บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล

2.1.1 คุณสมบัติทั่วไป

เอทานอลหรือเอทธิลแอลกอฮอล์เป็นไฮโดรคาร์บอนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (R-OH) เป็นหมู่ไวปฏิกิริยา (Functional group) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ C_2H_5OH ในสภาวะปกติ เอทานอลจะอยู่ในสภาวะของเหลวใส ระเหยง่าย มีรสขม และมีกลิ่นเฉพาะตัว ติดไฟ และให้เปลวไฟมีความร้อนประมาณ 7,100 แคลอรีต่อกรัม ละลายได้ในตัวทำลายที่เป็นน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ มีจุดเดือดที่ความดันบรรยากาศ 78.4 องศาเซลเซียส มีจุดเยือกแข็งที่ -117.3 องศาเซลเซียส มีค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.794 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาฟาเรนไฮต์ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 46.068 กรัม มีจุดหลอมเหลวที่ -114.3 องศาเซลเซียส และมีค่าออกเทนนัมเบอร์ประมาณ 96-113

โดยทั่วไปเอทานอลหรือเอทธิลแอลกอฮอล์ที่ผลิตในทางอุตสาหกรรม สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภทหรือ 4 เกรด ดังนี้คือ

1) Industrial alcohol (96.5^{o}GL) นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรม โดยใช้เป็นตัวทำละลายเป็นเชื้อเพลิง และใช้ในการเตรียมสารเคมีอื่น ๆ

2) Denatured spirit (88^{o}GL) นิยมใช้เพื่อการให้ความร้อนและแสงสว่าง

3) Fine alcohol (96.0 – 96.5^{o}GL) นิยมใช้ในทางการแพทย์และการผลิตเครื่องสำอาง

4) Absolute หรือ anhydrous alcohol (99.7 – 99.8^{o}GL) นิยมใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับการเผาไหม้ภายในของเครื่องยนต์

หมายเหตุ ^{o}GL หมายถึง The degree Gay-Lussac ซึ่งสามารถวัดโดยใช้เครื่องไฮโดรมิเตอร์ (Hydrometer) โดยอ่านเป็นร้อยละ (%) โดยปริมาตรของเอทธิลแอลกอฮอล์ในของผสมระหว่างเอทธิลแอลกอฮอล์ต่อน้ำ %(v/v) (ethanol/water)

2.1.2 ประโยชน์ของเอทานอล

เอทานอลที่ผลิตอยู่ในปัจจุบันมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมาย อาทิเช่น 1) ใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อให้พลังงานและความร้อน 2) ใช้เป็นตัวทำละลายทางเคมีในทางอุตสาหกรรม 3) ในทางการแพทย์ใช้เป็นตัวทำละลายยาและเป็นสารเสริมช่วยออกฤทธิ์ในยา นอกจากนี้ยังใช้เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อ

ทำความสะอาดบาดแผล 4) ใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อการผลิตสารบางชนิดใน อุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอาง เช่น น้ำหอม สบู่ เป็นต้น

2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล

การผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม สามารถทำได้ 2 วิธีการด้วยกัน คือการผลิตเอทานอล ทางเคมี และการผลิตเอทานอลทางชีวภาพ

2.2.1 การผลิตเอทานอลทางเคมี

เป็นวิธีการผลิตหรือสังเคราะห์เอทานอลโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งมีข้อดีหลายประการ อาทิ เช่น ปฏิกิริยาเกิดได้รวดเร็วและให้ความถูกต้องซึ่งสามารถคำนวณได้อย่างใกล้เคียงหรือแน่นอน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง ปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เอทานอลมีหลากหลายวิธี และการ ดูแลเอาใจใส่ไม่ยาวนานเหมือนกระบวนการหมักเอทานอลด้วยวิธีการทางชีวภาพ ส่วนข้อเสียของวิธีการ ผลิตหรือสังเคราะห์เอทานอลทางเคมี ได้แก่ ต้องใช้สารเคมีที่จำเพาะมากเป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์เอ ทานอล ซึ่งสารเคมีเหล่านี้ส่วนใหญ่มีราคาสูง เมื่อเทียบกับวัตถุดิบหรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เอ ทานอลที่ได้มีสารเคมีตัวอื่นๆ ปนมาในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ ซึ่งสารเหล่านั้นเป็นอันตรายทั้งต่อ ผู้ผลิตและสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุนี้กฎหมายจึงไม่อนุญาตให้นำเอทานอลจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี ไปใช้รับประทานหรือใช้กับสิ่งมีชีวิตภายในร่างกาย และการสังเคราะห์เอทานอลในทางเคมี สภาวะในการ เกิดปฏิกิริยาค่อนข้างสูงหรือจำเพาะ และของเสียจากกระบวนการผลิตยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมด้วย ดังนั้นในปัจจุบันการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจึงไม่นิยมใช้วิธีการผลิตโดยทางเคมี สำหรับ ตัวอย่างปฏิกิริยาทางเคมีที่ใช้ในการผลิตหรือสังเคราะห์เอทานอลทางเคมีที่สำคัญได้แก่

1) การสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาการเติมน้ำให้กับเอทธิลีน (ethylene) เป็นการเปลี่ยน เอทธิลีนให้กลายเป็นเอทานอลโดยการเติมกรดซัลฟูริกให้กับเอทธิลีน ได้ผลผลิตเป็นเอทธิลไฮโดรเจน ซัลเฟต (ethyl hydrogen sulfate) ซึ่งเมื่อนำไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสด้วยน้ำที่ อุณหภูมิสูง จะได้เอทา นอลเป็นสารผลิตภัณฑ์

2) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอทานอลโดยการเติมไฮโดรเจนให้กับอัลดีไฮด์ การสังเคราะห์เอทา นอลโดยวิธีนี้ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ดีภายใต้สภาวะที่มีความร้อนและความดันสูง โดยมีนิเกิล (nikel) และ แพลตตินั่ม (platinum) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst)

3) การสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาระหว่างเมทานาล (methanal) กับกรีญาร์รีเอเจนต์ ซึ่ง กรีญาร์รีเอเจนต์เกิดจากอัลคิลเฮไลด์ทำปฏิกิริยากับแมกนีเซียมในไดเอทธิล อีเทอร์ (anhydrous diethyl

ether) จะได้อัลคิลแมกนีเซียมเฮไลด์ (alkylmagnesium halide) ซึ่งเป็นกรีญาร์รีเอเจนต์ โดยอัลคิลแมกนีเซียมเฮไลด์จะทำปฏิกิริยากับเมทานาลกลายเป็นเอทานอล

4) การสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาไฮโดรโบเรชันของเอทธิลีน (ethylene) เป็นปฏิกิริยาระหว่างเอทธิลีนกับไฮไดรด์ของโบรอน ที่เรียกว่า โบเรน BH_3 (ไดเมอร์ของโบเรน คือ B_2H_6 ซึ่งเรียกว่า ไดโบเรน) จะให้สารประกอบไตรอัลคิลโบรอน ซึ่งเมื่อนำไปออกซิไดซ์ด้วยไฮโดรเจนเพอร์รอกไซด์จะให้แอลกอฮอล์หรือเอทานอล

5) การสังเคราะห์เอทานอลจากการไฮโดรไลซิสของเอทิลเฮไลด์ (ethyl helide; CH_3CH_2X) เป็นการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อเปลี่ยนเอทิลเฮไลด์ไปเป็นเอทานอลภายใต้สภาวะเป็นด่าง

