บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล

2.1.1 คุณสมบัติทั่วไปของเอทานอล

เอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งซึ่งในสภาวะปกติจะอยู่ในสภาวะของเหลวใส ระเหยง่ายมีรสขมและมีกลิ่นเฉพาะ ติดไฟและให้เปลวไฟที่มีความร้อนประมาณ 7,100 แคลอรี่ต่อกรัม ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำหรือสารละลายอินทรีย์ ที่ความดันบรรยากาศ เอทานอลมีจุดเดือดและจุดเยือกแข็งที่ 78 และ -117.3 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 60 องศาฟาเรนไฮต์ มีค่าความถ่วงจำเพาะ 0.794 กรัมต่อมิลลิลิตร และค่าออกเทน เท่ากับ 113 (Wikipedia, 2010)

ในอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลออกมาจำหน่าย สามารถแบ่งเป็น 3 ประเภท (Wikipedia, 2010) ดังนี้

1. Denatured alcohol (Britain, 2005; Howell, 2007) คือ แอลกอฮอล์ที่มีการปรับแต่งให้ไม่เหมาะต่อการบริโภค เนื่องจากภาษีสรรพสามิตของแอลกอฮอล์บริสุทธิ์และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีราคาแพงมาก การควบคุมให้มีการละเว้นของภาษีนั้น ผู้ผลิตจึงเพิ่มระดับแอลกอฮอล์ให้ไม่เหมาะต่อการบริโภค ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ denatured alcohol ได้แก่ กลุ่มสารให้ความขม (denatonium benzoate) สารพิษ (เมทานอล (methanol) แนฟทาร์ (naphtha) และไพริดีน (pyrimidine)) และผลิตภัณฑ์สำหรับให้ความร้อนและแสงสว่าง เป็นต้น

2. Absolute หรือ anhydrous alcohol คือ แอลกอฮอล์ที่ไม่มีน้ำหรือมีในปริมาณที่ต่ำมาก ซึ่งระดับของปริมาณน้ำที่เป็นองค์ประกอบมีตั้งแต่ 1 ในล้านส่วน (ppm) จนถึง 1 ในร้อยส่วน absolute alcohol นี้จะไม่นำมาใช้บริโภค เนื่องจากมีส่วนผสมของสารพิษกลุ่มเบนซีน (benzene) ในปริมาณเล็กน้อยจากขั้นตอนการกลั่น (Bernthsen และ Bansal, 2003) absolute alcohol นิยมใช้เป็นตัวทำละลายในห้องปฏิบัติการและการประยุกต์ใช้สำหรับเป็นเชื้อเพลิงในการเผาไหม้เครื่องยนต์ในอุตสาหกรรม ค่าสเปกโตรสโคปิค (spectroscopic) ของเอทานอลที่เป็น absolute alcohol จะมีค่าต่ำกว่าค่าการดูดกลืนแสงในแสงยูวี (UV light) และแสงที่สามารถมองเห็นได้ (visible light) ซึ่งมีความเหมาสมสำหรับการนำมาใช้เป็นตัวทำละลายในการวิเคราะห์ด้วย ultraviolet-visible spectroscopy

3. Rectified spirits คือ แอลกอฮอล์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นซ้ำและมักใช้แทน absolute alcohol ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การแพทย์ และการผลิตเครื่องสำอาง เนื่องจากมีความบริสุทธิ์มากกว่า (Bernthsen และ Bansal, 2003)

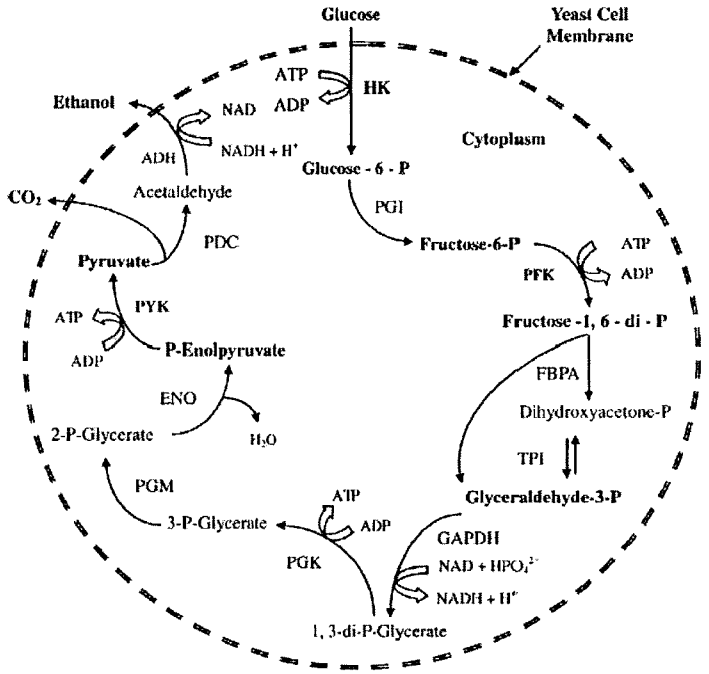
2.1.2 ประโยชน์ของเอทานอล

เอทานอลมีคุณสมบัติที่สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้เช่นเดียวกับน้ำมันเบนซินและดีเซลเนื่องจากสามารถจุดติดไฟได้ และให้ความร้อนเมื่อถูกเผาไหม้ นอกจากนี้เอทานอลยังมีส่วนผสมของออกซิเจน จึงมีคุณสมบัติที่ใช้เป็นสารเติมออกซิเจนและเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเชื้อเพลิงได้อีกด้วย สำหรับส่วนที่เหลือจากการเผาไหม้เมื่อออกสู่บรรยากาศจะมีปริมาณออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น มลพิษพวกไฮโดรคาร์บอน คาร์บอนมอนอกไซด์ ปริมาณฝุ่น และควันดำจะลดลง จึงจัดเป็นเชื้อเพลิงสะอาดอย่างหนึ่ง (Balat และ Balat, 2009; Tollefson, 2009) เอทานอลสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้หลายรูปแบบ ได้แก่ การนำเอทานอลร้อยละ 95 - 99.6 เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง ทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล แต่ต้องมีการปรับแต่งเครื่องยนต์ให้เหมาะสมกับการใช้เอทานอลก่อน มิฉะนั้นเครื่องยนต์จะเกิดปัญหากระตุกขณะเคลื่อนที่ แต่ถ้าหากนำเอทานอลผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วนที่เหมาะสม ไม่จำเป็นต้องปรับแต่งเครื่องยนต์ ประเทศในกลุ่มยุโรปพบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสม คือ ใช้เอทานอลผสมอยู่ในช่วงร้อยละ 20 - 35 (ชูชาติ, 2546) นอกจากนี้เอทานอลสามารถใช้เป็นเครื่องดื่มแอกอฮอล์ เช่น เหล้า ไวน์ และเบียร์ ใช้เป็นสารเสริมช่วยออกฤทธิ์และตัวทำละลายในอุตสาหกรรมยา ใช้เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (เช่น สี แล็กเกอร์ ยาเคลือบน้ำมัน และขี้ผึ้ง) ใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์สารเคมีและชีวเคมี ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซินที่เรียกว่าแก๊สโซฮอล์ ใช้เป็นอาหาร (เช่น น้ำส้มสายชู เจลาติน) ใช้ทางด้านการแพทย์ (เช่น ใช้เช็ดแผล ใช้ฆ่าเชื้อทำความสะอาดแผลสด) และใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นต้น (Chen และคณะ 2009; Suárez และคณะ 2009)

2.1.3 การผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวภาพเป็นกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการใช้คาร์โบไฮเดรตในการเจริญ แล้วให้เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลัก จุดประสงค์ประการหนึ่งของการผลิตเอทานอลทางชีวภาพ คือ ต้องการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบสูง กลับมาใช้ให้ประโยชน์มากขึ้น โดยในทางทฤษฎี จากกระบวนการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ เมื่อน้ำตาลถูกใช้โดยยีสต์ น้ำตาลจะถูกนำเข้าสู่เซลล์แล้วถูกย่อยสลายโดยวิถีไกลโคไลซีส (glycolysis pathway) หรือวิถีอีเอ็มพี (Embden - Meyerhof – Parnas, EMP) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 โดยวิถีนี้เกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีการใช้อากาศ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไพรูวิก 2 โมเลกุล ซึ่งกรดไพรูวิกนี้ในสิ่งมีชีวิตจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในหลายเมแทบอลิซึม (metabolism) ภายในเซลล์ ยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดสามารถเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นเอทานอลได้ อย่างไรก็ตามการคัดเลือกสายพันธุ์และควบคุมสภาวะให้เหมาะสมมีความจำเป็น เพื่อไม่ให้เกิดผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ ในทางทฤษฎีกลูโคสสามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ ร้อยละ 51 (กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคสที่ใช้) และได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 49 (กรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกรัมกลูโคสที่ใช้) สำหรับในทางปฏิบัติแล้ว พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Sacchromyces cerevisiae* และใช้น้ำตาลเฮกโซสเป็นแหล่ง

