บทที่ 2
การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล

เอทานอล หรือเอทธิลแอลกอฮอล์เป็นไฮโดรคาร์บอนที่มีหมู่ไวปฏิกิริยา (Functional group) เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (R-OH) แอลกอฮอล์มีหลายชนิด และมีการเรียกชื่อต่างกันไปตามขนาด จำนวนคาร์บอน และโครงสร้างของโมเลกุล ดังตัวอย่างในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงการเรียกชื่อสารบางตัวในกลุ่มแอลกอฮอล์

จำนวนคาร์บอนในหมู่ R	สูตรโครงสร้าง	ชื่อเรียกระบบ IUPAC
1	CH_3OH	Methanol
2	CH_3CH_2OH	Ethanol
3	$CH_3CH_3CH_2OH$	Propanol
4	CH_3CH_2OH CH_3	2-propanol หรือ Isopropyl alcohol

ถึงแม้จะมีแอลกอฮอล์หลายชนิด แต่ในแง่เชื้อเพลิงทดแทนมักจะใช้เอทานอล ทั้งนี้เพราะเอทานอลเป็นสารไม่มีพิษและไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม สามารถผลิตได้โดยการหมักจากจุลินทรีย์ ซึ่งโดยทฤษฎีน้ำตาลกลูโคส จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลประมาณ 51% (กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคสที่ใช้) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 49% (กรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกรัมกลูโคสที่ใช้) (ภาพที่ 2.1)

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

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

ภาพที่ 2.1 การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล

2.1.1 คุณสมบัติโดยทั่วไปของเอทานอล

ในสภาวะปกติ เอทานอลจะอยู่ในสภาวะของเหลวใส ระเหยง่าย มีรสขม และมีกลิ่นเฉพาะตัว ติดไฟ และให้เปลวไฟมีความร้อนประมาณ 7,100 แคลอรีต่อกรัม ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ มีจุดเดือดที่ความดันบรรยากาศ 78 องศาเซลเซียส และมีจุดเยือกแข็งที่ -117.3 องศาเซลเซียส มีค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.794 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาฟาเรนไฮต์

2.1.2 ประเภทของเอทานอลที่ผลิตในทางอุตสาหกรรม

โดยทั่วไปแอลกอฮอล์ที่ผลิตในทางอุตสาหกรรม สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภทหรือ 4 เกรด ดังนี้คือ

1) Industrial alcohol (96.5^{o}GL) นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรม โดยใช้เป็นตัวทำละลาย เป็นเชื้อเพลิง 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 (%) โดยปริมาตรของเอทิลแอลกอฮอล์ในของผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์ต่อน้ำ %(v/v) (ethanol/water)

2.1.3 ประโยชน์ของแอลกอฮอล์

มีการนำแอลกอฮอล์ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมาย อาทิเช่น

1) ใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อให้พลังงานและความร้อน

2) ในทางอุตสาหกรรมใช้เป็นตัวทำละลายทางเคมี

3) ในทางการแพทย์ใช้เป็นตัวทำละลายยาและเป็นสารเสริมช่วยออกฤทธิ์ในยา นอกจากนี้ยังใช้เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อทำความสะอาดบาดแผล

4) ในอุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอางใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อการผลิตสารบางชนิด เช่น น้ำหอม สบู่ เป็นต้น

2.1.4 การผลิตเอทานอล

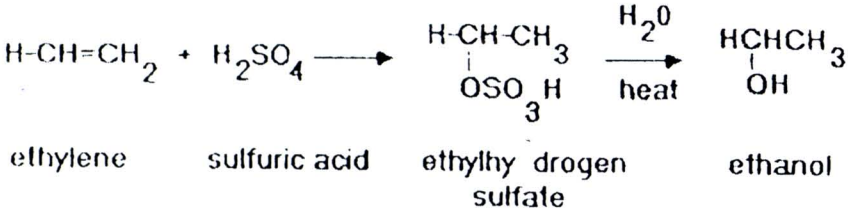
การสังเคราะห์เอทานอลในระดับอุตสาหกรรม สามารถทำได้ 2 วิธีการด้วยกัน คือ การสังเคราะห์เอทานอลทางเคมี และการสังเคราะห์เอทานอลทางชีวภาพ แต่ละวิธีการมีรายละเอียดที่สำคัญดังนี้ คือ

2.1.4.1 การสังเคราะห์เอทานอลทางเคมี

ในทางกฎหมายเอทานอลที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้ ไม่อนุญาตให้ใช้เป็นเครื่องดื่ม ตัวอย่างปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอทานอลทางเคมี ได้แก่

1) การสังเคราะห์เอทานอลาจากปฏิกิริยาการเติมน้ำให้กับเอทธิลีน (ethylene)

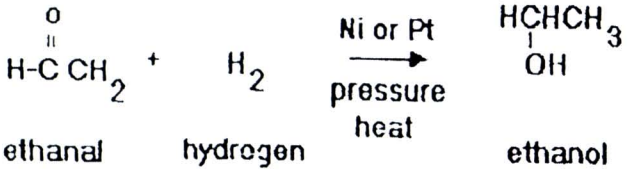
เป็นการเปลี่ยนเอทธิลีนให้เป็นเอทานอลโดยเติมกรดซัลฟูริกให้กับเอทธิลีน ได้ผลผลิตเป็นเอทิลไฮโดรเจนซัลเฟต ซึ่งเมื่อนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำร้อนจะให้เอทานอล (ภาพที่ 2.2) เป็นไปตามกฎมาร์โคว์นิคอฟฟ์



ภาพที่ 2.2 การสังเคราะห์เอทานอลาจากปฏิกิริยาการเติมน้ำให้กับเอทธิลีน (ethylene)

2) การสังเคราะห์เอทานอลโดยการเติมไฮโดรเจนให้กับอัลดีไฮด์

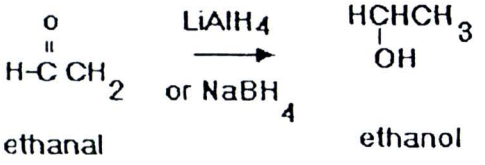
การสังเคราะห์โดยวิธีนี้ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ที่ความร้อนและความดันสูง โดยมีนิเกิล (nikel) และแพลตตินั่ม (platinum) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ดังปฏิกิริยาในภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 การสังเคราะห์เอทานอลโดยการเติมไฮโดรเจนให้กับอัลดีไฮด์

3) การสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาดักชันของสารเอทานอลด้วยไฮโดรด์

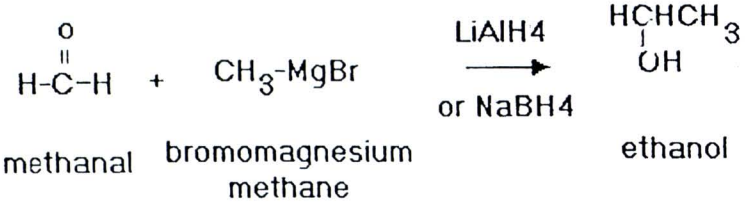
โดยจะใช้ลิเทียมอะลูมินัมไฮไดรด์ ($LiAlH_4$) หรือโซเดียมโบโรไฮไดรด์ ($NaBH_4$) เป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 การสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาดักชันของสารเอทานอลด้วยไฮโดรด์

4) การสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาระหว่างเอทานอลกับกรีญาร์รีเอเจนต์

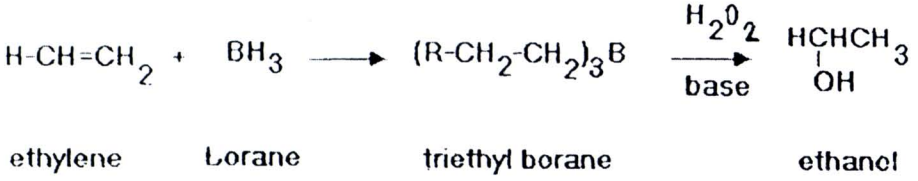
กรีญาร์รีเอเจนต์ เกิดจากอัลคิลเฮไลด์ ทำปฏิกิริยากับแมกนีเซียมใน anhydrous diethyl ether จะได้อัลคิลแมกนีเซียมเฮไลด์ (alkylmagnesium halide) ซึ่งเป็นกรีญาร์รีเอเจนต์ โดยอัลคิลแมกนีเซียมเฮไลด์จะทำปฏิกิริยากับเมทานาลกลายเป็นเอทานอล (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.5 การสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาระหว่างเอทานอลกับกรีญาร์รีเอเจนต์

5) การสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาไฮโดรโบเรชันของเอทิลีน (ethylene)

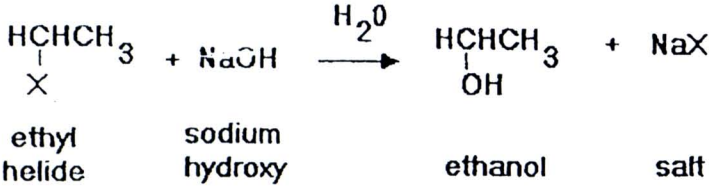
เป็นปฏิกิริยาระหว่างเอทธิลีน(ethylene) กับไฮไดรด์ของโบรอน ที่เรียกว่า โบเรน BH_3 (ไดเมอร์ของโบเรน คือ B_2H_6 ซึ่งเรียกว่า ไดโบเรน) จะให้สารประกอบไตรอัลคิลโบรอน ซึ่งเมื่อนำไปออกซิไดซ์ด้วยไฮโดรเจนเพอร์รอกไซด์จะให้แอลกอฮอล์หรือเอทานอล (ภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 การสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาไฮโดรโบเรชันของเอทิลีน (ethylene)

6) การสังเคราะห์เอทานอลจากการไฮโดรไลซิสของเอทิลเฮไลด์ (ethyl helide; CH_3CH_2X)