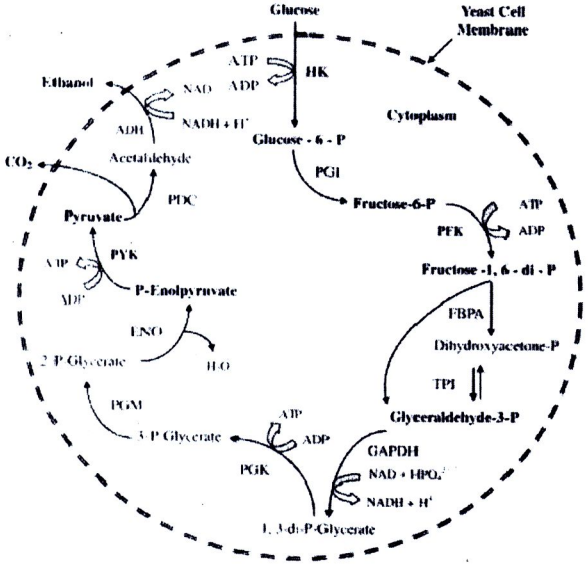
2.2.2 การผลิตเอทานอลทางชีวภาพ

การผลิตเอทานอลทางชีวภาพเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นซึ่งส่วนใหญ่จะหมายถึงสารละลายน้ำตาล (หากเป็นวัตถุดิบที่ไม่ใช้น้ำตาล เช่น แป้งหรือเซลลูโลส จำเป็นต้องเปลี่ยนวัตถุดิบเหล่านั้นให้กลายเป็นน้ำตาลที่สามารถหมักได้ก่อน ซึ่งจะเรียกขั้นตอนนี้ว่า (pretreatment) ให้กลายเป็นเอทานอลโดยอาศัยกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตที่สำคัญคือ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Zymomonas mobilis* ข้อดีของการผลิตเอทานอลทางชีวภาพคือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรงเมื่อเทียบกับวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี ต้นทุนในการผลิตต่ำเนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตส่วนใหญ่เป็นผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งมีราคาถูกเมื่อเทียบกับวิธีการสังเคราะห์เอทานอลด้วยวิธีทางเคมี นอกจากนี้ปริมาณของวัตถุดิบยังมีมาก และหาได้ง่าย โดยเฉพาะของเหลือทิ้งทางการเกษตร ข้อดีทางอ้อมคือ ช่วยเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจให้แก่พืชผลทางการเกษตร สร้างรายได้ให้แก่เกษตรกร ช่วยลดขยะและช่วยรักษาสิ่งแวดล้อม และผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้ตัวอื่นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ใช้ทำน้ำแข็งแห้ง น้ำโซดา หรือสารตั้งต้นในปฏิกิริยาเคมี เอนไซม์อินเวอร์เทส ซึ่งผลิตได้จากยีสต์สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ ตัวยีสต์อาจใช้เป็นอาหารเสริมเป็นแหล่งของวิตามินบี ใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหารที่ให้รสมันเนย หรือใช้เป็นอาหารสัตว์ ส่วนข้อเสียของการผลิตเอทานอลทางชีวภาพคือ กระบวนการผลิตเอทานอลเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ทำให้ต้องใช้แรงงาน และการดูแลเอาใจใส่มากกว่าวิธีการทางเคมี นอกจากนี้หากต้องการปริมาณผลผลิตที่มากจำเป็นต้องใช้ระบบการผลิตที่ใหญ่ขึ้น ทำให้ต้นทุนของการผลิตโดยเฉพาะต้นทุนเกี่ยวกับเครื่องมืออุปกรณ์สูงขึ้นด้วย และในบางครั้งหากใช้วัตถุดิบที่จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้ได้โดยตรง จำเป็นที่จะต้องปรับสภาพหรือเปลี่ยนไปเป็นสารตั้งต้นที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ก่อน ซึ่งทำให้เกิดความยุ่งยากซับซ้อนและเสียค่าใช้จ่ายมากขึ้น

2.3 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในกระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวภาพ

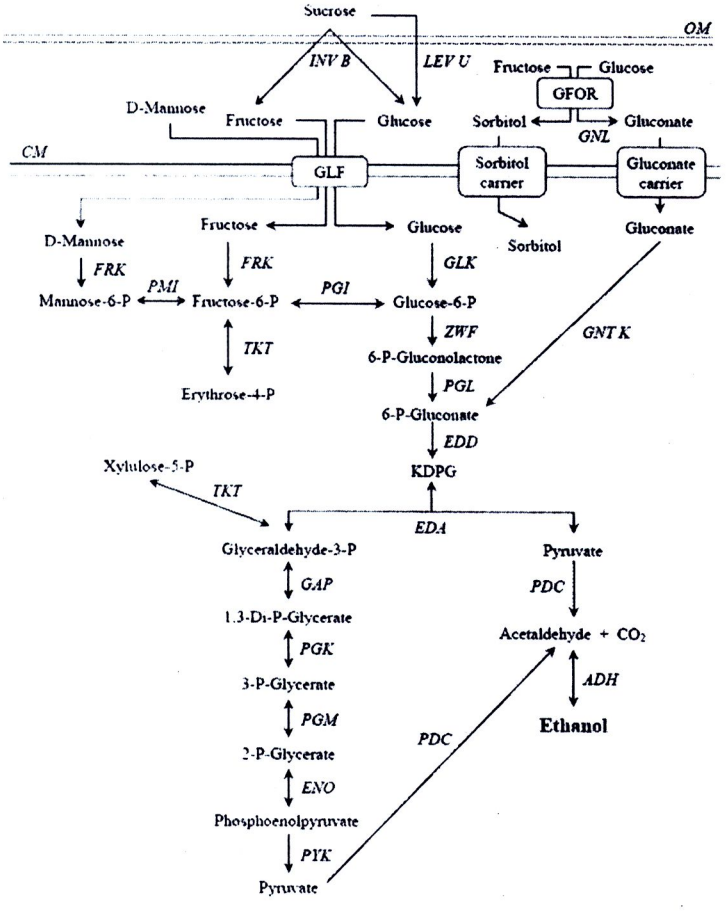
ในกระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวภาพนั้น จะมีปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นเอทานอลโดยกิจกรรมของเซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ ในที่นี้จะขอกล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ *S. cerevisiae* และ *Z. mobilis* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิต

ยีสต์ *S. cerevisiae* จะนำน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคส เข้าสู่เซลล์จากนั้นกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางต่างๆ ในวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) หรือผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) โดยไม่มีการใช้อากาศในปฏิกิริยา น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไพรูวิก 2 โมเลกุล จากนั้นกรดไพรูวิกที่เกิดขึ้นนี้ จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยอาศัยเอ็นไซม์ pyruvate decarboxylase (PDC) และ alcohol dehydrogenase (ADH) ผ่านวิถีการสังเคราะห์เอทานอล โดยทฤษฎีแล้วน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล สามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้ 51% (กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคสที่ใช้) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 49% (กรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกรัมกลูโคสที่ใช้) (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 การสลายน้ำตาลกลูโคสโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ผ่านวิถีไกลโคไลซิสเพื่อเปลี่ยนไปเป็นกรดไพรูวิก แล้วกรดไพรูวิกถูกสลายต่อเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Madigan et al., 2000)

