บทที่ 2
การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอลกอฮอล์

แอลกอฮอล์สามารถนำมาเป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์แก๊สโซลีน โดยผสมกับน้ำมันแก๊สโซลีนแล้วจึงนำไปใช้งาน เอทานอลสามารถผลิตขึ้นจากชีวมวล (Biomass) หรือจากสารไฮโดรคาร์บอน (หรือน้ำมันก๊าซ) อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลโดยทั่วไปแบ่งได้ 4 ชนิด ดังนี้

1) Industrial alcohol (95°GL) ใช้ในทางอุตสาหกรรม โดยใช้เป็นตัวทำละลาย ใช้เป็นเชื้อเพลิง และใช้ในการเตรียมสารเคมีอย่างอื่น

2) Denatured spirit (88°GL) ใช้ในการให้ความร้อนและแสงสว่าง

3) Fine alcohol (96.0-96.5°GL) ใช้ในทางการแพทย์และการผลิตเครื่องสำอาง

4) Absolute หรือ Anhydrous Alcohol (99.7-99.8°GL) ใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อการเผาไหม้ภายในของเครื่องยนต์

หมายเหตุ °GL หมายถึง The degree Gay-Lussac ซึ่งสามารถวัดโดยเครื่อง hydrometer โดยอ่านเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรของเอทานอล ในของผสมระหว่างเอทานอลต่อน้ำ

2.1.1 สมบัติทางกายภาพของแอลกอฮอล์

แอลกอฮอล์เป็นสารประกอบที่ไฮโดรเจนอะตอมหนึ่งของน้ำถูกแทนที่ด้วยหมู่แอลคิล ดั้งนั้นแอลกอฮอล์จึงเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีหมู่ –OH ต่ออยู่ มีสูตรทั่วไปดังนี้

R-OH

แอลกอฮอล์ที่มีโมเลกุลเล็กๆ เป็นของเหลวมีกลิ่นฉุน จุดเดือดสูงกว่าสารไฮโดรคาร์บอน ทั้งนี้เพราะหมู่ –OH เป็นหมู่ที่มีความเป็นโพลาร์และมีพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลถ้าเปรียบเทียบระหว่างไฮโดรคาร์บอนที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากัน แรงดูดจะต่างกันมาก เช่น เอทานอล มีน้ำหนักโมเลกุล 46 จะมีจุดเดือดเท่ากับ 78.5 องศาเซลเซียส ส่วนโพรเพน มีน้ำหนักโมเลกุล 44 จะมีจุดเดือดเท่ากับ -42 องศาเซลเซียส ค่าคงที่ของคุณสมบัติทางกายภาพของเอทานอลแสดงดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพของเอทานอล (วิรัช, 2529)

คุณสมบัติ	
สูตรโมเลกุล	C_2H_5OH
น้ำหนักโมเลกุล	46.06
ความถ่วงจำเพาะ	0.785
ความหนืด abs.(P)	0.0173
จุดหลอมเหลวที่ความดัน 1 บรรยากาศ (o F)	-170
จุดเดือดที่ความดัน 1บรรยากาศ (o F)	172
ความดันไอ (RVP) ที่100o F (psia)	2.25
ค่าความร้อนเมื่อความดันคงที่	
HHV ที่ 77o F (Btu/lb)	12,780
LHV ที่ 77o F (Btu/lb)	11,604
ค่าความร้อนของการกลายเป็นไอ (Btu/lb)	396
อัตราส่วนของอากาศ/เชื้อเพลิง	9.0

หมายเหตุ HHV หมายถึง High heating values เป็นค่าความร้อนสูงสุด

LHV หมายถึง Low heating values เป็นค่าความร้อนต่ำสุด

2.1.2 ชนิดของแอลกอฮอล์ แอลกอฮอล์แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

1) เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) หรือที่เรียกว่าเอทานอล (Ethanol) มีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH ผลิตได้จากผลผลิตทางการเกษตร

2) เมทิลแอลกอฮอล์ (Methyl alcohol) หรือที่เรียกว่าเมทานอล (Methanol) มีสูตรทางเคมีคือ CH_3OH ผลิตได้จากปิโตรเลียม ถ่านหิน และไม้ เป็นต้น

2.1.3 กระบวนการผลิตแอลกอฮอล์

กระบวนการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงนั้นมีอยู่ 2 กระบวนการคือ กระบวนการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ และกระบวนการผลิตเมทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1) กระบวนการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล ผลิตได้จากวัสดุทางการเกษตร ซึ่งจัดแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ ประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย ข้าวฟ่างหวาน และกากน้ำตาล เป็นต้น ส่วนอีกประเภทหนึ่งเป็นประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าวเหนียว ข้าวเจ้า ข้าวโพด เป็นต้น พืชเศรษฐกิจที่มีศักยภาพสูงที่จะนำมาใช้เพื่อผลิตเอทิลแอลกอฮอล์แทนน้ำมันเชื้อเพลิงในขณะนี้ได้แก่ อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น

2) กระบวนการผลิตเมทิลแอลกอฮอล์หรือเมทานอล เป็นแอลกอฮอล์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ แต่มีวิธีการผลิตที่แตกต่างไปจากการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ สำหรับวัตถุดิบใน

ประเทศที่มีศักยภาพสามารถนำมาใช้ผลิตเมทิลแอลกอฮอล์ในขณะนี้คือ ถ่านหินลิกไนต์ ไม้ และก๊าซธรรมชาติ

2.1.4 ประโยชน์ของเอทานอล

เอทานอลเป็นสารอินทรีย์ที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ที่สำคัญ เช่น

1) ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์เบนซิน

2) ใช้เป็นสารเคมีโดยตรง เช่น ใช้เป็นตัวทำละลาย (Solvent)

3) ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์

4) ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตสารเคมีประเภทอื่นๆ เช่น น้ำหอม เครื่องสำอาง อาหาร ยา สารเคลือบผิว เป็นต้น

2.1.5 เทคโนโลยีการผลิตเอทานอล

เอทานอลสามารถผลิตขึ้นได้จากวัตถุดิบที่เป็นชีวมวลประเภทที่มีแป้งหรือชีวมวลที่ให้สารคาร์โบไฮเดรตในรูปแป้ง ชีวมวลที่ให้คาร์โบไฮเดรตประเภทน้ำตาล และชีวมวลในรูปของเซลลูโลส เช่น วัสดุทางการเกษตร ไม้ เป็นต้น การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่เป็นชีวมวลดังกล่าว ยกเว้นที่ให้คาร์โบไฮเดรตในรูปน้ำตาล จะต้องผ่านกระบวนการผลิต 3 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้อยู่ในรูปน้ำตาลที่สามารถละลายน้ำได้ ขั้นที่สองหมักน้ำตาลให้กลายเป็นเอทานอลโดยยีสต์ (yeast) และขั้นที่สามแยกเอทานอลจากสารผสมที่ได้จากการหมักโดยวิธีการกลั่น

การผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมสามารถผลิตได้โดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ

1. กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

เอทานอลที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้ไม่อนุญาตใช้เป็นเครื่องดื่ม การสังเคราะห์เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างเมทานอล กับกรีญาร์รีเอเจนต์ (Grignard reagent) ซึ่งกรีญารีเอเจนต์เกิดจากอัลคิลเฮไลด์ทำปฏิกิริยากับแมกนีเซียมใน anhydrous diethyl ether จะได้อัลคิลแมกนีเซียมแฮไลด์ ซึ่งเป็นกรีญารีเอเจนต์ โดยอัลคิลแมกนีเซียมแฮไลด์ จะทำปฏิกิริยากับเมทานอลกลายเป็นเอทานอล

$$\underset{\text{Methanol}}{CH_3OH} + \underset{\text{Bromomagnesium methane}}{CH_3\text{-}MgBr} \xrightarrow{LiAlH_4} \underset{\text{Ethanol}}{C_2H_5OH}$$

ข้อดีของการสังเคราะห์ประเภทนี้คือ ปฏิกิริยาเกิดได้รวดเร็ว และให้ความถูกต้องที่สามารถคำนวณได้อย่างใกล้เคียงหรือแน่นอน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง ใช้เวลาไม่นานเหมือนการหมักเอทานอลด้วยจุลินทรีย์ ที่ต้องรักษาสภาวะให้เหมาะสมในระหว่างการหมัก