เป็นการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อเปลี่ยนเอทิลเฮไลด์ไปเป็นเอทานอลภายใต้สภาวะเป็นด่าง (ภาพที่ 2.7)



ภาพที่ 2.7 การสังเคราะห์เอทานอลจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอทิลเฮไลด์ (ethyl helide; CH_3CH_2X)

ข้อดีของการสังเคราะห์เอทานอลด้วยวิธีทางเคมี

ปฏิกิริยาเกิดได้รวดเร็วและให้ความถูกต้องที่สามารถคำนวณได้อย่างใกล้เคียงหรือแน่นอน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง มีปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เอทานอลค่อนข้างหลากหลายวิธี ใช้การดูแลเอาใจใส่ไม่ยาวนานเหมือนการหมักเอทานอลด้วยจุลินทรีย์ เป็นต้น

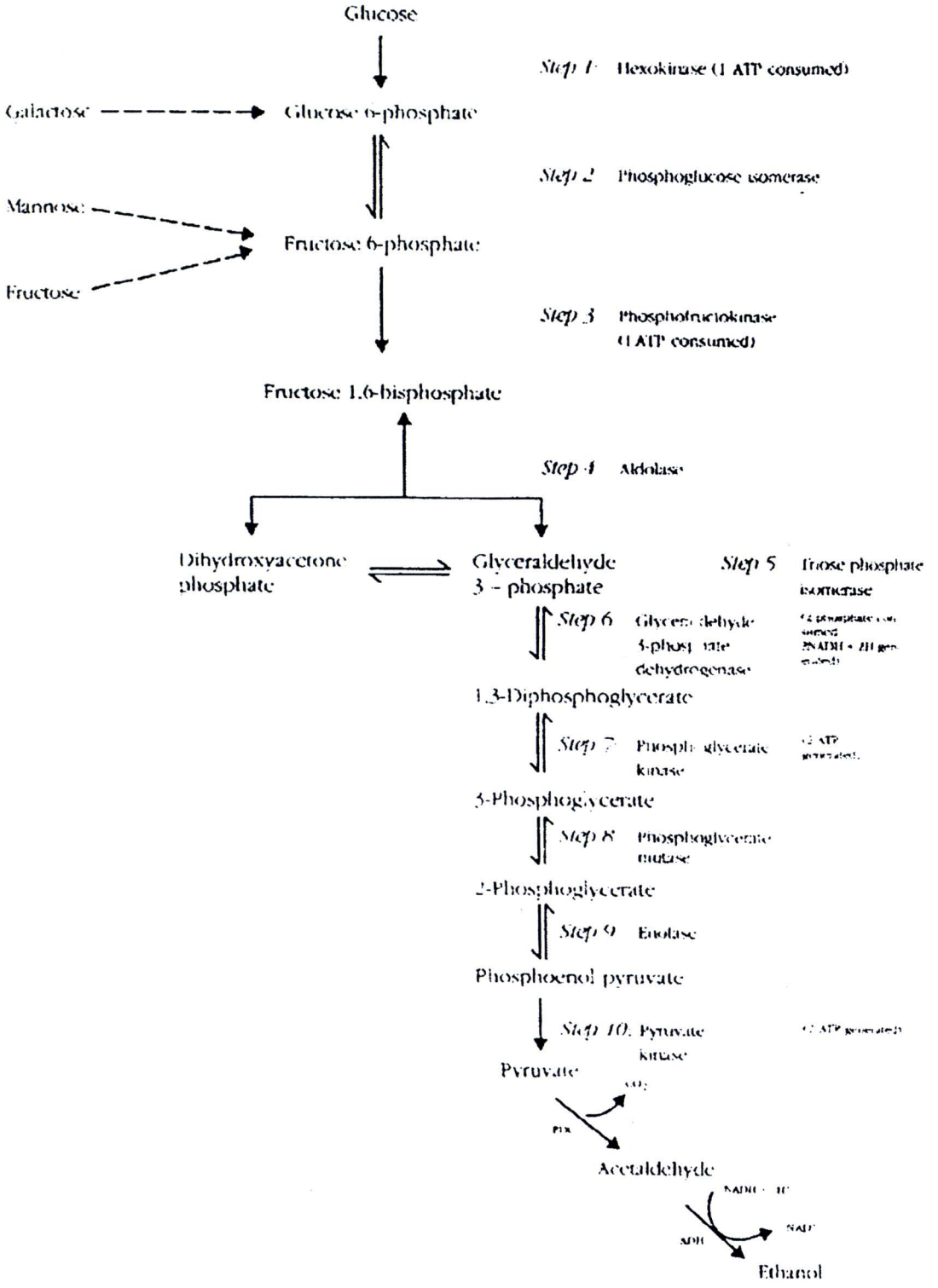
ข้อเสียของการสังเคราะห์เอทานอลด้วยวิธีทางเคมี

ต้องใช้สารเคมีที่จำเพาะมากเป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์เอทานอล สารเคมีที่จำเพาะค่อนข้างมีราคาสูง เมื่อเทียบกับวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตร เอทานอลที่ได้มีสารเคมีตัวอื่น ๆ ปนมาในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ ซึ่งสารเหล่านั้นมีอันตราย กฎหมายจึงไม่อนุญาตให้นำเอทานอลจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีไว้ใช้รับประทานหรือใช้กับสิ่งมีชีวิตภายในร่างกาย และนอกจากนี้แล้วในการสังเคราะห์เอทานอลในทางเคมี สภาวะในการเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างสูงหรือจำเพาะ

2.1.4.2 การสังเคราะห์เอทานอลทางชีวภาพ

กระบวนการสังเคราะห์เอทานอลทางชีวภาพ อาศัยการใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ และเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล ในทางทฤษฎีจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ สารตั้งต้นซึ่งมักจะหมายถึงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (น้ำตาลกลูโคส) จะถูกใช้โดยยีสต์ โดยเซลล์ยีสต์จะนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ และเปลี่ยนไปเป็นสารตัวกลางต่าง ๆ ในวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) หรือผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (รูปที่ 2.8) โดยไม่มีการใช้อากาศในปฏิกิริยา น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไพรูวิก 2 โมเลกุล จากนั้นกรดไพรูวิกที่เกิดขึ้นนี้ จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยอาศัยเอ็นไซม์

ผ่านวิถีการสังเคราะห์เอทานอลซึ่งจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ โดยทฤษฎีแล้วน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล สามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้ 51% (กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคสที่ใช้) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 49% (กรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกรัมกลูโคสที่ใช้)



ภาพที่ 2.8 การสลายน้ำตาลกลูโคสโดยวิถีไกลโคไลซิสเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดไพรูวิก แล้วกรดไพรูวิก ถูกสลายต่อเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Walker, 1997)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้โดยทั่ว ๆ ไป ได้แก่ *Saccharomvces cerevisiae*, *S. fragillis*, *S. uvarium*, *Kluyveromyces fragillis*, *Nematospora* sp., *Shizosaccharomyces* sp. และ *Zymomonas mobilis* เป็นต้น

กลไกในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทานอลภายในเซลล์จุลินทรีย์

กลไกในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทานอลภายในเซลล์จุลินทรีย์ เกิดผ่านกลไกหรือวิถีการสังเคราะห์ที่สำคัญคือ วิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) หรือ Embden Meyorhof-Parnas (EMP) pathway ในสภาวะที่ไม่ใช้อากาศ และระบบมีความเป็นกลางหรือกรดเล็กน้อย และมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน น้ำตาลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไพรูวิก ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลได้ โดยมีขั้นตอนดังภาพที่ 2.9 (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539)

(1) glucose + ATP (adenosine triphosphate) —hexokinase—> glucose-6-phosphate + ADP (adenosine diphosphate)

(2) glucose-6-phosphate —phosphoglucoisomerase—> fructose-6-phosphate

(3) fructose-6-phosphate —phosphofructokinase—> fructose-1,6-diphosphate

(4) fructose-1,6-diphosphate —aldolase—> dihydroxyacetone phosphate + glyceraldehyde-3- phosphate

dihydroxyacetone phosphate —triosephosphate isomerase—> glyceraldehyde-3- phosphate

(5) glyceraldehyde-3- phosphate + NAD^+ + Pi —glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase—> 1,3- diphosphoglycerate + NADH + H^+

(6) 1,3- diphosphoglycerate + ADP —phosphoglycerate kinase—> 3-phosphoglycerate + ATP

phosphoglyceromutase

(7) 3-phosphoglycerate ---------- > 2-phosphoglycerate

enolase

(8) 2-phosphoglycerate -------> phosphoenol pyruvate

pyruvate kinase

(9) phosphoenol pyruvate + ADP -------> pyruvate + ATP

ภาพที่ 2.9 กลไกในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทานอลภายในเซลล์จุลินทรีย์

หลังจากที่กลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซิสแล้ว ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะได้กรดไพรูวิก 2 โมเลกุล โดยกรดไพรูวิกจะเปลี่ยนไปเป็นสารต่าง ๆ ที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกลไกการใช้กรดนี้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และสภาวะในการดำรงชีวิตขณะนั้นเป็นเช่นไร เช่น จุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติคจะเปลี่ยนกรดไพรูวิกไปเป็นกรดแลคติคในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ถ้ามีอากาศกรดนี้จะเข้าสู่กระบวนการผลิตเซลล์หรือสร้างผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น หรือถ้าเป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้อากาศจะเปลี่ยนกรดไพรูวิก ไปเป็นอะเซททิลโคเอก่อนนำเข้าสู่วัฏจักรเครบ แล้วเข้าสู่กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน ซึ่งจะมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย โดยให้พลังงานประมาณ 32 ATP ปริมาณพลังงานจะมากเท่าใดขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่มีการสลายพลังงาน หรือขึ้นกับกลไกของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นในการสลายสารให้พลังงาน ส่วนจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลได้ ในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะเปลี่ยนกรดไพรูวิกไปเป็นเอทานอล โดยมีขั้นตอนดังภาพที่ 2.10

pyruvate decarboxylase

(1) pyruvic acid -------> acetaldehyde + CO_2

alcohol dehydrogenase

(2) acetaldehyde + NADH + H^+ --------> ethanol + NAD^+

ภาพที่ 2.10 ขั้นตอนเปลี่ยนกรดไพรูวิกไปเป็นเอทานอล

ข้อดีของการสังเคราะห์เอทานอลด้วยวิธีทางชีวภาพ

ต้นทุนของวัตถุดิบมีราคาถูกเมื่อเทียบกับวิธีการสังเคราะห์เอทานอลด้วยวิธีทางเคมี ทั้งนี้เพราะวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์มักเป็นผลิตผลทางการเกษตร ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมาก หาได้ง่าย และมีราคาต่ำ โดยเฉพาะของเหลือทิ้งทางการเกษตร นอกจากนี้ข้อดีทางอ้อมคือ ช่วยเพิ่มมูลค่าให้แก่พืชผลทางการเกษตร ทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มมากขึ้น ช่วยลดขยะรักษาสิ่งแวดล้อม และผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้ตัวอื่นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ใช้ทำน้ำแข็งแห้ง น้ำโซดา หรือสารตั้งต้นในปฏิกิริยาเคมี เอนไซม์อิน

เวอร์เทสใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ ตัวยีสต์อาจใช้เป็นอาหารเสริมวิตามินบี ใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหารที่ซึ่งจะให้รสมันเนย หรือใช้เป็นอาหารสัตว์

ข้อเสียของการสังเคราะห์เอทานอลด้วยวิธีทางชีวภาพ

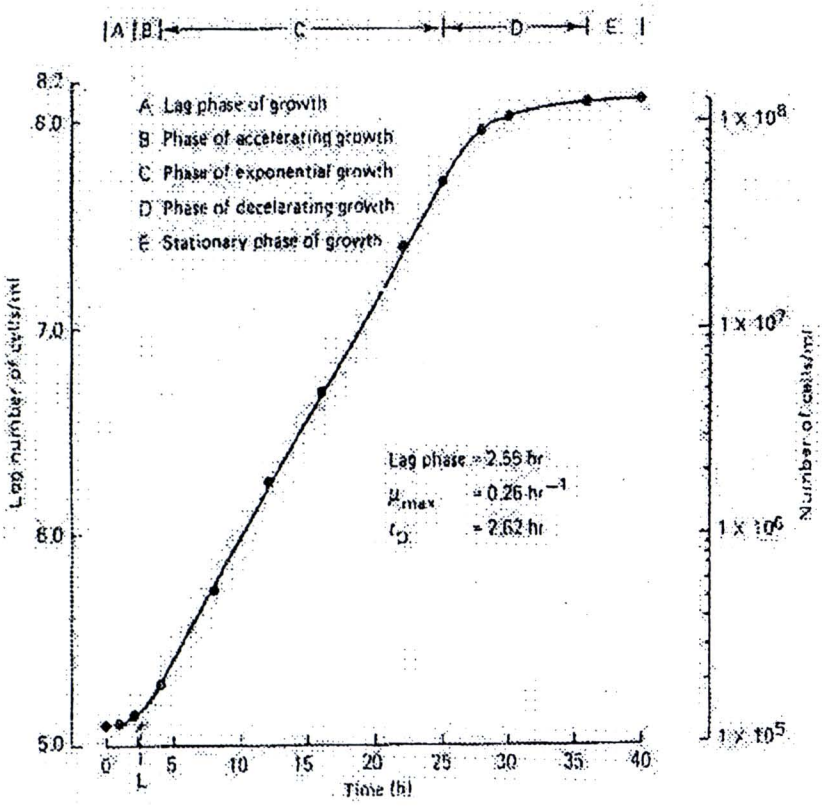
กระบวนการผลิตเอทานอลเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ทำให้ต้องใช้แรงงาน และการดูแลเอาใจใส่มากกว่าวิธีการทางเคมี นอกจากนี้หากต้องการปริมาณผลผลิตที่มากจำเป็นต้องใช้ระบบการผลิตที่ใหญ่ขึ้น ซึ่งอาจทำให้ต้นทุนของเครื่องมืออุปกรณ์สูงขึ้น และในบางครั้งหากใช้วัตถุดิบที่จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้ได้โดยตรง จำเป็นที่จะต้องปรับสภาพหรือเปลี่ยนไปเป็นสารตั้งต้นที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ก่อน ซึ่งทำให้เกิดความยุ่งยากซับซ้อนและเสียค่าใช้จ่ายมากขึ้น

2.1.5 กระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอทานอล

กระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยทั่วไป แบ่งได้ดังนี้ (รัตนภรณ์, 2542)

2.1.5.1 กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture)

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบนี้จะมีการเติมสารอาหารเมื่อเริ่มต้นเท่านั้น ปฏิกิริยาชีวภาพจะดำเนินไปจนกว่าจะถึงจุดที่ต้องการแล้วจึงเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ โดยทั่วไปจะรอจนผลิตภัณฑ์มีปริมาณสูงสุดและมีอัตราการเปลี่ยนแปลงสั้นที่สุด ถ้าดูจากกราฟการเจริญของจุลินทรีย์ (ภาพที่ 2.11 และ 2.12 A) ควรหยุดการหมักตอนต้นของช่วง D หรือช่วง decelerating growth



ภาพที่ 2.11 ลักษณะการเจริญของยีสต์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะ (Walker, 1997)

โดยทั่วไปนิยมใช้ระบบนี้กับกระบวนการหมักขนาดเล็ก เพราะจะมีราคาถูกและประหยัด ควบคุมการทำงานง่าย เช่น การหมักไวน์ เบียร์ สุราและแอลกอฮอล์ เป็นต้น นอกจากนี้กระบวนการที่ต้องควบคุมสภาวะ ส่วนใหญ่จะใช้ระบบนี้เช่น การผลิตเอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ สารประกอบอินทรีย์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการเพาะเลี้ยงไฮบริโดมา (hybridoma) เป็นต้น

2.1.5.2 กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (Fed-batch culture)

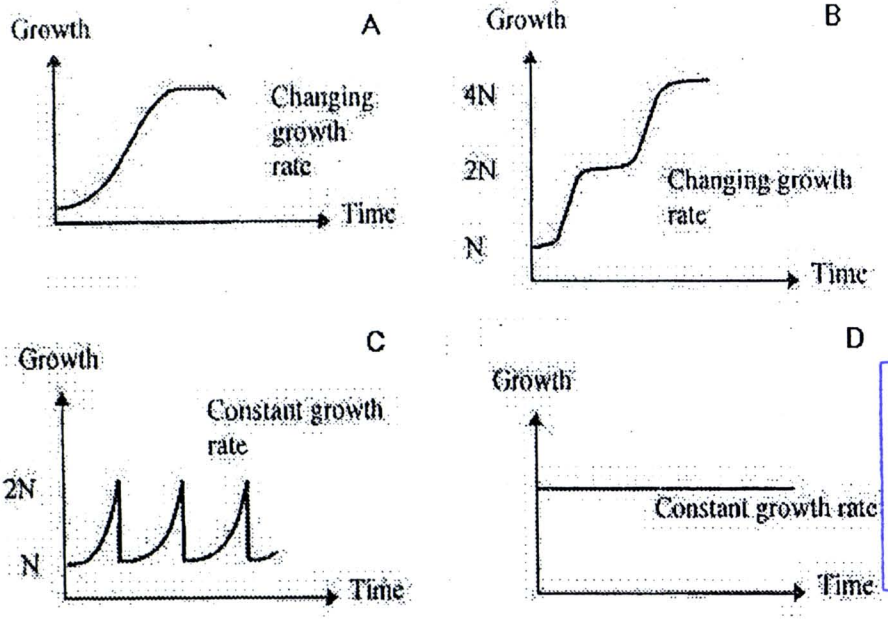
การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะเป็นระบบที่มีการป้อนสารอาหารเข้าไปในระบบเป็นระยะ ๆ และจะหยุดการหมักเมื่อผลิตภัณฑ์มีปริมาณสูงสุด และจะมีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับปริมาตรทำงาน (working volume) ของถังหมัก ระบบนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อลดปัญหาการที่มีความเข้มข้นของอาหารสูงเกินไป ซึ่งอาจยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้การหมักหยุดก่อนการใช้อาหารหมด ภาพที่ 2.12 B แสดงการเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ

2.1.5.3 กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous culture)

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องจะเริ่มต้นแบบการเพาะเลี้ยงแบบกะก่อน เมื่ออาหารที่ให้ในระบบใกล้จะหมด จะมีการดึงน้ำหมักบางส่วนออกจากระบบเพื่อเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ โดยจะเหลือน้ำหมักส่วนหนึ่งไว้ในถังหมัก หลังจากนั้นจะมีการป้อนสารอาหารใหม่เข้าไปในระบบในปริมาตรเท่ากับที่ดึงน้ำหมักออก เพื่อให้ปริมาตรทำงานคงที่ และเมื่ออาหารในระบบใกล้จะหมดอีก ก็จะมีการดึงน้ำหมักและป้อนสารอาหารเข้าไปใหม่อีกครั้ง ทำเช่นนั้นไปเรื่อย ๆ คล้ายเป็นการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ระบบจะเข้าสู่สภาวะที่เรียกว่าสภาวะคงที่เทียม (pseudo-steady state) (ภาพที่ 2.12 C) ข้อดีของกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบนี้ คือ สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ต่อเนื่องระบบไม่แพงเท่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง และสารอาหารที่ให้เข้าไปมีการใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนข้อเสียคือ ต้องระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตัวอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ และต้องใช้แรงงานคนคอยดูแลติดตามการใช้อาหารของจุลินทรีย์ และการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์พร้อมกับการให้อาหารชุดใหม่

2.1.5.4 กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous culture)

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบนี้จะมีการเติมอาหารให้แก่ระบบอย่างต่อเนื่อง พร้อม ๆ กับมีการไหลออกของน้ำหมักอย่างต่อเนื่อง โดยมีอัตราการไหลเข้าและออกของระบบต้องไม่ควรสูงกว่าอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันการชะจุลินทรีย์ออกจากระบบ ทำให้ไม่มีจุลินทรีย์ในระบบการเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงในช่วงหลังจะคงที่ (steady state) ไม่ขึ้นกับเวลา (ดังภาพที่ 2.12 D) ระบบการเพาะเลี้ยงแบบนี้เหมาะกับระบบที่ต้องการการผลิตสูงและมีการควบคุมระบบแบบอัตโนมัติ ตัวอย่างของการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ใช้การเพาะเลี้ยงแบบนี้ เช่น การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวทดแทนอาหารสัตว์ และระบบการหมักก๊าซชีวภาพจากของเสียโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น (สมใจ, 2544)



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่ง
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่...0 2 ต.ค. 2555.....
เลขทะเบียน.....248110
เลขเรียกหนังสือ.....

พที่ 2.12 ลักษณะของกระบวนการหมักแบบ A) Batch culture; B) Fed-batch culture; C) Semi-continuous lture; D) Continuous culture (Walker, 1997)

2.1.6 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้ วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวเ น้ำมันสำปะหลัง มันฝรั่ง ฯลฯ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย กากน้ำตาล หัวบีท ข้าวฟ่างหวาน ฯลฯ และ เถุดิบประเภทเส้นใยเช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ฯลฯ วัตถุดิบประเภทแป้งและเซลลูโลสจะถูกย่อยด้วยกรดหรือ นไซม์ให้เป็นน้ำตาลก่อน แต่วัตถุดิบประเภทที่เป็นน้ำตาลอยู่แล้วสามารถนำไปใช้หมักได้เลย ระยะเวลาในการ มักเพื่อให้ได้เอทานอลจะประมาณ 48 ชั่วโมง จะได้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 8-12 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

2.1.6 .1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล

วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล หัวบีท ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น

2.1.6 .1.1 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ

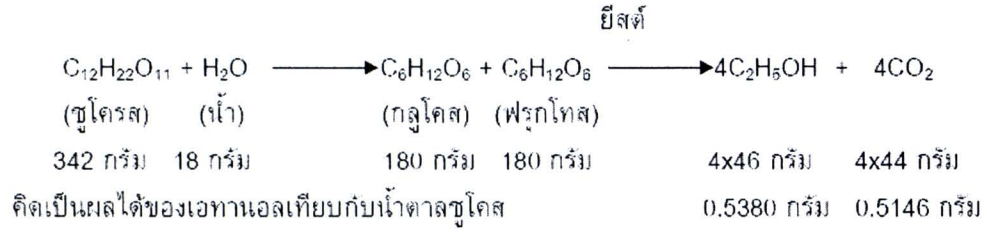
ตามทฤษฎี แล้วในกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของยีสต์นั้น น้ำตาลกลูโคส 100 กรัม จะถูก ลี่ยนเป็นเอทานอล 51.11 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.89 กรัม นอกจากนั้นยังมีพลังงานความร้อนเกิดขึ้นอีก 3.7 กิโลแคลอรี่ (Kcal) ดังแสดงในภาพที่ 2.13

$C_6H_{12}O_6$ + ยีสต์	⟶	$2C_2H_5OH$	$+ 2CO_2$	+ 28.7 Kcal
(กลูโคส)		(เอทานอล)	(คาร์บอนไดออกไซด์)	
180 กรัม		2x46 กรัม	2x44 กรัม	
คิดเป็นร้อยละ 100 กรัม		51.11 กรัม	48.89 กรัม	

ภาพที่ 2.13 การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลโดยการหมักของยีสต์

2.1.6 .1.2 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบ

กากน้ำตาล และน้ำตาลจากหัวบีท ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส ที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ประกอบกด้วย น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสนั้นมีขั้นตอนดังนี้ คือ ขั้นแรกน้ำตาลซูโครสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ได้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสอย่างละโมเลกุล จากนั้นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสจะถูกยีสต์เปลี่ยนไปเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์อย่างละ 4 โมเลกุล (ภาพที่ 2.14)



ภาพที่ 2.14 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นเอทานอล

2.1.6 .2. วัตถุดิบประเภทแป้ง

วัตถุดิบประเภทแป้งที่ใช้ในการผลิต ได้แก่ มันสำปะหลัง (ทั้งหัวมันสด และมันเส้น) ข้าวโพด ข้าว และเมล็ดข้าวฟ่าง เป็นต้น โดยแป้งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เมื่อนำแป้งมาผ่านกระบวนการย่อย (Hydrolysis) ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสที่สามารถเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอลได้ ในปัจจุบันนิยมย่อยแป้งด้วยเอนไซม์มากกว่ากรด เนื่องจากสามารถควบคุมการย่อยได้ง่ายกว่าและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากกว่า การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ประกอบด้วยการย่อย 2 ครั้ง คือ

- การย่อยแป้งครั้งแรกหรือการทำให้แป้งเหลว (Liquefaction) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์แอลฟาอะมิเลส (α-amylase) ย่อยแป้งที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่าเด็กทรินซ์ (Dextrin)

- การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายหรือการเปลี่ยนเป็นน้ำตาล (Saccharification) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์กลูโคอะมิเลส (Glucoamylase) ย่อยเด็กทรินซ์ที่อุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส ให้ได้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งยีสต์สามารถใช้หมักเป็นเอทานอลได้ โดยกระบวนการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้งสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 2.15

อะมิโลไลติกเอนไซม์ ยีสต์

$H(C_6H_{10}O_5)OH + nH_2O \longrightarrow nC_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2nC_2H_5OH + 2nCO_2$

(แป้ง) (น้ำ) (กลูโคส) (เอทานอล)

162 กรัม (มอนอเมอร์) 180 กรัม 2x46 กรัม 2x44 กรัม

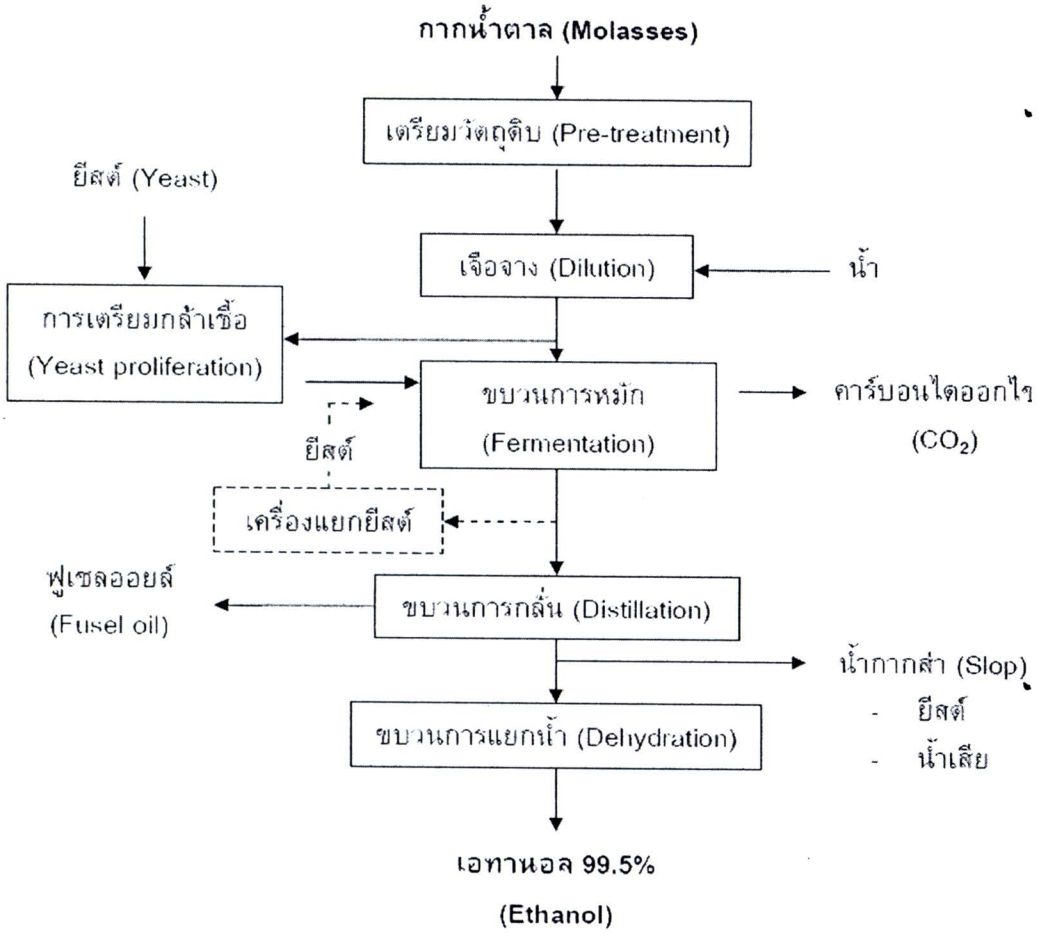
คิดเป็นผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง 0.5679 กรัมต่อกรัม

ภาพที่ 2.15 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแป้งไปเป็นเอทานอล

