

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

จากปัญหาเชื้อเพลิงและพลังงานที่มีความต้องการสูงขึ้น ความผันผวนของราคาน้ำมันที่มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ อย่างไม่หยุดยั้ง ในขณะที่เกษตรกรชาติและน้ำมันของไทยมีอยู่อย่างจำกัด ไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศ ทำให้มีการแสวงหาแหล่งพลังงานจากทรัพยากรภายในประเทศเพื่อทดแทนการนำเข้าพลังงานในรูปแบบของน้ำมันดิบ วันที่ 9 ธันวาคม 2546 จึงได้มีมติของคณะรัฐมนตรี เรื่องพลังงานทดแทน และวางยุทธศาสตร์ส่งเสริมการใช้แก๊สโซฮอล์ และไบโอดีเซลเป็นพลังงานทดแทน อย่างไรก็ตามในปี พ.ศ. 2550 ประเทศไทยยังต้องสูญเสียเงินตราการนำเข้าเชื้อเพลิงให้กับต่างประเทศ เป็นเงิน 752,783 ล้านบาท (กระทรวงพลังงาน, 2551)

น้ำมันแก๊สโซฮอล์ (gasohol) เป็นเชื้อเพลิงที่ประกอบด้วยน้ำมันเบนซินและเอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในขณะนี้ประเทศไทยมีน้ำมันแก๊สโซฮอล์ 2 ชนิดหลัก คือ แก๊สโซฮอล์ E10 และ E20 ซึ่งมีอัตราส่วนระหว่างน้ำมันเบนซินและเอทานอล 9 ต่อ 1 และ 8 ต่อ 2 ตามลำดับ ในปี พ.ศ. 2550 ปริมาณการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ E10 ในประเทศไทยอยู่ที่ประมาณ 4.6 ล้านลิตรต่อวัน คิดเป็น 23 เปอร์เซ็นต์ของความต้องการน้ำมันเบนซินทั้งหมดประมาณ 20 ล้านลิตรต่อวัน ทำให้มีปริมาณการใช้เอทานอลเป็นพลังงานทดแทนประมาณ 5 แสนลิตรต่อวัน แต่หลังจากมีการประกาศใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ E20 เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 รวมทั้งนโยบายทางด้านราคาของรัฐบาลที่ผ่านมานั้น คาดว่าปริมาณการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ทั้ง E10 และ E20 จะเพิ่มมากขึ้นอีก ส่งผลให้ปริมาณการใช้เอทานอลเพิ่มเป็นประมาณ 1.3 ล้านลิตรต่อวันในปี พ.ศ. 2551 และคาดว่าจะเพิ่มเป็น 2.4 ล้านลิตรต่อวัน ในปี พ.ศ. 2554 ในที่สุด (มิตรผล, 2551) โครงการวิจัยเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบจากพืชผลทางการเกษตรมีเป้าหมายเพื่อใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตเอทานอลและสร้างมูลค่าเพิ่มของพืชผลทางการเกษตร ตลอดจนเป็นแนวทางในแก้ไขปัญหาการขาดแคลนพลังงาน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดเสถียรภาพด้านพลังงานของประเทศ และยกระดับคุณภาพชีวิตของเกษตรกรซึ่งเป็นคนส่วนใหญ่ของประเทศ ทำให้สามารถแก้ไขปัญหาความยากจนตามนโยบายของรัฐบาลได้ทางหนึ่ง และยังช่วยลดมลพิษทางอากาศเนื่องจากเอทานอลสามารถเผาไหม้ได้สมบูรณ์ ทำให้แก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อม และเพิ่มคุณภาพชีวิตได้

ปัจจุบันมีโรงงานผลิตเอทานอล 11 โรงงาน มีกำลังการผลิตกว่า 1.2 ล้านลิตรต่อวัน อีกทั้งยังมีผู้ขออนุญาตตั้งโรงงานผลิตเอทานอลแล้วทั้งสิ้น 45 ราย ซึ่งทำให้มีกำลังการผลิตในอนาคตเป็น 12 ล้านลิตรต่อวัน (ฐานเศรษฐกิจ, 2550) โดยโรงงานส่วนใหญ่จำหน่ายเอทานอลเพื่อใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงโดยใช้กากน้ำตาลและแอมโมเนียปาล์มเป็นวัตถุดิบ จากปริมาณกำลังการผลิตที่สูงนี้ จะเห็นได้ว่ามีความ

