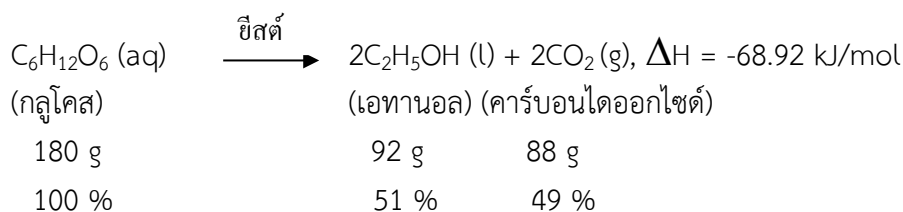


บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การผลิตเอทานอลทางชีวภาพ

กระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวภาพเป็นกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์ที่สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตแล้วให้เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ โดยในทางทฤษฎี จากกระบวนการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ เมื่อน้ำตาลถูกใช้โดยยีสต์ น้ำตาลจะถูกนำเข้าสู่เซลล์แล้วถูกย่อยสลายโดยวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) หรือวิถี Embden - Meyerhof - Parnas (EMP) (รูปที่ 2.1) โดยไม่มีการใช้ออกซิเจนในปฏิกิริยา ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไพรูวิก 2 โมเลกุล ซึ่งกรดไพรูวิกนี้ในสิ่งมีชีวิตจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในหลายเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดสามารถจะเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นเอทานอลได้ ซึ่งต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์และควบคุมสภาวะให้เหมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ ในทางทฤษฎีกลูโคสสามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ 51 เปอร์เซ็นต์ (กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคสที่ใช้) และได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 49 เปอร์เซ็นต์ (กรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกรัมกลูโคสที่ใช้) ดังสมการต่อไปนี้

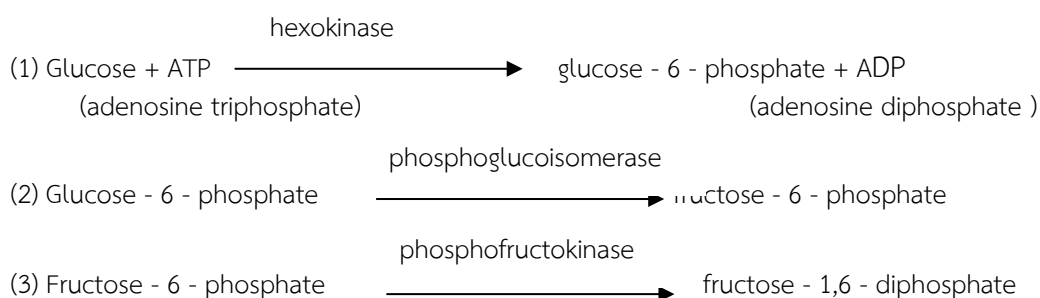


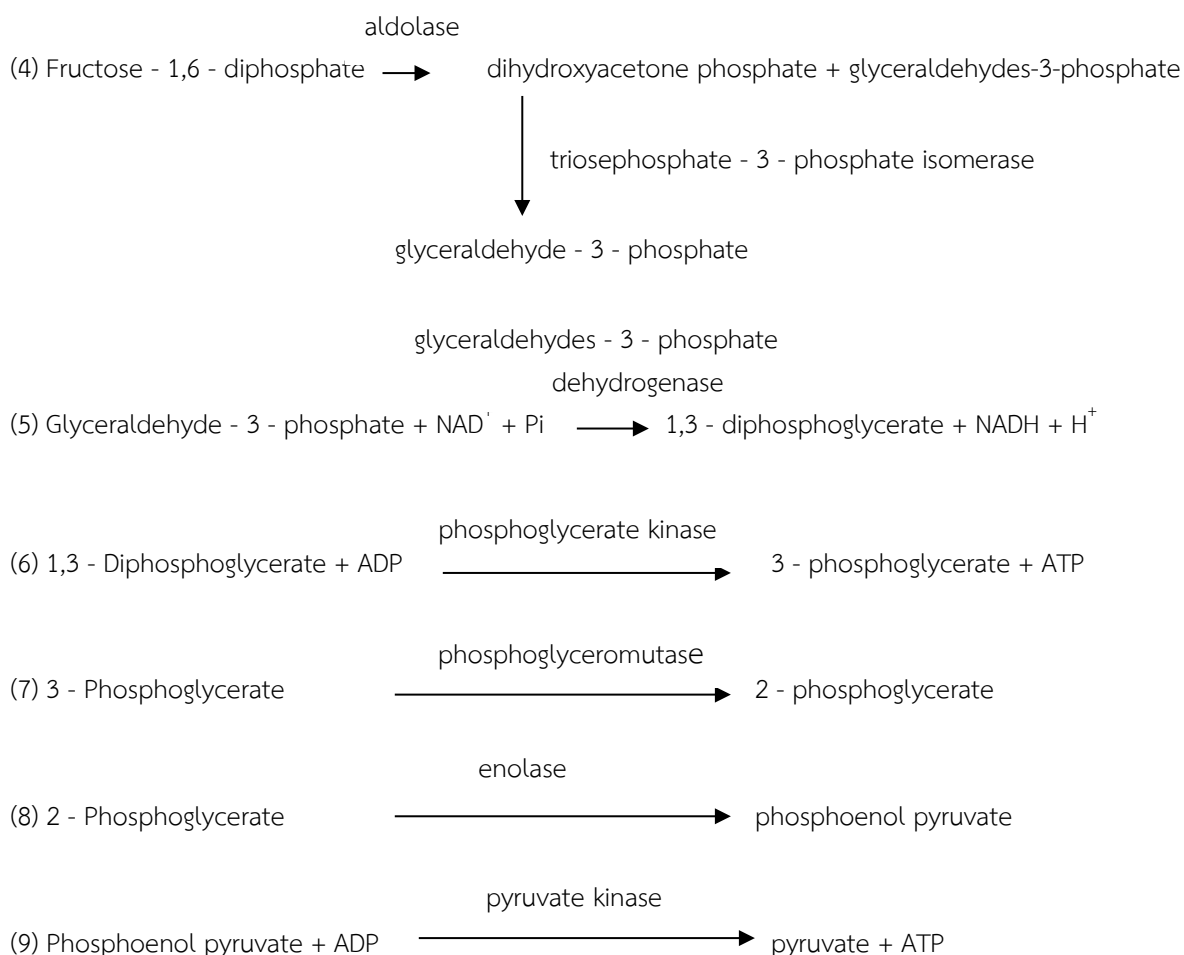
จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิด ได้แก่ *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces fragillis*, *K. marxianus*, *Candida utilis*, *Pachysolen tannophilus*, *Shizosaccharomyces* sp. และ *Zymomonas mobilis* เป็นต้น (Lin และ Tanaka, 2006)

วิธีการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลภายในเซลล์จุลินทรีย์สามารถแบ่งออกได้ 2 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

1) วิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway

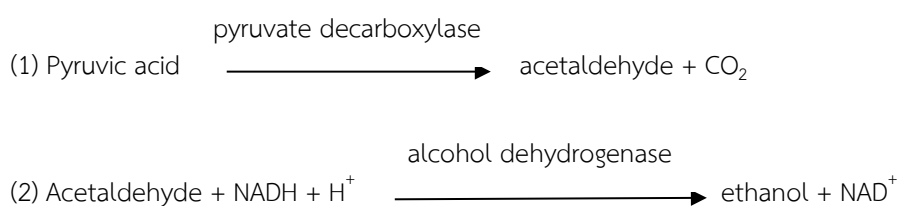
ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจนและระบบมีความเป็นกลางหรือกรดเล็กน้อย โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน กลูโคสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไพรูวิก โดยมีขั้นตอนการเปลี่ยนดังนี้ (วิลาวัณย์, 2539)





