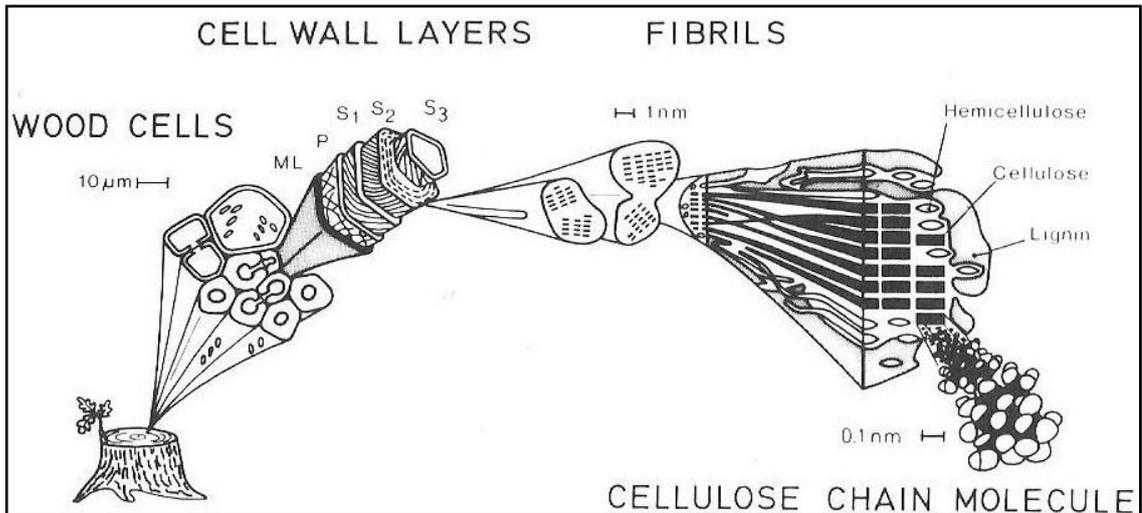
ดังนั้นวัตถุดิบที่มีน้ำตาลกลูโคสเปนองคประกอบสามารถนำมาใช้ในการหมักเอทานอล โดยวัตถุดิบที่มีน้ำตาลกลูโคสเปนองคประกอบสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย และกากน้ำตาล วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด และอื่นๆ และประเภทสุดท้ายคือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic material) ที่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เช่น ฟางข้าว กากอ้อย และซังข้าวโพด เป็นต้น ขั้นตอนในการผลิตเอทานอล โดยทั่วไปจะประกอบด้วย การเตรียมวัตถุดิบ (Raw material preparation) การหมัก (Fermentation) การกลั่น (Distillation) และการกำจัดน้ำ (Dehydration) ซึ่งในกรณีที่วัตถุดิบเป็นแป้งหรือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส จึงต้องมีขั้นตอนการย่อยเพื่อเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลก่อนการหมัก (Hydrolysis) ดังรูป



รูปที่ 2.5 กระบวนการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส

ที่มา : http://www.international.inra.fr/research/some_examples/

ทิพวรรณและคณะ, 2553 อธิบายว่า ในด้านโครงสร้างสายของเซลลูโลสจะต่อกันด้วยพันธะปีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก โดยเรียงต่อกันเป็นสายตรงที่ไม่มีการแตกกิ่งก้านสาขา จำนวนหน่วยย่อยที่มาต่อขึ้นอยู่กับชนิด และอายุของพืช อาจมี 200-15,000 หน่วย หรือเป็นล้านหน่วย คอนฟิกูเรชัน (configuration) ของปีต้า-ดี-กลูโคไซรานอส (β -D-glucopyranose) ส่วนใหญ่จะเป็นรูปแบบเก้าอี้ (chair form) และโมเลกุลของกลูแคนจะมีผิว (surface) เป็นไฮโดรเจนอะตอม โมเลกุลของสายกลูแคนมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) การต่อกันด้วยพันธะปีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก จึงเกิดแรงที่ทำให้สายกลูแคนหมุนบิดตัวได้ 180 องศา รอบแกน จึงทำให้แต่ละสายมีรูปร่างลักษณะที่เปรียบเสมือนริบบิ้น (flat ribbon) สายกลูแคนแต่ละสายจะมาเรียงต่อกันเป็นไมโครไฟบริล ซึ่งอาจจะม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส หรือม้วนทับกันเป็นเกลียวรอบแกนของเส้นใย จากการเรียงตัวของโมเลกุลของเซลลูโลสดังกล่าวทำให้สามารถแบ่งรูปร่างของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชได้ 3 แบบ ที่แตกต่างกันดังแสดงใน (Norkrans, 1967) จากการศึกษาโดยใช้เอกซเรย์ดิฟแฟคชัน (x-ray diffraction) พบว่าไมโครไฟบริลบางส่วนจัดตัวอย่างมีระเบียบ (crystalline) แต่บางส่วนจัดตัวไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ซึ่งในธรรมชาติจะมีส่วนจัดตัวเป็นระเบียบร้อยละ 85 แต่ส่วนที่ไม่เป็นระเบียบร้อยละ 15 ผนังเซลล์ของพืชจะมีเซลลูโลสจับตัวอยู่เป็นแถบๆ ไม่ติดต่อกันโดยตลอด แยกโดยช่องว่าง เมื่อเซลล์แก่เต็มที่ภายในช่องว่างจะเต็มไปด้วยลิกนิน ซึ่งมีผลทำให้เซลลูโลสถูกห่อหุ้มด้วยลิกนิน



รูปที่ 2.6 โครงสร้างผนังเซลล์พืช (Hoffman, P. and Jones, M. A., 1989)

2.2 การย่อยสลายเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ได้แก่ การนำเซลลูโลสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมทำเยื่อกระดาษและกระดาษ อุตสาหกรรมทอผ้า มีรายงานการใช้เซลลูโลสในการผลิตแอลกอฮอล์ เป็นต้น จึงมีความจำเป็นต้องมีการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลงหรือในบางครั้งจำเป็นต้องให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส การย่อยสลายเซลลูโลสทำได้หลายวิธี เช่น การย่อยสลายด้วยวิธีทางเคมี การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ และการย่อยสลายด้วยวิธีทางกายภาพ

2.2.1 การย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลด้วยกระบวนการทางเคมี

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรด (acid hydrolysis) ได้ทำกันมานานแล้วด้วยวัตถุประสงค์ที่จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือน้ำตาล (รูปที่ 2.7) แต่จากการย่อยเซลลูโลสด้วยกรดจะได้สารประกอบ furfural และอนุพันธ์ของ furfural ซึ่งไม่พึงประสงค์เกิดขึ้น วิธีการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรดกระทำกันเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกคือขั้นตอนการใช้กรดเข้าไปทำลายโครงสร้างของเซลลูโลส โดยกรดจะเป็น swelling agent คือทำให้เซลลูโลสพองตัว ขั้นที่สอง เป็นการเติมน้ำเพื่อลดความเป็นกรด จากนั้นให้ความร้อนซึ่งมีผลทำให้เซลลูโลสถูกตัดเป็นโมเลกุลเล็กๆ คือ น้ำตาล ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายเพื่อให้โครงสร้างประเภท crystalline ซึ่งทนต่อการย่อยด้วยกรดเกิดการแตกตัวให้หมดด้วย กรดที่นิยมได้แก่ กรดซัลฟูริกเข้มข้น 72 % กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 41 % หรือกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 80 %

การย่อยสลายด้วยกรดไม่เป็นที่นิยมเนื่องจาก ปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยกรดไม่จำเพาะเจาะจง บางครั้งก่อให้เกิดปฏิกิริยาอื่นๆ เช่น ปฏิกิริยาการคิงน้ำ และปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลที่เป็นผลิตภัณฑ์ เป็นต้น นอกจากนี้กรดที่ใช้มีผลกัดกร่อนอุปกรณ์ต่างๆ การปรับสภาพให้เป็นกลาง มีผลให้เสียเวลาและค่าใช้จ่าย

การอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีในการทำลายโครงสร้างของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งจะเป็นกระบวนการทำงานร่วมกันระหว่างการใช้สารเคมีและกระบวนการ pretreatment อื่นๆร่วมด้วย

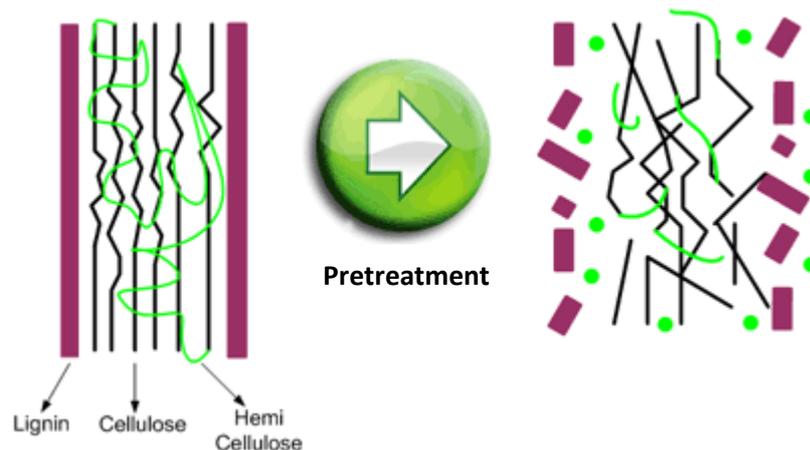
1) Weak acid hydrolysis

การใช้กรดเจือจางในการ treatment เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการ pretreatment วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปการใช้กรดเจือจางในการย่อยมี 2 ชนิด คือ

การใช้อุณหภูมิสูงและอัตราการเติมตัวอย่างชนิดที่มีปริมาณของแข็งต่ำในกระบวนการต่อเนื่อง (อุณหภูมิสูงกว่า 160 °C และความเข้มข้นของสับสเตรตเป็นร้อยละ 5-10 ส่วนอีกวิธีการหนึ่งคือ การใช้อุณหภูมิต่ำในกระบวนการแบบ batch สำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณของแข็งสูง (อุณหภูมิต่ำกว่า 160 °C และความเข้มข้นของสับสเตรตเป็นร้อยละ 10-40 กรดเจือจางส่วนใหญ่เป็นกรดซัลฟิวริก ที่นำไปฉีดพ่นลงบนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และผสมให้เข้ากันภายใต้อุณหภูมิ 160-220 °C ในระยะเวลาสั้น เมื่อเกิดกระบวนการย่อยเอมิเซลลูโลส จะเกิดการปลดปล่อย monomeric sugars และ soluble oligomers จากผนังเซลล์เข้าสู่สารละลาย โดยคาร์บอนเอมิเซลลูโลสออกนั้นจึงเป็นการเพิ่มรพูนแก๊ววัสดุเหลือทิ้งทางและยังช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นด้วย (Chen *et al.*, 2007) หรืออีกทางเลือกหนึ่งในการใช้กรดเจือจางในการ pretreatment คือ การใช้กรดอินทรีย์หรือกรดอินทรีย์เจือจาง (เช่น กรดมาเลอิก และกรดฟูมาริก) (Kootstra *et al.*, 2009) การ treatment จึงเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการทำลาย ย่อยสลายน้ำตาลเอมิเซลลูโลส แต่ข้อด้อยคือ น้ำตาลเอมิเซลลูโลสอาจถูกย่อยให้กลายเป็น furfural และ hydroxymethyl furfural ได้ ซึ่งจัดเป็นตัวยับยั้งการหมักของจุลินทรีย์ได้ อย่างไรก็ตาม การใช้กรดในการ treatment เหมาะกับวัตถุดิบที่มีปริมาณลิกนินต่ำ หรือมีการนำลิกนินออกจากวัตถุดิบแล้ว

2) Strong acid hydrolysis

โดยทั่วไปการใช้กรดเข้มข้น เช่น กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการ treatment วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เนื่องจาก เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส (Sun and Cheng, 2002) และไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ร่วมในการย่อยสลาย โดยข้อดีของการใช้กรดเข้มข้นในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ มีความยืดหยุ่นในแง่ของการเลือกวัตถุดิบ ได้ปริมาณ monomeric sugar สูงและยังใช้อุณหภูมิต่ำที่ไม่สูงมาก ส่วนข้อด้อย คือ เกิดปฏิกิริยากัดกร่อนขึ้นและจำเป็นต้องมีการนำกรดเข้มข้นนั้นกลับมาใช้ใหม่เพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนการ ปัจจุบันมีหลายบริษัทที่นำเอาการ pretreated ด้วยกรดเข้มข้นนี้ไปใช้ในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เพื่อให้ได้วัตถุดิบสำหรับกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ (BlueFire Ethanol, 2010; Biosulfurol, 2010)



รูปที่ 2.7 การ pretreatment เพื่อทำลายโครงสร้างลิกนินออกจากเซลลูโลส

ที่มา: <http://www.hrs-heatexchangers.com/en/applications/biofuels/thermal-hydrolysis-biomass-biofuel-bioethanol-biogas-2-3.aspx>

พรเทพและคณะ (2538) กล่าวว่า ในธรรมชาติการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส เกิดโดยอาศัย การย่อยสลายจุลินทรีย์หลายชนิดรวมกันในสภาพที่มีออกซิเจน ผลที่ได้จากการย่อยสลาย จะได้ก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ อีเทน ความร้อน และจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์จะได้มา จากการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสในสภาพที่เหมาะสม มีการระบายอากาศ และอุณหภูมิที่เหมาะสม มีแหล่งอาหารเพียงพอกับการนำไปสร้างพลังงานเพื่อใช้ในกระบวนการหมัก และการเพิ่มจำนวนเซลล์ ใน สภาพที่ไม่มีออกซิเจน การย่อยสลายเซลลูโลส จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน เอทานอล กรด พอร์มิก กรดซัคซินิก กรดบิวทีริก และกรดแลคติก เป็นต้น นอกจากนี้การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส ยังสามารถทำได้โดยวิธีทางเคมี ซึ่งมีการย่อยสลายด้วยสารเคมี อาทิเช่น การใช้กรด การย่อยสลายวิธีนี้ ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นจะไม่เฉพาะเจาะจง ดังนั้นน้ำตาลกลูโคสบางส่วนที่เกิดขึ้นจะทาปฏิกริยากับกรดต่อไป ทา ให้ได้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงชนิดอื่น และกรดยังทาปฏิกริยากับสารชนิดอื่นที่ติดมากับเซลลูโลส ทาให้ผลิตภัณฑ์ ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้โครงสร้างในส่วนที่เป็น คริสตัลลีน ก็จำเป็นต้องใช้กรดที่ความเข้มข้น และอุณหภูมิ สูงในการย่อยสลายจึงจะได้น้ำตาลกลูโคส ปฏิกริยาย่อยจึงเกิดแบบรุนแรง ภาชนะที่ใช้ต้องทนทานต่อการ กัดกร่อน ต้นทุนจึงสูง และกรดที่ถูกทิ้งออกมายังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย แต่วิธีนี้ปฏิกริยาการ ย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 15-20 นาที

Rajeev และคณะ (2009) ศึกษาข้อจำกัดของการย่อยวัสดุทางการเกษตรสำหรับการผลิตเอทานอล คือราคาของเอนไซม์เซลลูเลส ราคากระบวนการผลิตเซลลูเลสเพื่อที่จะให้ราคาถูกลงก็ต้องใช้ลิกโน เซลลูโลสที่มีราคาถูกสำหรับเป็นสับสเตรต กระบวนการหมักด้วยเอนไซม์และกระบวนการหมักก็เป็น เหมือนกับ Solid state fermentation (SSF) เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการผลิต ในการศึกษานี้จะใช้เอนไซม์ เซลลูโลสไลติกย่อยวัสดุโดย Solid state fermentation (SSF) บนรำข้าวสาลี เซลลูเลสและบีต้ากลูโคซิเดส โดยใช้ *Trichoderma reesei* RUT C30 และ *Aspergillus niger* MTCC 7956 ตามลำดับ ใน กระบวนการย่อยจะใช้ สามสับสเตรตคือ ชานอ้อย ฟางข้าวและ ผักตบชวา ที่ใช้ในการศึกษาเอนไซม์ ใช้ 50 เปเปอร์ฟิเลเตอร์ยูนิตของเซลลูเลส และ 10 ยูนิตบีต้ากลูโคซิเดสต่อกรัมในการ pretreat วัสดุเหลือทิ้ง ฟาง ข้าวให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 26.3 กรัมต่อลิตร ตามด้วย ชานอ้อย 17.79 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงใช้ฟางข้าว เป็นสับสเตรตในการผลิตเอทานอลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ได้เอทานอล 0.0093 กรัมต่อกรัม ฟางข้าว

การ pretreatment ด้วยต่างเป็นการทำลายและนำโครงสร้างของลิกนินออกจากวัสดุเหลือทิ้งทาง การเกษตร (รูปที่ 10) เพื่อให้ปฏิกริยาการย่อยสลายได้เป็นโพลีแซคคาไรด์ ทั้งยังเป็นการนำหมู่อะซิทิ ลอกและทนที่ด้วยกรดยูโรนิก ในโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส (Chang and Holtzaple, 2000) ซึ่งมีการรายงานถึงกลไกการย่อยสลายด้วยต่าง ที่เป็นพื้นฐานในกระบวนการ saponification ของ สารชีวโมเลกุลในตำแหน่งของพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมระหว่างไซแลน เฮมิเซลลูโลส และองค์ประกอบอื่นๆ เช่น ลิกนิน (Sun and Cheng, 2002)

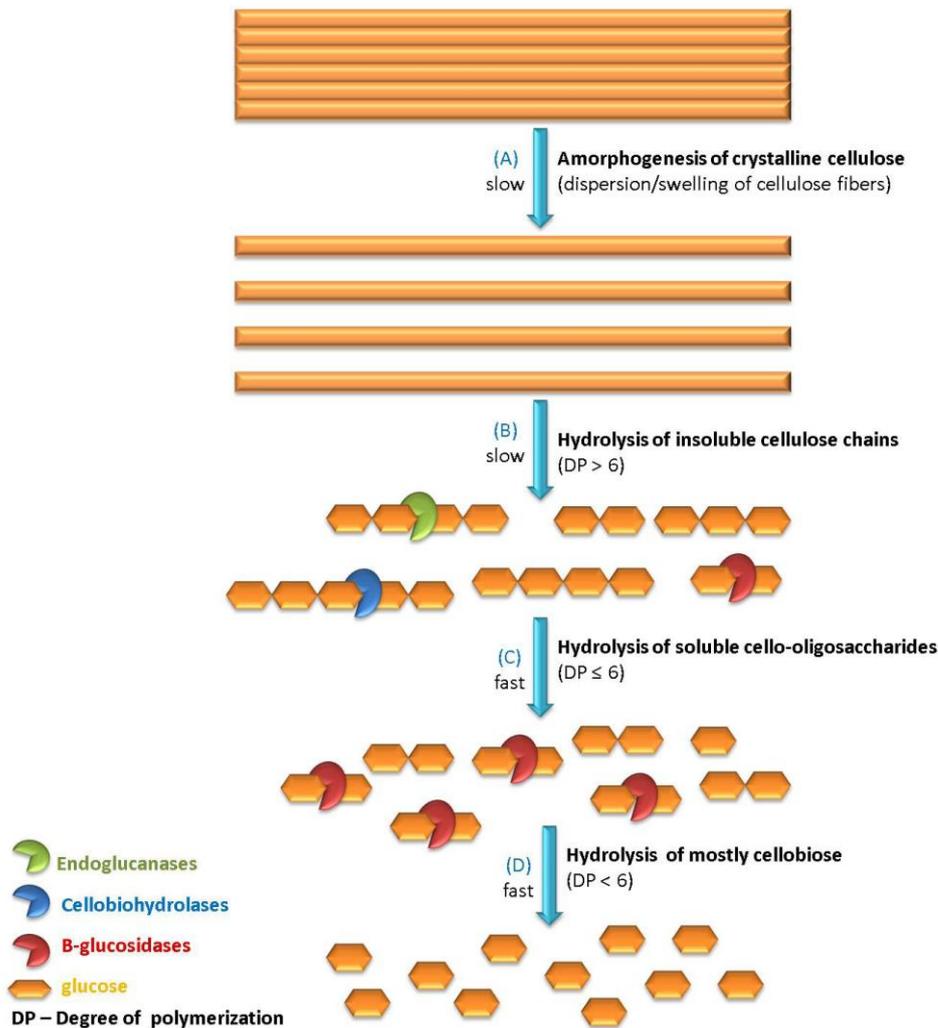
2.2.2 การย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

ปฏิกริยาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เป็นกระบวนการย่อยสลายที่มี ความจำเพาะสูง เอนไซม์จะไม่ทาปฏิกริยากับสารอื่นที่ปะปนมา ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ปฏิกริยาไม่รุนแรง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่ถูกทาปฏิกริยาต่อไป โดย เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน แสดงดังรูปที่ 2.3

Endoglucanase (endo- β -1,4-glucanase) (E.C.3.2.1.4) (พิจิตรา, 2548) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ ของเซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) เซลลูโลสที่ผ่านการทำ ปฏิกิริยากับกรดฟอสฟอริก (phosphoric swollen cellulose) ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) และเซลโลโอลิโกเมอร์ (cello-oligomers) โดยตัดย่อยเซลล์ที่ตำแหน่ง พันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่ม (random) ทำให้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ เซลโลโอลิโก แซคคาไรด์ (cellooligo-saccharides) เซลโลเพนทาโอส (cellopentaose) เซลโลไตรโอส (cellotriose) เซลโลไบโอส (cellobiose) และกลูโคส โดยจะได้ผลิตภัณฑ์หลักได้ขึ้นอยู่กับสมบัติ ของแต่ละเอนไซม์

Exoglucosidase (exo- β -1,4-glucanase) หรือเอกโซบีต้า-1,4-กลูแคนกลูโคไฮโดรเนส หรือเอกโซบีต้า-1,4-เซลโลไบโอไฮโดรเนส (E.C.3.2.1.91) พบว่ามักทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ เอนโดกลูคาเนสในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มี น้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ของเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่ คือ น้ำตาล เซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบ (microcrystalline cellulose) ได้โดยอาศัยการทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนส

เอนไซม์บีต้า-1,4-กลูโคไซด์เนส (E.C.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ละลายน้ำได้ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุล ซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรง กลไกการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในส่วนที่เป็น ระเบียบ (crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ร่วมกันแสดงเป็นแผนภูมิได้ดังรูปที่ 2.8



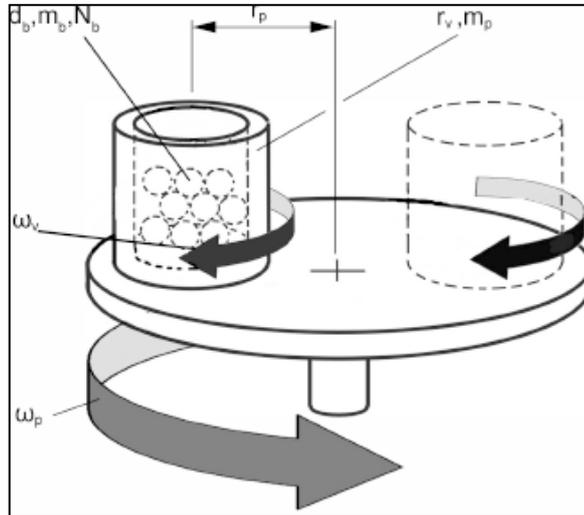
รูปที่ 2.8 กระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเซลลูโลไลติกเอนไซม์ (Arantes และคณะ, 2010)

2.2.3 การย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลด้วยกระบวนการทางกายภาพ Mechanical pretreatment

1) Milling กระบวนการลดขนาดอนุภาคของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อให้การจัดการง่ายขึ้นและเพิ่มอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตร ซึ่งทำได้โดยการสับ การม่หรือการบด การ pretreatment ด้วยเครื่องกลนี้จะใช้ก่อนกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ ขนาดของอนุภาคที่เหมาะสมในการนำไปใช้ (P.F.H. Harmsen, 2010) และการย่อยด้วยวิธีการทางกายภาพแบบ ball milling คือ การอาศัยการทำงานของลูกทรงกลมในการบดวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อให้มีขนาดของอนุภาคของเซลลูโลสที่เล็กลง ที่ส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายของเซลลูโลไลติกเอนไซม์มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นดังรูป 12 (Gy. Kakuk, 2009)

2) Ultrasonic pretreatment กระบวนการทำลายโครงสร้างของวัสดุทางการเกษตรโดยใช้คลื่นเสียง (ultrasonication) นั้นได้มีการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ เช่น การ treatment พวกโคลนในน้ำเน่าเสีย โดยในการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงผลของการ pretreatment เซลลูโลสโดยใช้กระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ จากการทดลองนี้พบว่า เมื่อให้คลื่นรังสีพลังงานแก่เซลลูโลสในสภาพที่เป็นสารละลายนั้น คลื่นรังสีได้ส่งผลให้อัตราเร่งของปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้นถึง

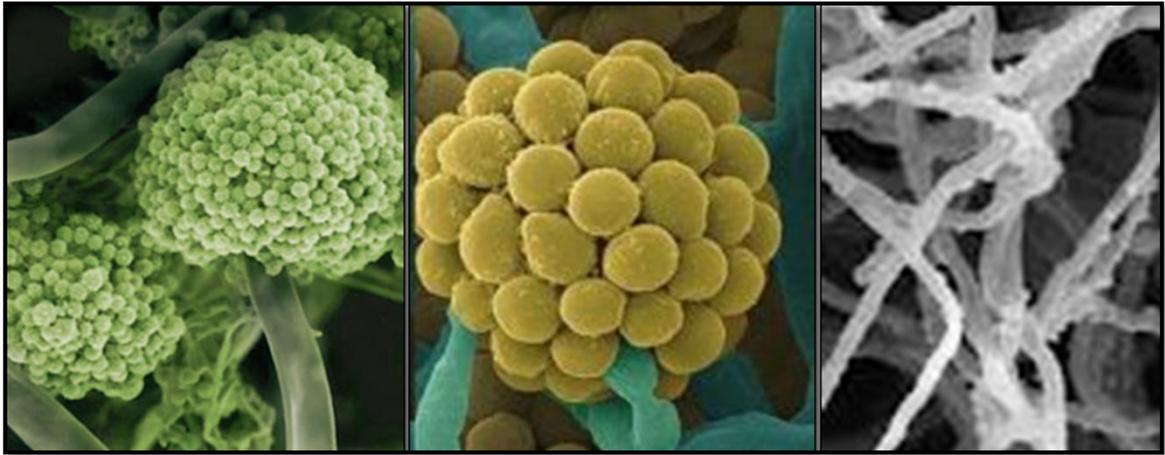
ร้อยละ 200 (Imai และคณะ., 2004) แต่ยังไม่มีการทดลองในด้านกระบวนการทำงานของคลื่นรังสี แต่มีข้อสันนิษฐานว่า พันธะไฮโดรเจนของโครงสร้างเซลลูโลสอาจจะถูกทำลายไปเมื่อได้รับพลังงานรังสี อย่างไรก็ตาม พลังงานที่ให้แก่ คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสต้องเท่ากับ 130 กิโลจูลต่อกรัมของคาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส ซึ่งมีผลต่อพลังงานพันธะไฮโดรเจนเป็น 0.12 กิโลจูลต่อกรัมของเซลลูโลส (21 กิโลจูลต่อโมลของเซลลูโลส (Bochek, 2003))



รูปที่ 2.9 กระบวนการทำงานของ ball mill. d_b : เส้นผ่าศูนย์กลางของลูกบอล, m_b : ปริมาณของลูกบอล, N_b : จำนวนของลูกบอล, r_p : ระยะห่างระหว่าง vial กับแกนกลาง, r_v : รัศมีของ vial, m_p : ปริมาณของผงแป้ง, ω_v : ความเร็วการหมุนของ vial, ω_p : ความเร็วการหมุนของ sun disk (Gy. Kakuk, 2009)

2.3 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา

เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตเพื่อการค้านั้นมักเป็นเอนไซม์เซลลูเลสผสมที่สกัดได้จากเชื้อราหลายชนิด และปริมาณของเอนไซม์แตกต่างกันออกไป ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้ในการผลิตองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการผลิต ในธรรมชาติมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ เช่น สัตว์ทะเลในกลุ่มเพรียงหัวหอม (tunicate) หอยทากยักษ์ (Achatina fulica) และจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งที่เป็นโปรโตซัว แบคทีเรีย แอคติโนมัยสิท และเชื้อรา จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สร้างเอนไซม์ เซลลูเลสที่มีความสามารถในการย่อยสลายแตกต่างกันขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์เหล่านั้นเจริญอยู่ พบว่าเชื้อรา (cellulolytic fungi) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เอนไซม์เซลลูเลสส่วนใหญ่เป็นเอกซ์ตราเซลลูลาร์เอนไซม์ (extracellular enzyme) คือ เซลล์ปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ทำให้สะดวกต่อการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายเซลลูโลส และสะดวกต่อการนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ในการศึกษา หรือใช้ในอุตสาหกรรม (พิจิตร, 2548)



รูปที่ 2.10 เชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูโลสไลติก เอนไซม์ *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* และ *Phanerochaete chrysosporium*

ที่มา: <http://genome.jgi-psf.org/Aspni5/Aspni5.home.html>
<http://en.wikipedia.org/wiki>

Krishna และ Chowdary (2000) ศึกษาการผลิตและการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส โดยได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *Trichoderma reesei* QM-9414 โดยในสภาวะที่การผลิตเอนไซม์เหมาะสมจะขึ้นกับ pH อายุของเชื้อ สารอินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นของเชื้อ นอกจากนี้ยังศึกษาความสามารถของเอนไซม์บริสุทธิ์ในการ hydrolyze สารประกอบที่มีองค์ประกอบของลิกนินและเซลลูโลส โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเกิด hydrolysis คือที่อุณหภูมิ 50°C pH 4.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 40 FPU/g และความเข้มข้นของ substrate เท่ากับ 2.5%

Pointing และคณะ (1999) ศึกษาเชื้อราจากต้นโกกาง 5 ชนิด ที่ผลิตเอนไซม์ endoglucanase, cellobiohydrolase และ β -glucosidase โดยเลี้ยงในสภาวะที่กำหนดใน define medium เมื่อมีการรบกวนการเพาะเลี้ยงเชื้อก็จะเป็นการรบกวนการผลิตเอนไซม์และเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเกลือการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสก็จะลดลงด้วยเช่นกัน

Soni และคณะ (1999) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *Chaetomium erraticum* จากการศึกษาพบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะขึ้นกับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยอุณหภูมิที่เชื้อผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุด คือ 37°C pH 5.0-10.0 ในอาหารที่มี carboxymethyl cellulose ภายใต้การเขย่า

Swangkeaw และคณะ (2006) รายงานการคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากผลไม้ พบว่าสามารถคัดเลือกยีสต์ได้ 365 ไอโซเลต ที่ผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส โดยพบว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่สะสมอยู่ใน periplasmic space

Chen และ Jin (2006) ศึกษาผลของเอทานอลต่อเอนไซม์เซลลูเลสจากยีสต์ในการย่อยสลายเซลลูโลส พบว่าในสภาวะที่มีเอทานอลความเข้มข้นระหว่าง 1%-9% ไม่มีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและ ปีศาจโคซิเดสที่ผลิตจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

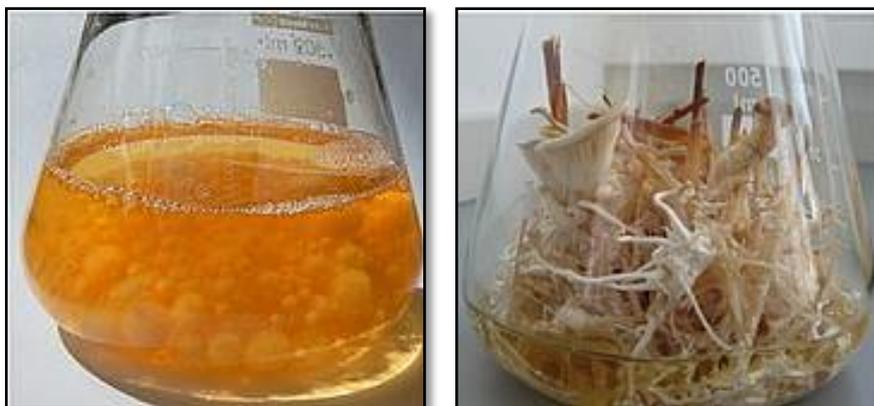
การเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสนั้นสามารถทำได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง ขึ้นกับความเหมาะสม การที่จะให้ผลผลิตเอนไซม์สูงและมีคุณภาพดีนั้นจะต้องมีการควบคุมสภาวะต่างๆ ให้

เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ชนิดอาหารที่ใช้ต้องเหมาะสม พิเอช การปนเปื้อน รวมทั้งคำนึงถึงราคาต้นทุนในการผลิตด้วย นอกจากนี้การใส่สารเร่งการเจริญ แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ สารเหนียวทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ก็เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงด้วย สารเหนียวจากการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ สารประกอบเซลลูโลส อนุพันธ์ของเซลลูโลส และสารที่มีพันธะ β -1,4 glycosidic เช่น cellulobiose, sepharose และ lactose เป็นต้น (การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรามีรายงานการทดลองไว้ 2 วิธี คือ การผลิตเอนไซม์โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในลักษณะ submerged culture และ solid state cultivation

การผลิตแบบ submerged culture ได้แก่ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยนำเชื้อรามาล้างในอาหารสังเคราะห์ชนิดเหลว (liquid synthetic medium) เช่น อาหาร Eggins & Pugh medium หรืออาหาร M4-medium เป็นต้น ข้อได้เปรียบของการผลิตแบบ submerged culture นี้ สามารถคุมสภาพแวดล้อมได้ดีและง่ายต่อการควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

การผลิตแบบ solid substrate cultivation เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาพที่ไม่มีน้ำอิสระ หรือมีน้ำน้อย โดยให้ความชื้นอยู่ระหว่าง 12-80 % และเป็นความชื้นอยู่ในลักษณะที่ดูดซับอยู่บนอาหารวัตถุแข็ง ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบ solid substrate นอกจากนี้จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้แล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ซึ่งเป็นปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความชื้นและความสามารถในการอุ้มน้ำของวัสดุของอาหารแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยง อุณหภูมิของวัสดุอาหารแข็ง ในขณะที่เพาะเลี้ยง ปริมาณของวัสดุอาหารแข็ง ขนาดและรูปร่างของวัสดุ อัตราการไหลเวียนอากาศและช่วงระยะเวลาในการบ่ม เป็นต้น และปัจจัยทางเคมี เช่น แหล่งธาตุอาหารและอัตราส่วนของอาหารแต่ละชนิด วัสดุทางการเกษตรที่สามารถนำมาใช้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ได้แก่ รำข้าวสาลี ฟางข้าว ชี้เลื่อย แกลบ และขานอ้อย เป็นต้น โดยเฉพาะรำข้าวสาลีและฟางข้าว จะนิยมใช้มากที่สุด

ข้อได้เปรียบของการผลิตแบบ solid substrate cultivation คือผลผลิตต่อหน่วยวัสดุแข็งที่ได้จะสูงกว่าการผลิตในอาหารเหลว ไม่ค่อยพบกับปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปของสปอร์จึงไม่จำเป็นต้องใช้ถังเตรียมเชื้อเริ่มต้น การย่อยสลายเซลลูโลสเกิดขึ้นภายนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสลายเซลลูโลส โดยจุลินทรีย์จะกระตุ้นระบบการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ให้มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายสารประกอบพวก β -1,4 glycosidic ซึ่งเมื่อย่อยสลายเสร็จสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์



รูปที่ 2.11 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแบบ submerged culture และแบบ solid substrate cultivation

ที่มา: <http://www.basidionet.de/basidionet.html?&L=1>

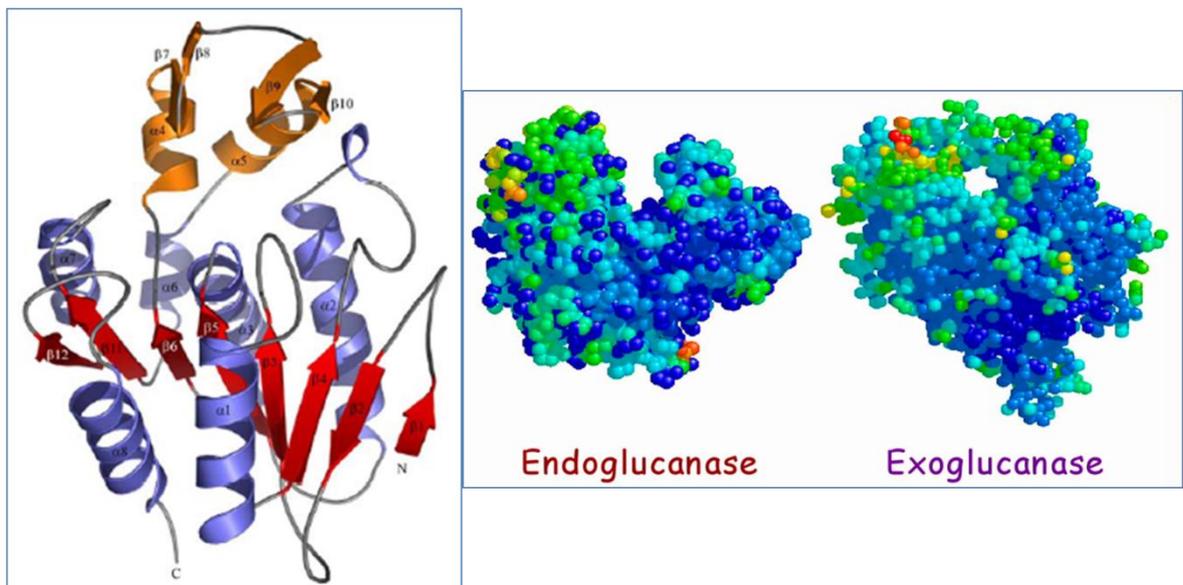
Dogaris และคณะ (2009) ปรับปรุงการผลิตเอทานอลของ *Neurospora crassa* โดยสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงแบบ solid-state cultivation (SSC) โดยใช้ก้านข้าวฟ่างเป็นสับสเตรต กลูโคสเป็นผลผลิตหลักที่ได้จากกระบวนการย่อยข้าวฟ่างหวาน สุดท้ายความเข้มข้นของกลูโคสที่ได้ 5.4 กรัมต่อลิตรหลังจาก 51 ชั่วโมงของการย่อย ไฮโดรไลโอสมีความเข้มข้น 5.4 กรัมต่อลิตร การเปลี่ยนข้าวฟ่างหวานไปเป็นเอทานอลภายใต้สภาวะ SSC ผลผลิตที่ได้เอทานอล 81.5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 8.1 เปอร์เซ็นต์ ไฮลิตอล 5.7 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 4.7 เปอร์เซ็นต์

โดย Yu และคณะ (2008) รายงานการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่ทนต่อความร้อนโดยอาศัยกระบวนการหมักแบบแห้งที่มีข้าวฟ่างหวานเป็นวัตถุดิบในการผลิต ที่พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงถึงร้อยละ 91 ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

Chahal และคณะ(1984) รายงานกระบวนการหมักแบบแห้งด้วยเชื้อ *Trichoderma reesei* ในการผลิตเอทานอล พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบอาหารเหลวที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ต่ำและนอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบพบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส และเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส โดยในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้นการเจริญของเชื้อด้วย

2.4 เอนไซม์เซลลูเลส

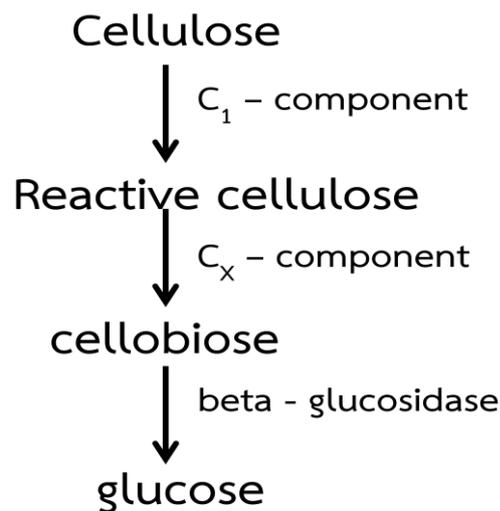
จากการศึกษาถึงโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า เซลลูเลสเป็น glycoprotein ประกอบด้วยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ถึง 60,000 ดาลตัน มีสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ co-factor หรือโลหะอื่นๆในการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์ จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส ยกเว้นจุลินทรีย์ที่ร้อนบางชนิด นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังมีความทนต่ออุณหภูมิสูง ทนต่อความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ในช่วงกว้างประมาณ 4.8 ถึง 8.0 และคงทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 0 และ 4.0 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลาหลายปี หรือเก็บโดยวิธี freeze dry หรือตากตะกอน ด้วยอะซิโตน หรือเอทานอล โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ย่อมมีสมบัติแตกต่างกัน (พรเทพ, 2538)



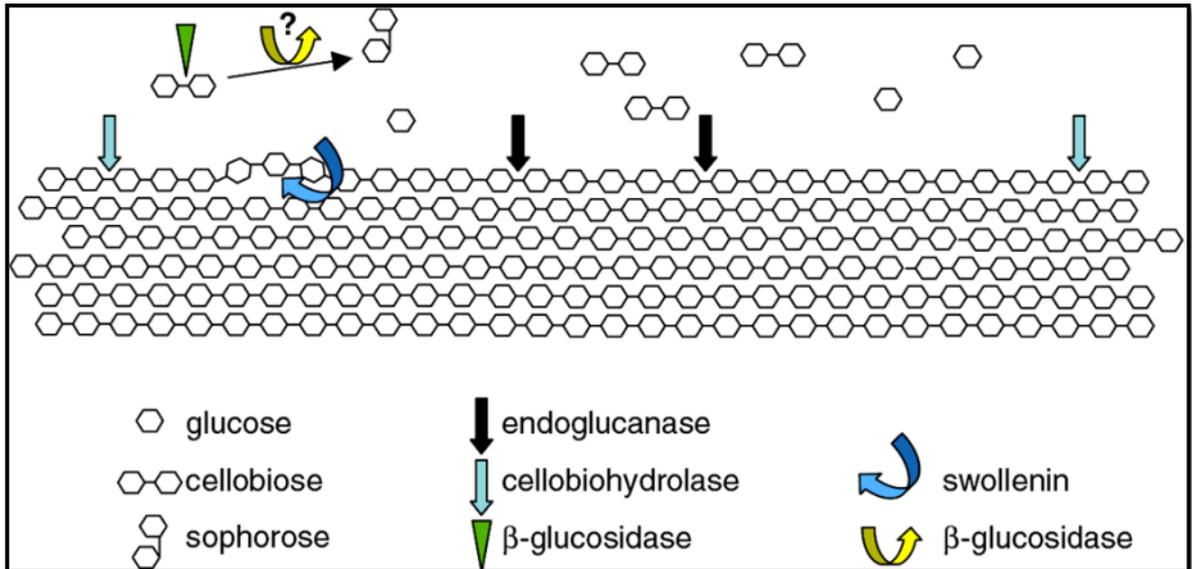
รูปที่ 2.12 โครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลส

ที่มา: <http://sci.waikato.ac.nz/farm/content/microbiology.html>

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ beta - 1,4 glycosidic ภายในโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส ผลผลิตสุดท้ายคือน้ำตาลกลูโคส จำเป็นต้องอาศัยระบบเอนไซม์เซลลูเลสที่มีองค์ประกอบ (component) แตกต่างกัน Reese และคณะ (1950) ได้เสนอว่าเอนไซม์เซลลูเลสนั้นประกอบด้วยองค์ประกอบที่มีหน้าที่แตกต่างกัน 2 องค์ประกอบคือ C_1 - component เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโครงสร้างเซลลูโลสที่มีอยู่ในธรรมชาติ (native cellulose) ให้เกิดเป็นโครงสร้างที่ง่ายต่อการย่อยสลาย (reactive cellulose) ต่อไปและ C_x - component คือส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย reactive cellulose ผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากการย่อย reactive cellulose คือสารประกอบ cellobiose ซึ่งละลายน้ำได้และจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ต่อมา Reese และ Levinson (1952) ได้เสนอลักษณะการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มเติมโดยเสนอว่ามีองค์ประกอบของเอนไซม์ส่วนที่สามคือ beta - glucosidase ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบ cellobiose ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ลักษณะของปฏิกิริยามีดังนี้



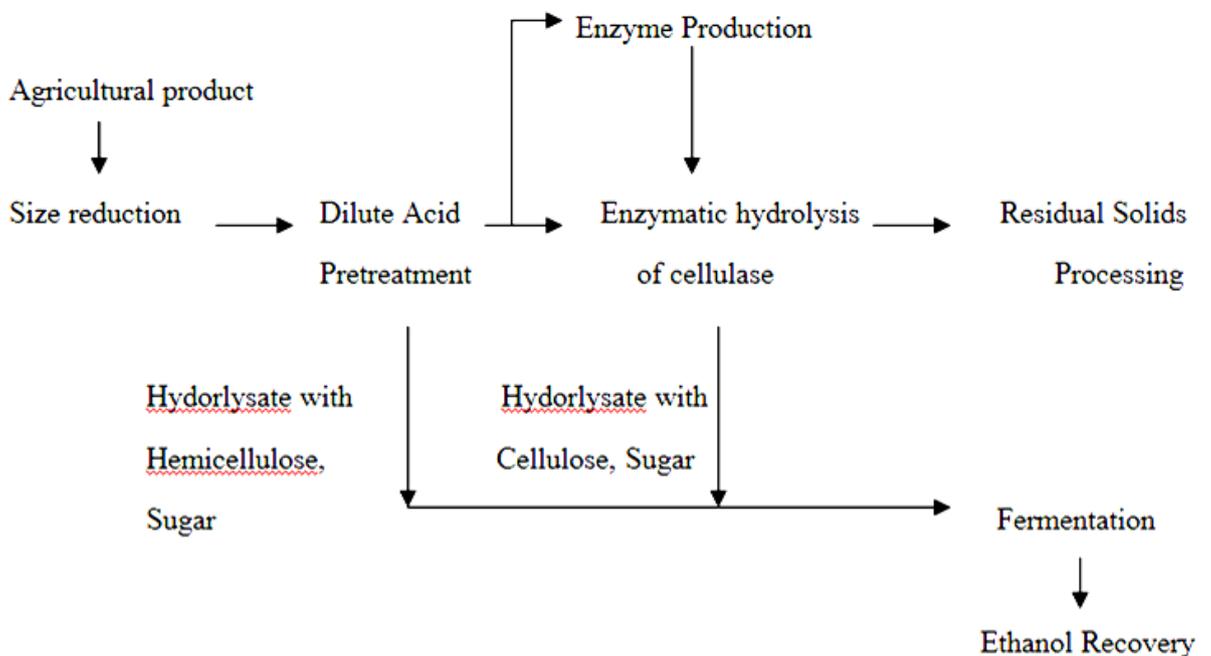
สำหรับขั้นตอนการทำปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งประกอบด้วย endoglucanase, exoglucanase และ beta -glucosidase มีดังนี้คือ endoglucanase จะเข้าทำปฏิกิริยาตรงส่วนของเซลลูโลสบริเวณที่เป็น amorphous ทำให้สายของเซลลูโลสขาดออกจากกันหลังจากนั้นจะเป็นปฏิกิริยาร่วมกันของเอนไซม์ endoglucanase และ exoglucanase ซึ่ง exoglucanase เข้าทำปฏิกิริยาตรงปลายด้านอนอริตวซิงของสายเซลลูโลสที่ถูกตัดนี้ ทำให้ได้ cellobiose สุดท้าย β -glucosidase จะย่อยสลาย cellobiose จนกระทั่งได้น้ำตาลกลูโคส



รูปที่ 2.13 ปฏิกริยาของระบบเอนไซม์เซลลูเลส (Alonso, D. (2011))

2.3 ขั้นตอนการนำเอนไซม์เซลลูโลสไลติกมาผลิตเอทานอล

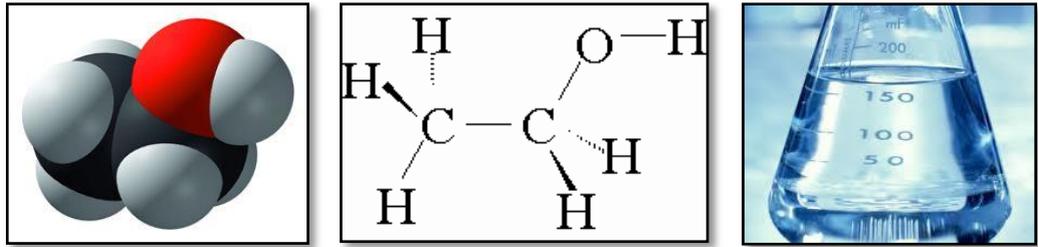
ในการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักทำได้โดยในขั้นตอนแรก โดยการย่อยสลายโครงสร้างวัสดุทางการเกษตรด้วยกรดจะได้เฮมิเซลลูโลส และน้ำตาล ในขั้นตอนต่อไปคือปฏิกริยาของเอนไซม์ในการย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้น้ำตาล (cellobiose) จากนั้น cellobiose จะถูกย่อยสลายได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นสารอาหารแกยีสต์สำหรับนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล โดยขั้นตอนของปฏิกริยามีดังต่อไปนี้



ไบโอเอทานอล

"เอทานอล" หมายความว่า แอลกอฮอล์ หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เอทิลแอลกอฮอล์ มีสูตรทางเคมี CH_3CH_2OH มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่าย มีความไวไฟและค่าออกเทนสูง (เอทานอลบริสุทธิ์ ร้อยละ 99.8 มีค่าออกเทนสูงถึง 113) ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นไฮดรอก

ซิล ดิริเวทีฟของไฮโดรคาร์บอน เกิดจากการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมด้วย hydroxyl group (OH) มีน้ำหนักโมเลกุล 46.07 ความหนาแน่น 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว -114.1 องศาเซลเซียส จุดเดือด 78.5 องศาเซลเซียส สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย อาทิ ใช้ผลิตอาหาร และเครื่องตีแอลกอฮอล์ ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ ฯลฯ โดยจะใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง หรือใช้ผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงก็ได้ "ไบโอดีเซล" หมายความว่า แอลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (alkyl ester of fatty acid) มีสูตรทางเคมี R_1COOR_2 ซึ่งใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ โดยจะใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง หรือใช้ผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงก็ได้



รูปที่ 2.14 โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล
(ที่มา: <http://www.vcharkarn.com/varticle/38199>)

เอทานอล ผลิตได้ทั้งจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยใช้เอทิลีนเป็นวัตถุดิบ และกระบวนการทางชีวเคมี โดยใช้พืชผลหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีแป้งและน้ำตาลสูงเป็นวัตถุดิบ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ได้รับความนิยมและมีวัตถุดิบที่สามารถเลือกใช้ได้หลากหลายชนิดตามความเหมาะสมของแต่ละประเทศ เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง อ้อย กากน้ำตาล สาหร่าย ฯลฯ นอกจากนี้ยังมีความพยายามพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสสูง เช่น ฟางข้าว ชี้อ้อย หญ้า เป็นต้น เนื่องจาก เอทานอล มีออกซิเจนประกอบอยู่ในโมเลกุล ออกซิเจนจะจับตัวอยู่ในรูปของอนุภาคไฮดรอกซิล (Hydroxyl -OH) ทำให้โมเลกุลของเอทานอล มีคุณสมบัติเป็นขั้ว (Polar) ซึ่งมีปฏิกิริยาสูงกว่าเบนซิน จึงทำให้เอทานอลมีอำนาจการกัดกร่อนมากกว่า เบนซิน คุณสมบัติการกัดกร่อนของเอทานอลป้องกันได้โดยใช้สารเคลือบที่สามารถต้านทานการกัดกร่อนไว้กับถังน้ำมันเชื้อเพลิง ถ้าพึ่งเอทานอลอย่างเดียวไม่สามารถผสมเข้ากับน้ำมันดีเซลได้นัก ต้องเติมสารพิเศษเข้าไปเพื่อให้ผสม เข้ากันได้ดี ร่วมกับการเติมสาร Emulsifier และ Cetane Improver ในปริมาณ 1 - 2 % เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติ ในการจุดระเบิด ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้คือ สามารถลดปริมาณไฮโดรคาร์บอน (HC) ลงได้ถึง 20-40 % และ ลดปริมาณฝุ่น และควันต่ำลงได้ถึง 0-40 %

โดยทั่วไปเอทานอลมี 2 ประเภทคือ เอทานอลสังเคราะห์ (synthetic ethanol) ซึ่งได้จากกระบวนการผลิตทางเคมี และเอทานอลชีวภาพ (ไบโอเอทานอล) ซึ่งได้จากการใช้จุลินทรีย์จำพวกยีสต์หมักกับวัตถุดิบจากการเกษตรผลิตได้จากวัตถุดิบที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอยู่ในโครงสร้างโมเลกุล เช่น มันสำปะหลัง อ้อย molasses เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมน้ำตาล ข้าวโพด ข้าวฟ่างและของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ฯลฯ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิดแต่ ยีสต์ (Yeast) ก็ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลายเพราะสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วและมีปริมาณมาก ยีสต์ยังสามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลาย เอทานอลยังสามารถทำเป็นแอลกอฮอล์หรือสุราที่ใช้บริโภคได้ และเนื่องจากเอทานอลมีค่าออกเทนสูงจึงนำไปผสมกับน้ำมันเบนซิน เรียกว่า น้ำมันแก๊สโซฮอล์ ใช้เป็นเชื้อเพลิง

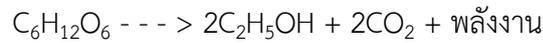
ทดแทนการใช้น้ำมันจากฟอสซิลได้ ประเทศบราซิล (ผู้ผลิตเอทานอลรายใหญ่ของโลก) ใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ประเทศสหรัฐอเมริกาใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ และเอทานอลยังมีประโยชน์ ในการช่วยลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งทำให้เครื่องยนต์มีการเผาไหม้ดีขึ้น ทำให้ไอเสียจากการใช้แก๊สโซฮอล์ มีปริมาณแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ลดลงร้อยละ 20 และปริมาณไฮโดรคาร์บอนลดลงร้อยละ 10 เมื่อเทียบกับ การใช้ น้ำมันเบนซิน ซึ่งจะส่งผลให้ลดค่าใช้จ่ายในการแก้ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของประชาชน ลดปริมาณการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิง จากต่างประเทศได้ประมาณ 3,000 ล้านบาทต่อปี ลดการใช้เชื้อเพลิงปิโตรเลียมซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิด Greenhouse Effect ที่ทำให้อากาศบนโลกร้อนขึ้น ส่งผลต่อการเกษตรกรรม การละลายของน้ำแข็งขั้วโลก ระดับน้ำทะเลที่สูงขึ้น และการเกิดอุทกภัยบ่อยครั้งในพื้นที่ชายฝั่งทะเล ทำให้ปริมาณก๊าซพิษในบรรยากาศลดลง ช่วยให้คุณภาพชีวิตดีขึ้น และเนื่องจากการผลิตเอทานอล ได้จากพืชผลการเกษตร ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงมีผลผลิตเหล่านี้มากมาย ช่วยลดการนำเข้าวัตถุดิบ และลดการพึ่งพาเชื้อเพลิงปิโตรเลียมจากต่างประเทศ ช่วยพยุงเศรษฐกิจในระดับระดับไร่นา สร้างความมั่นคงทางด้านอาชีพและเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร ทำให้เกิดการ พัฒนาเทคโนโลยีทั้งในด้านการผลิตและการใช้ประโยชน์ การสร้างงานและสร้างรายได้ให้กับเศรษฐกิจครัวเรือนภาคการเกษตร ช่วยสร้างผลตอบแทนทางเศรษฐกิจให้กับประเทศ

แต่การใช้ผลผลิตทางการเกษตรโดยตรงอาจจะมีผลกระทบต่อราคาของผลผลิตซึ่งเป็นพืชที่ใช้ในการบริโภค ทำให้มีราคาสูงขึ้น เกิดความเดือดร้อนต่อประชาชน จึงมีการศึกษาที่จะนำเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ในการเป็นวัตถุดิบการผลิตไบโอเอทานอล ทั้งยังช่วยลดต้นทุนการผลิตอีกด้วย ซึ่งการพัฒนาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรม มักจะมีเศษวัสดุเหลือใช้จากการผลิตมากมาย เช่น ฟางข้าว กากชานอ้อย ชังข้าวโพด ฯลฯ ส่วนใหญ่จะมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย เซลลูโลสมีโครงสร้างที่แข็งแรง ไม่ละลายน้ำ และไม่สามารถย่อยสลายไปในเวลาอันรวดเร็วจึงมักจะทำให้เกิดปัญหาเศษวัสดุเหลือใช้ที่เกษตรกรไม่ต้องการ ทำให้เกิดการเน่าเหม็น เกิดเป็นมลพิษที่ไม่ดีต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งการย่อยเซลลูโลส จำเป็นต้องใช้สารละลายกรด หรือใช้เอนไซม์ cellulase ที่จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างขึ้นได้ เช่น *Trichoderma species*, *Aspergillus species*, *Bacillus*, *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น ขณะนี้ การศึกษาค้นคว้าและนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากขึ้นเพราะสามารถเจริญเติบโตรวดเร็ว ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย ต้นทุนในการเพาะเลี้ยงน้อย และยังเจริญได้ในทุก ๆ ฤดูกาล ยีสต์ก็เช่นเดียวกัน ที่เป็นที่นิยมนำมาสกัดเอาสารต่างๆ ที่ยีสต์สร้างขึ้นมาใช้ประโยชน์ซึ่งก็คือ น้ำตาลกลูโคส นำมาผลิต ไบโอเอทานอล เพื่อใช้ลดปัญหาเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมที่มีมากเกินไป และกำจัดไปได้ยาก และช่วยพัฒนาในด้านการเกษตรและเทคโนโลยีเพื่อให้ได้วัตถุดิบต่างๆ มากขึ้น ซึ่งการนำยีสต์มาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล เรามุ่งเน้นไปที่ยีสต์ที่สร้าง เอนไซม์ คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลส และ บีต้ากลูโคซิเดส จะช่วยในการย่อยสลาย 1,4-beta-D- glycosidic linkages ในเซลลูโลส, lichenin และ beta-D-glucans ในธัญพืช ช่วยย่อย cellubios ให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส

กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ (alcohol fermentation)

จะเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นเอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นการ สลายกลูโคสโดยไม่ใช้ออกซิเจน เริ่มต้นด้วยไกลโคไลซิสเช่นเดียวกับการสลายอาหารแบบใช้ออกซิเจน กล่าวคือ กลูโคส 1 โมเลกุลสลายได้กรดไพรูวิก 2 โมเลกุล แล้วปล่อย ATP 2 โมเลกุล และ ไฮโดรเจน 4 อะตอม NAD จะมารับไฮโดรเจนเป็น NADH+H+ และจะถ่ายทอดอะตอมของไฮโดรเจนให้กับอะซิตัลดีไฮด์ ซึ่งมีคาร์บอน 2 อะตอม จึงไม่สามารถนำเอาพลังงานอิเล็กทรอนิกส์ที่มีอยู่ในอะตอมของไฮโดรเจนมาสร้าง ATP ได้อีก ดังนั้น

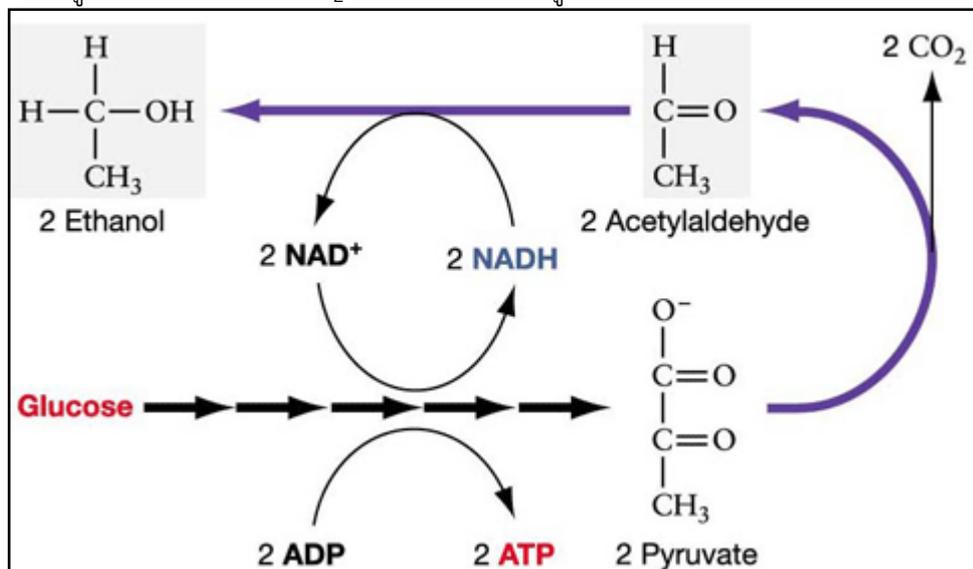
การสลายกลูโคส 1 โมเลกุล จึงได้ ATP เพียง 2 โมเลกุลเท่านั้น เอทานอลที่ได้จากการสลายกลูโคสถ้ามีปริมาณมากจะเป็นอันตรายต่อเซลล์ ร่างกายจะมีกระบวนการเปลี่ยนเอทานอลให้เป็นสารอื่นที่ไม่เป็นอันตรายแก่เซลล์และขับออกจากร่างกายโดยระบบขับถ่ายเมื่อนำยีสต์มาเลี้ยงในน้ำตาลจะได้เอทานอลถึงแม้เอทานอลจะเป็นพิษต่อยีสต์ก็ตาม การหมักนั้นจะไม่ให้อากาศเข้าสู่ภาชนะที่ใช้หมักและให้อาหารยีสต์อย่างเพียงพอจะเกิดสมการดังนี้



แต่ถ้าอากาศเข้าสู่ภาชนะที่ใช้หมักจะทำให้ยีสต์หายใจแบบใช้ออกซิเจนเกิดสมการดังนี้



เอทานอลที่ได้จะมีพลังงานศักย์สะสมอยู่เพราะสามารถติดไฟได้ จึงกล่าวได้ว่าเป็นการสลายของอาหารที่ไม่สมบูรณ์ ส่วนสมการที่ใช้ O_2 ไม่เหลือพลังงานอยู่ในส่วนของคาร์บอนไดออกไซด์



รูปที่ 2.15 กระบวนการหมักเอทานอล

ที่มา : <http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/BIOBK/BioBookGlyc.html>

ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภทเซลลูโลสเป็นจำนวนมาก ดังนั้นหากนำเศษวัสดุดังกล่าวมาเปลี่ยนเป็นเอทานอลจะทำการเพิ่มมูลค่า ตลอดจนเป็นพลังงานทดแทนอีกแหล่งหนึ่งได้ ชาวอ้อยสามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้จากกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ต่อจากนั้นกลูโคสจะถูกเปลี่ยนให้เป็นเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากยีสต์ การย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลทำได้สองวิธีโดยกระบวนการเคมีและกระบวนการของเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการทางเคมีจะใช้ปฏิกิริยาที่รุนแรงเนื่องจากใช้กรดในการย่อยสลายทำให้ได้ผลผลิตบางอย่างเกิดขึ้นส่งผลให้เกิดสารพิษต่อยีสต์และทำให้กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพต่ำนอกจากนั้นยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการย่อยสลายอ้อยโดยใช้กระบวนการทางเอนไซม์จะมีข้อเด่นกว่าการใช้เคมีเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่รุนแรง ควบคุมได้ และไม่มีพิษต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตาม สิ่งที่น่าสนใจ

ในการหาแหล่งพลังงานทดแทนใหม่ โดยเอทานอล คือ แหล่งพลังงานทดแทนที่ได้มาจากกระบวนการหมักน้ำตาล ซึ่งในประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการนำเอทานอลไปใช้เป็นส่วนประกอบของน้ำมันเบนซิน ซึ่งน้ำมันเบนซินนี้จะมีปริมาณของเอทานอลสูงถึง 10% โดยปริมาตร และภาคการขนส่งของประเทศสหรัฐอเมริกาในปัจจุบันมีการใช้ เอทานอลถึง 4540 ล้านลิตรต่อปี (Wang และคณะ 1999)



รูปที่ 2.16 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ที่มา: <http://kanchanapisek.or.th/oncc-cgi/text.cgi?no=12129>
<http://www.thairath.co.th/media/content/2012/04/04/250619/o4/420.jpg>

เอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่เกิดจากการหมักพืช เศษซากพืชเพื่อเปลี่ยนแป้งจากพืชให้เป็นน้ำตาล แล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์อีกครั้ง แอลกอฮอล์ที่ทำให้บริสุทธิ์ 95% จะเรียกว่าเอทานอล เมื่อนำไปใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินเรียกว่าแก๊สโซฮอล์ ถ้าผสมกับน้ำมันดีเซลเรียกว่าดีโซฮอล์ สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ พืชสะสมพลังงานจากดวงอาทิตย์ในรูปพลังงานเคมีของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ในเนื้อเยื่อพืชที่เราเรียก ง่ายๆ ว่าไบโอแมส นั้นประกอบด้วยส่วนสำคัญคือเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน เซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลซึ่งต่อกันเป็นสายยาว ถ้าเราตัดเซลลูโลสออกเป็นแต่ละยูนิตของน้ำตาลเราก็จะได้น้ำตาลสามารถนำมาหมักด้วยยีสต์เพื่อผลิตเป็นแอลกอฮอล์ได้ การตัดเซลลูโลสอาจตัดด้วยกรดหรือเอนไซม์ แต่เนื่องจากพืชมีเฮมิเซลลูโลสและลิกนินด้วยจึงต้องทำให้เป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์เสียก่อน ซึ่งพืชแต่ละชนิดก็มีสัดส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินแตกต่างกัน การผลิตแอลกอฮอล์จากไบโอแมสคือต้องทำให้ขนาดของไบโอแมสเล็กลง แยกเอาเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออก ไปด้วยไอน้ำเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้ย่อยง่ายขึ้น ทำปฏิกิริยาของกรดหรือเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลแล้วหมักด้วยยีสต์จนได้แอลกอฮอล์

Haan และคณะ (2007) ได้วิเคราะห์กระบวนการผลิตเอทานอลจาก lignocellulose โดยใช้กระบวนการ Consolidated bioprocessing (CBP) แบบ one-step เพื่อลดขั้นตอนและต้นทุนของกระบวนการผลิต โดยการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ให้มีคุณสมบัติทั้งการย่อยสับสเตรทที่มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลสและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลให้รวมอยู่ด้วยกัน โคลนยีนที่สร้างเอนไซม์ Cellobiohydrolase (CBH) ของเชื้อรา (*Trichoderma reesei cbh1* และ *cbh2*, *Aspergillus niger cbhB* และ *Phanerochaete chrysosporium cbh1-4*) ให้มีการแสดงออกในยีสต์ พบว่าเอนไซม์ทั้งสี่ชนิด (CBH1, CBH2, CBHB และ CBH1-4) มีการแสดงออกและมีกิจกรรมของเอนไซม์ภายนอกเซลล์เหมือนกัน โดยจะเห็นว่าทั้ง recombinant CBHs และ native *Trichoderma reesei* CBH มีระดับการแสดงออกต่ำเหมือนกัน จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของ Cellobiohydrolase (CBH) CBH2 มีกิจกรรมสูงกว่า CBH1 CBHB CBH1-4 แต่เมื่อเทียบ recombinant CBHs กับ native *T. reesei* CBH กิจกรรมของเอนไซม์ไม่ได้แตกต่างกัน และ CBH2 มีกิจกรรมบน phosphoric acid swollen cellulose (PASC) สูงกว่า bacterial microcrystalline cellulose (BMCC) แต่กิจกรรมของ CBH1 บน PASC และ BMCC ไม่ต่างกัน ดังนั้นจึงนำ CBH1 ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ปริมาณโปรตีนที่ได้ 0.22 ± 0.17 กรัมต่อมิลลิลิตร และค่า specific activity คือ 0.22 ± 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่า Y294[REF] ที่ผสมกับ native CBH1 ที่มีค่า specific activity เท่ากับ 0.14 ± 0.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัม จากการทดลองทั้งหมดพบว่าระดับการแสดงออกของ Cellobiohydrolase (CBH) เท่ากับ native *Trichoderma reesei* CBH สุดท้ายสิ่งที่จะทำต่อคือเพิ่มระดับการแสดงออกใน *Saccharomyces cerevisiae* ต่อไป

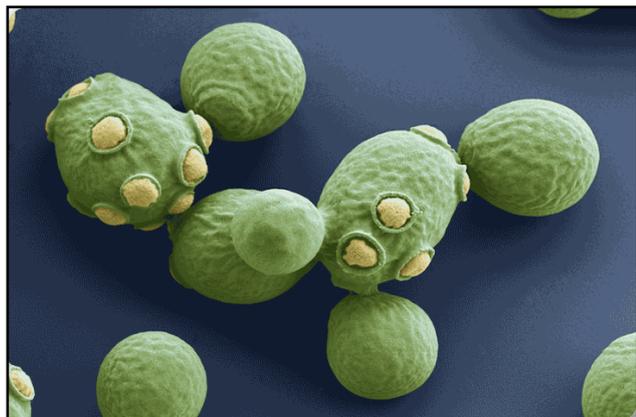
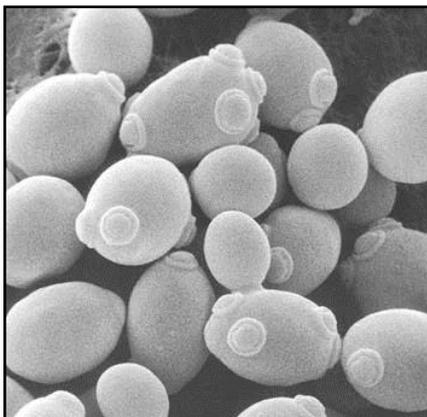
Mingjie และคณะ (2010) ตรวจสอบการผลิตเอทานอลโดยใช้ switchgrass (*Panicum virgatum*) เป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่ใช้เป็นสับสเตรท โดยกระบวนการเริ่มจากขั้นตอน Pretreatment ด้วย Ammonia Fiber Expansion (AFEX) และใช้ทั้งเอนไซม์ทางการค้า และ *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) ในการผลิตเอทานอล กระบวนการผลิตใช้มีสองวิธีคือ two-step Simultaneous saccharification และ co-fermentation (SSCF). แต่ละกระบวนการจะส่งเสริมการใช้ไซโลสซึ่งส่งผลให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ SSCF ดั้งเดิม SSCF ดั้งเดิมหลังจากย่อยความเข้มข้นของกลูโคสและไซโลสเป็น 30.7 และ 25.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากเติมยีสต์ความเข้มข้นของกลูโคสลดลง 1.3 กรัมต่อลิตร ใน 14 ชม. ความเข้มข้นสุดท้ายของไซโลสและเอทานอลประมาณ 25 กรัมต่อลิตร และ 22 กรัมต่อลิตร สำหรับกระบวนการ two step SSCF ความเข้มข้นของกลูโคสและไซโลสเป็น 8.1 และ 25.1 กรัมต่อลิตร หลังจาก 8 ชม. ของการ prehydrolysis. ในขั้นที่หนึ่งของวิธี SSCF ความเข้มข้นของกลูโคสและไซโลสลดลง 0.6 และ 18.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขั้นที่สองความเข้มข้นของไซโลสประมาณ 19 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นถึง 15 กรัมต่อลิตร ใน 36 ชม. อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของกลูโคสลดลงถึง 0.9 กรัมต่อลิตร ที่ 128 ชม. ความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 26.3 กรัมต่อลิตร

Badal และคณะ (2008) ทดลองการนำเปลือกข้าว (rice hulls) เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรมาพัฒนาเป็น feedstock เพื่อผลิตเอทานอล โดยย่อยเปลือกข้าวด้วย ปูนขาว (lime หรือ CaCO_3) 100 มิลลิกรัมต่อกรัมของเปลือกข้าว มีการปลดปล่อยน้ำตาลสูงสุดที่ 126 ± 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของเปลือกข้าว (กลูโคส 93 ± 1 มิลลิกรัม ไซโลส 27 ± 0 มิลลิกรัม อะราบินอส 6 ± 0 มิลลิกรัม) จากนั้นใช้เซลลูโลสไลติกเอนไซม์ปริมาณ 0.05 มิลลิตรต่อกรัมสับสเตรท ในสภาวะพีเอช 5 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเวลา 72 ชม. จากสภาวะการย่อยด้วยเอนไซม์ที่พีเอช 5 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณของเอนไซม์ 3 ชนิดที่ 0.15 มิลลิตรต่อกรัมสับสเตรท ให้น้ำตาลสูงสุด 154 ± 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของเปลือก

ข้าว จากนั้นตัวอย่างน้ำตาลที่ได้ในขั้นตอน enzymatic saccharification นำเข้าสู่กระบวนการหมักโดยใช้ recombinant *E. coli* สายพันธุ์ FBR5 ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล กระบวนการหมักมี 2 ระบบ คือ separate hydrolysis and fermentation (SHF) และ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) จากการทดลองพบว่า ระบบ SHF ได้ความเข้มข้นของเอทานอล 9.8 ± 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุดที่ A 660 นาโนเมตร ถึง 6.5 ± 0.5 ในเวลา 19 ชม. ส่วนในระบบ SSF ความเข้มข้นของเอทานอล 11.0 ± 1.0 กรัมต่อลิตรที่เวลา 53 ชม.

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับยีสต์

ยีสต์ หรือ ส่าเหล้า (อังกฤษ: yeast) คือ รากลุ่มหนึ่งที่มีส่วนใหญเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รี สามเหลี่ยม รูปร่างแบบมะนาว ฝรั่งเศส เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ มีน้อยชนิดที่เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งเซลล์แบบพิสซันหรือวิธีอื่นๆ มีทั้งชนิดที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ ที่เรียกว่าแอสโคไมซีตัสยีสต์ และชนิดที่สร้างแบสิดิโอสปอร์ ที่เรียกว่า แบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ ยีสต์มีความสัมพันธ์กับพืชหรือสัตว์ที่มีชีวิตหรือสารอินทรีย์ที่ได้จากพืชและสัตว์ที่ตายแล้ว โดยยีสต์สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างหลากหลาย เช่น น้ำตาล กรดอินทรีย์ กรดไขมัน ไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ และพอลิเมอร์หลายชนิด มีบางชนิดที่เป็นโรคทำให้เกิดโรคพืชและสัตว์ ยีสต์พบได้ทั่วไป ไปแบบไม่มีจำกัดในชีวมณฑล โดยในธรรมชาติแล้วยีสต์แต่ละชนิดมีแหล่งที่อยู่จำเพาะ ขึ้นอยู่กับลักษณะสรีรวิทยาของยีสต์ชนิดนั้น ๆ พบบนบก ในน้ำ รวมทั้งแหล่งที่อยู่ที่มีความรุนแรง เช่น มีความเค็มสูง และมีความเย็นจัด แหล่งที่อยู่ที่ยีสต์ชอบคือ พืช โดยพบทั้งที่ดอก ผล ใบ ลำต้น และยางไม้ แหล่งที่พบยีสต์อยู่บ่อยๆ คือแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน ยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ มักจะปนลงไปเป็นอาหาร เป็นเหตุให้อาหารเน่าเสียได้ และยีสต์เป็นราชนิดที่มีส่วนใหญมีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม รี สามเหลี่ยม รีและปลายด้านหนึ่งแหลม ทรงกระบอกที่มีปลายมน รูปร่างแบบมะนาวฝรั่งเศส รูปคนโทหรือพลาสติก ยาว เป็นเส้นสาย บางชนิดมีการสร้างเส้นใยเทียม บางชนิดสร้างเส้นใยแท้ ขนาดของเซลล์ยีสต์จะผันแปร บางชนิดมีความยาวของเซลล์ 2-3 ไมโครเมตร ขณะที่บางชนิดยาว 20-50 ไมโครเมตร ส่วนความกว้างผันแปรน้อยกว่า คือระหว่าง 1-10 ไมโครเมตร (สาวิตรี, 2549)



รูปที่ 2.17 รูปร่างของยีสต์

ที่มา: <http://www.microbiologyonline.org.uk/about-microbiology/introducing-microbes/fungi>

ประโยชน์จากยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มีมนุษย์นำมาใช้ เริ่มจากการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Boozah เมื่อประมาณ 7,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช ต่อมามีการใช้ยีสต์ในการผลิตไวน์เมื่อ 3,500 ปีก่อนคริสต์ศักราช เมื่อ 2,000 ปี ก่อนคริสต์ศักราชมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่าขนมปังที่ใช้ยีสต์ขึ้นฟูกว่าที่ไม่ได้ใช้อย่างชัดเจน จากนั้นเทคโนโลยีการผลิตเบียร์ ไวน์ และขนมปัง ถูกถ่ายทอดจากประเทศอียิปต์ไปยังประเทศกรีก และต่อไปยังโรมัน สำหรับทวีปเอเชียมีมาประมาณ 1,000 ปีก่อนคริสต์ศักราชมีรายงานในประเทศจีนเกี่ยวกับสุรากลั่น ต่อมาในศตวรรษที่ 12 การผลิตวิสกีเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก นอกจากนั้นในเอเชียมีการผลิตนํ้านมหมักที่เรียกว่า Kefyr และ Koumiss มาเป็นเวลาหลายศตวรรษ ปัจจุบันยีสต์ในผลิตภัณฑ์จากนมหมักมีการผลิตปริมาณมากอยู่ 4 ชนิด คือ เบียร์ ไวน์ ยีสต์ขนมปัง และโปรตีนเซลล์เดี่ยวและยีสต์อาหารสัตว์ และสามารถแบ่งกว้างๆ ได้เป็น

1. เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ และวิสกี
2. ผลิตภัณฑ์จากการหมัก เช่น เอทานอล และกลีเซอรอล
3. ผลิตภัณฑ์ในรูปของเซลล์ยีสต์ เช่น ยีสต์ขนมปัง ยีสต์อาหารคน และยีสต์อาหารสัตว์
4. ผลิตภัณฑ์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ เช่น วิตามินบี และวิตามินดี เอนไซม์

บทที่ 3 วัสดุและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. Spectrophotometer
2. Water bath
3. Incubator shaker
4. Autoclave
5. Microscope
6. Hot air oven
7. Laminar flow
8. pH meter
9. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
10. เต้าแก๊ส
11. micro centrifuge tube
12. Micropipette
13. Flask
14. Duran bottle
15. หลอดทดลอง
16. ลูกแก้ว

สารเคมี

1. Carboxymethyl cellulose

2. 3, 5-dinitrosalicylic acid
3. Na_2CO_3
4. Citric acid
5. Na_2HPO_4
6. pNPG
7. 0.004% (w/v) MUG (4-methylumbelliferyl- β -glucoside)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract –malt extract (YM) agar
2. carboxymethylcellulose agar (CMC agar)
3. Yeast extract peptone dextrose (YPD broth)
4. Yeast Nitrogen Base w/0 amino acids (YNB) agar plate
5. Minimum medium
6. Mendel's medium
7. Potato dextrose agar

บทที่ 4 วิธีดำเนินงานวิจัย

4.1 การคัดเลือกยีสต์และราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์

4.1.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง

รวบรวมเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิต คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และ ปีต้ากลูโคซิเดส จากจังหวัดขอนแก่นและจังหวัดชัยภูมิ ที่มีการคัดแยกได้แล้ว

เตรียมกล้าเชื้อโดยนำเชื้อยีสต์จาก YM agar slant มา streak ลงบนอาหาร YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 จากนั้น point inoculation ลงบนอาหาร YM agar plate ที่มี 1% Carboxymethyl cellulose (CMC) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยการวาด congo red ให้ทั่วบริเวณบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้ออยู่ โดยยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้จะสังเกตเห็นโซนใส (clear zone) รอบโคโลนี และบันทึกผล

ส่วนการทดสอบเชื้อราจะใช้อาหาร Mineral medium แทน อาหาร YM โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเชื้อราจากตัวอย่างดินและเศษใบไม้ จากจังหวัดชัยภูมิ เพื่อนำมาแยกหาเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและปีต้ากลูโคซิเดส นำเชื้อราที่เก็บรักษาไว้ใน PDA slant มาทำ Point inoculation ลงบนอาหาร Mineral medium ที่มีส่วนผสมของ 1% Carboxymethyl cellulose (CMC) แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-7 วัน จากนั้นวาดด้วย congo red solution เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เลือกเชื้อราที่เกิดเป็นบริเวณใสรอบๆ โคโลนีและบันทึกผล

4.1.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (ดัดแปลงจาก White et al., 1996)

นำเชื้อมาจาก YM agar slant stock มา streak บนอาหาร YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้น point inoculation เชื้อลงบนอาหาร Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (YNB) agar plate ที่มี 0.004% (w/v) MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส โดยเชื้อที่สามารถเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส ได้จะเรืองแสงรอบโคโลนี เมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกผล

ส่วนการทดสอบเชื้อราจะใช้อาหาร Mineral medium แทน อาหาร YM นำเชื้อราที่เก็บรักษาไว้ใน PDA slant มาทำ point inoculation ลงบนอาหาร Mineral medium ที่มี 0.004%(w/v) MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside) แล้วนำ จานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส โดยเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสได้นั้นจะสังเกตเห็นจากรอบๆโคโลนีของเชื้อจะเรืองแสงเมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

4.2 การผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหาร

4.2.1 การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและปีต้ากลูโคซิเดสในอาหารเหลวสำหรับยีสต์

นำยีสต์ที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 30° C เป็นเวลา 24-48

ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์มา 1 loop full เติมลงใน flask ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร YPD broth (yeast extract 10 กรัม, peptone 20 กรัม และ glucose 10 กรัม น้ำ 1 ลิตร พีเอช 5) 50 ml, pH 5.0 บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง วัดปริมาณเซลล์โดยใช้ hemacytometer (10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปิเปตเชื้อยีสต์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงใน flask ที่มีอาหาร YPD broth อยู่ 50 มิลลิลิตร, pH 5.0 บ่มแบบเขย่าที่ 150 rpm , อุณหภูมิ 30° C จากนั้นเก็บเชื้อ 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสเก็บใส่ micro centrifuge tube อันใหม่ และเติม 0.5 M citrate phosphate buffer , pH 5.0 ลงในตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นล้างเซลล์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เท buffer ทิ้งแล้วเติมกลับ 1 ml เท่าเดิม เก็บส่วนใสที่ -20° C เก็บตะกอนเซลล์ที่ 4°C เพื่อใช้สำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

4.2.2 การผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ในอาหารเหลวสำหรับรา

นำราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำเชื้อราสายพันธุ์ *Penicillium oxalicum* HS1-3 ที่เก็บรักษาไว้ใน PDA slant ย้ายลงใน PDA slant หลอดใหม่ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นนำเชื้อรามาทำ Spore suspension โดยให้มีจำนวนสปอร์ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนำ spore suspension ถ่ายลงในอาหาร Mendel (urea 0.3 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, CaCl_2 0.3 g/L, MgSO_4 0.3 g/L, yeast extract 0.25 g/L, peptone 0.75 g/L) ที่ผสมเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย แกลบ เป็นต้น เป็นการเพาะเลี้ยงในสภาพที่เป็น solid state ในถุงพลาสติกชนิดถุงร้อนขนาด 9x14 นิ้ว ปากถุงครอบด้วยกระดาษแข็งรูปทรงกระบอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร เพื่อบังคับขนาดของปากถุง และปิดปากถุงด้วยจุกสาลีโดยสวมตรงบริเวณที่ครอบไว้ด้วยกระดาษแข็ง ทั้งนี้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนหลังจากการฆ่าเชื้อแล้ว (Lotong และ Suwanarit, 1983) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เก็บเชื้อทุกวันที่ 1, 3, 5, และ 7 วัน เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ แยกราออกจากอาหารโดยการเซนตริฟิวก์ นำส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์

4.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลสด้วยการวัดปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller และคณะ (1959) เตรียมตัวอย่างเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเจือจางด้วย 0.05 M citate phosphate buffer pH 5 และเตรียมสับสเตรต คือ สารละลาย Carboxymethyl cellulose ร้อยละ 1 ละลายใน 0.05 M citate phosphate buffer pH 5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองและนำไปบ่มในอ่างน้ำร้อน 45°C เพื่อให้สารละลายในหลอดทดลองมีอุณหภูมิเป็น 45°C จากนั้นจึงเติมสารตัวอย่างเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ลงในหลอดทดลองที่มีสับสเตรตอยู่ แล้วเขย่าให้เข้ากันทันที และบ่มต่อเป็นเวลา 30 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วจึงนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที จากนั้นจึงทำให้สารละลายเย็นทันทีโดยนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งแล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดทดลอง 10 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูโคสเพื่อคำนวณหาน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น ซึ่งจะช่วยให้ทราบค่ากิจกรรมเอนไซม์

1 หน่วยของเอนไซม์ (U) หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาย่อยสลาย สับสเตรต (Carboxymethylcellulose Filter paper และ Microcrystalline cellulose) ได้เป็นน้ำตาล ริตวิซ 1 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส เตรียมตัวอย่างเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น ที่เหมาะสม โดยเจือจางด้วย 0.05 M citate phosphate buffer pH 5 และปิเปตสับสเตรตคือ สารละลาย 0.002 mM pNPG (para-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside) 0.2 มิลลิลิตร ใส่ใน หลอดทดลองและนำไปบ่มในอ่างน้ำร้อน 30°C จากนั้นจึงเติมสารตัวอย่างเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ ลงในหลอดทดลองที่มีสับสเตรตอยู่ แล้วเขย่าให้เข้ากันทันที และบ่มต่อเป็นเวลา 30 นาที จึงหยุดปฏิกิริยา ด้วยสารละลาย 0.25 M Na₂CO₃ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของ สารละลายมาตรฐาน p – nitrophenol (pNP) เพื่อคำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์

1 หน่วยของเอนไซม์ (U) หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสับสเตรต pNPG และเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ p – nitrophenol (pNP) 1 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ในเวลา 1 นาที ภายใต้ สภาวะที่กำหนด

4.4 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายวัสดุบิทางการเกษตรโดยใช้กระบวนการทางเอนไซม์ และเคมี

นำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ และบั่นให้ละเอียด จากนั้นเริ่มขั้นตอนการ pretreatment ด้วยกรดซัลฟูริก (H₂SO₄) ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ในอัตราส่วน 1:10 และใช้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ศึกษาปริมาณน้ำตาลที่ได้และนำวัสดุเหลือทิ้ง ทางการเกษตรที่ผ่านการ pretreatment แล้วใช้เป็นแหล่งคาร์บอนใน 0.05 M citate phosphate buffer pH 5 นำเชื้อยีสต์มาเลี้ยงใน YPD agar (yeast extract peptone dextrose) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 2-3 วัน จากนั้นย้ายเชื้อมา 1 loop full ใส่ใน YPD broth (yeast extract peptone dextrose) ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นับจำนวนเซลล์เริ่มต้นให้ได้ 10⁸ เซลล์ ต่อมิลลิลิตร ปิเปตเชื้อยีสต์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงใน flask ที่มีอาหาร YPD broth อยู่ 50 มิลลิลิตร, pH 5.0 บ่มแบบเขย่าที่ 150 rpm , อุณหภูมิ 30° C เพื่อผลิตเอนไซม์ หรือเพาะเลี้ยงราเพื่อผลิตเอนไซม์ ในอาหารที่เหมาะสม จากนั้นเติมลงในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ผ่านการ pretreatment แล้วเพื่อ ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้ง เก็บตัวอย่าง วิเคราะห์การเจริญ กิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลส บีต้ากลูโคซิเดส และศึกษาปริมาณน้ำตาลที่ได้ เพื่อนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้ในขั้นตอนของการบวนการ หมักเอทานอลต่อไป

4.5 ศึกษาการผลิตเอทานอลจากยีสต์โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งอาหาร

เลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* ใน YPD agar (yeast extract peptone dextrose) บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 2-3 วัน จากนั้นย้ายเชื้อมา 1 loop full ใส่ใน YPD broth (yeast extract peptone dextrose) ในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นับจำนวนเซลล์เริ่มต้นให้ได้ 10⁸ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

นำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ และบดให้ละเอียด จากนั้น pretreatment ด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ในอัตราส่วน 1:10 และใช้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงวัดปริมาณน้ำตาล จากนั้นเลือก pretreatment ด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นที่เหมาะสม ศึกษาน้ำตาลที่ได้

การผลิตเอทานอลจะนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ผ่านการ pretreatment ด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปรับพีเอช 5 แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง นำส่วนที่เป็นของเหลวเก็บไว้ ส่วนที่เป็นของแข็งนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นใช้เป็นสับสเตรต 10% ใน 0.05M CP buffer พีเอช 5 ของเอนไซม์เซลลูเลส ปีตากลูโคซิเดส อย่างละ 10 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาส่วนใส และเติมใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ใน YP medium พีเอช 5 เติมยีสต์ 10 เปอร์เซ็นต์ inoculum size ที่ผ่านการบ่มแล้วที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง จากนั้น บ่มแบบเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และนำมาตั้งไว้โดยไม่เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 15 วัน เก็บตัวอย่าง 1, 3, 5, 7, 10, 15 วัน และวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ และวิเคราะห์เอทานอลโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี

บทที่ 5

ผลการทดลอง

5.1 การคัดเลือกยีสต์และราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์

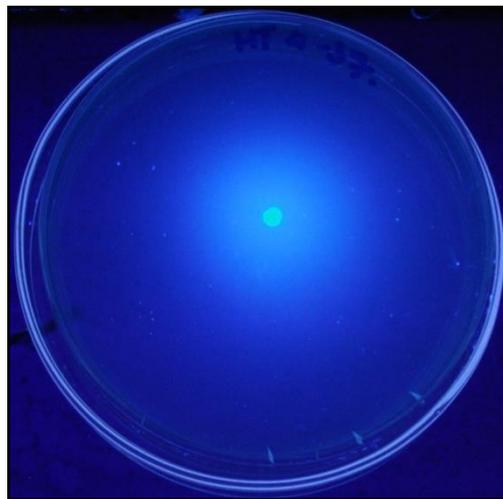
5.1.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและปีตากลูโคซิเดสจากบนอาหารแข็ง

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ในอาหารแข็ง CMC เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ราวด้วย congo red ที่ทิ้งไว้ 15 นาที สังเกตดูโซนใสที่เกิดขึ้น โดยที่ congo red จะติดกับโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นสับสเตรต คือ carboxymethyl cellulose แล้วจะเห็นเป็นสีแดงของ congo red ถ้าหากยีสต์ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสซึ่งจะสามารถย่อยสับสเตรตได้ เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ ทำให้ congo red ไม่สามารถติดกับสับสเตรตได้ จึงเห็นเป็นโซนใส จากการทดสอบพบว่าเชื้อเกิดโซนใส 10 สายพันธุ์ คือ *Torulasporea* sp.PM34 (New sp.), *Candida* sp.PM47(New sp.), *Candida fructus* PM05, *Candida* sp. FW10 (New sp.), *Kluyveromyces africanus* S2-1-2, *Candida tropicalis* S1-1, *Candida orthopsilosis* 109-1, *Candida orthopsilosis* 214-1, *Candida* sp. F5-1 (New sp.), 201-2, 203-1 และ *Pichia fabianii* 204-1



รูปที่ 5.1 การสร้างเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสบนอาหารแข็งของเชื้อ *C. tropicalis* S1-1

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ บีต้ากลูโคซิเดส บนอาหารแข็ง YNB ที่มี 0.004%(w/v) MUG(4-methylumbelliferyl- β -glucoside) ที่ 24 – 48 ชม. สังเกตการณ์เรืองแสงเมื่อส่องภายใต้แสง UV โดย MUG จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ บีต้ากลูโคซิเดส ได้เป็น 4-methylumbelliferone ซึ่งเป็นสารเรืองแสง จากการส่องภายใต้แสงยูวี พบเชื้อ 3 สายพันธุ์ที่เกิดการเรืองแสง คือ *Wickerhamomyces* sp. HT4-37 (sister sp.), *Candida* sp. HFr2-24 (sister sp.), *Candida natalensis* HS1-26 และ *Candida tropicalis* S1-1



รูปที่ 5.2 การสร้างเอนไซม์ บีต้ากลูโคซิเดส บนอาหารแข็ง YNB ของเชื้อ *C. tropicalis* S1-1

จากการคัดเลือกยีสต์จากธรรมชาติ ได้ ยีสต์ไอโซเลต 204-1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิล เมทิลเซลลูเลส และยีสต์ไอโซเลต S1-1 สามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูง เมื่อจัดจำแนกประเภท ยีสต์โดยเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของยีสต์ พบว่าไอโซเลต 204-1 มีความเหมือน 100%

เมื่อเทียบกับเชื้อ *Pichia fabianii* และไอโซเลต S1-1 มีความเหมือน 100% เมื่อเทียบกับเชื้อ *C. glabrata*

วิเชียร และคณะ (2538) ได้ศึกษาการคัดแยกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจากตัวอย่างดินและน้ำบริเวณที่มีการเน่าเปื่อยของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ดินบริเวณนาข้าว ดินไร่ข้าวโพด ดินไร่อ้อย ดินในป่า และน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ รวมจำนวน 55 ตัวอย่าง ได้ยีสต์ 105 ไอโซเลต และเมื่อนำมาคัดเลือดยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตไซลิทอลซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ของไซโลสที่มีความหวานใกล้เคียงกับซูโครส ร่วมกับยีสต์ที่ใช้ไซโลสได้ที่เก็บรวบรวมอยู่ที่มหาวิทยาลัยอิโรซิม่า ประเทศญี่ปุ่น 15 สายพันธุ์ โดยใช้การเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีไซโลสและตรวจการสร้างไซลิทอลโดยการเกิดสีหลังจากเกิดปฏิกิริยาเคมีของ ไซลิทอล พบว่า *Candida* sp. WT52 มีประสิทธิภาพสูงสุด

Swangkeaw และคณะ (2008) รายงานการผลิต extracellular beta-glucosidase จากเชื้อ *Pichia anomala* MDD24 พบว่าที่พีเอช 5-7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150-200 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต β -glucosidase เมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย 50% (V/V) acetone และนำมาศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีแอลกอฮอล์ (4-20% V/V)

จากการศึกษาการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยราที่สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 65 ไอโซเลต พบรา 25 ไอโซเลต ที่สามารถย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ผสมในอาหาร Mineral medium ได้ (ตารางที่ 1) ซึ่งสังเกตได้จากโซนใสที่เกิดขึ้นรอบๆ โคลนีย์ หลังจากการราด congo red ทิ้งไว้ 15 นาที โดยที่ congo red จะดูดซับกับโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นสับสเตรท คือ carboxymethyl cellulose แล้วเห็นเป็นสีแดง ของ congo red หากมีการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ซึ่งจะสามารถย่อยสับสเตรทได้ ทำให้ congo red ไม่สามารถดูดซับกับสับสเตรท จึงเห็นเป็นโซนใส และผลการผลิตเอนไซม์ จากราที่แยกได้ 65 ไอโซเลต ตรวจพบราจำนวน 25 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งได้ (รูปที่ 5.3)



รูปที่ 5.3 ราไอโซเลต HS1-3 ที่ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ตรวจสอบโดยราดด้วย congo red

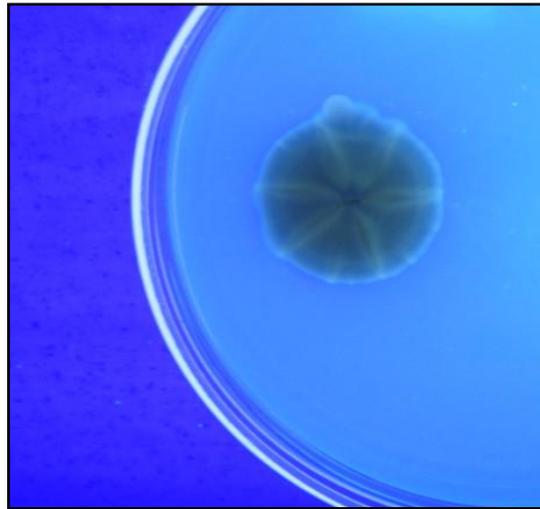
ตารางที่ 5.1 ราไอโซเลตที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง

Isolate	Clear zone (mm)	Isolate	Clear zone (mm)	Isolate	Clear zone (mm)
HS1-1	-	HS2-4	2	HS3-8	3
HS1-2	-	HS2-5	17	HS3-9	10
HS1-3	21	HS2-6	-	HS3-10	-
HS1-4	4	HS2-7	-	HS3-11	-
HS1-5	43	HS2-8	-	HS3-12	-

ตารางที่ 5.1 ราไอโซเลตที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง (ต่อ)

Isolate	Clear zone (mm)	Isolate	Clear zone (mm)	Isolate	Clear zone (mm)
HS1-6	10	HS2-9	10	HS3-13	-
HS1-7	32	HS2-10	-	HS3-14	-
HS1-8	-	HS2-11	-	HS3-15	-
HS1-9	-	HS2-12	7	HS3-16	-
HS1-10	-	HS2-13	10	HS3-17	-
HS1-11	10	HS2-14	-	HS3-18	-
HS1-12	40	HS2-15	5	HS3-19	-
HS1-13	-	HS2-16	-	HS3-20	5
HS1-14	-	HS2-17	1	HS3-21	-
HS1-15	6	HS2-18	10	HS3-22	1
HS1-16	-	HS3-1	-	HS3-23	10
HS1-17	-	HS3-2	-	HS3-24	-
HS1-18	2	HS3-3	-	HS3-25	2
HS1-19	-	HS3-4	-	HS3-26	11
HS2-1	-	HS3-5	-	HS3-27	-
HS2-2	-	HS3-6	-	HS3-28	1
HS2-3	-	HS3-7	-		

จากการศึกษาการสร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสที่ดัดแปลงวิธีจาก White และคณะ, 1996 โดยราที่สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 65 ไอโซเลต พบราเพียง 2 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยราที่สามารถผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสได้จะสามารถย่อยสลาย 0.004% (w/v) MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside) ที่ผสมในอาหาร Mineral medium เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส จะได้เป็น สาร 4-methylumbelliferone ซึ่งเป็นสารเรืองแสง เมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตจะพบการเรืองแสงรอบๆ โคลนีย์ของเชื้อราได้ (รูปที่ 5.4)



รูปที่ 5.4 ราไอโซเลต HS1-3 ที่ผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ตรวจสอบโดยส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

ตารางที่ 5.2 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสบนอาหารแข็ง

Isolate	Visualize zone (mm)	Isolate	Visualize zone (mm)	Isolate	Visualize zone (mm)
HS1-1	-	HS2-5	-	HS3-10	-
HS1-2	-	HS2-6	-	HS3-11	-
HS1-3	2	HS2-7	-	HS3-12	-
HS1-4	-	HS2-8	-	HS3-13	-
HS1-5	2	HS2-9	-	HS3-14	-
HS1-6	-	HS2-10	-	HS3-15	-
HS1-7	-	HS2-12	-	HS3-16	-
HS1-8	-	HS2-13	-	HS3-17	-

HS1-9	-	HS2-14	-	HS3-18	-
HS1-10	-	HS2-15	-	HS3-19	-
HS1-11	-	HS2-16	-	HS3-20	-
HS1-12	-	HS2-17	-	HS3-21	-
HS1-13	-	HS2-18	-	HS3-22	-
HS1-14	-	HS3-1	-	HS3-23	-

ตารางที่ 5.2 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสบนอาหารแข็ง (ต่อ)

Isolate	Visualize zone (mm)	Isolate	Visualize zone (mm)	Isolate	Visualize zone (mm)
HS1-15	-	HS3-2	-	HS3-24	-
HS1-16	-	HS3-3	-	HS3-25	-
HS1-17	-	HS3-4	-	HS3-26	-
HS1-18	-	HS3-5	-	HS3-27	-
HS1-19	-	HS3-6	-	HS3-28	-
HS2-1	-	HS3-7	-	HS2-5	-
HS2-2	-	HS3-8	-	HS2-6	-
HS2-3	-	HS3-9	-	HS2-7	-
HS2-4	-				

เอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสจาก *P. citrinum* YS40-5 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนเป็น rice bran แต่ไม่พบกิจกรรมเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสเมื่อเพาะเลี้ยงในชานอ้อย (Ng และคณะ, 2010) แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งฟางข้าว รำข้าวสาลีและชานอ้อยยังคงเป็นแหล่งของสับสเตรตที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล (Sukumaran และคณะ, 2009; Lever และคณะ, 2010).

Ng และคณะ (2010) รายงานการทนอุณหภูมิสูงของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสสามารถเกิดกิจกรรมได้ที่ 30 ถึง 50°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิต ($T_{1/2}$) ที่ 60°C 1 ชั่วโมง โดยค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสจาก *P. citrinum* YS40-5 อยู่ที่ 58°C เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง และมีค่ากิจกรรมสูงสุดร้อยละ 75 ที่ 60°C เป็นเวลา 10 นาที และเอนไซม์นี้จะไม่สามารถเกิดกิจกรรมเอนไซม์เมื่อต้มที่ 70°C เป็นเวลา 10 นาที

ความสามารถของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสในการทนต่อค่าพีเอชจาก *P. citrinum* YS40-5 สามารถทนได้ที่ช่วง 3.0 ถึง 8.0 ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าร้อยละ 85 (Ng และคณะ, 2010).

เอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสทางการค้าจาก *A. niger* ถูกยับยั้งโดยกลูโคส (Barbagallo และคณะ, 2004; Swangkeaw และคณะ, 2009). Moreover, the catalyzed reactions from *Pichia anomala*

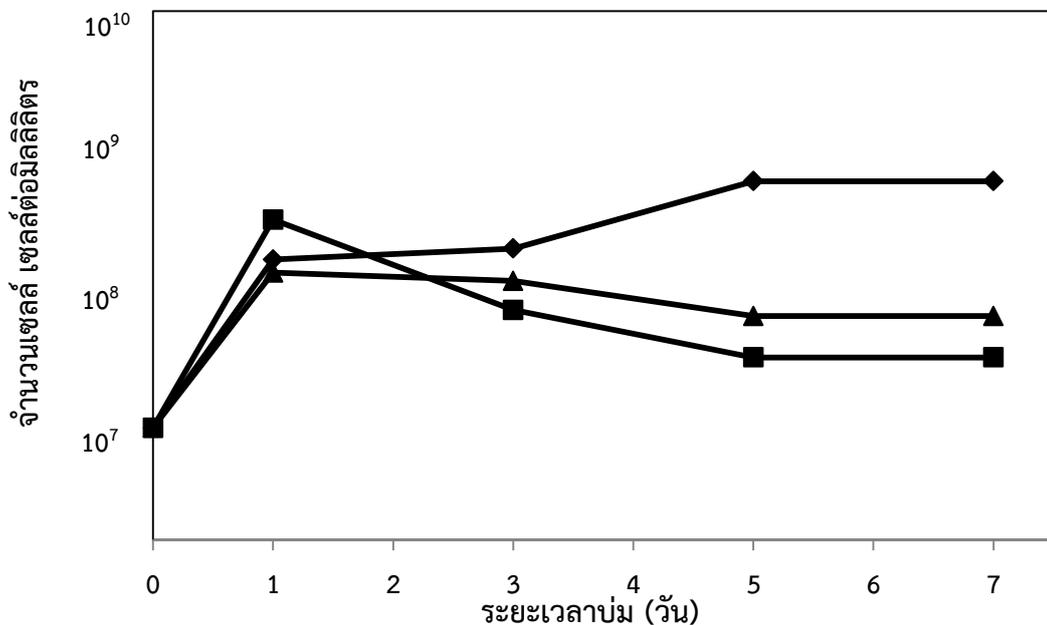
AL112 (Spagna et al., 2002), *Debaryomyces vanriijiae* (Belancic และคณะ, 2003) and *Candida peltata* NRRL Y-6888 (Saha and Bothast, 1996) β -glucosidases are inhibited by glucose.

จากการทดลอง ราไฮโซเลต HS1-3 มีความสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้สูงสุดบนอาหาร PDA และมีความสามารถสร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสได้สูงสุดเช่นกัน จึงคัดเลือกรา HS1-3 เพื่อนำมาศึกษา กิจกรรมของเอนไซม์ในขั้นต่อไป

5.2 การผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหาร

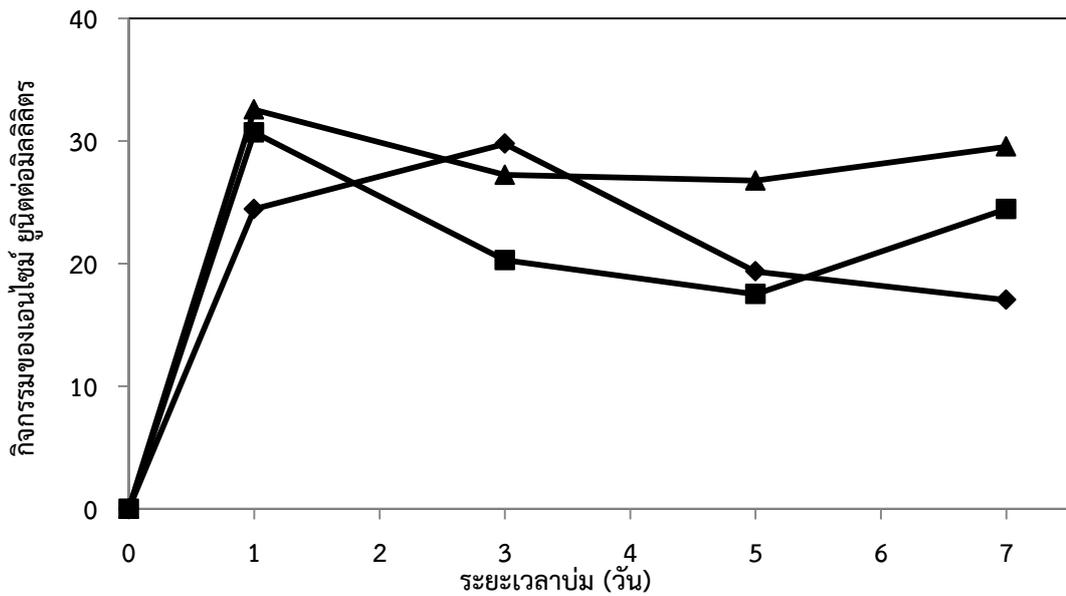
5.2.1 การผลิตเอนไซม์เซลลูโลสไลติกเอนไซม์ ในอาหารเหลวสำหรับยีสต์

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ในอาหารเหลว สำหรับเชื้อ *Pichia fabianii* 204-1 พบว่า *P. fabianii* 204-1 สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเจริญสูงสุดในวันที่ 7 โดยมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10.85×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มี ชานอ้อย ฟางข้าว และ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ (รูปที่ 5.5)

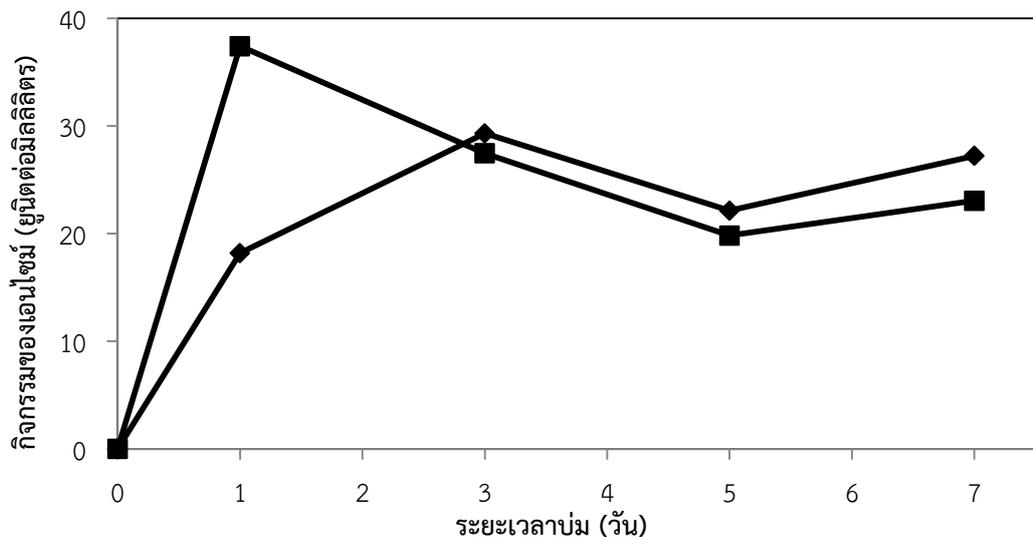


รูปที่ 5.5 จำนวนเซลล์ของ *Pichia fabianii* 204-1 ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน (■ CMC, ▲ ชานอ้อย, ◆ YPD)

เมื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ *P. fabianii* 204-1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส จาก Extracellular enzyme พบว่า เมื่อใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เป็นชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอนไซม์ เชื้อ *P. fabianii* 204-1 สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือ 32.55 U/ml และอาหารที่มี CMC และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมาตามลำดับ (รูปที่ 5.6) และจากรูปที่ 5.7 เชื้อ *Pichia fabianii* 204-1 สามารถผลิตเอนไซม์ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส Whole cell assay ได้มากที่สุด เมื่อมี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งผลิตได้มากในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงคือเท่ากับ 37.41 U/ml และในสภาวะที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมน้อยลงมา



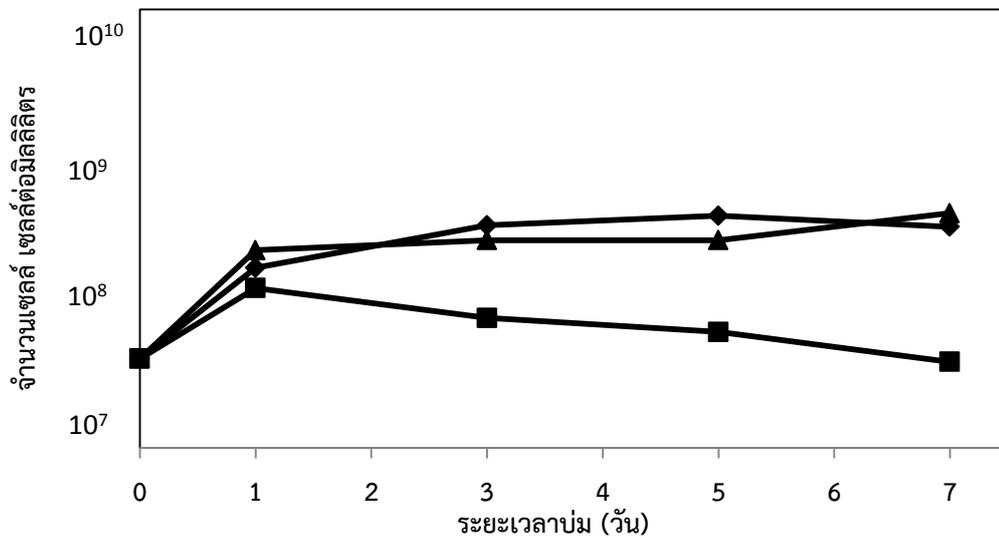
รูปที่ 5.6 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก extracellular enzyme ของ *P. fabianii* 204-1 (—◆— YPD, —■— CMC, —▲— ชานอ้อย)



รูปที่ 5.7 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ whole cell จากเชื้อ *Pichia fabianii* 204-1 (—◆— YPD, —■— CMC)

เมื่อศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญสำหรับเชื้อ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน คือ YPD, CMC และ ชานอ้อย เป็นส่วนผสมลงไปในอาหารเหลว และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Candida tropicalis* S1-1 เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยมีการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อ โดยการนับเซลล์ พบว่า เชื้อ *C. tropicalis* S1-1 สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มี ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเจริญสูงสุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และในอาหารที่มี กลูโคส และ CMC เป็นแหล่ง

คาร์บอน คือมีเซลล์ประมาณ 4.03×10^8 , 3.25×10^8 , 0.78×10^8 และ 0.38×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 5.8)



รูปที่ 5.8 จำนวนเซลล์ของ *Candida tropicalis* S1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน (◆ YPD, ■ CMC, ▲ ชานอ้อย)

จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสที่ผลิตโดยยีสต์ในอาหารเหลว โดยนำเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสทำปฏิกิริยากับสับสเตรตคือ สารละลาย 0.002 mM pNPG (para-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside) และวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นจึงนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน จึงจะสามารถทราบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสได้ โดยจากการทดลองพบว่า *Candida tropicalis* S1-1 สามารถผลิตเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสได้สูงสุดคือ 17.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์อื่นๆที่คัดแยกได้ (ตารางที่ 5.3)

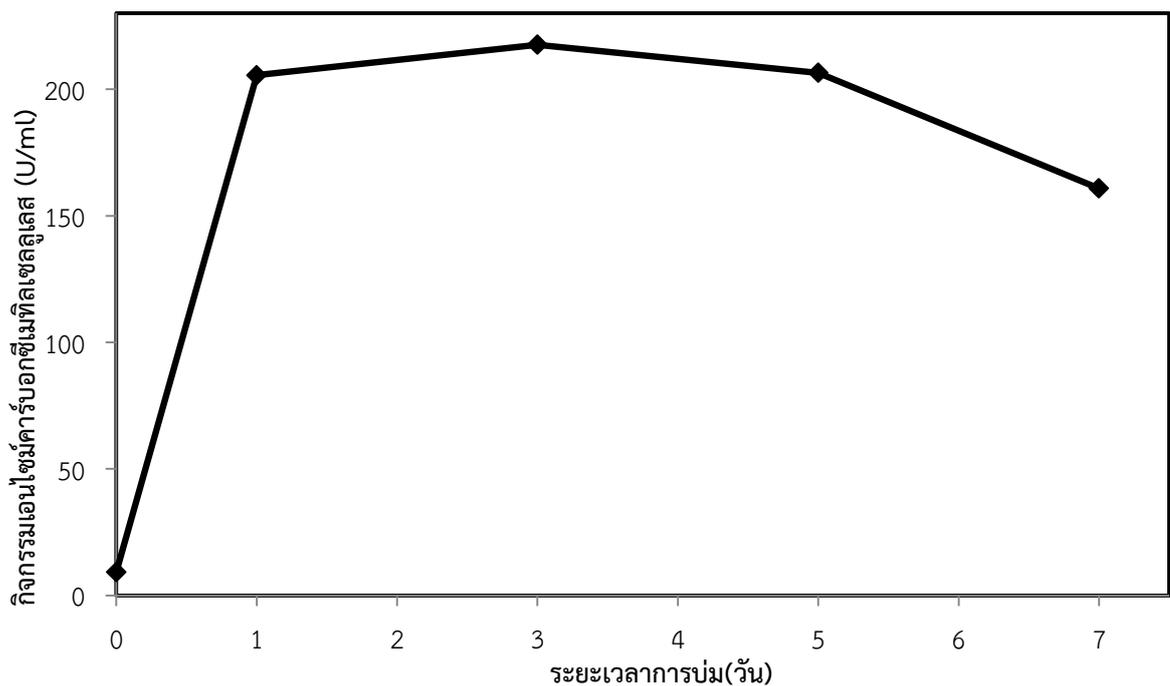
ตารางที่ 5.3 ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสโดยยีสต์ในอาหารเหลวเมื่อเลี้ยงเชื้อ

ไอโซเลต	กิจกรรมของเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
	Intracellular enzyme	Extracellular enzyme
S1-1	17.98	0.68
F14-2	4.73	0
F5-1	5.73	0.11
L3	9.48	0.09

5.2.2 การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและบีต้ากลูโคซิเดสในอาหารเหลวสำหรับรา

จากการคัดเลือกเชื้อราโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างดินและเศษใบไม้ จากจังหวัดชัยภูมิ สามารถแยกมาได้จำนวน 65 ไอโซเลต โดยสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและเอนไซม์ บีต้ากลูโคซิเดสได้สูงสุดจำนวน 1 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต HS1-3 เมื่อนำมาจัดจำแนกเชื้อราโดยใช้ ITS1-2 region sequencing พบว่าไอโซเลต HS1-3 มีความเหมือน 100% เมื่อเทียบกับเชื้อ *Penicillium oxalicum*

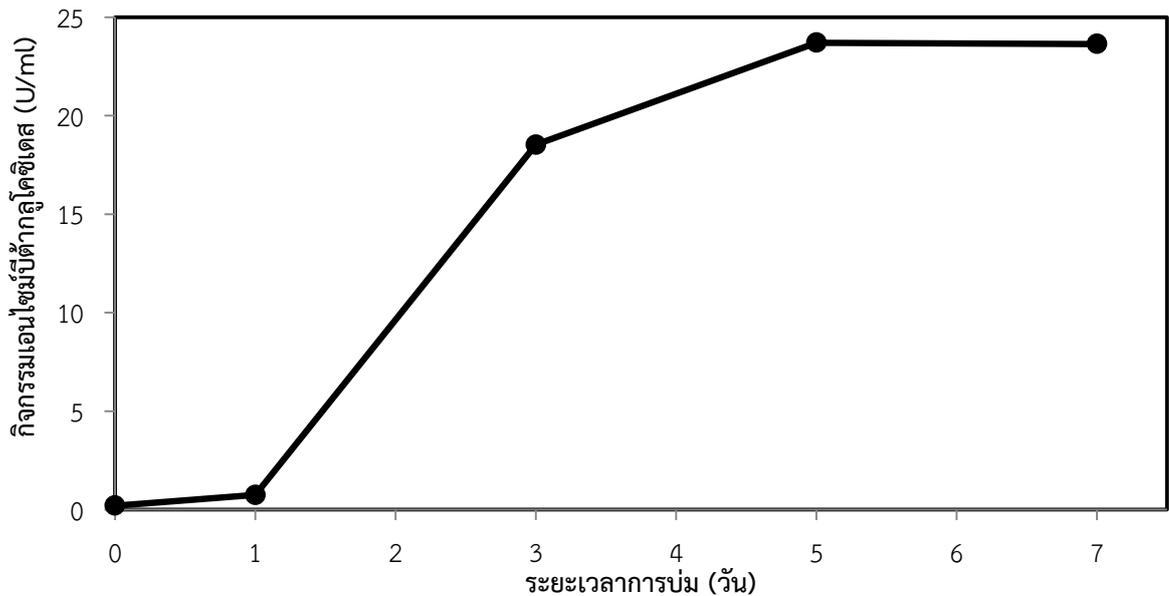
การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสด้วยการหาปริมาณ reducing sugar ด้วยวิธี DNS ตามวิธีของ Miller และคณะ (1959) โดยเตรียมตัวอย่างเอนไซม์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างเอนไซม์ทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นเตรียมเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมและทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรต คือ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูโคสเพื่อคำนวณหาน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น ซึ่งจะทำให้ทราบค่ากิจกรรมเอนไซม์ จากการทดลองจึงได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า ในวันที่ 3 ของระยะเวลาการบ่ม โดยรา *P. oxalicum* HS1-3 จะมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ 217.60 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และมีค่าลดลงเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน ดังรูปที่ 5.9



รูปที่ 5.9 การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสโดย *P. oxalicum* HS1-3

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสโดย *P. oxalicum* HS1-3 โดยเตรียมตัวอย่างเอนไซม์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งมีการเก็บตัวอย่างเอนไซม์ทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์สามารถทำได้โดยเตรียมตัวอย่างเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อทำปฏิกิริยากับ

สารละลายสับสเตรต คือ pNPG (para-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside) จากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.25 M Na_2CO_3 แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน p - nitrophenol (pNP) เพื่อคำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ จากการทดลองจึงพบว่า รา *P. oxalicum* HS1-3 สามารถผลิตเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสได้สูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลองซึ่งผลิตได้ 23.70 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และค่ากิจกรรมเอนไซม์จะเริ่มลดลงในวันที่ 7 ของระยะเวลาการบ่ม ดังรูปที่ 5.10

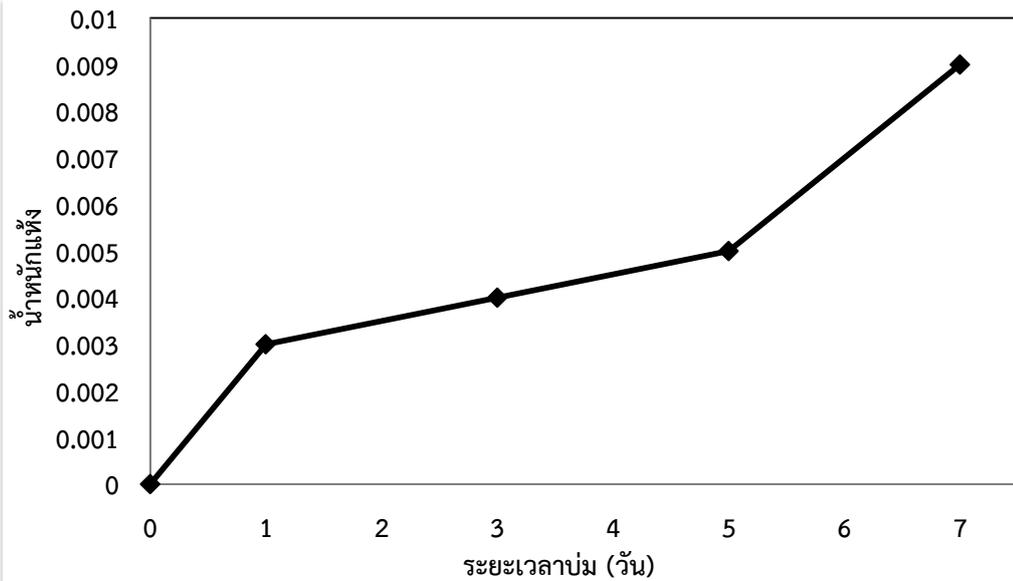


รูปที่ 5.10 การผลิตเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสโดย *P. oxalicum* HS1-3

การศึกษาการเจริญของเชื้อราทำโดยการหาน้ำหนักแห้งของรา โดยนำเชื้อราที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว mineral salt medium มากรองเพื่อแยกเอาส่วนของเส้นใยและสปอร์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนบนกระดาดกรองจะมีเส้นใยและสปอร์ของราอยู่ นำไปอบเพื่อหาน้ำหนักแห้ง โดยการอบแล้ววัดน้ำหนักแห้งในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 จากรูปที่ 5.11 จะเห็นได้ว่ารา *P. oxalicum* HS1-3 มีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นในแต่ละวันที่นำทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้ง โดยพบการเจริญระยะ log phase ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

การคัดเลือกรา *Penicillium* เพื่อการผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์พบรา *P. brasillianum* IBT 20888 มีกิจกรรมเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสสูงสุดที่ 1.2 U/mL เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 240 ชั่วโมง ในอาหารที่มีเซลลูโลส 20 กรัมต่อลิตร (Kristian และคณะ, 2004)

Sree และคณะ (1999) พบว่า การผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (VS3) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถทำงานได้ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงร่วมกับเชื้อ *Bacillus sp.* (VB9) ในกระบวนการหมักแบบ Solid Substrate Fermentation (SSF) ที่ใช้วัตถุดิบผสมระหว่างข้าวฟ่างและมันเทศจะสามารถผลิตเอทานอลได้ 5 กรัม/100 กรัมวัตถุดิบ และ 3.5 กรัม/100 กรัมวัตถุดิบ ที่อุณหภูมิในกระบวนการหมัก 37°C และ 42°C ตามลำดับ



รูปที่ 5.11 การเจริญของเชื้อราโดยการหาน้ำหนักแห้ง

ในการทดลองขั้นต่อไป จะศึกษาการผลิตเอนไซม์โดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางเกษตรมาเป็นแหล่งอาหาร เพื่อนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล

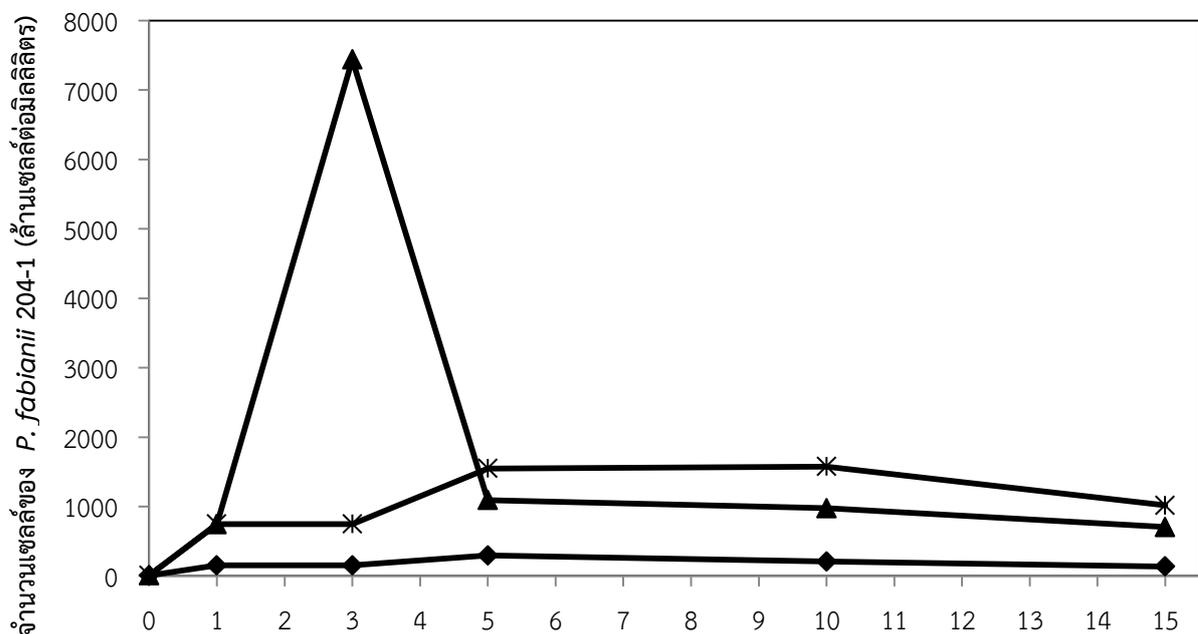
5.3 ศึกษาการผลิตเซลลูโลสไดกลูโคสจากเอนไซม์ โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหาร

5.3.1 การผลิตเซลลูโลสไดกลูโคสจากยีสต์โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลสโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหาร นำยีสต์ *P. fabianii* 204-1 ที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar ที่มีส่วนผสมของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย และ CMC ในความเข้มข้นที่ต่างกัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 15 วัน วัดการเจริญของยีสต์โดยการนับจำนวนเซลล์ยีสต์ พบว่าจำนวนเซลล์ของ *P. fabianii* 204-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็น ชานอ้อยที่ผสมในอาหารเหลวที่ความเข้มข้น 2% จะมีปริมาณเซลล์มากที่สุดในวันที่ 3 ของการบ่ม คือ 7440×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 5.4)

ตารางที่ 5.4 จำนวนเซลล์ของ *P. fabianii* 204-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และชานอ้อย

รหัสเชื้อ	วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15
204-1	2% carboxymethylcellulose	69×10^5	1520×10^5	152×10^6	296×10^6	2080×10^5	136×10^6
	2% ชานอ้อย	69×10^5	7440×10^5	7440×10^6	1092×10^6	976×10^6	704×10^6
	1% ชานอ้อย	69×10^5	7480×10^5	748×10^6	1548×10^6	1576×10^6	1016×10^6

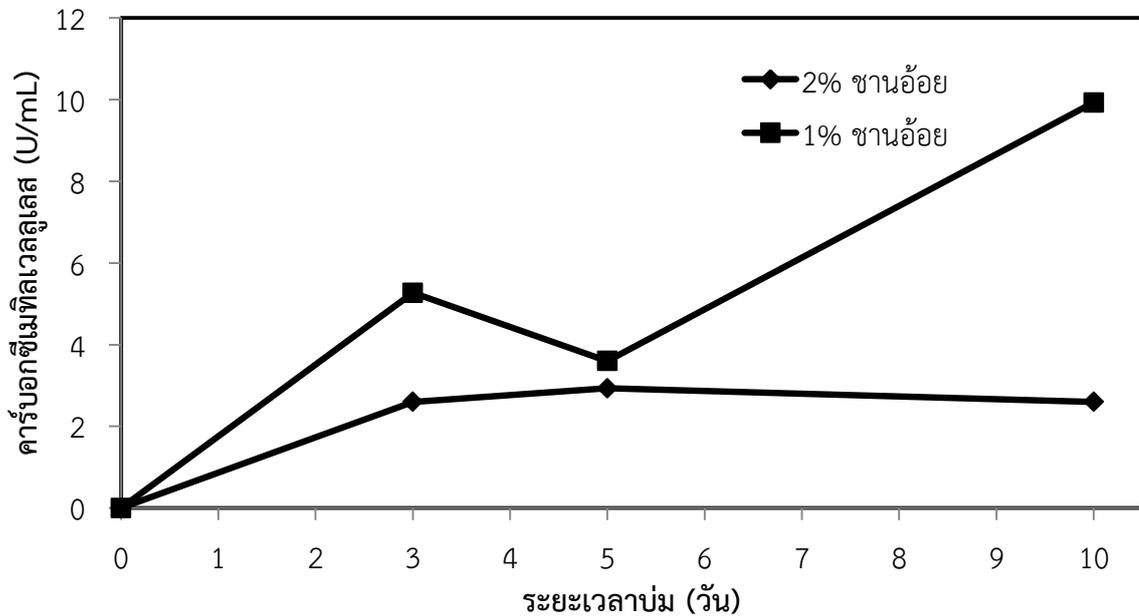


รูปที่ 5.12 จำนวนเซลล์ของ *Pichia fabianii* 204-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 2% carboxymethylcellulose, 2% ชานอ้อย และ 1% ชานอ้อย

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหาร แสดงดังตารางที่ 5.4 ซึ่งเชื่อมีการเจริญสูงในวันที่ 3 ในแหล่งอาหารชนิดต่างๆ และการเจริญลดลงในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ดังรูปที่ 5.12 การสร้างเอนไซม์เซลลูโลสดังแสดงในตารางที่ 5.5 2% carboxymethylcellulose และ 2% ชานอ้อย กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูโลสสูงสุดเป็น 14.60 และ 2.93 ยูนิิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ และเริ่มลดลงในวันที่ 10

ตารางที่ 5.5 ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์เซลลูโลสของ *Pichia fabianii* 204-1

รหัสเชื้อ	วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 10
204-1	2% ชานอ้อย	0	2.60	2.93	2.60
	1% ชานอ้อย	0	5.27	3.60	9.93



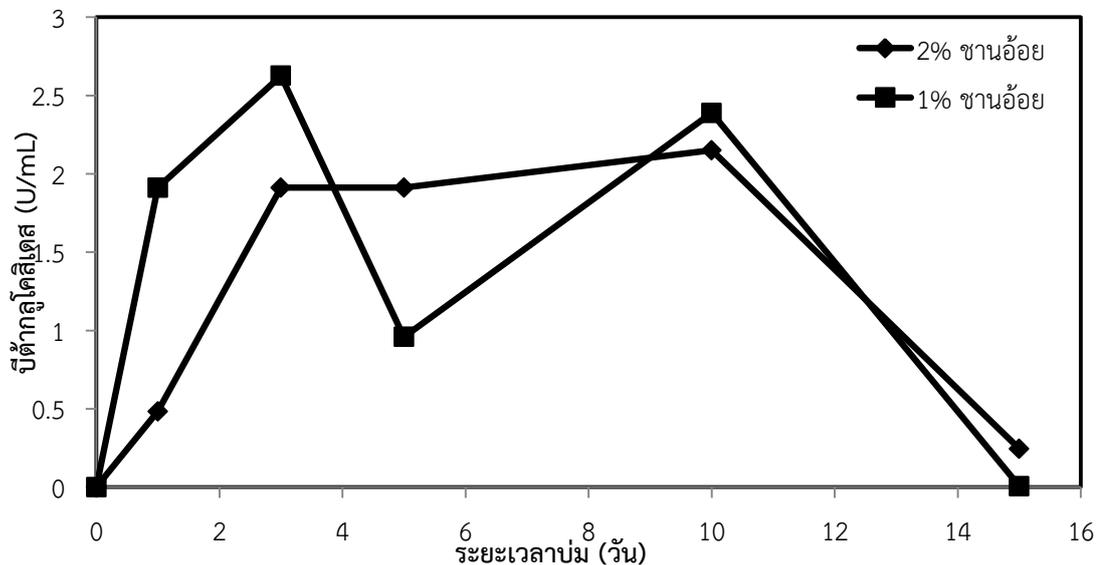
รูปที่ 5.13 กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *Pichia fabianii* 204-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 2% ชานอ้อย และ 1% ชานอ้อย)

เมื่อศึกษาการเจริญของ *C. tropicalis* S1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันคือ carboxymethylcellulose และชานอ้อย โดยมีสภาวะการเพาะเลี้ยงและระยะเวลาการบ่มเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส พบว่า *C. tropicalis* S1-1 สามารถเจริญได้ในแหล่งอาหารที่ประกอบไปด้วย carboxymethylcellulose, ฟางข้าว และชานอ้อย ซึ่งผลการทดลองการศึกษาการเจริญของเซลล์ยีสต์โดยการนับจำนวนเซลล์ (ตารางที่ 5.6) พบว่าไอโซเลต *C. tropicalis* S1-1 เจริญได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็น 1% ฟางข้าว และ 1% ชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญ ดังรูปที่ 5.14

ตารางที่ 5.6 จำนวนเซลล์ของ *Candida tropicalis* S1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และชานอ้อย

รหัสเชื้อ	วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15
-----------	---------------------------	----------	----------	----------	----------	-----------	-----------