คาร์บอน จะได้เอทานอลร้อยละ 48.4 คาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 46.5 อะซิทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) ร้อยละ 0.0 - 0.3 กรดอะซิติก (acetic acid) ร้อยละ 0.05 - 0.25 กลีเซอรอล (glycerol) ร้อยละ 2.5 - 3.6 กรดแลคติก (lactic acid) ร้อยละ 0.0 - 0.2 กรดซัคซินิค (succinic acid) ร้อยละ 0.5 - 0.77 และฟูลเซลล์ออยล์ (fuel oil) ร้อยละ 0.025 - 0.5 เป็นต้น ซึ่งจะเห็นว่าได้เอทานอลน้อยกว่าทางทฤษฎี (ณัฐศิษฎ์ และคณะ, 2530)



รูปที่ 2.1 วิถีอีเอ็มพีในยีสต์สายพันธุ์ *Sacchromyces cerevisiae* (Madigan และคณะ, 2000)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisae, S. fragillis, S. urarium, Kluyveromyces fragillis, Nematospora sp., Shizosaccharomyces sp.* และ *Zymomonas mobllis* เป็นต้น (Wahlborm และคณะ, 2003; Tao และคณะ, 2005; Andrietta และคณะ, 2008; Laopaiboon และคณะ, 2009)

2.2 ยีสต์

2.2.1 ลักษณะทั่วไปและโครงสร้างของยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต ยีสต์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมหรือรี นอกจากนี้อาจมีรูปร่างเป็นรูปถั่ว เลมอน ทรงกระบอก สามเหลี่ยม หรือยาวเป็นสาย ขนาดของยีสต์แตกต่างกันในแต่ละชนิด ลักษณะเด่นของยีสต์คือ เป็นเซลล์เดียวและมีหน่อ การแตกหน่อบางครั้งไม่หลุดออกจากกัน แต่เกาะกันเป็นกลุ่ม บางครั้งมีการเปลี่ยนแปลงโดยเซลล์ตรงกลางยาวต่อกันเป็นสาย เรียกซูโด

ไมซีเลียม (pseudomycelium) โครงสร้างทั่วไปของยีสต์คือ ผนังเซลล์หนาประมาณ 25 นาโนเมตร หนักร้อยละ 25 ของน้ำหนักแห้งเซลล์โดยพบโปรตีนประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ โดยอาจอยู่ในรูปเอนไซม์ที่ติดผนังเซลล์ เซลล์เมมเบรนของยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกลิปิดและโปรตีน คาร์โบไฮเดรตมีปริมาณเล็กน้อย มีนิวเคลียสเห็นได้ชัดเจนเมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทรัส (phase contrast microscopy) โดยนิวเคลียส (nucleus) ของยีสต์มักอยู่ระหว่างแวคิวโอล (vacuole) และหน่อ (budding) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) มีรูปร่างกลมหรือรูปท่อน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.3 – 1 ไมโครเมตร ยาว 3 ไมโครเมตร ในยีสต์ที่โตเต็มวัย ภายในเซลล์จะเห็นแวคิวโอลขนาดใหญ่ หน้าที่ของแวคิวโอลยังไม่แน่ชัดแต่พบว่าในแวคิวโอลมีไฮโดรไลติกเอนไซม์ (hydrolytic enzyme) พอลิฟอสเฟต (polyphosphate) ลิปิด สารตัวกลางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และโลหะไอออน จึงเชื่อว่าอาจทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บสะสมอาหาร และไฮไลติกเอนไซม์ ส่วนโครงสร้างอื่น ๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ ไรโบโซมชนิด 80s ร่างแหเอนโดพลาสซึม (endoplasm) กอลจิบอดี (golgi body) และเม็ดไขมัน (Walker, 2010)

2.2.2 ปัจจัยที่สำคัญต่อยีสต์ในการหมักเอทานอล

ปัจจัยที่สำคัญเกี่ยวกับการเจริญของยีสต์ ได้แก่ ธาตุอาหาร เกลือแร่ วิตามิน อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของน้ำตาล ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จะมีผลต่อการหมักเอทานอลด้วย (Stanley และคณะ, 2009; Slininger และคณะ, 2009)

2.2.2.1 ผลของธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามินต่อการหมัก

เมื่อพิจารณาถึงผลของธาตุอาหารแต่ละชนิดต่อการเจริญของยีสต์สามารถแยกออกเป็นกลุ่มได้ ดังนี้

1) ไนโตรเจน ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้ง (Spielewoy และคณะ, 2010) ดังนั้น ไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็น โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้แอมโมเนียมอิออน (ammonium ions) เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่ในยีสต์บางชนิดต้องการกรดอะมิโนที่จำเพาะเท่านั้น เพราะกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นตัวควบคุมการทำงานของวิถีอีเอ็มพี อย่างไรก็ตาม ในตัวยีสต์ประกอบด้วยพิวรีน (purine), ไพริมิดีน (pyrimidines) และกรดอะมิโน ดังนั้นจึงน่าจะใช้ตัวยีสต์เองเป็นแหล่งอะมิโน-ไนโตรเจน (amino-nitrogen) เช่น ในการนำน้ำกากส่า (stillage) กลับมาใช้ละลายกากน้ำตาล (ประมาณ 10-30 เปอร์เซนต์) เรียกกระบวนการนี้ว่า “Stopping back” ซึ่งนอกจากจะได้ธาตุอาหารแล้ว ยังช่วยเพิ่ม buffering capacity และ ลดปริมาณน้ำที่ต้องการใช้รวมทั้งเป็นการกำจัดน้ำกากส่าทิ้งไปในตัวด้วย หรือโดยการนำเอาเซลล์ยีสต์ที่ถูกย่อยสลายกลับมาใช้ใหม่ (cell recycle) แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ คือ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

2) ฟอสฟอรัส โดยมากใช้ในรูปเกลือฟอสเฟต ในอัตราประมาณ 0.6 มิลลิโมลาร์ต่อกรัมเซลล์ ฟอสเฟต (ในรูป $H_2PO_4^-$) มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ เพราะเป็นตัวควบคุมการสังเคราะห์ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต และรักษาสภาพของผนังเซลล์ ดังนั้น ฟอสเฟตจึงเป็น ionic factor ที่สำคัญที่สุดในการหาอัตราการหมัก (rate of fermentation)

3) ซัลเฟอร์ ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 0.4 ของน้ำหนักแห้ง โดยอยู่ในรูปของเมไธโอนีน (methionine, amino acid) แต่เนื่องจากเมไธโอนีนมีราคาแพงมาก ดังนั้น ในอุตสาหกรรมจึงใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแทน (เกลือ inorganic sulphate จะถูกเปลี่ยนเป็น methionine ภายในเซลล์ของยีสต์ แต่ต้องอาศัยพลังงาน 2 moles ATP ต่อ mole SO_4^{2-} reduced)

4) แร่ธาตุต่างๆ แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการหมักของยีสต์แบ่งออกได้เป็น 3 พวก ได้แก่

4.1) Macroelements ได้แก่ K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn และ Cl เป็นต้น ซึ่งยีสต์ต้องการประมาณ 0.1 – 1 มิลลิโมลาร์ และแร่ธาตุพวกนี้เข้าไปในเซลล์ยีสต์โดยอาศัย facilitated diffusion

4.2) Microelements ได้แก่ Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni และ Va เป็นต้น ซึ่งยีสต์ต้องการใช้ในระดับ 0.1 - 100 มิลลิโมลาร์

4.3) inhibitors ได้แก่ Ag, As, Bd, Hg, Li, Ni, Os, Pd, Se และ Te เป็นต้น ถ้ามีในระดับความเข้มข้นสูงกว่า 10 - 100 มิลลิโมลาร์ จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการหมักของยีสต์

ในบางครั้งถ้ามี microelements และ macroelements ในปริมาณมากจะมีผลไปยับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์ได้เช่นกัน

4.4) วิตามิน เป็นตัวควบคุมเมแทบอลิซึมของยีสต์ โดยจะควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากวิตามินเป็นโคเอนไซม์ (co-enzymes) หรือสารเริ่มต้น (precursors) ที่ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้เต็มที่ วิตามินที่ยีสต์ต้องการส่วนใหญ่เป็นไบโอติน และแพนโอธีนิคแอซิด

นอกจากนี้ยีสต์ต้องการวิตามินชนิดอื่น ๆ เช่น ไธอามีน (B1) ไพริด๊อกซิน (B6) ไนอาซีน โฟลิกแอซิด (folic acid) และ พารา-อะมิโน เบนโซอิคแอซิด (p-amino benzoic acid) เป็นต้น อย่างไรก็ตามขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ ยีสต์บางสายพันธุ์ที่มีไธอามีน แต่ขาดไพริด๊อกซินจะทำให้การเจริญลดลง ในขณะที่บางสายพันธุ์เจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีไธอามีนและไพริด๊อกซินเท่านั้น สำหรับในตารางที่ 2.1 แสดงวิตามินชนิดต่างๆ ในรูปที่เหมาะสมในการทำงาน หน้าที่ของวิตามินในเมแทบอลิซึม และความเข้มข้นที่ต้องการในกระบวนการหมัก

4.5) ปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งเสริมการเจริญ (growth promoting factors) ได้แก่ กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิค กรดไขมันและสเตอรอยด์ (steroid) สารเหล่านี้ถูกใช้ไปในกระบวนการสังเคราะห์และเพิ่มผลได้เอทานอล (ethanol yield) ในบางกรณีความต้องการ growth factor ของยีสต์ขึ้นกับสภาพแวดล้อม เช่น ในกรณีที่ยีสต์เจริญในสภาวะไม่มีอากาศ ยีสต์จะต้องการเออโกสเตอรอล

(ergosterol) และกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว และในกรณีของ thermophilic yeast ต้องการโคลีน (choline) คาร์นิทีน (carnitine) หรือลิวซีน (leucine) (Stanley และคณะ, 2009)

Growth factors ที่สำคัญสำหรับยีสต์หลายชนิดได้แก่ อินโนซิทอล (inositol) อยู่ในรูปของฟอสฟาทิดิลอินโนซิทอล (phosphatidyl inositol) สารนี้ทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสภาพของเมมเบรนของยีสต์ ซึ่งจะมีผลต่อการควบคุมอัตราการหมัก (rate of fermentation)

2.2.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการหมัก

อุณหภูมิมีความสำคัญมากต่อการหมักดพื่อผลิตเอทานอล ในโรงงานอุตสาหกรรมทั่วไปนั้นอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส และยีสต์สามารถทนไปได้ถึง 37 องศาเซลเซียส ถ้าสูงขึ้นไปถึง 40 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่การเจริญจะหยุดชะงัก ดังนั้น ในช่วงหลังจากผ่าส่าไปแล้ว 1-10 ชั่วโมง ควรควบคุมอุณหภูมิให้ไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส หลังจาก 10 ชั่วโมง ควรควบคุมไม่ให้เกิน 37 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิในช่วง 10 ชั่วโมงแรกสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส แล้วอาจจะเกิดปัญหาแบคทีเรียเจริญขึ้นมามากเกินไปและจะเป็นผลให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ เนื่องจากในอุตสาหกรรมอาหารที่ใช้หมักจะไม่มีการฆ่าเชื้อที่ปนมากับน้ำหมัก การควบคุมอุณหภูมิจึงนับว่าจำเป็นและเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลผลิตที่จะได้ สำหรับการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์สูงๆ ร้อยละ 15 - 20 และให้ได้กลิ่นรสดี เช่น การหมักไวน์และสาเกจะหมักไม่เกิน 15 องศาเซลเซียส การหมักที่อุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดฟูลเซลออยล์ (fusel oil) มากขึ้นซึ่งจะไปมีผลต่ออาการมึนและปวดศีรษะของผู้บริโภค อย่างไรก็ตามการลดอุณหภูมิของถังหมักลงเป็นค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจะต้องคำนึงถึงว่าควรลดอุณหภูมิลงเท่าใดเพื่อไม่ให้เปลืองพลังงานมากเกินไปแต่ได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด

ตารางที่ 2.1 ผลของวิตามินต่อเมแทบอลิซึมของยีสต์

Vitamin	Active form	Metabolic role	Optimum concentration (mg/l)
Biotin	Biotin	All carboxylation and decarboxylation reactions	0.005 - 0.5
Pantothenate	Coenzyme A	Keto acid oxidation reactions fatty acid metabolism, amino acid, carbohydrate, choline metabolism	0.2 - 2.0
Thiamin (B1)	Thiamin pyrophosphate	Fermentative decarboxylation of pyruvate Oxo-acid oxidation and decarboxylation	0.1 - 1.0
Pyridoxine (B6)	Pyridoxal phosphate	Amino acid metabolism, deamination, decarboxylation, Recemisation reaction	0.1 - 1.0
Folic acid and p-amino benzoic acid	Tetra hydro folate	Transamination Ergosterol synthesis transfer 1 carbon units	0.5 - 5
Niacin (Nicotinic acid)	NAD^+, $NADP^+$	Dehydrogenation reaction	0.1 - 1.0
Riboflavin (B2)	FMN, FAD	Same flavoprotein, dehydrogenation reactions and some amino acid oxidations	0.2 - 0.25

สาเหตุที่อุณหภูมิในระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากกิจกรรมของยีสต์ กล่าวคือ ในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาลกลูโคสจะเกิดความร้อน 149.5 แคลลอรี่ต่อกรัมซูโครส ในกรณีน้ำตาลกลูโคสจะเกิดพลังงานความร้อนจากการหมัก 140.2 แคลลอรี่ต่อกรัมกลูโคส ความร้อนที่เกิดขึ้นเป็น exothermic energy ซึ่งจะถ่ายเทลงสู่น้ำหมักทำให้น้ำหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้น โดยทั่วไป

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์ โดยปกติอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส แต่ในช่วงสภาพที่มีแอลกอฮอล์หรือเอทานอลผลิตออกมาแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักจะเปลี่ยนไป ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณเอทานอลเป็นและสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้

2.2.2.3 ผลของพีเอชต่อการหมัก

ยีสต์และราชอบเจริญในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด คือในระดับพีเอช 3.8 - 5.5 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 3.5 การเจริญจะลดลง ถ้าพีเอชต่ำถึง 3 จะไม่มีการเจริญหรือการเจริญจะช้ามาก ดังนั้นในการหมักจึงนิยมปรับให้มีพีเอชอยู่ในช่วง 4 - 4.5 นอกจากยีสต์จะเจริญได้ดีที่ระดับพีเอชดังกล่าวแล้ว ยังช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ด้วย เพราะแบคทีเรียทั่วไปชอบเจริญในสภาพที่พีเอชเป็นกลาง แต่มีแบคทีเรียบางชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกจะเจริญได้ดีในระดับพีเอชที่ยีสต์เจริญและมักจะเกิดปัญหากับการหมักเพื่อผลิตเอทานอล

2.2.2.4 ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้น

ความเข้มข้นของสารอาหารมีผลต่อการปรับตัวของยีสต์ ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นสูง จะส่งผลต่อความเครียดของยีสต์เนื่องจากแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ระหว่างความเข้มข้นของสารอาหารภายนอกผนังเซลล์ยีสต์และความเข้มข้นภายในเซลล์ยีสต์ ความเข้มข้นของสารที่สูงๆ จะทำให้เซลล์เสียสภาพมีขนาดลดลง

2.2.2.5 ผลของความเข้มข้นของเอทานอล

แอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักมีผลยับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นเอทานอลสูงขึ้น อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์จะลดลง ซึ่งทำให้อัตราการหมักลดลงไปด้วย ทั้งนี้เนื่องจากเอทานอลไปมีผลต่อเอนไซม์และสรีระวิทยาของเซลล์ โดยเอทานอลจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) และเฮกโซไคเนส (hexokinase) และมีผลต่อเมมเบรนของเซลล์ยีสต์ โดยทำลายหรือทำให้เมมเบรนเกิดการเปลี่ยนแปลง

เอทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยยีสต์ ซึ่งยีสต์สามารถเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์รวมถึงสามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ เมแทบอลิซึมของยีสต์สามารถแบ่งได้เป็น 2 สภาวะ ดังนี้

1) การหายใจโดยใช้อากาศ (Oxidative metabolism or aerobic respiration) ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นไพรูเวท (pyruvate) จากนั้นในสภาวะที่มีออกซิเจนไพรูเวทจะเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ โดยผ่านวิถีการหายใจ ในสภาวะนี้จำนวนเซลล์ยีสต์จะเพิ่มสูงขึ้น (รูปที่ 2.2-ก) สมการการเปลี่ยนแปลงโดยทั่วไปของการหายใจโดยใช้อากาศ คือ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 11 ส.ค. 2555
เลขทะเบียน 243137

$C_6H_{12}O_6$ + $6O_2$ ⟶ $6H_2O$ + $2CO_2$ + 36ATP + ความร้อน

กลูโคส ออกซิเจน น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์

2) การหมักโดยไม่ใช้อากาศ (Fermentative metabolism or anaerobic fermentation) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ยีสต์จะเปลี่ยนไพรูเวทเป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะเรียกว่าเกิด 'การหมัก' (fermentation) ขึ้น โดยในสภาวะนี้จะมีจำนวนเซลล์ยีสต์เพิ่มเล็กน้อย (รูปที่ 2.2-ข) สมการการเปลี่ยนแปลงโดยทั่วไปของการหมักโดยไม่ใช้อากาศ คือ