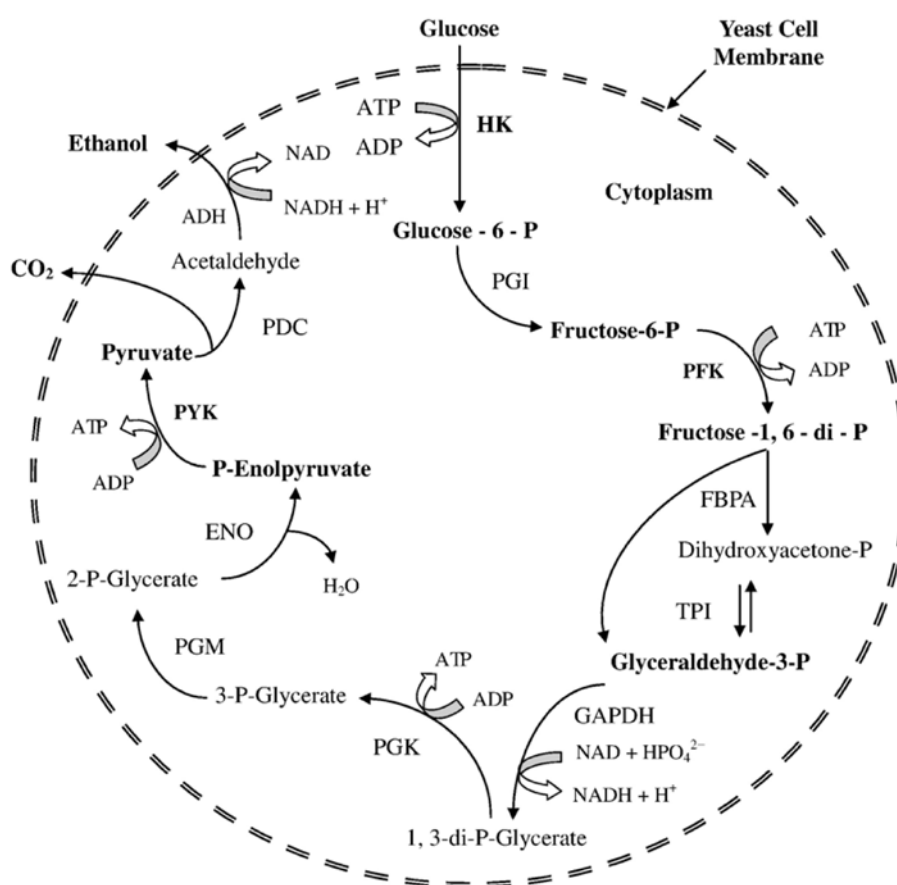
2) วิธีการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นเอทานอล

หลังจากที่น้ำตาลกลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซิสแล้ว ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะได้กรดไพรูวิก 2 โมเลกุล จากนั้นกรดไพรูวิกจะถูกเปลี่ยนเป็นสารต่างๆ แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับกลไกการใช้กรดไพรูวิกในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และสภาวะในการดำรงชีวิตขณะนั้น เช่น จุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติก จะเปลี่ยนกรดไพรูวิกไปเป็นกรดแลคติกในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศกรดนี้จะเข้าสู่กระบวนการผลิตเซลล์หรือสร้างผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น หรือถ้าเป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้อากาศจะเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นอะซีติลโคเอก่อนเข้าสู่วัฏจักรเคร็บ และเข้าสู่กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ให้พลังงาน 32 ATP ปริมาณพลังงานจะมากเท่าใดขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่มีการสลายพลังงานหรือขึ้นอยู่กับกลไกของสิ่งมีชีวิตนั้นในการสลายสารให้พลังงาน (คณิต, 2548) จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นเอทานอล กลไกการเปลี่ยนกรดไพรูวิกของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ (วิลาวณย์, 2539) มีขั้นตอนดังนี้



กรดไพรูวิกที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล ทำให้ปริมาณเอทานอลสูงขึ้น อย่างไรก็ตามในจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลได้ จะมีกระบวนการใช้สารต่างๆ แตกต่างกันไป ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ ด้วย หรือจุลินทรีย์นั้นอาจสามารถใช้เอทานอลนั้นในการเจริญต่อไปได้อีก ทำให้ปริมาณเอทานอลลดลงเมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี (วิลาวัณย์, 2539)

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์หลังการหมักที่ตรวจพบ เมื่อใช้ *S. cerevisiae* ในการใช้น้ำตาลเฮกโซสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ เอทานอล 48.4 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 46.5 เปอร์เซ็นต์ อะซิตาลดีไฮด์ 0.0 – 0.3 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติกร้อยละ 0.05 – 0.25 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 2.5 – 3.6 เปอร์เซ็นต์ กรดแลคติก 0.0 – 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรดซัคซินิก 0.5 – 0.77 เปอร์เซ็นต์ และ Fuel oil 0.025 – 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น (ณัฐศิษฐ์ และคณะ, 2530)

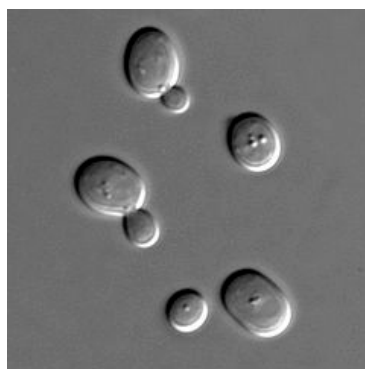


รูปที่ 2.1 การสลายน้ำตาลกลูโคสโดยวิถีไกลโคไลซิส โดยน้ำตาลกลูโคสเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก จากนั้นกรดไพรูวิกเปลี่ยนเป็นเอทานอลและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (HK: hexokinase, PGI: phosphoglucose isomerase, PFK: phosphofructokinase, FBPA: fructose biphosphate aldolase, TPI: triose phosphate isomerase, GAPDH: glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, PGK: phosphoglycerate kinase, PGM: phosphoglyceromutase, ENO: enolase, PYK: pyruvate kinase, PDC: pyruvate decarboxylase, ADH: alcohol dehydrogenase (Madigan และคณะ 2000).