2% ชานอ้อย	0	0.48	1.91	1.91	2.15	0.25
1% ชานอ้อย	0	1.9	2.63	0.96	2.39	0.01

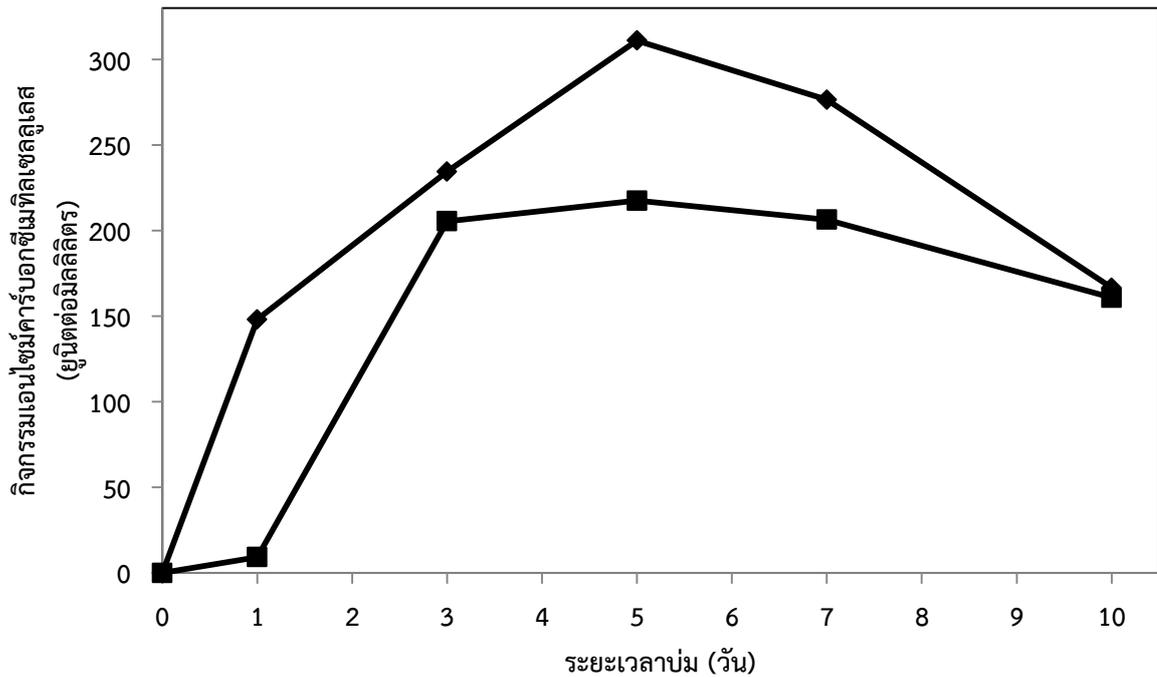


รูปที่ 5.15 กิจกรรมเอนไซม์ปัสต้ากลูโคซิเดส ของ *Candida tropicalis* S1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 15 วัน
(—◆— 2% ชานอ้อย, —■— 1%ชานอ้อย)

5.3.2 การผลิตเซลลูโลสไดคเอนไซม์จากราโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

นารที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสไดคเอนไซม์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำเชื้อราสายพันธุ์ *Penicillium oxalicum* HS1-3 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ ชานอ้อย รำข้าวสาลีและแกลบ ในสภาวะการหมักแบบแห้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 วัน วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอนไซม์ปัสต้ากลูโคซิเดสที่เกิดขึ้น

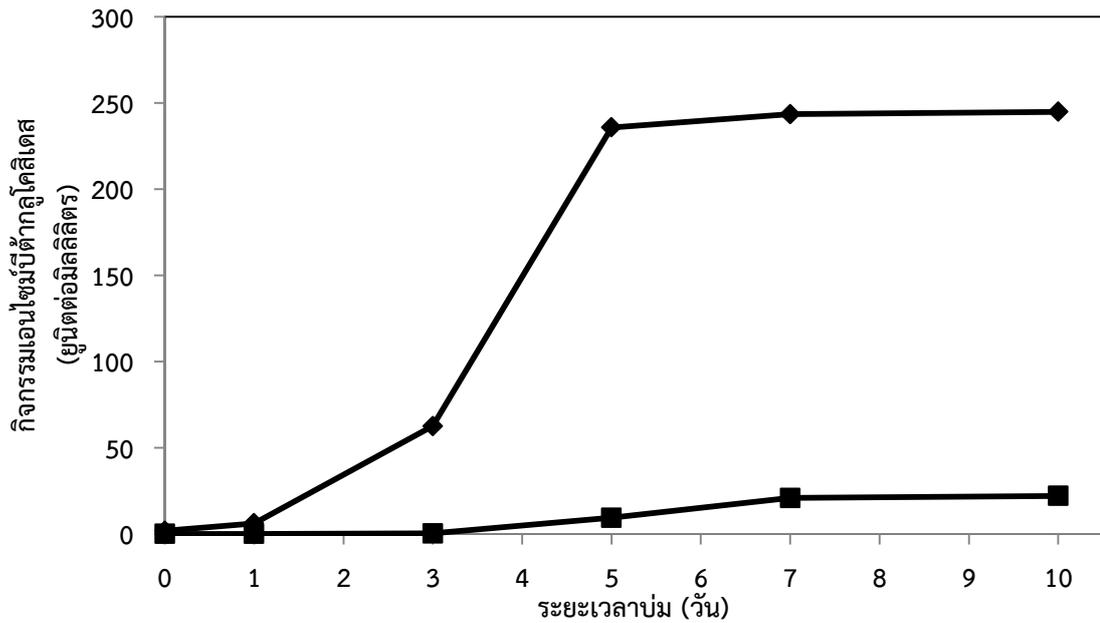
จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อรา *P. oxalicum* HS1-3 ในสภาวะการหมักแบบแห้ง พบว่าเมื่อใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงสามารถส่งผลให้รา *P. oxalicum* HS1-3 ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงถึง 311.11 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน (รูปที่ 5.16) และเริ่มมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น คือ วันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 166.67 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเปรียบเทียบกับการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในสภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในสภาวะการหมักแบบแห้ง



รูปที่ 5.16 กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เมื่อเลี้ยง *P. oxalicum* HS1-3 ในอาหารที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในสภาวะการหมักแบบแห้ง (◆— Chan Ooi) และหมักแบบสภาพเหลว (■— คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส)

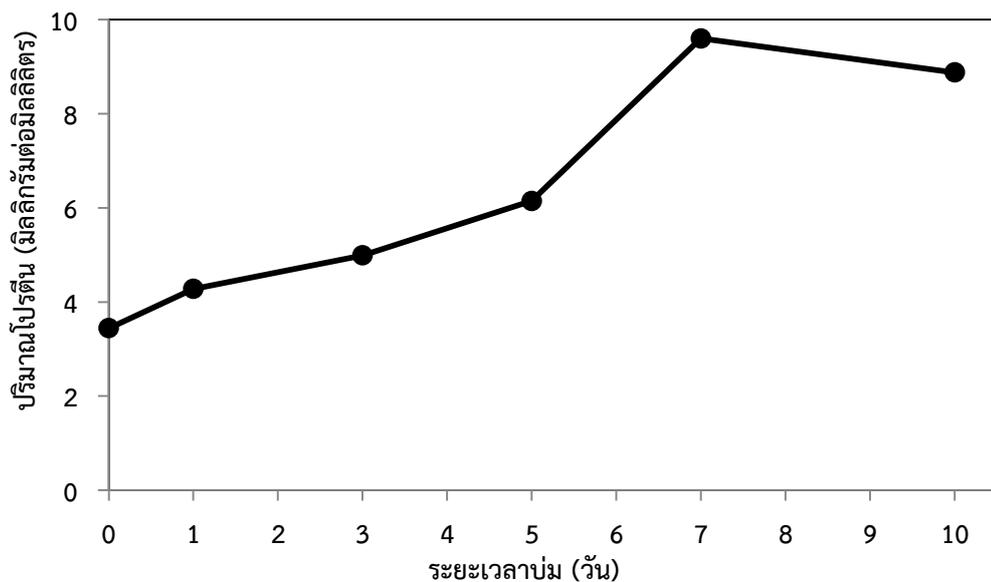
จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อรา *P. oxalicum* HS1-3 ในสภาวะการหมักแบบแห้ง พบว่าเมื่อใช้ Chan Ooi เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงสามารถส่งผลให้รา *P. oxalicum* HS1-3 ผลิตเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสได้สูงถึง 244.90 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน (รูปที่ 5.17) และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูง 235.82 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่ากิจกรรมเอนไซม์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน และเมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสที่ผลิตโดยเชื้อรานี้ในสภาวะการหมักแบบแห้งและในอาหารเหลว พบว่าการผลิตเอนไซม์เอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสในอาหารเหลวให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 22.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะการหมักแบบแห้งจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่ามากถึง 100 เท่าของค่ากิจกรรมเอนไซม์ปีต้ากลูโคซิเดสในสภาวะการหมักในอาหารเหลว

การใช้ Chan Ooi ชั่งข้าวโพด และขี้เลื่อยเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *A. flavus* โดยมีการบดสับและการย่อยด้วยไซเตียมไฮดรอกไซด์ก่อนนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ โดยจากการหมักพบว่าขี้เลื่อยเป็นแหล่งคาร์บอนที่ผลิตเอนไซม์และให้ค่ากิจกรรมสูงสุดที่ 0.0743 IU/mL ขณะที่ Chan Ooi และชั่งข้าวโพดให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 0.0573 และ 0.0502 IU/mL ตามลำดับ และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงสุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Ojumu และคณะ, 2003)



รูปที่ 5.17 กิจกรรมเอนไซม์ปีต้ากลูโคไซด์เลส เมื่อเลี้ยง *P. oxalicum* HS1-3 ในอาหารที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในสภาวะการหมักแบบแห้ง (◆ ชานอ้อย) และหมักแบบสภาพเหลว (■ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส)

เมื่อศึกษาปริมาณของโปรตีนตามวิธี Lawry และคณะ (1951) ของรา *P. oxalicum* HS1-3 ในการเจริญในสภาวะการหมักแบบแห้งที่มีชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงราเป็นระยะเวลา 7 วัน จะพบว่ามีปริมาณของโปรตีนที่สูงที่สุด คือ 9.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าปริมาณโปรตีนลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไป (รูปที่ 5.18)



รูปที่ 5.18 ปริมาณของโปรตีน เมื่อเลี้ยง *P. oxalicum* HS1-3 ในอาหารที่มีชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะการหมักแบบแห้ง

Badal และคณะ (2008) ทดลองการนำเปลือกข้าว (rice hulls) เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรมาพัฒนาเป็น feedstock เพื่อผลิตเอทานอล พบว่ามีการปลดปล่อยน้ำตาลสูงสุดที่ 126 ± 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของเปลือกข้าว (กลูโคส 93 ± 1 มิลลิกรัม ไส้โลส 27 ± 0 มิลลิกรัม อะราบิโนส 6 ± 0 มิลลิกรัม) จากนั้นใช้เซลลูโลสไลติกเอนไซม์ปริมาณ 0.05 มิลลิตรต่อกรัมสับสเตรต จากสภาวะการย่อยด้วยเอนไซม์ให้น้ำตาลสูงสุด 154 ± 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของเปลือกข้าว จากนั้นตัวอย่างน้ำตาลที่ได้ในขั้นตอน enzymatic saccharification นำเข้าสู่กระบวนการหมักโดยใช้ recombinant *E. coli* สายพันธุ์ FBR5 ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล จากการทดลองพบว่า ระบบ SHF ได้รับความเข้มข้นของเอทานอล 9.8 ± 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุดที่ $A 660$ นาโนเมตร ถึง 6.5 ± 0.5 ในเวลา 19 ชม. ส่วนในระบบ SSF ความเข้มข้นของเอทานอล 11.0 ± 1.0 กรัมต่อลิตรที่เวลา 53 ชม.

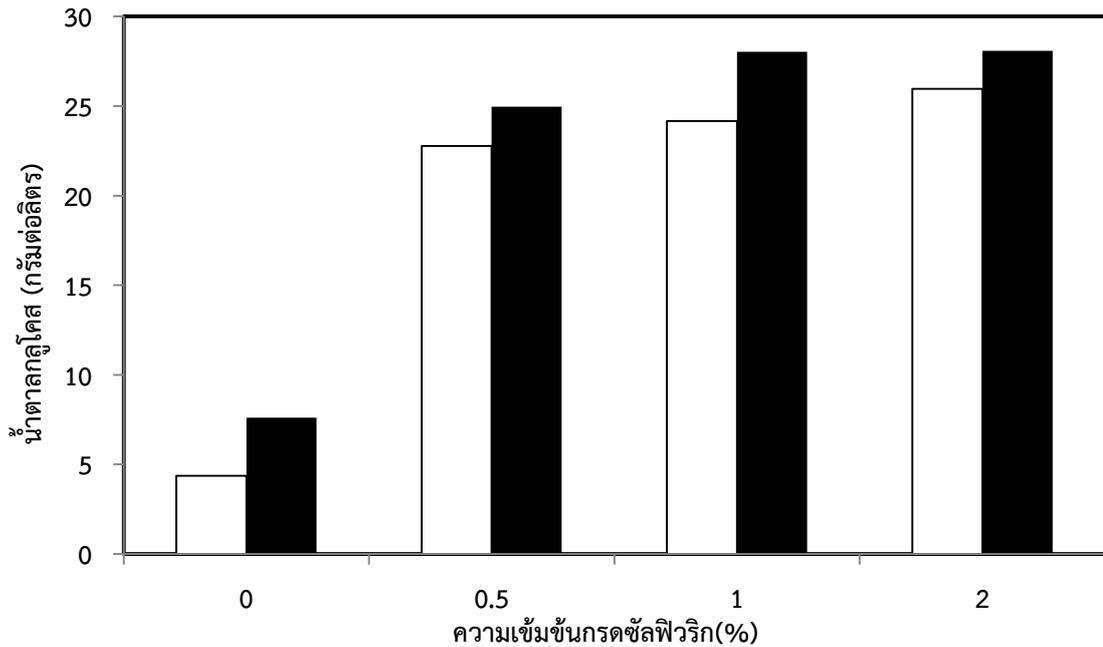
การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสจาก *A.niger* MTCC 7956 โดยการหมักแบบแห้งที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นฟางข้าว ชานอ้อย และรำข้าวสาลีในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งจะใช้เอนไซม์เซลลูเลส 50 FPU และเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส 10 U ต่อ 1 กรัมวัสดุเหลือ พบว่าได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ 26.3 กรัมต่อลิตร และ 17.79 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำน้ำตาลที่ได้ไปหมักเอทานอลพบว่า ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 0.093 กรัมต่อกรัมฟางข้าว (Sukumaran และคณะ, 2009)

วิมลทิพย์ และคณะ ทดลองพบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 เป็น facultatively anaerobic bacterium ซึ่งคัดแยกได้จากถังหมักแก๊สชีวภาพ สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกและเซลลูโลสไลติก โดยประกอบด้วย ไซลานเนส เบต้าไซโลซิเดส อะราบิโนฟูราโนซิเดส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส อะโวซิเลส เซลโลไบโอไฮโดรเลส และ เบต้ากลูโคซิเดส เมื่อเจริญในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ในส่วนของ crude enzyme เมื่อนำมาตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และ zymograms พบโปรตีนอย่างน้อย 26 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยไซลานเนส 12 ชนิด และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 12 ชนิด เมื่อนำ crude xylanolytic-cellulolytic enzyme มาย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรพบว่าสามารถย่อยเปลือกข้าวโพดได้สูงสุด รองลงมา คือ ชังข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าว และ แกลบตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล ไส้โลส และกลูโคส

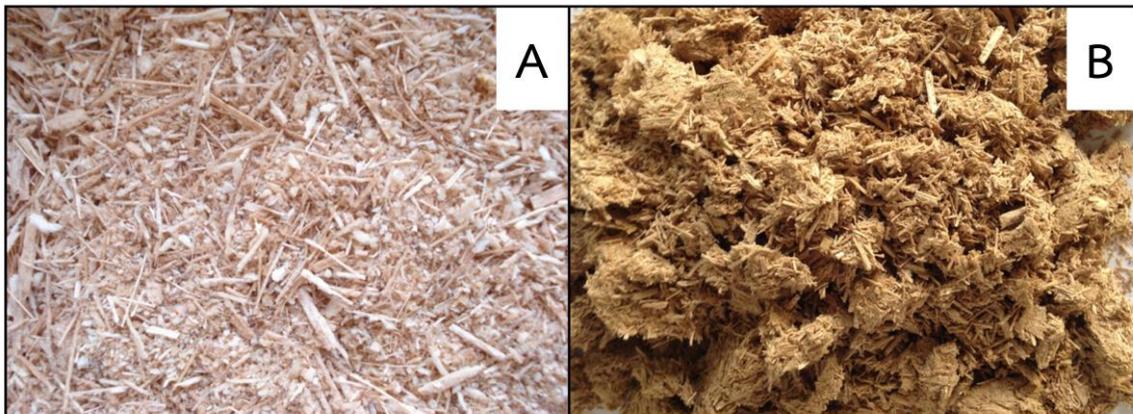
5.4 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายวัตถุดิบทางการเกษตร

5.4.1 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากการย่อยสลายด้วยวิธีทางเคมี

จากการทดสอบการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยวิธีทางเคมี โดยการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ ชานอ้อยซึ่งพบว่าทั้งราและยีสต์มีความสามารถในการย่อยสลายและให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูง มาย่อยสลายด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่างๆและวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นพบว่า เมื่อย่อยชานอ้อยด้วย 1%กรดซัลฟิวริกและต้มด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จะให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดคือ 28.01 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 5.19) ซึ่งเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมและสามารถนำไปใช้ในการหมักเอทานอลต่อไปได้



รูปที่ 5.19 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟิวริก (□ บ่มชานอ้อย 30 นาที, ■ บ่มชานอ้อย 60 นาที)



รูปที่ 5.20 ลักษณะของชานอ้อยเมื่อถูกย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกและความร้อน (A :ชานอ้อยที่ยังไม่ถูกย่อยด้วยกรด และ B : ชานอ้อยที่ถูกย่อยด้วยกรดและความร้อน)

5.5 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากยีสต์

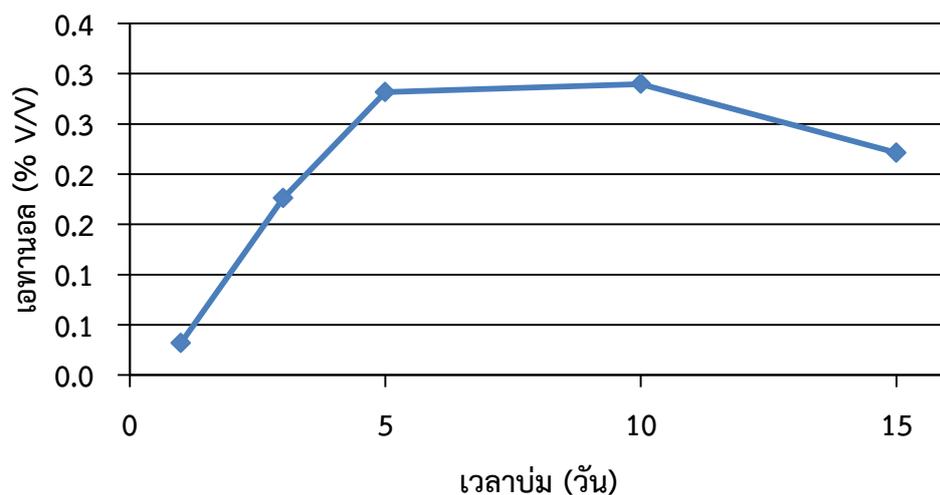
โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งอาหารโดยการหมักร่วมกับ ราและ/หรือยีสต์ที่สามารถผลิตเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ ตลอดจนทดลองร่วมกับการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธีทางเคมี วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 5.8 ปริมาณเอทานอลจากการหมักชานอ้อยด้วยเซลลูโลสไลติกเอนไซม์จากเชื้อรา *P. oxalicum*

HS1- 3 ยีสต์ *Pichia fabianii* 204-1 และ *Candida glabrata* S1-1

น้ำตาลกลูโคส เริ่มต้น (g/g substrate)	เอทานอล (% v/v)				
	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15
0.600	0.032	0.176	0.282	0.290	0.221

จากนั้นนำวัสดุเหลือทิ้งที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งหมักร่วมกับเซลลูโลสไลติกเอนไซม์จากยีสต์และราร่วมด้วย โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่นำไปใช้ในกระบวนการหมักเท่ากับ 0.6 g/g ชานอ้อยโดยกระบวนการหมักเอทานอล โดยทั้งหมดใช้เวลา 15 วันและนำตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยการวิเคราะห์ด้วย gas chromatography พบว่าเมื่อเลี้ยงยีสต์เป็นเวลานาน 10 วัน ได้เอทานอลสูงสุด คือ 0.290 % (v/v) (ตารางที่ 5.8 และรูปที่ 5.21)



รูปที่ 5.21 การผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* เมื่อเลี้ยงในชานอ้อยที่ผ่านการ pretreatment และ enzyme hydrolysis

Yi-Huang Chang และคณะ, 2012 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยการย่อยซังข้าวโพดเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้น้ำตาลกลูโคส 0.36 กรัมต่อกรัมซังข้าวโพด จากนั้นจึงศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* BCRC 21812 พบว่าได้เอทานอล 6.9 – 23 กรัมต่อลิตร โดยเมื่อให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณเอทานอลสูงถึง 20 กรัมต่อลิตร

Haan และคณะ (2007) ได้วิเคราะห์กระบวนการผลิตเอทานอลจาก lignocellulose โดยใช้กระบวนการ Consolidated bioprocessing (CBP) แบบ one-step โดยการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์

Saccharomyces cerevisiae ให้มีคุณสมบัติทั้งการย่อยสับสเตรทที่มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลสและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลให้รวมอยู่ด้วยกัน โคลนยีนที่สร้างเอนไซม์ Cellobiohydrolase (CBH) ให้มีการแสดงออกในยีสต์ พบว่าเอนไซม์ทั้งสี่ชนิด (CBH1, CBH2, CBHB และ CBH1-4) มีการแสดงออกและมีกิจกรรมของเอนไซม์ภายนอกเซลล์เหมือนกัน ดังนั้นจึงนำ CBH1 ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ปริมาณโปรตีนที่ได้ 0.22 ± 0.17 กรัมต่อมิลลิลิตร และค่า specific activity คือ 0.22 ± 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่า Y294[REF] ที่ผสมกับ native CBH1 ที่มีค่า specific activity เท่ากับ 0.14 ± 0.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

Mingjie และคณะ (2010) ตรวจสอบการผลิตเอทานอลโดยใช้ switchgrass (*Panicum virgatum*) เป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่ใช้เป็นสับสเตรท โดยกระบวนการเริ่มจากขั้นตอน Pretreatment ด้วย Ammonia Fiber Expansion (AFEX) หลังจากย่อยความเข้มข้นของกลูโคสและไซโลสเป็น 30.7 และ 25.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากเติมยีสต์ความเข้มข้นของกลูโคสลดลง 1.3 กรัมต่อลิตร ใน 14 ชม. ความเข้มข้นสุดท้ายของไซโลสและเอทานอลประมาณ 25 กรัมต่อลิตร และ 22 กรัมต่อลิตร สำหรับกระบวนการ two step SSCF ความเข้มข้นของกลูโคสและไซโลสเป็น 8.1 และ 25.1 กรัมต่อลิตร ในขั้นที่หนึ่งของวิธี SSCF ความเข้มข้นของกลูโคสและไซโลสลดลง 0.6 และ 18.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขั้นที่สองความเข้มข้นของไซโลสประมาณ 19 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นถึง 15 กรัมต่อลิตร ใน 36 ชม. อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของกลูโคสลดลงถึง 0.9 กรัมต่อลิตร ที่ 128 ชม. ความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 26.3 กรัมต่อลิตร