สำหรับวิถีการสังเคราะห์เอทานอลโดย *Z. mobilis* นั้น จะเกิดผ่านวิถี Entner-doudoroff โดยน้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 2.2 และจะได้กรดไพรูวิก 2 โมเลกุล จากนั้นกรดไพรูวิกจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ pyruvate decarboxylase และ alcohol dehydrogenase โดยผลผลิตของเอทานอลในทางทฤษฎีจะมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับผลผลิตของเอทานอลจากยีสต์



ภาพที่ 2.2 การสลายน้ำตาลกลูโคสโดยแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ผ่านวิถี Entner-Doudoroff pathway เพื่อเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล โดยคำย่อต่างๆ มีดังนี้ : ADH, alcohol dehydrogenases I and II; CM, cytoplasmic membrane; EDA, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase; EDD, 6-phosphogluconate dehydratase; ENO, enolase; FRK, fructokinase; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase;

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

GFOR, glucose-fructose oxidoreductase; GLF, glucose facilitator; GLK, glucokinase; GNL, gluconolactonase; GNT K, gluconate kinase; INV B, invertase B; KDPG, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate; LEV U, levansucrase; OM, outer membrane; PDC, pyruvate decarboxylase, PGI, phosphoglucose isomerase; PGK, phosphoglycerate kinase; PGL, phosphogluconolactonase; PGM, phosphoglyceromutase; PMI, phosphomannose isomerase; PYK, pyruvate kinase; TKT, transketolase; ZWF, glucose 6-phosphate dehydrogenase (Sprenger, 1996)

2.4 วัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

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

2.4.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ น้ำอ้อย กากน้ำตาล และน้ำตาลจากหัวบีท ยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้ได้เลย โดยไม่ต้องผ่านการย่อยให้กลายเป็นน้ำตาล (Pretreatment) ใดๆ น้ำตาลที่พบในวัตถุดิบเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล โดยมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ดังนี้

น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส+ฟรุกโตส เอทานอล

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

2.4.2 วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ มันสำปะหลัง ธัญพืช และมันฝรั่ง โดยมีโครงสร้างการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของวัตถุดิบเหล่านี้ให้กลายเป็นเอทานอล สามารถสรุปขั้นตอนได้ดังนี้

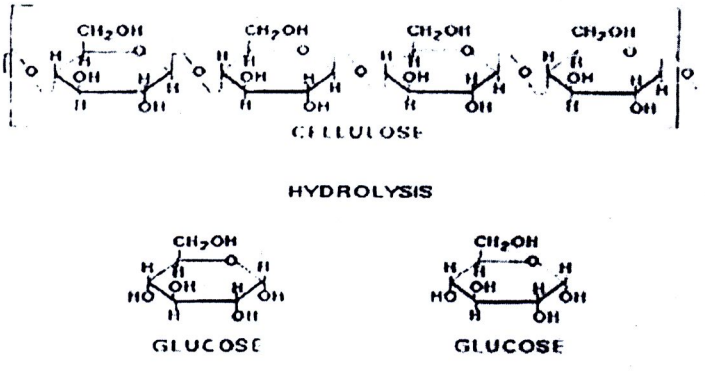
แป้ง น้ำตาลกลูโคส เอทานอล

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

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 29 พ.ย. 2555
เลขทะเบียน 250762

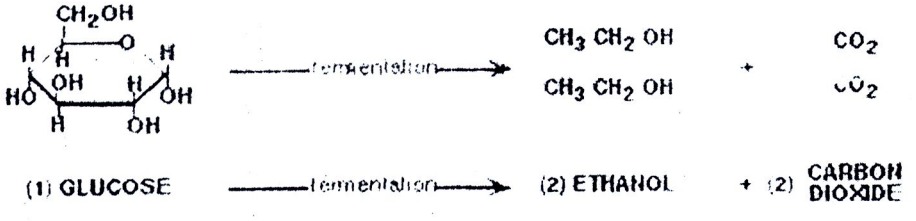
แป้งในวัตถุดิบจะต้องถูกย่อยให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนจากนั้นยีสต์จึงจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้

2.4.3 วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น ฟางข้าว กากอ้อย ซังข้าวโพด และกากของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ฯลฯ การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสนั้น ขั้นตอนแรกจะใช้กระบวนการไฮโดรไลซิส ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงพันธะในเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลส ไปเป็นน้ำตาลกลูโคสดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 การย่อยเซลลูโลส หรือเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส

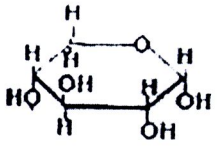
โครงสร้างที่มีมวลโมเลกุลใหญ่จะถูกย่อยสลายให้กลายเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์ หรือกรด จากนั้น น้ำตาลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล โดยผ่านกระบวนการหมัก ดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล ด้วยกระบวนการหมัก

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

สำหรับปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลส (xylose) ไปเป็นเอทานอล แสดงดังภาพที่ 2.5 ซึ่งปกติแล้วน้ำตาลไซโลสสามารถหมักได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นเอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ



$\xrightarrow{\text{fermentation}}$ CH_3CH_2OH + CO_2 + H_2O

XYLOSE $\xrightarrow{\text{fermentation}}$ ETHANOL + CARBON DIOXIDE + WATER

ภาพที่ 2.5 แสดงการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลส (xylose) ไปเป็นเอทานอล

แม้ว่าจะมีวัตถุดิบอยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ แต่จะมีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยมีหลักเกณฑ์ที่ควรพิจารณา คือ

- วัตถุดิบมีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนสู่โรงงานได้ตลอดทั้งปี หาได้ง่าย และมีราคาถูก
- สามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบ และต่อหน่วยของพื้นที่เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง
- พลังงานสมดุลของระบบเป็นบวก
- วัตถุดิบนั้นจะต้องไม่แย่งอาหารมนุษย์

สำหรับประเทศไทยวัตถุดิบที่ได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการเอทานอลแห่งชาติว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเอทานอลมีเพียง 3 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบปริมาตรของเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบชนิดต่างๆ (http://www.region8.m-energy.go.th/ethanol.htm)

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

ตารางที่ 2.1 แสดงศักยภาพของวัตถุดิบแต่ละชนิดในการผลิตเอทานอล จากข้อมูลจะเห็นว่าวัตถุดิบประเภทแป้ง (ธัญพืช เช่น ข้าวโพด) ที่มีน้ำหนัก 1 ตัน สามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ปริมาตรสูงสุด รองลงมาคือ กากน้ำตาล หัวมันสำปะหลังสด น้ำมะพร้าว ข้าวฟ่าง และอ้อย ตามลำดับ

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ (http://www.region8.m-energy.go.th/ethanol.htm)

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

ตารางที่ 2.2 แสดงต้นทุนในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบทางการเกษตรแต่ละชนิด จากข้อมูลจะเห็นว่าวัตถุดิบที่เป็นหัวมันสำปะหลังสด เมื่อนำมาผลิตเป็นเอทานอลมีต้นทุนการผลิตต่ำสุด รองลงมาคือ มันสำปะหลังเส้น อ้อย ข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง ตามลำดับ

2.5 ยีสต์

การใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมที่สำคัญและรู้จักกันดี คือ การใช้ยีสต์ในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบพวกคาร์โบไฮเดรตและการผลิตยีสต์ขนมปัง สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นมาโดยอาศัยกระบวนการหมัก (Fermentation Process) ได้แก่ เบียร์ สุรา ขนมปัง ไวน์ ผลิตภัณฑ์ทางเคมี เป็นต้น จุลินทรีย์ที่นิยมใช้คือยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้งนี้เนื่องจากว่ายีสต์ชนิดนี้มีข้อดีหรือคุณสมบัติเด่นคือ

1) เจริญรวดเร็ว
2) มีความคงทนต่อแอลกอฮอล์ได้สูง
3) ให้แอลกอฮอล์ในปริมาณสูง

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นสูงหรือที่เรียกว่ายูคาริโอติกเซลล์ จึงมีโครงสร้างเซลล์แบบยูคาริโอต รูปร่างและโครงสร้างของยีสต์จะแตกต่างกันไปตามสปีชีย์ เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีความสำคัญทาง

การเกษตรและอุตสาหกรรมมาก จึงทำให้มีผู้ศึกษารายละเอียดของยีสต์ชนิดนี้มาก อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีผู้ศึกษารายละเอียดของยีสต์ชนิดอื่นเพิ่มขึ้น เช่น *Kluyveromyces, Pichia, Hansenula, Rhodotorula, Candida* และอื่นๆ

โดยทั่วไปยีสต์จะมีปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารชีวภาพชนิดต่างๆ ที่แตกต่างกัน เช่น การย่อยน้ำตาลกลูโคส อาจเกิดในลักษณะทั้งที่ไม่ใช้ออกซิเจน (กระบวนการหมัก) หรือใช้ออกซิเจน (กระบวนการหายใจ) แต่กระบวนการที่เป็นแบบฉบับมากที่สุดก็คือ การย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนหรือที่รู้จักในนามกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งผลผลิตสุดท้ายจะได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการ

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

ในสภาพที่มีออกซิเจนในกระบวนการหายใจ จะเกิดการออกซิเดชันกลูโคสอย่างสมบูรณ์จนได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่ถ้าเกิดออกซิเดชันไม่สมบูรณ์จะได้กรดและสารตัวกลางอื่นๆ ผลผลิตที่สำคัญได้แก่ แอลกอฮอล์ กรด เอสเทอร์ (ester) กลีเซอรอล (glycerol) และอัลดีไฮด์ (aldehyde) ก่อนที่ยีสต์จะเกิดกระบวนการหมักได้สารโมเลกุลใหญ่ เช่น ไดแซคคาไรด์ ไตรแซคคาไรด์ และพอลีแซคคาไรด์ จะต้องถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (ไฮโดรเลส) ชนิดของเอนไซม์ไฮโดรเลสจะแตกต่างกันไปตามจีนัส และสปีชีส์ของยีสต์ ซึ่งใช้คุณสมบัตินี้ในการแยกความแตกต่างของแต่ละสปีชีส์ได้ นอกจากนี้ยีสต์ยังมีเอนไซม์อื่นๆ เช่น แลกเทส (lactase) อินเวอร์เทส (invertase) และคาตาเลส (catalase) ซึ่งมีความสำคัญทางการค้า

ยีสต์ได้รับไนโตรเจนจากสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อนำไปสร้างโปรตีน และยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้แอมโมเนียไอออนได้ รวมทั้งสารประเภทไนเตรตและไนไตรต์ และยังสามารถใช้หมู่อะมิโนออกจากกรดอะมิโนเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ จากคุณสมบัตินี้ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างของยีสต์ในแต่ละสายพันธุ์และสปีชีย์ได้

ยีสต์ต้องการซัลเฟอร์ซึ่งอาจอยู่ในรูปซัลเฟต หรือสารอินทรีย์ซัลเฟอร์ เช่น ซีสเตอีน หรือเมทิโอนิน และแร่ธาตุอื่นๆ เพื่อการเจริญ เช่น โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และแคลเซียม นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการแร่ธาตุ (Trace elements) เช่น โบรอน ทองแดง สังกะสี เหล็ก ไอโอดีน และ โมลิดินัม เพื่อให้ยีสต์เจริญเติบโตได้ดี

ยีสต์พวกที่ชอบแรงดันออสโมติกสูง (Osmophilic yeast) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลสูงๆ ได้โดยมีความชื้นจำกัด ยีสต์สามารถเจริญในช่วงที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 0-47 องศาเซลเซียส บางชนิดไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส ในขณะที่บางชนิดจะไม่เจริญในที่อุณหภูมิต่ำกว่านี้ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริยของยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ที่ 20-30 องศาเซลเซียส ยีสต์ที่ก่อโรคจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส

โดยทั่วไปยีสต์จะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างระหว่าง 3.5 ถึง 3.8 ซึ่งเป็นช่วงความเป็นกรดที่ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ ยีสต์ต้องการแหล่งอาหารที่แตกต่างกันในการเจริญ โดยมีรายงานว่ายีสต์สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เช่น อาหารวุ้นแข็ง (Nutrient agar) และอาหารเหลว (Nutrient broth) ได้ ในการแยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติ นิยมใช้อาหารที่มีส่วนประกอบของมอลต์เอกแทรกซ์ โดยใช้ในรูปของมอลต์เอกแทรกซ์อะการ์ (5% malt extract agar) นอกจากนี้อาหารชนิดอื่นๆ เช่น วิกเกอร์แฮมมีเดียม (Wickerham's medium) (ตารางที่ 2.3) และอาหารที่เตรียมจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ผลไม้และผัก ยังช่วยให้ยีสต์สามารถเจริญได้ดีขึ้น

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (นงลักษณ์, 2541)

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

2.6 ข้าวฟ่างหวาน

ข้าวฟ่างหวานจัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับหญ้า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sorghum bicolor* L. Moench สามารถจัดจำแนกชั้นตามลักษณะทางพฤษศาสตร์ได้ดังนี้

Kingdom :	Plantae
Division :	Magnoliophyta
Class :	Liliopsida
Order :	Poales
Family :	Poaceae
Genus :	*Sorghum* L.
Species :	*Sorghum bicolor*

ข้าวฟ่างหวานจัดเป็นพืชที่มีศักยภาพสูงและเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ทั้งนี้เพราะมีข้อดีหลายประการอาทิเช่น 1) มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี เหมาะสำหรับการแนะนำให้ปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีปัญหาทางด้านนี้ 2) มีอายุการเก็บเกี่ยวสั้น ประมาณ 3-4 เดือน ในหนึ่งปีจึงสามารถปลูกได้ประมาณ 2-3 ครั้ง ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับการปลูกสลับกับพืชหลักชนิดอื่นๆ และ 3) มีองค์ประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรททั้งชนิดที่ละลายน้ำได้ (สารละลายน้ำตาล) และชนิดที่ละลายน้ำไม่ได้ (สารประกอบประเภทลิกโนเซลลูโลส) ในปริมาณสูง นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์น้ำตาลที่พบในข้าวฟ่างหวานยังมีค่าใกล้เคียงหรือเทียบเท่ากับปริมาณน้ำตาลที่พบในอ้อย จึงเหมาะสำหรับการใช้ประโยชน์เพื่อการผลิตเอทานอล (น้อม ขันติคุณ, 2523; Jasberg, *et al.*, 1983)

ที่ผ่านมาได้มีความพยายามที่จะนำเอาน้ำหวานจากลำต้นข้าวฟ่างหวานไปใช้เพื่อการผลิตน้ำตาล แต่พบว่าไม่สามารถทำการตกผลึกน้ำตาลที่เกิดขึ้นได้ จึงทำให้หลายๆ ประเทศหันไปให้ความสนใจที่จะนำข้าวฟ่างหวานไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมด้านอื่นๆ แทน ซึ่งอุตสาหกรรมที่ได้รับความสนใจในการนำข้างฟ่างหวานไปใช้ประโยชน์ที่นอกเหนือจากอุตสาหกรรมอาหารสัตว์คือ อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล โดยประเทศที่ทำการศึกษาและผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวานมากได้แก่ อิตาลี ฝรั่งเศส สหรัฐอเมริกา อินเดีย เป็นต้น (Subramanian *et al.*, 1987)

ในส่วนของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรทชนิดที่ไม่ละลายน้ำซึ่งได้แก่สารประกอบประเภทลิกโนเซลลูโลส ที่เป็นองค์ประกอบในส่วนต้นของข้าวฟ่างหวานนั้น มีอยู่ในปริมาณสูงถึง 43-52 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของสายพันธุ์และพื้นที่ปลูก และจากรายงานพบว่าองค์ประกอบทางเคมีในส่วนของสารประกอบประเภทลิกโนเซลลูโลสในต้นข้าวฟ่างหวานประกอบ

ไปด้วยเซลลูโลส ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลสหรือเพนโตแซน ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ลิกนิน ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และองค์ประกอบอื่นๆ อีกเล็กน้อย จากองค์ประกอบเหล่านี้ จะเห็นได้ว่าต้นข้าวฟ่างหวานเป็นพืชที่มีเซลลูโลสอยู่ค่อนข้างสูง ด้วยเหตุนี้ต้นข้าวฟ่างหวานภายหลังจากการคั้นน้ำหรือที่เรียกว่า ชานต้นข้าวฟ่างหวาน น่าจะเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สามารถนำไปแปรสภาพให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงขึ้น อาทิเช่น การนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลโดยอาศัยกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน

ยีสต์ทนร้อน (thermotolerant yeast) ตามความหมายของ McCracken และ Gong (1982) หมายถึงยีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะอุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส ซึ่งข้อดีของยีสต์ทนร้อนคือ สามารถเจริญได้ดีในสภาวะอุณหภูมิสูง มีอัตราการผลิตเอทานอลค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับยีสต์สายพันธุ์ปกติ และสามารถทนเอทานอลได้ดี นอกจากเซลล์ยีสต์จะมีข้อดีดังที่กล่าวแล้ว ระบบการหมักในสภาวะอุณหภูมิสูงโดยอาศัยยีสต์ทนร้อน ยังมีข้อได้เปรียบในด้านอื่นๆ ด้วย ที่สำคัญคือ การหมักในสภาวะอุณหภูมิสูงจะทำให้อัตราการหมักเอทานอลเกิดขึ้นได้เร็ว ทำให้ระยะเวลาในการหมักสั้นลง ระบบการหมักในสภาวะอุณหภูมิสูงยังช่วยลดปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ และที่ระดับอุณหภูมิสูงเอทานอลที่เกิดขึ้นในระบบสามารถระเหยทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวโดยอาศัยระบบที่เรียกว่า continuous stripping (Kiran Sree et al., 2000)

ในต่างประเทศมีการศึกษาวิจัยถึงการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ทนร้อนมากพอสมควร ตัวอย่างงานวิจัยที่สำคัญ ได้แก่ Banat et al. (1992) ได้รายงานผลการคัดแยกยีสต์ทนร้อนจากตัวอย่างในประเทศอินเดีย และพบยีสต์ทนร้อนจำนวน 5 ไอโซเลต ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 52 องศาเซลเซียส โดยยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลต มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปทดสอบการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 16% น้ำหนักโดยปริมาตร พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 7.5-8.0 และ 6.5-7.0% เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Singh et al. (1998) รายงานผลการทดสอบการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลในถังหมักขนาด 60 ลิตร โดยใช้ยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *K. marxianus* IMB3 ผลการศึกษาพบว่าเอทานอลที่ผลิตได้มีความเข้มข้นประมาณ 6.0-7.2 % น้ำหนักโดยปริมาตร โดยที่ไม่จำเป็นต้องใช้ระบบน้ำหล่อเย็น และพบว่าระยะเวลาในการหมักสั้งลงประมาณ 20 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับการหมักในสภาวะปกติที่อุณหภูมิ 30 องศา

เซลเซียส

Kiran Sree et al. (1999) รายงานผลศึกษาการผลิตเอทานอลจากการใช้ข้าวฟ่างหวานและมันฝรั่งเป็นวัตถุดิบ ในระบบการหมักแบบ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) โดยใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* VS3 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* sp. (VB9) ผลการศึกษาพบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าประมาณ 5 กรัมต่อ 100 กรัมวัตถุดิบ เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และประมาณ 3.5 กรัมต่อ 100 กรัมวัตถุดิบ เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

Kiran Sree et al. (2000) รายงานผลการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อนจากตัวอย่างดินบริเวณโรงงานผลิตกระแสไฟฟ้าในประเทศอินเดีย ผลการศึกษาพบว่าสามารถคัดแยกยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* ได้ 4 สายพันธุ์คือ VS1-VS4 เมื่อนำมาทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิระดับต่างๆ กัน พบว่ายีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส โดยยีสต์สายพันธุ์ VS1 และ VS3 สามารถเจริญได้ดีกว่าอีกสองสายพันธุ์ เมื่อทดสอบการหมักเอทานอลจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ายีสต์สายพันธุ์ VS3 สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด โดยมีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 75 และ 60 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Hari Krishna et al. (2001) รายงานผลศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลระหว่างการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* NRRL-Y-132 และยีสต์ทนร้อน *K. fragilis* NCIM3358 ในสูตรอาหารที่มีสารละลายน้ำตาลจากการย่อยเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบ ผลการศึกษาพบว่า *K. fragilis* NICM3358 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า (2.5-3.5% w/v) ยีสต์ *S. cerevisiae* NRRL-Y-132 (2.0-2.5% w/v) นอกจากนี้ระยะเวลาในการหมักยังสั้นกว่า

Ballesteros et al. (2004) รายงานผลการศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสจากเนื้อไม้ชนิดต่างๆ ด้วยระบบการหมักแบบ SSF โดยใช้ยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* CECT 10875 ผลการทดสอบการหมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โดยใช้ซับสเตรทความเข้มข้น 10% และใช้เอนไซม์เซลลูเลสในความเข้มข้น 15 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรท พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 16-19 กรัมต่อลิตร ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อไม้ที่นำมาทดสอบการหมัก

Limtong et al. (2007) รายงานผลการแยกเชื้อยีสต์จากแหล่งต่างๆ เช่น ดิน น้ำอ้อยดิบในโรงงานผลิตน้ำตาล โดยใช้เทคนิค enrichment culture โดยใช้สูตรอาหาร YM ที่เติมเอทานอล 4% ลง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ไป และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาสามารถคัดแยกยีสต์ทนร้อนได้หลายสายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีที่สุดคือ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปทดสอบการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ พบว่ายีสต์สายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดมีค่า 8.7% (w/v) เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเอทานอลจะลดลงเหลือ 6.78% (w/v)

Yu et al. (2008) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน *S. cerevisiae* AF37X ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการเจริญได้ดีในสภาพอุณหภูมิสูง จากผลการศึกษาพบว่าภายใต้สภาวะการหมักที่เหมาะสมคือ ลำต้นข้าวฟ่างหวานมีขนาด 1.5 มิลลิเมตร เซลล์ยีสต์เริ่มต้น $4x10^6$ เซลล์ต่อกรัมวัตถุดิบ สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 7.9 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสดของวัตถุดิบ หรือมีผลได้เท่ากับ 0.46 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด ซึ่งมีค่าประมาณ 91 % ของค่าในทางทฤษฎี

Wilkins et al. (2008) รายงานผลการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* IMB2, IMB4 และ IMB5 ผลการศึกษาพบว่ายีสต์ทนร้อน *K. marxianus* IMB4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด 2.08 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่างของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5.5

Faga et al. (2010) รายงานผลการผลิตเอทานอลจากหญ้า switch grass ด้วยระบบการหมักแบบ SSF โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* D5A และยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* IMB1, IMB2, IMB3, IMB4 และ IMB5 จากผลการทดลองพบว่า *K. marxianus* IMB3 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ 77.5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิในการหมัก 45 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ

Dhaliwal et al. (2011) รายงานผลการคัดแยกยีสต์ทนร้อนจากน้ำอ้อยโดยใช้เทคนิค enrichment culture ผลการศึกษาพบว่าสามารถคัดแยกยีสต์ทนร้อน *P. kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*) ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบการหมักในถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้น้ำอ้อยที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 14% น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 2% และฟรุกโตส ความเข้มข้น 1% เป็นวัตถุดิบ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 71.9 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิต 4.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง