บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

น้ำมันเชื้อเพลิงจัดเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญที่สุดของมนุษย์ และนับวันก็จะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากในชีวิตประจำวันจำเป็นต้องอาศัยน้ำมันไม่ทางตรงก็ทางอ้อม และไม่ว่าราคาน้ำมันจะแพง ยังคงมีความจำเป็นในการใช้น้ำมัน แต่ปัญหาที่ทั่วโลกกังวลมากกว่าเรื่องราคาก็คือน้ำมันดิบที่มีอยู่ในธรรมชาติจะมีใช้ไปได้อีกไม่เกิน 50 ปี วิธีแก้ปัญหาการขาดแคลนน้ำมันทางหนึ่งก็คือการหาแหล่งพลังงานทดแทน และต้องเป็นพลังงานที่สามารถหมุนเวียนกลับมาใช้ได้ (renewable energy) อย่างเช่น พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังงานแก๊สชีวภาพ (biogas) เพื่อทดแทนแหล่งพลังงานสิ้นเปลืองที่ใช้แล้วหมดไป (Non –renewable energy) เช่น พวกน้ำมันดิบ ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ

ไบโอเอทานอล (bioethanol) หรือเอทานอลชีวภาพ คือเอทานอลที่ได้จากการสังเคราะห์โดยสิ่งมีชีวิต เป็นพลังงานหมุนเวียนอีกชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจในขณะนี้ เนื่องจากเป็นพลังงานที่ใช้ได้ทั้งในโรงงานอุตสาหกรรม และสำหรับรถยนต์ ประเทศไทยมีความเหมาะสมอย่างมากในการผลิตไบโอเอธา นอลเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันดิบ เพราะสามารถใช้ผลผลิตจากการเกษตร หรือของเหลือทิ้งจากภาคเกษตรกรรม มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตได้เป็นอย่างดี วัตถุดิบต่างๆ เหล่านี้มีมากมายในประเทศ ถ้าสามารถนำมาใช้ผลิตเชื้อเพลิงจะช่วยชาติได้

กระบวนการผลิตเอทานอลประกอบด้วย 4 ขั้นตอน

1. การเปลี่ยนเซลลูโลส หรือแป้ง ไปเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์ หรือกรดในการย่อยสลายแต่ถ้าวัตถุดิบที่ใช้ประกอบด้วยน้ำตาลอยู่แล้ว ก็นำมาใช้ในขั้นตอนที่สองได้เลย
2. การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลโดยใช้ยีสต์ ยีสต์จะผลิตเอทานอลได้ประมาณ 10 – 12 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ แต่เอทานอลที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงได้นั้น ต้องมีความบริสุทธิ์สูงถึง 99.5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงต้องนำมาสู่ขั้นตอนที่ 3 และ 4
3. การกลั่นใช้หลักการเดียวกับการกลั่นสุรา เป็นการดึงน้ำออกจากเอทานอล ทำให้ได้เอทานอลความเข้มข้นสูงขึ้น เป็น 95 เปอร์เซ็นต์
4. การดึงน้ำออกเพื่อให้ได้เอทานอลบริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์ ทำได้โดยนำไปผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วนที่เหมาะสม เรียกว่าแก๊สโซฮอล์ ในสหรัฐอเมริกามีสูตรน้ำมันที่ส่วนผสมระหว่างเอทานอลกับน้ำมันเบนซินหลาย สูตรเช่น E10 หมายถึงมีเอทานอล 10 ส่วน น้ำมันเบนซิน 90 ส่วน หรือ E95 หมายถึงมีเฉพาะเอธา นอล เท่านั้น แต่ต้องปรับปรุงลักษณะเครื่องยนต์ให้เหมาะสมกับการใช้กับเอทานอลด้วย เอทานอลที่นำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์จะปลดปล่อยสารพิษ เช่น คาร์บอนมอนอกไซด์ ออกสู่สิ่งแวดล้อมน้อยกว่าการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงมาก นอกจากนี้ยังมีค่าออก

เทนสูง ช่วยให้ประสิทธิภาพการขับเคลื่อนดี เอทานอลเป็นสารที่มีอันตรายต่ำ ละลายน้ำได้ดี และย่อยสลายตามธรรมชาติได้ง่ายกว่าน้ำมันดิบมาก เกิดการรั่วไหลของเอธา นอลลงสู่แหล่งน้ำ หรือพื้นดินก็จะไม่ส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมเหมือนน้ำมันดิบ จะเห็นได้ว่าไบโอเอทานอลเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจ

เอทานอลได้ถูกนำมาใช้สำหรับการแก้ไขปัญหาต่างๆที่เกี่ยวกับพลังงานและสิ่งแวดล้อมหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเพลิงจากฟอสซิล เอทานอลมีข้อดีได้แก่เป็นเชื้อเพลิงหมุนเวียน ให้การเผาไหม้ที่สะอาดและไม่ทำให้เกิดก๊าซเรือนกระจก ไบโอเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงที่ได้จากแหล่งชีวมวลจากวัสดุทางการเกษตรโดยทั่วไปได้จากพืช เช่น ข้าว น้ำตาล ข้าวโพด ต้นพืชต่างๆและเศษไม้ การผลิตเอทานอลจากชีวมวลเป็นทางหนึ่งที่จะลดการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงและมลภาวะ การใช้ไบโอเอทานอลผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์สามารถลดการใช้น้ำมันและการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก ไบโอเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงที่มีออกซิเจนอยู่โดยประกอบด้วยออกซิเจน 35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะลดการปลดปล่อยสาร ประกอบไนโตรเจนออกไซด์ที่เกิดจากการเผาไหม้ เอทานอลมีค่าออกเทนสูง (Rahman และคณะ, 2007) มีค่าการติดไฟกว้าง มีอัตราเร็วการเป็นเปลวไฟสูง และมีค่าความร้อนของความดันไอสูง คุณสมบัติเหล่านี้ทำให้มีอัตราการอัดอากาศสูงและใช้ระยะเวลาการเผาไหม้สั้นซึ่งทำให้มีประสิทธิภาพมากกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงใน ICE ไบโอเอทานอลผสมกับน้ำมันเบนซินได้เป็น E20 (ไบโอเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ และ น้ำมันเบนซิน 80 เปอร์เซ็นต์) แต่ไบโอเอทานอลสามารถมีอัตราส่วนสูงได้เป็น E85 หรือ E95

ขั้นตอนแรกที่สำคัญของการแปรรูปชีวมวลเป็นเอทานอลคือการผลิตน้ำตาล ซึ่งสามารถทำได้โดยเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ น้ำตาลจะถูกหมักเป็นเอทานอลหรือเป็นกรดอินทรีย์ และโดยการแปรรูปทางเคมีได้เป็นแอลกอฮอล์ การย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีข้อดี ได้แก่การได้ผลผลิตที่สูง ลดผลพลอยได้ของสารอื่นๆ ใช้พลังงานน้อยสภาวะการทำปฏิกิริยาไม่รุนแรง (Kadam และคณะ, 1999; Van Wyk, 2001) การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ในการย่อยสลายสำหรับกระบวนการหมักให้ได้เอทานอลสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้โดยการพรีทรีตเมนต์ (pretreatment) เช่นการใช้สารเคมี เช่น กรดหรือ ด่าง หรือทางกายภาพเช่นการบด การฉายรังสี มีความจำเป็นสำหรับการดัดแปรโครงสร้างทำให้สามารถถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ได้ดียิ่งขึ้น (Chang และ Holtzapple, 2000) นอกจากนี้ การที่จะลดต้นทุนในส่วนของเอนไซม์ได้ทางหนึ่งคือการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ในการย่อยสลายวัตถุดิบแล้วได้เป็นน้ำตาลที่สามารถจะทำการผลิตเอทานอลได้ในขั้นตอนเดียว ในการศึกษาวิจัยนี้จึงได้นำจุลินทรีย์ในกลุ่มอะไมโลไลติคมาทำการศึกษาโดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางเกษตรที่มีองค์ประกอบของแป้งสูงได้แก่ กากมันสำปะหลัง เมล็ดข้าว และกล้วยน้ำว้า เพื่อทำการผลิตเอทานอลในขั้นตอนเดียวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลและลดต้นทุนการผลิต

โดยทั่วไปวัตถุดิบทางธรรมชาติถูกใช้ในกระบวนการหมักเนื่องจากมีราคาถูกกว่าซับสเทรทบริสุทธิ์ (Goel, 1994) วัสดุทางเกษตรสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียนได้ วัสดุเหลือใช้ทาง

เกษตรประมาณ 3.5 พันล้านตันที่ผลิตขึ้นในแต่ละปีทั่วโลก (Pandey และคณะ, 2001) การแปรรูปโพลิแซคคาร์ไรด์เป็น เอทานอลสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการรวมกระบวนการย่อยของซับสเทรทและการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นน้ำตาลและได้ผลผลิตเป็นเอทานอลจากวัตถุดิบ การแปรรูปโพลิแซคคาร์ไรด์เป็นเอทานอลสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการรวมกระบวนการย่อยของซับสเทรทและการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นน้ำตาลและได้ผลผลิตเป็นเอทานอลจากวัตถุดิบในขั้นตอนเดียว ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่สามารถนำมาใช้เป็นซับสเทรทที่มีประสิทธิภาพได้แก่ ไฮโดรไลเสทของลิกโนเซลลูโลส/เฮมิเซลลูโลส (Karel และคณะ, 1997) เปลือกเมล็ดฝ้าย แกนข้าวโพด ต้นข้าวโพด (Vickroy,1985) Kotzamanidis และคณะ, 2002) เซลลูโลส (Venkatesh, 1997) ของเสียหัวแครอท (Pandey และคณะ, 2001) corn fiber hydrolysates (Saha และ Nakamura, 2003)

วิธีการที่ได้ถูกรายงานสำหรับการผลิตเอทานอลโดยการหมักได้แก่ (1) การทำให้เป็นน้ำตาลร่วมกับการหมัก (simultaneous saccharification and fermentation) โดยเชื้อจุลินทรีย์ผสมของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายแป้งและจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล (Abouzied และ Reddy, 1987; Verma และคณะ, 2000) (2) การใช้เอนไซม์ย่อยแป้งและจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสำหรับการทำให้เป็นน้ำตาลร่วมกับการหมักโดยเชื้อยีสต์ (Hoshino และคณะ,1989; Hoshino และคณะ,1990) (3) การเติมเอนไซม์ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Yamade และคณะ,1989) การแปรรูปโพลิแซคคาร์ไรด์เป็นเอทานอลสามารถทำได้โดยการรวมกระบวนการย่อยของซับสเทรทและการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นน้ำตาลและได้ผลผลิตเป็นเอทานอลจากวัตถุดิบในขั้นตอนเดียว

ในการศึกษาวิจัยนี้จะได้พัฒนาการใช้เชื้อที่สามารถทำการหมักได้เป็นเอทานอลได้โดยตรงจะทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตเอทานอล วัสดุที่ใช้ในการศึกษาทดลองเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ กากมันสำปะหลัง ข้าว และกล้วยน้ำว้า

เนื่องจากในแต่ละปีประเทศไทยมีผลผลิตทางการเกษตรเช่น ข้าวในปริมาณมากเพื่อการส่งออก บางฤดูกาลมีปริมาณสูงเกินความต้องการของตลาดทำให้ราคาตกต่ำ เป็นผลให้เกษตรกรมีรายได้ลดลง ไม่เพียงพอต่อรายจ่ายในการประกอบการ

ผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยอีกชนิดหนึ่งได้แก่ กล้วยน้ำว้าซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมาก มีผลผลิตทั้งปี มีประโยชน์และใช้มูลค่าได้ทุกส่วน โดยเฉพาะผลกล้วยมีคุณค่าทางอาหารมีแร่ธาตุและวิตามินต่าง ๆ มาก มีการปลูกกล้วยน้ำว้าตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน ตั้งแต่การปลูกเป็นไม้ประดับ จนกระทั่งการปลูกเพื่อการค้า คนไทยนิยมปลูกกล้วยน้ำว้า เนื่องจากปลูกง่ายและดูแลรักษาไม่ยุ่งยาก ผลผลิตสูง จังหวัดภาคเหนือตอนล่าง ซึ่งประกอบด้วยจังหวัดพิษณุโลก สุโขทัย อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์และตาก ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีศักยภาพในการผลิตกล้วยและผลิตภัณฑ์กล้วย เนื่องในเขตพื้นที่นี้มีการปลูกกล้วยเป็นจำนวนมาก ในปี พ.ศ.2547 มีผลผลิตของกล้วยน้ำว้าจำนวน 217,672 ตัน คิดเป็นสัดส่วนผลผลิตกล้วยน้ำว้าต่อภาคเหนือทั้งหมด (กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2549) นอกจากนำมาบริโภคแล้วกล้วยน้ำว้ายัง

สามารถใช้เป็นยาสมุนไพรได้เกือบทุกส่วน แต่ปัญหาที่ตามมาจากอุตสาหกรรมการเกษตรและการแปรรูปกล้วยน้ำว้านั้น จากการสำรวจ พบว่าประเทศไทยมีปริมาณขยะจากเปลือกกล้วยน้ำว้ามากถึง 200 ตันต่อวัน นอกจากนี้ยังมีผลกล้วยน้ำว้าที่ล้นตลาด และราคาผลผลิตที่ตกต่ำ มีผลกระทบต่อรายได้เกษตรกร บางส่วนของผลผลิตมีการเน่าเสีย ซึ่งปัจจุบันขยะจากเปลือกกล้วยและผลกล้วยน้ำว้าที่เน่าเสียมี ปริมาณมหาศาลดังกล่าว และมีการนำกลับมาใช้ประโยชน์เพียงเล็กน้อย โดยแปรรูปเป็นปุ๋ยและอาหารสัตว์ แต่ส่วนใหญ่แล้วมักถูกทิ้งให้เน่าเสีย จึงก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม

ผลผลิตทางการเกษตรดังกล่าวนี้พบว่ามีส่วนประกอบของแป้งปริมาณสูงจึงมีศักยภาพในการที่จะนำมาแปรรูปเป็นเอทานอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มได้ในปริมาณสูงอันจะมีส่วนให้ผลผลิตทางการเกษตรไม่ล้นตลาด และมีแหล่งรองรับผลผลิตจากเกษตรกรเพื่อการแปรรูปเป็นการผลิตผลิตภัณฑ์ต่อไป

ในการวิจัยนี้จึงจะได้ทำการพัฒนาผลิตเอทานอลจากผลผลิตทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ กากมันสำปะหลัง ข้าว และกล้วยน้ำว้า โดยอะไมโลไลติคยีสต์ ซึ่งกระบวนการผลิตนี้สามารถผลิตเอทานอลในขั้นตอนเดียว อันจะส่งผลให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นและลดต้นทุนการผลิตได้ เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยได้แก่อะไมโลไลติคยีสต์ สายพันธุ์ *Saccharomyces diastaticus* (Laluce และ Mattoon, 1984) และ *Saccharomycopsis fibuligera* (Gonzalez และคณะ, 2008) เพื่อการเพิ่มผลผลิตเอทานอลและเพื่อการพัฒนาการผลิตต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเพิ่มผลผลิตเอทานอลจากผลิตผลทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักในขั้นตอนเดียวโดยกระบวนการหมักด้วยเชื้ออะไมโลไลติค ยีสต์
2. เพื่อศึกษาปัจจัยการเพิ่มผลผลิตเอทานอลในกระบวนการหมักโดยเชื้ออะไมโลไลติคยีสต์
3. เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพกระบวนการหมักเอทานอลจากผลิตผลทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักด้วยเชื้ออะไมโลไลติคยีสต์

ขอบเขตของการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อยีสต์
2. การเตรียมวัตถุดิบผลิตผลทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก
3. การศึกษาการพรีทรีตเมนต์ที่เหมาะสมในการย่อยผลิตผลทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักเพื่อการผลิตเอทานอล
4. การศึกษาปริมาณผลิตผลทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักที่เหมาะสมเพื่อการผลิตเอทานอล
5. การเพิ่มการผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ ขนาด 70 ลิตร

ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

คนไทยเราอาศัยอยู่ในประเทศที่เป็นเนื้อนาบุญ ตามคำกล่าวของบรรพบุรุษเราอย่างแท้จริง ประการสำคัญที่สุดนั้นเรามีพระมหากษัตริย์ที่ทรงมีพระปรีชาญาณ ทรงชี้นำหนทางในการพัฒนาหลายด้านด้านการแก้ไขปัญหาพลังงานและราคาพืชผลทางการเกษตรก็เช่นกัน พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวได้ทรงมีพระราช ดำริให้โครงการส่วนพระองค์ทำการวิจัย ทำการทดลองทั้ง ผลิตและใช้งาน รวมทั้งตรวจสอบด้วยกรรมวิธีทางวิทยาศาสตร์จนสามารถยืนยันผลได้แล้ว แนวพระราชดำรินี้จึงเป็นหนทางที่พสกนิกรทั้งในภาครัฐและเอกชน สมควรจะน้อมนำมาเป็นแนว ทางในการพัฒนาประเทศ

แนวความคิดเรื่องนี้พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวได้ทรงทำการทดลองทั้งการผลิตและใช้งานในโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา และได้มีการทดลองโดยสถาบันวิจัยของการปิโตรเลียมแห่งประเทศไทยจนได้ผลดีมาแล้ว ในการนี้รัฐบาลได้น้อมนำเอาพระราชดำริในเรื่อง นี้มาเป็นนโยบายเร่งด่วนที่จะแก้ไขปัญหาอันเป็นการรับสนองพระราชกระแสว่าด้วยเศรษฐกิจพอเพียงอีกโสตหนึ่งด้วย เนื่องด้วยประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมและเป็นแหล่งทรัพยากรทางเกษตรจำนวนมาก พืชผลทางเกษตรกรรมเป็นสินค้าส่งออกที่นำรายได้มาสู่ประเทศเป็นส่วนสำคัญทำให้ประเทศมีความเจริญและประชากรมีรายได้จากพืชผลทางเกษตรกรรม ตามแนวทางเศรษฐกิจพอเพียง นอกจากนี้ผลพลอยได้จากการแปรรูปพืชผลทางเกษตรสามารถนำมาใช้ในกระบวนการหมักเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มได้ในที่นี้ได้แก่เอทานอลซึ่งเป็นเชื้อเพลิงหมุนเวียนที่มีประโยชน์ที่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตรที่ทำให้ประเทศสามารถพึ่งพาตนเองได้จากการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงหมุนเวียนเพื่อลดการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิง การใช้ผลผลิตทางการเกษตรจะเป็นเพิ่มมูลค่าเพิ่มแก่ผลิตผลทางการเกษตร และทั้งเป็นการรองรับผลิตผลทางการเกษตรจากเกษตรกรเพื่อไม่ให้มีปริมาณผลผลิตล้นตลาด อีกทั้งการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้วัสดุทางการเกษตรในการผลิตเอทานอลได้โดยตรงจะลดระยะเวลาการหมักและเพิ่มผลผลิตเอทานอลในขั้นตอนเดียวจะเป็นการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลได้ในขณะเดียวกัน

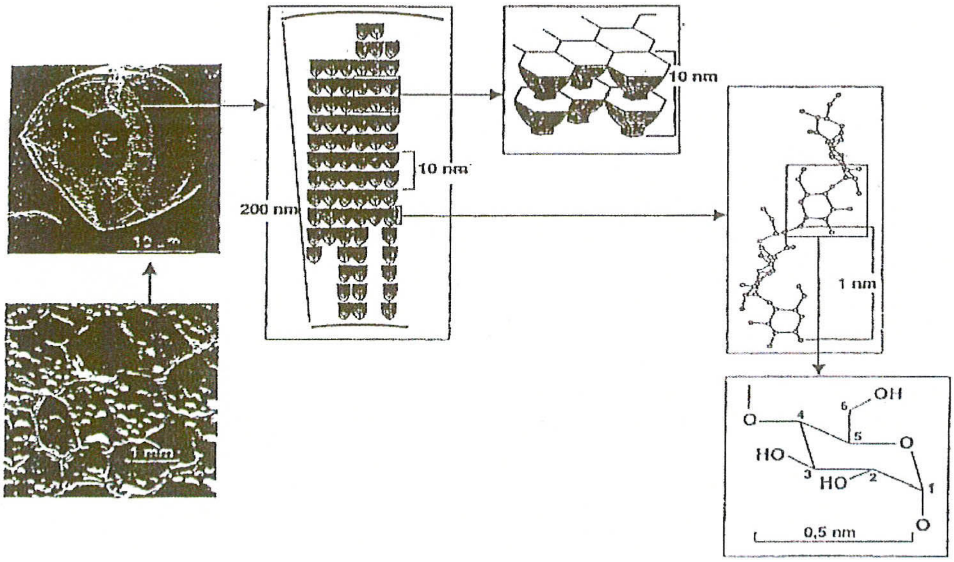
วัตถุประสงค์ของโครงการนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การพัฒนาการเพิ่มผลผลิตเอทานอลจากผลิตผลทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักในขั้นตอนเดียวโดยเชื้ออะไมโลไลติคยีสต์ โดยใช้วัตถุดิบที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตพืชผลทางการเกษตรของประชากรส่วนใหญ่ของประเทศเพื่อลดต้นทุนการผลิตเอทานอลในขณะเดียวกันก็ลดการนำเข้าน้ำมันดิบและเป็นการสร้างเสริมทั้งความมั่นคงทางเศรษฐกิจและความมั่นคงทางพลังงานของชาติ ในที่สุดแล้วคุณภาพชีวิตของเกษตรกรและประชาชนก็จะดีขึ้นจากรายได้ที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ประชาชนที่อาศัยในเมืองก็จะมีสภาพแวดล้อมทางอากาศที่ดีขึ้นด้วยเช่นกัน

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

วัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตร และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งประกอบด้วยแป้ง และลิกโนเซลลูโลส อันเป็นสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรต ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเพื่อให้เกิดเป็นเอทานอลได้

องค์ประกอบภายในแป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6:10:5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วย anhydroglucose unit เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glucosidic linkage ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายพอลิเมอร์ มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่า reducing end group แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (อะมิโลส) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (อะมิโลเพคทิน) วางตัวในแนวรัศมี แสดงระดับโครงสร้างของเม็ดแป้ง ดังภาพที่ 1 คุณสมบัติที่สำคัญของของอะมิโลสและอะมิโลเพคทินแสดงดังตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ระดับโครงสร้างภายในเม็ดแป้ง (Sander, 1996) ได้แก่

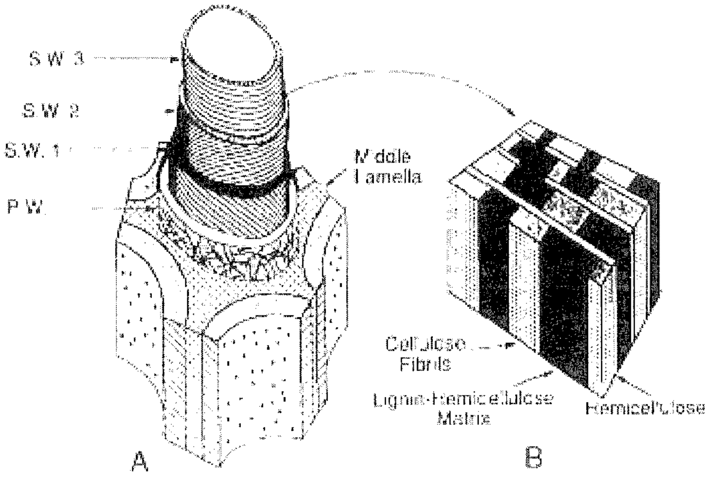
1. อะมิโลส (amylose)
2. อะมิโลเพคทิน (amylopectin)
3. สารตัวกลาง (intermediate material)

ตารางที่ 1 สมบัติที่สำคัญของอะมิโลสและอะมิโลเพคทิน (Beyum และ Roels, 1985)

คุณสมบัติ	อะมิโลส	อะมิโลเพคทิน
ลักษณะโครงสร้าง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นเส้นตรง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันเป็นกิ่งก้าน
พันธะที่จับ	α-1,4	α-1,4 และ α-1,6
ขนาด	200-2,000 หน่วยกลูโคส	มากกว่า 1,000 หน่วยกลูโคส
การละลาย	ละลายน้ำได้น้อยกว่า	ละลายน้ำได้ดี
การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน	สีน้ำเงิน	สีแดงม่วง
การจับตัว	เมื่อให้ความร้อนแล้วทิ้งไว้จะจับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง	ไม่จับตัวเป็นแผ่นแข็ง

โครงสร้างของผนังพืช

ส่วนประกอบที่เป็นโครงสร้างของผนังพืช ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน เป็นหลัก แสดงโครงสร้างของผนังพืช ดังภาพที่ 2

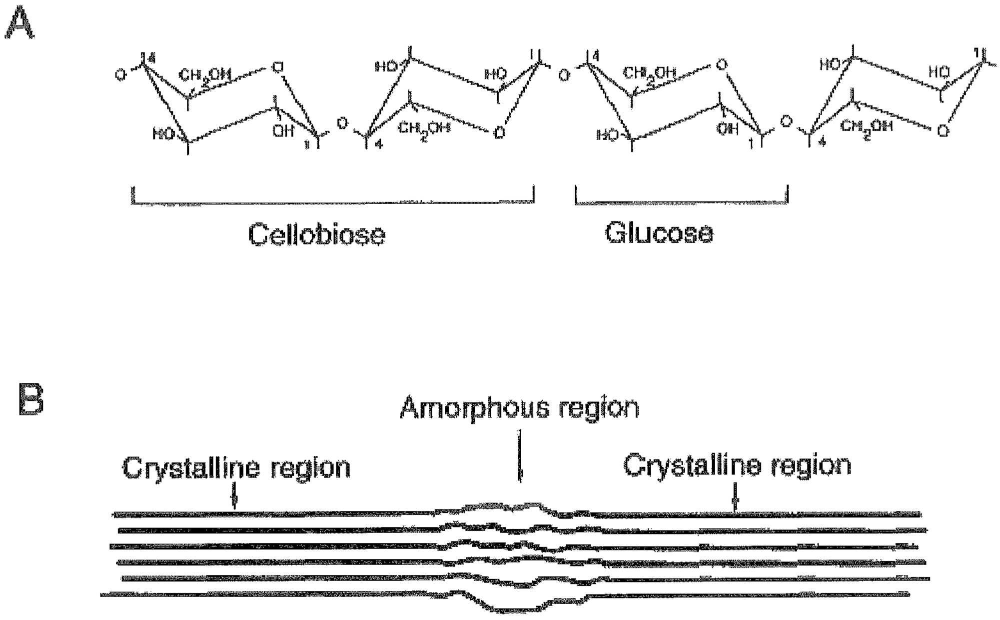


ภาพที่ 2 โครงสร้างของผนังเซลล์พืช A) แสดงโครงสร้างของส่วนประกอบต่างๆในไม้ B) แสดงความสัมพันธ์ของ ลิกนิน เซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลส (Beguin และคณะ, 1992)

เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลส เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ ที่มีประมาณ 40-50เปอร์เซ็นต์ ในผนังเซลล์พืช ลักษณะเป็นโพลีเมอร์สายตรง ไม่มีกิ่งก้านสาขา และเป็นโฮโมโพลีเมอร์ (homopolymer) ของ β-D-glucose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-glucosidic linkage โดยมีค่า degree of polymerization อยู่ในช่วงประมาณ 100 ถึงมากกว่า 10,000 เกาะรวมกันภายใน crystalline microfibrils เซลลูโลสมี

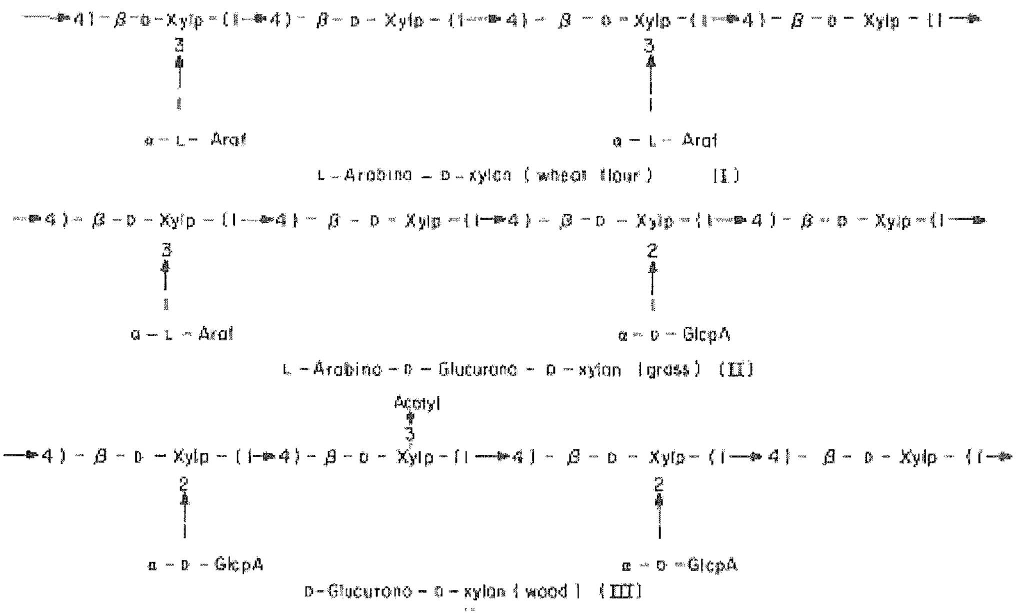
น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20,000 ถึง 750,000 ดาลตัน ซึ่งเท่ากับ 100 – 4,000 หน่วยกลูโคส โมเลกุลของเซลลูโลสเรียงตัวกันเป็นมัดเรียกว่า fibril โดยมีพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลกลูโคสที่อยู่ใกล้กันของเซลลูโลสสายหนึ่ง กับเซลลูโลสอีกสายหนึ่งเชื่อมต่อกันเป็น fibril ดังภาพที่ 3 นอกจากนั้นเซลลูโลสที่พบในทั้งไม้เนื้ออ่อน และไม้เนื้อแข็งมีความทนต่อกรดได้มากกว่าเฮมิเซลลูโลส



ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส A) แสดงพันธะ β-glucosidic bond และ B) แสดงโครงสร้างของ fibril ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็น crystalline และ amorphous (Beguin และคณะ, 1992)

เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลส เป็นสารประกอบพวก amorphous polymeric carbohydrate พบมากในไม้เนื้อแข็ง เปลือกพวกพืชตระกูลหญ้า ละลายในสารละลายที่เป็นด่างเจือจาง ปกติจะอยู่ร่วมกับเซลลูโลส และลิกนินในผนังของเซลล์พืชโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็น heteroglycan ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดมาต่อกัน เช่น β-D-xylopyronose, α-L-arabofuranose, β-D-glucopyranose, α-D-galactopyranose, β-D-mannopyranose, α-L-rhamnopyronose และ α-L-fucopyronose ซึ่งน้ำตาลทั้งหมดมีลักษณะเป็น pyranose form ยกเว้น arabofuranose ที่มีลักษณะเป็น furanose form acid ตัวอย่างของโครงสร้างเฮมิเซลลูโลสแสดงไว้ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 สมมุติฐานโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (Saski และคณะ, 1979; Reilly, 1980)

A = L-arabinofuranosyl residue, GlcA = glucuronic acid residue,

Xi = D-xylopyranosyl residue

Subscript i, j, k,...... = ลำดับของ D-xylopyranosyl residue ที่เชื่อมอยู่กับโมเลกุลอื่นด้วยพันธะแบบ β-1, 4 bond

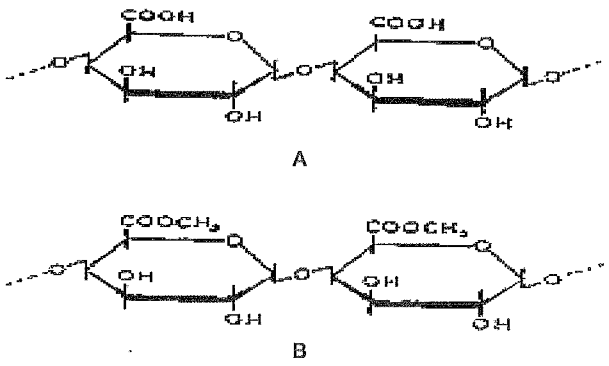
● = reducing end

เฮมิเซลลูโลสในพืชทั่วๆไปมีโครงสร้างหลัก (back bone) เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาล ไซโลส ที่เชื่อมต่อกันด้วย 1,4-β-linkage โดยมี branch chain เป็นน้ำตาล pentose, hexose หรือ uronic acid

เพคทิน (Pectin substance)

เพคทินเป็นสารประเภทพวก heteropolysaccharide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000-300,000 ดาลตัน ส่วนใหญ่อยู่ในชั้น middle lamella ซึ่งเป็นส่วนที่เชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์ที่อยู่ติดกัน แม้ว่าปริมาณเพคทิน ในผนังเซลล์พืชจะมีไม่มาก (1-2 เปอร์เซ็นต์) แต่ก็มีผลอย่างมากต่อความแข็งและความเหนียวของเนื้อเยื่อ

โครงสร้างหลักของเพคทิน โดยทั่วไปเป็นโพลีเมอร์ของ galacturonan acid ที่มีขนาดประมาณ 150 – 1500 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วย α-1,4 glycosidic linkage มีอยู่ 2 ฟอร์ม คือ ฟอร์มที่อยู่ในรูปของ free carboxyl group (pectin acid) และฟอร์มที่อยู่ในภาพที่ถูก esterify โดย methoxy group (pectin) ดังแสดงในภาพที่ 5

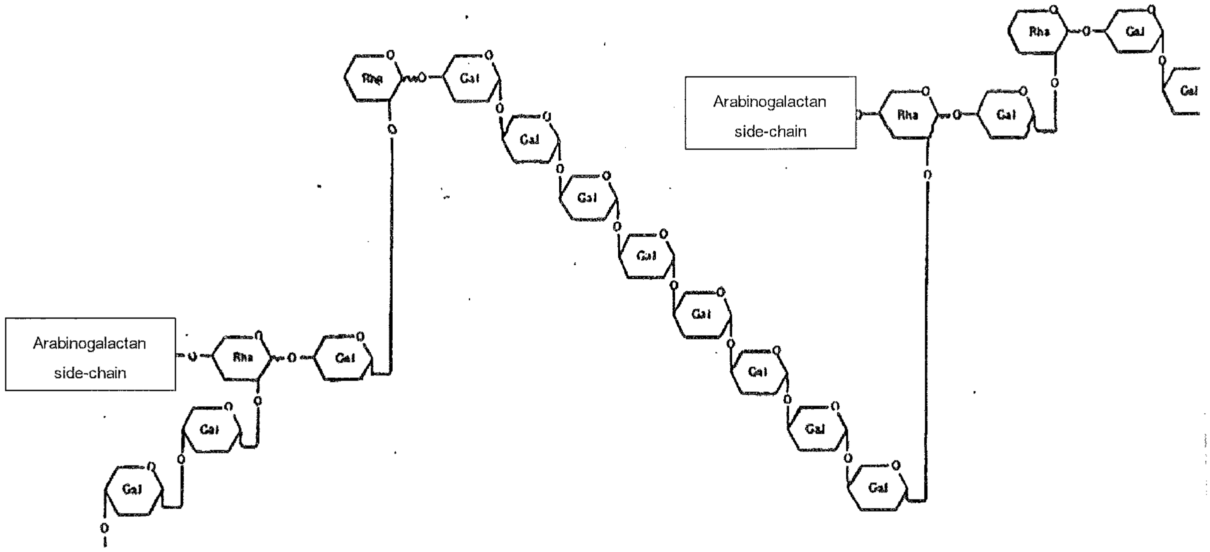


ภาพที่ 5 โครงสร้างของ pectin substance (Merchessult และ Sandararajan, 1983)

(A) carboxylic form (pectic acid หรือ polygalacturonic acid)

(B) methyl-esterified form (pectin)

นอกจากนี้ galacturonan chain ยังอาจมี side chain เป็น อะราบิโนส กาแลคโตส หรือ ไซโลส โดยเชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักด้วยพันธะโควาเลนท์ ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 โครงสร้างของ pectin substances ที่พบใน primary cell wall ของพืชใบเลี้ยงคู่ทั่วๆไป Rha = rhamnosyl residue; Gal = galacturonic acid (Merchessult และ Sandararajan, 1983)

ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินเป็นสารประกอบ aromatic structure ซึ่งหมู่ -OH group สามารถสร้างพันธะกับหมู่ aldehyde ได้เป็น hemiacetal และ หมู่ ketone ได้เป็น ketals ลิกนินมีความต้านทานต่อจุลินทรีย์ และ anaerobic process ซึ่งจุลินทรีย์ไม่สามารถที่จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับ aromatic ring ของลิกนินได้ หรือ

ถ้าเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ ก็จะช้ามากเป็นเวลาหลายวัน ลิกนินพบในธรรมชาติ โดยเป็นตัวยึดเกาะระหว่างเซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลส

ในการศึกษาวิจัยนี้ใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่ใช้อยู่ในจำพวก hydrolytic enzyme ที่มีความจำเพาะต่อโพลิแซคคาไรด์ต่างชนิด กัน ดังนี้

การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะการทำงานในการย่อยแป้ง การทำงานของเอนไซม์แต่ละกลุ่มแสดงดังภาพที่ 7

เอนไซม์ย่อยภายนอก (exo-enzyme)

กลูโคซิเดส (glucoamylase) หรือ เรียกว่าอะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในเชื้อราบางชนิด เช่น *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae* และ *Rhizopus spp.* เอนไซม์นี้จัดเป็นแอลฟาอะไมเลส (α-amylase) ชนิดหนึ่งที่ย่อยจากด้านปลาย โมเลกุล (exo-hydrolase) ทั้งพันธะแอลฟา (1,4) และแอลฟา (1,6) โดยจะตัดพันธะแอลฟา (1,4) ได้เร็วกว่าแอลฟา (1,6) เอนไซม์นี้ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (cofactor)มีเอนไซม์เบต้าอะไมเลส(β-amylase) ย่อยจากด้านปลายโมเลกุล (exo-hydrolase) ครั้งละ 2 โมเลกุลกลูโคส ทำให้ได้น้ำตาลมอลโตสเป็นผลผลิต ส่งผลต่อพันธะแอลฟา (1,4) และเมื่อย่อยมาถึงพันธะแอลฟา (1,6) กิจกรรมของเอนไซม์จะหยุดลงเอนไซม์นี้ต้องการแคลเซียมไอออน (Ca^{++}) เป็นโคแฟกเตอร์

ฟอสฟอรีเลส (phosphorylase) เป็นทั้งเอนไซม์สังเคราะห์ และ ย่อยสลาย พบในพืช และ สัตว์ ในสภาวะที่มี inorganic phosphate ใช้เอนไซม์นี้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาผันกลับของปฏิกิริยาดังนี้

$$\text{starch} + \text{phosphate (Pi)} \longrightarrow \text{glucose} - 1 - \text{phosphate}$$

เอนไซม์ชนิดนี้ตัดหน่วยกลูโคสออกจากสาย โดยเริ่มตัดจากด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซิง (non-reducing end) ไม่สามารถย่อยพันธะกิ่งได้เอนไซม์ย่อยภายใน (endo-enzyme)

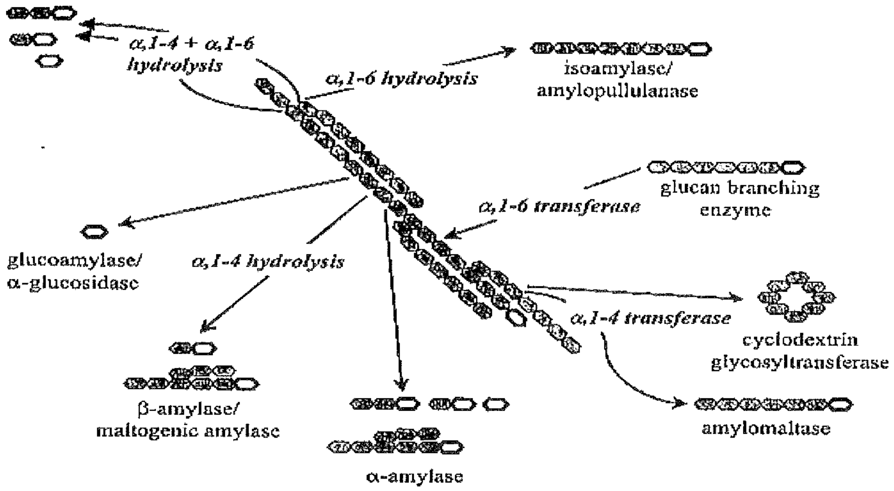
แอลฟาอะไมเลส

เป็นเอนไซม์ที่ย่อยจากภายในโมเลกุล (endo-hydrolase) ที่พันธะแอลฟา (1,4) แต่ไม่สามารถย่อยพันธะแอลฟา (1,6) ผลผลิตที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้เป็นสารผสมของโอลิโกแซกคาไรด์ (oligosaccharide) เอนไซม์นี้ต้องการแคลเซียมไอออน (Ca^{++}) เป็นโคแฟกเตอร์ พบเอนไซม์ชนิดนี้ใน *Aspergillus oryzae, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* เป็นต้น

เอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง (Debranching enzyme)

พูลลูลาเนส (pullulanase) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะ แอลฟา (1,6) บริเวณกิ่ง เป็นเอนไซม์ที่ย่อยจากปลายโมเลกุล สามารถย่อยจนได้สายกลูโคสที่มีความยาว 2-3 หน่วย ไม่สามารถย่อยจนได้กลูโคส 1 หน่วย

ไอโซอะไมเลส (isoamylase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยจุดที่เป็นกิ่งของอะไมโลส และอะไมโลเพคทินได้ดี ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ในการทำกิจกรรม



ภาพที่ 7 การทำงานของเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายแป้ง สัญลักษณ์วงแหวนเปิด แสดงถึง reducing end ของ polyglucose molecule (Van der Maarel และคณะ, 2002)

การย่อยโครงสร้างของผนังพืชด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ย่อยโครงสร้างของผนังพืชที่สำคัญมี 3 ชนิด คือ เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส และเพคติเนสตามซับสเทรทที่เอนไซม์แต่ละชนิดเข้าไปย่อย

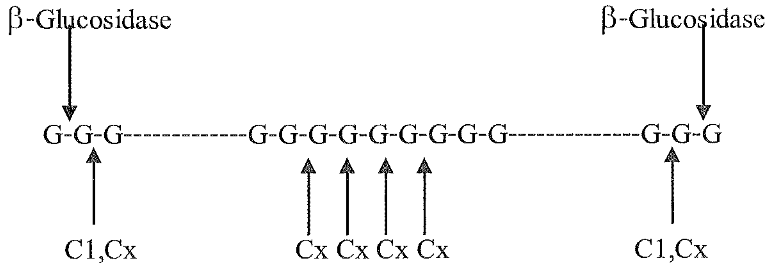
เซลลูเลส (Cellulase)

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์เชิงซ้อน (complex enzyme) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกันคือ Cx (endoglucanase ; 1,4-β-D-glucan 4- glucanohydrolase (EC 3.2.1.4) C1 (exoglucanase ; 1,4-β-D-glucan cellobiohydrolases; EC 3.2.1.91) และ β-glucosidase หรือ cellobiases (EC 3.2.1.21) ดังภาพที่ 8

1. endoglucanase จะย่อยสลาย เซลลูโลสไปเป็น กลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคาไรด์ โดยจะย่อยสลายด้านในของสาย เซลลูโลส แบบสุ่ม
2. exoglucanase จะย่อยสลายเซลลูโลส และโอลิโกแซคคาไรด์ ไปเป็น เซลโลไบโอส โดยจะย่อยสลายจากด้านปลายของสายเซลลูโลส
3. β-glucosidase จะย่อยสลาย เซลโลไบโอส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ไปเป็นกลูโคส

เฮมิเซลลูเลส (Hemicellulase)

เฮมิเซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมีโครงสร้างเป็นกิ่งก้านสาขา และประกอบด้วยน้ำตาลหลายๆชนิด เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสมีหลายชนิด เช่น L-arabinanases, D-galactanases, D-mannanases และ D-xylanase ปริมาณของเอนไซม์เหล่านี้ขึ้นอยู่ซับสเทรทที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ชนิดของจุลินทรีย์ และ สภาวะที่เลี้ยงเชื้อ (Reilly, 1980)



ภาพที่ 8 โครงสร้างของเซลลูโลส และตำแหน่งที่เอนไซม์ต่างๆ จะเข้าไปย่อยสลาย

G = glucose molecule (Endogglucanase ; Cx, Exoglucanase ; C1) (Sun และ Cheng, 2002)

D-galactanases

D-galactanases เป็น hydrolytic enzyme ที่ผลิตจากแบคทีเรีย รา และพืช สามารถย่อยสลายได้ทั้ง D-galactan และ L-arabino-D-galactan D-galactanases มี 2 ชนิดคือ (1⟶3)–β-D-galactanases ที่จำเพาะต่อ (1⟶3)-β-D-galactopyranosyl linkages และ (1⟶4)–β-D-galactanases ที่จำเพาะต่อ (1⟶4)-β-D-galactopyranosyl linkages

D-mannanases

D-mannanases ((1⟶4)–β-D-mannan mannanohydrolases, endo-D-mannanase, EC 3.2.1.78) เป็นเอนไซม์ซึ่งสามารถย่อยสลาย (1⟶4)–β-D-mannanopyranosyl linked ของ D-mannans, D-gluco-D-mannan และ D-galacto-D-mannans เอนไซม์ชนิดนี้ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย, Rumen bacteria, Rumen protozoa, Mycorrhiza fungi, พืช และ สัตว์

D-xylanase

โดยทั่วไปเฮมิเซลลูโลสจะมีโครงสร้างหลักเป็นไซแลน โดยเฉพาะในไม้เนื้อแข็งและพืชตระกูลหญ้า ดังนั้นไซโลสจึงเป็นน้ำตาลที่มีมากที่สุดในกลุ่มเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมีผลทำให้ D-xylanase เป็นเอนไซม์ที่มีปริมาณมากที่สุดในกลุ่มของเฮมิเซลลูเลสด้วย และในบางครั้งถือว่า D-xylanase หมายถึง เฮมิเซลลูเลส D-xylanase แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามซับสเทรทที่เข้าไปย่อยสลายคือ (1⟶3)-β-D-xylanases และ (1⟶4)-β-D-xylanases

เพคติคเอนไซม์ (Pectic enzymes)

เอนไซม์เพคติเนส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเพคทิน เป็นเอนไซม์ที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ มีทั้งที่เป็น inducible enzyme และเป็น constitutive enzyme ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต เอนไซม์ที่ย่อยสลายสารประกอยเพคทิน คือ เพคติเนส ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ

243166

1. พอลิกาแลคทูโลเนส (Polygalacturonase)

มีชื่อตามระบบว่า Poly- α-1, 4 galacturonide glycanohydrolase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยพันธะไกลโคซิดิกในสารประกอบเพคทินได้ผลผลิตจากปฏิกิริยา คือ สารประกอบเพคทินสายสั้น ทำให้เกิดหมู่รีดิวซ์เพิ่มขึ้น ลักษณะของปฏิกิริยาดังภาพที่ 9(a) สามารถแบ่งพอลิกาแลคทูโลเนส ตามลักษณะการย่อยสลาย คือ

1.1 กลุ่มย่อยสลายแบบสุ่ม (endo spliting polygalacturonases) แบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ

ก. Endo–polymethylgalacturonasesจำเพาะต่อซับสเตรททีมีหมู่เมทิลเอสเทอร์โดยในการย่อยซับสเตรท ที่เป็นเพคทินได้ดีกว่ากรดเพคติก และมีลักษณะการย่อยแบบไม่เป็นระเบียบในสายพอลิเมอร์

ข. Endo-polygalacturonases จำเพาะต่อซับสเตรทที่ไม่มีเมทิลเอสเทอร์ โดยจะทำการย่อยสลายซับสเตรทที่เป็นกรดเพคติกได้ดีกว่าเพคทิน และมีลักษณะการย่อยแบบไม่เป็นระเบียบในสายพอลิเมอร์

1.2 กลุ่มย่อยสลายแบบเป็นระเบียบ (exo spliting polygalacturonases) แบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ

ก. Exo–polymethylgalacturonases จำเพาะต่อซับสเตรทที่มีหมู่แมทิลเอสเทอร์ โดยย่อยสลายซับสเตรทที่เป็นเพคทินได้ดีกว่ากรดเพคติก และมีลักษณะการย่อยแบบเป็นระเบียบจากปลายสายพอลิเมอร์

ข. Exo–polygalacturonasesจำเพาะต่อซับสเตรทที่ไม่มีเมทิลเอสเทอร์โดยย่อยสลายซับสเตรทที่เป็นกรดเพคติกได้ดีกว่าเพคทิน และมีลักษณะการย่อยแบบเป็นระเบียบโดยย่อยจากปลายสารพอลิเมอร์

2. เพคทินเอสเทอร์เรส (Pectinesterase)

มีชื่อตามระบบว่า Pectin pectylhydrolase เร่งปฏิกิริยาการแยกหมู่เมทิลจากสารประกอบเพคทินที่ทีการเติมหมู่เมทิลที่หมู่คาร์บอกซิล โดยไม่ย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก ได้ผลผลิตจากปฏิกิริยา คือ กรดเพคติก กรดเพคตินิค และ เมทานอล ลักษณะของปฏิกิริยาดังภาพที่ 9(b)

3. เพคทินไลเอส (Pectin lyases)

มีชื่อตามระบบว่า poly-α-1, 4–D–galacturonide lyase เป็นเพคติเนสที่อยู่ในกลุ่มไลเอส โดยย่อยสลายพันธะไกลโคไลซิสในเพคทิน หรือกรดเพคติก แล้วได้สารพอลิเมอร์สายสั้นที่สายหนึ่งมีปลายรีดิวซ์ และ อีกสายพอลิเมอร์มีพันธะคู่ โดยเพคเทตไลเอสจะต้องการ Ca^{++} เป็นตัวกระตุ้นลักษณะของปฏิกิริยาดังภาพที่ 9(c) สามารถแบ่งกลุ่มของเพคเทตไลเอสได้เช่นเดียวกับพอลิกาแลคทูโรเนส คือ

3.1 กลุ่มย่อยสลายแบบสุ่ม (Endo spliting pectate lyases)

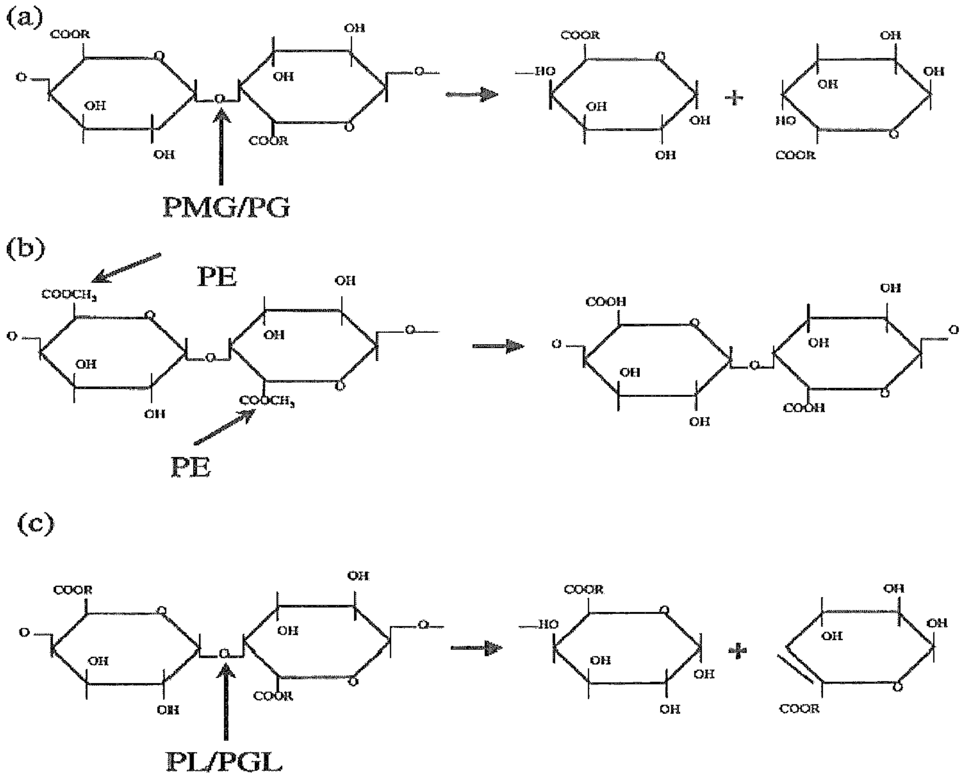
ก. จำเพาะต่อสับสเตรตที่มีเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งซับสเตรทเป็นเพคทิน และลักษณะการย่อยแบบไม่เป็นระเบียบ

ข. จำเพาะต่อซับสเทรทที่ไม่มีเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งซับสเทรทเป็นกรดเพคทิน และลักษณะการย่อยแบบเป็นระเบียบจากปลายที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์

3.2 กลุ่มย่อยสลายแบบมีระเบียบ (Exo spliting pectate lyases)

ก. จำเพาะต่อซับสเทรทที่มีเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งซับสเทรทเป็นเพคทิน และลักษณะการย่อยแบบเป็นระเบียบจากปลายที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์

ข. จำเพาะต่อซับสเทรทที่ไม่มีเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งซับสเทรทเป็นกรดเพคติก และลักษณะการย่อยแบบเป็นระเบียบจากปลายที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์



ภาพที่ 9 การย่อยสลายโมเลกุลของเพคทิน ของกลุ่มเอนไซม์เพคติเนส (a) PG; R=H, PMG; R=CH_3 (b) PE (c) PGL; R=H, PL; R=CH_3 ลูกศรคือบริเวณที่กลุ่มเอนไซม์เพคติเนส เข้าทำปฏิกิริยากับ เพคทิน PMG : Polymethylgalacturonase, PG : Polygalacturonase, PE : Pectinesterase, PL : Pectinlyase (Gummadi และ Panda 2003)

การพรีทรีตเมนต์วัตถุดิบ

กระบวนการพรีทรีตเมนต์วัตถุดิบก่อนที่จะได้เซลลูโลสแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ๆคือ การพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีเชิงกล วิธีทางเคมี และทางชีวภาพ

- กระบวนการพรีทรีตเมนต์เชิงกล เป็นการใช้แรงกลหรือกระบวนการทางกายภาพเพื่อทำความสะอาดปรับขนาดและทำลายโครงสร้างเซลล์ของวัตถุดิบเพื่อให้ปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวเคมีในขั้นต่อไปเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง การตัดหรือบดให้ขนาดชิ้นวัตถุดิบมีขนาดเล็กลง จะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว ทำให้ตัวเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ หรือไอน้ำจับกับวัตถุดิบได้ง่ายขึ้นการพรีทรีตเมนต์วัตถุดิบ

- การพรีทรีตเมนต์ทางเคมี กระบวนการทางเคมีที่นิยมใช้แบ่งออกเป็น 3 ชนิดคือการใช้กรดอ่อน กรดแก่ และเบส กระบวนการใช้กรดอ่อนจะใช้กรดเกลือหรือกรดไนตริกเจือจางกระบวนการที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือการใช้กรดกำมะถันเจือจาง (0.5-1.5%, 160°C) เนื่องจากในสภาวะนี้จะได้ yield ของเฮมิเซลลูโลสสูงถึง 75-90% ข้อเสียของกระบวนการนี้คือการใช้อุณหภูมิที่สูงจะทำให้เกิดสารข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์และเป็นพิษต่อกระบวนการหมักในขั้นตอนต่อไป ถึงแม้ว่าการใช้กรดอ่อนจะมีต้นทุนต่ำ แต่การกำจัดสารพิษที่เกิดขึ้นมีราคาสูง ดังนั้น จึงมีคิดกระบวนการใหม่โดยเพิ่มความเข้มข้นของกรดที่ใช้และทำในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า ทำให้สามารถลดการเกิดสารพิษลงได้

- การย่อยด้วยด่าง การพรีทรีตเมนต์สามารถทำได้ด้วยด่างเช่นกัน เชื่อกันว่าด่างจะทำให้เกิดปฏิกิริยาสบู่ (saponification) ของพันธะเอสเตอร์ระหว่างโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสกับสารอื่น เช่น ลิกนิน มีรายงานว่ารูพรุนของวัสดุ lignocelluloseเพิ่มขึ้น การพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางทำให้วัสดุเกิดการพองตัวส่งผลให้พื้นที่ผิวภายในเพิ่มขึ้น degree of polymerization และความเป็นผลึกลดลง เกิดการแยกตัวของโครงสร้างลิกนินและเฮมิเซลลูโลส การใช้ NaOH เจือจางนี้สามารถลดเปอร์เซ็นต์ของลิกนินลงได้ในไม้เนื้อแข็งและส่งผลดีต่อสารจำพวกฟางที่มีปริมาณลิกนินต่ำ แต่ไม่เหมาะกับวัสดุที่มีลิกนินสูง แอมโมเนียก็สามารถใช้ในการกำจัดลิกนินได้ ประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนินด้วยแอมโมเนียอยู่ที่ 60-80%สำหรับซังข้าวโพด (corn cobs) และ 65-85% สำหรับ switchgrass แม้ว่าการใช้ด่างจะทำให้การย่อยเซลลูโลสในขั้นต่อไปมีประสิทธิภาพสูงขึ้น แต่วิธีนี้นอกจากจะต้องใช้เกลือที่มีราคาแพงแล้วยังสร้างของเสียที่เป็นเบสซึ่งยากต่อการกำจัด ทำให้เป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมได้

-การย่อยด้วยโอโซนโอโซนจะทำปฏิกิริยากับลิกนินและเฮมิเซลลูโลสโดยไม่ทำให้เซลลูโลสเปลี่ยนแปลง การทดสอบวิธีนี้กับวัสดุหลายชนิดเช่น ฟางข้าวสาลี ชานอ้อย เปลือกถั่วลิสง ขี้เลื่อย poplar แสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนิน
โดยที่ไม่สร้างสารยับยั้งและสามารถทำได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ แต่เนื่องจากจำเป็นต้องใช้โอโซนในปริมาณมาก ทำให้เป็นวิธีที่มีต้นทุนสูง

- การพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีทางกายภาพ-เคมี วิธีทางกายภาพอีกวิธีหนึ่งคือการใช้น้ำร้อนความดันสูงกว่าจุดอิ่มตัวในการย่อยเฮมิเซลลูโลส ในระดับห้องปฏิบัติการวิธีนี้สามารถให้ผลผลิตของ xylose ที่สูงมากถึง 88-98% มีรายงานว่าการอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปทำให้น้ำร้อนกลายเป็นกรด

คาร์บอเนตและใช้ร่วมกับไอน้ำ จะช่วยเพิ่มผลผลิตได้ ทั้งยังไม่สร้างสารยับยั้งหรือก่อให้เกิดสารมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

- เห็ดราหลายชนิดสามารถย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลสได้ โดยทั่วไปราสีน้ำตาลจะย่อยเซลลูโลส ส่วนราสีขาวและ soft rot จะย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลสราขาวจะเป็นตัวเลือกที่ดีที่สุดโดยสามารถให้ reducing sugar ได้ถึง 35% ในเวลาห้าสัปดาห์ เพื่อป้องกันไม่ให้ราใช้เซลลูโลส จึงมีการพัฒนาราสายพันธุ์ที่ไม่มีเซลลูเลสขึ้น แม้ว่าวิธีทางชีวภาพนี้จะสามารถทำได้ในสภาวะปกติและมีค่าใช้จ่ายต่ำ แต่ว่าการย่อยลิกนินทางชีวภาพต้องอาศัยเวลาที่ยาวนานมาก จึงไม่ค่อยเหมาะสมในการนำมาใช้จริง

การผลิตเอทานอลด้วยน้ำตาลเฮกโซสโดยเชื้อยีสต์

ในสภาวะที่มีอากาศเชื้อยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสในการหายใจ (respiration) เพื่อเป็นการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานในรูป ATP ดังแสดงในสมการ

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6H_2O + 6CO_2 + 38ATP$$

การผลิตเอทานอลเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยอาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลในสภาวะที่ไร้อากาศ ซึ่งเชื้อยีสต์ทำการหมักเอทานอลโดยผ่านวิถี Glycolysis หรือ Embden-Meyerhof-Parnas ซึ่งในการหมักน้ำตาลโดยเชื้อยีสต์จะได้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เอทานอลตามทฤษฎี (yield) เป็น 0.51 กรัม/กรัมน้ำตาลที่ใช้ นอกจากเอทานอลแล้วยังได้คาร์บอนไดออกไซด์และพลังงานในรูป ATP จากวิถีดังกล่าวเล็กน้อย ดังแสดงในสมการ

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

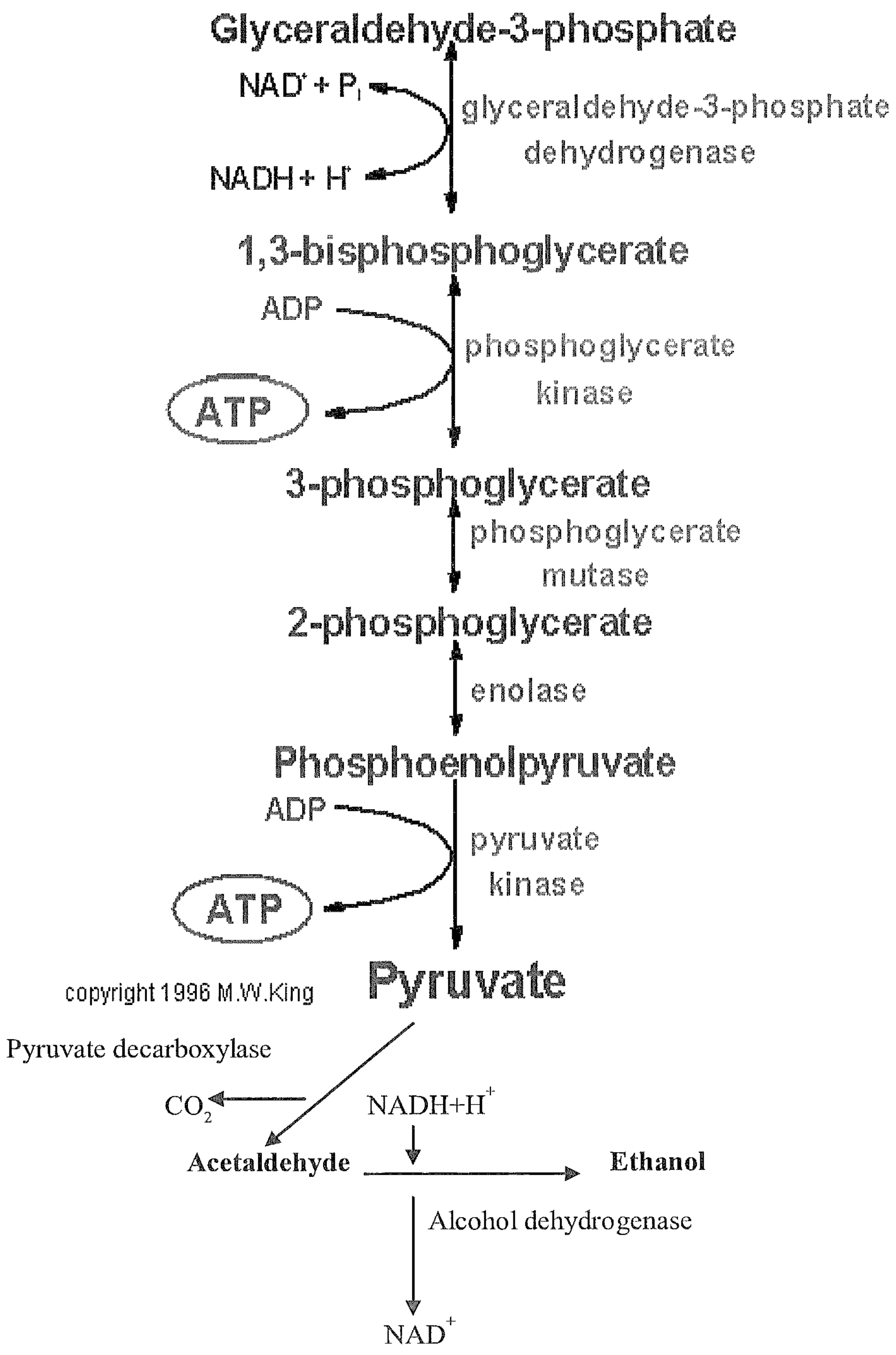
ในขั้นตอนของวิถี Glycolysis เพื่อให้ได้เป็นเอทานอลแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 10) คือ

1. การสลายกลูโคสให้เป็น 2 ไทรโอฟอสเฟท (triose phosphate)
2. การเปลี่ยนไทรโอสฟอสเฟทให้เป็นไพรูเวท (pyruvate)
3. เป็นการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็น 2 คาร์บอน เช่น เอทานอล หรือ 3 คาร์บอน

ตอนที่หนึ่งประกอบด้วย 4 ปฏิกิริยา ปฏิกิริยาของ hexokinase หรือ glucokinase ใช้ ATP เพื่อเปลี่ยนกลูโคสให้เป็น glucose-6-phosphate (G6P) ซึ่งเปลี่ยนเป็น fructose-6-phosphate (F6P) ด้วย phosphohexoisomerase จากนั้น phosphofructokinase จะเปลี่ยน F6P ให้เป็น fructose1,6-diphosphate (FDP) ซึ่งแตกตัวเป็นสารที่มีสามคาร์บอน 2 ชนิด คือ glyceraldehydes-3-phosphate (G3P) และ dihydroxyacetonephosphate (DHAP) โดยอาศัยการเร่งของเอนไซม์ aldolase จากนั้น DHAP จะเปลี่ยนเป็น glycerol phosphate และได้ glycerol ในที่สุด

ตอนที่สองมี 6 ปฏิกิริยาเริ่มด้วย DHAP เปลี่ยนเป็น G3P โดยเอนไซม์ triosephosphate isomerase ต่อจากนั้น G3P จะทำปฏิกิริยากับฟอสเฟทให้ได้ 1,3-diphosphoglycerate (DPG) ขณะเดียวกันก็ปล่อยอิเล็กตรอนให้แก่ NAD^+ ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งด้วย glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase ซึ่ง DPG จะทำปฏิกิริยากับ ADP ได้ 3-phosphoglycerate (3PG) และ ATP ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ phosephoglycerate kinase ปฏิกิริยานี้สร้าง ATP โดยวิธี substrate level phosphorylation โดย 3PG จะเปลี่ยนแปลงเป็น phosphoenol-pyruvate (PEP) ซึ่งจะให้ ATP อีกหนึ่งโดยวิธี substrate level phosphorylation เช่นเดียวกัน รวมทั้งให้ไพรูเวทด้วย ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดย pyruvate kinase

ตอนที่สามจะเป็นการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นสารประกอบที่มี 2 หรือ 3 คาร์บอนทั้งนี้ขึ้นกับเอนไซม์ที่เหมาะ สมต่อการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ ในกรณีขาดออกซิเจนหรือไม่สามารถใช้ออกซิเจนไพรูเวทจะเปลี่ยนเป็นแลคเตท (lactate) โดยใช้ NADH เป็นตัวอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาของ lactate dehydrogenase เมื่อมีออกซิเจนไพรูเวทอาจเปลี่ยนเป็น acetyl CoA โดยเอนไซม์ pyruvate dehydrogenase complex ซึ่ง acetyl CoA จะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป เอนไซม์นี้อยู่ในไมโตคอนเดรียและเป็น enzyme complex ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดไพรูเวทอาจสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์กลายเป็น acetaldehyde โดยการเร่งของ pyruvate decarboxylase ต่อจากนั้น acetaldehyde จะถูกออกซิไดซ์ด้วย NAD^+ กลายเป็นอะซิเตท (acetate) หรือถูกรีดิวซ์ด้วย NADH โดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ได้เป็นเอทานอล

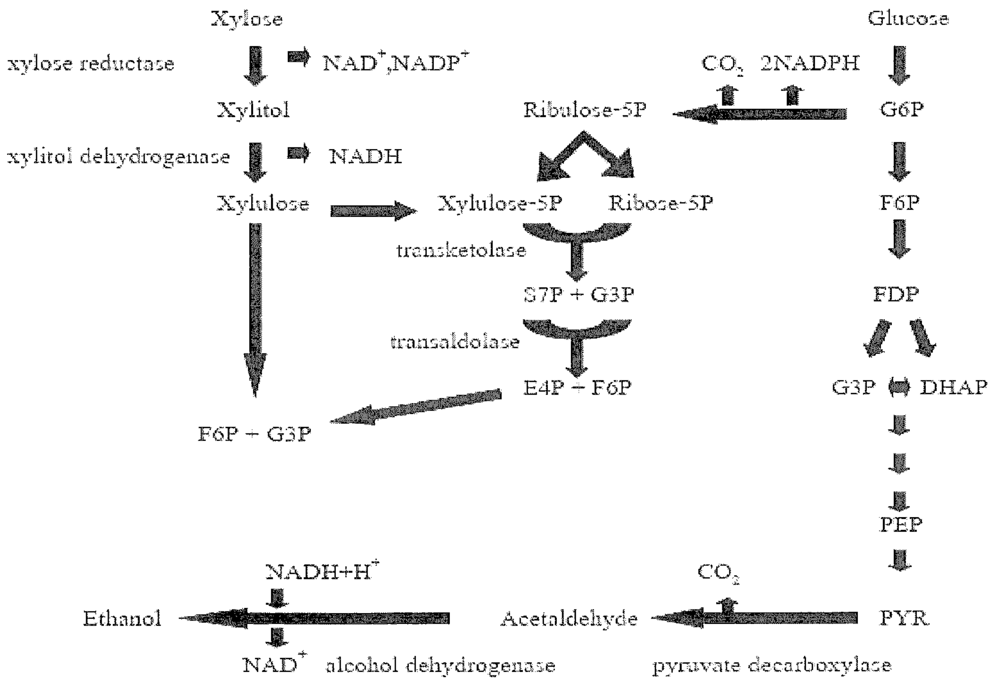


ภาพที่ 10 กระบวนการเชื้อยีสต์ทำการหมักเอทานอลโดยผ่านวิถีไกลโคไลซีส (Scragg, 1999)

การผลิตเอทานอลด้วยน้ำตาลเพนโตสโดยเชื้อยีสต์

น้ำตาลเพนโตสที่ยีสต์สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลคือ น้ำตาลไซโลส ซึ่งน้ำตาลชนิดนี้เป็นน้ำตาลที่ประกอบอยู่ในเฮมิเซลลูโลส การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสโดยเชื้อยีสต์เริ่มต้นเมื่อน้ำตาลไซโลสเชื้อสู่เซลล์ยีสต์แล้วไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลิทอลด้วยเอนไซม์ xylose reductaseจากนั้นไซลิทอลจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นไซลูโลสด้วยเอนไซม์ xylitol dehydrogenase ต่อจากนั้นไซโลสจะเกิดปฏิกิริยาฟอสฟอริเรชั่นได้เป็น xylose-5-phosphate (X5P) ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในวิถี Pentose phosphate ต่อจากนั้นจึงนำ G3P และ F6P ที่ได้เข้าสู่วิถีของ Glycolysisและได้เป็นเอทานอล ในที่สุด (Grohman, 1993) วิถี pentose phosphate เป็นกระบวนการย่อยสลายน้ำตาลอีกวิธีหนึ่ง ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ตอนที่หนึ่งเป็นการออกซิไดซ์ G6P ให้เป็น 6-phosphogluconolactone โดยเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase ซึ่งจะให้ NADPH ต่อมา 6-phosphogluconolactone จะเปลี่ยนเป็น 6-phosphogluconate (6PG) โดย lactonase แล้ว 6PG ถูกออกซิไดซ์เป็น ribulose-5-phosphate (RL5P) กับคาร์บอนไดออกไซด์พร้อมกับให้ NADPH อีก ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดย 6-phosphogluconate dehydrogenase ในตอนที่หนึ่งจึงเรียกว่า oxidative pentose phosphate pathway ซึ่งจะให้ 2 NADPH

ตอนที่สองเป็นการเปลี่ยน RL5P เป็นเพนโตสรูปอื่นๆ ได้แก่ ribose-5-phosphate (R5P) และ xylulose-5-phosphate (X5P) R5P จะเป็นสารตั้งต้นในการสร้าง DNA RNA nucleotide และกรดอะมิโนบางชนิด นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเพนโตสให้เป็นน้ำตาลอื่นๆ และในที่สุดเป็น F6P กระบวนการนี้อาศัยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ transketolase ซึ่งใช้ thiamine pyrophosphate หรือ TPP เป็นโคเอนไซม์ในการโยกย้ายหมู่คีโตน และ transaldolase เร่งปฏิกิริยาระหว่าง R5P กับ X5P ได้ sedoheptulo-7-phosphate(S7P) และ G3P และ transaldolase เร่งปฏิกิริยาระหว่าง S7P และG3P ได้ F6P กับ erythrose-4-phosphate (E4P) ในปฏิกิริยาต่อไปซึ่งถูกเร่งโดย transaldolase อีกเช่นกันจะรวม E4P กับ X5P ได้เป็น F6P กับ G3P (มนตรี จุฬาวัฒนทล, 2542)ซึ่งจะนำเข้าไปใช้ในวิถี glycolysis จนในที่สุดจะผลิตเป็นเอทานอลออกมา ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 การผลิตเอทานอลด้วยน้ำตาลเพนโตสโดยเชื้อยีสต์โดยผ่านวิถี Pentose phosphate และ Embden-Meyerhof-Parnas pathway (Saddler, 1993)

กระบวนการหมัก

สิ่งมีชีวิตหลายชนิด ตั้งแต่แบคทีเรีย รา หรือยีสต์สามารถเปลี่ยนสารคาร์โบไฮเดรตให้กลายไปเป็นเอทานอลได้ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ปริมาณเอทานอลที่ได้ตามทฤษฎีต่อน้ำตาลหนึ่งกิโลกรัมคือ 0.51กิโลกรัม โดยในส่วนที่เหลือจะเป็นคาร์บอนไดออกไซด์

ปัจจัยที่จำเป็นต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในขบวนการหมัก
เพื่อให้มีประสิทธิภาพการหมักสูงสุดและได้ปริมาณเอทานอลสูง จำเป็นต้องมีปัจจัยแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในการหมักเอทานอล มีองค์ประกอบที่เป็นส่วนปัจจัยสำคัญ และองค์ประกอบด้านสภาพแวดล้อมอื่น ๆ

- **ปริมาตรคาร์บอน ในการหมักจุลินทรีย์จะใช้คาร์บอนจาก**
    - น้ำตาลกลูโคส และฟรักโตสใช้หมักได้ดีเท่ากัน โดยปกติแหล่งน้ำตาลที่หาได้ง่ายได้จากกากน้ำตาล น้ำอ้อย ข้าวฟ่างหวาน
    - เป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ เช่นจากแป้งมันชนิดต่างๆ รวมทั้งมันสำปะหลัง ข้าวโพด และธัญพืชต่างๆ
    - เป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสด้วยขบวนการจุลชีวเคมีหรือขบวนการเคมี เช่นจากกระดาษ ใยจากต้นพืชและขี้เลื่อย ซึ่งในปัจจุบันยังอยู่ในขั้นพัฒนาในขั้นต่อไป

- **ความเข้มข้นของเอทานอล**

ในสภาพที่มีเอทานอลสูงการเจริญและการหมักจุลินทรย์จะถูกยับยั้งเพราะเอทานอลมีผลต่อเอนไซม์และสรีรวิทยาวของเซลล์ เมื่อเปอร์เซ็นต์เอทานอลมากกว่า 1 โดยน้ำหนัก มีผลทำให้การเจริญลดลงและจะหยุดลงเมื่อมีเอทานอล 4.7-7.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยต่อจากนั้นจะเป็นการหมักเอทานอลจนถึงเอทานอลความเข้มข้น 14 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก การที่ยีสต์ไม่เจริญทำให้อัตราการหมักลดลงด้วย เชื่อ S cerevisiae เป็นยีสต์ที่ทนเอทานอลมากที่สุด และในสภาพที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเกี่ยวข้องกับสภาวะ ฟอสโฟไลปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์

- **ปริมาณออกซิเจน**

ในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ ออกซิเจนมีความสำคัญมาก เนื่องจากจุลินทรย์มีการเจริญสูงในสภาวะที่มีออกซิเจนมาก แต่จะมีผลให้การหมักลดลง ออกซิเจนส่งเสริให้การออกซิเดชั่นสมบูรณ์ และมีการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ในออกซิเจนยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว ที่มีความสำคัญที่ทำให้จุลินทรย์ทนเอทานอลได้มากขึ้น ดังนั้นในสภาวะที่ขาดออกซิเจน จุลินทรย์ไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ จึงต้องมีการเติมกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพื่อให้ยีสต์สามารถอยู่รอดได้ จุลินทรย์ใช้ออกซิเจนในการหายใจเพื่อการเจริญเติบโต ดังนั้นในกระบวนการหมักอย่างต่อเนื่องควรมีการให้อากาศบ้างในระหว่างการหมัก เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ทดแทนเซลล์ที่ตายลง และยังพบว่าการให้อากาศปริมาณเล็กน้อย ทำให้การใช้กลูโคสได้มากขึ้น และช่วยให้ยีสต์มีความทนทานต่อเอทานอลได้ดี

- **ปริมาณคาร์บอนไดอ๊อกไซด์**

คาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเติบโตของจุลินทรย์ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ที่ความดันบรรยากาศปกติ หากมีคาร์บอนไดออกไซด์สูงจะเกิดการยังยั้งการเจริญและการหมักอย่างรุนแรง โดยคาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชั่น และคาร์บอนไดออกไซด์ยังมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้การขนถ่ายสารเข้าออกเซลล์เปลี่ยนไป และคาร์บอนไดออกไซด์ยังมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้การขนถ่ายสารเข้าออกเซลล์เปลี่ยนไป

- **ปริมาณไนโตรเจน**

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์และเป็นสับสเตรทสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น นับว่าเป็นส่วนสำคัญที่กระตุ้นการหมักหรือการผลิตแอลกอฮอล์ (เอทานอล) โดยในตัวของจุลินทรีย์จะมีปริมาณไนโตรเจน ราว 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง โดยส่วนใหญ่จุลินทรีย์จะสามารถใช้ไนโตรเจนในรูป แอมโมเนียมอิออนได้ ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลนิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เป็นแหล่งให้ธาตุไนโตรเจนและให้ซัลเฟอร์ไปพร้อมกัน (สำหรับจุลินทรีย์บางชนิดอาจใช้ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน)

- **ปริมาณซัลเฟอร์**

ซัลเฟอร์ เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเซลล์ จุลินทรีย์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ 0.4 เปอร์เซ็นต์ แหล่งซัลเฟอร์ที่จุลินทรีย์ใช้ได้ดีคือ

- กรดแอมมอโนเมทไทโอนีน
- เกลือซัลเฟต ในรูปแอมโมเนียมซัลเฟต ที่มีราคาถูกและปีนแหล่งไนโตรเจนพร้อมกันไป
- แมกนิเซียม
- แคลเซียม
- ไวตามินในการเจริญได้แก่ ไบโอติน กรดแพนโทแทนนิต ไทอะมีน กรดนิโคตินิค และไพริดอกซิน ในปริมาณเล็กน้อย

- **ปัจจัยแวดล้อมอื่นระหว่างการหมัก**

การหมักเชิงอุตสาหกรรมต้องมีการควบคุมสิ่งแวดล้อมในการหมักในทุกขั้นตอนเพื่อให้ประสิทธิภาพการหมักสูงสุด ทั้งนี้ต้องมีความสอดคล้องกับคุณลักษณะประจำสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้

- **ความเข้มข้นของน้ำตาล**

ในสภาพการหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะช่วยลดการปนเปื้อนเชื้ออื่นได้ดี แต่น้ำตาลสูงจะยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอล และคุณสมบัตินี้เป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เมื่อเทียบกันกับกรณีความเข้มข้นอทานอลจะมีผลยับยั้งการหมักรุนแรงกว่า แต่หากมีภาวะทั้งน้ำตาลเข้มข้นและเอทานอลสูงจะยิ่งเสริมกันให้มีลักษณะยับยั้งการหมักรุนแรงขึ้น

- **ระดับอุณหภูมิ**

ในการหมักยีสต์สายพันธุ์ *S cerevisiae* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดที่จะทนได้คือ 5-10 องศาเซลเซียส ในสภาพที่อาหารอุดมสมบูรณ์ยีสต์จะทนอุณหภูมิสูงได้ดี และจะหยุดเจริญเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 0 และเกินกว่า 40 องศาเซลเซียส การควบคุมอุณหภูมิในการหมักเชิงอุตสาหกรรมเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อประสิทธิภาพการหมักที่ดี และจำเป็นต้องมีระบบหล่อเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิในถังหมัก

- **ค่าพีเอช**

ยีสต์สายพันธุ์ *S cerevisiae* สามารถเจริญได้ดีในสภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ ค่า พีเอช อยู่ในช่วง 2.4-8.6 โดยมีค่าที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5 ซึ่งในสภาพเป็นกรดอ่อนนี้สามารถช่วยควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียได้ดี การหมักเอทานอลจากซูโครสมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลง พีเอชมากกว่าการใช้กลูโคส 7