ข้อเสียของการสังเคราะห์โดยวิธีนี้คือ ต้องใช้สารเคมีที่จำเพาะมากเป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ สารเคมีเหล่านี้มีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับวัตถุดิบที่ได้จากการเกษตร เอทานอลที่ได้มี

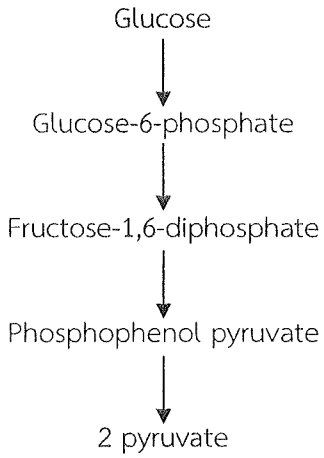
สารอื่นปนมาในระหว่างการสังเคราะห์ซึ่งเป็นสารที่อันตราย สภาวะในการเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างสูง หรือจำเพาะ

2. กระบวนการสังเคราะห์เอทานอลทางชีวภาพ

เป็นการหมักโดยอาศัยจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการใช้คาร์โบไฮเดรตในการเจริญ แล้วให้เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ เมื่อน้ำตาลถูกใช้โดยจุลินทรีย์ น้ำตาลจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ แล้วถูกย่อยสลายโดยวิถีไกลโคไลซีส (Glycolysis pathway) หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) จะไม่มีการใช้อากาศในปฏิกิริยา แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นไพรูวิก 2 โมเลกุล ซึ่งไพรูวิกนี้ในแต่ละสิ่งมีชีวิตจะถูกนำไปเป็นสารตั้งต้นในหลายๆ เมตาบอลิซึมภายในเซลล์ (Intermediate) โดยในยีสต์และแบคทีเรียจะเปลี่ยนไพรูวิกไปเป็นเอทานอล (Harden, 1929)

กลไกการสังเคราะห์เอทานอลจากจุลินทรีย์ แบ่งได้ 2 ขั้นตอน

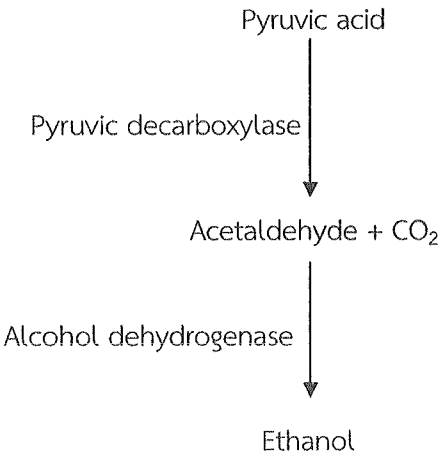
1) วิถีไกลโคไลซีส (Glycolysis pathway) ในสภาวะที่ไม่ใช้อากาศ ระบบมีความเป็นกรดเล็กน้อย และมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน น้ำตาลจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูวิก ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลได้



ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงกลูโคสเป็นไพรูเวทโดยวิถีไกลโคไลซีส (Glycolysis pathway)

2) วิถีการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นเอทานอล

หลังจากที่กลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซีสจะได้ไพรูวิก 2 โมเลกุล โดยกรดไพรูวิก นี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารต่างๆ ขึ้นอยู่กับกลไกของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ในกรณีที่ไม่มีอากาศจุลินทรีย์จะเปลี่ยนกรดไพรูวิกไปเป็นเอทานอล (Buchner, 1897 อ้างอิงใน พรพจน์ และคณะ, 2547) ไพรูวิกที่ได้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล ทำให้ได้เอทานอลที่สูงขึ้น แต่ในจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลจะมีกระบวนการใช้สารแตกต่างกันออกไปทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นออกมาร่วมกับเอทานอล หรือจุลินทรีย์นั้นอาจสามารถใช้เอทานอลนั้นในการเจริญต่อไปอีก ทำให้ได้เอทานอลลดลงจากทฤษฎี



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของกรดไพรูวิกไปเป็นเอทานอลในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (Buchner, 1897 อ้างอิงใน พรพจน์ และคณะ, 2547)

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรหลายชนิด แบ่งได้เป็น 3 ประเภทหลักๆ ที่สำคัญ คือ วัตถุดิบประเภทแป้ง วัตถุดิบประเภทน้ำตาล และวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส โดยที่วัตถุดิบประเภทแป้งและเซลลูโลสจะถูกย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลก่อน แต่วัตถุดิบประเภทที่เป็นน้ำตาลอยู่แล้วสามารถนำไปใช้หมักได้เลย ระยะเวลาในการหมักเพื่อให้ได้เอทานอลจะประมาณ 48 ชั่วโมง จะได้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 8-12 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

2.2.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล

ได้แก่ น้ำอ้อย กากน้ำตาล และบีทน้ำตาล ยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้ได้เลย โดยไม่ต้องผ่านการย่อยเพื่อเป็นน้ำตาล (Pretreatment) ใดๆ โดยมีโครงสร้างของการเปลี่ยนแปลงทางเคมีดังนี้

น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส+ฟรุกโตส เอทานอล

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \text{ ----------> } 2C_6H_{12}O_6 + \text{Yeast ----------> } 4C_2H_5OH + 4CO_2$$

2.2.2 วัตถุดิบปะเภทแป้ง

ได้แก่ มันสำปะหลัง ธัญพืช และมันฝรั่ง โดยมีโครงสร้างการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ดังนี้

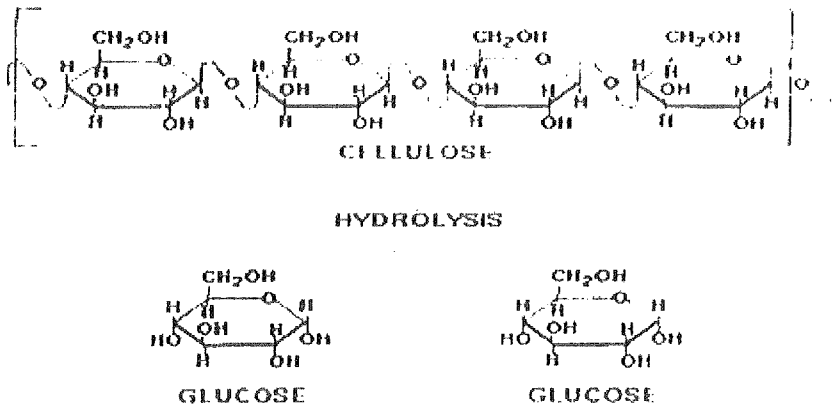
แป้ง น้ำตาลกลูโคส เอทานอล

$$H(C_6H_{10}O_5)_NOH \text{ -------ย่อย---------> } nC_6H_{12}O_6 + \text{Yeast ----------> } 2C_2H_5OH + 2nCO_2$$

แป้งในวัตถุดิบจะต้องถูกย่อยให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนจากนั้นยีสต์จึงจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้

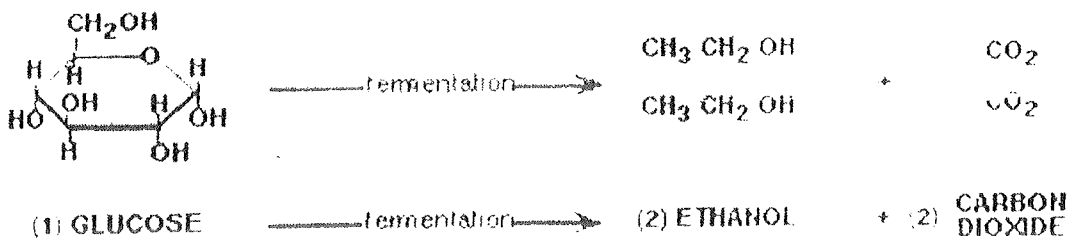
2.2.3 วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