เป็นไปได้ที่จะทำให้อากน้ำตาลและแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักเกิดการขาดแคลนได้นอกจากนี้กากน้ำตาลยังมีราคาเพิ่มสูงขึ้น และพบว่าคุณภาพของกากน้ำตาลที่ได้มีค่าไม่คงที่ ในบางครั้งมีปริมาณน้ำตาลที่สามารถหมักได้ (fermentable sugar) เพียงร้อยละ 33 (กัญญพัชร จินันท์เดช, 2549) ทำให้ปริมาณการผลิตเอทานอลลดลง และต้นทุนการผลิตเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น แนวทางการแก้ไขปัญหาด้านวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลทางหนึ่งคือ สร้างทางเลือกให้กับการใช้วัตถุดิบชนิดอื่นๆ ที่มีศักยภาพ เพื่อรองรับให้มีการผลิตเอทานอลได้อย่างต่อเนื่อง และเพื่อให้เกิดการแข่งขันด้านราคา

นอกเหนือจากกากน้ำตาลจากอ้อย และมันสำปะหลังแล้ว เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัสดุทางการเกษตรอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่างหวาน และพืชอื่นๆ หลายชนิดที่มีแป้งและน้ำตาล เป็นองค์ประกอบ อย่างไรก็ตามในการคัดเลือกวัตถุดิบเพื่อนำมาผลิตเอทานอล ควรเลือกวัตถุดิบที่มีเพียงพอตลอดปี ราคาถูก ผลได้เอทานอลต่อหน่วยวัตถุดิบและต่อพื้นที่เพาะปลูกสูง (ศิริภัทร ศรีนรคตร, 2549) และต้นทุนในการเตรียมวัตถุดิบเริ่มต้นก่อนการหมัก (pretreatment) ต่ำ

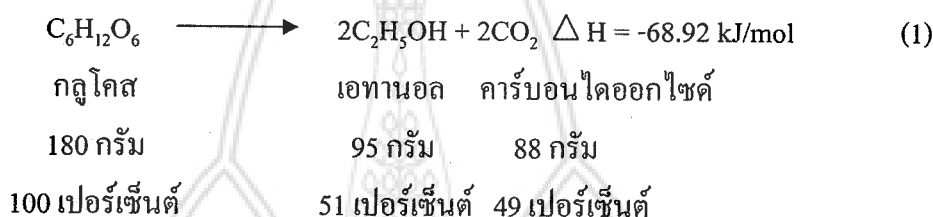
ข้าวฟ่างหวาน (*Sorghum bicolor* L. Moench) เป็นพืชชนิดหนึ่งที่ได้มีการศึกษาและพัฒนาเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล เนื่องจากเป็นพืชที่มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี และคุณภาพของน้ำคั้นจากข้าวฟ่างหวานมีความใกล้เคียงกับน้ำคั้นจากอ้อย ซึ่งสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้โดยตรง ไม่ต้องผ่านกระบวนการบำบัดขั้นต้นหรือ pretreatment นอกจากนี้แล้วข้าวฟ่างหวานยังมีช่วงการเจริญเติบโตและเก็บเกี่ยวผลผลิตสั้นประมาณ 100 – 140 วัน โดยเฉลี่ย 1 ปีสามารถปลูกได้ถึง 3 ครั้ง ในขณะที่อ้อยปลูกได้ปีละ 1 ครั้ง ข้าวฟ่างหวานปลูกได้ง่ายโดยใช้เมล็ดพันธุ์เพียง 1.5 กิโลกรัมต่อไร่ อัตราขยายพันธุ์ 1 ต่อ 1000 ในขณะที่อ้อยมีอัตราการขยายพันธุ์เพียง 1 ต่อ 10 จึงทำให้ต้นทุนของการปลูกข้าวฟ่างหวานต่ำกว่าอ้อยมาก (ประสิทธิ์ ใจศิลป์, 2547) นอกจากนี้แล้วทุกส่วนของข้าวฟ่างหวาน ได้แก่ เมล็ด น้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวาน และขานต้นข้าวฟ่างหวาน สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้แต่ต้องผ่านการ pretreatment ที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาของคณะผู้วิจัย พบว่าน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานสามารถนำมาผลิตเอทานอลแบบกะ โดยได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงถึง 12.7 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) หรือ 100 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.67 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Laopai boon และคณะ, 2007) จึงทำให้ข้าวฟ่างหวานเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพมากเมื่อเทียบกับแหล่งวัตถุดิบชนิดอื่น

ปัจจุบันข้าวฟ่างหวานได้รับการส่งเสริมให้เป็นวัตถุดิบส่งโรงงานเอทานอล เพื่อเตรียมรับมืออ้อย มันสำปะหลัง และกากน้ำตาลที่อาจจะขาดแคลนในอนาคต โดยส่วนประกอบของข้าวฟ่างหวานที่จะนำมาใช้เพื่อป้อนโรงงานผลิตเอทานอลคือส่วนลำต้นที่จะมาคั้นเป็นน้ำ (กรุงเทพธุรกิจ, 2547) โดยในขณะนี้ มีโรงงานผลิตเอทานอล 4 แห่งที่สนใจข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล คือ โรงงานน้ำตาลขอนแก่น ที่อำเภอโนนสะอาด จังหวัดขอนแก่น โรงงานน้ำตาลมิตรผล ที่อำเภอภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ บริษัทไทยอะโกรเอ็นเนอร์ยี จำกัด อำเภอท่าช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี และโรงงานน้ำตาล จังหวัดอุดรธานี โดยสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานที่ส่งเสริมให้ปลูกคือ พันธุ์ มข. 40 ซึ่งให้ผลผลิตเฉลี่ย 5-7 ตันต่อไร่ มีอายุ

การเลี้ยงเชื้อ 90 – 100 วัน (23- 35 วันหลังคอกบาน) ให้น้ำหวานเฉลี่ยต่อไร่ 2,500 – 3,500 ลิตรต่อไร่ (ประสิทธิ์ ใจจิต, 2551)

กระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลของยีสต์เกิดขึ้นได้เนื่องจาก ยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส ในทางทฤษฎีน้ำตาลกลูโคสสามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ประมาณ 51 เปอร์เซ็นต์ (กรัมของเอทานอลที่ผลิตได้ต่อกรัมกลูโคสที่ถูกใช้) และได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อีกประมาณ 49 เปอร์เซ็นต์ (กรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกรัมกลูโคสที่ถูกใช้) ดังสมการ (1) อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติแหล่งคาร์บอนบางส่วนที่ถูกนำไปใช้เพื่อเปลี่ยนเป็นเซลล์และสร้างผลพลอยได้ (by-products) เช่น กลีเซอรอล ซักซิเนต และสารประกอบอื่นๆ ดังนั้นผลได้ของเอทานอลที่เกิดขึ้นจริงจะมีค่าประมาณ 90-95 เปอร์เซ็นต์ของผลได้ทางทฤษฎี (Sobocan และ Glavic, 2000)



การผลิตเอทานอลในปัจจุบันนิยมใช้กระบวนการหมักแบบกะ หรือกึ่งกะ ซึ่งในกระบวนการหมักแต่ละครั้งจำเป็นต้องเตรียมกล้าเชื้อ ขยายกล้าเชื้อใหม่ให้ได้ปริมาณมากทุกครั้ง และปริมาณเอทานอลที่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของถังหมัก ซึ่งทำให้เสียเวลา พลังงานและส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น แนวทางแก้ไขทางหนึ่งคือการใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องซึ่งมีการเตรียมกล้าเชื้อเพียงครั้งเดียวและมีการป้อนสารอาหารเข้าไปในถังหมัก ในขณะเดียวกันก็มีการดึงเอาผลิตภัณฑ์ออกจากถังหมักด้วย ซึ่งวิธีนี้ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ตลอดเวลา การผลิตเอทานอลของยีสต์นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของกระบวนการหมักแล้วยังขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์ยีสต์ สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม และความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักดังสมการข้างบน อย่างไรก็ตามในการผลิตเอทานอลในโรงงานทั่วไปจะใช้วัตถุดิบที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นประมาณ 20 องศาบริกซ์ (นั่นก็จะได้เอทานอลสูงสุดไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์) เพราะความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงเกินไปสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของยีสต์ในการสร้างผลิตภัณฑ์ได้ ในขณะเดียวกันปริมาณเอทานอลที่สูงเกินไปในน้ำหมักอาจเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ได้ ทำให้การผลิตเอทานอลหยุดชะงัก หรือทำให้ไม่ได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงดังทฤษฎี อย่างไรก็ตาม Thomas และคณะ (1996) พบว่าภายใต้สภาวะแวดล้อมและสารอาหารที่เหมาะสม *Saccharomyces cerevisiae* สามารถผลิตและทนต่อเอทานอลได้สูงขึ้น การปรับปรุงกระบวนการผลิตเอทานอลเพื่อให้ยีสต์สามารถทำงานและผลิตเอทานอลได้ในสภาวะที่น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้หรือปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสูงอย่างน้อย 280 กรัมต่อลิตรขึ้นไป ภายใต้สภาวะแวดล้อมและสารอาหารที่เหมาะสมเรียกว่า การหมักแบบ VHG หรือ very high gravity fermentation ซึ่งการหมักแบบ VHG มี

วัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราการผลิต ซึ่งหากสามารถเพิ่มอัตราการผลิตและความเข้มข้นของเอทานอลได้ จะทำให้ลดต้นทุนในการกลั่น และลดต้นทุนพลังงานต่อลิตรของเอทานอล นอกจากนี้ยังลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการหมักได้อีกด้วย (Thomas และคณะ 1996) อย่างไรก็ตามในการหมักแบบ VHG ความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงอาจจะมีผลต่อเมแทบอลิซึมของยีสต์ ซึ่งนำไปสู่การลดลงของความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอล (Reddy และ Reddy, 2006)

Laopaiboon และคณะ (2008) ศึกษาความสามารถหรือศักยภาพของยีสต์ในการเจริญและการผลิตเอทานอลภายใต้การหมักแบบ VHG ของยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูง 3 สายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048, *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* NP 01 พบว่าเมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวสมบูรณ์สูตรผลิตเอทานอลที่มีกลูโคสเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง และมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่า *S. cerevisiae* NP 01 สามารถเจริญและให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดคือ 104.68 กรัมต่อลิตร

งานวิจัยนี้จึงเป็นการพัฒนากระบวนการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NP 01 โดยแบ่งการศึกษาออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยการหมักแบบต่อเนื่องโดยระบบ cascade และส่วนที่สองเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยใช้เทคโนโลยี VHG ซึ่งข้อมูลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในเชิงพาณิชย์ต่อไป

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยคือ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NP 01 เพื่อเป็นทางเลือกให้แก่โรงงานผลิตเอทานอลซึ่งอาจประสบปัญหาการขาดแคลนวัตถุดิบในอนาคตโดยมีวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้

1.2.1 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ cascade ที่ประกอบด้วยถังกวนและ tubular reactor

1.2.2 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยกระบวนการหมักแบบกะภายใต้สภาวะ VHG

1.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 : การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยการหมักแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ cascade จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานด้วย *Saccharomyces cerevisiae* มีขอบเขตการวิจัยดังนี้

- 1) เตรียมวัตถุดิบ (น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน) และวิเคราะห์องค์ประกอบพื้นฐานในวัตถุดิบ
- 2) ศึกษาผลของปริมาณกลีเซอรีนเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่สภาวะที่มีน้ำตาลปกติและสภาวะ VHG โดยการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 2 ลิตร
- 3) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนเสริมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่สภาวะที่มีน้ำตาลปกติและสภาวะ VHG โดยกระบวนการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 2 ลิตร
- 4) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในถังหมักขนาด 5 ลิตร
- 5) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ cascade และแบบถังกวน (continuous stirred tank bioreactor, CSTR)

6) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลระหว่างการหมักแบบกะและแบบต่อเนื่อง

ส่วนที่ 2 : การพัฒนาระบบการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้เทคโนโลยี VHG มีขอบเขตการวิจัยดังนี้

- 1) ศึกษาผลของยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์ (yeast extract) และเปปโตนต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะ VHG ในถังหมักขนาด 5 ลิตร
- 2) ศึกษาผลของกากเซลล์ยีสต์แห้งของโรงงานเบียร์ (dried spent brewer's yeast) ต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะ VHG ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3) ศึกษาผลของปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เริ่มต้นต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน ภายใต้สภาวะ VHG ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

4) ศึกษาผลของการขยายขนาดการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะ VHG

5) คำนวณต้นทุนโดยประมาณในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเปรียบเทียบกับ การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชนิดอื่นที่ใช้ในการผลิต

1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป

วิธีดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1.4.1 วิธีดำเนินการวิจัยส่วนที่ 1 : การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยการหมักแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ cascade จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานด้วย *Saccharomyces cerevisiae*

1) เตรียมวัตถุดิบจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล และหาองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน

2) หาอัตราการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* ในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 240 และ 280 กรัมต่อลิตร โดยกระบวนการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการแปรผันจำนวนกล้าเชื้อเริ่มต้น

3) หาการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* ในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อที่มีการเติมและไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลเฟต) และมีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 240 และ 280 กรัมต่อลิตร โดยกระบวนการหมักแบบกะ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

4) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเลือกใช้สภาวะที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุด (จากข้อ 2 และ 3)

5) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ cascade ที่ประกอบด้วยถังกวนและ tubular reactor และในระบบ CSTR โดยให้มีปริมาตรทำงานทั้งหมดของแต่ละระบบเท่ากับในการหมักเอทานอลแบบกะ

6) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในแง่ของความเข้มข้น ผลได้ และ อัตราผลผลิตของเอทานอล ในการหมักแบบกะและแบบต่อเนื่อง

1.4.2 วิธีดำเนินการวิจัยส่วนที่ 2: การพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้เทคโนโลยี VHG

- 1) หอจักษ์ประกอบที่สำคัญในยีสต์เอ็กซ์แทร็ก เปปโตน และกากเซลล์ยีสต์แห้ง
- 2) หมักเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณน้ำตาล 280 กรัมต่อลิตร โดยใช้ยีสต์เอ็กซ์แทร็กและเปปโตนเป็นแหล่งอาหารเสริม โดยหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร
- 2) หมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณน้ำตาล 280 กรัมต่อลิตร โดยใช้ กากเซลล์ยีสต์แห้ง (dried spent yeast) เป็นแหล่งอาหารเสริม โดยหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร
- 3) หมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณน้ำตาล 280 กรัมต่อลิตร โดยแปรผันปริมาณยีสต์เริ่มต้น โดยหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร
- 4) การหมักเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในถังหมักขนาด 50 ลิตร ภายใต้การหมักแบบ VHG
- 5) กำหนดต้นทุนโดยประมาณในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเปรียบเทียบกับการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชนิดอื่นที่ใช้ในการผลิต
- 6) รวบรวมข้อมูล และสรุปผลการศึกษา

1.5 ทฤษฎีและ/หรือแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

กระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวภาพเป็นกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการใช้คาร์โบไฮเดรตในการเจริญ แล้วให้เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ กระบวนการหมักเอทานอลทางทฤษฎี เมื่อน้ำตาลถูกใช้โดยยีสต์ น้ำตาลจะถูกนำเข้าสู่เซลล์แล้วถูกย่อยสลายโดยวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) หรือผ่านวิถี Embden - Meyerhof - Parnas (EMP) โดยไม่มีการใช้ออกซิเจนในปฏิกิริยา ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไพรูวิก 2 โมเลกุล ซึ่งกรดไพรูวิกนี้ในสิ่งมีชีวิตจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในหลายเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดสามารถจะเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นเอทานอลได้ ซึ่งต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์และควบคุมสภาวะให้เหมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการทางทฤษฎีกลูโคสสามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ 51 เปอร์เซ็นต์ (กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคสที่ใช้) และได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 49 เปอร์เซ็นต์ (กรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกรัมกลูโคสที่ใช้)

งานวิจัยนี้ต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยมีกรอบแนวคิดดังนี้ การผลิตเอทานอลในปัจจุบันนิยมใช้กระบวนการหมักแบบกะ หรือกึ่งกะ ซึ่งมีข้อจำกัดคือในกระบวนการหมักแต่ละครั้งจำเป็นต้องเตรียมกล้าเชื้อ ขยายกล้าเชื้อใหม่ให้ได้ปริมาณมาก ทุกครั้งก่อนที่จะทำการหมัก ซึ่งทำให้เสียเวลา พลังงานและส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น แนวทางแก้ไขทางหนึ่งคือการใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องซึ่งมีการเตรียมกล้าเชื้อเพียงครั้งเดียวและมีการป้อนสารอาหารเข้าไปในถังหมัก ในขณะเดียวกันก็มีการดึงเอาผลิตภัณฑ์ออกจากถังหมักด้วย ซึ่งวิธี

นี้จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ตลอดเวลา การป้อนอาหารเข้าสู่ถังหมักขึ้นอยู่กับปัจจัยหลัก คือ การเจริญของจุลินทรีย์ในถังหมักและอาหารที่ป้อนเข้าสู่ถังหมัก อย่างไรก็ตามการหมักเอทานอลโดยทั่วไปจะใช้ระบบถังกวน (continuous stirred tank bioreactor) หรือเรียกว่าระบบ CSTR ซึ่งมีข้อเสียคือ หากใช้น้ำตาลเริ่มต้นสูงอาจเกิดการยับยั้งเนื่องจากสารอาหาร (substrate inhibition) ได้ ทำให้จุลินทรีย์ใช้น้ำตาลได้น้อยลง ส่งผลให้ผลิตผลิตภัณฑ์ได้ลดลง แนวทางแก้ไขคือไม่ให้จุลินทรีย์สัมผัสกับน้ำหมัก (ที่มีน้ำตาลเริ่มต้นสูง) โดยตรง โดยใช้ระบบ cascade ที่ประกอบด้วย ถังกวน และ tubular bioreactors ต่ออนุกรมกัน เนื่องจากระบบนี้การหมักแบ่งออกเป็นช่วงๆ ทำให้จุลินทรีย์ไม่ได้สัมผัสกับน้ำหมักที่มีน้ำตาลสูงทั้งหมด สัมผัสโดยตรงเฉพาะส่วนถึงหมัก ส่วนน้ำหมักที่เข้า tubular bioreactor จะมีความเข้มข้นของน้ำตาลลดลง น่าจะทำให้จุลินทรีย์ใช้น้ำตาลได้ดีขึ้น และผลิตผลิตภัณฑ์ได้เพิ่มขึ้น

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิด ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *S. fragilis*, *S. urarium*, *Kluyveromyces fragilis*, *Nematospora* sp., *Shizosaccharomyces* sp. และ *Zymomonas mobilis* เป็นต้น อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปในทางอุตสาหกรรม *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล อย่างไรก็ตามความสามารถในการผลิตเอทานอลขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สายพันธุ์จุลินทรีย์ ชนิดของวัตถุดิบ สารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการสร้างเอทานอล และสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยง เป็นต้น นอกจากนี้ ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นด้วย นั่นคือ หากเริ่มต้นที่น้ำตาล 20 องศาบริกซ์ หรือประมาณ 200 กรัมต่อลิตร จะได้เอทานอลสูงสุดประมาณไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เป็นต้น ดังนั้นหากต้องการให้ได้เอทานอลในความเข้มข้นสูง จะต้องใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงด้วย อย่างไรก็ตาม การมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่สูงเกินไปในน้ำหมัก อาจส่งผลเสียต่อกระบวนการหมัก คือ อาจเกิด substrate inhibition หรือ catabolic repression คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงเกินไปจะไปยับยั้งการเปลี่ยนแปลง หรือการทำงานของเอนไซม์ของยีสต์ในการสร้างผลิตภัณฑ์ ในขณะที่เดียวกันปริมาณเอทานอลที่สูงเกินไปในน้ำหมักอาจเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ได้ ทำให้การผลิตเอทานอลหยุดชะงัก หรือทำให้ไม่ได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงดังทฤษฎี อย่างไรก็ตาม Thomas และคณะ (1996) พบว่าภายใต้สภาวะแวดล้อมและสารอาหารที่เหมาะสม *Saccharomyces cerevisiae* สามารถผลิตและทนต่อเอทานอลได้สูงขึ้น การหมักในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูง หรือการใช้เทคโนโลยีการหมักแบบ VHGF หรือ very high gravity fermentation เป็นวิธีหนึ่งในการปรับปรุงกระบวนการผลิตเอทานอล โดย VHGF technology เป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการเตรียม และการหมักน้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 280 กรัมต่อลิตรขึ้นไป (Thomas และคณะ 1993) ภายใต้สภาวะแวดล้อมและสารอาหารที่เหมาะสม ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลและอัตราการผลิต ซึ่งหากสามารถเพิ่มอัตราการผลิตและความเข้มข้นของเอทานอลได้ จะทำให้ลดต้นทุนในการกลั่น และลดต้นทุนพลังงานต่อลิตรของเอทานอล และนอกจากนี้ ยังลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการหมักได้อีกด้วย (Mullins, 1985; Thomas และคณะ 1996) อย่างไรก็ตามในการหมักแบบ VHGF ความเข้มข้นของ

สารตั้งต้นหรือปริมาณน้ำตาลที่สูง และความเข้มข้นของเอทานอลที่เกิดขึ้นอาจจะมีผลต่อเมแทบอลิซึมของยีสต์ ซึ่งนำไปสู่การลดลงของอัตราการผลิตและความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอล (Thomas และ Ingledew, 1990; Reddy และ Reddy, 2006)

จากข้อได้เปรียบของน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานและทฤษฎีที่ได้กล่าวไปแล้ว งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายหลักที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยการหมักแบบต่อเนื่องโดยระบบ cascade และการหมักภายใต้สภาวะ VHG โดยพยายามทำให้เกิดการหมักเอทานอลอย่างสมบูรณ์ โดยใช้ *S. cerevisiae* NP 01 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้สูงภายใต้สภาวะ VHG (Laopaiboon และคณะ, 2008)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ภายใต้การหมักสภาวะที่มีน้ำตาลปกติ และสภาวะที่มีน้ำตาลสูง (VHG) ในแง่ของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ และการเติมแหล่งไนโตรเจนเสริมในน้ำหมัก

1.6.2 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องโดยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ cascade

1.6.3 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะ VHG โดยใช้แหล่งอาหารเสริมที่มีราคาถูกลงคือ กากเชลล์ยีสต์แห้ง

1.6.4 ทราบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะ VHG ในถังหมักขนาด 50 ลิตร ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ดีต่อโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเอทานอล และโรงงานที่เกี่ยวข้องที่จะใช้เป็นแนวทางในการตัดสินใจลงทุนในระดับอุตสาหกรรม ในการเลือกใช้ข้าวฟ่างหวานเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล เนื่องจากการศึกษาโดยทั่วไปส่วนใหญ่ศึกษาในถังหมักขนาดเล็กประมาณ 2 – 5 ลิตร เท่านั้น

1.6.5 องค์ความรู้และความเข้าใจที่ได้จากโครงการนี้สามารถนำไปใช้ในการเรียนการสอนและงานวิจัยด้านเทคโนโลยีการหมักในสถาบันอุดมศึกษา ทั้งระดับปริญญาตรี โท และเอก

1.6.6 องค์ความรู้ที่ได้จากโครงการนี้ สามารถใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตการผลิตเอทานอลให้แก่ภาคธุรกิจที่ประกอบธุรกิจเกี่ยวกับการผลิตเอทานอล โดยเฉพาะการใช้ข้าวฟ่างหวานเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ซึ่งนับว่าเป็นการประยุกต์ใช้วัสดุทางการเกษตรทางเลือกใหม่ที่มีศักยภาพสูง และในขณะเดียวกันเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มแก่วัสดุทางการเกษตรดังกล่าว และเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน หรือวัสดุทางการเกษตรอื่นๆ ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป