บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล

2.1.1 คุณสมบัติทั่วไปของเอทานอล

เอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งซึ่งในสภาวะปกติจะอยู่ในสภาวะของเหลวใส ระเหยง่ายมีรสขมและมีกลิ่นเฉพาะตัว ติดไฟและให้เปลวไฟที่มีความร้อนประมาณ 7,100 แคลอรี่ต่อกรัม ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ มีจุดเดือดที่ความดันบรรยากาศ 78 องศาเซลเซียส และมีจุดเยือกแข็งที่ -117.3 องศาเซลเซียส มีค่าความถ่วงจำเพาะ 0.794 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาฟาเรนไฮต์ (ฐิติมา, 2542)

อุตสาหกรรมผลิตเอทานอล โดยทั่วไปผลิตออกมาจำหน่าย สามารถแบ่งเป็น 4 ประเภท หรือ 4 เกรดดังนี้ (วิรัช, 2529)

1) Industrial alcohol (96.5 °GI) ใช้ในอุตสาหกรรม โดยใช้เป็นตัวทำละลายเชื้อเพลิง และใช้ในการเตรียมสารอื่น ๆ

2) Denatured spirit (88 °GI) ใช้สำหรับให้ความร้อนและแสงสว่าง

3) Fine alcohol (96.0-96.5 °GI) ใช้ในทางการแพทย์และการผลิตเครื่องสำอาง

4) Absolute หรือ Anhydrous alcohol (99.7-99.8 °GI) ใช้สำหรับเป็นเชื้อเพลิง สำหรับการเผาไหม้เครื่องยนต์

หมายเหตุ °GI หมายถึง The degree Gay – Lussac ซึ่งสามารถวัดโดยเครื่อง hydrometer โดยอ่านเป็นร้อยละ (%) โดยปริมาตร (v/v) ของเอทานอลในของผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ

2.1.2 ประโยชน์ของเอทานอล (ฐิติมา, 2542)

เอทานอลมีคุณสมบัติที่สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้เช่นเดียวกับน้ำมันเบนซินและดีเซล เนื่องจากสามารถจุดติดไฟได้ และให้ความร้อนเมื่อถูกเผาไหม้ นอกจากนี้เอทานอลยังมีส่วนผสมของออกซิเจน จึงมีคุณสมบัติที่ใช้เป็นสารเติมออกซิเจนและเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเชื้อเพลิงได้อีกด้วย สำหรับส่วนที่เหลือจากการเผาไหม้เมื่อออกสู่บรรยากาศจะมีปริมาณออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น มลพิษพวกไฮโดรคาร์บอน คาร์บอนมอนอกไซด์ ปริมาณฝุ่น และควันดำจะลดลง จึงจัดเป็นเชื้อเพลิงสะอาดอย่างหนึ่ง เอทานอลสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้หลายรูปแบบ ได้แก่

1) การนำเอทานอล 95% เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง ทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล (ชูชาติ, 2546)
2) การนำเอทานอลบริสุทธิ์ 99.5% ผสมในน้ำมันเบนซิน ที่เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (gasohol) การใช้เอทานอลเป็นสารเคมีเพิ่มออกเทนแก่เครื่องยนต์ โดยการเปลี่ยนรูปเอทานอล

3) เป็นสาร ETBE (Ethyl Tertiary Butyl Ether) สามารถใช้ทดแทนสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) ที่เป็นสารเติมแต่งในน้ำมันเบนซินที่หลายประเทศประกาศห้ามใช้ เพราะก่อให้เกิดมลพิษในอากาศที่สูงกว่าสารเติมแต่งอื่นๆ (ชูชาติ, 2546)

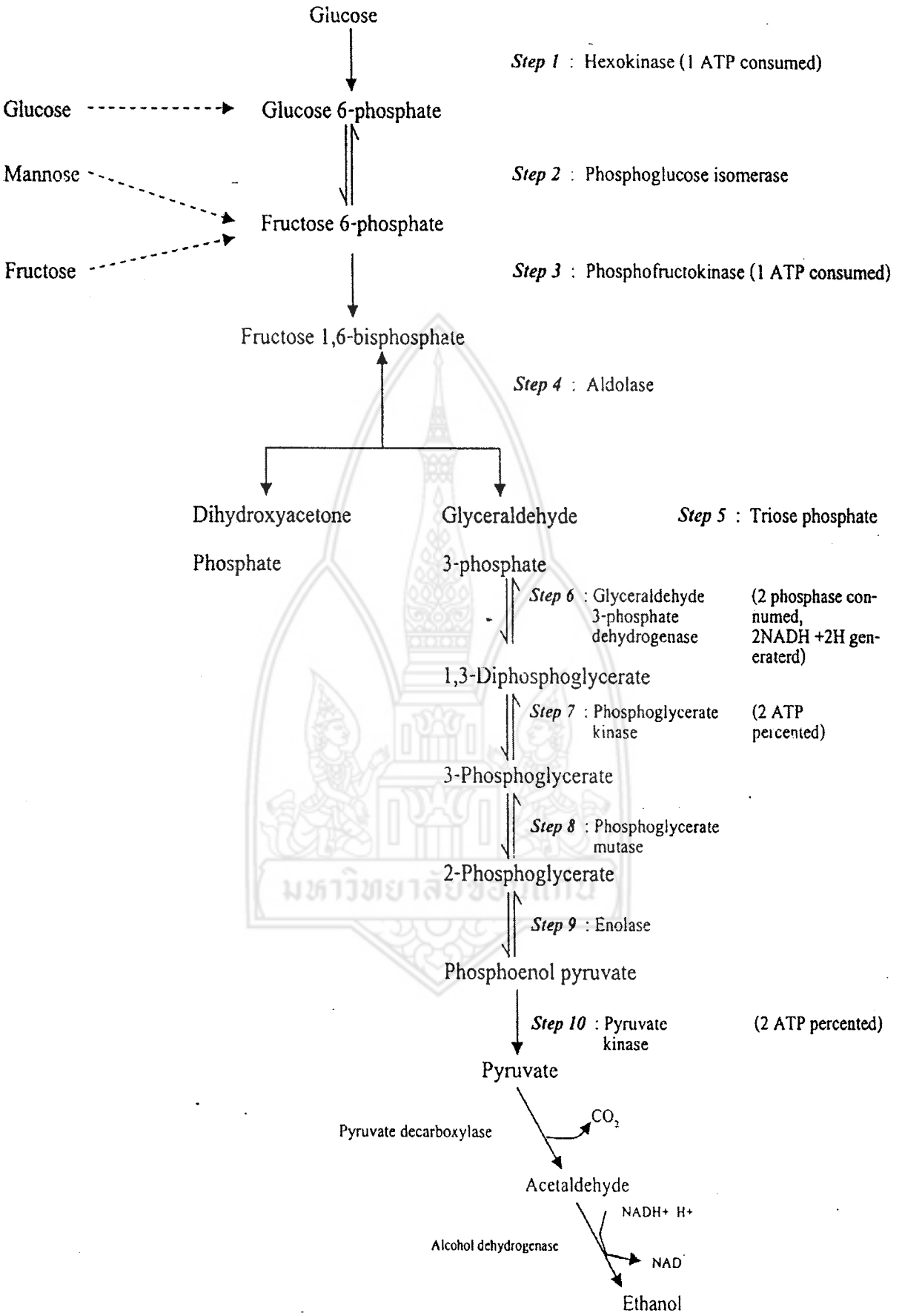
นอกจากนี้แล้วเอทานอลยังสามารถใช้ในงานอื่น ๆ ได้แก่ เป็นตัวทำละลายทางเคมี เป็นตัวทำละลายยาและเป็นสารเสริมช่วยออกฤทธิ์ในยา เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาเคมี ใช้ฆ่าเชื้อทำความสะอาดแผลสด และใช้เป็นสารทำความสะอาด