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย

พลังงานทางเลือกต่างๆ ที่มีการศึกษาเช่น พลังงานเชื้อเพลิงแอลกอฮอล์ หรือ พลังงานจากไบโอดีเซล ซึ่งกำลังมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและผลิตเอนไซม์มีราคาสูง ประกอบกับปัจจุบันจึงได้มีผลิตผลทางการเกษตรมากมาย เช่น น้ำอ้อย แป้งและแป้งมันสำปะหลัง และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร การเกษตร เช่น ฟางข้าว เป็นต้น ดังนั้นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาย่อยสลายโดยใช้เซลล์จุลินทรีย์เอนไซม์ เพื่อให้ได้น้ำตาล ซึ่งเป็นแหล่งอาหารสำหรับยีสต์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล จะเป็นการทำให้ผลิตผลทางการเกษตรที่มีราคาต่ำของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้ผลผลิตดังกล่าวอีกด้วย

จากการวิจัยโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างใบไม้ ดอกไม้ ผลไม้ และดิน เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสเอนไซม์ และจากการสุ่มเก็บตัวอย่างใบไม้ ดอกไม้ ผลไม้ และดิน รวมทั้ง 48 ตัวอย่าง จากจังหวัดชัยภูมิ เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสเอนไซม์ ในขั้นแรกคือการทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการย่อยสลายสับสเตรตคือ คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสอาหารแข็ง ซึ่งในการทดลองได้มีการผสมคาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสในอาหาร YM agar plate สำหรับยีสต์และ PDA สำหรับรา เพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงตรวจสอบการย่อยสลายคาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสด้วยการราดสารละลาย Congo red ให้ท่วมจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นซึ่ง congo red จะดูดซับกับโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นสับสเตรต คือ carboxymethyl cellulose แล้วเห็นเป็นสีแดงของ congo red หากยีสต์มีการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสซึ่งจะสามารถย่อยสับสเตรตได้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ ทำให้ congo red ไม่สามารถดูดซับกับสับสเตรต จึงเห็นเป็นโซนใสเกิดขึ้น จากการทดลองดังกล่าวสามารถคัดเลือกยีสต์จากธรรมชาติได้ 10 สายพันธุ์ โดยในการทดลองในครั้งนี้สามารถคัดเลือกยีสต์ไอโซเลต 204-1 ที่มีสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสได้สูงสุด สำหรับราสามารถคัดเลือกไอโซเลตได้ทั้งหมด 65 ไอโซเลต โดยไอโซเลต HS1-3 เป็นราที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลสได้สูงสุดเช่นกัน

การทดสอบการสร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสโดยดูการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งการทดลองทำโดยนำเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร YM agar plate ที่มี 0.004% (w/v) MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส โดยเชื้อที่สามารถเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส ได้จะเรืองแสงรอบโคโลนี เมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เมื่อ 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส ที่พันธะ beta-1,4 glycosidic จะเกิดสารประกอบเป็น 4-methylumbelliferone ซึ่งเป็นสารเรืองแสง เมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตจะเห็นการเรืองแสงรอบๆโคโลนีของเชื้อได้ จากการทดลองจึงสามารถคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสทั้งหมด พบเชื้อ 3 สายพันธุ์ที่เกิดการเรืองแสง และคัดเลือกไอโซเลต S1-1 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นี้ได้สูงสุด สำหรับเชื้อรานั้น ได้มีการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกมาได้บนอาหาร Mineral medium ที่มี 0.004% (w/v) MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside)

เช่นเดียวกัน พบว่ารา 2 ไอโซเลต และไอโซเลต HS1-3 เป็นราที่สามารถผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสได้สูงสุด

เมื่อจัดจำแนกประเภทยีสต์โดยเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของยีสต์ พบว่าไอโซเลต 204-1 มีความเหมือน 100% เมื่อเทียบกับเชื้อ *Pichia fabianii* ไอโซเลต S1-1 มีความเหมือน 100% เมื่อเทียบกับเชื้อ *Candida glabrata* และราที่ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูเลสและเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงจำนวน 1 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต HS1-3 เมื่อนำมาจัดจำแนกเชื้อราโดยใช้ ITS1-2 region sequencing โดยไอโซเลต HS1-3 มีความเหมือน 100% เมื่อเทียบกับเชื้อ *Penicillium oxalicum* จากนั้นจึงศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์

การศึกษาความสามารถของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์จากเชื้อยีสต์ *Pichia fabianii* 204-1, *Candida glabrata* S1-1 และ *Penicillium oxalicum* HS1-3 ในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ในการทดลองสำหรับยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์นั้น ทำโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จากนั้นศึกษาการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ พบว่า ยีสต์ *Pichia fabianii* 204-1 สามารถเจริญในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีจำนวนเซลล์สูงสุดเมื่อ เพาะเลี้ยงในวันที่ 7 โดยมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10.85×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับยีสต์ *Candida glabrata* S1-1 สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มี ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเจริญสูงสุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง คือมีเซลล์ประมาณ 4.03×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เมื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ด้วยวิธี DNS โดยวัดปริมาณ reducing sugar ซึ่งแปรผันตรงกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อมีปริมาณ reducing sugar เพิ่มขึ้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย พบว่าเชื้อ *P. fabianii* 204-1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส พบว่า เมื่อใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เป็นชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอนไซม์ เชื้อ *P. fabianii* 204-1 สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือ 32.55 U/ml และรา *P. oxalicum* HS1-3 ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุด 217.59 U/ml เมื่อเลี้ยงในสภาวะการหมักแบบแห้ง

การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส ด้วยวิธีการหาปริมาณ *p*-nitrophenol จากยีสต์ *Candida glabrata* S1-1 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุด คือ 17.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบเชื้อยีสต์อื่นๆที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงในสภาวะการหมักในอาหารเหลว และรา พบว่า *P. oxalicum* HS1-3 ผลิตเอนไซม์เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้ 23.64 U/ml เมื่อเลี้ยงในสภาวะการหมักแบบแห้ง

การทดสอบการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้นเพื่อทำลายโครงสร้างของเซลลูโลสร่วมกับความร้อนสูง 121 °C เป็นเวลา 60 นาที และตรวจสอบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น พบว่ามีปริมาณน้ำตาลสูงถึง 28.01 g/L เมื่อนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยวิธีทางเคมีมาแล้ว มาศึกษาประสิทธิภาพของเซลลูโลสไลติกเอนไซม์จากราและยีสต์โดยการบ่มเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ร่วมกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรนี้ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นจึงวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Nelson ซึ่งเป็นการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

พบว่า เชลลูโลสไดคเอนไทม์จากยีสต์ สามารถย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุด 0.513 กรัมต่อกรัมขานอ้อย เมื่อบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และรา *P. oxalicum* HS1-3 ให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุด 0.500 กรัมต่อกรัมขานอ้อย เมื่อบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากนั้นนำวัสดุเหลือทิ้งที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งหมักร่วมกับเชลลูโลสไดคเอนไทม์จากยีสต์และราร่วมด้วย โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่นำไปใช้ในกระบวนการหมักเท่ากับ 0.6 g/g ขานอ้อยโดยกระบวนการหมักเอทานอลโดย ทั้งหมดใช้เวลา 15 วันและนำตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยการวิเคราะห์ด้วย gas chromatography พบว่าเมื่อเลี้ยงยีสต์เป็นเวลานาน 10 วัน ได้เอทานอลสูงสุด คือ 0.290 % (v/v)

ดังนั้นการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ประเภทขานอ้อย เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับนำมาใช้ในการผลิตพลังงานทดแทนประเภทไบโอเอทานอลได้

ข้อเสนอด้านการวิจัย ควรมีการศึกษาทางด้าน large scale ในขั้นต่อไปเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ทิพวรรณ แต่งสวน. 2553. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลสุกร. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี หลักสูตรสัตวศาสตร์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง. กรุงเทพมหานคร. หน้า 1- 43.
- พรเทพ ถนนแก้ว. 2538. ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูก ป่าศรณารายณ์. วิทยานิพนธ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. หน้า 1- 43.
- วิเชียร กิจปรีชานิช, กัญญา สอนสนิท, สาวิตรี ลิ้มทอง, กล้าณรงค์ ศรีรอด และชาญวิทย์ โฆษิตานนท์. 2538. การผลิตไซลิทอลจากเอนไซม์ไซโลสโตยีสต์ *Cnadida* sp. WT 52. รายงานการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33. กรุงเทพมหานคร. หน้า 216-230.
- วิมลทิพย์ ไตรปัญญา, จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ, กนก รัตน์ะกนกชัย และ คิน เลย์ คู, Wimoltip Tripanya, Chakrit Tachaapaikoon, Khanok Ratanakhanokchai, and Khin Lay Kyu. 2550. การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มไซลานโกลิก และเชลลูโลสไดคเอนจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1. วิทยานิพนธ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพมหานคร. หน้า 1 - 8.

- Alonso, D., Martins, B., Ferreira, H., Prado, A. D., Simes, R., Leite, R., , Ferreira, H., Souza, M., Moretti, M., Silva, R. and Gomes, E. 2011. **Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production.** *Integrated Waste Management.* 2: 319 – 361
- Barbagallo R.N., Spagna G., Palmeri R., Restuccia C., Giudici P. (2004). **Selection, characterization and comparison of beta-glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications.** *Enzyme Microb Technol.* 35:58-66.
- Chen, H., Jin, S. 2006. **Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulase.** *Enzyme Microbial. Technol.* 39: 1430-1432.
- Fan, L.T., Lee, Y.H. 1983. **Kinetics studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Derivation of a mechanistic kinetic model.** *Biotech. Bioeng.* 25: 2707-2733.
- Hoffmann Per , Mark A. Jones. 1989. **Structure and Degradation Process for Waterlogged Archaeological Wood.** *Archaeological Wood.* United Kingdom. Chapter 2: 35–65
- KRISTIAN B. R. KROGH, ASTRID MØRKEBERG, HENNING JØRGENSEN, JENS C. FRISVAD, AND LISBETH OLSSON. (2004). **Screening Genus *Penicillium* for Producers of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes.** *App. Biochem. and Biotech.* Vol. 113–116
- Lever M., Ho G., Cord-Ruwisch R. (2010). **Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulase from solid-state fermentation.** *Bioresour. Technol.* 101:7094-7098.
- Lotong, N. and Suwanarit, P. (1983). **Production of soy sauce koji mold spore inoculum in plastic bags.** *Appl Environ Microbiol.* 46: 1224- 1226.
- Mandels, M., Hontz, L. and Nystrom, W. (1974). **Enzymatic hydrolysis of waste cellulose.** *Biotechnology and Bioengineering.* 6: 1471-1493.
- Miller GL. 1059. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Anal. Chem.* 31:426–428.
- Nelson, N. 1944. **A photometric adaptation of the somogyi method For the determination of glucose.** *J. Biol. Chem.* 153, 375-380.
- Ng I.S., Li, C.W., Chan S.P. Chir J.L., Chen P.T., Tong C.G., Yu S.M., David Ho T.H. (2010). **High-level production of a thermoacidophilic beta-glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran.** *Bioresour. Technol.* 101:1310-1317.
- Nisizawa, K., 1973. **Mode of the action of cellulase.** *J. Ferment. Technol.* 267-304.
- Ojumu, T., V., Solomon, B.O., Betigu, E., Layokun, S.K. and Amigun, B. (2003). **Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob.** *African J. and biotech.* 2 (6) : 150 – 152.

- Pointing S.B., Buswell J.A., Jones E.B.G., Vrijmoed L.L.P. 1999. **Extracellular cellulytic enzyme Profile of five lignicolous mangrove fungi.** Mycol Res. 103: 696-700.
- Reese, E.T. and Levinson, H.S. 1952. **A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganism.** Physid. Plantarum. 5: 345-366.
- Reese, E.T. 1963. **Advanced in enzymatic hydrolysis of cellulase and related materials.** New York; The Macmillian company.
- Soni R., Sandhu D.K and Soni S.K. 1999. **Localisation and optimization of cellulose production in *Chaetonium erraticum*** J. of Biotechnol. 73: 43-57.
- Sree, N.K., Sridhar, M., Venkateswar Rao L., Panday A., 1999. **Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast.** Process Biochem. 34: 115-119.
- Sukumaran, R.K., Singhanian R.R., Pandey A. (2005). **Microbial cellulase-Production, application and challenges.** J. Sci. Indust. Res. 64:832-844.
- Sukumaran, R.K., Singhanian R.R., Mathew, G.M. and Pandey A. (2009). **Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulosesaccharification for bio-ethanol production.** Renew. Ener. 34 : 421 - 424
- Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Thanonkeo, P. and K. Vichitphan, K. **Screening, production and localization of glycosidase from isolated yeasts.** Findings of the young researchers on applied science 2006 (CAS 2006), Selangor, Malaysia. p 349-353.
- Swangkeaw, J., Vichitphan, S., and K. Vichitphan, K. **Production and characterization of extracellular beta-glucosidase from *Pichia anomala* MDD24 for enhancing wine aroma.** IBS2008, Dalian, China. J Biotech 2008, S296.
- Yi-Huang Chang, Ku-Shang Chang, Cheng-Wei Huang, Chuan-Liang Hsu, Hung-Der Jang. (2012). **Comparison of batch and fed-batch fermentations using corncob hydrolysate for bioethanol production.** Fuel (97) : 166 – 173.
- <http://kanchanapisek.or.th/oncc-cgi/text.cgi?no=12129>
- <http://www.thairath.co.th/media/content/2012/04/04/250619/o4/420.jpg>
- http://www.dld.go.th/nccn_cnt/th/index.php?option=com_content&view=article&id=108:-sweet-sorghum-keller&catid=53:2011-11-27-05-42-43&Itemid=55
- http://www.thaipromote.com/picture.php?picture=c1454057b078afed2179e029ca48a29d.jpg&p_id=1723933

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร

1. Yeast extract-malt extract (YM) agar

Glucose	1%
Peptone	0.5%

Yeast extract	0.3%	
Malt extract	0.3%	
Agar	1.5%	
Purified water	100	มิลลิลิตร

2. Yeast extract malt extract broth (YM broth)

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Distill water	1000	มิลลิลิตร

3. Yeast extract peptone dextrose (YPD broth) pH 5.0

Glucose	20	กรัม
Yeast extract	20	กรัม
Peptone	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

4. YNB agar (Yeast Nitrogen Base /W/O amino acids)

Yeast Nitrogen Base	1.7	กรัม
Ammonium sulfate	5	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

5. Carboxymethylcellulose agar(CMC agar) pH 5.0

Glucose	5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Agar	15	กรัม
0.5% CMC	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

6. mendels medium broth

urea	0.3	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4	กรัม
KH_2PO_4	2	กรัม
CaCl_2	0.3	กรัม
MgSO_4	0.3	กรัม
yeast extract	0.25	กรัม
peptone	0.75	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

7. mendels medium agar

urea	0.3	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4	กรัม
KH_2PO_4	2	กรัม
CaCl_2	0.3	กรัม
MgSO_4	0.3	กรัม
yeast extract	0.25	กรัม
peptone	0.75	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

8. Mineral salt medium

Carboxymethyl cellulose	1.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
CaCl_2	0.1	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.543	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

9. Potato dextrose agar (PDA)

PDA สำเร็จรูป	39	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
สารเคมี

1. Congo red

Stock NaCl

NaCl	30	กรัม
100% OH	800	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

Stock working solution

Stock NaCl	50	มิลลิลิตร
1% NaOH	0.5	มิลลิลิตร

Congo red

Congo red	0.1	กรัม
Stock NaCl	500	มิลลิลิตร

2. citrate phosphate buffer

citric acid	10.5	กรัม
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	25.8	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

3. 0.004 % (w/v) MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside)

4. 0.002 M p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside

5. p-nitrophenol

6. 1% Carboxymethylcellulose

Carboxymethylcellulose	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

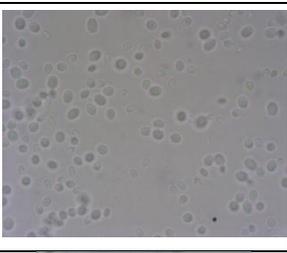
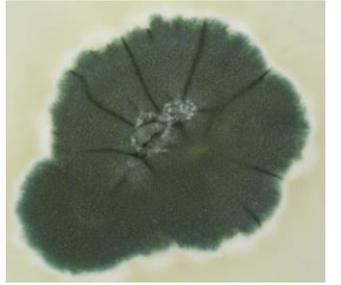
7. Standards glucose

D-glucose	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

8. DNS (Dinitrosalicylic)

DNS	2	กรัม
NaOH	4	กรัม
NaPO ₄ tratate	40	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

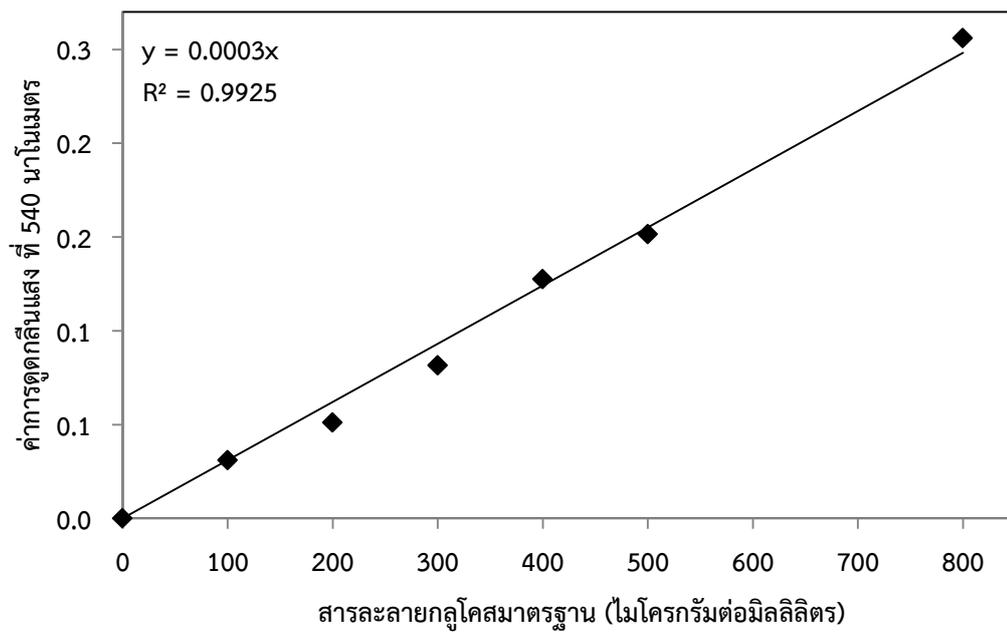
ภาคผนวก ค
ลักษณะต่าง ๆ ของยีสต์และรา

204-1			โคโลนีใหญ่ ผิวหน้าโค้งนูน ผิวหน้ามันวาว สีขาวขุ่น ขอบ เรียบ
S1-1			โคโลนีกลม สีขาวขุ่น ผิวหน้าไม่ มันวาว ผิวหน้าโค้งนูน ขอบ เรียบ
HS1-3			โคโลนีขนาดใหญ่ เส้นใยสีขาวมี ผนังกัน สร้างสปอร์สีเขียว

ภาคผนวก ง
การทดสอบเอนไซม์
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

ตารางที่ 1ง ตารางการทดสอบสารละลายกลูโคสมาตรฐาน หาปริมาณ reducing sugar ของกราฟมาตรฐาน

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร
0	0
100	0.031
200	0.051
300	0.082
400	0.128
500	0.152
800	0.256



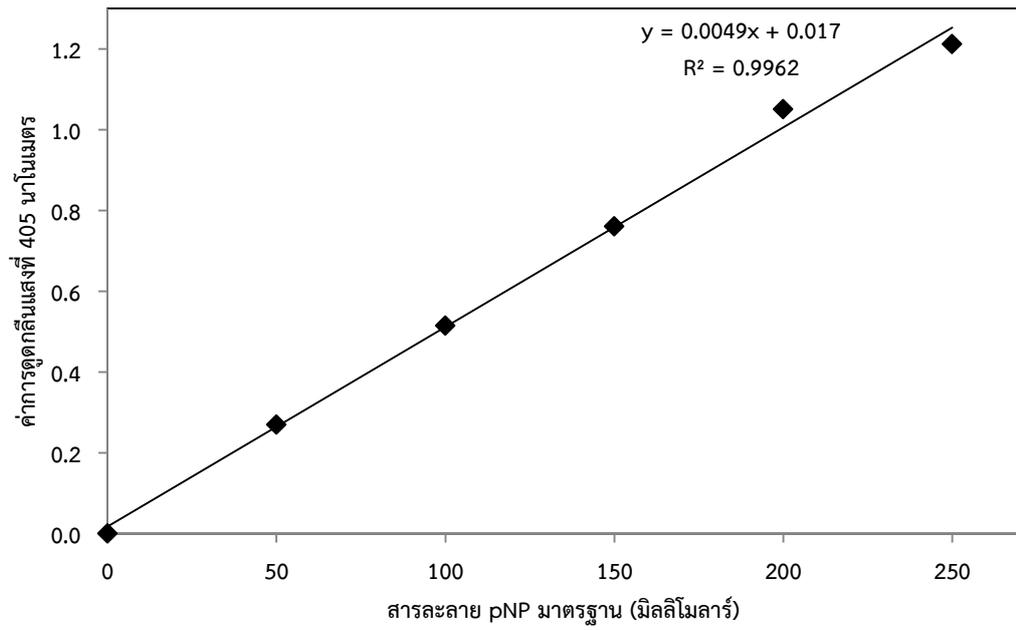
รูปที่ 1ง กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ปีศาจกลูโคไซด์

ตารางที่ 2ง การทดสอบ สารละลาย pNP มาตรฐาน

สารละลาย pNP มาตรฐาน (มิลลิโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร
---------------------------------------	----------------------------------

0	0
50	0.27
100	0.515
150	0.761
200	1.051
250	1.212



รูปที่ 2ง กราฟมาตรฐานของสารละลาย pNP มาตรฐาน