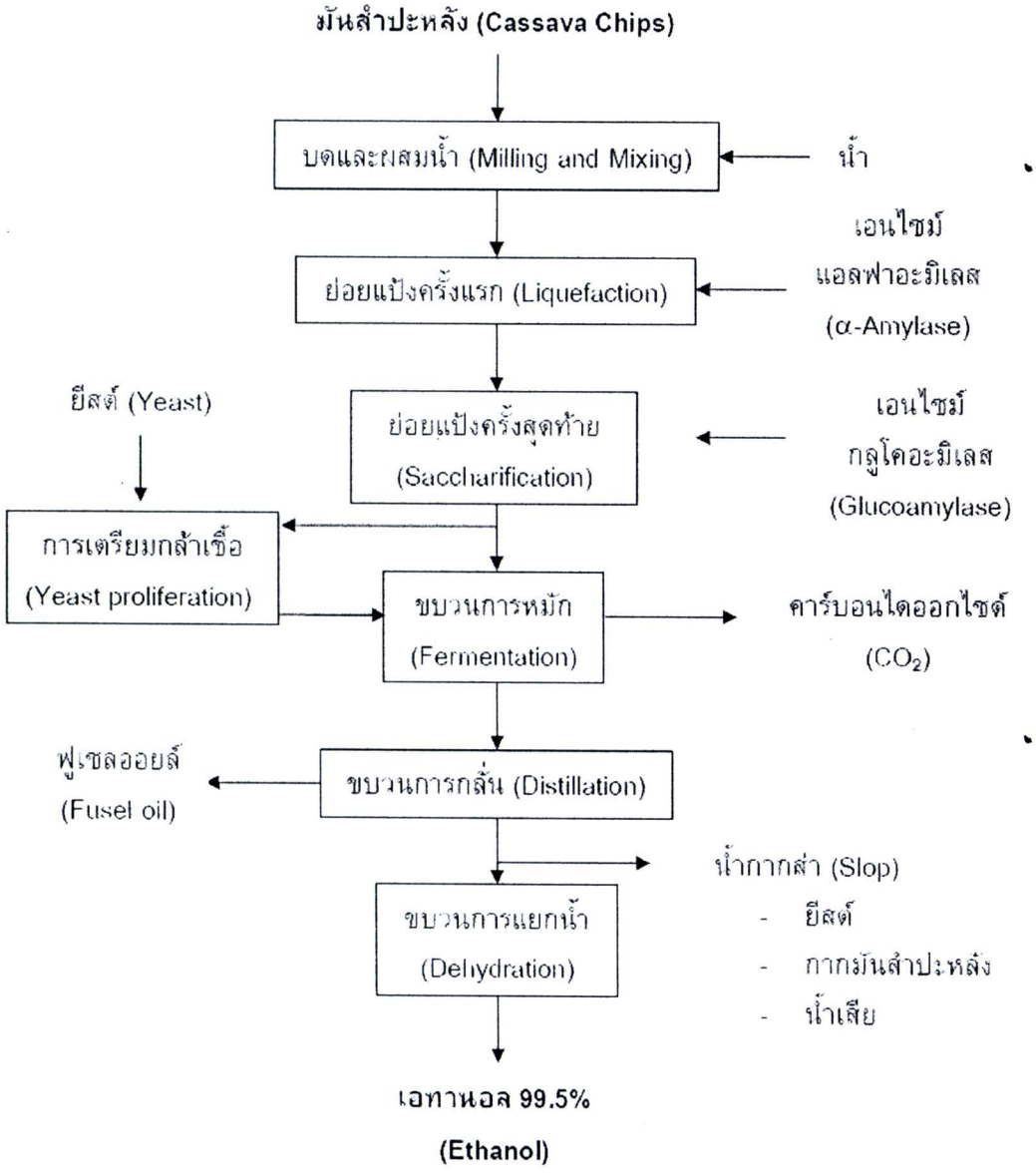
2.1.6 .3. วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด และเศษไม้ เป็นต้น วัตถุดิบประเภทนี้มีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) โดยเซลลูโลสเป็นพอลิเมอรของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวและอยู่ในรูปผลึกมีลักษณะเป็นเส้นใยเหนียวและไม่ละลายน้ำ เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอรของน้ำตาลเพนโทส (pentose) หลายชนิด เช่น ไซโลส (xylose) แมนโนส (mannose) และอะราบิโนส (arabinose) เป็นต้น ส่วนลิกนินเป็นพอลิเมอร์ของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) ซึ่งทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก

ขั้นตอนในการผลิตเอทานอลโดยทั่วไปจะประกอบด้วยการเตรียมวัตถุดิบ (raw material preparation) การหมัก (fermentation) การกลั่น (distillation) และการกำจัดน้ำ (dehydration) ซึ่งในกรณีที่วัตถุดิบเป็นแป้งหรือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสจะต้องมีขั้นตอนการย่อยเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลก่อนการหมัก แผนภาพการผลิตเอทานอลโดยใช้กากน้ำตาลและมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบแสดงดังภาพที่ 2.16 และ 2.17 ตามลำดับ



ภาพที่ 2.16 ไดอะแกรมแสดงกระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล



ภาพที่ 2.17 ไดอะแกรมแสดงกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง

2.2 แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis*

โดยปกติจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลคือยีสต์ (yeast) ซึ่งยีสต์ที่สำคัญคือ ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* อย่างไรก็ตามก็ยังมีการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นในการหมักแอลกอฮอล์ด้วยเช่นกัน รวมถึงแบคทีเรียสกุล *Zymomonas* ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Z. mobilis* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ เช่น ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่า 3-4 เท่าเมื่อใช้น้ำตาลเท่ากัน แต่มีข้อด้อยกว่ายีสต์คือแบคทีเรียใช้น้ำตาลได้จำกัด คือใช้น้ำตาลได้ 3 ชนิดคือ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส ในขณะที่ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิดกว่าแบคทีเรีย แต่เพื่อให้แบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลได้มากขึ้นจึงมีการปรับปรุงสาย

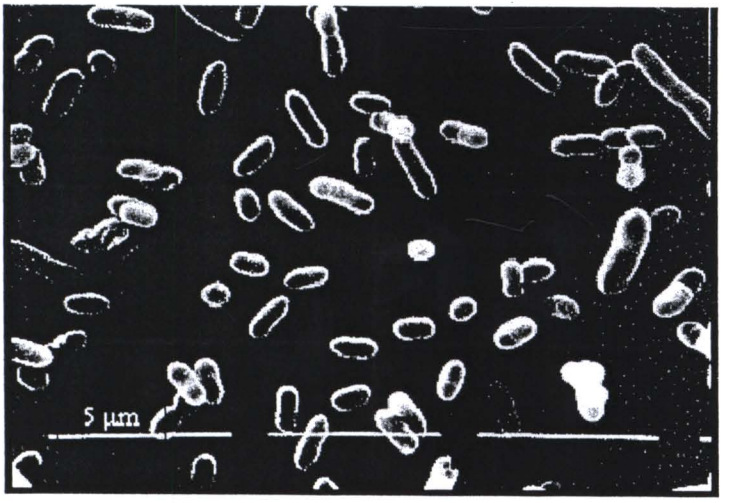
พันธุ์โดยใช้เทคนิคทางพันธุ์วิศวกรรม (genetic engineering) เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นคือ สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลาย ทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น แม้ว่าจะได้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Z. mobilis* ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นแต่การนำแบคทีเรียมาใช้ค่อนข้างที่จะยาก เพราะโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่คุ้นเคยกับยีสต์มากกว่า (ที่มา : www.nrel.gov)

2.2.1 ลักษณะของแบคทีเรียสกุล *Zymomonas*

Zymomonas เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นท่อนตรงและมีส่วนปลายโค้งเล็กน้อย ขนาดกว้าง 1 – 1.4 ไมครอน และยาว 2 – 6 ไมครอน (ภาพที่ 2.18) มักอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ๆ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ ย้อมติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต แต่สามารถเจริญเติบโตได้ในที่มีออกซิเจน ไม่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร nutrient broth และ nutrient agar ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) และ ฟรุกโตส (fructose) ได้เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถแบ่งแบคทีเรีย *Zymomonas* ออกได้เป็น 2 สปีชีส์ คือ *Z. mobilis* และ *Z. anareobia* โดยอาศัยความสามารถในการหมักน้ำตาลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) ฟรุกโตส (fructose) และ ซูโครส (sucrose) ได้ แต่ *Z. anareobia* สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) และ ฟรุกโตส (fructose) ได้เท่านั้น ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครส (sucrose) ได้ (มาโนช, 2546)

2.2.2 แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* กับการผลิตเอทานอล

Z. mobilis เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลได้สูงกว่ายีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม เมื่อทำการเปรียบเทียบปัจจัยทางจลศาสตร์ระหว่างจุลินทรีย์สองชนิดนี้ พบว่า *Z. mobilis* ให้ผลผลิตเอทานอล (ethanol yield) สูงกว่า และผลผลิตเซลล์ (biomass yield) ต่ำกว่ายีสต์ *Z. mobilis* มีอัตราการใช้น้ำตาลจำเพาะ (specific glucose consumption rate) และอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะ (specific ethanol production rate) สูงกว่ายีสต์ประมาณ 3 - 4 เท่า นอกจากนี้ยังให้ปริมาณผลิตผล (ethanol productivity) สูงถึง 120 - 200 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง



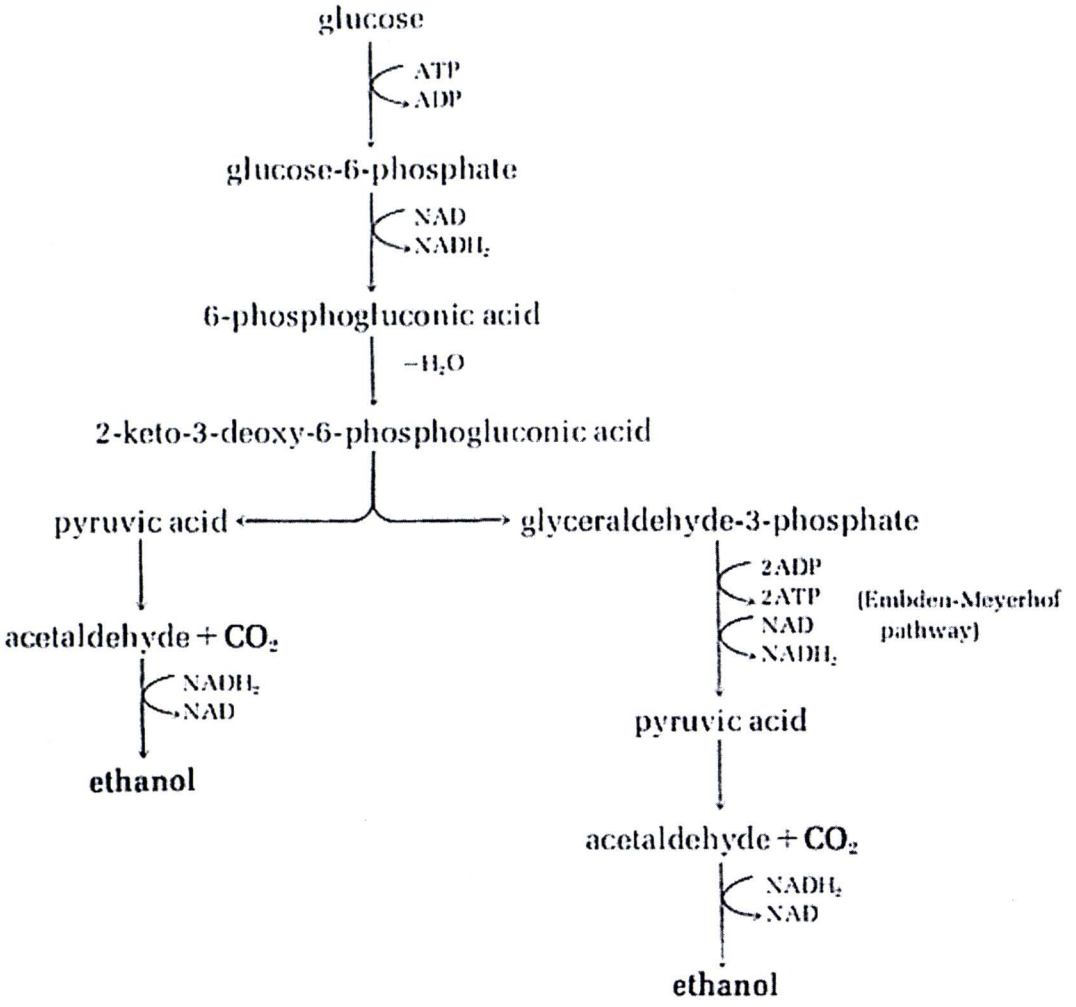
ภาพที่ 2.18 ลักษณะเซลล์แบคทีเรีย *Zymomonas* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

มีรายงานว่าแบคทีเรียในสกุลนี้สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ในสภาวะไร้ออกซิเจนผ่านวิถี Entner–Doudoroff Pathway (ภาพที่ 2.19) ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแรกที่สามารถดำรงชีวิตแบบไม่ใช้ออกซิเจน โดยใช้กลไกที่พบได้ในเฉพาะแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนอย่างแท้จริงเท่านั้น (strictly anaerobic bacteria)

Tripetchkul และคณะ (1993) พบว่า ในการเพาะเลี้ยง *Z. mobilis* การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างจะสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเมื่อจุลินทรีย์มีการใช้น้ำตาลกระบวนการขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์และกระบวนการสร้างพลังงานของ *Z. mobilis* จะมีการปลดปล่อยโปรตอนออกมา ส่งผลให้ความเป็นกรดด่างของอาหารลดลง และเมื่อกลูโคสหมดลง จุลินทรีย์จะใช้แหล่งไนโตรเจนซับซ้อนในอาหารแทน ผลของกระบวนการเมตาบอลิซึม ส่งผลให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียออกมา ความเป็นกรดด่างของอาหารจึงสูง จึงมีความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้หลักการดังกล่าวในการควบคุมการป้อนสารอาหารในกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องด้วยระบบ pH - auxostat โดย *Z. mobilis*

Rogers และคณะ (1980) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรีย *Z. mobilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 10-25 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และเลี้ยงแบบกะ ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย *Z. mobilis* สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ *Saccharomyces uvarum* พบว่าแบคทีเรีย *Z. mobilis* จะมีอัตราจำเพาะของการใช้น้ำตาลกลูโคสกับอัตราจำเพาะของการผลิตเอทานอลสูงกว่ายีสต์ และให้มวลเซลล์ต่ำกว่าดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งได้เปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด โดยหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และหมักแบบกะ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพที่ 2.19 Entner – Doudoroff Pathway (ที่มา: http://textbookofbacteriology.net/metabolism.html)

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* และ *S. uvarum*

ค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์	*Z. mobilis*	*S. uvarum*
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.13	0.055
อัตราจำเพาะของการใช้น้ำตาลกลูโคส (กรัมน้ำตาลกลูโคสต่อกรัมมวลเซลล์ต่อชั่วโมง)	5.5	2.1
อัตราจำเพาะของการผลิตเอทานอล (กรัมเอทานอลต่อกรัมมวลเซลล์ต่อชั่วโมง)	2.5	0.87
ผลได้ของมวลเซลล์ (กรัมมวลเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป)	0.019	0.033
ผลได้ของเอทานอล (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป)	0.47	0.44
ผลได้ของเอทานอลสัมพัทธ์	92.5	86.0
ความเข้มข้นสูงสุดของเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	102.0	108.0

(Rogers et al., 1980)

Gunasekaran และคณะ (1986) ได้ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล (ค่าความเป็นกรดด่าง และความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น) ของเชื้อ *Z. mobilis* 4 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ ATCC 10988, ATCC 12526, NRRL B 4286 and IFO 13756) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 เป็นสภาวะที่มีความเหมาะสมต่อสายพันธุ์ ATCC 10988 และ ATCC 12526 ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 เป็นสภาวะที่มีความเหมาะสมต่อสายพันธุ์ NRRL B 4286 และ IFO 13756 จากนั้นได้นำเชื้อทั้งหมดนี้มาหมักในอาหารที่แตกต่างกันคือ อาหารสังเคราะห์ น้ำอ้อย และกากน้ำตาล เพื่อเปรียบเทียบกัน ผลการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ NRRL B 4286 ให้ปริมาณการผลิตเอทานอลสูงสุดเมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์ สายพันธุ์ ATCC 10988 และ ATCC 12526 ให้ปริมาณการผลิตเอทานอลสูงเมื่อหมักในน้ำอ้อย แต่ทุกสายพันธุ์จะผลิตเอทานอลได้ต่ำเมื่อหมักในกากน้ำตาล

Szambelan และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแก่นตะวันโดยใช้จุลินทรีย์ร่วมระหว่าง *S. cerevisae* และ *Z. mobilis* กับ *K. fragilis* ผลการศึกษาพบว่าผลได้ของเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ ในสภาวะเชื้อผสม แต่ในสภาวะเชื้อเดี่ยว ผลได้ของเอทานอลมีค่าประมาณ 0.46 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ เมื่อเทียบค่าปริมาณผลได้ในทางทฤษฎีพบว่าการใช้เชื้อผสมทำให้ปริมาณการผลิตเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 2-12 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เมื่อเทียบกับสภาวะการใช้เชื้อเดี่ยว นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ *K. fragilis* ร่วมกับ *Z. mobilis* 3881 ในการผลิตเอทานอลจากแก่นตะวันสายพันธุ์ Rubik ให้เอทานอลสูงถึง 94 เปอร์เซ็นต์ และได้ผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.41 – 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ ซึ่งสูงกว่าการใช้ *K. fragilis* ร่วมกับ *S. cerevisae* (0.39 – 0.44 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้) ในขณะที่การใช้เชื้อเดี่ยว คือ *S. cerevisae* ได้ผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.34 – 0.43 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และ *Z. mobilis* ได้ผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.37 – 0.46 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้น้ำตาลเพื่อหมักเอทานอลในสภาวะเชื้อผสมจะผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงถึง 96 – 99 เปอร์เซ็นต์ ของผลได้ในทางทฤษฎี

2.3 แก่นตะวัน

แก่นตะวัน หรือ Jerusalem artichoke มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus* L. เป็นพืชล้มลุกที่ใกล้ชิดกับทานตะวัน ลำต้นมีขนคล้ายหนามกระจายทั่วลำต้น ขอบใบมีรอยหยักแบบฟันปลา พื้นผิวใบสาก มีความสูงประมาณ 1.5 – 3.0 เมตร มีดอกคล้ายทานตะวัน และบัวตอง แต่มีขนาดเล็กกว่า (ภาพที่ 2.20) มีหัวใต้ดินลักษณะหัวตะปุ่มตะป่ำ คล้ายหัวขิง ข่า หรือคล้ายมันฝรั่ง เพื่อเก็บสะสมอาหาร (ภาพที่ 2.21) คืออินูลิน(Inulin) ซึ่งจัดเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทหนึ่ง ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุคโตสต่อกันเป็นโมเลกุลยาวและต่อด้วยน้ำตาลกลูโคสในหน่วยสุดท้าย พืชนี้มีถิ่นกำเนิดในเขตหนาวของประเทศสหรัฐอเมริกา แต่สามารถปลูก และปรับตัวได้ดีในสภาพเพาะปลูกของประเทศไทย การใช้ประโยชน์โดยใช้หัวเป็นอาหารคน และอาหารสัตว์ พบว่าต้นแก่นตะวันสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นอาหารเพื่อสุขภาพในการลดความอ้วน ลดไขมันในเส้นเลือด ลดความเสี่ยงการเป็นมะเร็งในลำไส้ ทั้งยังเป็นสมุนไพรใช้ได้กับสัตว์ เป็นน้ำหวานเลี้ยงผึ้ง รองรับในอุตสาหกรรมการท่องเที่ยว และที่สำคัญสามารถนำมาแปรรูปเป็นพลังงานทดแทน ผลิตเอทานอลได้ หัวแก่นตะวัน 1 ตัน สามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 80-100 ลิตร มากกว่าการผลิตเอทานอลจากอ้อย หรือข้าวฟ่าง (สนั่น จอกลอย, 2549)

Duke (1983) ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในหัวแก่นตะวันพบว่ามีความชื้นประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือ 20 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยโปรตีน 10-15 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 1 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรท (แป้ง) 70 -76 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใย 4-6 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบแร่ธาตุบางชนิด เช่น ฟอสฟอรัส (0.099 เปอร์เซ็นต์) แคลเซียม (0.023 เปอร์เซ็นต์) เหล็ก (3.4 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) และอะลูมิเนียม คลอรีน ไอโอดีน แมกนีเซียม โปแตสเซียม โซเดียม ซัลเฟอร์ และสังกะสี ในปริมาณเล็กน้อย นอกจากองค์ประกอบดังกล่าวแล้วยังพบว่าในส่วนหัวของแก่นตะวันยังมีวิตามินบี วิตามินซี อาร์จินิน ฮิสติดิน บีเทน โคลีน ในปริมาณเล็กน้อยด้วย

Szambelan และคณะ (2004) รายงานว่าคาร์โบไฮเดรตที่พบในหัวแก่นตะวันประกอบไปด้วยอินูลินและอินูลิดประมาณ 70 – 90 % ซึ่งโครงสร้างของอินูลินนี้ประกอบไปด้วยหน่วยย่อยๆ ของน้ำตาลฟรุกโตส (D-fructose) ที่ต่อกันด้วยพันธะ β (2$\longrightarrow$1) มีลักษณะโครงสร้างเป็นเส้นตรง (ยาวไม่น้อยกว่า 30 โมเลกุล) และต่อด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) ด้วยพันธะ α (1$\longrightarrow$2) ในหน่วยสุดท้าย

ภาพที่ 2.20 ลักษณะลำต้นและดอกของแก่นตะวัน

ภาพที่ 2.21 ลักษณะของหัวแก่นตะวัน

2.3.1 กระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวแก่นตะวัน

กระบวนการผลิตเอทานอลจากแก่นตะวันประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลักๆ ได้แก่ ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อและการหมัก ขั้นตอนการแยกผลิตภัณฑ์และทำเอทานอลให้บริสุทธิ์ และขั้นตอนการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์รองและของเสียจากการผลิต (ภาพที่ 2.22)

1) การเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก

หัวแก่นตะวันที่ใช้จะต้องนำมาล้างทำความสะอาดก่อนแล้วนำเข้าเครื่องตีป่น ซึ่งจะได้วัตถุดิบในรูปของหัวบด ถ้าต้องการใช้วัตถุดิบที่อยู่ในรูปของน้ำคั้นก็นำส่วนของหัวบดนี้ไปคั้นเอาเฉพาะน้ำและแยกเอากากออก เมื่อได้วัตถุดิบแล้วก็นำไปย่อยสลายสารประกอบอินูลินให้อยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวซึ่งสามารถทำได้โดย วิธีที่ 1 การย่อยด้วยกรด (Acid hydrolysis): ในขบวนการย่อยนี้จะใช้กรด เช่น ไฮโดรคลอริก (HCl) หรือซัลฟิวริก (H_2SO_4) เป็นตัวทำปฏิกิริยา โดยใช้กรดปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของวัตถุดิบให้มีค่าเท่ากับ 2.0 จากนั้นให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของวัตถุดิบให้มีค่าเท่ากับ 5.0 – 5.5 และนึ่งฆ่าเชื้อวัตถุดิบก่อนใช้หมัก วิธีที่ 2 การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis) ในขบวนการย่อยนี้จะใช้เอนไซม์อินูลิเนสเป็นตัวทำปฏิกิริยา โดยใช้เอนไซม์อินูลิเนส 0.02 กรัม/หัวแก่นตะวันสด 1 กิโลกรัม ที่ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของวัตถุดิบเท่ากับ 5.0 จากนั้นให้ความร้อนที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และนึ่งฆ่าเชื้อวัตถุดิบก่อนใช้หมัก (Szambelan et al., 2004)

2) การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) และการหมัก (fermentation)

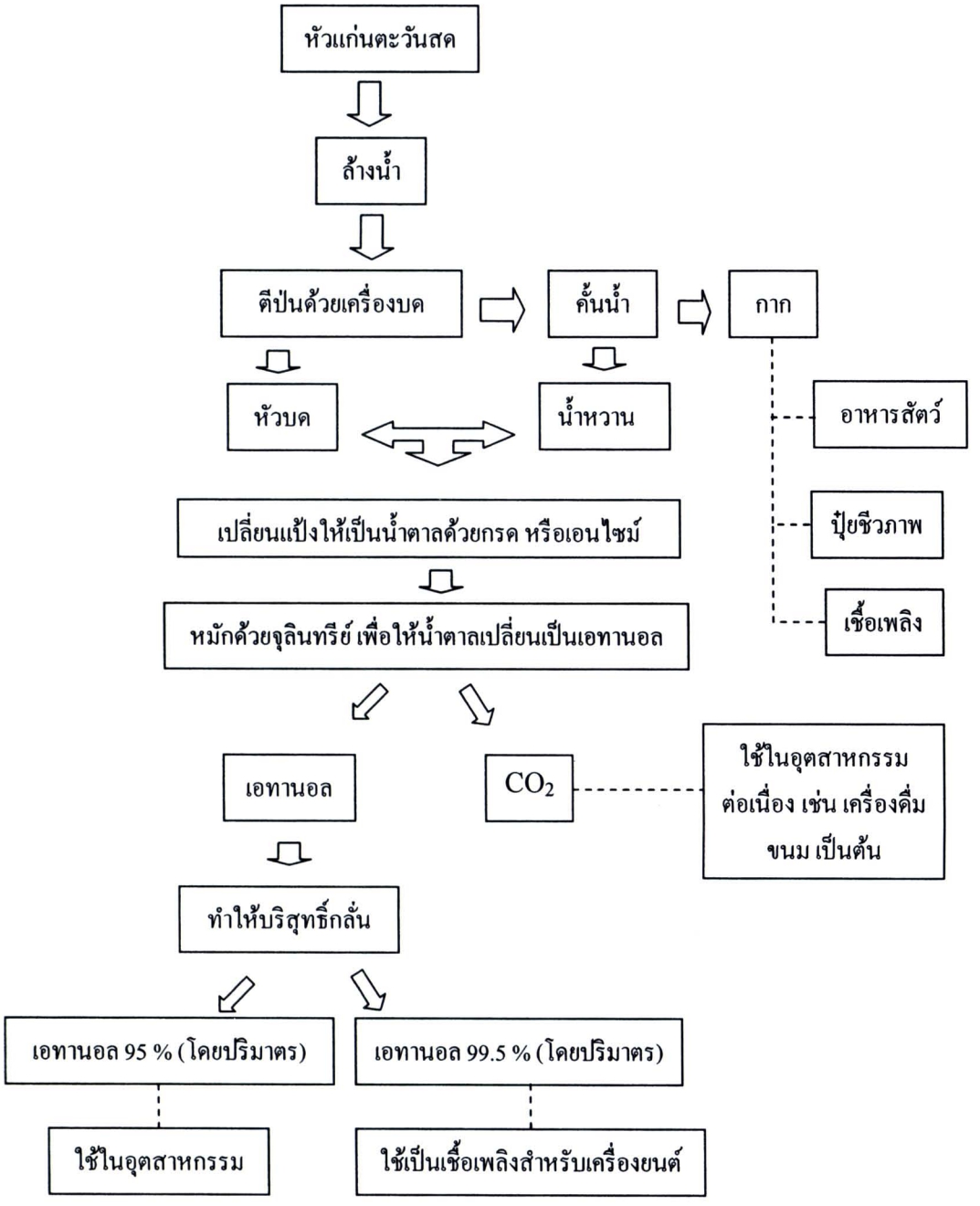
การเตรียมหัวเชื้อเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่แข็งแรงและมีปริมาณมากพอสำหรับการหมัก รวมทั้งต้องปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ เมื่อเตรียมหัวเชื้อเรียบร้อยแล้วจึงถ่ายลงในถังหมักผสมกับวัตถุดิบแล้วทำการปรับและควบคุมสภาวะของการหมัก เช่น อัตราการให้อากาศ (aeration rate) อัตราการกวน (agitation rate) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และอุณหภูมิระหว่างการหมัก ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของการหมัก และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ การหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ที่เกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ซึ่งจะมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และความร้อนเกิดขึ้น โดยทั่วไปจะใช้เวลาหมักประมาณ 2 – 3 วัน เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น

3) การแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์

เป็นขั้นตอนการนำเอทานอลออกจากน้ำหมัก โดยใช้กระบวนการทางเคมี ได้แก่ กระบวนการกลั่นลำดับส่วนซึ่งสามารถแยกเอทานอลให้ได้ความบริสุทธิ์ประมาณร้อยละ 95 โดยปริมาตร แต่สำหรับเอทานอลที่จะใช้ผลิตเป็นเชื้อเพลิงต้องมีความบริสุทธิ์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร เรียกว่าเอทานอลไร้น้ำ (anhydrous หรือ absolute ethanol) ซึ่งต้องใช้กระบวนการแยกต่อเนื่องไปอีก กระบวนการหลักๆ ที่นิยมใช้ประกอบด้วย 3 กระบวนการ คือ กระบวนการแยกด้วยวิธีกลั่นสกัดสารตัวที่สาม (extractive distillation with the third component) กระบวนการแยกด้วยเมมเบรน (membrane pervaporation) และกระบวนการแยกด้วยวิธีโมเลคูลาซีฟ (molecular seive separation) ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อเสียแตกต่างกัน การพิจารณาเลือกใช้ขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ของเอทานอลที่ได้รับว่าจะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทใด ความสะดวกในการปฏิบัติงาน และผลของต้นทุนการผลิตผลิตภัณฑ์ของเอทานอล

4) การใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์รองและของเสียจากการผลิตเอทานอล

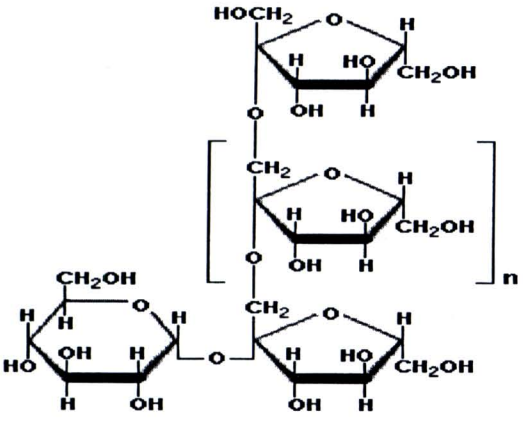
การผลิตเอทานอลจากแก่นตะวันนอกจากได้เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักแล้ว ยังเกิดผลิตภัณฑ์รองและของเสีย เช่น กาก ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ ปุ๋ยหมัก หรือใช้เป็นเชื้อเพลิง เป็นต้น ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ช่วยลดการปล่อยของเสียสู่สิ่งแวดล้อม ช่วยลดต้นทุนการผลิตและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับของเสียจากกระบวนการผลิต



ภาพที่ 2.22 แผนผังการผลิตเอทานอลจากแก่นตะวัน

2.4 อินูลิน (Inulin)

อินูลิน (Inulin) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลฟรุกโตสที่เชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรงที่ตำแหน่งบีตา 2, 1 (β - 2, 1 linked polyfructan) มีปลายด้านหนึ่งคือกลูโคสที่เชื่อมต่อกับฟรุกโตสในลักษณะการเชื่อมของซูโครส (ภาพที่ 2.23) โดยพบเป็นคาร์โบไฮเดรตสะสมในหัวและรากพืชหลายชนิดเช่น Jerusalem artichoke รักเร่ (dahlia) และชิโคริ (chicory) เป็นต้น (Selvakumar and Pandey, 1999)



ภาพที่ 2.23 โครงสร้างของอินูลิน

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลจากอินูลิน

Baipai และ Margaritis (1983) ได้ศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ *K. marxianus* UCD (FST) 55 – 82 ในอาหารที่มีเอทานอลเริ่มต้น 0 – 80 กรัมต่อลิตร โดยใช้อาหารเหลวซึ่งประกอบไปด้วยอินูลินที่สกัดได้จากหัวแก่นตะวัน 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเติม Tween 80 กรดไขมัน และน้ำล้างฝักข้าวโพดในปริมาณเล็กน้อย ผลการศึกษาพบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 0 – 80 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของเซลล์ *K. marxianus* ลดลงจาก 0.42 เป็น 0.09 ต่อชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณการผลิตเอทานอล ปริมาณเซลล์ และการใช้น้ำตาลมีค่าคงที่

Ohta และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากอินูลินบริสุทธิ์ โดยใช้วิธีการหมักแบบ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) โดยใช้ *Aspergillus niger* 817 ร่วมกับ *S. cerevisiae* 1200 ผลการศึกษาพบว่า *A. niger* 817 สามารถผลิตเอนไซม์อินูลิเนส (inulinase) ได้ และมีกิจกรรม (activity) สูงถึง 48.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการหมักอินูลินด้วยการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมอินูลินเป็นระยะๆ โดยการเพาะเลี้ยง *A. niger* 817 ร่วมกับ *S. cerevisiae* 1200 พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงถึง 20 – 21 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในระยะเวลาการหมัก 3 วัน

Szambelan และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแก่นตะวันด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* และยีสต์ *S. cerevisiae* และ *Kluyveomyces* sp. โดยการเพาะเลี้ยง *Z. mobilis* และ *S. cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนาน 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยง *Kluyveomyces* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเช่นกันนาน 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 140 รอบ/นาที จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปทดสอบการหมักในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่เติมวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยสารอินูลินด้วยเอนไซม์อินูลิเนสลงไป 200 กรัม (หัวแก่นตะวันบด) หรือ 200 มิลลิลิตร (น้ำคั้นหัวแก่นตะวัน) และเติมกล้าเชื้อลงไป 20 มิลลิลิตร ภายใต้การหมักแบบกะ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง พบว่าวิธีการย่อยอินูลินในหัวแก่นตะวันบด (mash) ด้วยเอนไซม์อินูลิเนสได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาน้อยกว่า และเมื่อนำมาใช้ผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรียได้เอทานอลเท่ากับ 78.3 – 90 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ในขณะที่การใช้ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 72.4 – 84.2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ส่วนน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยอินูลินในน้ำคั้นด้วยเอนไซม์อินูลิเนส เมื่อนำมาใช้ผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรียสามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 78.3 – 88.1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) และเมื่อใช้ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 74.4 – 82.2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบ

ประสิทธิภาพของวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์พบว่าวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าวัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยกรดถึง 2.0 – 9.2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เชื้อยีสต์ *Kluyveromyces* sp. ซึ่งมีความสามารถผลิตเอนไซม์อินูลิเนสได้ให้ผลดีเมื่อใช้กับน้ำคั้นแก่นตะวันมากกว่าเมื่อใช้กับหัวแก่นตะวันบด

Margarits และ Bajpai (1983) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแก่นตะวันโดย *K. marxianus* UCD (FST) 55-82 พบว่ายีสต์สามารถหมักให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 102 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดมีค่าแปรผันตั้งแต่ 0.44 ต่อชั่วโมง ที่น้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ถึง 0.13 ต่อชั่วโมง ที่น้ำตาลเริ่มต้น 300 กรัมต่อลิตร และผลผลิตเอทานอลมีค่าประมาณ 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้

Schorr-Galindo และคณะ (2000) ศึกษาอัตราการหมักเอทานอลจากแก่นตะวันโดยใช้เชื้อ *S. diastaticus* NCYC 625 ผลการศึกษาพบว่าเมื่ออัตราส่วนของน้ำตาลฟรุกโตสต่อกลูโคสเพิ่มขึ้น อัตราการผลิตเอทานอลโดยยีสต์จะลดลง ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่ออัตราส่วนของฟรุกโตสต่อกลูโคสเท่ากับ 6.0 มีค่าประมาณ 45 กรัมต่อลิตร แต่เมื่ออัตราส่วนของน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดลดลงเหลือ 3.5 เอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 65 กรัมต่อลิตร

Szambelan และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมระหว่าง *S. cerevisae* และ *Z. mobilis* กับ *K. fragilis* ผลการศึกษาพบว่าผลได้ของเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ในสภาวะเชื้อผสม แต่ในสภาวะเชื้อเดี่ยว ผลได้ของเอทานอลมีค่าประมาณ 0.46 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ เมื่อเทียบค่าปริมาณผลได้ในทางทฤษฎีพบว่าการใช้เชื้อผสมทำให้ผลได้ของเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 2-12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับสภาวะการใช้เชื้อเดี่ยว

Nakamura และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากหัวแก่นตะวันด้วยวิธี simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ซึ่งใช้ *A. niger* 817 ร่วมกับ *S. cerevisiae* 1200 ในการหมักแบบกึ่งกะ พบว่าเมื่อใช้หัวแก่นตะวันบดเป็นวัตถุดิบร่วมกับเอนไซม์ผงที่ได้จาก *A. niger* 817 สามารถผลิตเอทานอลได้ 10.4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายในเวลา 15 ชั่วโมง และเมื่อใช้น้ำคั้นที่ได้จากหัวแก่นตะวันเป็นวัตถุดิบร่วมกับเอนไซม์ผงที่ได้จาก *A. niger* 817 สามารถผลิตเอทานอลได้ 15.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายในเวลา 72 ชั่วโมง และเมื่อใช้แป้งแปรรูปที่ได้จากหัวแก่นตะวันเป็นวัตถุดิบร่วมกับ *A. niger* 817 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว สามารถผลิตเอทานอลได้ 20.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายในเวลา 120 ชั่วโมง

Xiang-Yang Ge และ Wei-Gue Zhang (2005) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากหัวแก่นตะวันบด และแป้งที่แปรรูปจากหัวแก่นตะวัน โดยใช้ *A. niger* SL-09 ร่วมกับ *S. cerevisiae* Z-06 ด้วยวิธี simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ในการหมักแบบกึ่งกะ พบว่า *S. cerevisiae* Z-06 สามารถใช้น้ำตาลทั้งหมดได้ 98 เปอร์เซ็นต์ และผลิตเอทานอลได้ 19.6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใช้เวลาหมักทั้งหมด 48 ชั่วโมง ผลได้เอทานอลตามทฤษฎี มีค่าเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์