ได้แก่ ผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น ฟางข้าว กากอ้อย ซังข้าวโพด และกากของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ฯลฯ (สมพร อิศวิลานนท์ และคณะ, 2546) การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสนั้น ขั้นตอนแรกจะใช้กระบวนการไฮโดรไลซิส ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงพันธะในเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลส ไปเป็นน้ำตาลกลูโคสดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การย่อยเซลลูโลส หรือเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส

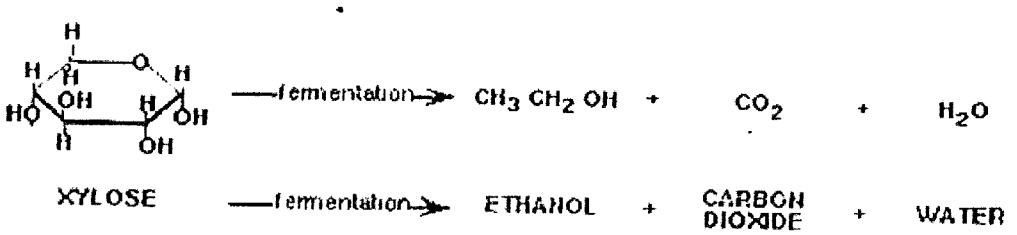
โครงสร้างที่มีมวลโมเลกุลใหญ่จะถูกย่อยสลายให้กลายเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์ หรือกรด จากนั้นน้ำตาลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล โดยผ่านกระบวนการหมัก ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล ด้วยกระบวนการหมัก

โดยทั่วไปกลูโคส 1 โมเลกุล สามารถผลิตเอทานอลได้ 2 โมเลกุล และจะได้คาร์บอนไดออกไซด์อีก 2 โมเลกุล โดยตรวจสอบได้จากน้ำหนักโมเลกุลซึ่งเอทานอลจะมีน้ำหนักโมเลกุลเป็นครึ่งหนึ่งของสารตั้งต้น (กลูโคส)

สำหรับปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลส (xylose) ไปเป็นเอทานอล แสดงดังภาพที่ 5 ซึ่งปกติแล้วน้ำตาลไซโลสสามารถหมักได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นเอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ



ภาพที่ 5 แสดงการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลส (xylose) ไปเป็นเอทานอล

แม้ว่าจะมีวัตถุดิบอยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ แต่จะมีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยมีหลักเกณฑ์ที่ควรพิจารณา คือ

- วัตถุดิบมีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนสู่โรงงานได้ตลอดทั้งปี หาได้ง่าย ราคาถูก
- สามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบ และต่อหน่วยของพื้นที่เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง
- พลังงานสมดุลของระบบเป็นบวก
- วัตถุดิบนั้นจะต้องไม่แย่งอาหารมนุษย์ (http://www.region8.m-energy.go.th/ethanol.htm)

สำหรับประเทศไทยวัตถุดิบที่ได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการเอทานอลแห่งชาติว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเอทานอลมีเพียง 3 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบปริมาตรของเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบชนิดต่างๆ

วัตถุดิบ (1ตัน)	ปริมาตรเอทานอลที่ผลิตได้ (ลิตร)
กากน้ำตาล	260
อ้อย	70
หัวมันสำปะหลังสด	180
ข้าวฟ่าง	70
ธัญพืช (เช่น ข้าวโพด)	375
น้ำมะพร้าว	83

(ที่มา: http://www.region8.m-energy.go.th/ethanol.htm)

จากข้อมูลในตารางที่ 2 จะเห็นว่าวัตถุดิบ คือ ธัญพืช (เช่น ข้าวโพด) ที่มีน้ำหนัก 1 ตัน สามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ปริมาตรสูงสุด รองลงมาคือ กากน้ำตาล หัวมันสำปะหลังสด น้ำมะพร้าว ข้าวฟ่าง และอ้อย ตามลำดับ

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ

วัตถุดิบ	ต้นทุนการผลิตเอทานอล (บาท/ลิตร)
หัวมันสำปะหลังสด	8.94
มันสำปะหลังเส้น	9.41
แป้งมันสำปะหลัง	13.5
อ้อย	10.54
ข้าวโพด	10.65

(ที่มา: http://www.region8.m-energy.go.th/ethanol.htm)

จากข้อมูลในตารางที่ 3 จะเห็นว่าวัตถุดิบที่เป็นหัวมันสำปะหลังสด เมื่อนำมาผลิตเป็นเอทานอลมีต้นทุนการผลิตต่ำสุด รองลงมาคือ มันสำปะหลังเส้น อ้อย ข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง ตามลำดับ

2.3 ยีสต์

การใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมที่สำคัญและรู้จักกันดี คือ การใช้ยีสต์ในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบพวกคาร์โบไฮเดรตและการผลิตยีสต์ขนมปัง สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นมาโดยอาศัยกระบวนการหมัก (Fermentation Process) ได้แก่ เบียร์ สุรา ขนมปัง ไวน์ ผลิตภัณฑ์ทางเคมี เป็น

ต้น จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ ได้แก่ เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ทั้งนี้เนื่องจากว่าเชื้อนี้มีคุณสมบัติดังนี้

1) เจริญรวดเร็ว
2) มีความคงทนต่อแอลกอฮอล์ได้สูง
3) ให้แอลกอฮอล์ในปริมาณสูง

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นสูง จัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต รูปร่างและโครงสร้างของยีสต์จะแตกต่างกันไปตามสปีชีย์ เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีความสำคัญทางการเกษตรและอุตสาหกรรมมาก จึงทำให้มีผู้ศึกษารายละเอียดของยีสต์ชนิดนี้มาก อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีผู้ศึกษารายละเอียดของยีสต์ชนิดอื่นเพิ่มขึ้น เช่น *Hansenula, Rhodotorula, Kluyveromyces* และอื่นๆ

ยีสต์แต่ละชนิดมีปฏิกิริยาทางสรีระวิทยาที่แตกต่างกันเช่น การย่อยสลายน้ำตาล เช่น กลูโคส อาจเกิดในลักษณะที่ไม่ใช้ออกซิเจน (กระบวนการหมัก) หรือใช้ออกซิเจน (กระบวนการหายใจ) กระบวนการที่เป็นแบบฉบับมากที่สุดก็คือ การย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนหรือที่รู้จักกันว่ากระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งผลผลิตสุดท้ายจะได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซน์ ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

ในสภาพที่มีออกซิเจนในกระบวนการหายใจ จะเกิดการออกซิเดชันกลูโคสอย่างสมบูรณ์จนได้คาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ แต่ถ้าเกิดออกซิเดชันไม่สมบูรณ์จะได้กรดและสารตัวกลางอื่นๆ ผลผลิตที่สำคัญได้แก่ แอลกอฮอล์ กรด เอสเทอร์ กลีเซอรอลและอัลดีไฮด์ ก่อนที่ยีสต์จะเกิดกระบวนการหมักได้สารโมเลกุลใหญ่ เช่น ได–. ไ ตร – และพอลีแซคคาไรด์จะต้องถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (ไฮโดรเลส) ชนิดของเอนไซม์ไฮโดรเลสจะแตกต่างกันไปตามจีนัส และ สปีชีส์ของยีสต์ ซึ่งใช้คุณสมบัตินี้ในการแยกความแตกต่างของแต่ละสปีชีส์ได้ นอกจากนี้ยีสต์ยังมีเอนไซม์อื่นๆ เช่น แลกเทส (lactase) อินเวอร์เทส (Invertase) และคาตาเลส (Catalase) ซึ่งมีความสำคัญทางการค้า

ยีสต์ได้รับไนโตรเจนจากสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อนำไปสร้างโปรตีนและยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้แอมโมเนียไอออนได้ ความสามารถในการใช้ไนเตรตและไนไตรต์และสามารถดึงหมู่อะมิโนออกจากกรดอะมิโน ช่วยแยกความแตกต่างของยีสต์แต่ละสายพันธุ์และสปีชีย์ได้

ยีสต์ต้องการซัลเฟอร์อาจอยู่ในรูปซัลเฟต หรือสารอินทรีย์ซัลเฟอร์ เช่น ซีสเตอีน หรือ เมทิโอนิน แร่ธาตุอื่นๆ เพื่อการเจริญ เช่น โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม สารที่ต้องการในปริมาณน้อย (Trace elements) คือโบรอน ทองแดง สังกะสี เหล็ก ไอโอดีน และ โมลิดินัม เพื่อให้ยีสต์เจริญเติบโตมากที่สุด

ยีสต์พวกที่ชอบแรงดันออสโมติกสูง (Osmophilic yeast) สามารถเจริญได้ในที่มีความเข้มข้นเกลือหรือน้ำตาลสูงๆ ได้โดยมีความขึ้นจำกัด

ยีสต์สามารถเจริญในช่วงที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 0-47 องศาเซลเซียส บางชนิดไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส ในขณะที่บางชนิดจะไม่เจริญในที่อุณหภูมิต่ำกว่านี้อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ที่ 20-30 องศาเซลเซียส ยีสต์ที่ก่อโรคจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส

โดยทั่วไปยีสต์จะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีความเป็นกรดระหว่าง pH 3.5 ถึง 3.8 ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่

การเลี้ยงในห้องทดลอง โดยให้ก๊าซออกซิเจนเพื่อเร่งการเจริญเติบโต อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เช่น อาหารวุ้นแข็ง (Nutrient agar) และอาหารเหลว (Nutrient broth) สามารถใช้เลี้ยงยีสต์ได้ อาหารที่ใช้แยกยีสต์คือ 5% มอลต์เอกแทรกซต์อะการ์ (5% malt extract agar) อาหารชนิดอื่นๆ เช่น วิกเกอร์แฮมมีเดียม (Wickerham 's medium) ดังตารางที่ 4 และอาหารที่เตรียมจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ผลไม้และผัก ทำให้ยีสต์เจริญได้ดีด้วย

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (นงลักษณ์, 2541)

อาหารวิกเกอร์แฮม	เปอร์เซ็นต์
มอลต์เอกแทรกซต์	0.3
ยีสต์เอกแทรกซต์	0.3
เพปโทน	0.5
กลูโคส	1.0
วุ้น	2.0
อาหารกระตุ้นการสร้างสปอร์	ปริมาณ
โซเดียมอะซิเตต (แอนไฮดรัส)	0.5 กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	1.0 กรัม
วุ้น	1.5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

2.4 แก่นตะวัน

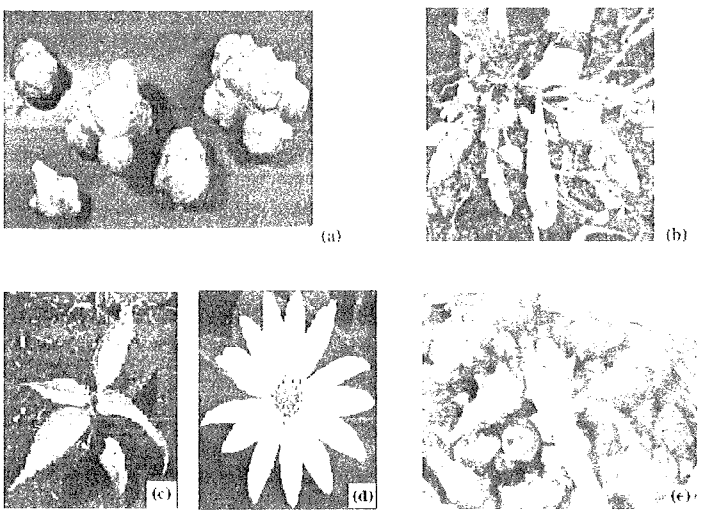
แก่นตะวัน มีชื่อสามัญว่า เยรูซาเล็ม อาร์ติโชค (Jerusalem artichoke) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus* L. จัดอยู่ในตระกูล Asteraceae ซึ่งพืชในกลุ่มนี้ ได้แก่ เบญจมาศและเก๊กฮวย จัดอยู่ในสกุลเดียวกับทานตะวัน คือ สกุล *Helianthus*

แก่นตะวันมีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบอเมริกาเหนือซึ่งเป็นเขตหนาว แต่มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพเพาะปลูกในเขตร้อนได้ดี และเจริญเติบโตได้ดีแม้ในสภาพที่ค่อนข้างแห้งแล้ง เป็นพืชล้มลุก ที่มีหัวสะสมอาหารลักษณะหัวเป็นตะปุ่มตะป่ำผิวไม่เรียบคล้ายหัวของขิงหรือข่า หัวมีสีขาว

248162

หรือเหลือง แต่ละหัวยาวประมาณ 7.5-10.0 เซนติเมตร (ภาพที่ 6) ลำต้นมีกิ่งก้านเรียวเล็ก มีขนคล้ายหนามกระจายทั่วลำต้น ความสูงต้นประมาณ 1.5-3.0 เมตร ใบเกิดสลับบนลำต้น ใบมีลักษณะเรียวยาวรูปไข่หรือวงรี ขอบใบมีรอยหยักแบบฟันปลา พื้นผิวใบสากเพราะมีขนเช่นเดียวกับลำต้น (สนั่น และคณะ, 2549)

หัวแก่นตะวันมีน้ำเป็นส่วนประกอบ 80 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต 13-18 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือจะเป็นสารประกอบพวกไขมัน โปรตีนและเส้นใย โดยประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดจะเป็นน้ำตาลฟรุคโตส (NNFCC, 2002 อ้างถึงใน สนั่น และคณะ, 2549) ที่อยู่ในรูปของสารอินูลินและโอลิโกฟรุคโตส (oligofructose) สารอินูลินเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตโพลิเมอร์ที่พืชเก็บสะสมไว้ จัดเป็นเส้นใยอาหารและเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นหัวของแก่นตะวันจึงสะสมน้ำตาลสูงและมีแป้งต่ำ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการผลิตเอทานอล โดยนำน้ำตาลที่ได้ไปหมัก ตามกระบวนการในการผลิตเอทานอล ฟรุคโตสที่พบในหัวแก่นตะวันสามารถละลายและแยกตัวได้ดีโดยความร้อน และจะตกตะกอนเมื่อได้รับความเย็น โดยหัวแก่นตะวัน 1 ตันสามารถผลิตเอทานอลได้ 80-100 ลิตร (NNFCC, 2000 และ Fernandez, 2006 อ้างถึงใน สนั่น และคณะ, 2549)



ภาพที่ 6 หัวแก่นตะวัน (a,b,e), ใบ(c), ดอก(d) (สนั่น และคณะ, 2549)

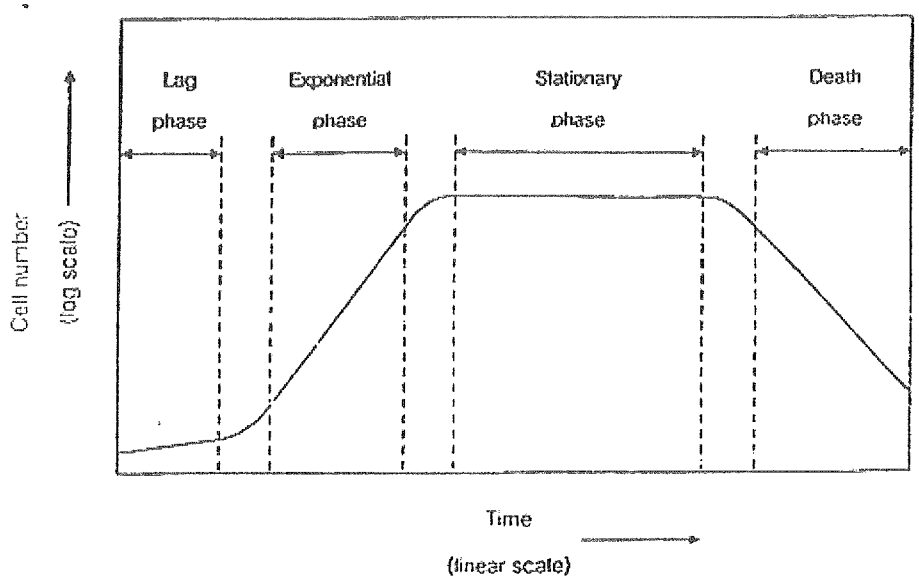
2.5 กระบวนการหมัก

กระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลแบ่งเป็น 4 ประเภทหลักๆ คือ กระบวนการหมักแบบกะ แบบกึ่งกะ แบบต่อเนื่อง และแบบกึ่งต่อเนื่อง ซึ่งการหมักแบบกะและแบบต่อเนื่องเป็นการหมักที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตเอทานอล กระบวนการหมักแต่ละประเภทมีทั้งข้อดี ข้อเสีย ซึ่งในการเลือกใช้กระบวนการใดในการหมักควรคำนึงถึงคุณสมบัติของวัตถุดิบที่ใช้ รวมทั้งเงินทุนและต้นทุนในการดำเนินการ โดยเฉพาะค่าร้อยละผลได้ (% Yield) และอัตราผลผลิต (Productivity) เป็น

สิ่งสำคัญในการเลือกกระบวนการหมัก ซึ่งกระบวนการหมักที่ดีควรมีการลงทุนต่ำ แต่สามารถผลิตและเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้สูง

2.5.1 การหมักแบบกะ (Batch fermentation)

การหมักแบบกะจะมีการเติมสารอาหารเมื่อเริ่มต้นเท่านั้น แล้วปฏิกิริยาชีวภาพจะดำเนินต่อไปจนกว่าจะถึงจุดที่ต้องการแล้วจึงแยกเซลล์หรือเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ออก โดยทั่วไปจะรอจนผลิตภัณฑ์มีปริมาณสูงสุดและมีอัตราการเปลี่ยนแปลงสั้นที่สุด ในการหมักแบบกะจุลินทรีย์จะมีรูปแบบการเจริญดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ลักษณะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการหมักแบบกะ

เมื่อเติมจุลินทรีย์ลงในอาหารระยะแรกเซลล์จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน เรียกระยะนี้ว่า lag phase เนื่องจากเป็นระยะที่เชื้อกำลังปรับตัว ในช่วง lag phase นี้กระบวนการในระดับอุตสาหกรรมจะต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นตามลำดับ จนกระทั่งเข้าสู่ log phase หรือ exponential phase ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีการแบ่งตัวเป็นทวีคูณ จำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นแบบ exponential การเจริญเติบโตระยะนี้จะเกิดขึ้นต่อไปหลายชั่วโมง จนกว่าองค์ประกอบของอาหารมีการเปลี่ยนแปลง เช่น อาหารมีปริมาณลดลง และปริมาณออกซิเจนที่จำกัดเนื่องจากเซลล์หนาแน่น เมื่อถึงจุดนี้การเจริญจะช้าลงและปริมาณเซลล์ค่อนข้างจะคงที่ เซลล์จะเข้าสู่ระยะใหม่ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์หยุดการทวีจำนวนและอยู่ในสภาวะคงที่ไปช่วงระยะเวลาหนึ่ง การหยุดทวีจำนวนนั้นอาจเนื่องมาจากปริมาณสารอาหารบางอย่างหมดหรือลดน้อยลงหรือมีการสร้างสารพิษระหว่างการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ การที่จำนวนประชากรคงที่นั้นแสดงว่าเซลล์ไม่มีการบ่งตัวอีก หรืออัตราการเจริญเท่ากับอัตราการ

ตายหรือสมดุลกัน ถึงแม้ว่าไม่มีการเจริญเกิดขึ้นระหว่างนี้ก็ตาม แต่หน้าที่ต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น เมตาบอลิซึมทางพลังงาน และกระบวนการสร้างทางชีวภาพยังเกิดขึ้น ระยะนี้เรียกว่า stationary phase ระยะสุดท้ายจุลินทรีย์ที่มีอยู่จะมีการตายเร็วกว่าการเพิ่มจำนวนระยะนี้เรียกว่า death phase ซึ่งเกิดจากอาหารหมดหรือมีการสะสมสารยับยั้งการเจริญ เช่น กรด หรือสารพิษ จุลินทรีย์ระยะนี้ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้งานเพราะมีจำนวนน้อยและมีแต่เซลล์ตาย ขนาดเซลล์เล็กผิดปกติ อาจมีขนาดยาวหรือเป็นเส้น มีหลายนิวเคลียส ไม่มีผนังเซลล์หรือผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ เซลล์ต่างๆ เหล่านี้ถ้านำไปเลียงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ก็จะกลับมาเป็นเซลล์ปกติการหมักแบบกะนี้นิยมใช้กับกระบวนการขนาดเล็กเพราะจะมีราคาถูกและประหยัดมีการควบคุมการทำงานที่ง่าย เช่น การหมักไวน์ เบียร์ สุรา และแอลกอฮอล์ เป็นต้น นอกจากนี้กระบวนการที่ต้องควบคุมสภาวะต่างๆ โดยมาจะใช้ระบบนี้อยู่ เช่น การผลิตเอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ สารประกอบอินทรีย์ การเพาะเลี้งเนื้อเยื่อและการเพาะเลี้ยงไฮบริโดมา (hybridoma) เป็นต้น เนื่องจากควบคุมสภาพได้ง่ายกว่าระบบอื่น

2.5.2 การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-bath fermentation)

เป็นระบบที่มีการป้อนอาหารเข้าไปในระบบเป็นระยะๆ เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารอาหารได้เต็มที่ และใช้ได้ในปริมาณสูง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ปริมาณสูงจากนั้นจะหยุดการหมัก การหมักแบบกึ่งกะนี้เป็นการขยายการทำงานของการหมักแบบกะออกไปนั้นเอง ซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าการหมักแบบกะหลายประการด้วยกัน เช่น

1) การยับยั้งของสารอาหาร (Substrate inhibition) สารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น กรดน้ำส้ม แอกอฮอล์ เมทานอล และสารประกอบพวกอะโรมาติก สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ แม้ในความเข้มข้นที่ต่ำๆ ก็ตาม การเติมอาหารเหล่านี้อย่างเหมาะสมและต่อเนื่องกันจะช่วยให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้โดยปราศจากการยับยั้งของสารอาหาร

2) การผลิตเซลล์เป็นจำนวนมาก (High cell concentration) ในการเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์แบบกะจะได้ปริมาณเซลล์ไม่มากเท่ากับการเลี้ยงแบบกึ่งกะ

3) อิทธิพลของกลูโคส (Glucose effect) การผลิตยีสต์ขนมปังจากน้ำตาลมอลท์ หรือกากน้ำตาล พบว่ามีแอลกอฮอล์ละลายปนอยู่กับยีสต์ในถังหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารที่เลี้ยงสูงแม้จะให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอ แอลกอฮอล์จะทำให้ปริมาณเซลล์ลดลง การสร้างแอลกอฮอล์แบบนี้เกิดจากอิทธิพลของกลูโคส เพื่อที่จะลดอิทธิพลดังกล่าวจึงได้นำการหมักแบบกึ่งกะมาใช้ผลิตยีสต์ในปัจจุบัน

4) ช่วยลดความหนืดของอาหาร (Decreasing viscosity of broth) โพลิเมอร์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ เช่น Dextran, Pullolan และ Xanthan gum สามารถควบคุมความหนืดของอาหารโดยการค่อยๆ เติมอย่างต่อเนื่อง ซึ่งหากความหนืดเพิ่มมากขึ้นจะมีผลต่อระบบเติมอากาศ เช่น ใบพัดในการกวนจะต้องใช้กำลังไฟฟ้าเพิ่มขึ้น เกิดฟองมากขึ้นทำให้การละลายของออกซิเจนไม่ดีพอ

5) ป้องกันการปะปนของจุลินทรีย์อื่น (Protection from contamination) กรณีของการหมักแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ การหมักแบบกะอาจพบปัญหาการปะปนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นทำให้ผลผลิตแอลกอฮอล์ลดลงหากใช้การหมักแบบกึ่งกะจะช่วยให้ปัญหาเหล่านี้หมดไป

2.5.3 การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous fermentation)

ระบบการหมักแบบนี้จะทำการหมักแบบกะก่อน แต่เมื่ออาหารที่ให้ในระบบเริ่มจะหมดจะมีการนำน้ำหมักออกจากระบบออกไปเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์จะเหลือน้ำหมักส่วนหนึ่งไว้ในถังหมัก หลังจากนั้นก็มีการให้อาหารเข้าไปเหมือนแบบกะป้อนทันที แต่ปริมาตรที่เติมเข้าไปในถังหมักจะเต็มระบบทุกครั้งไม่เหมือนแบบกะป้อน ระบบหมักจะหมุนไปเรื่อยๆ เหมือนดังการหมักแบบต่อเนื่อง แต่ไม่ใช่การหมักแบบต่อเนื่อง ข้อดีของกระบวนการหมักแบบนี้คือ สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ต่อเนื่องระบบไม่แพงเท่าระบบการหมักแบบต่อเนื่อง และสารอาหารที่ให้เข้าไปมีการใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนข้อเสียคือ จะต้องระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อตัวอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ และต้องใช้แรงงานคนคอยดูแลติดตามการใช้อาหารของจุลินทรีย์ แล้วทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตพร้อมกับการให้อาหารชุดใหม่ จึงดูค่อนข้างยุ่งยากพอสมควรถ้าหากมีการดำเนินการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องไปตลอด

2.5.4 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

การหมักแบบต่อเนื่องจะมีการเติมอาหารให้แก่ระบบอย่างต่อเนื่องพร้อมๆ กับการไหลออกของน้ำหมักะอย่างต่อเนื่องในอัตราที่เท่ากัน โดยอัตราการไหลเข้าออกของระบบไม่ควรสูงกว่าอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันการชะจุลินทรีย์ออกจากระบบ ทำให้ไม่มีจุลินทรีย์ในระบบหมัก ในระบบการหมักช่วงหลังๆ จะมีความคงที่ไม่ขึ้นกับเวลา (Steady state) ระบบการหมักนี้เหมาะกับระบบที่ต้องการการผลิตสูงและมีการควบคุมระบบแบบอัตโนมัติ ระบบนี้ยังไม่เป็นระบบที่ใช้อย่างแพร่หลาย แต่มีใช้บ้างกับการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวทดแทนอาหารสัตว์และระบบการหมักก๊าซชีวภาพจากของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น

การเจริญของจุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงด้วยระบบต่อเนื่อง ปริมาณประชากรของเซลล์ (Cell population) สามารถรักษาสภาวะคงตัว (Steady state) อยู่ในช่วง exponential phase ได้เป็นเวลานาน ระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องมีการป้อนอาหารเข้า (Feed in) และนำอาหารออกจากระบบ (Feed out) ตลอดเวลาด้วยอัตราคงที่ค่าหนึ่ง ระบบการหมักแบบต่อเนื่องสามารถแบ่งการควบคุมการทำงานของระบบได้เป็น 2 ลักษณะคือ ระบบต่อเนื่องแบบ Chemostat และแบบ Turbidostat โดยหลักการทั้ง 2 ระบบ คือต้องทำให้ความเข้มข้นของเซลล์ในระบบมีปริมาณคงที่ ดังนั้นการเติมสารอาหารลงไปในถังหมักจะต้องสัมพันธ์กับ generation time ของจุลินทรีย์ โดยถ้าอัตราการให้สารอาหารต่ำ เชื้อจะเข้าสู่ช่วง stationary phase ทำให้ไม่สามารถรักษาระบบให้ดำเนินการแบบต่อเนื่องได้ ในขณะเดียวกันถ้าอัตราการให้อาหารสูงกว่า generation time ของจุลินทรีย์จะทำให้ปริมาณเซลล์ในถังหมักมีปริมาณต่ำหรืออาจเจือจางซึ่งทำให้ระบบไม่สามารถดำเนินการแบบต่อเนื่องได้เช่นเดียวกัน

ระบบแบบ Chemostat อัตราการนำอาหารเข้าและอัตราการนำน้ำหมักออกจากระบบจะมีค่าคงที่ตลอดการดำเนินการ และอัตราการเจริญจะควบคุมโดยปริมาณของสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตที่ pH หรืออุณหภูมิ ส่วนระบบแบบ turbidostat จะมีการควบคุมความเข้มข้นของเซลล์ในถังหมักให้คงที่ โดยการควบคุมอัตราการเติมสารอาหารลงในถังหมักโดยใช้เครื่องควบคุมความขุ่นของเชื้อ ความแตกต่างของกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องทั้งแบบ Chemostat และแบบ Turbidostat แสดงดังตารางที่ 5 (รัตนาภรณ์, 2542)

ตารางที่ 5 ข้อแตกต่างของระบบต่อเนื่องแบบ Chemostat และแบบ Turbidostat (รัตนาภรณ์, 2542)

Chemostat	Turbidostat
1. Feed in และ Feed out ตลอดเวลา 2. Limiting substrate เช่น C-source 3. อัตราการเจริญของเซลล์สามารถปรับได้ตามอัตรา Feed in 4. สามารถจัดระบบได้ง่ายกว่า เนื่องจากกำหนดค่า flow rate ให้คงที่โดยควบคุมปั๊ม	1. Feed in และ Feed out ขึ้นกับความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือปริมาณเซลล์ 2. ป้องกันการสูญเสีย (wash out) ได้ดี 3. ยุ่งยากต่อการจัดระบบเนื่องจากต้องการอุปกรณ์สำหรับวัดความขุ่นและการควบคุม (Optical sensing and controller device)

2.6 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเพื่อผลิตเอทานอล

การหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น สารอาหาร เกลือแร่ วิตามิน อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเข้มข้นของน้ำตาล และอื่นๆ ที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ เป็นต้น

2.6.1 ธาตุอาหาร

ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ มีดังนี้ (วิรัช, 2529)

1) คาร์บอน คาร์บอนถูกใช้เป็นแหล่งพลังงาน ส่วนใหญ่มาจากสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต จะมีบางส่วนที่จะถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของเซลล์ ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะการเจริญและความสามารถในการนำไปใช้ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ เช่น น้ำตาล 6 คาร์บอน (กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส) ยีสต์สามารถใช้ได้ *Candida utilis* สามารถใช้ไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาล 5 คาร์บอน ยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่ได้ เช่น มอลโตส ซูโครส แต่ยีสต์บางชนิด เช่น *S. cerevisiae* สามารถใช้ได้เฉพาะในสภาวะที่มีอากาศ แต่จะไม่สามารถนำน้ำตาลนี้มาใช้ในการหมักได้ในที่มีสภาวะที่ไม่มีอากาศ หรือ *C. utilis* สามารถใช้มอลโตสได้ในสภาวะที่มีอากาศเท่านั้น นอกจากนี้ยีสต์บางชนิด เช่น *S. diastaticus, S. chevalien, Endomycopsis filbuligera* สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้

2) ไนโตรเจน ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10% (โดยน้ำหนักแห้ง) ดังนั้น ไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้ Free ammonium ion เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่ยีสต์บางชนิดสามารถใช้ยูเรียได้ดีกว่าหรือใช้กรดอะมิโนในการเจริญได้ดีกว่าเพราะว่ากรดอะมิโนจะเป็นตัวช่วยควบคุมการทำงานของกลไกภายในเซลล์ยีสต์บางส่วน แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ ได้แก่ เกลือแอมโมเนียซัลเฟต

3) ฟอสฟอรัส ยีสต์มักจะใช้ฟอสฟอรัสในรูปเกลือฟอสเฟต ($H_2PO_4^-$) เกลือฟอสเฟตนี้มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพราะเป็นตัวควบคุมการสังเคราะห์ไขมันคาร์โบไฮเดรต และยังเป็นตัวรักษาสภาพของผนังเซลล์ ยีสต์จะเก็บฟอสเฟตไว้ในแวคคิวโอ (Vacuole) ซึ่งจะพบว่ามีความเข้มข้นประมาณ 110 เท่าของฟอสเฟตที่อยู่ในไซโตพลาสซึม