2.1.3 การผลิตเอทานอลทางชีวภาพ

กระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวภาพเป็นกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการใช้คาร์โบไฮเดรตในการเจริญ แล้วให้เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ จุดประสงค์ประการหนึ่งของการผลิตเอทานอลทางชีวภาพ คือ ต้องการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (ที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบสูง) กลับมาใช้ให้ก่อประโยชน์ทางเศรษฐกิจ โดยในทางทฤษฎี จากกระบวนการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ เมื่อน้ำตาลถูกใช้โดยยีสต์ น้ำตาลจะถูกนำเข้าสู่เซลล์แล้วถูกย่อยสลายโดยวิถีไกลโคไลซีส (glycolysis pathway) หรือผ่านวิถี Embden - Meyerhof – Parnas (EMP) โดยไม่มีการใช้อากาศในปฏิกิริยา ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไพรูวิก 2 โมเลกุล ซึ่งกรดไพรูวิกนี้ในสิ่งมีชีวิตจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในหลายเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดสามารถจะเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นเอทานอลได้ ซึ่งต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์และควบคุมสภาวะให้เหมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ ทางทฤษฎีกลูโคสสามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ ร้อยละ 51 (กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคสที่ใช้) และได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 49 (กรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกรัมกลูโคสที่ใช้) ดังสมการต่อไปนี้

$$C_6H_{12}O_6\,(aq) \longrightarrow 2C_2H_5OH\,(l) + 2CO_2\,(g)$$

glucose	ethanol	carbondioxide
180 g	92 g	88 g
100 %	51 %	49 %



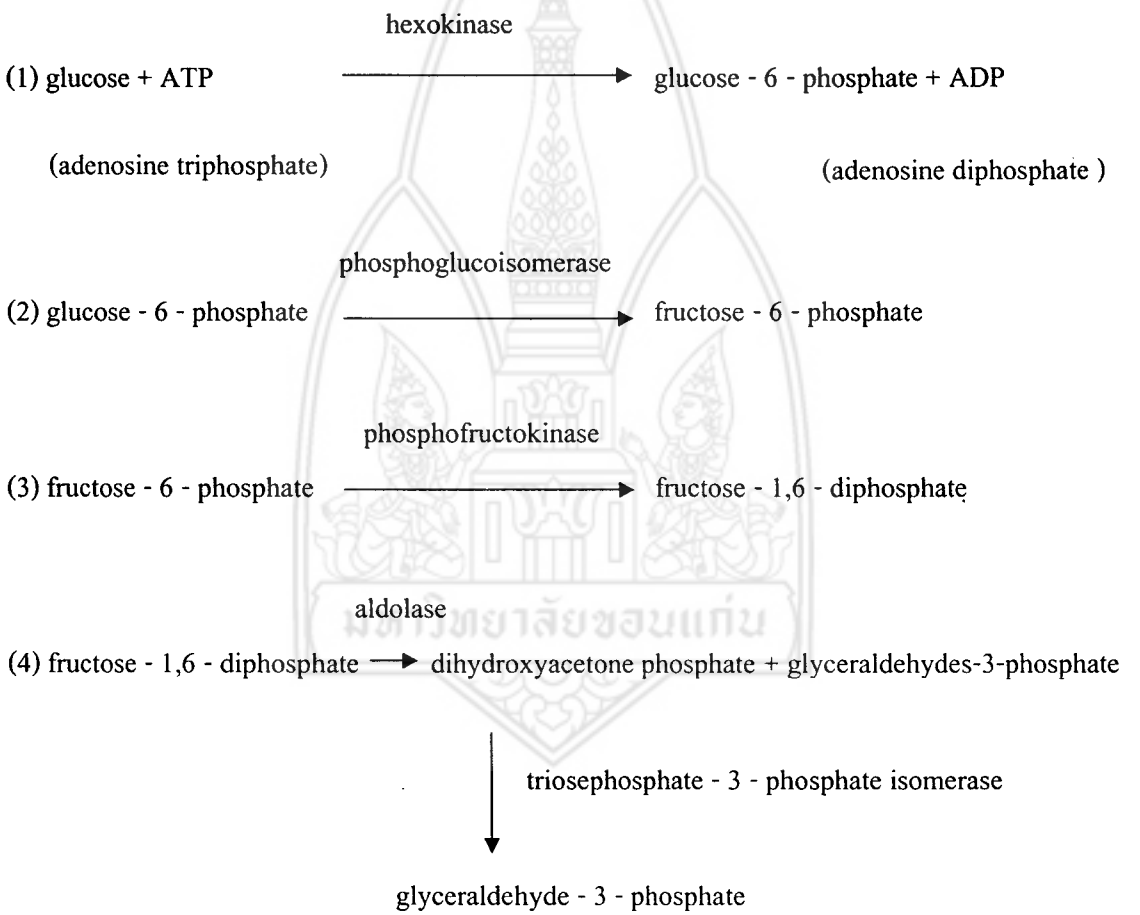
รูปที่ 2.1 การสลายน้ำตาลกลูโคสโดยวิถีไกลโคไลซิสโดยน้ำตาลกลูโคสเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกจากนั้นกรดไพรูวิกเปลี่ยนเป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Walker, 1997)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisae, S. fragillis, S. urarium, Kluyveromyces fragillis, Nematospora sp., Shizosaccharomyces sp.* และ *Zymomonas mobllis* เป็นต้น

2.1.3.1 กลไกลการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลภายในเซลล์จุลินทรีย์

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

ในสภาวะที่ไม่ใช้อากาศและระบบมีความเป็นกลางหรือกรดเล็กน้อย โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน กลูโคสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไพรูวิก โดยมีขั้นตอนการเปลี่ยนแปลง เป็นลำดับดังนี้ (วิลาวัณย์, 2539)



glyceraldehydes - 3 - phosphate

dehydrogenase

(5) glyceraldehydes - 3 - phosphate + NAD^+ + Pi ⟶ 1,3 - diphosphoglycerate + NADH + H^+

phosphoglycerate kinase

(6) 1,3 - diphosphoglycerate + ADP ⟶ 3 - phosphoglycerate + ATP

phosphoglyceromutase

(7) 3 - phosphoglycerate ⟶ 2 - phosphoglycerate

enolase

(8) 2 - phosphoglycerate ⟶ phosphoenol pyruvate

pyruvate kinase

(9) phosphoenol pyruvate + ADP ⟶ pyruvate + ATP

2) วิธีการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นเอทานอล

หลังจากที่กลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซิสแล้ว ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะได้กรดไพรูวิก 2 โมเลกุล จากนั้นกรดไพรูวิกจะถูกเปลี่ยนเป็นสารต่าง ๆ แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับกลไกการใช้กรดนี้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และสภาวะในการดำรงชีวิตขณะนั้น เช่น จุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติค จะเปลี่ยนกรดไพรูวิกไปเป็นกรดแลคติคในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศกรดนี้จะเข้าสู่กระบวนการผลิตเซลล์หรือสร้างผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น หรือถ้าเป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้อากาศจะเปลี่ยนกรดไพรูวิกไปเป็นอะซิติลโคเอก่อนเข้าสู่วัฏจักรเครบ และเข้าสู่กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ให้พลังงาน 32 ATP ปริมาณพลังงานจะมากเท่าใดขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่มีการสลายพลังงาน หรือขึ้นอยู่กลไกของสิ่งมีชีวิตนั้นในการสลายสารให้พลังงาน จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นเอทานอล กลไกการเปลี่ยนกรดไพรูวิกของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ มีขั้นตอนดังนี้

Pyruvate decarboxylase

(1) pyruvic acid ⟶ acetaldehyde + CO_2

alcohol dehydrogenase

(2) acetaldehyde + NADH + H^+ ⟶ ethanol + NAD^+

กรดไพรูวิกที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล ทำให้ปริมาณเอทานอลสูงขึ้น อย่างไรก็ตามในจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลได้ จะมีกระบวนการใช้สารต่างๆ แตกต่างกันออกไป ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆด้วย หรือจุลินทรีย์นั้นอาจสามารถใช้เอทานอลนั้นในการเจริญต่อไปได้อีก ทำให้ปริมาณเอทานอลลดลงเมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์หลังการหมักที่ตรวจพบ เมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Sacchromyces cerevisiae* ใช้น้ำตาลเฮกโซสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ เอทานอลร้อยละ 48.4 คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 46.5 อะซิตาลดีไฮด์ร้อยละ 0.0 - 0.3 กรดอะซิติกร้อยละ 0.05 - 0.25 กลีเซอรอลร้อยละ 2.5 - 3.6 กรดแลคติคร้อยละ 0.0 - 0.2 กรดซัคซินิคร้อยละ 0.5 - 0.77 และ Fuel oil ร้อยละ 0.025 - 0.5 เป็นต้น (ณัฐศิษฏ์ และคณะ, 2530)

2.2 ยีสต์

2.2.1 ลักษณะทั่วไปและโครงสร้างของยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต ยีสต์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมหรือรี นอกจากนี้อาจมีรูปร่างเป็นรูปถั่ว เลมอน ทรงกระบอก สามเหลี่ยม หรือยาวเป็นสาย ขนาดของยีสต์แตกต่างกันในแต่ละชนิด ลักษณะเด่นของยีสต์คือ เป็นเซลล์เดียวและมีหน่อ การแตกหน่อบางครั้งไม่หลุดออกจากกัน แต่เกาะกันเป็นกลุ่ม บางครั้งมีการเปลี่ยนแปลงโดยเซลล์ตรงกลางยาวต่อกันเป็นสาย เรียกซูโดไมซีเลียม (pseudomycelium) โครงสร้างทั่วไปของยีสต์คือ ผนังเซลล์หนาประมาณ 25 นาโนเมตร หนัก 25 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งเซลล์โดยพบโปรตีนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ โดยอาจอยู่ในรูปเอนไซม์ที่ติดผนังเซลล์ เซลล์เมมเบรนของยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกลิปิดและโปรตีน คาร์โบไฮเดรตมีปริมาณเล็กน้อย มีนิวเคลียสเห็นได้ชัดเจนเมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทรัส โดยนิวเคลียสของยีสต์มักอยู่ระหว่าง แวคิวโอลและหน่อ ไมโทคอนเดรียมีรูปร่างกลมหรือรูปท่อน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.3 – 1 ไมโครเมตร ยาว 3 ไมโครเมตร ในยีสต์ที่โตเต็มวัย ภายในเซลล์จะเห็นแวคิวโอลขนาดใหญ่ หน้าที่ของแวคิวโอลยังไม่แน่ชัดแต่พบว่าในแวคิวโอลมีไฮโดรไลติกเอนไซม์ พอลิฟอสเฟต ลิปิด สารตัวกลางที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และโลหะไอออน จึงเชื่อว่าอาจทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บสะสมอาหาร และไฮไลติกเอนไซม์ ส่วนโครงสร้างอื่น ๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ ไรโบโซมชนิด 80s ร่างแหเอนโดพลาสซึม กอลจิบอดี และเม็ดไขมัน

2.2.2 ปัจจัยที่สำคัญต่อยีสต์ในการหมักเอทานอล (วราวุฒิ, 2529)

ปัจจัยที่สำคัญเกี่ยวกับการเจริญของยีสต์ คือธาตุอาหาร เกลือแร่ วิตามิน อุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาล และสารบางอย่างที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ ซึ่งจะมีผลต่อการหมักเอทานอล

2.2.2.1 ผลของธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามินต่อการหมัก

เมื่อพิจารณาถึงผลของธาตุอาหารแต่ละชนิดต่อการเจริญของยีสต์สามารถแยกออกเป็นกลุ่มได้ดังนี้

2.2.2.1.1 ไนโตรเจน ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10 เปอร์เซนต์

ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็น โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้ ammonium ions เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่ในยีสต์บางชนิดต้องการกรดอะมิโนที่จำเพาะเท่านั้น เพราะกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นตัวควบคุมการทำงานของ glycolysis pathway อย่างไรก็ตาม ในตัวยีสต์ประกอบด้วย purine, pyrimidines และกรดอะมิโน ดังนั้นจึงน่าจะใช้ตัวยีสต์เองเป็นแหล่ง amino-nitrogen เช่น ในการนำน้ำกากส่าหรือ Stillage กลับมาใช้ละลายกากน้ำตาล (ประมาณ 10-30 เปอร์เซนต์) เราเรียกขบวนการนี้ว่า "Stopping back" ซึ่งนอกจากจะได้ธาตุอาหารแล้ว ยังช่วยเพิ่ม buffering capacity และลดปริมาณน้ำที่ต้องการใช้รวมทั้งเป็นการกำจัดน้ำกากส่าทิ้งไปในตัวด้วย หรือโดยการนำเอาเซลล์ยีสต์ที่ถูกย่อยสลาย (lysed yeast cell) กลับมาใช้ใหม่ (recycle)

แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์คือ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

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

2.2.2.1.3 ซัลเฟอร์ ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบประมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง โดยอยู่ในรูปของเมไธโอนีน (methionine, amino acid) แต่เนื่องจากเมไธโอนีนมีราคาแพงมาก ดังนั้นในอุตสาหกรรมจึงใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแทน (เกลือ inorganic sulphate จะถูกเปลี่ยนเป็น methionine ภายในเซลล์ของยีสต์ แต่ต้องอาศัยพลังงาน 2 moles ATP/mole SO_4^{2-} reduced)

2.2.2.1.4 แร่ธาตุต่าง ๆ แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการหมักของยีสต์แบ่งออกได้เป็น 3 พวกได้แก่

1) macroelements ได้แก่ K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn, Cl ยีสต์ต้องการ 0.1-1 mM และแร่ธาตุพวกนี้เข้าไปในเซลล์ยีสต์โดยอาศัย facilitated diffusion

2) microelements ได้แก่ Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni, Va, ยีสต์ต้องการใช้ในระดับ 0.1-100 μM

3) inhibitors ได้แก่ Ag, As, Bd, Hg, Li, Ni, Os, Pd, Se, Te ถ้ามีในระดับความเข้มข้นสูงกว่า 10-100 μM จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการหมักโดยยีสต์

ในบางครั้งถ้ามี microelements และ macroelements ในปริมาณมากจะมีผลไปยับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์ได้เช่นกัน

2.2.2.1.5 วิตามิน เป็นตัวควบคุมเมตาบอลิซึมของยีสต์ โดยจะควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพราะวิตามินเป็นโคเอนไซม์ (co-enzymes) หรือสารเริ่มต้น (precursors) ที่ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้เต็มที่ วิตามินที่ยีสต์ต้องการส่วนใหญ่เป็นไบโอติน และแพนโอธีนิคแอซิด

นอกจากนี้ความต้องการวิตามินชนิดอื่น ๆ เช่น ไธอามีน (B1) ไพริด็อกซิน (B6) ไนอาซีน โฟลิกแอซิด (folic acid) และ p-amino benzoic acid ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ บางสายพันธุ์ถ้า

มีไธอามีน แต่ขาดไพริด๊อกซินจะทำให้การเจริญลดลง ในขณะที่บางสายพันธุ์เจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีไธอามีนและไพริด๊อกซินเท่านั้น สำหรับในตารางที่ 2.1 แสดงวิตามินชนิดต่าง ๆ ในรูปที่เหมาะสมในการทำงาน หน้าที่ของวิตามินในเมตาบอลิซึม และความเข้มข้นที่ต้องการในกระบวนการหมัก

2.2.2.1.6 ปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งเสริมการเจริญ (Growth promoting factors) ได้แก่ กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิค กรดไขมันและสเตอรอยด์ (steroid) สารเหล่านี้ถูกใช้ไปในกระบวนการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณเอทานอล (ethanol yield) ในบางกรณีความต้องการ growth factor ของยีสต์ขึ้นกับสภาพแวดล้อม เช่น ในกรณีที่ยีสต์เจริญในสภาพไร้อากาศ จะต้องการ ergosterol และกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว และในกรณีของ thermophilic yeast ต้องการ choline, carnitine หรือ leucine

Growth factor ที่สำคัญสำหรับยีสต์หลายชนิดได้แก่ inosital ในรูปของ phosphatidyl inosital ทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสภาพของเมมเบรนของยีสต์ ซึ่งจะมีผลต่อการควบคุมอัตราการหมัก (rate of fermentation)

2.2.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการหมัก

อุณหภูมินับว่ามีความสำคัญมาก ระดับที่ยีสต์หมักแอลกอฮอล์ได้ดีสำหรับยีสต์ที่ใช้กันอยู่ตามโรงงานทั่วไปนั้นอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส และจะทนไปได้ถึง 37 องศาเซลเซียส ถ้าสูงขึ้นไปถึง 40 องศาเซลเซียสส่วนใหญ่การเจริญจะหยุดชะงักแม้ว่าการหมักจะดำเนินไปถ้ามีปริมาณยีสต์มากพอแล้ว ดังนั้นในช่วงหลังจากผ่าส่าไปแล้ว 1-10 ชั่วโมง ควรจะต้องควบคุมอุณหภูมิให้ไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส หลังจาก 10 ชั่วโมงไปแล้ว ควบคุมไม่ให้เกิน 37 องศาเซลเซียส การหมักก็จะดำเนินไปด้วยดี ถ้าอุณหภูมิในช่วง 10 ชั่วโมงแรกสูงกว่า 37 องศาเซลเซียสแล้วอาจจะเกิดปัญหาแบคทีเรียเจริญขึ้นมามากเกินไปและจะเป็นผลให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ การควบคุมอุณหภูมิจึงนับว่าจำเป็นและเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลผลิตที่จะได้ สำหรับการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์สูง ๆ 15-20 เปอร์เซนต์ และให้ได้กลิ่นรสดี เช่น การหมักไวน์และสาเกจะหมักไม่เกิน 15 องศาเซลเซียส การหมักที่อุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดแอลกอฮอล์หนัก (fusel oil) มากขึ้นซึ่งจะไปมีผลต่ออาการมึนและปวดหัวของผู้บริโภค การลดอุณหภูมิของถังหมักเป็นค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้น แต่ก็คงจะคุ้มถ้าสามารถหมักแอลกอฮอล์ได้ในระดับ 9-10 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24-36 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.1 ผลของวิตามินต่อเมตาบอลิซึมของยีสต์ (วราวุฒิ, 2529)

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

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สาเหตุที่อุณหภูมิในระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากกิจกรรมของยีสต์ กล่าวคือ ในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาลกลูโคสจะเกิดความร้อน 149.5 แคลลอรี่ต่อกรัมซูโครส ในกรณีน้ำตาลกลูโคสจะ

เกิดพลังงานความร้อนจากการหมัก 140.2 แคลลอรี่ต่อกรัมกลูโคส ความร้อนที่เกิดขึ้นเป็นพวก exothermic energy ดังนั้นจึงถ่ายเทลงสู่น้ำหมักทำให้น้ำหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้น

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์ โดยปกติอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส แต่ในช่วงสภาพที่มีแอลกอฮอล์หรือเอทานอลผลิตออกมาแล้วจะมีผลทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเปลี่ยนไป ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณเอทานอลเป็นสำคัญรวมถึงสายพันธุ์ของยีสต์ด้วยดังนี้คือ

1) ในกรณีที่มีเอทานอล 4.6 เปอร์เซนต์ จะทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักของ *S. cerevisiae* ลดลงจาก 38 องศาเซลเซียสเป็น 32 องศาเซลเซียส

2) ใน *S. cerevisiae* สายพันธุ์หนึ่งถ้ามีเอทานอล 3.8 เปอร์เซนต์ จะทำให้การหมักหยุดที่ 36 องศาเซลเซียส และถ้ามีเอทานอลสูงขึ้นเป็น 7.5, 8.3 และ 9.5 เปอร์เซนต์ จะทำให้ยีสต์หยุดหมักที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส, 18 องศาเซลเซียส และ 9 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3) ใน rapid batch fermentation ที่ได้เอทานอล 9.5 เปอร์เซนต์ จะทำให้ยีสต์มีอัตราในการรอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิสูงกว่า 20-25 องศาเซลเซียส

4) ในกรณีของ "Sake" Yeast (hightly ethanol tolerant) ที่ความเข้มข้นของเอทานอลระหว่าง 10 และ 19 เปอร์เซนต์ อัตราการผลิตเอทานอลจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูง

จะเห็นได้ว่าในระหว่างการหมัก การควบคุมอุณหภูมิและปริมาตรเอทานอลในระหว่างการหมักมีความสำคัญมาก

2.2.2.3 ผลของ pH ต่อการหมัก

ยีสต์และราชอบเจริญในสภาพที่เป็นกรดพอสมควร คือในระดับ pH 3.8 - 5.5 ถ้า pH ต่ำกว่า 3.5 การเจริญจะลดลง ถ้า pH ต่ำถึง 3 หรือกว่านั้นจะไม่เจริญ ดังนั้นในการหมักจึงนิยมปรับให้มี pH อยู่ในช่วง 4-4.5 ทั้งนี้นอกจากยีสต์จะเจริญได้ดีที่ระดับ pH ดังกล่าวแล้ว ยังช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ด้วย เพราะแบคทีเรียทั่วไปชอบเจริญในสภาพที่ pH เป็นกลาง แต่มีแบคทีเรียบางชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก เจริญได้ดีในระดับ pH ที่ยีสต์เจริญและมักจะสร้างปัญหา เมื่อแบคทีเรียพวกนี้สร้างกรดขึ้นมามากเกินไปจนยีสต์ทนไม่ได้ ปกติจะใช้กรดซัลฟูริกแบบราคาถูกมาใช้ในการปรับ pH การปรับ pH จะช่วยลดระยะเวลาการต้มให้ความร้อนแก่ถังหมักเพื่อการฆ่าเชื้อเพราะความร้อนที่อุณหภูมิเท่ากันจะฆ่าแบคทีเรียในอาหารที่มีสภาพเป็นกรดได้มากกว่าสภาพที่เป็นกลางโดยปกติจะต้มฆ่าเชื้อในถังเตรียมฆ่าเชื้อเมื่อปรับ pH ลงมาแล้วให้เป็น 4-4.5 ใช้อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 นาทีก็เพียงพอ

การติดตามวัด ค่า pH ในช่วงการหมักนับว่ามีความจำเป็น บ่อยครั้งปัญหาที่เกิดขึ้นเราสามารถคาดคะเนได้ว่าการหมักผิดปกติโดยการสังเกตอุณหภูมิของถังหมักที่ขึ้นคู่กับการที่ pH ลดลงอย่างรวดเร็วผิดปกติ โดยที่แอลกอฮอล์ไม่เพิ่มขึ้น เมื่อเกิดเหตุการณ์เช่นนั้นขึ้น บางโรงงานแก้ปัญหาด้วยการสูบถ่ายไปปนกับถังอื่นที่หมักได้ดีมีแอลกอฮอล์สูงเกินกว่า 5 เปอร์เซนต์ และเติมกล้ายีสต์เพิ่มควบคู่กันไปอีกทางหนึ่งด้วยก็พอจะแก้ปัญหาดังกล่าวได้

2.2.2.4 ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้น

ยีสต์จะตอบสนองต่อสารอาหารที่ถูกละลายในอาหารซึ่งมีผลต่อการปรับตัวของยีสต์ได้หลายทาง กรณีที่เกี่ยวข้องกับความเครียดเนื่องจากแรงดันออสโมซิส หากในลักษณะปกติที่ความเข้มข้นภายนอกมากกว่าภายในเซลล์ น้ำภายในเซลล์จะมีทิศทางเคลื่อนที่ออกสู่ภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์เสียสภาพมีขนาดลดลง

2.2.2.5 ผลของความเข้มข้นของเอทานอล

แอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักเอง กลับมีผลมายับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์ จะเห็นได้ว่าถ้าเอทานอลที่ได้มีความเข้มข้นสูงขึ้น อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์จะลดลง ซึ่งจะทำให้อัตราการหมักลดลงไปด้วย ทั้งนี้เนื่องจากเอทานอลไปมีผลต่อเอนไซม์และสรีระวิทยาของเซลล์ ในกรณีแรกเอทานอลจะไปมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) และ เฮกโซไคเนส (hexokinase) ในกรณีหลังมีผลต่อเมมเบรนของเซลล์ยีสต์ กล่าวคืออาจมีการทำลาย หรือทำให้เมมเบรนเปลี่ยนแปลงไป (วราวุฒิ, 2529)

2.3 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์

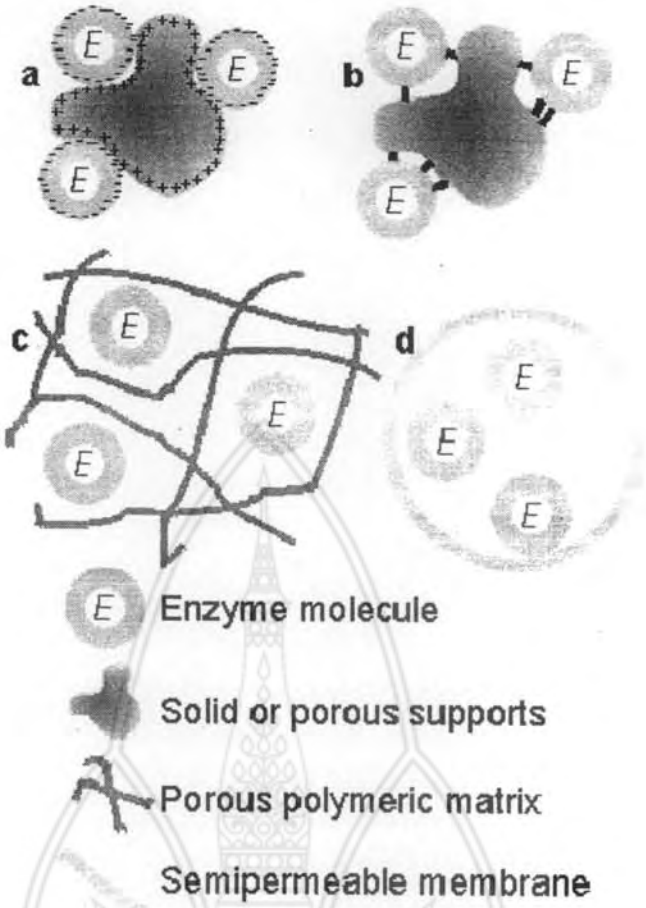
การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ หมายถึง การจำกัดขอบเขตของเซลล์ให้อยู่ในบริเวณที่จำกัด โดยเซลล์ยังมีกิจกรรมต่าง ๆ เหมือนเดิม จุลินทรีย์หรือเซลล์ที่ถูกตรึงสามารถนำมาใช้ในกระบวนการหมักทั้งแบบกะและแบบต่อเนื่อง เซลล์ตรึงรูปนี่สามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อ

2.3.1 วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์สามารถแบ่งตามลักษณะการตรึงเซลล์ได้ 5 วิธี คือ

2.3.1.1 การตรึงเซลล์แบบดูดซับบนผิว (Adsorption)

การตรึงเซลล์แบบดูดซับบนผิวเป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่ง่ายที่สุด เซลล์จะถูกดูดซับไว้บนตัวพยุง โดยอาศัยแรงอ่อน ๆ ในการติดกับตัวพยุง เช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals forces) และแรงไฮโดรโฟบิค (hydrophobic forces) เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 2.2 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการนี้ไม่มีการใช้สารเคมีต่อการเกิดปฏิกิริยา ความสามารถในการดูดซับบนตัวพยุงขึ้นอยู่กับ ความเป็นกรดด่าง ตัวทำละลาย ความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย ความเข้มข้นของเซลล์ต่อตัวพยุง และอุณหภูมิ เป็นต้น (Bickerstaff, 1997) สารพาหะที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์แบบดูซับบผิว ได้แก่ อลูมินา (alumina) ถ่านกัมมันต์ (activated carbon) คอลลาเจน (collagen) และซิลิกาเจล (silica gel) เป็นต้น ข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของการตรึงเซลล์แบบดูดซับบนผิว ดังแสดงในตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.2 วิธีการตรึงเซลล์โดยวิธีต่าง ๆ (a) วิธีจับกับพาหะ (b) วิธีการเชื่อมไขว้ (c) วิธีการกักเซลล์แบบ entrapment และ (d) วิธีการกักเซลล์แบบไมโครแคปซูล
(ที่มาของภาพ http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/immethod.html)

ตารางที่ 2.2 ข้อดีและข้อเสียของการตรึงเซลล์แบบดูดซับบนผิว (Bickerstaff, 1997)

ข้อดีของการตรึงเซลล์แบบดูดซับบนผิว	ข้อเสียของการตรึงเซลล์แบบดูดซับบนผิว
1) ไม่ทำลายเซลล์หรืออาจทำลายเพียงเล็กน้อย 2) วิธีการตรึงเซลล์ทำได้ง่าย ราคาถูก และรวดเร็ว 3) ไม่ใช้สารเคมีซึ่งอาจมีผลต่อตัวพยุงหรือเซลล์ที่ถูกตรึง	1) เกิดการหลุดออก (leakage) ของเซลล์จากตัวพยุงได้ง่าย 2) มีการเกาะแบบไม่จำเพาะและไร้ทิศทาง 3) ตัวพยุงมีมีพื้นที่ให้เกาะไม่เพียงพอ

2.3.1.2 การตรึงเซลล์แบบอาศัยพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding)

การตรึงเซลล์แบบนี้อาศัยการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างเซลล์กับตัวพยุง ซึ่งเป็นพันธะระว่างกลุ่มฟังชันนัล (functional group) ที่อยู่บนผิวของตัวพยุงและกลุ่มฟังชันนัลของกรดอะมิโนที่ผิวของเซลล์ ส่วนกลุ่มฟังชันนัลของกรดอะมิโนที่เข้าร่วมกับการเกิดพันธะโควาเลนต์ โดยส่วนใหญ่เป็นพวกหมู่อะมิโน (NH_2) ของไลซีน (lysine) หรือ อาร์จินิน (arginin) หมู่คาร์บอกซิล (CO_2H) ของแอสพาติค (aspartic) หรือกรดกลูตามิค (glutamic) หมู่ไฮดรอกซิล (OH) ของเซอริน (serin) หรือ ธรีโอนีน (threonine) และหมู่ซัลฟ์ไฮริล (sulfhydryl; SH) ของซิสติน (cystein) เป็นต้น (Bickerstaff, 1997)

2.3.1.3 การตรึงเซลล์แบบห่อหุ้ม (Encapsulation)

การตรึงเซลล์แบบห่อหุ้ม เป็นการห่อหุ้มเซลล์ด้วยเมมเบรนที่มีลักษณะเป็นเยื่อเลือกผ่าน (semi permeable membrane) โดยเซลล์จะมีอิสระภายในสารละลายแต่ถูกจำกัดบริเวณอยู่ โปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีขนาดใหญ่ จะไม่สามารถผ่านเข้าออกได้ ยกเว้นสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเล็กที่สามารถผ่านเข้าออกเยื่อเลือกผ่านได้ ปัญหาการตรึงเซลล์วิธีนี้จะเกี่ยวข้องกับการแพร่เข้าออกของสาร รวมทั้งรอยแตกออกของเมมเบรนเมื่อมีการสะสมของผลิตภัณฑ์อย่างรวดเร็ว พอลิเมอร์ที่นิยมใช้ในวิธีการตรึงเซลล์แบบห่อหุ้ม ได้แก่ เอทิลเซลลูโลส (ethyl cellulose) พอลิสไตลีน (polystyline) และเซลลูโลสไนเตรท (cellulose nitrate) เป็นต้น (Bickerstaff, 1997)

2.3.1.4 การตรึงเซลล์แบบกักขัง (Entrapment)

การตรึงเซลล์แบบกักขัง ใช้หลักการที่ให้เซลล์หรือเอนไซม์เป็นอิสระอยู่ในสารละลายคล้ายการตรึงแบบห่อหุ้มแต่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่ให้อยู่ในตาข่ายพอลิเมอร์ที่เกิดจากแรงเชื่อมไขว้กัน โดยความพรุนของเจลจะควบคุมไม่ให้เซลล์หรือเอนไซม์หลุดออกมา ในขณะเดียวกันสารอาหารและผลิตภัณฑ์ต้องสามารถผ่านเข้าออกเซลล์ตรึงรูปได้ การเจริญเติบโตของเซลล์ภายในเม็ดเจลขึ้นอยู่กับความสามารถในการซึมผ่านของสารอาหาร ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของรูของวัสดุที่ใช้ การตรึงเซลล์แบบกักขังทำให้การเจริญของเซลล์ที่อยู่ในเม็ดเจลแตกต่างกัน เซลล์จึงมีลักษณะแตกต่างกัน โดยเซลล์ที่มีการเจริญบริเวณผิวหน้าของเซลล์ตรึงรูปจะมีลักษณะที่แตกต่างจากเซลล์ที่อยู่ภายในเซลล์ตรึงรูปเนื่องจากภายในเซลล์ตรึงรูปมีปริมาณสารอาหารและออกซิเจนค่อนข้างจำกัด (Freeman and Lilly, 1998)

2.3.1.5 การตรึงเซลล์แบบเชื่อมไขว้ (Cross linking)

วิธีนี้เซลล์จะถูกตรึงโดยใช้สารเชื่อมไขว้ ซึ่งจะทำให้โมเลกุลมีการเชื่อมไขว้ภายในและระหว่างโมเลกุลทำให้เกิดการเชื่อมไขว้ทั้ง 3 ทิศทาง และมีการจับกันเป็นก้อน โดยเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างเซลล์สารที่นิยมใช้ในการตรึงด้วยการเชื่อมไขว้ เช่น กลูทารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และโทลูอีนไดไอโซไซยาเนต (toluene diisocyanate) อย่างไรก็ตามความเป็นพิษของสารเคมีเหล่านี้ต่อเซลล์มีชีวิตและเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการตรึงโดยวิธีนี้ (Bickerstaff, 1997)

นอกจากวิธีการตรึงเซลล์ 5 วิธีที่กล่าวไปแล้วยังมีการตรึงเซลล์แบบเชื่อมไขว้ทางกายภาพ เช่น การรวมตัวการตัวกันของเซลล์ทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น (flocculation) ทำให้แรงดึงดูดระหว่างเซลล์มีความแข็งแรงขึ้น (Ramakrishna and Prakasham, 2003)

2.3.2 คุณลักษณะที่ดีของตัวพยุงที่ใช้ในการตรึงเซลล์

ตัวพยุง (carrier) ที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์สำหรับกระบวนการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ควรมีลักษณะดังนี้ (Kourkoutas et al., 2004)

1) มีพื้นที่ผิวเพียงพอและมีตำแหน่งสำหรับให้เซลล์เกาะยึดได้

2) สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

3) มีความคงทนสูง ใช้งานได้ง่าย และมีระยะเวลาของการใช้งานนาน

4) สามารถรักษากิจกรรมของเซลล์ได้เป็นอย่างดีเมื่อผ่านกระบวนการตรึงเซลล์

5) มีความปลอดภัยไม่มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ รวมทั้งเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

6) วิธีการตรึงเซลล์และการใช้ตัวพยุงนั้นควรเป็นวิธีการที่ง่าย ต้นทุนต่ำ และสามารถขยายขนาดให้ใหญ่ขึ้นได้

2.3.3 ข้อได้เปรียบของการใช้เซลล์ตรึงรูป

การใช้เซลล์ตรึงรูปในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์มีข้อได้เปรียบเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระดังนี้ (นิพัทธ์, 2549)

1) เพิ่มระยะเวลาของกิจกรรมและความคงตัวของตัวพยุง โดยการตรึงเซลล์ช่วยช่วยป้องกันผลกระทบจากทางกายภาพและทางเคมี เช่น พีเอช อุณหภูมิ สารละลาย และโลหะหนักต่าง ๆ เป็นต้น

2) มีความหนาแน่นของเซลล์ต่อปริมาตรถังหมักสูงทำให้ได้ปริมาณของผลิตภัณฑ์สูง โดยใช้ระยะเวลาของการหมักสั้นลง

3) เพิ่มความสามารถของเซลล์ในการใช้วัตถุดิบและเพิ่มผลได้ (yield) ของการหมัก

4) สามารถใช้ในกระบวนการหมักต่อเนื่องได้ และใช้อัตราการเจือจางที่สูงกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของเซลล์อิสระ

5) เพิ่มความสามารถของเซลล์ในการใช้สารตั้งต้นสูง และลดการเกิดการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นในระหว่างการหมัก

6) สามารถใช้ในการหมักที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งช่วยปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยเฉพาะเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์

7) ง่ายต่อการจัดการหลังกระบวนการหมัก เช่น การแยกตะกอน การกรอง ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในด้านเครื่องมือและพลังงาน

8) สามารถนำตัวพยุงกลับมาใช้ได้ใหม่เพื่อขยายระยะเวลาของการหมักแบบกะ โดยไม่จำเป็นต้องมีการนำเอาตัวพยุงออกจากเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

9) ลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ๆ เนื่องจากมีความหนาแน่นของเซลล์และกิจกรรมของการหมักสูง

2.3.4 ข้อจำกัดในการใช้เซลล์ตรึงรูป

ข้อจำกัดในการใช้เซลล์ตรึงรูปสรุปได้ดังนี้ (ภาวิณี, 2531; Kourkoutas et al., 2004)

1) การตรึงเซลล์จุลินทรีย์อาจทำให้กิจกรรมของเซลล์เปลี่ยนแปลง หลังผ่านกระบวนการตรึงเซลล์

2) การใช้เซลล์ตรึงรูปอาจมีปัญหาในเรื่องการแพร่ การขนส่งสารอาหาร และผลิตภัณฑ์ผ่านสารพาหะที่ใช้ตรึงเซลล์

3) การใช้เซลล์ตรึงรูปในกระบวนการหมักเป็นระยะเวลานาน ๆ จะต้องระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อน

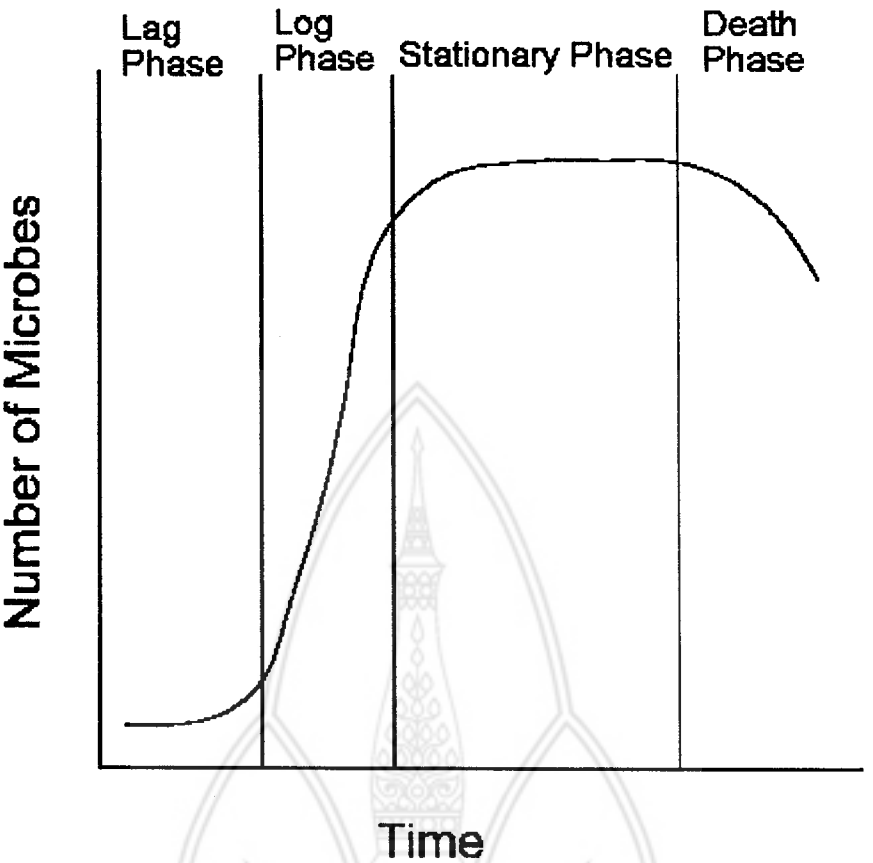
4) ควรทราบชนิดของผลิตภัณฑ์ กระบวนการหมักที่ใช้เซลล์ตรึงรูป รวมทั้งการควบคุมสภาวะของการหมัก เพื่อจะได้เลือกวิธีการตรึงเซลล์ที่เหมาะสม

2.4 กระบวนการหมัก

กระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลแบ่งเป็น 4 ประเภทหลัก ๆ คือ กระบวนการหมักแบบกะ แบบกึ่งกะ แบบต่อเนื่อง และแบบกึ่งต่อเนื่อง ซึ่งการหมักแบบกะและแบบต่อเนื่องเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตเอทานอล และในกระบวนการหมักบางประเภทที่ใช้ประโยชน์จากการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่นั้น อาจมีปัญหาในการปั่นเซลล์แยกออกมาใช้เนื่องจากสับสเตรตที่ใช้มีวัสดุที่ไม่สามารถละลายได้ในปริมาณสูง ดังนั้นกระบวนการหมักแต่ละประเภทมีทั้งข้อดีข้อเสีย ซึ่งในการเลือกใช้กระบวนการใดในการหมักควรคำนึงถึงคุณสมบัติของวัตถุดิบที่ใช้ รวมทั้งต้นทุนในการดำเนินการ โดยเฉพาะค่าร้อยละผลได้ (% yield) และอัตราผลผลิต (productivity) ของผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งสำคัญในการเลือกกระบวนการหมัก ซึ่งกระบวนการหมักที่ดีควรมีการลงทุนต่ำ แต่สามารถผลิต และเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้สูง

2.4.1 การหมักแบบกะ (Batch fermentation)

การหมักแบบกะจะมีการเติมสารอาหารและเซลล์เมื่อเริ่มต้นเท่านั้น ปฏิกิริยาชีวภาพจะดำเนินไปจนกว่าจะถึงจุดที่ต้องการ แล้วจึงแยกเซลล์หรือเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ออก โดยทั่วไปจะรอจนผลิตภัณฑ์มีปริมาณสูงสุดและมีอัตราการเปลี่ยนแปลงสั้นที่สุด ในการหมักแบบกะจุลินทรีย์จะมีรูปแบบการเจริญดังแสดงในรูปที่ 2.3



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

เมื่อเติมจุลินทรีย์ลงในอาหารระยะแรกเซลล์จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน ระยะนี้เรียกว่า lag phase เนื่องจากเป็นระยะที่เชื้อกำลังปรับตัว ในช่วง lag phase นี้ กระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยใช้เชื้อเริ่มต้น (starter หรือ inoculum) ที่เหมาะสม หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะมีอัตราการเพิ่มขึ้นตามลำดับจนกระทั่งเข้าสู่ log phase หรือ exponential phase ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีการแบ่งตัวทวีคูณ จำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นแบบ exponential การเจริญเติบโตระยะนี้จะเกิดขึ้นต่อไปหลายชั่วโมงจนกว่าองค์ประกอบของอาหารจะมีการเปลี่ยนแปลง เช่น อาหารมีปริมาณน้อยลง และปริมาณออกซิเจนจำกัดเนื่องจากเซลล์มีความหนาแน่น เมื่อถึงจุดนี้การเจริญจะช้าลงและปริมาณเซลล์ค่อนข้างคงที่ เซลล์จะเข้าสู่ระยะใหม่ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์หยุดการทวีจำนวนและอยู่ในสภาวะคงที่ไปช่วงระยะเวลาหนึ่ง การหยุดทวีจำนวนนั้นอาจเนื่องมาจากปริมาณสารอาหารบางอย่างหมดหรือลดน้อยลงหรือมีการสร้างสารพิษระหว่างการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ การที่จำนวนประชากรคงที่นั้น แสดงว่าเซลล์ไม่มีการแบ่งตัวอีกเลย หรืออัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตายหรือสมดุล ถึงแม้ว่าไม่มีการเจริญเกิดขึ้นก็ตาม แต่หน้าที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น เมตาบอลิซึม ทางพลังงาน และกระบวนการสร้างทางชีวภาพ ระยะนี้เรียกว่า stationary phase ระยะสุดท้าย จุลิน-

ทรีย์ที่เหลือจะมีการตายเร็วกว่าการเพิ่มจำนวน ระยะนี้เรียกว่า death phase ซึ่งเกิดจากอาหารหมด หรือมีการสะสมสารยับยั้งการเจริญ เช่น กรดหรือสารพิษ จุลินทรีย์ระยะนี้ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้งาน เพราะมีจำนวนน้อยมักมีแต่เซลล์ตาย ขนาดเซลล์เล็กผิดปรกติ อาจมีขนาดยาวหรือเป็นเส้น มีหลายนิวเคลียส ไม่มีผนังเซลล์หรือผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ เซลล์ต่าง ๆ เหล่านี้ถ้านำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จะกลับมาเป็นเซลล์ปกติ การหมักแบบกะนิยมใช้ระบบนี้จัดกระบวนการขนาดเล็ก เพราะจะมีราคาถูกและประหยัด มีการควบคุมการทำงานที่ง่าย เช่น การหมักไวน์ เบียร์ สุราและแอลกอฮอล์ เป็นต้น นอกจากนี้กระบวนการที่ต้องควบคุมสภาวะต่าง ๆ โดยมากจะใช้ระบบนี้อยู่ เช่น การผลิตเอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ สารประกอบอินทรีย์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการเพาะเลี้ยงไฮบริโนมา เป็นต้น เนื่องจากควบคุมง่ายกว่าระบบอื่น ๆ

2.4.2 การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-bath Fermentation)

เป็นระบบการหมักที่มีการป้อนสารอาหาร เข้าไปในระบบเป็นระยะ ๆ เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่และใช้ได้ในปริมาณสูงจากนั้นจะหยุดการหมัก การหมักแบบกึ่งกะนี้เป็นการขยายการทำงานแบบกึ่งกะออกไปนั้นเองซึ่งมีข้อได้เปรียบแบบการหมักแบบกะหลายประการด้วยการด้วยกันเช่น

1) การยับยั้งของสารอาหาร (Substrate inhibition) สารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น กรดน้ำส้ม แอลกอฮอล์ เมทานอล และสารประกอบพวกอโรมาติก สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้แม้ในความเข้มข้นที่ต่ำ ๆ ก็ตาม การเติมอาหารเหล่านี้อย่างเหมาะสมและต่อเนื่องกันจะช่วยให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้โดยปราศจากการยับยั้งของสารอาหาร

2) การผลิตเซลล์เป็นจำนวนมาก (High cell concentration) ในการเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์แบบกะจะได้ปริมาณเซลล์ไม่มากเท่าแบบกึ่งกะ

3) อิทธิพลของกลูโคส (Glucose effect) การผลิตยีสต์ขนมปังจากน้ำตาลมอลท์หรือกากน้ำตาลพบว่า มีแอลกอฮอล์ละลายปนอยู่กับยีสต์ในถังหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารที่เลี้ยงสูงแม้จะให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอ แอลกอฮอล์จะให้ปริมาณเซลล์ลดลง การสร้างแอลกอฮอล์แบบนี้เกิดจากอิทธิพลของกลูโคส เพื่อที่จะลดอิทธิพลดังกล่าวจึงได้นำการหมักแบบกึ่งกะมาใช้ผลิตยีสต์ในปัจจุบัน

4) ช่วยลดความหนืดของอาหาร (Decreasing viscosity of broth) พอลิเมอร์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ เช่น dextran, pullolan และ xanthan gum สามารถควบคุมความหนืดของสารโดยการค่อย ๆ เติมอย่างต่อเนื่อง ซึ่งหากความหนืดเพิ่มมากขึ้น จะมีผลต่อระบบการเติมอากาศ เช่น ใบพัดในการกวนจะต้องใช้กำลังไฟฟ้ามากขึ้นทำให้การละลายของออกซิเจนไม่ดีพอ

5) ป้องกันการปะปนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Protection from contamination) กรณีการหมักแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ การหมักแบบกะอาจพบปัญหาการปะปนของจุลินทรีย์อื่น ทำให้ผลผลิตของแอลกอฮอล์ลดลงหากใช้การหมักแบบกึ่งกะจะช่วยทำให้ปัญหาเหล่านี้หมดไป

2.4.3 การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous fermentation)

ระบบการหมักแบบนี้จะทำการหมักแบบกะก่อนแต่เมื่ออาหารที่ให้ในระบบเริ่มหมด จะมีการนำน้ำหมักออกจากระบบไปเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์โดยจะเหลือน้ำหมักส่วนหนึ่งไว้ในถังหมัก หลังจากนั้นจะเติมอาหารเข้าไปเหมือนการหมักแบบกึ่งกะทันที แต่ปริมาตรที่เติมเข้าไปในถังหมักจะเต็มปริมาตรทำงานของระบบทุกครั้งไม่เหมือนแบบกึ่งกะ ระบบการหมักจะหมุนเวียนกันไปเรื่อย ๆ เหมือนดังการหมักแบบต่อเนื่อง แต่ไม่ใช่การหมักแบบต่อเนื่อง ข้อดีของกระบวนการหมักแบบนี้คือ สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้อย่างต่อเนื่อง ระบบไม่แพงเท่าระบบการหมักแบบต่อเนื่อง และสารอาหารที่ให้เข้าไปมีการใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนข้อเสียคือ จะต้องระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อตัวอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ และต้องใช้แรงงานคนคอยดูและติดตามการให้อาหารของจุลินทรีย์ แล้วทำการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ไปพร้อมกับการให้อาหารชุดใหม่ จึงค่อนข้างยุ่งยากพอสมควร ถ้ามีการดำเนินการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องไปตลอด

2.4.4 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

ในระบบนี้จะมีการเติมอาหารให้แก่ระบบอย่างต่อเนื่องพร้อม ๆ กับการไหลออกของน้ำหมักอย่างต่อเนื่องในอัตราที่เท่ากัน โดยที่อัตราการไหลเข้าออกของระบบไม่ควรสูงไปกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันการชะจุลินทรีย์ออกจากระบบ ทำให้ไม่มีจุลินทรีย์ในระบบการหมัก ในระบบการหมักช่วงหลัง ๆ จะมีความคงที่ไม่ขึ้นกับเวลา (steady-state) ระบบการหมักนี้เหมาะกับระบบที่ต้องการการผลิตสูงและมีการควบคุมระบบแบบอัตโนมัติ ระบบนี้ยังไม่เป็นที่ใช้แพร่หลายแต่มีใช้บ้างกับการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) ทดแทนอาหารสัตว์ และระบบการหมักก๊าซชีวภาพจากของเสียในโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น

การเจริญของจุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงด้วยระบบต่อเนื่อง ปริมาณประชากรของเซลล์สามารถรักษาสภาวะคงตัว (steady-state) อยู่ในช่วง exponential state ได้เป็นเวลานาน ระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องมีการป้อนอาหารเข้า และนำอาหารออกจากระบบตลอดเวลาด้วยอัตราคงที่ค่าหนึ่งระบบการหมักแบบต่อเนื่องสามารถแบ่งการควบคุมการทำงานได้เป็น 2 ลักษณะคือ ระบบการหมักต่อเนื่องแบบ chemostat และแบบ turbidostat โดยหลักการของทั้ง 2 ระบบคือ ต้องทำให้ความเข้มข้นของเซลล์ในระบบมีปริมาณคงที่ ดังนั้นการเติมสารอาหารลงในถึงหมักต้องสัมพันธ์กับ generation time ของจุลินทรีย์ โดยถ้าอัตราการให้สารอาหารต่ำ เชื้อจะเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase ทำให้ไม่สามารถรักษาระบบให้ดำเนินการแบบต่อเนื่องได้เช่นเดียวกัน

ระบบ chemostat อัตราการนำอาหารเข้าและอัตราการนำน้ำหมักออกจากระบบจะมีค่าคงที่ตลอดการดำเนินการ และอัตราการเจริญจะควบคุมโดยปริมาณของสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต pH หรือ อุณหภูมิ ส่วนระบบแบบ turbidostat จะมีการควบคุมความเข้มข้นของเซลล์ในถังหมักให้คงที่ โดยการควบคุมอัตราการเติมสารอาหารลงในถังหมักและอัตราการนำน้ำหมักโดยใช้เครื่องควบคุมความขุ่นของจุลินทรีย์

2.5 ข้าวโพด

ข้าวโพด (Indian Corn หรือ Maize) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Zea mays Linn. (ซีเมส์ : Zea mays) เป็นพืชตระกูลเดียวกับหญ้ามีลำต้นสูง โดยเฉลี่ย 2.2 เมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น 0.5-2.0 นิ้ว เมล็ดจากฝักใช้เป็นอาหารคนและสัตว์ (http://th.wikipedia.org/wiki/)

2.5.1 การใช้ประโยชน์

เมล็ดข้าวโพดและส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่างอาจแบ่งการใช้ออกเป็น 3 ประเภท คือ

2.5.1.1 ใช้เป็นอาหารมนุษย์

ประเทศไทย ประชาชนนิยมรับประทานฝักสดของข้าวโพดหวาน ข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดไร่โดยการต้มหรือเผาให้สุกเสียก่อน นอกจากนั้น ฝักอ่อนของข้าวโพดยังนิยมรับประทานกันอย่างแพร่หลายนับเป็นผักชนิดหนึ่งที่นำมาปรุงอาหาร นอกจากจะรับประทานในประเทศแล้ว ยังบรรจุกระป๋องส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศเป็นอุตสาหกรรมชนิดหนึ่งด้วย

ประชาชนในบางประเทศ บริโภคข้าวโพดเป็นอาหารหลักในรูปต่าง ๆ กัน เช่น ในอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ใช้แป้งบดจากเมล็ดแก่มาทำเป็นแผ่นนึ่งหรือย่างให้สุก รับประทานกับอาหารอื่นคล้ายกับการรับประทานขนมปัง ในฟิลิปปินส์นิยมตำเมล็ดข้าวโพดแก่ให้แตกเป็นชิ้นเล็กเท่า ๆ เมล็ดข้าว แล้วต้มรับประทานแทนข้าว

2.5.1.2 ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรม

เมล็ดและผลิตผลจากเมล็ดข้าวโพด สามารถนำไปใช้ในการอุตสาหกรรมได้หลายประเภท เช่น ทำแอลกอฮอล์ แป้ง น้ำตาลชนิดต่าง ๆ น้ำเชื่อมและน้ำมัน ผลิตผลเหล่านี้อาจนำไปใช้ทำผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมอื่น ๆ ได้อีกต่อหนึ่ง เช่น ยารักษาโรค กระดาษ กระดาษแก้ว ผ้าสังเคราะห์ กรด น้ำหอม น้ำมันใส่ผม และ แบตเตอรี่ นอกจากเมล็ดแล้ว พวกฝัก ใบ และลำต้น อาจนำไปใช้ทำผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด เช่น กระดาษ ปุ๋ย และฉนวนไฟฟ้า นอกจากนี้แล้วยังสามารถนำซังข้าวโพดมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำถ่านอัดแท่งจากซังข้าวโพด ดังเช่นที่อำเภอนครไทย จังหวัดพิษณุโลกซึ่งมีพื้นที่ปลูกข้าวโพดประมาณ 100,000 ไร่ ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 600 กิโลกรัมต่อไร่ ข้าวโพดทั้งฝักน้ำหนัก 100 กิโลกรัม เมื่อแบ่งหากเป็นเมล็ดข้าวโพดกะเทาะเปลือกได้ประมาณ 70 กิโลกรัม ส่วนที่เหลือ 30 กิโลกรัมคือ "ซังข้าวโพด" ทั้งอำเภอนครไทยมีซังข้าวโพดทิ้งปีละ 26,000,000 กิโลกรัม ด้วยปริมาณซังข้าวโพดที่มากเช่นนี้จึงได้มีโครงการผลิตถ่านอัดแท่งจากซังข้าวโพดขึ้น (http://teenet.tei.or.th/news/corn.html)

2.5.1.3 ใช้เป็นอาหารสัตว์

ข้าวโพดนับเป็นพืชที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ดีชนิดหนึ่ง การใช้ข้าวโพด เลี้ยงสัตว์อาจทำได้หลายอย่าง เช่น ใช้เมล็ด กากน้ำตาล กากแป้งที่เหลือจากสกัดน้ำมัน ตัดต้นสดให้สัตว์กินโดยตรง ตัดต้นสดหมัก และใช้ต้นแก่หลังเก็บเกี่ยวฝักแล้ว ในต่างประเทศนิยมใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์กันมาก แต่ในประเทศไทยยังใช้กันน้อย ทั้งนี้เนื่องจากราคายังสูงอยู่ ถ้าสามารถลดต้นทุนการผลิตลง และ

ราคาข้าวโพดอยู่ในระดับพอสมควร อาจมีการใช้เลี้ยงสัตว์เพิ่มขึ้น (http://www.kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK3/)

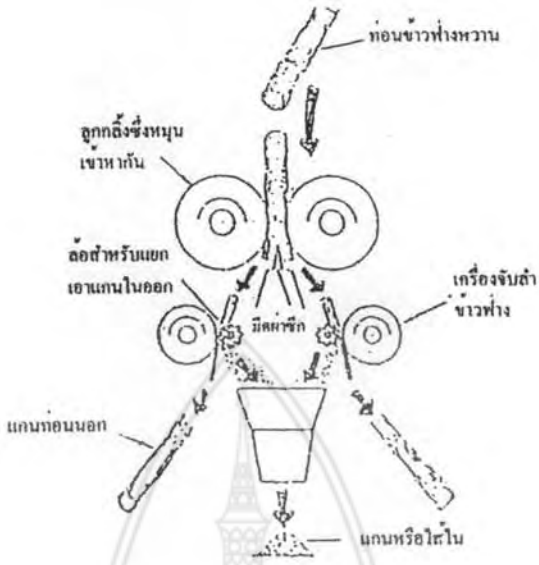
2.6 ข้าวฟ่างหวาน

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

ข้าวฟ่างหวาน มีลักษณะเช่นเดียวกับข้าวฟ่างที่ใช้ประโยชน์จากเมล็ดที่ปลูกกันทั่ว ๆ ไป ต่างกันในตรงที่มีน้ำตาลในลำต้นมากกว่า จึงสามารถนำไปผลิตเป็นน้ำตาลเพื่อบริโภคได้ และข้าวฟ่างหวานมีข้อดีเหนือกว่าอ้อย คือ สามารถปลูกและเจริญเติบโตได้ในดินแทบทุกชนิด และความทนทานต่อสภาพภูมิอากาศแห้งแล้ง ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและมีอายุเก็บเกี่ยวสั้นประมาณ 90-120 วันเท่านั้น (ขึ้นอยู่กับพันธุ์) อีกทั้งยังสามารถใช้ประโยชน์ได้ในลักษณะเดียวกับอ้อย เพราะนอกเหนือจากการผลิตเป็นน้ำเชื่อมหรือน้ำตาลแล้ว ข้าวฟ่างหวานยังสามารถเป็นผลิตเป็นอาหารสัตว์ กระดาษไม้อัดและน้ำมันเชื้อเพลิงได้อีกด้วย การแยกลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อไปใช้เป็นประโยชน์ ใช้วิธี "Tilby Seperator Process" รูปที่ 2.4 ซึ่งประกอบด้วยเครื่องมือที่จะแยกลำต้นข้าวฟ่างหวานออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนผิวนอกของลำต้นข้าวฟ่างหวานที่เรียกว่า "outer rind fiber" สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตกระดาษ ส่วนแกนในจะเป็นส่วนประกอบของน้ำหวาน ซึ่งน้ำตาลอยู่มาก จึงนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเป็นแอลกอฮอล์ สำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ทั้งเบนซินและดีเซลได้ ใบและเมล็ดสามารถทำเป็นอาหารหมักใช้เลี้ยงสัตว์ นอกจากนี้ส่วนของก้านช่อดอกยังใช้ทำปุ๋ยหรือเป็นเชื้อเพลิงได้ (น้อม, 2523)

ข้าวฟ่างหวานที่ปลูกเพื่อผลิตน้ำตาลหรือเพื่อผลิตแอลกอฮอล์นั้นควรมีลักษณะดังต่อไปนี้ (กฤษฎา, 2525)

1) มีลำต้นโต เพื่อสะดวกต่อการหีบน้ำตาล
2) มีลำต้นแข็งแรง ไม่หักล้มง่าย
3) ลำต้นฉ่ำน้ำ และมีปริมาณน้ำตาลสูง
4) มีความต้านทานต่อโรคสูง
5) มีอายุไม่ยาวเกินไป เพื่อให้ทันกับช่วงฝน
6) ทนทานต่อความแห้งแล้ง เพราะสภาพฝนมักไม่แน่นอน
7) ต้านทานต่อสภาพน้ำขังแฉะ ในกรณีที่มีฝนตกชุก
8) ถ้ามีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ทำน้ำเชื่อม ควรให้กลิ่น สี ของน้ำเชื่อมที่ดี แต่ถ้ามีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแอลกอฮอล์ คุณภาพดังกล่าวไม่จำเป็นนัก



รูปที่ 2.4 กระบวนการแยกส่วนต่างๆ ของข้าวฟ่างหวานแบบ Tilby (Tilby separation process) (น้อม, 2523)

จะเห็นได้ว่าข้าวฟ่างหวานเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ของเกษตรกรได้ในอนาคต โดยเฉพาะการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานนั้นมีความเป็นไปได้สูงมาก ดังนั้นการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อผลผลิตและคุณภาพของข้าวฟ่างหวานโดยรวมไปถึงการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุด

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Roukas (1996) ศึกษาการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลบีทที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของ *Saccharomyces cerevisiae* โดยการหมักแบบกะซ้ำในถังหมักขนาด 8 ลิตร ผลการทดลองพบว่า การหมักแบบกะซ้ำโดยใช้เซลล์อิสระ ความเข้มข้นของเอทานอลโดยรวม (overall ethanol concentration) และจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตลดลงอย่างชัดเจนจากกะซ้ำที่ 1 ถึง 5 ในขณะที่เมื่อใช้เซลล์ตรึงรูป ความเข้มข้นของเอทานอลโดยรวมมีค่าค่อนข้างคงที่จากกะซ้ำที่ 1 ถึง 8 โดยมีความเข้มข้นของเอทานอลโดยรวมในแต่ละกะซ้ำประมาณ 420 กรัม

Nigam (2000) ศึกษาการหมักเอทานอลจากของเสียโรงงานสับปะรดกระป๋องที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด 82 กรัมต่อลิตร โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24533 โดยการหมักแบบต่อเนื่อง ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของเอทานอล

และผลได้ของเอทานอลที่ได้จากการใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงมีค่าใกล้เคียงกัน แต่การหมักโดยเซลล์ตรึงรูปให้อัตราผลผลิต (productivity) สูงกว่าการหมักโดยใช้เซลล์อิสระถึง 11 เท่า และสามารถหมักได้อย่างต่อเนื่องถึง 87 วัน

Kourkoutas และคณะ (2001) และ Kourkoutas และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตไวน์โดยใช้เซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* strain AXAZ1 ตรึงบนชิ้นแอ๊ปเปิ้ลโดยการหมักแบบกะ และแบบต่อเนื่อง จากผลการทดลองพบว่า แอ๊ปเปิ้ลสามารถใช้เป็นวัสดุตรึงรูปได้ดี โดยสามารถหมักไวน์แบบต่อเนื่องได้นานถึง 95 วัน โดยประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

Najafpour และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24533 โดยการหมักแบบกะและแบบต่อเนื่อง ผลการทดลองพบว่า ในการหมักแบบกะการใช้น้ำตาลและการผลิตเอทานอลมีค่าเท่ากับร้อยละ 99.6 และ 12.5 (โดยปริมาตร) ตามลำดับ หลังจาก 27 ชั่วโมง ในขณะที่การหมักแบบต่อเนื่องการใช้น้ำตาลและการผลิตเอทานอลมีค่าเท่ากับร้อยละ 88.2 และ 16.7 ตามลำดับ ที่ระยะเวลาที่น้ำหมักอยู่ในคอลัมน์ 6 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยขอนแก่น