2.2 ยีสต์

2.2.1 ลักษณะทั่วไปและโครงสร้างของยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวุกยูคาริโอต ยีสต์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมหรือรี นอกจากนี้อาจมีรูปร่างเป็นรูปไข่ เลมอน ทรงกระบอก สามเหลี่ยม หรือยาวเป็นสาย ขนาดของยีสต์แตกต่างกันในแต่ละชนิด ลักษณะเด่นของยีสต์คือ เป็นเซลล์เดี่ยวและมีหน่อ การแตกหน่อบางครั้งไม่หลุดออกจากกัน แต่เกาะกันเป็นกลุ่ม บางครั้งมีการเปลี่ยนแปลงโดยเซลล์ตรงกลางยาวต่อกันเป็นสาย เรียกชุดไมซีเลียม (pseudomycelium) โครงสร้างทั่วไปของยีสต์คือ ผนังเซลล์หนาประมาณ 25 นาโนเมตร หนัก 25 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งเซลล์โดยพบโปรตีนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ โดยอาจอยู่ในรูปเอนไซม์ที่ติดผนังเซลล์ เซลล์เมมเบรนของยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพอลิพิดและโปรตีน คาร์โบไฮเดรตมีปริมาณเล็กน้อยมีนิวเคลียสเห็นได้ชัดเจนเมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ โดยนิวเคลียสของยีสต์มักอยู่ระหว่าง แวคิวโอลและหน่อ ไมโทคอนเดรียมีรูปร่างกลมหรือรูปท่อน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.3 – 1 ไมโครเมตร ยาว 3 ไมโครเมตร ในยีสต์ที่โตเต็มวัย ภายในเซลล์จะเห็นแวคิวโอลขนาดใหญ่ หน้าที่ของแวคิวโอลยังไม่แน่ชัดแต่พบว่าในแวคิวโอลมีไฮโดรไลติกเอนไซม์ พอลิฟอสเฟต ลิพิด สารตัวกลางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และโลหะไอออน จึงเชื่อว่าอาจทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บสะสมอาหาร และไฮโดรไลติกเอนไซม์ ส่วนโครงสร้างอื่น ๆ ภายในเซลล์ ประกอบด้วย ไรโบโซมชนิด 80s ร่างแหเอนโดพลาสมิก กอลจิบอดี และเม็ดไขมัน (ลักษณะ, 2548)



รูปที่ 2.2 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ *S. cerevisiae*
(http://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae)

2.2.2 ปัจจัยที่สำคัญต่อยีสต์ในการหมักเอทานอล

2.2.2.1 ธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามิน

ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์และการหมักเอทานอลสามารถแยกออกเป็นกลุ่มได้ดังนี้ (วรารุณ, 2529)

2.2.2.1.1 ไนโตรเจน ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็น โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้ ammonium ions เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่ในยีสต์บางชนิดต้องการกรดอะมิโนที่จำเพาะเท่านั้น เพราะกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นตัวควบคุมการทำงานของ glycolysis pathway อย่างไรก็ตาม ในตัวยีสต์ประกอบด้วย purine, pyrimidines และกรดอะมิโน ดังนั้นจึงน่าจะใช้ตัวยีสต์เองเป็นแหล่ง amino-nitrogen เช่น ในการนำน้ำกากส่าหรือ Stillage กลับมาใช้ละลายกากน้ำตาล (ประมาณ 10 - 30 เปอร์เซ็นต์) เราเรียกกระบวนการนี้ว่า “Stopping back” ซึ่งนอกจากจะได้ธาตุอาหารแล้ว ยังช่วยเพิ่ม buffering capacity และ ลด

ปริมาณน้ำที่ต้องการใช้รวมทั้งเป็นการกำจัดน้ำกากส่าทิ้งไปในตัวด้วย หรือโดยการนำเอาเซลล์ยีสต์ที่ถูกย่อยสลาย (lysed yeast cell) กลับมาใช้ใหม่ (Jones and Ingledew, 1994) ปัจจุบันแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหมักแอลกอฮอล์คือ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

2.2.2.1.2 ฟอสฟอรัส โดยมากใช้ในรูปเกลือฟอสเฟต ในอัตราประมาณ 0.6 มิลลิโมลาร์ต่อกรัมเซลล์ ฟอสเฟต (ในรูป H_2PO_4) มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ เพราะเป็นตัวควบคุมการสังเคราะห์ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต และรักษาสภาพของผนังเซลล์ (Walker, 1994)

2.2.2.1.3 ซัลเฟอร์ ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง โดยอยู่ในรูปของเมไธโอนีน (methionine) แต่เนื่องจากเมไธโอนีนมีราคาแพงมาก ดังนั้นในอุตสาหกรรมจึงใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแทน (เกลือ inorganic sulphate จะถูกเปลี่ยนเป็น methionine ภายในเซลล์ของยีสต์ แต่ต้องอาศัยพลังงาน 2 moles $ATP/mole SO_4^{2-}$ reduced) (Berry et al., 1987)

2.2.2.1.4 วิตามิน เป็นตัวควบคุมเมแทบอลิซึมของยีสต์ วิตามินเป็นโคเอนไซม์ (co-enzymes) หรือสารเริ่มต้น (precursors) ที่ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้เต็มที่ วิตามินที่ยีสต์ต้องการส่วนใหญ่เป็นไบโอติน และแพนโทธีนิกแอซิด (Alfenore et al., 2002) ความต้องการวิตามินชนิดอื่น ๆ เช่น ไธอามีน (B1) ไพริดอกซิน (B6) ไนอาซิน โฟลิกแอซิด (folic acid) และ p-amino benzoic acid ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ บางสายพันธุ์ถ้ามีไธอามีน แต่ขาดไพริดอกซินจะทำให้การเจริญลดลง ในขณะที่บางสายพันธุ์เจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีไธอามีนและไพริดอกซินเท่านั้น (วรารุณ, 2529) สำหรับในตารางที่ 2.1 แสดงวิตามินชนิดต่าง ๆ ในรูปที่เหมาะสมในการทำงาน หน้าที่ของวิตามินในเมแทบอลิซึม และความเข้มข้นที่ต้องการในกระบวนการหมัก

2.2.2.1.5 โลหะที่มีผลต่อการเจริญและการหมักเอทานอล โลหะที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์และ/หรือการหมักของเอทานอลมีหลายชนิด ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (ศิริมา, 2545) ได้แก่

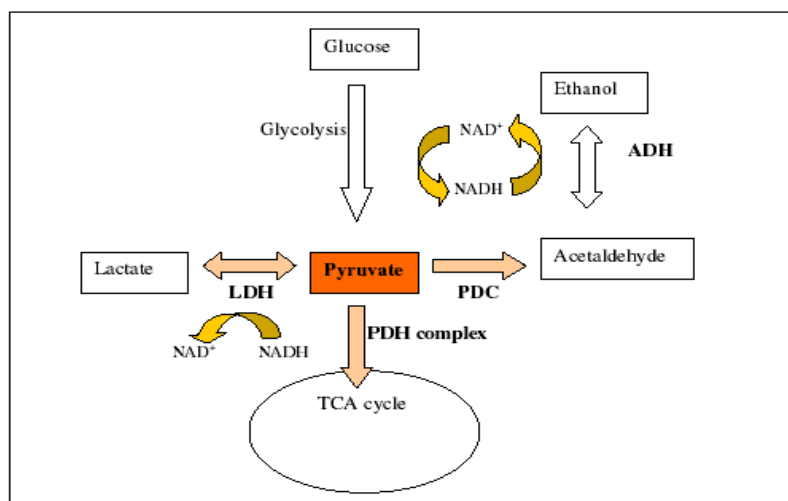
- 1) Macroelements ได้แก่ K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn และ Cl เป็นต้น ซึ่งยีสต์ต้องการในช่วง 0.1-1 mM และแร่ธาตุพวกนี้เข้าไปในเซลล์ยีสต์โดยอาศัย facilitated diffusion
- 2) Microelements ได้แก่ Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni และ Va, เป็นต้น ซึ่งยีสต์ต้องการใช้ในระดับ 0.1-100 μM
- 3) Inhibitors ได้แก่ Ag, As, Bd, Hg, Li, Ni, Os, Pd, Se และ Te เป็นต้น ถ้ามีในระดับความเข้มข้นสูงกว่า 10-100 μM จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการหมักของยีสต์

ตารางที่ 2.1 ผลของวิตามินต่อเมแทบอลิซึมของยีสต์ (วรารุณี, 2529)

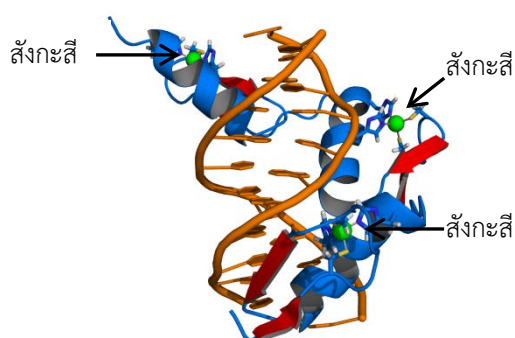
Vitamin	Active form	Metabolic role	Optimum concentration (mg/l)
Biotin	Biotin	All carboxylation and decarboxylation reactions	0.005-0.5
Pantothenate	Coenzyme A	Keto acid oxidation reactions fatty acid metabolism, amino acid, carbohydrate, choline metabolism	0.2-2.0
Thiamin (B1)	Thiamin pyrophosphate	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	0.5-5.0
Niacin (Nicotinic acid)	NAD^+ , $NADP^+$	Dehydrogenation reaction	0.1-1.0
Riboflavin (B2)	FMN, FAD	Same flavoprotein, dehydrogenation reactions and some amino acid oxidations	0.1-0.25

ในหัวข้อนี้จะกล่าวถึงเฉพาะโลหะที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ Zn, Mg และ Mn

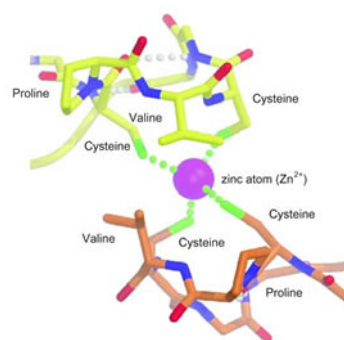
(1) สังกะสี (Zn) จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ซึ่งสังกะสีมีผลต่อการเจริญของเซลล์และเมแทบอลิซึมและมีความสำคัญต่อโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ โดยสังกะสีจะเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) และเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์เกือบ 300 ชนิดรวมไปถึงเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH) ซึ่ง ADH เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกับผลิตเอทานอลโดยทำหน้าที่เปลี่ยน acetaldehyde ไปเป็นเอทานอล (รูปที่ 2.3) เซลล์ต้องการสังกะสีประมาณ 0.12 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ในสถานะที่มีสังกะสีในระดับต่ำจะเป็นอันตรายต่อเมแทบอลิซึมของยีสต์ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนเสียหายและส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบฟอสโฟลิปิดของเมมเบรน (Zhao et al., 2009) Zinc finger proteins เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน (gene expression) และป้องกันดีเอ็นเอจาก oxidative reaction ตัวอย่างการจับกันระหว่างดีเอ็นเอและ Zinc finger protein และการจับกันของสังกะสีและกรดอะมิโนในการซ่อมแซมดีเอ็นเอแสดงดังรูปที่ 2.4 และ 2.5 ตามลำดับ



รูปที่ 2.3 วิธีการผลิตเอทานอล ADH : alcohol dehydrogenase, LDH : lactate dehydrogenase, PDC : pyruvate decarboxylase, PDH, pyruvate dehydrogenase (Acar, n.d.)



รูปที่ 2.4 การจับกันระหว่าง DNA กับ ZIF268 protein ซึ่งมีอยู่ 3 zinc finger motifs (http://www.metasynthesis.com/webbook/13_lab-matrix/LAB_matrix.html)

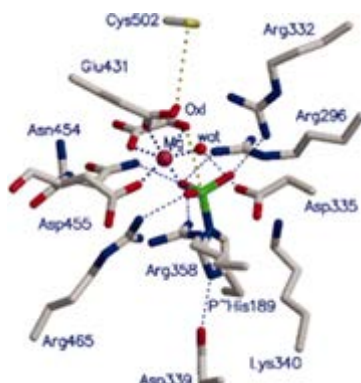


รูปที่ 2.5 สังกะสีจับกับ Cyteine ในการซ่อมแซม DNA (<http://www.eurekalert.org/features/doi/2002-11/dbnl-tsb110702.php>)

(2) แมกนีเซียม (Mg) เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของยีสต์ในไกลโคไลซิส เช่น ATPase เป็นต้น นอกจากนี้แมกนีเซียมยังกระตุ้นการสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็น การแบ่งเซลล์ เกี่ยวข้องกับโครงสร้างและหน้าที่ของไมโทคอนเดรียและร่วมไปถึงการนำฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ (Berry et al., 1987) แมกนีเซียมส่วนใหญ่อยู่ในรูป $MgCl_2$ และ $MgSO_4$ Cao และคณะ (2006) และ Hu และคณะ (2003) พบว่าการเติมแมกนีเซียมช่วยให้เซลล์ทนต่อเอทานอลได้เพิ่มขึ้น

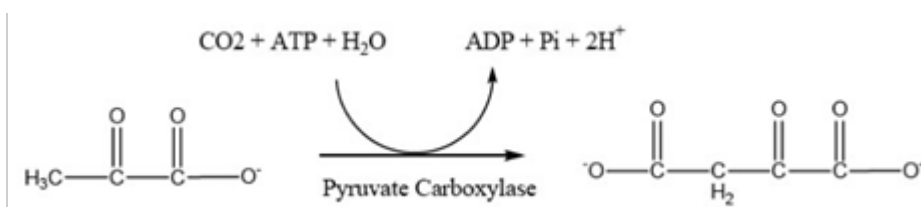
Dombek และ Ingram (1986) รายงานว่าการมีแมกนีเซียมเพียงพอในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจะช่วยขยายระยะ exponential growth phase ให้ยาวขึ้น และทำให้เพิ่มอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสและการผลิตเอทานอล แมกนีเซียมยังช่วยป้องกันเซลล์ยีสต์ภายใต้สภาวะที่มี environmental stress ในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น เอทานอลสูง อุณหภูมิสูง หรือ high osmotic pressure (Walker และ Maynard, 1997) นอกจากนี้แมกนีเซียมยังช่วยรักษาโครงสร้างของ tertiary

protein และโครงสร้างของเซลล์และออร์แกเนลล์ ช่วยรักษาประจุของฟอสโฟลิปิด จึงทำให้สามารถรักษาโครงสร้างของเมมเบรนได้ (Walker, 1998)



รูปที่ 2.6 Mg^{2+} เป็น ligand interaction ในโครงสร้างของเอนไซม์ phosphoenolpyruvate (Teplyakov และคณะ, 2006)

(3) แมงกานีส (Mn) เป็นโลหะอีกชนิดหนึ่งที่เป็นต่อการเจริญและเมแทบอลิซึมของยีสต์ โดยจะถูกสะสมไว้ในแวคิวโอล แมงกานีสเป็นโคแฟกเตอร์ในเอนไซม์หลายๆ ชนิด รวมไปถึงเอนไซม์ mitochondrial superoxide dismutase, arginase และ pyruvate carboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา carboxylation ของ pyruvate ไปเป็น oxaloacetate (รูปที่ 2.7) มีรายงานพบว่า ถ้าในอาหารมีปริมาณของแมงกานีสที่เหมาะสมจะทำให้อัตราการเจริญจำเพาะของ *S. cerevisiae* สูงขึ้น (von Meyenburg, 1969)



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยา carboxylation ของ pyruvate carboxylate (http://www_deltatrac_net-images-CHARTS-Gluconeogenesis-image015_png.mh)

2.2.2.1.6 ปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งเสริมการเจริญ (Growth promoting factors) ได้แก่ กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก กรดไขมันและสเตอรอยด์ (steroid) สารเหล่านี้ถูกใช้ไปในกระบวนการสังเคราะห์และเพิ่มผลได้เอทานอล (ethanol yield) ในบางกรณีความต้องการ growth factor ของยีสต์ขึ้นกับสภาพแวดล้อม เช่น ในกรณีที่ยีสต์เจริญในสภาพไร้อากาศ จะต้องการ ergosterol และกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว และในกรณีของ thermophilic yeast ต้องการ choline, carnitine หรือ leucine growth factor ที่สำคัญสำหรับยีสต์หลายชนิดได้แก่ inositol โดย inositol ในรูปของ phosphatidyl inositol ทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสภาพของเมมเบรนของยีสต์ ซึ่งจะมีผลต่อการอัตราการหมัก

2.2.2.2 อุณหภูมิของการหมัก

อุณหภูมิมีความสำคัญมากในการหมักเอทานอล สำหรับยีสต์ที่ใช้กันในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลทั่วไปนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส และยีสต์จะทนไปได้ถึง 37 องศาเซลเซียส ถ้าสูงขึ้นไปถึง 40 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่การเจริญจะหยุดชะงัก ดังนั้นในช่วงหลังจากผ่าสาไปแล้ว 1-10 ชั่วโมง ควรควบคุมอุณหภูมิให้ไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส หลังจาก 10 ชั่วโมงไปแล้ว การควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 37 องศาเซลเซียส การหมักจะดำเนินไปด้วยดี ถ้าอุณหภูมิในช่วง 10 ชั่วโมงแรกการสูงกว่า 37 องศาเซลเซียสแล้วอาจจะเกิดปัญหาแบคทีเรียเจริญขึ้นมามากเกินไปและจะเป็นผลให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ การควบคุมอุณหภูมิจึงจำเป็นและเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลผลิตที่ได้ สำหรับการหมักเพื่อให้ได้เอทานอลสูงประมาณ 15-20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรและให้ได้กลิ่นรสดี เช่น การหมักไวน์และสาเกจะหมักไม่เกิน 15 องศาเซลเซียส การหมักที่อุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดแอลกอฮอล์หนัก (fusel oil) มากขึ้น ซึ่งจะมีผลต่ออาการมึนและปวดหัวของผู้บริโภค อย่างไรก็ตามการลดอุณหภูมิของถังหมักลงเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการผลิต

สาเหตุที่อุณหภูมิในระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากกิจกรรมของยีสต์โดย ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสจะเกิดความร้อน 149.5 แคลลอรี่ต่อกรัมซูโครส ในกรณีน้ำตาลกลูโคสจะเกิดพลังงานความร้อนจากการหมัก 140.2 แคลลอรี่ต่อกรัมกลูโคส ความร้อนที่เกิดขึ้นเป็นพวก exothermic energy ดังนั้นความร้อนจึงถ่ายเทลงสู่น้ำหมักทำให้น้ำหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้น (Burrows, 1970)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ โดยปกติอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส แต่ในช่วงที่มีเอทานอลผลิตออกมาแล้วจะมีผลทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเปลี่ยนไป ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณเอทานอลเป็นสำคัญรวมถึงสายพันธุ์ของยีสต์ด้วย โดยใน rapid batch fermentation ที่ได้เอทานอล 9.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะทำให้ยีสต์มีอัตราในการรอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิสูงกว่า 20-25 องศาเซลเซียส

2.2.2.3 pH ในระหว่างการหมัก

ยีสต์ชอบเจริญในสภาพที่เป็นกรดโดยมีค่า pH อยู่ในช่วง 3.8 - 5.5 ถ้า pH ต่ำกว่า 3.5 การเจริญจะลดลง ถ้า pH ต่ำถึง 3.0 ยีสต์จะไม่เจริญ ดังนั้นในการหมักจึงนิยมปรับให้มี pH อยู่ในช่วง 4.0 - 4.5 pH ที่ต่ำจะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้ เพราะแบคทีเรียทั่วไปชอบเจริญในสภาพที่ pH เป็นกลาง แต่มีแบคทีเรียบางชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก เจริญได้ดีในระดับ pH ที่ยีสต์เจริญได้และมักจะสร้างปัญหา เมื่อแบคทีเรียพวกนี้สร้างกรดขึ้นมามากเกินไปจนยีสต์ทนไม่ได้

การติดตามวัดค่า pH ในระหว่างการหมักนับว่ามีความจำเป็น บ่อยครั้งปัญหาที่เกิดขึ้นสามารถคาดคะเนได้ว่าการหมักผิดปกติโดยการสังเกตอุณหภูมิของถังหมักคู่กับการที่ pH ลดลงอย่างรวดเร็วผิดปกติ โดยที่เอทานอลไม่เพิ่มขึ้น เมื่อเกิดเหตุการณ์เช่นนั้นขึ้น บางโรงงานแก้ปัญหาด้วยการสูบน้ำหมักไปปนกับถังอื่นที่หมักได้ดีมีเอทานอลสูงเกินกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ และเติมกล้ายีสต์เพิ่มควบคู่กันไปอีกทางหนึ่ง

2.2.2.4 ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

การหมักเอทานอลโดยใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูง เป็นการหมักที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลมากกว่า 27 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ขึ้นไปและให้ได้ความเข้มข้นเอทานอลมากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (Jones และคณะ, 1994, Thomas และคณะ, 1996) การหมักแบบ VHG ทำให้ได้ความเข้มข้นเอทานอลเพิ่มขึ้นซึ่งทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ การใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงในการ

หมักเอทานอลจะส่งผลทำให้การเจริญของจุลินทรีย์ช้าลงและทำให้เกิด osmotic stress ต่อเซลล์ อย่างไรก็ตามการแปรรูปปัจจัยอื่น เช่น การใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม การให้อากาศ การเติมสารอาหารที่เหมาะสม เป็นต้น (Jones และคณะ, 1994) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะน้ำตาลสูงได้

2.2.2.5 ความเข้มข้นของเอทานอล

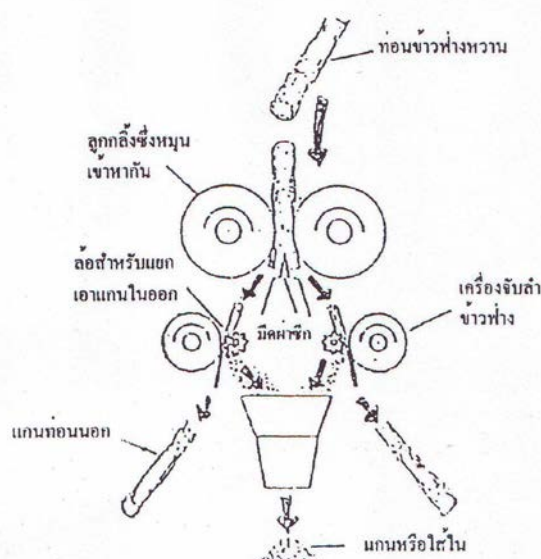
เอทานอลที่ได้จากการหมักสามารถยับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์ได้ ถ้าเอทานอลที่ได้มีความเข้มข้นสูงขึ้น อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์จะลดลง ซึ่งทำให้อัตราการหมักลดลงไปด้วย เนื่องจากเอทานอลมีผลต่อเอนไซม์และสรีรวิทยาของเซลล์ ในกรณีแรกเอทานอลจะไปมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) และ เฮกโซไคเนส (hexokinase) ในกรณีหลังมีผลต่อเมมเบรนของเซลล์ยีสต์ กล่าวคืออาจมีการทำลาย หรือทำให้คุณสมบัติของเมมเบรนเปลี่ยนแปลงไป (วรารุติ, 2529)