4) ซัลเฟอร์ ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบประมาณ 0.4% (โดยน้ำหนักแห้ง) โดยยีสต์สามารถใช้ซัลเฟอร์ในรูปอนินทรีย์ซัลเฟต ซัลไฟต์และไทโอซัลไฟต์ และใช้ในรูปสารอินทรีย์เมทไธโอนีน (Methionine) ซัลเฟอร์ทั้งสองแหล่งมีความสำคัญในปฏิกิริยาภายในเซลล์ยีสต์ ในอุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์จะใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแทนเมทไทโอนีน ซีสตีนหรือซีสเตอีน (*Saccharomyces* ไม่สามารถใช้ซีสเตอีนได้) เพราะเมทไทโอนีนมีราคาสูงกว่าเกลือเหล่านี้

5) แร่ธาตุอื่นๆ (Trace element) ยีสต์ต้องการแร่ธาตุในการเจริญเติบโต ที่สำคัญคือ K และ Mg (จัดเป็น Macroelements) ซึ่งมีความต้องการในระดับล้านโมลาร์ ส่วนธาตุรอง (Microelement) ยีสต์มีความต้องการอยู่ในช่วงไมโครโมลาร์ถึงนาโนโมลาร์ เช่น Mn Fe Zn Cu Ni Co และ Mo แต่ยังมีโลหะที่เป็นพิษต่อยีสต์ เช่น Ag As Bs Cs Cd Hg Li และ Pb ถ้าหากความเข้มข้นของโลหะไอออนมีมากก็จะทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของยีสต์เช่นกัน (Walker, 1997)

6) วิตามิน เป็นตัวควบคุมเมตาบอลิซึมของยีสต์ โดยควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง วิตามินทำหน้าที่เป็น co-enzymes ทำให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิตามินที่ยีสต์ต้องการ ได้แก่ biotin และ pantothenic acid นอกจากนี้ยังมี Thiamine, Niacin, Folic acid ความต้องการวิตามินแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์

7) สารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญ เป็นสารอินทรีย์เชิงซ้อนที่ยีสต์มีความต้องการในระดับความเข้มข้นต่ำมีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาหรือมีบทบาทต่อโครงสร้างในเซลล์ยีสต์ แต่ไม่ได้เป็นแหล่งพลังงาน เช่น กรดนิวคลีอีก กรดอะมิโน กรดไขมัน และสเตียรอยด์ เป็นต้น

2.6.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

pH เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการผลิตเอทานอล โดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจาก pH มีผลต่ออัตราการหมัก การสร้างผลพลอยได้ (By product) ตลอดจนควบคุมการปนเปื้อน ซึ่งมีผลต่อการเจริญของยีสต์ ซึ่งยีสต์เจริญได้ในช่วง pH กว้าง โดยพบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ที่ pH ต่ำสุดประมาณ 1.5 ส่วน pH สูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้คือ 8.0-8.5 สำหรับ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป ส่วนใหญ่จะอยู่ที่ระหว่าง pH 4.0-4.5 และยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ไม่ดีในสภาวะที่เป็นด่าง

2.6.3 อุณหภูมิ

การผลิตเอทานอลที่มีอัตราการหมักสูงจะมีอัตราการเกิดความร้อนสูงตามมา ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อยีสต์ที่เพาะเลี้ยง ทำให้กระบวนการหมักหยุดชะงักเนื่องจากยีสต์ตาย นอกจากนั้นอุณหภูมิสูงยังทำให้แอลกอฮอล์ในระบบระเหยจากระบบมากขึ้น ดังนั้นกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมที่มีขนาดใหญ่จำเป็นต้องมีระบบหล่อเย็น เพื่อลดอุณหภูมิระหว่างการหมัก

2.6.4 ความชื้น

ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาพที่มีความชื้นเพียงพอ แต่มีหลายชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลสูงได้ ซึ่งได้แก่พวกออสโมฟิลิคยีสต์ และยีสต์ที่ทนเกลือ ส่วนใหญ่ต้องการความชื้นในการเจริญมากกว่ารา แต่น้อยกว่าแบคทีเรีย ส่วนใหญ่ค่าน้ำอิสระ (Water activity = a_w) เป็นน้ำที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.88-0.94 ยีสต์แต่ละชนิดต้องการค่านี้แตกต่างกัน เช่น กลุ่มออสโมฟิลิคยีสต์ ต้องการค่าน้ำอิสระอยู่ระหว่าง 0.62-0.65 เป็นต้น นอกจากนั้นค่าน้ำอิสระจะขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์แล้ว ยังขึ้นกับลักษณะของอาหาร pH อุณหภูมิ ออกซิเจน การมีหรือไม่มีสารยับยั้งการเจริญ

2.6.5 ออกซิเจน

ยีสต์ส่วนใหญ่จัดเป็นกลุ่มที่เจริญโดยใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนก็ได้ (Facultative anaerobe) โดยทั่วไปยีสต์จะเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ยีสต์จะเจริญได้ช้า ในสภาวะที่มีออกซิเจนยีสต์จะเผาผลาญน้ำตาลให้ได้พลังงานอย่างสมบูรณ์มีผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซน์ โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ส่วนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนยีสต์จะใช้น้ำตาลโดยการหมัก ส่วนใหญ่การหมักน้ำตาลด้วยยีสต์จะได้เอทานอล ในการหมักเอทานอลหากมีออกซิเจนในการหมัก น้ำตาลจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ ซึ่งการหมักจะถูกยับยั้งด้วยกระบวนการหายใจ (positive Pasteur effect) ยกเว้นในยีสต์บางชนิด ได้แก่ *Brettanomyces* ซึ่งจะถูกกระตุ้นการหมักเมื่อมีออกซิเจน (negative Pasteur effect) ยีสต์บางชนิดเจริญได้เฉพาะที่มีอากาศแต่ไม่มีความสามารถในการหมัก (Oxidative yeast) ยีสต์พวกนี้ได้แก่ *Rhodotomila, sporobomyces, Endomycosis* เป็นต้น

2.6.6 คาร์บอนไดออกไซด์

โดยทฤษฎีของการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ จะพบปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 33.33% (โมลคาร์บอนไดออกไซน์ต่อโมลกลูโคส) ซึ่งมีปริมาณรองมาจากเอทานอล และพบว่าการหมักที่ระบบใหญ่จะมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมามาก แรงดันในระบบจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในการเพาะเลี้ยงจำเป็นต้องจัดระบบให้มีทางระบายก๊าซเพื่อป้องกันการระเบิดเนื่องจากแรงดันก๊าซที่เพิ่มขึ้น และยังต้องจัดระบบที่จะนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป โดยคุณสมบัติทางเคมีของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นก๊าซที่สามารถละลายได้ในน้ำปริมาณหนึ่งที่สภาวะหนึ่ง เมื่อละลายในน้ำจะอยู่ในรูปกรดคาร์บอนิค ซึ่งเป็นสาเหตุให้ pH ในระบบต่ำลง แต่กรดคาร์บอนิคไม่ใช่กรดแก่จึงมี pH คงที่ๆ สภาวะหนึ่งหรือ pH จะไม่ลดลงไปได้อีก

ตามปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น การหมักโดยทั่วไปจะมี pH ค่อยๆ ลดลงมาแล้วคงที่ที่ค่าประมาณ 4.5-5.0 ซึ่งเป็นช่วงที่ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี

2.6.7 ความเข้มข้นของเอทานอล

เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการหมัก และเมื่อมีการสะสมเอทานอลในระหว่างการหมักมากขึ้นยีสต์จะเกิดความเครียดมากขึ้น เนื่องจากเอทานอลเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ การเพิ่มความเข้มข้นเอทานอลจะเริ่มยับยั้งยีสต์จนกระทั่งฆ่ายีสต์ กลไกลการเป็นพิษของเอทานอลต่อยีสต์มีคนศึกษาอย่างกว้างขวาง ซึ่งเอทานอลเป็นตัวยับยั้งที่ไม่ต้องแข่งขัน (Non competitive inhibitor) ของอัตราการเจริญของยีสต์

2.6.8 ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

ยีสต์จะตอบสนองต่อสารที่ถูกละลายในอาหาร ซึ่งมีผลในการปรับตัวของยีสต์ได้หลายทาง กรณีที่เกี่ยวกับความเครียดเนื่องจากแรงดันออสโมซิส หากในลักษณะปกติที่ความเข้มข้นภายนอกมากกว่าภายในเซลล์ น้ำภายในเซลล์จะมีทิศทางเคลื่อนที่ออกสู่ภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์เสียสภาพหดตัวมีขนาดเล็กลง เพื่อปกป้องกิจกรรมที่มีอยู่ภายในเซลล์ให้คงอยู่ ยีสต์จึงต้องมีระบบที่ลดปัญหาด้านนี้ เช่น *Deharyomyces hansenii* *S. cerevisiae* หรือ *Zygosaccharomyces rouxii* เมื่อเจริญในอาหารที่มีเกลือและน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีการสังเคราะห์กลีเซอรอล และสะสมเพิ่มขึ้นจนมีผลต่อแรงดันออสโมซิส ที่เกิดจากเกลือเหนี่ยวนำขึ้น เมื่อเลี้ยงไปอีกหลายชั่วโมง พบว่ามีองค์ประกอบของ K^+, Na^+ และ trehalose เพิ่มขึ้น เป็นต้น ความสามารถในการเจริญที่ความเข้มข้นของอาหารแตกต่างกันสามารถแบ่งยีสต์ออกเป็นกลุ่มได้ตามความสามารถในการเจริญ เมื่อพิจารณาทิศทางน้ำเข้าสู่เซลล์ คือ พวกที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมซิส (Osmotolerant) พวกที่ชอบต่อการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมซีส(Osmophilic) และพวกที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมซิสแล้วเจริญได้ไม่ดี (Osmosensitive)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลโดยแก่นตะวัน

Mar-garits และ Bajpai (1983) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแก่นตะวันโดย *K. marxianus* UCD(FST) 55-82 ผลการศึกษาพบว่ายีสต์สามารถหมักให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 102 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของยีสต์มีค่าแปรผันตั้งแต่ 0.44 ต่อชั่วโมง ที่น้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ถึง 0.13 ต่อชั่วโมง ที่น้ำตาลเริ่มต้น 300 กรัมต่อลิตร และผลผลิตเอทานอลมีค่าประมาณ 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้

Mar-garits และ Bajpai (1983) ได้ศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ *K. marxianus* UCD (FST) 55 – 82 ในอาหารที่มีเอทานอลเริ่มต้น 0 – 80 กรัมต่อลิตร โดยอาหารเหลวซึ่งประกอบไปด้วยอินูลิน ที่สกัดได้จากหัวแก่นตะวัน 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 0 – 80 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μmax)

ของเซลล์ ลดลงจาก 0.42 เป็น 0.09 ต่อชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณการผลิตเอทานอล ปริมาณเซลล์ และการใช้น้ำตาลมีค่าคงที่

Gunasekaran และคณะ (1986) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลของเชื้อ *Z. mobilis* 4 สายพันธุ์ พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 เป็นสภาวะที่มีค่าความเหมาะสมต่อสายพันธุ์ ATCC 10988 และ ATCC 12526 ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อสายพันธุ์ NRRL B 4286 และ IFO 13756 และพบว่าสายพันธุ์ NRRL B 4286 สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดเมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์ ส่วนสายพันธุ์ ATCC 10988 และ ATCC 12526 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงเมื่อหมักในน้ำอ้อย แต่ทุกสายพันธุ์จะผลิตเอทานอลได้ต่ำเมื่อหมักในโมลาส

Bajai และ Margaritis (1986) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแก่นตะวันโดยใช้ *K. maxianus* SM 16-10 ที่มีความสามารถในการตกตะกอนรวมกลุ่มกันได้โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 เปอร์เซ็นต์ เชื้อใช้น้ำตาลไป 98 เปอร์เซ็นต์ในเวลาหมัก 7 ชั่วโมง พบว่าค่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 92 กรัมต่อลิตร ผลผลิตเอทานอล 0.47 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ อัตราการผลิตเอทานอล 17.2 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมงและอัตราการใช้น้ำตาล 41 กรัมน้ำตาลต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อนำเซลล์มาใช้ในการหมักแบบกะซ้ำ 7 ซ้ำ พบว่าประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลตามทฤษฎี มีค่าเท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่อัตราการผลิตเอทานอลเพิ่มจาก 17.21 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมงในการหมักครั้งแรกเพิ่มไปถึง 21 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง ในการหมักครั้งสุดท้าย

Ohta และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากอินูลินบริสุทธิ์ โดยใช้วิธีการหมักแบบ silmultaneous saccharification and fermentation (SSF) โดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger* 817 ร่วมกับ *S. cerevisiae* 1200 ผลการศึกษาพบว่า *A. niger* 817 สามารถผลิตเอนไซม์อินูลิเนส (inulinase) ได้ และมีกิจกรรม (activity) สูงถึง 48.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อหมักอินูลินด้วยการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมอินูลินเป็นระยะๆ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. niger* 817 ร่วมกับ *S. cerevisiae* 1200 สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงถึง 20 – 21 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในระยะเวลาการหมัก 3 วัน

Nakamura และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากหัวแก่นตะวัน ด้วยวิธี silmultaneous saccharification and fermentation (SSF) ซึ่งใช้ *Aspergillus niger* 817 ร่วมกับ *S. cerevisiae* 1200 ในการหมักแบบกึ่งกะ พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ 10.4 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใช้เวลาหมัก 15 ชั่วโมง โดยใช้หัวแก่นตะวันเป็นวัตถุดิบ เมื่อใช้หัวแก่นตะวันบดเป็นวัตถุดิบร่วมกับเอนไซม์ผงที่ได้จาก *A. niger* 817 ผลิตเอทานอลได้ 15.0 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใช้เวลาหมัก 72 ชั่วโมง เมื่อใช้น้ำคั้นที่ได้จากหัวแก่นตะวันเป็นวัตถุดิบร่วมกับเอนไซม์ผงที่

ได้จาก *A. niger* 817 และผลิตเอทานอลได้ 20.1 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใช้เวลาหมัก 120 ชั่วโมงเมื่อใช้แป้งที่แปรรูปได้จากหัวแก่นตะวันเป็นวัตถุดิบร่วมกับ *A. niger* 817 ที่เลี้ยงอยู่ในอาหาร

Schorr-Galindo และคณะ (2000) ศึกษาอัตราการหมักเอทานอลจากแก่นตะวันโดยใช้ *S. diastaticus* NCYC 625 ผลการศึกษาพบว่าเมื่ออัตราส่วนของน้ำตาลฟรุกโตสต่อกลูโคสเพิ่มขึ้น อัตราการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ลดลง ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่ออัตราส่วนของฟรุกโตสต่อกลูโคสเท่ากับ 6.0 มีค่าประมาณ 45 กรัมต่อลิตร แต่เมื่ออัตราส่วนของน้ำตาลทั้งสองชนิดลดลงเหลือ 3.5 เอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 65 กรัมต่อลิตร

Szambelan และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* และ *Z. mobilis* กับ *K. fragilis* ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ในสภาวะเชื้อผสม แต่ในสภาวะเชื้อเดี่ยว ความเข้มข้นของเอทานอลมีค่าประมาณ 0.46 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ โดยความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบค่าปริมาณผลผลิตในทางทฤษฎีพบว่าการใช้เชื้อผสมทำให้ปริมาณการผลิตเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 2- 4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับสภาวะการใช้เชื้อเดี่ยว

Xiang-Yang Ge และ Wei-Gue Zhang (2005) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากหัวแก่นตะวันบด และแป้งที่แปรรูปจากหัวแก่นตะวัน โดยใช้ *A. niger* SL-09 ร่วมกับ *S. cerevisiae* Z-06 ด้วยวิธี simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ในการหมักแบบกึ่งกะ พบว่า *S. cerevisiae* Z-06 สามารถใช้น้ำตาลทั้งหมดได้ 98 เปอร์เซนต์ และผลิตเอทานอลได้ 19.6 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายในเวลา 48 ชั่วโมง หากคำนวณประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลตามทฤษฎี มีค่าเท่ากับ 90 เปอร์เซนต์