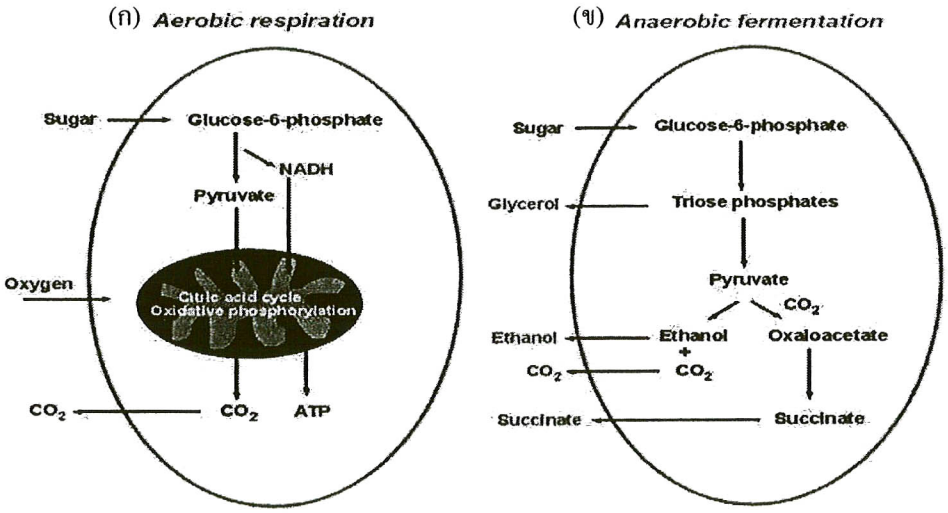
$C_6H_{12}O_6$ ⟶ $2C_2H_5OH$ + $2CO_2$ + 2ATP + ความร้อน

กลูโคส เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์

1 โมล 2 โมล 2 โมล

180.16 กรัม (2 × 46.05 กรัม) (2 × 44 กรัม)

ร้อยละ 51.1 ร้อยละ 48.9 (โดยน้ำหนัก)



รูปที่ 2.2 เมแทบอลิซึมของยีสต์ภายใต้สภาวะ (ก) การหายใจโดยใช้อากาศ และ (ข) การหมักโดยไม่ใช้อากาศ (ที่มา: http://biochemie.web.med.uniuenchen.de/Yeast_Biology/03_Metabolism.htm)

เอทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักของยีสต์ จากสมการยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้ โดยทางทฤษฎีสามารถเปลี่ยน เป็นเอทานอลได้ร้อยละ 51.1 แต่ในทางปฏิบัติจะได้เอทานอลต่ำกว่า

ร้อยละ 51 เนื่องจากคาร์บอนบางส่วนถูกนำไปสร้างเป็นคาร์บอนในเซลล์ และผลพลอยได้อื่นๆ เช่น กลีเซอรอล และ กรดอินทรีย์ เป็นต้น (Zoecklein และคณะ, 1995)

จากเมแทบอลิซึมของยีสต์จะเห็นว่า หากต้องการได้เอทานอลสูงต้องหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่หากต้องการได้เซลล์ยีสต์สูง เช่น การเลี้ยงเพื่อให้ได้ยีสต์ขนมปัง (baker yeast) ต้องเลี้ยงยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ Laopaiboon และคณะ (2007) พบว่า ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานมีผลต่อประสิทธิภาพการหมัก โดยพบว่าความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคือ 1×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยได้ความเข้มข้นเอทานอล 100.37 ± 2.97 กรัมต่อลิตร ได้ผลได้ (yield) และอัตราผลผลิตเอทานอล (productivity) 0.42 ± 0.01 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ และ 1.68 ± 0.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการหมัก 60 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะนิ่ง อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์ยีสต์เริ่มต้น 1×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่สูงมาก ซึ่งต้องใช้อาหารในการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาณมาก และต้องปั่นเหวี่ยงหัวเชื้อที่เลี้ยงได้เพื่อให้ได้กล้าเชื้อเข้มข้นก่อนเติมลงในน้ำหมัก นอกจากนี้อาหารที่ใช้เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ (Yeast extract malt extract broth, YM broth) ยังมีราคาแพงด้วย

การผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นมากกว่าร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือ 200 กรัมต่อลิตร จะไม่ใช้ในการผลิตเอทานอลเชิงอุตสาหกรรม เนื่องจากความเข้มข้นเอทานอลที่เพิ่มขึ้นจากกระบวนการหมักจะทำให้การเจริญของยีสต์ลดลงและหยุดหมัก อย่างไรก็ตามความเข้มข้นเอทานอลที่สามารถหยุดการเจริญของยีสต์ขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารในการหมักซึ่งได้แก่ ยีสต์เอ็กแทร๊กท์ (yeast extract) แอมโมเนียม แมกนีเซียมและแคลเซียม เป็นต้น นอกจากนี้สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้กระบวนการหมัก สารอาหารต่างๆ และการให้อากาศก็มีผลโดยตรงต่อการมีชีวิตของยีสต์และการผลิตเอทานอลด้วย

Cot และคณะ (2006) พบว่า ที่ความเข้มข้นของเอทานอลในน้ำหมักสูงขึ้นเกิน 80 – 100 กรัมต่อลิตร จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตจะลดลงอย่างรวดเร็ว พร้อมกับมีการหลุดออกของ intracellular metabolites สู่น้ำหมัก การที่ intracellular metabolites หลุดออกอาจเนื่องจากสัดส่วนของ plasma membrane phospholipids ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า หากมีการให้อากาศที่เพียงพอเซลล์ยีสต์จะทนต่อเอทานอลได้มากขึ้น ทำให้มีเซลล์ยีสต์ที่จะผลิตเอทานอลได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามจากเมแทบอลิซึมของยีสต์ในรูปที่ 2.2 หากต้องการให้ได้เอทานอลสูงต้องหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาสภาวะการให้อากาศที่เหมาะสมที่สามารถให้ได้เซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตสูงแข็งแรงและสามารถผลิตเอทานอลได้สูง

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์ ทำให้ยีสต์แข็งแรงและว่องไว (active) ดังนั้นจึงควรทราบสภาวะที่จะทำให้ยีสต์เพิ่มจำนวนได้ดี ในสภาวะที่มีอาหารสมบูรณ์ยีสต์จะเจริญหรือเพิ่มจำนวนได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ ภายใต้สภาวะกึ่งไม่มี

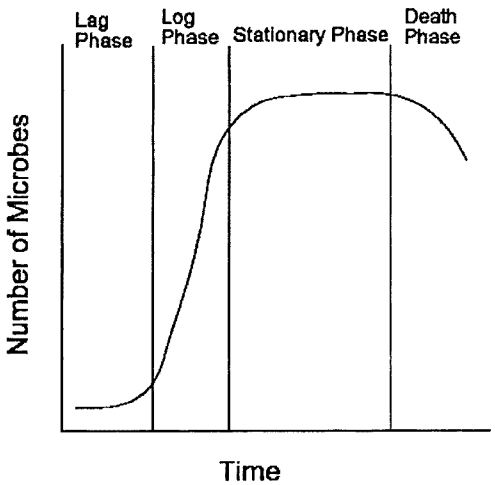
อากาศยีสต์จะใช้เวลานานขึ้นในการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาณตามต้องการ ทำให้ยีสต์มีการเจริญยาวนานขึ้น ส่งผลให้ปริมาณของเออร์โกสเตอรอลและกรดไขมัน (fatty acid) บริเวณเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ลดลง มีผลทำให้ยีสต์ไวต่อเอทานอลมากขึ้นหรือทนต่อเอทานอลได้น้อยลง เนื่องจากการสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์เมมเบรนของยีสต์ (เช่น กรดไขมันและสเตอรอล) ต้องการโมเลกุลของออกซิเจน (Bardi และคณะ, 1999; Belo และคณะ, 2005; Bai และคณะ, 2008)

2.3 กระบวนการหมัก

กระบวนการหมักแบ่งเป็น 4 ประเภทหลักๆ คือ กระบวนการหมักแบบกะ (batch) แบบกึ่งกะ (fed-batch) แบบต่อเนื่อง (continuous) และแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) (Stanbury และคณะ, 1995) ซึ่งการหมักแบบกะ แบบกึ่งกะ และแบบต่อเนื่องเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตเอทานอล อย่างไรก็ตามในการเลือกใช้กระบวนการใดในการหมักควรคำนึงถึงคุณสมบัติของวัตถุดิบที่ใช้ รวมทั้งต้นทุนในการดำเนินการ โดยเฉพาะค่าผลได้ (yield) และอัตราผลผลิต (productivity) ของผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งสำคัญในการเลือกกระบวนการหมัก ซึ่งกระบวนการหมักที่ดีควรมีการลงทุนต่ำ แต่สามารถผลิต และเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้สูง

2.3.1 การหมักแบบกะ

การหมักแบบกะจะมีการเติมสารอาหารและเซลล์เมื่อเริ่มต้นเท่านั้น ปฏิกิริยาชีวภาพจะดำเนินไปจนกว่าจะสิ้นสุดการหมัก แล้วจึงแยกเซลล์หรือเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ออก โดยทั่วไปจะรอจนผลิตภัณฑ์มีปริมาณสูงสุดและมีอัตราการเปลี่ยนแปลงสั้นที่สุด ในการหมักแบบกะจุลินทรีย์จะมีรูปแบบการเจริญดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ลักษณะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบกะ
(ที่มา : www.eng.auburn.edu/.../growth%20curve.gif)

เมื่อเติมจุลินทรีย์ลงในอาหารระยะแรกเซลล์จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน ระยะนี้เรียกว่า lag phase เนื่องจากเป็นระยะที่เชื้อกำลังปรับตัว ในช่วง lag phase นี้ กระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยใช้เชื้อเริ่มต้น (starter หรือ inoculum) ที่เหมาะสม หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะมีอัตราการเพิ่มขึ้นตามลำดับจนกระทั่งเข้าสู่ log phase หรือ exponential phase ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีการแบ่งตัวทวีคูณ จำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นแบบ exponential การเจริญเติบโตระยะนี้จะเกิดขึ้นต่อไปหลายชั่วโมงจนกว่าองค์ประกอบของอาหารจะมีการเปลี่ยนแปลง เช่น อาหารมีปริมาณน้อยลง และปริมาณออกซิเจนจำกัดเนื่องจากเซลล์มีความหนาแน่น เมื่อถึงจุดนี้การเจริญจะช้าลงและปริมาณเซลล์ค่อนข้างคงที่ เซลล์จะเข้าสู่ระยะใหม่ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์หยุดการทวีจำนวนและอยู่ในสภาวะคงที่ไปช่วงระยะเวลาหนึ่ง การหยุดทวีจำนวนนั้นอาจเนื่องมาจากปริมาณสารอาหารบางอย่างหมดหรือลดน้อยลงหรือมีการสร้างสารพิษระหว่างการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ การที่จำนวนประชากรคงที่นั้น แสดงว่าเซลล์ไม่มีการแบ่งตัวอีกเลย หรืออัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตายหรือสมดุล ระยะนี้เรียกว่า stationary phase ระยะสุดท้าย จุลินทรีย์ที่เหลือจะมีการตายเร็วกว่าการเพิ่มจำนวน ระยะนี้เรียกว่า death phase ซึ่งเกิดจากอาหารหมด หรือมีการสะสมสารยับยั้งการเจริญ เช่น กรดหรือสารพิษ จุลินทรีย์ระยะนี้ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้งานเพราะมีจำนวนน้อยมักมีแต่เซลล์ตาย ขนาดเซลล์เล็กผิดปรกติ อาจมีขนาดยาวหรือเป็นเส้น มีหลายนิวเคลียส ไม่มีผนังเซลล์หรือผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ เซลล์ต่างๆ เหล่านี้ถ้านำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จะกลับมาเป็นเซลล์ปกติ

2.3.2 การหมักแบบกึ่งกะ

การหมักแบบกึ่งกะเป็นระบบการหมักที่มีการป้อนสารอาหารเข้าไปในระบบเป็นระยะๆ เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่และใช้ได้ในปริมาณสูงจากนั้นจะหยุดการหมัก การหมักแบบกึ่งกะนี้ เป็นการขยายการทำงานแบบกะออกไปนั่นเอง

2.3.3 การหมักแบบต่อเนื่อง

ในระบบนี้จะมีการเติมอาหารให้แก่ระบบอย่างต่อเนื่องพร้อมๆ กับดึงน้ำหมักออกอย่างต่อเนื่องในอัตราที่เท่ากัน โดยที่อัตราการไหลเข้าออกของระบบไม่ควรสูงไปกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันการชะจุลินทรีย์ออกจากระบบ (wash out) ทำให้ไม่มีจุลินทรีย์เหลืออยู่ในระบบการหมัก อย่างไรก็ตามเมื่อให้อัตราไหลของอาหารเข้าระบบคงที่และเหมาะสม ระบบจะเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady-state) ระบบการหมักแบบต่อเนื่องนี้เหมาะกับระบบที่ต้องการอัตราการผลิตสูงและมีการควบคุมระบบแบบอัตโนมัติ

2.3.4 การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

ระบบการหมักแบบนี้จะหมักแบบกะก่อน แต่เมื่ออาหารที่ให้ในระบบเริ่มหมดหรือใกล้จะหมด จะมีการนำน้ำหมักออกจากระบบเพื่อไปเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์โดยจะเหลือน้ำหมักส่วนหนึ่งไว้ในถังหมัก หลังจากนั้นจะเติมอาหารใหม่เข้าไปเหมือนการหมักแบบกึ่งกะทันที แต่ปริมาตรที่เติมเข้าไปในถังหมักจะเต็มปริมาตรทำงานของระบบทุกครั้งซึ่งไม่เหมือนการหมักแบบกึ่งกะ ระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องนี้จะหมุนเวียนกันไปเรื่อยๆ คล้ายกับการหมักแบบต่อเนื่อง แต่ไม่ใช่การหมักแบบต่อเนื่อง ข้อดีของกระบวนการหมักแบบนี้ คือ สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้อย่างต่อเนื่อง ระบบไม่แพงเท่าระบบการหมักแบบต่อเนื่อง และสารอาหารที่ให้เข้าไปมีการใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนข้อเสีย คือ ต้องระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ และต้องเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ไปพร้อมกับการให้อาหารชุดใหม่ ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากพอสมควร ถ้ามีการดำเนินการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องไปตลอด

2.4 ข้าวฟ่างหวาน

ข้าวฟ่างหวาน (Sweet Sorghum; *Sorghum bicihor* (Linn.) Moench) มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบตะวันออกของอัฟริกา เป็นพืชเศรษฐกิจอย่างหนึ่งของประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อ 50 ปีที่ผ่านมา โดยปลูกเพื่อใช้ทำน้ำเชื่อม (syrup) และน้ำตาลเกล็ด สำหรับประเทศไทยข้าวฟ่างหวานนับเป็นพืชใหม่ที่ยังไม่มีการปลูกเป็นการค้าแต่มีการทดลองและวิจัยเกี่ยวกับพืชชนิดนี้อยู่บ้าง

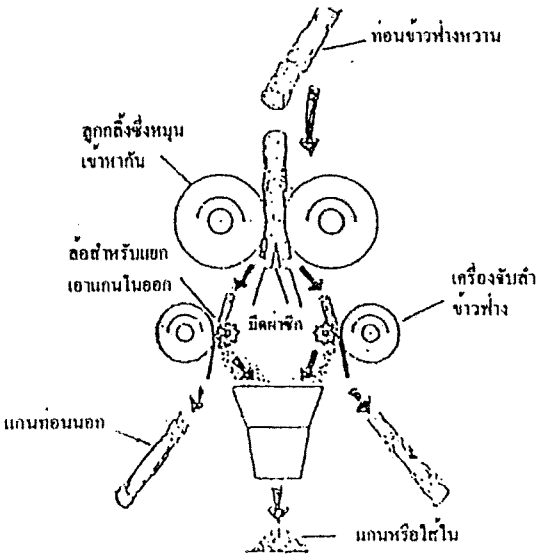
ข้าวฟ่างหวาน มีลักษณะเช่นเดียวกับข้าวฟ่างที่ใช้ประโยชน์จากเมล็ดที่ปลูกกันทั่วๆ ไป ต่างกันตรงที่มีน้ำตาลในลำต้นมากกว่า จึงสามารถนำไปผลิตเป็นน้ำตาลเพื่อบริโภคได้ และข้าวฟ่างหวานมีข้อดีเหนือกว่าอ้อย คือ สามารถปลูกและเจริญเติบโตได้ในดินแทบทุกชนิด และมีความทนทานต่อสภาพภูมิอากาศแห้งแล้ง ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและมีอายุเก็บเกี่ยวสั้นประมาณ 90-120 วันเท่านั้น อีกทั้งยังสามารถใช้ประโยชน์ได้ในลักษณะเดียวกับอ้อย และสามารถเป็นผลิตเป็นอาหารสัตว์ กระดาษไม้อัดและน้ำมันเชื้อเพลิงได้อีกด้วย การแยกลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อนำไปใช้เป็นประโยชน์ ใช้วิธี “Tilby Seperator Process” ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.4 ระบบประกอบด้วยเครื่องมือที่จะแยกลำต้นข้าวฟ่างหวานออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนผิวนอกของลำต้นข้าวฟ่างหวานที่เรียกว่า “outer rind fiber” ส่วนนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตกระดาษส่วนแกนในจะเป็นส่วนประกอบของน้ำหวาน ซึ่งน้ำตาลอยู่มาก ส่วนนี้นำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเป็นแอลกอฮอล์สำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ทั้งเบนซินและดีเซล ใบและเมล็ดสามารถทำเป็นอาหารหมักใช้เลี้ยงสัตว์ นอกจากนี้ส่วนของก้านช่อดอกยังใช้ทำปุ๋ยหรือเป็นเชื้อเพลิงได้

คุณลักษณะของข้าวฟ่างหวานที่ปลูกเพื่อผลิตน้ำตาลหรือเพื่อผลิตแอลกอฮอล์นั้นควรมีลักษณะดังต่อไปนี้

1) มีลำต้นโต เพื่อสะดวกต่อการหีบน้ำตาล
2) มีลำต้นแข็งแรง ไม่หักล้มง่าย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3) ลำต้นฉ่ำน้ำ และมีปริมาณน้ำตาลสูง
4) มีความต้านทานต่อโรคสูง
5) มีอายุไม่ยาวเกินไป เพื่อให้ทันกับช่วงฝน
6) ทนทานต่อความแห้งแล้ง เพราะสภาพฝนมักไม่แน่นอน
7) ต้านทานต่อสภาพน้ำขังแฉะ ในกรณีที่มีฝนตกชุก
8) ถ้ามีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ทำน้ำเชื่อม น้ำข้าวฟ่างควรให้กลิ่น สี ของน้ำเชื่อมที่ดี แต่ถ้ามีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแอลกอฮอล์ คุณภาพดังกล่าวอาจไม่จำเป็น



รูปที่ 2.4 กระบวนการแยกส่วนต่างๆ ของข้าวฟ่างหวานแบบ Tilby (สุชีรา และคณะ, 2549)

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าข้าวฟ่างหวานเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ของเกษตรกรในอนาคต โดยเฉพาะการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานนั้นมีความเป็นไปได้สูง ดังนั้นการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน สำหรับการผลิตเอทานอลให้ได้ประสิทธิภาพการผลิตสูงสุด

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Delgenes และคณะ (1986) ศึกษาการให้อากาศต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสด้วย *Candida shehatae* โดยใช้น้ำหมักที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และมีการให้อากาศ 0 - 1 vvm ผลการทดลองพบว่า ในสภาวะที่มีการให้อากาศ 0.02 vvm ให้ประสิทธิภาพการ

หมักสูงสุด โดยได้อัตราผลผลิตเอทานอล 3.5 กรัมต่อกรัมต่อวัน และผลได้ของเอทานอลเท่ากับ 78.43 เปอร์เซนต์ของผลได้ทางทฤษฎี

Groleau และคณะ (1995) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Zygosaccharomyces rouxii* ในน้ำหมักที่มีความเข้มน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีปริมาตรทำงาน 1.5 ลิตร ใช้กล้าเชื้อร้อยละ 4 ของปริมาตรทำงาน ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส และแปรผันการกวน 79 ถึง 500 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศ และการกวนที่ 300 รอบต่อนาที โดยมีการแปรผันการให้อากาศ 0, 0.33, 0.66 และ 1 vvm ผลการทดลองพบว่าการหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีการให้อากาศและมีการกวนที่ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที ได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด 30 กรัมต่อลิตร สำหรับสภาวะที่มีการกวนควบคู่การให้อากาศนั้น พบว่าการให้อากาศช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลโดยน้ำตาลกลูโคสถูกใช้ร้อยละ 100 ภายใต้สภาวะการหมักที่มีการกวน 300 รอบต่อนาที และมีการให้อากาศ 0.66 และ 1.0 vvm ที่ระยะเวลาในการหมักที่ 80 ชั่วโมง และยังพบว่าสภาวะการหมักที่มีการกวน 300 รอบต่อนาที และมีการให้อากาศ 0.66 vvm ได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด 38 กรัมต่อลิตร

Alexandre และคณะ (1994) พบว่าการขาดออกซิเจนมีผลต่อยีสต์ โดยทำให้ยีสต์ลดความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวและเออโกสเตอรอล (ergosterol) ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้มีประโยชน์ในการป้องกันยีสต์จากความเครียดที่เกิดจากเอทานอล (ethanol stress)

Bardi (1996) รายงานว่าการชะงักและการหยุดหมักสามารถป้องกันได้หลายวิธี อาทิ การให้อากาศ การเลี้ยงในอาหารที่อุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว และการใช้กล้าเชื้อที่ถูกเตรียมด้วยเทคนิคซึ่งส่งเสริมให้มีการกักเก็บไขมันโดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสัดส่วน C/N สูง

Bardi และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* S47c ในน้ำหมักที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร และมีการเติมกรดทาทาลิก (tartaric acid) กรดมาลิก (malic acid) กรดซิทริก (citric acid) 3, 2 และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พีเอช 3.2 หมักในถังหมักที่มีปริมาตรทำงาน 2.5 ลิตร มีการให้อากาศจนน้ำหมักอิ่มตัวก่อนเติมกล้าเชื้อความเข้มข้น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงไป ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส และมีการกวน 700 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่า การหมักที่ช้า (sluggish fermentation) หรือเกิดการหยุดหมัก (stuck fermentation) จะมีความสัมพันธ์กับกรดไขมันประเภท Medium-chain fatty-acids (MCFAs) ซึ่งประกอบด้วย กรดคาร์โพรอิค (caproic acid; C_6) กรดคาร์ไพรลิก (caprylic acid; C_5) และกรดคาร์ปริก (capric acid; C_{10}) น้ำหมักในสภาวะที่เกิดการหมักช้าหรือเกิดการหยุดหมักพบว่ามีความเข้มข้นของสาร MCFAs สูง เนื่องจาก MCFAs เป็นสารที่ไม่ได้ถูกตรึงไว้ในโครงสร้างของยีสต์แต่เป็นสารที่ยีสต์สร้างขึ้นแล้วปล่อยออกสู่น้ำหมัก ส่วนค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักแสดงให้เห็นว่าออกซิเจนในน้ำหมักถูกใช้หมดภายในวันแรกของการหมัก และในช่วงสามวันแรกของการหมัก พบว่ากรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวภายในเซลล์ ได้แก่ กรดพาลมิโทเลอิก (palmitoleic acid) และกรดโอเลอิก (oleic acid) มีค่าลดลงประมาณร้อยละ 20 ของกรดไขมันทั้งหมดเมื่อเริ่มต้นการ

หมัก ในขณะที่กรดไขมันอิ่มตัวภายในเซลล์ ได้แก่ กรดคาร์ปริก (capric acid) และกรดลอร์ลิก (lauric acid; C_{12}) มีค่าเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 8 - 10 ของกรดไขมันทั้งหมดเมื่อเริ่มต้นการหมัก

Bayrock และ Ingledew (2001) ศึกษาการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้ระบบการหมักแบบ multistage fermenters ซึ่งมีถังหมักจำนวน 5 ถัง เรียงต่อกันเป็นลำดับคล้ายขั้นบันได ถังแรกออกแบบเพื่อใช้เป็นถังเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีการให้อากาศ 2.0 vvm และถังที่เหลือใช้เพื่อกระบวนการผลิตเอทานอล โดยมีปริมาตรทำงานทั้งหมด 16.2 ลิตร การหมักควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วในการกวน 100 รอบต่อนาที โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* และเลี้ยงภายใต้สภาวะการหมักแบบ VHG (very high gravity) ที่มีน้ำตาลกลูโคส 320 กรัมต่อลิตร เติม corn steep powder 20 กรัมต่อลิตร และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 20 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองพบว่า ได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดร้อยละ 16.73 โดยปริมาตร หรือ 132.0 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.005 ต่อชั่วโมง

You และคณะ (2003) ศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid, UFA) ใน *S. cerevisiae* ซึ่งประกอบด้วยกรดพาลมิโทเลอิก (palmitoleic acid; C16:1) และกรดโอเลอิก (oleic acid; C18:1) ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเอทานอลในอาหารสังเคราะห์ (YPD liquid medium) โดยมีการแปรผันการเติมเอทานอลร้อยละ 0, 1, 3 และ 5 โดยปริมาตร ผลการทดลองพบว่าสัดส่วนของ C18:1 ในน้ำหมักที่มีการเติมเอทานอลร้อยละ 5 โดยปริมาตร มีค่าเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ยีสต์ในสภาวะที่ไม่มีการเติมเอทานอล ในขณะที่ระดับของ C16:0 และ C16:1 มีค่าลดลงร้อยละ 38 และ 50 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์ในสภาวะที่ไม่มีการเติมเอทานอล นอกจากนี้สัดส่วนของ C18:1 ต่อ C16:1 ในเซลล์ที่มีการเจริญเพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า ในสภาวะที่ไม่มีการเติมเอทานอลในน้ำหมัก

Alfenore และคณะ (2004) ศึกษาการให้อากาศที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลในกระบวนการหมักที่ต้องการให้มีการเจริญของยีสต์และการผลิตเอทานอลเกิดขึ้นไปพร้อมๆกัน โดยการแปรผันการให้อากาศ 2 วิธี คือ สภาวะที่ให้ออกซิเจนไม่จำกัด (aerobic culture) ซึ่งมีการให้อากาศ 0.2 vvm ที่ด้านล่างของถังหมัก และมีการกวน 400 รอบต่อนาที และสภาวะที่ให้ออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (micro-aerobic) คือ มีการให้อากาศด้วยอัตรา 100 ลิตรต่อนาที ที่บริเวณผิวด้านบน (headspace) ของน้ำหมักในถังหมัก และมีการกวน 300 รอบต่อนาที โดยใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะด้วย *S. cerevisiae* ผลการทดลองพบว่า ในสภาวะที่มีออกซิเจนไม่จำกัดได้ความเข้มข้นของเอทานอล 147 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดได้ความเข้มข้นของเอทานอลต่ำกว่า โดยได้ 131 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมักเท่ากัน (45 ชั่วโมง) ได้อัตราผลผลิตเอทานอลในสภาวะที่มีออกซิเจนไม่จำกัดและสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดเท่ากับ 3.3 และ 2.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่า จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตในสภาวะที่มีออกซิเจนไม่จำกัดมีปริมาณสูงกว่าในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดถึงร้อยละ 23 และการหมักเอทานอลแบบกึ่งกะในสภาวะที่มีออกซิเจนไม่จำกัดมีการสร้างผลพลอยได้คือกลีเซอรอลลดลงจาก 12 กรัมต่อลิตร เป็น 4 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด

Bai และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องในน้ำหมักที่มีน้ำตาลกลูโคส ยีสต์เอ็กแทร๊กท์ (yeast extract) และ เปปโตน 280, 5 และ 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* หมักใน bioreactor 2 ชนิดที่ต่อกันเป็นอนุกรม ประกอบด้วย stirred tank bioreactor ที่มีการให้อากาศ 0.5 vvm และมีการกวน 100 รอบต่อนาที และ three-stage tubular bioreactors ที่มีการให้อากาศ 0.005 vvm โดยมีปริมาตรทำงานทั้งระบบ คือ 3260 มิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า ได้ความเข้มข้นของเอทานอลเฉลี่ย 124.6 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 15.8 และได้ผลได้ 0.48 หรือร้อยละ 94.7 ของผลได้เมื่อเปรียบเทียบกับผลได้ทางทฤษฎี (0.511) ที่อัตราการเจือจาง 0.012 ต่อชั่วโมง

Belo และคณะ (2005) ศึกษาสัณฐานวิทยาและโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงของ *S. cerevisiae* ATCC32167 ภายใต้ oxidative stress จากความดันที่สูงกว่าความดันบรรยากาศ (hyperbaric air) โดยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ น้ำหมักที่ใช้มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร และมีการเติม KH_2PO_4, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 7H_2O$ และยีสต์เอ็กแทร๊กท์ (yeast extract) เท่ากับ 7.5, 10, 1 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส การกวน 400 รอบต่อนาที และมีการให้อากาศ 1 vvm แปรผันค่าความดันอากาศ (air pressure) ที่ 0.1, 0.6, 1.0 และ 1.5 MPa และค่าความดันออกซิเจนบริสุทธิ์ (pure oxygen pressure) ที่ 0.13 และ 0.32 MPa ผลการทดลองพบว่า ค่าความดันอากาศ 1.5 MPa และค่าความดันออกซิเจนบริสุทธิ์ 0.32 MPa มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมในเมแทบอลิซึมและการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยได้อัตราการเจริญจำเพาะ 0-0.06 ต่อชั่วโมง ภายใต้สภาวะการหมักที่ระดับค่าความดันอากาศ 1.5 MPa และค่าความดันออกซิเจนบริสุทธิ์ 0.32 Mpa ได้ผลได้เอทานอลร้อยละ 8.3 และร้อยละ 14.0 ของผลได้ทางทฤษฎีตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า สัณฐานวิทยาของยีสต์มีการเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งขนาดเซลล์และรูปแบบอายุของเซลล์ และพบว่า ความดันเป็นสาเหตุทำให้เกิดการอัดตัวของเซลล์ (cell compression) และการเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่มีอายุ ซึ่งผลเหล่านี้เกิดจากความเป็นพิษของออกซิเจน โดยภายใต้สภาวะที่มีการใช้ความดันอากาศและความดันออกซิเจนบริสุทธิ์ให้ผลคล้ายคลึงกัน

Xu และคณะ (2005) ศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้ flocculating yeast สายพันธุ์ SPSC 01 โดยทดลองในถังหมัก 4 ถังที่ต่ออนุกรมมีปริมาตรทำงานทั้งระบบ คือ 4 ลิตร ถังแรกออกแบบเพื่อใช้เป็นถังเลี้ยงกล้าเชื้อที่มีการให้อากาศ 0.05 vvm และถังที่เหลือใช้เพื่อกระบวนการผลิตเอทานอล ไฮโดรไลเซตจากแป้งข้าวโพดที่มีน้ำตาลทั้งหมด 120 กรัมต่อลิตร ถูกใช้เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อและป้อนเข้าสู่ถังหมักกล้าเชื้อที่อัตราการเจือจาง 0.017 ต่อชั่วโมง ในขณะที่ไฮโดรไลเซตที่ประกอบด้วยน้ำตาลทั้งหมด 220 กรัมต่อลิตร ถูกใช้เป็นอาหารสำหรับกระบวนการผลิตเอทานอลและป้อนเข้าสู่ถังที่ 2 ที่อัตราการเจือจางต่างๆ กัน คือ 0.017, 0.025, 0.033, 0.040 และ 0.05 ต่อชั่วโมง สภาวะคงที่ของระบบการหมักพบที่อัตราการเจือจาง 0.017, 0.025, 0.033 และ 0.05 ต่อชั่วโมง เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบระบบการผลิตเอทานอลโดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระแขวนลอยกับสายพันธุ์ flocculating yeast พบว่า การใช้ flocculating yeast สามารถผลิตเอทานอลได้ 95.6 กรัมต่อลิตร และได้อัตราผลผลิตเอทานอล 3.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อัตราการเจือจาง

0.033 ต่อชั่วโมง และพบว่าอัตราผลผลิตเอทานอลมีค่าเกือบ 2 เท่าของระบบที่ใช้เซลล์ยีสต์อิสระแขวนลอยเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับของเอทานอลและน้ำตาลที่เหลือเท่ากัน

Lei และคณะ (2007) ศึกษาความสามารถในการทนต่อเอทานอลของ self-flocculating yeast ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ SPSC01 โดยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด yeast floc populations ที่ศึกษามีขนาดเฉลี่ยอยู่ในช่วง 100 – 400 ไมโครเมตร ผลการทดลองพบว่า ความสามารถในการทนต่อเอทานอลเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดของ floc populations เพิ่มขึ้นเป็น 100, 200 และ 300 ไมโครเมตร และพบว่าเมื่อขนาดของ floc populations ใหญ่เกิน 400 ไมโครเมตร ความสามารถในการทนต่อเอทานอลจะลดลง และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเมมเบรนของ floc populations ขนาดต่างๆ พบว่าองค์ประกอบ plasma membrane ของ floc populations ในส่วนของเออโกเสตอรอล ฟอสฟาทิดิลลิโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) และกรดพาลมิโทเลอิก (palmitoleic acid) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่า plasma membrane ของ floc populations ที่ทนเอทานอลได้สูงกว่าจะมีความสามารถในการแพร่ของสารได้น้อยกว่าเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่กระตุ้นด้วยเอทานอลร้อยละ 15 โดยปริมาตร นอกจากนี้พบว่ากิจกรรมของ plasma membrane ATPase จะสูง ใน floc populations ที่ทนเอทานอลได้สูงผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าขนาดเฉลี่ยของ floc populations มีอิทธิพลต่อสรีระวิทยาของเซลล์ยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอล

Limtong และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยโดย *Kluveromyces marxianus* DMKU 3-1042 น้ำหมักที่ใช้มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และมีการเติม $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 และ $MgSO_4 7H_2O$ เท่ากับร้อยละ 0.05, 0.05 และ 0.15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรทำงาน 3 ลิตร ใช้กล้าเชื้อร้อยละ 5 ของปริมาตรทำงานของน้ำหมักควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส สภาวะที่ใช้ในการหมักมี 4 สภาวะ ประกอบด้วย (1) กวนที่ 300 รอบต่อนาที (2) กวน 300 รอบต่อนาที ที่มีการให้อากาศ 0.2 vvm (3) กวนที่ 300 รอบต่อนาที และมีการให้อากาศ 0.2 vvm เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก (4) กวนที่ 300 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก จากนั้นใช้การกวน 150 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่มีการกวน 300 รอบต่อนาที และมีการให้อากาศ 0.2 vvm เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก ให้ประสิทธิภาพการหมักสูงสุด นั่นคือ ได้ความเข้มข้นเอทานอล อัตราผลผลิต และผลได้เอทานอล มีค่าร้อยละ 6.43 (หรือ 50.73 กรัมต่อลิตร) 1.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และร้อยละ 57.1 ของผลได้ทางทฤษฎี ตามลำดับ

Yang และคณะ (2007) พบว่าระดับของ ORP (oxidation reduction potential) ซึ่งเกี่ยวข้องกับออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ ORP เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ การสร้างกลีเซอรอลและการปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมานอกเซลล์ สำหรับ ORP ที่ระดับ -150 mV เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อเปรียบเทียบกับ ORP ที่ระดับ -50, -100 และ -230 mV

Liu และ Shen (2008) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดย *S. cerevisiae* CICC 1308 หมักในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรทำงาน 200-250 มิลลิลิตร ใช้กล้าเชื้อ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (28, 31, 34 และ 37 องศาเซลเซียส) อัตราการกวน (100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที) particle stuffing rate (ร้อยละ 15, 20, 25 และ 30) และพีเอช (3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0) และมีการออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี L_{16} orthogonal พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลประกอบด้วย อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก อัตราการกวน particle stuffing rate และพีเอช เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที ร้อยละ 25 และ 5.0 ตามลำดับ ในสภาวะดังกล่าวได้ผลได้ร้อยละ 98.07 ของผลได้ทางทฤษฎี และ CO_2 weight loss rate 1.020 กรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ ที่ระยะเวลาในการหมัก 11 ชั่วโมง

Millati และคณะ (2008) พบว่าอัตราการให้อากาศเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสโดยรา *Mucor indicus* โดยเมื่อใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียงชนิดเดียว ภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศ 0.1–1.0 vvm พบว่า ที่อัตราการให้อากาศ 0.1 vvm ให้ผลได้เอทานอลสูงสุดคือ 0.16 กรัมเอทานอลต่อกรัมไซโลส

Stoutenburg และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตเอทานอลจาก sugar maple wood hydrolysate โดย *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 น้ำหมักที่ใช้มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 58.99 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.7 หมักในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรทำงาน 100 มิลลิลิตร ใช้กล้าเชื้อร้อยละ 5 ของปริมาตรทำงานของน้ำหมัก สภาวะที่ใช้ในการหมักแปรผันอัตราการกวนที่ 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าระดับการกวนมีผลต่อการใช้น้ำตาล การผลิตเอทานอล และการผลิตผลพลอยได้ (by-products) โดย *P. stipitis* ผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้นสูงสุดในฟลาสก์ที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยได้ 14.3 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 71 ชั่วโมง ได้ผลได้ 0.37 และอัตราผลผลิตเอทานอล 0.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Emily และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบกะโดย *S. cereviciae* หมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีปริมาตรทำงาน 1.5 ลิตร ประกอบด้วย (กรัม) กลูโคส 75, ยีสต์เอ็กแทร็กท์ (yeast extract) 7.5, NH_4Cl 3.75, Na_2HPO_4 4.37, KH_2PO_4 4.5, $MgSO_4$ 0.38, $CaCl_2$, 0.12, กรดซิทริก 6.45, และโซเดียมซิเทรท 4.5 ใช้กล้าเชื้อประมาณร้อยละ 3 ของปริมาตรทำงานของน้ำหมัก ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 สภาวะที่ใช้ในการหมักมี 4 สภาวะ ประกอบด้วย (1) กวนที่ 100 รอบต่อนาที ที่มีการให้อากาศ 1 vvm (2) กวน 150 รอบต่อนาที ที่มีการให้อากาศ 1.5 vvm (3) กวนที่ 250 รอบต่อนาที ที่มีการให้อากาศ 1.0 vvm (4) กวนที่ 250 รอบต่อนาที ที่มีการให้อากาศ 1.5 vvm ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่มีการกวน 250 รอบต่อนาที ที่มีการให้อากาศ 1.5 vvm ให้ประสิทธิภาพการหมักสูงสุด โดยได้ความเข้มข้นเอทานอล อัตราผลผลิต และผลได้เอทานอล 9.91 กรัมต่อลิตร 0.16 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และร้อยละ 45.09 ของผลได้ทางทฤษฎี ตามลำดับ

Dodic และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตเอทานอลชีวภาพ (bioethanol) แบบกะ จาก thick juice ที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลจากหัวบีทโดยใช้ *S. cereviciae* น้ำหมักที่ใช้มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก หมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีปริมาตรทำงาน 1.5 ลิตร ใช้กล้าเชื้อ 1×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 การกวน 200 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่าได้ประสิทธิภาพการหมักสูงสุด โดยได้ความเข้มข้นเอทานอลและผลได้ มีค่าร้อยละ 12 โดยปริมาตร และร้อยละ 68 ตามลำดับ

Seo และคณะ 2009 ศึกษาการหมักเอทานอลแบบกึ่งกะโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* SC1024 ที่ทนเอทานอล น้ำหมักประกอบด้วย กลูโคส, corn steep liquor, yeast extract, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 และ $MgSO_4 7H_2O$ เท่ากับ 60, 20, 5, 1.2, 2.4 และ 1.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หมักที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส การกวน 200 รอบต่อนาที และพีเอช 4.0 ในระหว่างการหมักแปรผันอัตราการให้อากาศ 0.0, 0.13, 0.33 และ 0.8 vvm ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่มีการให้อากาศ 0.13 vvm ให้ประสิทธิภาพการหมักสูงสุด โดยได้ความเข้มข้นเอทานอล 160 กรัมต่อลิตร อัตราผลผลิต 4.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ร้อยละ 92.16 ของผลได้ทางทฤษฎี

Xu และ Liu (2009) ศึกษาการผลิตเอทานอลจาก sugar maple chips ที่มีการสกัดโดย hot-water การหมักใช้ยีสต์ *P. stipitis* 58784 หมักในถังหมักขนาด 1.3 ลิตร ที่มีปริมาตรทำงาน 800 มิลลิลิตร แปรผันระยะเวลาการเลี้ยงกล้าเชื้อเริ่มต้น (24, 36 และ 48 ชั่วโมง) ระยะเวลาในการหมัก (72, 96 และ 120 ชั่วโมง) ปริมาณกล้าเชื้อ (ร้อยละ 8, 12 และ 16 โดยปริมาตร) อัตราการกวน (0, 150 และ 180 รอบต่อนาที) sugar maple extract (0, 15 และ 30 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) $(NH_4)_2SO_4$ (3, 5 และ 8 กรัมต่อลิตร) และพีเอช (0, 6.0 และ 10.0) และออกแบบการทดลองโดยใช้วิธี L_{18} orthogonal ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคือ ระยะเวลาการเลี้ยงกล้าเชื้อเริ่มต้น 48 ชั่วโมง ระยะเวลาในการหมัก 120 ชั่วโมง ปริมาณกล้าเชื้อ 16 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร การกวน 180 รอบต่อนาที sugar maple extract ร้อยละ 30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร $(NH_4)_2SO_4$ 8 กรัมต่อลิตร และพีเอช 5.0 ในสภาวะดังกล่าวได้ผลได้เอทานอลร้อยละ 82.27 ของผลได้ทางทฤษฎี

ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเจริญของยีสต์ในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะการกวน การให้อากาศที่อัตราและเวลาที่แตกต่างกัน เพื่อให้ได้เซลล์ยีสต์จำนวนมาก แข็งแรงและว่องไว ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลความเข้มข้นสูงภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศโดยหมักต่อเนื่องจากการเจริญของยีสต์ โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงคือ *S. cerevisiae* NP 01 (Laopaiboon และคณะ, 2008) ในขณะเดียวกันยังต้องการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเซลล์และสรีระวิทยาของเซลล์ในสภาวะที่ผลิตเอทานอลความเข้มสูงจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลและนำไปประยุกต์ใช้สำหรับต่อยอดเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการหมักในระดับเชิงพาณิชย์ต่อไป