2.3 ข้าวฟ่างหวาน

ข้าวฟ่างหวาน (Sweet Sorghum; *Sorghum bicolor* (Linn.) Moench) มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบตะวันออกของแอฟริกา เป็นพืชเศรษฐกิจอย่างหนึ่งของประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อ 50 ปีที่ผ่านมา โดยปลูกเพื่อใช้ทำน้ำเชื่อม (syrup) และน้ำตาลเกล็ด สำหรับประเทศไทยข้าวฟ่างหวานนับเป็นพืชใหม่ที่ยังไม่มีการปลูกเป็นการค้าแต่มีการทดลองเกี่ยวกับพืชชนิดนี้อยู่บ้าง

ข้าวฟ่างหวาน มีลักษณะเช่นเดียวกับข้าวฟ่างที่ใช้ประโยชน์จากเมล็ดที่ปลูกกันทั่ว ๆ ไป ต่างกันตรงที่มีน้ำตาลในลำต้นมากกว่า จึงสามารถนำไปผลิตเป็นน้ำตาลเพื่อบริโภคได้ และข้าวฟ่างหวานมีข้อดีเหนือกว่าอ้อย คือ สามารถปลูกและเจริญเติบโตได้ในดินแทบทุกชนิด และความทนทานต่อสภาพภูมิอากาศแห้งแล้ง ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและมีอายุเก็บเกี่ยวสั้นประมาณ 90 - 120 วันเท่านั้น อีกทั้งยังสามารถใช้ประโยชน์ได้ในลักษณะเดียวกับอ้อย เพราะนอกเหนือจากการผลิตเป็นน้ำเชื่อมหรือน้ำตาลแล้ว ข้าวฟ่างหวานยังสามารถผลิตเป็นอาหารสัตว์ กระดาษไม้อัดและน้ำมันเชื้อเพลิงได้อีกด้วย การแยกลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อไปใช้เป็นประโยชน์ ใช้วิธี “Tilby Separator Process” รูปที่ 2.8 ซึ่งประกอบด้วยเครื่องมือที่แยกลำต้นข้าวฟ่างหวานออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนผิวนอกของลำต้นข้าวฟ่างหวานที่เรียกว่า “outer rind fiber” สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตกระดาษ ส่วนแกนในเป็นส่วนประกอบของน้ำหวาน ซึ่งมีน้ำตาลอยู่มาก จึงสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอทานอล สำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์เบนซินและดีเซลได้ ใบและเมล็ดสามารถทำเป็นอาหารหมักใช้เลี้ยงสัตว์ นอกจากนี้ส่วนของก้านช่อดอกยังใช้ทำปุ๋ยหรือเป็นเชื้อเพลิงได้ (น้อม, 2523)

ข้าวฟ่างหวานที่ปลูกเพื่อผลิตน้ำตาลหรือเพื่อผลิตแอลกอฮอล์นั้นควรมีลำต้นโต เพื่อสะดวกต่อการหีบน้ำตาล มีลำต้นแข็งแรง ไม่หักล้มง่าย ลำต้นฉ่ำน้ำ และมีปริมาณน้ำตาลสูง มีความต้านทานต่อโรคสูง มีอายุในการเก็บเกี่ยวไม่ยาวเกินไป เพื่อให้ทันกับช่วงฝน ทนทานต่อความแห้งแล้งได้ดีในสภาพฝนไม่แน่นอน และมีความต้านทานต่อสภาพน้ำขังแฉะ ในกรณีที่มิฝนตกชุก ถ้ามีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ทำน้ำเชื่อม ควรให้กลั่น สี ของน้ำเชื่อมที่ดี แต่ถ้ามีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแอลกอฮอล์ คุณภาพดังกล่าวไม่จำเป็น(กฤษฎา, 2525)



รูปที่ 2.8 กระบวนการแยกส่วนต่างๆ ของข้าวฟ่างหวนแบบ Tilby (Tilby separation process) (น้อม, 2523)

จากคุณสมบัติของข้าวฟ่างหวนที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่าข้าวฟ่างหวนเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ของเกษตรกรได้ในอนาคต โดยเฉพาะการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวนนั้นมีความเป็นไปได้สูงมาก ดังนั้นการศึกษาศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อผลผลิตและคุณภาพของข้าวฟ่างหวนโดยรวมไปถึงการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวน จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุด

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะ VHG สรุปได้ดังนี้

Bafrncova และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบกะภายใต้สภาวะ VHG ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 300 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ *S. cerevisiae* Pz90 และแปรผันแหล่งไนโตรเจน โดยให้ความเข้มข้นไนโตรเจนเริ่มต้น 0.141 โมลต่อลิตร ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่นำมาศึกษาได้แก่ ยีสต์เอ็กซ์แทรก 9.0 กรัมต่อลิตร Casamino acid 5.8 กรัมต่อลิตร fresh yeast autolysate 7.2 กรัมต่อลิตร และ urea 1.5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า เมื่อเติมไนโตรเจนลงในอาหารทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นจากเดิม 17 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการใช้กลูโคสเพิ่มขึ้นด้วย

Bvochora และคณะ (2000) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากการผสมกันระหว่างน้ำคั้นข้าวฟ่างหวนและเมล็ดข้าวฟ่างภายใต้การหมักแบบ VHG โดยใช้ *S. cerevisiae* strain N96 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในการทดลองได้เติมน้ำตาลซูโครสลงในน้ำคั้นข้าวฟ่างหวนเพื่อให้ได้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 340 กรัมต่อลิตร และใช้ระยะเวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า การหมักน้ำคั้นข้าวฟ่างหวนร่วมกับเมล็ดข้าวฟ่างหวนที่บดให้เอทานอลสูงสุด 16.8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ส่วนการหมักน้ำคั้นข้าวฟ่างหวนร่วมกับเมล็ดข้าวฟ่างไม่บดให้เอทานอลสูงสุด 11 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

Alfenore และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบกึ่งกะ โดยใช้ *S. cerevisiae* CBS8066 ในถังหมักขนาด 20 ลิตร โดยใช้เทคโนโลยี VHG ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 700 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 4.0 และแปรรูปการให้อากาศที่สภาวะ full aeration ความเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm และสภาวะ micro-aeration ที่มีการกวน 300 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่า เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักในช่วงที่ 45 ในสภาวะที่เป็น full aeration ได้ความเข้มข้นเอทานอล 147 กรัมต่อลิตร มีอัตราผลผลิตเอทานอลสูงสุด 9.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้ความเข้มข้นกลีเซอรอล 4.0 กรัมต่อลิตร ส่วนสภาวะ micro-aeration ได้ความเข้มข้นเอทานอล 131 กรัมต่อลิตร มีอัตราผลผลิตเอทานอลสูงสุด 7.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้ความเข้มข้นกลีเซอรอล 12.2 กรัมต่อลิตร

Bai และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องภายใต้สภาวะ VHG ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร ใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 2 ชนิดต่อกัน คือ stirred tank bioreactor ต่อกับ three-stage tubular และมีปริมาตรทำงาน 1500, 620, 610 และ 530 ตามลำดับ ควบคุม pH ที่ 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการให้อากาศใน stirred tank bioreactor ที่ 0.05 vvm และใน tubular 2 ถึงสุดท้ายที่ 0.005 vvm และใช้อัตราการเจือจาง 0.012 ต่อชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ได้ความเข้มข้นเอทานอลเฉลี่ย 15.9 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หรือ 124.6 กรัมต่อลิตร และได้ผลได้ 0.484 หรือ 94.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับผลได้ทางทฤษฎี 0.511

Laopaiboon และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นข้าวฟ่างหวาน โดย *S. cerevisiae* NP01 ที่ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้น 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิเมตร โดยหมักใน air-locked flask ขนาด 500 มิลลิเมตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หมักแบบสภาวะนิ่ง แปรรูปแหล่งคาร์บอนเสริมได้แก่ ซูโครสและโมลาส เพื่อให้ได้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 240, 280 และ 320 กรัมต่อลิตร และแปรรูปแหล่งไนโตรเจนเสริมได้แก่ ยีสต์เอ็กซ์แทรกคร่วมกับเปปโตน (YEP) และแอมโมเนียมซัลเฟต ผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเสริมเป็นซูโครส และใช้ YEP เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดคือ 120.68 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้พบว่า การทดลองที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเสริม ยีสต์จะใช้ไนโตรเจนมากกว่าที่ไม่เติม และพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเนื่องจากได้เอทานอลต่ำกว่าชุดควบคุม (ไม่มีการเติมไนโตรเจนเสริม) อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการใช้ YEP จะได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงขึ้นแต่จะใช้ระยะเวลาการหมักนานขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

Sridee และคณะ (2009a) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะ VHG ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที โดยใช้ *S. cerevisiae* NP01 ที่ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้น 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิเมตร แปรรูปแหล่งไนโตรเจนได้แก่ (1) ยีสต์เอ็กซ์แทรกและเปปโตน 3 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (YEP) (2) ยีสต์เอ็กซ์แทรก (YE) 8 กรัมต่อลิตร และ (3) dried spent yeast (DSY) หรือกากเซลล์ยีสต์ 8 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นเอทานอลจากการทดลองชุดควบคุม (ไม่มีการเติมแหล่งอาหารเสริม) การเติม YEP, YE และ DSY คือ 98.90, 104.60, 107.12 และ 104.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ได้แปรรูปความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นเป็น 1×10^7 , 5×10^7 และ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิเมตร โดยมีการเติม DSY เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นไม่มีผลต่อความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีผลต่ออัตราผลผลิตเอทานอล ซึ่งระยะเวลาการหมักที่

ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้น 1×10^7 , 5×10^7 และ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คือ 72, 56 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

Sridee และคณะ (2009b) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะ VHG ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร โดยใช้ *S. cerevisiae* NP01 ที่ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้น 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แปรผันแหล่งไนโตรเจนโดยเติม ยีสต์เอ็กซ์แทรก ร่วมกับเปปโตเน (YEP) ที่ 3 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ กากเซลล์ยีสต์ (DSY) ที่ 0, 8 และ 16 กรัมต่อลิตร โดยหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรทำงาน 3.5 ลิตร และถังหมักขนาด 50 ลิตร ปริมาตรทำงาน 40 ลิตร ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการทดลองที่เติม YEP (104.60 กรัมต่อลิตร) และ DSY (104.56 กรัมต่อลิตร) ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น DSY จึงเหมาะสมที่จะนำมาเป็นแหล่งไนโตรเจนเสริมแทนการใช้ YEP ที่มีราคาแพง และพบว่า ความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้เมื่อใช้ DSY 8 และ 16 กรัมต่อลิตร ไม่แตกต่างกัน และขนาดของถังหมักนั้นไม่มีผลต่อผลได้เอทานอล (yield) แต่มีผลต่อความเข้มข้นเอทานอลและอัตราผลผลิตเอทานอล (productivity)

Suwanapong และคณะ (2010) ศึกษาผลของการเติมกากเซลล์ยีสต์และกากเซลล์ยีสต์ที่ถูกย่อยด้วยกรด H_2SO_4 (3 M) ต่อการหมักเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะการหมักแบบ VHG ที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร โดยใช้ *S. cerevisiae* NP01 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในขวดป้องกันอากาศขนาด 1 ลิตร ความเข้มข้นของกากเซลล์ยีสต์และกากเซลล์ยีสต์ที่ถูกย่อยแปรผันที่ 11, 16 และ 21 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับยีสต์เอ็กซ์แทรก 6, 9 และ 12 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า การเติมกากเซลล์ยีสต์ 21 กรัมต่อลิตรให้ความเข้มข้นเอทานอล 107.33 ± 0.22 กรัมต่อลิตร และผลได้สูงสุด 0.47 ± 0.00 นอกจากนี้การเติมกากเซลล์ยีสต์ที่ถูกย่อยที่ความเข้มข้นเท่ากับกากเซลล์ยีสต์ไม่ถูกย่อยไม่ได้ปรับปรุงความเข้มข้นเอทานอลและผลได้เลย แต่ช่วยปรับปรุงอัตราผลผลิตเอทานอล และพบว่าประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลที่เติมกากเซลล์ยีสต์และกากเซลล์ยีสต์ที่ย่อยสูงกว่าชุดควบคุมทำให้มีการเพิ่มสารอาหารเสริม ซึ่งชุดควบคุมได้ความเข้มข้นเอทานอล 87.54 ± 0.21 กรัมต่อลิตร ผลได้ 0.44 ± 0.00 และอัตราผลผลิตเอทานอล 1.58 ± 0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลของสังกะสี แมกนีเซียม และแมงกานีสต่อการผลิตเอทานอลสรุปได้ดังนี้

Auld และคณะ (1976) และ Gottschalk (1986) รายงานว่า สังกะสีเป็น trace elements ที่มีความสำคัญมากต่อการเจริญและการผลิตเอทานอล โดยสังกะสีจำเป็นต่อกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการผลิตเอทานอล เช่น ethanolic dehydrogenase, aldolase alkaline phosphatase และ DNA และ RNA polymerase

การที่มีสารอาหารจำกัด (nutrient limitation) คือปัจจัยหลักที่มีผลกระทบต่อการผลิตเอทานอลในระหว่างการหมักแบบ VHG (Casey et al., 1984) Dombek และ Ingram (1986) รายงานว่าการมีแมกนีเซียมเพียงพอในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจะช่วยขยายระยะ exponential ให้ยาวขึ้น และทำให้เพิ่มอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสและการผลิตเอทานอลด้วย

Gutierrez (1993) รายงานว่า ในอาหารที่ขาดสังกะสี การเจริญของ *S. cerevisiae* M-300-A ลดลงจาก 342 มิลลิกรัมเซลล์ ต่อ 100 มิลลิลิตร เหลือเพียง 278 มิลลิกรัมเซลล์ ต่อ 100 มิลลิลิตร

Hu และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบกะและการทนต่อเอทานอล โดยใช้ น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำ ethanol shock ที่ความเข้มข้นเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีการเติมแมกนีเซียม (แมกนีเซียมซัลเฟต) 3.5 มิลลิโมลาร์ ยีสต์ที่ใช้ในการทดลองคือ self-flocculating yeast ที่ได้จากการ

หลอรวมโปรโตพลาสระหว่าง *Schizosaccharomyces pombe* และ *S. cerevisiae* ผลการทดลองพบว่า การทดลองที่เติมแมกนีเซียมนั้นสามารถผลิตเอทานอลและทนต่อเอทานอลได้มากกว่า (มีการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์) การทดลองที่ไม่เติมแมกนีเซียม (ไม่มีการรอดชีวิต) และมีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์ภายนอกเซลล์ (2 ไมโครกรัมฟอสเฟสต่อมิลลิลิตร) น้อยกว่าการทดลองที่ไม่ได้เติมแมกนีเซียม (8 ไมโครกรัมฟอสเฟสต่อมิลลิลิตร)

Stehlik-Tomus และคณะ (2004) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และผลของสังกะสี คอปเปอร์ และแมงกานีส ต่อการผลิตเอทานอล โดย *S. cerevisiae* TVG₄ ในอาหารโมลาส 90 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แปรผันพีเอชของอาหาร 3.5 – 6.0 และเติมสังกะสีซัลเฟต คอปเปอร์ซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร แปรผันสภาวะการให้อากาศที่สภาวะ semiaerobic conditions และ anaerobic condition ผลการทดลองพบว่า การเติมสังกะสีซัลเฟต คอปเปอร์ซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟต ภายใต้สภาวะ semiaerobic conditions และพีเอช 5.0 ทำให้ค่าผลได้ชีวมวลและผลได้เอทานอลมากกว่าสภาวะ anaerobic condition และพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์เพิ่มขึ้นทั้งในสภาวะ semiaerobic conditions (เพิ่มขึ้น 7-10 เปอร์เซ็นต์) และ anaerobic condition (เพิ่มขึ้น 6 เปอร์เซ็นต์)

Avci และ Dönmez (2005) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Thermoanaerobacter* พบว่า สังกะสีในรูปสังกะสีซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) มีผลต่อการผลิตเอทานอล โดยการผลิตเอทานอลจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเติมสังกะสีซัลเฟต เมื่อใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *T. ethanolicus* (JW200) พบว่าการเติมสังกะสีซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.17 กรัมต่อลิตร จะเพิ่มการผลิตเอทานอลเป็น 4.19 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อไม่ได้เติมสังกะสีซัลเฟตมีการผลิตเอทานอล 2.71 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่เติมสังกะสีซัลเฟตที่ความเข้มข้นเดียวกันเมื่อใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Thermoanaerobacter* (65-2) พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ 3.52 กรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *T. thermohydrosulfuricus* (70-1) พบว่าความเข้มข้นของสังกะสีในอาหารมีผลต่อการผลิตเอทานอล โดยการเติมสังกะสีซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.22 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 5.8 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้สังกะสีซัลเฟตที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้การผลิตเอทานอลลดลง

Wang และคณะ (2007) ศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลในสภาวะ VHG โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสปริมาณ 250 มิลลิลิตร และยีสต์ *S. cerevisiae* โดยมีการเติมแมกนีเซียม ยีสต์เอ็กซ์แทรกต์ ไกลซีน (glycine) ไบโอติน (biotin) เปปโตน (peptone) และอะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ผลการทดลองพบว่า แมกนีเซียมและเปปโตนที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตเอทานอล โดยเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 14 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เป็น 17 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่เติมแมกนีเซียมและเปปโตน

Lui และคณะ (2008) ศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 11.15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเซลล์ตรึง *S. cerevisiae* โดยใช้การออกแบบการทดลอง Orthogonal สารอาหารที่นำมาศึกษาได้แก่ $(NH_4)_2SO_4$ (0, 0.05 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์), K_2HPO_4 (0, 0.125 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์) และ $MgSO_4$ (0, 0.01 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์) ใช้กระบวนการหมักแบบกะในพลาสติกเยาะที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส pH 4.0 particle stuffing rate 30-33 เปอร์เซ็นต์ และใช้การกวนที่ 150 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่าลำดับอิทธิพลของสารอาหารคือ $(NH_4)_2SO_4 > MgSO_4 > K_2HPO_4$ และความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ K_2HPO_4 , 0 เปอร์เซ็นต์;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.20 เปอร์เซ็นต์ และ MgSO_4 , 0.05 เปอร์เซ็นต์ โดยได้ความเข้มข้นเอทานอล 6.2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในขณะที่ชุดควบคุม (ไม่เติมสารอาหาร) ได้เพียง 4.85 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

Xue และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตและการทนต่อเอทานอลของ self-flocculating yeast สายพันธุ์ SPSC01 โดยใช้กระบวนการหมักแบบกะในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้เติมวิตามิน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$ และโลหะต่างๆ ได้แก่ K_2HPO_4 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ลงในน้ำหมัก ผลการทดลองพบว่า สังกะสีและแมกนีเซียมช่วยป้องกันความเป็นพิษของเอทานอล (ethanol toxicity) ต่อเซลล์จุลินทรีย์ โดยการเติมสังกะสีซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.02 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นสังกะสี 4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถเพิ่มการรอดชีวิตของยีสต์ในสถานะที่มีเอทานอล 18 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ได้ 40 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเพิ่มการผลิตเอทานอลได้จาก 34.1 เป็น 43.7 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุมหรือสถานะที่ไม่เติมสังกะสีซัลเฟตในอาหาร อย่างไรก็ตามพบว่าสังกะสีไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ในขณะที่การเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.8 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นแมกนีเซียม 0.078 กรัมต่อลิตร) ทำให้การเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้นจาก 1.88 เป็น 4.06 กรัมต่อลิตร และ การผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 9.5 เป็น 38.2 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียคลอไรด์ทำให้การรอดชีวิตของยีสต์เพิ่มขึ้นจาก 36.9 เป็น 41.8 เปอร์เซ็นต์ และการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 27.0 เป็น 29.0 กรัมต่อลิตร

Zhao และคณะ (2009) ศึกษาผลของการเติมสังกะสีต่อการทนและการผลิตเอทานอลในการหมักแบบต่อเนื่องของ self-flocculating yeast สายพันธุ์ SPSC01 ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 245 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.025 ต่อชั่วโมง และเติมสังกะสีที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 กรัมต่อลิตร ทำ ethanol shock ที่ความเข้มข้นเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) บ่มแบบเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที และ heat shock ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่า การเติมสังกะสีซัลเฟตในอาหารความเข้มข้น 0.01 ถึง 0.1 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มความสามารถในการทนต่อเอทานอลและการทนต่อความร้อนได้เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากผนังเซลล์มีองค์ประกอบของ ergosterol และ trehalose เพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นของสังกะสีซัลเฟตที่เหมาะสมคือ 0.05 กรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้นนี้ได้เอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 104.1 (ไม่เติมสังกะสีซัลเฟต) เป็น 114.5 กรัมต่อลิตร

Nicolic และคณะ (2009) ศึกษาผลของการเติมสารอาหารต่อการผลิตเอทานอลแบบกะโดยเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* จากแป้งข้าวโพดที่ถูกย่อยที่มีน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร หมักในฟลาสก์ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที และใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น 2.5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยสารอาหารที่นำมาใช้ได้แก่ thiamine (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) pyridoxine (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) inositol (1 กรัมต่อลิตร) Ca-panthotenate (2 กรัมต่อลิตร) CaCl_2 (40 ถึง 120 มิลลิกรัมต่อลิตร) CuCl_2 (1 ถึง 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) MgSO_4 (2 กรัมต่อลิตร) ZnSO_4 (0.3 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองพบว่า การเติม MgSO_4 และ ZnSO_4 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุดโดยได้ 83.93 เปอร์เซ็นต์ (โดยมวล) ในขณะที่ชุดควบคุมได้เพียง 76.79 เปอร์เซ็นต์ และการเติมวิตามินและแร่ธาตุ MgSO_4 (2 กรัมต่อลิตร) ZnSO_4 (0.3 กรัมต่อลิตร) CuCl_2 (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) Ca-panthotenate (1 กรัมต่อลิตร) และ inositol (1 กรัมต่อลิตร) รวมกันสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักได้ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม