# บทที่ 1
# บทนำ

1.1 การหมักเอทานอล (ethanol fermentation)

ในราวศตวรรษที่ 19 Pasture อธิบายกระบวนการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ว่าเกิดจากการหมักของเชื้อจุลินทรีย์คือยีสต์ภายใต้ภาวะที่ปราศจากออกซิเจน (anaerobic process) เมื่อไม่มีจุลินทรีย์ดังกล่าวกระบวนการหมักก็ไม่เกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่ากระบวนการหมักที่แท้จริงนั้นเป็นกระบวนการทางสรีรวิทยาของเซลล์ที่มีชีวิต ต่อมา Buchers เป็นผู้สกัดสารออกจากเซลล์ของยีสต์และพบว่าสารที่สกัดได้นี้สามารถที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล เช่นเดียวกับกระบวนการหมักที่ใช้ยีสต์มีชีวิต แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่า สารที่สกัดจากเซลล์ยีสต์คือเอนไซม์นั่นเอง

เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย ตัวอย่างเช่น เป็นตัวทำละลาย หรือสารตัวกลาง (intermediate) ในอุตสาหกรรมทางเคมี เช่นการผลิตน้ำหอม ยารักษาโรค และสารต้านจุลชีพ เป็นต้น (Harrison and Graham, 1970) นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งพลังงานทดแทนปิโตรเลียม ในปี ค.ศ. 1935 หลายๆประเทศ เช่น ฝรั่งเศส บราซิล ออสเตรเลีย เยอรมัน และสวีเดน ได้ใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์ ซึ่งเรียกว่าแก๊สโซฮอล์ (gasohol) (Reed and Nagodawithana, 1991; Walker, 1998)

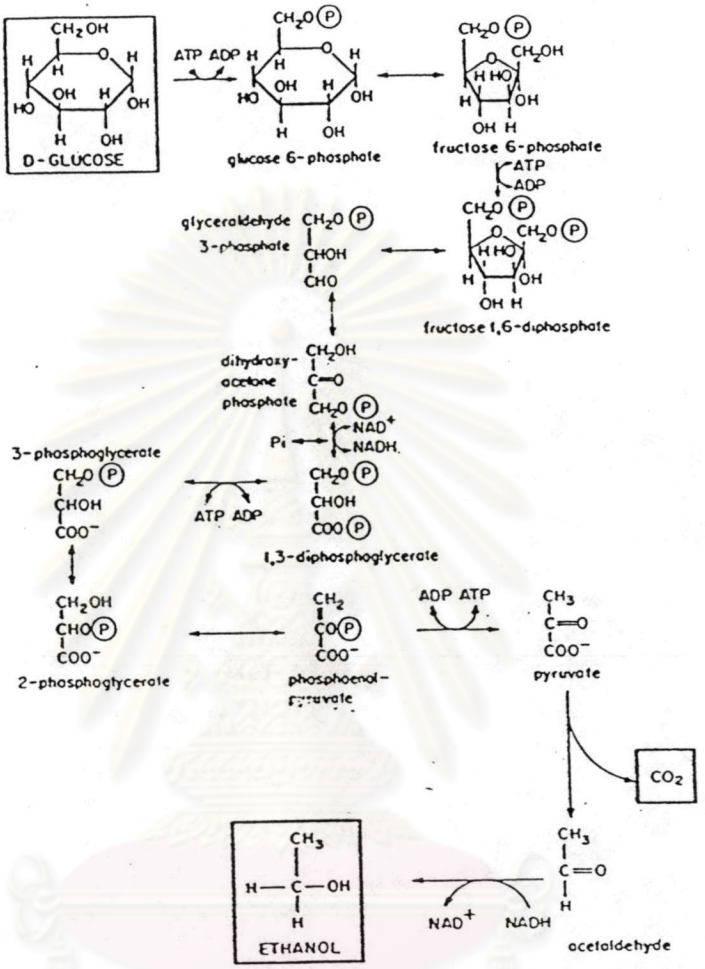
การผลิตเอทานอลสามารถสังเคราะห์ผ่านกระบวนการทางเคมีได้ โดยใช้เอทิลีนเป็นสารตั้งต้นแต่ใช้ต้นทุนสูงจึงไม่เป็นที่นิยม การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักทางชีวภาพเป็นที่สนใจมากกว่าโดยผลิตจากผลผลิตทางเกษตรกรรม เช่น แป้งมันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าวสาลี อ้อย และผลพลอยได้จากการแปรรูปของพืช เช่น กากน้ำตาล ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีมากและราคาถูก

1.2 ทฤษฎีการหมักเอทานอล

กระบวนการหมักเอทานอลจะเกิดขึ้นในภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยยีสต์จะอาศัยวิถี Embden Mayerhof Parnas (ดังรูปที่ 1.1) เปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่นกลูโคส 1โมเลกุล เป็นเอทานอลได้ 2 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุลเช่นกัน ตามสมการของ Gay -Lussac ดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 \text{ -------> } 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

ตามทฤษฎีการหมักยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ 51.1% และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9% โดยน้ำหนักของน้ำตาล แต่ในทางปฏิบัติน้ำตาลประมาณ 95% เท่านั้นที่ถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล นอกนั้นยีสต์จะใช้สำหรับการเจริญและเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่นๆ เช่น กลีเซอรอล (glycerol) กรดซัคซินิก (succinic acid) และอะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) เป็นต้น




รูปที่ 1.1 การสร้างเอทานอลโดยผ่านวิถี Embden – Meyerhof – Parnas (Harrison and Graham, 1970)

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในกระบวนการหะมักเอทานอลคือยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* (Hodge and Hildebrandt, 1954; Rose, 1977)

*Saccharomyces cerevisiae* มีอนุกรมพิธานดังนี้ คือจัดอยู่ใน

| | |
|---|---|
| อาณาจักร (Kingdom) | รา (Fungi) |
| ดิวิชั่น (Division) | Mycota |

| | |
|---|---|
| สับดิวิชั่น (Sub-Division) | Eumycotina |
| คลาส (Class) | Ascomycetes |
| สับคลาส (Sub-Class) | Hemiascomycetidae |
| ออร์เดอร์ (Order) | Endomycetales |
| แฟมิลี่ (Family) | Saccharomycetaceae |
| จีนัส (Genus) | Saccharomyces |

(Alexopoulos, 1962)

*Saccharomyces cerevisiae* มีลักษณะโดยทั่วไปคือมีรูปร่างเป็นวงรีคล้ายไข่ ค่อนข้างกลม เซลล์เดียว ไม่มีสี ความกว้างของเซลล์อยู่ในช่วง 2.5 - 10.5 ไมครอน ยาวประมาณ 4.5 - 21 ไมครอน สามารถขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) และขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) ภายในมีแอสคัส (ascus) โดยแต่ละ ascus จะมี 1-4 ascospore (Reed and Peppler, 1973; Rose, 1977)

1.3 วิธีการหมักเอทานอล (Bailey and Ollis, 1986)

กระบวนการผลิตเอทานอลได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เพื่อผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูง เพียงพอแก่ความต้องการ ซึ่งวิธีการหมักนั้นมีหลากหลาย ดังนี้

1.3.1 กระบวนการหมักแบบแบช (batch fermentation)

เป็นการหมักระบบปิด สารอาหารในระบบมีจำนวนจำกัด เพราะไม่มีการเติมสารอาหาร ภาวะภายในระบบมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก การหมักแบบแบชนี้มีข้อดี คือ ปลอดจากการปนเปื้อน จึงลดการเสี่ยงต่อการสูญเสีย แต่ในขณะเดียวกันก็มีข้อเสีย คือ เสียค่าใช้จ่ายมากในตอนเริ่มต้นการหมัก เช่น การทำความสะอาดอุปกรณ์และเครื่องมือ การเตรียมหัวเชื้อที่ดี เมื่อสิ้นสุดการหมักแต่ละคราว ก็ต้องทำความสะอาดใหม่ทุกครั้ง ทำให้สิ้นเปลืองแรงงานและเวลา และประสิทธิภาพการผลิตต่ำ

1.3.2 กระบวนการหมักเฟดแบช (fed batch fermentation)

เป็นการหมักแบบเติมสารอาหารที่จำเป็นเป็นช่วงๆ หรือเติมเป็นครั้งคราว และไม่มีการดึงเอาผลิตภัณฑ์ออกจากระบบจนกว่าจะสิ้นสุดการหมัก มีข้อดี คือได้จำนวนเซลล์ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น สามารถหลีกเลี่ยงการยับยั้งที่เกิดจากสารอาหารเริ่มต้น ในระหว่างการหมัก สามารถป้องกันการเกิดภาวะยับยั้งของสารอาหารที่มากเกินไป โดยการเติมสารอาหารทีละน้อยในระหว่างการหมัก และสามารถยืดเวลาการหมัก (operating time)ได้ แต่มีข้อเสียด้วยเช่นกันคือ เหมาะกับระบบการหมักที่มีขนาดเล็ก และต้องระวังการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆเนื่องจากการเติมสารอาหารใหม่ลงในระบบ

1.3.3 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation)

เป็นการหมักแบบเติมสารอาหารที่จำเป็นอย่างต่อเนื่องและมีการดึงเอาผลิตภัณฑ์ออกตลอดเวลา ซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าการเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่องหลายประการ ได้แก่

1.สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของเชื้อได้

2.สามารถตรวจสอบผลกระทบที่มีต่อการเจริญและการเกิดผลิตภัณฑ์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าทางกายภาพ และทางเคมี เช่น อุณหภูมิ การกวน การให้อากาศ เป็นต้น

3.สามารถรักษาความเข้มข้นของเซลล์ให้คงที่ โดยการแปรค่าอัตราการเจือจาง

4.สามารถรักษาความเข้มข้นของสารอาหารที่มีผลต่อการเจริญให้คงที่ และสามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเซลล์และกระบวนการเมตาโบลิซึมได้ โดยการเปลี่ยนปริมาณสารอาหารที่มีผลต่อการเจริญ

5.ผลที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องมักเชื่อถือได้ และสามารถทำซ้ำได้

6.การหมักแบบต่อเนื่องให้ผลคุ้มค่าในเชิงเศรษฐศาสตร์ เนื่องจาก ให้กำลังการผลิตต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรสูงกว่า เสียเวลาน้อยกว่าในการทำความสะอาด “down time” คือล้างทำความสะอาดเตรียมเครื่องและฆ่าเชื้อ นอกจากนี้ยังใช้แรงงานคนน้อยกว่าและใช้เงินลงทุนเริ่มต้นน้อยกว่าด้วย

แต่ทั้งนี้การหมักแบบต่อเนื่องก็มีข้อเสียเปรียบเมื่อเทียบกับการหมักแบบเป็นครั้งดังนี้

1.การผลิตผลิตภัณฑ์ไม่สัมพันธ์กับการเจริญมักไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร

2.การสร้างผนังเซลล์ และการรวมตัวของเซลล์ สามารถทำให้เกิดการล้างเชื้อและป้องกันไม่ให้เกิดภาวะคงที่ของการเจริญที่แท้จริง

3.การเจริญอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้สายพันธุ์ดั้งเดิมสูญไป เนื่องจากมีสายพันธุ์อื่นที่เจริญได้ดีกว่าเข้ามาแทนที่แต่อาจเกิดเหตุการณ์นี้ได้ไม่บ่อยนัก

4.การเจริญเป็นระยะเวลานานๆ ทำให้เกิดการปนเปื้อนได้

1.4 จลนพลศาสตร์การหมัก (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529; สมใจ ศิริโภค, 2537; Gaden, 1977; Stanbury and Whitaker, 1984)

จลนพลศาสตร์การหมักหมายถึง อัตราการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่มีเอนไซม์ซึ่งมาจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป็นตัวเร่ง การเปลี่ยนแปลงของตัวแปรที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการหมักได้แก่ การใช้สารอาหาร (substrate utilization) การสร้างผลผลิต (product formation) และการเพิ่มมวลของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีอัตราการใช้อากาศ การดูดซึมออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ แต่ในทางปฏิบัติจลนพลศาสตร์ของการหมักจะหมายถึงการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาทั้งหมด (overall reaction rate)

สำหรับการศึกษาทางจลนพลศาสตร์จะต้องคำนึงถึง ปัจจัยหลัก 2 ประการด้วยกันคือ

1. อัตราการผลิต (productivity) หมายถึง ปริมาณผลผลิตที่ได้จากการหมักต่อระยะเวลาที่ใช้ ตั้งแต่เริ่มใส่หัวเชื้อ (inoculum) จนสิ้นสุดการหมัก ซึ่งมีหน่วยเป็น มวลของผลผลิตต่อหน่วยปริมาตรต่อหน่วยเวลา ค่าที่ได้นี้เป็นอัตราโดยเฉลี่ยของการผลิต

2. อัตราการหมัก หมายถึง อัตราการเปลี่ยนแปลงโดยฉับพลันของความเข้มข้นของผลผลิต แต่ในบางกรณีอาจหมายถึงปัจจัยหรือลักษณะอื่นๆด้วย เช่น การหายใจ การเจริญเติบโต และการใช้สารอาหารหลัก เป็นต้น อัตราการหมักแบ่งได้ 2 ลักษณะ ดังนี้

2.1 volumetric rate มีหน่วยเป็น กรัมของผลผลิตที่ได้ต่อลิตรต่อชั่วโมง หรือ กรัมของน้ำตาลที่ใช้ต่อลิตรต่อชั่วโมง หรือ กรัมของเซลล์ที่ได้ต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.2 specific rate หมายถึงอัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเซลล์ สารอาหาร หรือผลผลิตต่อหน่วยความเข้มข้นเซลล์ ซึ่งสามารถคำนวณได้จากการหาร volumetric rate ด้วยความเข้มข้นของเซลล์ที่จุดนั้นๆ ดังนั้นหน่วยของ specific rate จะเป็น กรัมเซลล์ที่ได้ต่อชั่วโมงต่อกรัมเซลล์ (specific rate of growth) กรัมสารอาหารที่ใช้ต่อชั่วโมงต่อกรัมเซลล์ (specific rate of substrate utilization) หรือกรัมของผลผลิตที่ได้ต่อชั่วโมงต่อกรัมเซลล์ (specific rate of production) ตามลำดับ ซึ่งสามารถเขียนออกมาในรูปสมการได้ดังนี้

อัตราจำเพาะของการเจริญ (specific growth rate, $\mu$) $= \frac{1}{X}\cdot\frac{dX}{dt}$

อัตราจำเพาะของการเกิดผลผลิต (specific production rate) $= \frac{1}{X}\cdot\frac{dP}{dt}$

อัตราจำเพาะการใช้สับเสวต (specific substrate utilization rate) $= \frac{1}{X}\cdot\frac{-dS}{dt}$

จากสมการของอัตราการเจริญจำเพาะที่ว่า

$$\mu = \frac{1}{X}\cdot\frac{dX}{dt} \qquad (1)$$

mass doubling time หรือ generation time (td) หมายถึง ระยะเวลาที่ต้องการในการเพิ่มมวลเซลล์ให้เป็นสองเท่า

จากสมการที่ (1) นำมาอินทิเกรต จะได้

$$\ln\frac{X_2}{X_1} = \ln 2 = \mu td$$

$$\frac{\ln 2}{\mu} = td = \frac{0.693}{\mu}$$

จากการศึกษาของ Monod พบว่า การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีลักษณะเช่นเดียวกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งสามารถแสดงออกมาในรูปคล้าย Michaelis - Menten Equation คือ

$$\mu = \mu max \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \quad (2)$$

เมื่อ $\mu max$ = อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด

$K_s$ = ค่าคงที่ของการใช้สับเสรต มีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสับเสรต เมื่อ $\mu$ เท่ากับ 1/2 $\mu max$ และเป็นค่าที่แสดงสัมพรรคภาพ (affinity) ของจุลินทรีย์ต่อสับเสรต

จากสมการที่ (1) นำค่า $\mu$ มาแทนในสมการที่ (2) จะได้

$$\frac{dX}{dt} = \mu max \left( \frac{S}{K_s + S} \right) .X \quad (3)$$

จากสมการที่ (3) แสดงความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญของจุลินทรย์กับความเข้มข้นของสารอาหารที่มีอยู่จำกัด และความเข้มข้นของเซลล์ในขณะนั้น ซึ่งจากสมการนี้เป็นประโยชน์มากในการนำไปใช้เป็นพื้นฐานในการออกแบบกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

1.5 จลนพลศาสตร์การหมักแบบต่อเนื่อง (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529; Aiba et al., 1973; Marison, 1988)

ในการศึกษาจลนพลศาสตร์การหมักแบบต่อเนื่องจำเป็นต้องได้ข้อมูลทางจลนพลศาสตร์การหมักแบบแบชในภาวะเดียวกันเสียก่อน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคำนวณหาตัวแปรอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการหมักให้อยู่ในภาวะคงที่สม่ำเสมอของความเข้มข้นของเซลล์ภายในถังหมัก ซึ่งเรียกภาวะคงที่สม่ำเสมอ (steady state) เพื่อให้ได้ผลผลิตต่อเวลาที่สูงที่สุดโดยเสียค่าใช้จ่ายต่ำที่สุด

การหมักแบบต่อเนื่อง เป็นระบบที่การเจริญของจุลินทรีย์อยู่ในระบบเปิด ซึ่งจำนวนจุลินทรีย์ถูกรักษาให้อยู่ในสภาพการเจริญคงที่อย่างต่อเนื่อง เป็นภาวะที่มีอัตราการเจริญและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์สูงที่สุด พร้อมกับจัดให้ปัจจัยสำคัญในน้ำหมัก เช่นจำนวนจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของสารอาหารหลักอยู่ในระดับคงที่ที่เหมาะสม ทั้งนี้สามารถทำได้โดยการป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมัก พร้อมทั้งปล่อยน้ำหมักออกจากถังในอัตราเดียวกัน อัตราการไหลผ่านของน้ำหมักจะต้องพอเหมาะที่จะทำให้อัตราการเพิ่มของเซลล์ เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์เท่ากับอัตราการไหลออกของเซลล์ ส่วนอัตราการเพิ่มสารอาหารเข้าสู่ถังหมักเท่ากับอัตราการใช้สารอาหารโดยจุลินทรีย์ในน้ำหมัก และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับอัตราการไหลออกของผลิตภัณฑ์ในน้ำหมัก

1.5.1 ทฤษฎีเกี่ยวกับระบบการหมักแบบเคโมสแตท

ในระบบการหมักแบบเคโมสแตท อัตราการเจริญสามารถหาได้โดยแปรค่าอัตราการป้อนสารอาหารที่จำเป็น ซึ่งอาจเป็นสารประกอบคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือวิตามิน โดยสารอาหารที่จำเป็นดังกล่าวต้องมีอยู่มากเกินพอ ความสามารถในการแปรค่าอัตราการเจริญโดยการเปลี่ยนอัตราการป้อนสารอาหารเป็นข้อได้เปรียบมากที่สุดของการหมักแบบต่อเนื่องที่มีต่อการหมักแบบแบช และยังเป็นสิ่งที่อธิบายลักษณะเฉพาะของเคโมสแตทอีกด้วย โดยการควบคุมให้อัตราการป้อนสารอาหารคงที่เป็นการควบคุมระบบการหมักให้มีการเจริญอยู่ในภาวะคงที่

1.5.2ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของเซลล์

ลักษณะเฉพาะของเคโมสแตทและการเจริญที่ภาวะคงที่สามารถแสดงได้โดยใช้สมการต่อไปนี้ ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของสารอาหารกับอัตราการป้อนสารอาหารหรืออัตราการเจือจาง

เซลล์ที่สะสม = เซลล์เข้า + เซลล์ที่เจริญ - เซลล์ออก - เซลล์ที่ตาย

$$dX/dt = FX_0/V + [dX/dt]_G - FX/V - [dX/dt]_D \quad (4)$$

โดย $X$ = ความเข้มข้นของเซลล์ในถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

$X_0$ = ความเข้มข้นของเซลล์ในสารอาหารสำหรับเติมเข้าสู่ระบบ (กรัมต่อลิตร)

$[dX/dt]_G$ = อัตราการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของเซลล์เนื่องจากการเจริญ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

$[dX/dt]_D$ = อัตราการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของเซลล์เนื่องจากการตาย (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

$F$ = อัตราการไหล (ลิตรต่อชั่วโมง)

$V$ = ปริมาตรของน้ำหมักภายในถังหมัก (ลิตร)

จากสมการที่(1)

$$dX/dt = \mu X$$

โดย $\mu$ = อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

เมื่อนำมารวมกับสมการที่(4) จะได้ว่า

$$dX/dt = FX_0/V + \mu X - FX/V - \mu_D X \quad (5)$$

สำหรับกรณีที่สารอาหารที่ป้อนเข้ามามีการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว ดังนั้น $X_0 = 0$ และไม่มีการดึงเซลล์กลับมาใช้ ส่วนเซลล์ที่อยู่ในระบบมีอัตราการเจริญเติบโตสูงมาก เพราะมีสารอาหารเพียงพอ และอัตราการตายของเซลล์ต่ำมากเมื่อเทียบกับอัตราการเจริญเติบโต จึงจัดรูปสมการ(5)ได้เป็น

$$dX/dt = \mu X - FX/V \quad (6)$$

ค่า F/V คือ อัตราการเจือจาง (D) มีหน่วย ต่อชั่วโมง หมายความว่า ปริมาตรน้ำหมักที่ไหลผ่านถังหมักในเวลา 1 ชั่วโมง จากสมการที่ (6) เขียนได้ดังนี้

$$dX/dt = \mu X - DX = (\mu - D)X \quad (7)$$

ในช่วงการเจริญที่ภาวะคงที่ ค่า dX/dt = 0 เมื่อแทนในสมการที่ (7) ได้ดังนี้

$$\mu = D \quad (8)$$

นั่นแสดงว่า ในการหมักแบบต่อเนื่องสามารถควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อได้โดยการควบคุมอัตราการเจือจาง ที่อัตราการเจือจางหนึ่งจะส่งผลให้น้ำหมักมีความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของสารอาหารที่เหลือค่าหนึ่ง เมื่อเพิ่มอัตราการเจือจาง จะส่งผลให้ในน้ำหมักมีความเข้มข้นของเซลล์ลดลง และความเข้มข้นของสารอาหารที่เหลือเพิ่มขึ้น จนกระทั่งเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางมากเกินกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของจุลินทรีย์ คือ D>> $\mu$max (อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด) ผลที่ตามมา คือ ความเข้มข้นของเซลล์ลดลง เซลล์จะถูกชะออกจากระบบจนหมด (wash out) ในทางปฏิบัติอัตราการเจือจางวิกฤต ($D_c$) จะมีค่าประมาณเท่ากับค่า $\mu$max จากสมการข้างต้นทั้งหมดสามารถประยุกต์ไปใช้ได้ในแง่ของอัตราการสร้างผลผลิต (product formation) และอัตราการใช้สารอาหาร (substrate utilization) ซึ่งในการนี้ $(dP/dt)_D$หรือ $(-dS/dt)_D$จะเท่ากับศูนย์ และค่า$(dP/dt)_G$หรือ $(-dS/dt)_G$ จะเป็นการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ หรือสารอาหาร ตามลำดับ

1.6 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์

1.6.1 ธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามิน

เหมือนกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ยีสต์ต้องการสารอาหารสำหรับการสังเคราะห์สารภายในเซลล์และพลังงาน ดังนั้นภายในอาหารเลี้ยงเชื้อต้องประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลซึ่งสัดส่วนความต้องการของสารอาหารนั้นคล้ายกับองค์ประกอบของธาตุที่พบภายในเซลล์ยีสต์ ดังตารางที่ 1.1 โดยสัดส่วนสารอาหารที่ต้องการนั้นต้องมีความเหมาะสม มิฉะนั้นถ้ามากหรือน้อยเกินไปจะมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอล (Maiorella et al., 1984) ชนิดของสารอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลมีดังนี้

1.6.1.1 คาร์บอน

Berry และ Brown (1987) กล่าวว่าประมาณ 50 % ของน้ำหนักแห้งของยีสต์เป็นธาตุคาร์บอนนอกนั้นเป็นไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน ที่ทำให้เกิดโครงสร้างหลักของยีสต์ขึ้น ยีสต์จะใช้สารประกอบคาร์บอนเพื่อเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายในเซลล์เพื่อให้ได้พลังงานผ่านกระบวนการไกลโคไลซีส (glycolysis pathway) และวัฏจักรเครบส์ ซึ่งจะเกิดได้ดีในภาวะที่มีอากาศ และพลังงานที่ได้จะใช้ในการเจริญและการสร้างเซลล์ใหม่ แต่ในภาวะที่ขาด

ออกซิเจนเกิดกระบวนการหมักเอทานอล ยีสต์จะเปลี่ยนสารประกอบคาร์บอนเป็นเอทานอล และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แสดงปฏิกิริยาดังนี้ $C_6H_{12}O_6$ -------> $2C_2H_5OH + 2CO_2$

ในตารางที่ 1.2 แสดงแหล่งคาร์บอนที่ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งโดยปกติทั่วไปยีสต์สามารถใช้น้ำตาลชนิดเดียวกันทั้งในกระบวนการเจริญและการหมัก

ระดับอุตสาหกรรมแหล่งคาร์บอนที่ใช้ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด เช่น กากน้ำตาลอ้อย (cane molasses) มีซูโครสเป็นองค์ประกอบหลักนอกจากนั้นยังประกอบด้วยราฟฟิโนส กลูโคส และฟรุกโตส โดยทั่วๆไปกากน้ำตาล (molasses) สามารถแบ่งได้ 3 ชนิด คือ

1.Black strap molasses คือกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว มีปริมาณน้ำตาลอยู่ 50-60 %

2.Refinery molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ มีปริมาณน้ำตาลอยู่ 48 %

3.Hightest molasses หรือ Invert molasses ซึ่งผลิตโดยนำน้ำอ้อยมาเคี่ยวจนข้นเป็นน้ำเชื่อม ดังนั้น hightest molasses จึงไม่ใช่กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทราย มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 77 %

กากน้ำตาลที่ต่างชนิดกันจะมีองค์ประกอบและสมบัติต่างกัน แม้แต่กากน้ำตาลชนิดเดียวกันก็ยังมีองค์ประกอบบางส่วนที่ต่างกันขึ้นกับท้องถิ่นที่ทำการผลิต กรรมวิธีของโรงงาน ฤดูกาล และสภาพการเก็บ ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลนิยมใช้ black strap molasses เป็นวัตถุดิบซึ่งมีน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนใหญ่ และมีปัจจัยส่งเสริมการเจริญ (growth factor) ต่างๆ มากกว่า refinery molasses (Paturau, 1969 ; ณัฐศิษฎ์ ไทยตระกูล, 2528; ภัทรา มณีธวัช, 2520; Rainbow, 1971)

นอกจากชนิดของกากน้ำตาลแล้วความเข้มข้นของน้ำตาลก็มีผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ เป็นที่ทราบกันว่าการใช้น้ำตาลเข้มข้นสูงในการหมักเอทานอลทำให้ลดปริมาณน้ำที่ใช้เจือจางกากน้ำตาลลง และลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ ที่มากับกากน้ำตาล โดยถ้าสามารถกำจัดผลการยับยั้งของเอทานอลได้ จะทำให้ผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งจะเป็นแนวทางสำหรับลดค่าใช้จ่ายในการกลั่น ในภาวะที่มีอากาศ อาหารสำหรับหมักมีความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำกว่า 1 % ยีสต์จะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเซลล์ทั้งหมด เรียกว่าปรากฏการณ์ Pasteur effect ในขณะที่ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลสูงมาก จะพบการผลิตเอทานอลในภาวะที่มีอากาศ (aerobic fermentation) ซึ่งยีสต์ไม่สามารถเปลี่ยนวิถีการหมักเอทานอลเป็นการสร้างเซลล์ได้ทั้งหมด เรียกว่าปรากฏการณ์ Crabtree effect หรือ reverse Pasteur effect (Nagodawithana, 1991) และยังพบอีกว่ามีระยะเวลาพัก(lag phase)

ตารางที่ 1.1 แสดงค่าเฉลี่ยองค์ประกอบของธาตุที่พบภายในเซลล์ *Saccharomyces* sp. (Jones and Greenfield, 1984 cited in Berry and Brown, 1987)

| Element | Average value [g(100g) $^{-1}$ dry weight] | Element | Average value [g(100g) $^{-1}$ dry weight] |
|---|---|---|---|
| potassium | 2.2 | cobolt | $0.5 \times 10^{-3}$ |
| phosphorus | 1.6 | nickel | $250 \times 10^{-6}$ |
| sulphur | $300 \times 10^{-3}$ | arsenic | $180 \times 10^{-6}$ |
| magnesium | $270 \times 10^{-3}$ | lead | $150 \times 10^{-6}$ |
| sodium | $60 \times 10^{-3}$ | iodine | $125 \times 10^{-6}$ |
| calcium | $50 \times 10^{-3}$ | molybdate | $7 \times 10^{-6}$ |
| barium | $15 \times 10^{-3}$ | boron | $5 \times 10^{-6}$ |
| zinc | $12 \times 10^{-3}$ | aluminium | $1 \times 10^{-6}$ |
| iron | $10 \times 10^{-3}$ | chromium | $10 \times 10^{-26}$ |
| copper | $5 \times 10^{-3}$ | vanadium | $5 \times 10^{-26}$ |
| manganese | $3 \times 10^{-3}$ | | |

ตารางที่ 1.2 แสดงแหล่งคาร์บอนที่ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถนำไปใช้ได้ (Barnett et al., 1983 cited in Berry and Brown, 1987)

| | | |
|---|---|---|
| D-glucose | sucrose | D-mannitol |
| D-galactose | raffinose | ethanol |
| manose | trehalose | succinate |
| fructose | deoxyribose | D-glucono-1-5-lactone |
| melibiose | maltotriose | DL-lactate |
| melezitose | D-glucitol | glycerol |

นานขึ้นและเปอร์เซ็นต์การตายในระยะพักมากขึ้น จำนวนเซลล์ที่ผลิตได้ลดลง และถ้าในภาวะที่ไม่มีอากาศการใช้น้ำตาลเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอล ทำให้เกิดแรงดันออสโมติคสูงซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ยีสต์เพราะยีสต์จะขับเอทานอลออกจากเซลล์ได้ช้า ภายในเซลล์จึงมีเอทานอลปริมาณสูงจนเป็นพิษต่อตัวยีสต์เอง ขณะเดียวกันถ้าต้องการให้ยีสต์หมักเอทานอลได้ความเข้มข้นสูงก็ต้องใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นสูงเช่นกัน ดังนั้นการพิจารณาเลือกความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นจึงเป็นสิ่งสำคัญ ในการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลชนิด black strap molasses มีความเข้มข้นน้ำตาลที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 14-15 % (Hodge and Hildebrandt, 1954; Reed and Peppler, 1973)

1.6.1.2 ไนโตรเจน

ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นรองลงมาจากคาร์บอน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้มีหลากหลายชนิดแบ่งได้ดังนี้

1.6.1.2.1 เกลือไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen)

แอมโมเนียมไนโตรเจนในรูปของ $NH_4NO_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ มีรายงานว่า ใช้แอมโมเนียมไอออนเป็นแหล่งไนโตรเจน ยีสต์เซลล์สามารถให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงถึง 0.45 ต่อชั่วโมง (Burrow, 1970) ซึ่ง $(NH_4)_2SO_4$ เป็นที่นิยมเพราะเป็นทั้งแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ด้วย อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณไนโตรเจนที่มากเกินไปจะก่อให้เกิดผลเสียต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ (Harrison and Graham, 1970) มีรายงานว่าถ้ามีแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารสำหรับการหมักเอทานอลเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้การผลิตเอทานอลลดลงประมาณ 50 %(Limtong et al., 1985)

1.6.1.2.2 กรดอะมิโน (amino acid)

ชนิดของกรดอะมิโนที่สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้แสดงในตารางที่ 1.3 แต่ละชนิดของกรดอะมิโนส่งผลให้เชื้อยีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดไม่เท่ากัน

1.6.1.2.3 กรดอะมิโนหลายชนิด (mixtures of amino acid)

การย่อยแลคติกเคซีนด้วยกรด (casein hydrolysate) เป็นแหล่งของกรดอะมิโนผสมทำให้เชื้อยีสต์มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด และได้ผลผลิตเซลล์สูงมากกว่าใช้กรดอะมิโนเพียงตัวเดียว

1.6.1.2.4 ยูเรีย (urea)

ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดี เพราะเชื้อยีสต์มีกระบวนการหยุดใช้ยูเรียเมื่อมีแหล่งไนโตรเจนอื่นที่ดีกว่า แต่ต้องมีการเติมไบโอติน (biotin) เสริมลงอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.6.1.2.5 พิวรีน (purines) และ ไพริมิดีน (pyrimidine)

1.6.1.2.6 เปปไทด์ (peptide)

ตารางที่ 1.3 แสดงแหล่งไนโตรเจนที่มีความสัมพันธ์กับค่าอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย (Cooper, 1982 cited in Berry and Brown, 1987)

| | |
|---|---|
| 1.glutamine (highest μmax) | 13.valine |
| 2.ammonia | 14.leucine |
| 3.asparagine | 15.proline |
| 4.glutamate | 16.tyrosine |
| 5.serine | 17.isoleucine |
| 6.arginine | 18.threonine |
| 7.urea | 19.tryptophan |
| 8.alanine | 20.allantoate |
| 9.phenylalanine | 21.methionine |
| 10.ornithine | 22.histidine |
| 11.citrulline | 23.glycine (lowest μmax) |
| 12.allantoin | |

ถ้ามีแหล่งไนโตรเจนข้างต้นอยู่ร่วมกันมากกว่า 1 ชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งพบมากในระดับอุตสาหกรรม ยีสต์จะไม่สามารถใช้ไนโตรเจนเหล่านั้นในอัตราเดียวกันได้ คือจะเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดก่อน

ตามตารางที่ 1.3 Cooper (1982) รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนที่ดีมีสมบัติดังนี้

1. สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้เร็วที่สุด
2. ภายในเซลล์ แหล่งไนโตรเจนนั้นต้องมีขั้นตอนน้อยที่สุดในการเปลี่ยนรูปเป็นกลูตาเมตและหรือ แอมโมเนีย
3. ต้องไม่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ (toxic side effect)

อย่างไรก็ตาม ภายในตัวยีสต์เองประกอบด้วยพิวรีน ไพริมิดีน และกรดอะมิโน ดังนั้นจึงน่าจะใช้ตัวยีสต์เองเป็นแหล่งไนโตรเจน เช่นการนำกากส่าหรือ stillage กลับมาใช้ละลาย

กากน้ำตาล เรียกกระบวนการนี้ว่า slopping back ซึ่งนอกจากได้ธาตุอาหารแล้ว ยังช่วยลดปริมาณน้ำที่ต้องการใช้ รวมทั้งเป็นการกำจัดน้ำกากส่าทิ้งไปในตัวด้วย หรือโดยการนำเอาเซลล์ยีสต์ที่ถูกย่อยสลาย (lysed yeast cell) กลับมาใช้ใหม่ (recycle) (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529; Shojaosadati et al.,1996) สำหรับไนโตรเจนในกากน้ำตาลส่วนใหญ่อยู่ในรูปของโปรตีน กรดอะมิโน และกรดนิวคลีอิค (Paturau, 1989) ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับยีสต์ได้ แต่มีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับความต้องการของยีสต์ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์และผลิตเอทานอล

1.6.1.3 ฟอสฟอรัส

ยีสต์ใช้ฟอสฟอรัสในการสร้าง ATP เป็นแหล่งพลังงานแก่เซลล์ ควบคุมการเผาผลาญอาหาร ความเข้มข้นของฟอสเฟตไอออน ($PO_4^{3-}$) ภายในเซลล์ยังควบคุมการสังเคราะห์ไขมันและคาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้ฟอสฟอรัสยังช่วยเป็นบัฟเฟอร์รักษาค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย (Rose and Harrison, 1970; Berry and Brown, 1987) สำหรับในกากน้ำตาล ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟต ซึ่งยีสต์ไม่สามารถนำมาใช้ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมฟอสฟอรัสในรูปของสารประกอบฟอสเฟต เช่น โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) และ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4$) มีรายงานว่า โพแทสเซียมไอออน ($K^+$) เป็นตัวกระตุ้นการนำฟอสเฟตเข้าเซลล์ได้ง่ายขึ้นเพราะโพแทสเซียมไอออนเดินทาง (co-transport) ร่วมกับฟอสเฟตไอออนเข้าสู่เซลล์ (Schmidt et al., 1949) ดังนั้นจึงนิยมใช้ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ซึ่งเป็นแหล่งฟอสฟอรัสที่ดีกว่า โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

1.6.1.4 ซัลเฟอร์

ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบประมาณ 0.40 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยอยู่ในรูปกรดอะมิโนจำพวกเมไธโอนีน (methionine) ประมาณ 60 % เมไธโอนีนเป็นกรดอะมิโนที่สามารถเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ทำให้ยีสต์มีการเจริญได้เร็วกว่าซัลเฟตไอออน($SO_4^{2-}$) แต่เนื่องจากเมไธโอนีนมีราคาแพงมาก จึงใช้ซัลเฟตไอออนเป็นแหล่งซัลเฟอร์แทน เช่น $K_2SO_4$ และ $(NH_4)_2SO_4$ ซึ่ง $(NH_4)_2SO_4$ เป็นที่นิยมมากกว่าดังที่กล่าวในหัวข้อแหล่งไนโตรเจนซึ่งเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นเมไธโอนีนภายในเซลล์ของยีสต์แต่ต้องอาศัยพลังงาน

1.6.1.5 แมกนีเซียม

แมกนีเซียมมีความจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ เพราะเป็นปัจจัยร่วม (co-factor) ในการทำงานของเอนไซม์มากกว่า 100 ชนิด ในปฏิกิริยาชีวเคมีต่างๆของยีสต์ (Reed and Nagodawithana, 1991)

1.6.1.6 แมงกานีส

การเติมแมงกานีสมีผลต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์ยีสต์โดย ทำให้เพิ่มปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ เพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนและเพิ่มผลผลิตเซลล์ให้มากขึ้น (Berry and Brown, 1987)

1.6.1.7 ซิงค์

ซิงค์ มีความสำคัญในกระบวนการเมตาโบลิซึมดังนี้

1. เป็นปัจจัยร่วมในการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด เช่น อัลโดเลส (aldolase) ในกระบวนการไกลโคไลซีส
2. ใช้ในการสังเคราะห์วิตามินบางชนิด เช่น ไรโบฟลาวิน (riboflavin)
3. กระตุ้นการนำมอลโตส (moltose)และ มอลโตไตรโอส (moltotriose) เข้าสู่เซลล์

1.6.1.8 แร่ธาตุต่างๆ

แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการหมักของยีสต์ได้แก่ คอปเปอร์ โคบอลต์ นิกเกิล สารหนู ตะกั่ว ไอโอดีน โบรอน โครเมียม และวานาเดียมเป็นต้น ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่มีความต้องการเพียงเล็กน้อย ในบางครั้งถ้ามีปริมาณมากจะมีผลไปยับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์เช่นกัน มีรายงานว่า สารหนู ตะกั่ว อะลูมิเนียม โครเมต และวานาเดียม มีผลยับยั้งการเจริญและการหมัก (Berry and Brown, 1987)

1.6.1.9 ปัจจัยส่งเสริมการเจริญ (growth factor) และวิตามิน

ปัจจัยส่งเสริมการเจริญและวิตามิน เป็นตัวควบคุมเมตาโบลิซึมของยีสต์ โดยจะควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพราะวิตามินเป็น โคเอนไซม์ (coenzyme) หรือสารเริ่มต้น (precursors) ทำให้เอนไซม์ทำงานได้เต็มที่ ชนิดปัจจัยส่งเสริมการเจริญและวิตามินที่ยีสต์ต้องการ ได้แก่ อิโนซิทอล (inositol) ทำหน้าที่ในการรักษาเมมเบรน (membrane) ของยีสต์ ซึ่งมีผลต่อการควบคุมอัตราการหมัก ไบโอติน (biotin) กรดแพนโทธีนิค ในรูปของแคลเซียมแพนโทธีเนต (Ca pantothenate) วิตามินบี 6 (pyridoxine) วิตามินบี 1 (thiamine) กรดนิโคตินิค (nicotinic acid) นอกจากนี้ยีสต์ยังมีความต้องการกรดโฟลิค (folic acid) กรดพาราอะมิโนเบนโซอิค (para-amino benzoic acid) และ ไรโบฟลาวิน ซึ่งส่วนใหญ่ยีสต์สังเคราะห์ได้เอง ในบางกรณีความต้องการปัจจัยส่งเสริมการเจริญของยีสต์ขึ้นกับสภาพแวดล้อม เช่นในกรณีที่ยีสต์เจริญในสภาพไร้อากาศยีสต์ต้องการกรดไขมันที่มีพันธะคู่รวมทั้งกรดโอลิอิค (oleic acid) กรดลิโนลีอิค (linoleic acid) และ เออร์กอสเตอรอล (ergosterol) เป็นต้น

1.6.2 อุณหภูมิ

มีรายงานว่ายีสต์สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิตั้งแต่ 20-40 องศาเซลเซียส (White, 1954) และอุณหภูมิที่ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ดีไม่ควรเกิน 32 องศาเซลเซียส เป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ เช่น *Saccharomyces* sp. ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic strain) ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด และมีอัตราการเจริญสูงสุด ที่อุณหภูมิช่วง 28-35 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิสูงสุด (maximum temperature) สำหรับการเจริญของเชื้อประมาณ 40 องศาเซลเซียส ส่วนยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophile) จะมีระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส เชื้อประเภทนี้ต้องการธาตุอาหารบางอย่างเพิ่มขึ้น เพื่อรักษาเซลล์ให้สามารถเจริญได้ ธาตุอาหารเหล่านี้คือ โคลีน ลูซีน เหล็ก และแมงกานีส มีรายงานว่าพบสารทรีฮาโลส (trehalose) ภายในเซลล์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิการหมักจาก 27 เป็น 40 องศาเซลเซียส ซึ่งสารชนิดนี้มีสมบัติช่วยป้องกันภาวะกดดันทางเคมีและกายภาพต่อเซลล์ (chemical and physical stress) (Hottiger et al., 1987 cited in Ling et al., 1995)

ในการเจริญของยีสต์จะมีการปล่อยพลังงานความร้อนออกมาประมาณ 3.5-4.4 กิโลแคลอรี่ต่อกรัมยีสต์ (Nagodawithana, 1991) ในขณะที่การหมักเอทานอลจะมีความร้อนเกิดขึ้น 0.15 กิโลแคลอรี่ต่อกรัมกลูโคส จากความร้อนที่เกิดขึ้นนี้จึงทำให้อุณหภูมิของระบบเพิ่มขึ้น เพื่อให้ระบบสามารถรักษาประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสารอาหารเป็นเซลล์และเอทานอลจึงจำเป็นต้องมีการหล่อเย็น (cooling system) เพื่อลดอุณหภูมิในระหว่างการหมัก มีการพยายามปรับปรุงสายพันธุ์ให้ยีสต์เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงเพื่อเป็นการประหยัดพลังงานในการหล่อเย็น ซึ่งในอุตสาหกรรมยีสต์ส่วนใหญ่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25-35 องศาเซลเซียส

1.6.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งในการหมักเอทานอลโดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากความเป็นกรด-ด่างมีผลต่ออัตราการหมัก และควบคุมเชื้อปนเปื้อนซึ่งมีผลต่อการเจริญของยีสต์ ยีสต์ทั่วไปส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 3.5-7.0 (Rose and Harrison, 1971) และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S.cerevisiae* คือ 4.5 (Jone et.al.,1981) ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของยีสต์คือ 4.8-5.0 (Hodge and Hildebrandt,1954) ในอุตสาหกรรมจะปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 3.5-4.5 เพื่อให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนด้วย ความสามารถในการรักษาความเป็นกรด-ด่างในอาหาร (buffering capacity) เป็นสิ่งสำคัญเพื่อรักษาประสิทธิภาพการเจริญของยีสต์ได้ตลอดจนกระบวนการหมัก (Prescott and Dunn, 1959)

แต่กากน้ำตาลเป็นอาหารที่มีสมบัติในการรักษาความเป็นกรด-ด่างได้ดี ดังนั้นในการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลพบว่าความเป็นกรด-ด่างการหมักไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 3.5-6.0

1.6.4 ออกซิเจน (Ryu et al. ,1984; Kobayashi et.al.,1995)

มีผู้รายงานถึงบทบาทของออกซิเจนในการหมักเอทานอล โดยแสดงว่าอากาศหรือออกซิเจนจำเป็นต่อการหมักเบียร์ที่ดี หน้าที่หลักของออกซิเจน คือเป็นตัวรับอิเล็กตรอนขั้นสุดท้ายในลูกโซ่การหายใจ (respiratory chain) นอกจากนั้นออกซิเจนยังทำหน้าที่เป็นปัจจัยส่งเสริมการเจริญ (growth factor) ของยีสต์โดยเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีพันธะคู่ รวมทั้งกรดโอลิอิค (oleic acid) กรดลิโนลีอิค (linoleic acid) และ เออร์กอสเตอรอล (ergosterol) ซึ่งนอกจากช่วยส่งเสริมการเจริญภายใต้ภาวะที่ปราศจากออกซิเจนของยีสต์แล้วยังเพิ่มความทนเอทานอลของยีสต์ด้วย โดยกรดไขมันเหล่านี้จะสะสมไว้ที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์ยอมให้มีการขนถ่ายเอทานอลออกจากเซลล์ได้ดี และความเข้มข้นของเอทานอลภายในเซลล์จะลดลง มีรายงานว่ากรดไขมันที่มีพันธะคู่ และสเตอรอล จำเป็นในการทำให้การหมักเอทานอลดำเนินต่อไปหลังจากการเจริญของยีสต์หยุดลงแล้ว โดยเฉพาะในภาวะที่มีกลูโคสความเข้มข้นสูง ดังนั้นออกซิเจนจึงมีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล ในขั้นตอนของการเตรียมหัวเชื้อ (starter) โดยทั่วไปเชื้อเริ่มต้นที่ใช้สำหรับการหมักแบบแบช (batch) จะได้จากการเลี้ยงเชื้อในสภาพที่มีออกซิเจน ซึ่งยีสต์จะให้ปริมาณเซลล์สูง และมีอัตราการหมักสูงด้วยเช่นกัน

1.6.5 เอทานอล

โดยทั่วไปการเจริญ และการหมักเอทานอลของยีสต์ถูกยับยั้งด้วยเอทานอล โดยพบว่า เอทานอลเข้มข้น 1-2 %โดยน้ำหนัก ทำให้การเจริญของยีสต์ลดลง และการเจริญของยีสต์โดยทั่วไปจะหยุดเมื่อมีเอทานอล 4.7-7.8 %โดยน้ำหนัก แต่ความทนต่อเอทานอลเป็นลักษณะประจำของแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบส่วนที่เป็นกรดไขมันพันธะคู่ในฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ มีรายงานว่าใน *S.cerevisiae* ที่มีกรดไขมันพันธะคู่ในฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์มีปริมาณสูง สามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 13-15.5 %โดยน้ำหนัก (Watson, 1982) อย่างไรก็ตาม เอทานอลเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งที่จำกัดการผลิตเอทานอลของยีสต์ เนื่องจากเอทานอลไปมีผลต่อเอนไซม์และสรีระวิทยาของเซลล์ (Rose,1977) Aiba และคณะ (1968) รายงานว่า เอทานอลยับยั้งการเจริญแบบไม่แข่งขัน (non-competitive Michaelis Menten inhibition ) ต่อการเจริญของยีสต์ แต่จากการศึกษาของ Brown และคณะ (1981) รายงานว่าผลการยับยั้งอัตราการเจริญไม่ได้เป็นไปตามการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน โดยมีผลต่อการยับยั้งอัตราการเจริญและลดความมีชีวิตของเซลล์ การเติมเอทานอลลงไปในระหว่างที่เชื้ออยู่ในช่วงทวีคูณ (log phase) มีผลทำให้อัตราการเจริญของยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกับอัตราการสังเคราะห์เอทานอล แต่ผลของเอทานอลที่มีต่ออัตราการเจริญมีมากกว่าอัตราการหมัก นอกจากเอทานอลแล้วที่มีผลต่อ

เซลล์ยีสต์ ผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก ได้แก่ ไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์ โพรพานอล และ อะซีตัลดีไฮด์ ที่มีความเข้มข้นต่ำเพียง 0.35 % 1.20 % และ 0.50 % โดยน้ำหนัก ตามลำดับ จะมีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์และยังทำให้ยีสต์มีรูปร่างเปลี่ยนไปด้วย (Maiorella et al., 1983)

1.6.6 คาร์บอนไดออกไซด์ (Kuriyama, Mahakaenchanakul, Matsui and Kobayashi, 1993)

คาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ในที่ความดันสูงกว่าบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญและการหมักรุนแรงมากขึ้น คาร์บอนไดออกไซด์ดูเหมือนมีผลยับยั้งต่อปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชันเท่านั้น แต่ก็พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบางอย่างของกิจกรรมของเอนไซม์ เปลี่ยนแปลงสภาพให้ซึมได้ ความสัมพันธ์ของผลเหล่านี้ต่อการผลิตเอทานอลยังไม่ทราบแน่ชัด มีรายงานว่าเมื่อเพิ่มความดันแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลทำให้เกิดการยับยั้งอัตราการเจริญ ทำให้ปริมาณเซลล์ยีสต์ *S.cerevisiae* ลดลงและมีการผลิตกลีเซอรอลลดลง แต่ทำให้มีปริมาณเอทานอลเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งพบการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวภายในเซลล์ยีสต์มากขึ้น

1.7 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกากน้ำตาล

กากน้ำตาลมีสารอาหารและแร่ธาตุหลายชนิดจึงเหมาะสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จุลินทรีย์ในกากน้ำตาลอาจปนเปื้อนมาตั้งแต่เริ่มเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายและมีชีวิตรอดจนกระทั่งหลงเหลืออยู่ในกากน้ำตาล ในกากน้ำตาลใหม่ๆ จะมีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ประมาณ $1x10^2$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถ้าเป็นกากน้ำตาลค้างปีจะตรวจพบแบคทีเรียจำนวนมากถึง $8.4 x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาลเก่าส่วนใหญ่จะสร้างกรดได้ สามารถเจริญในช่วงพีเอชต่ำขณะหมักร่วมกับยีสต์ กากน้ำตาลเก่าจะมีค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 4.3 (ซึ่งค่าปกติควรอยู่ประมาณ 5.5) แสดงว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาลได้สร้างกรดขึ้นในช่วงการเก็บ ถ้านำกากน้ำตาลที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนสูงนี้ไปหมักเอทานอลจะทำให้ผลผลิตต่ำกว่าปกติ (จรูญ คำนวณตา และคณะ, 2525) และจากการสำรวจโรงงานสุรากรมสรรพสามิตใน 4 จังหวัด พบว่ากากน้ำตาลที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตมีแบคทีเรียปนเปื้อนระหว่าง $10^5$-$10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และจากการคัดเลือกแบคทีเรียจากกากน้ำตาลและน้ำล้างขณะหมักที่ทำให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของยีสต์ลดลง พบว่าเป็นแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* ซึ่งให้ความเป็นกรดสูงกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่คัดแยกได้ สามารถเจริญได้ดีในช่วงพีเอช 4-8 และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการเจริญต่ำหรือไม่มีการเจริญ (ณัฐศิษฏ์ ไทยตระกูล, 2528) แต่จากราย

งานของเกศกมล ไทยทอง (2542) รายงานว่าแบคทีเรียปนเปื้อนในกากน้ำตาลไม่น่าจะเป็นปัญหาในกระบวนการหมักเอทานอล ซึ่งได้ทำการแยกแบคทีเรียปนเปื้อนในกากน้ำตาลพบว่าส่วนมากเป็นแบคทีเรียขนิดสร้างสปอร์ที่อยู่ในสกุล *Bacillus* เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอลแล้วแบคทีเรียเหล่านี้เจริญได้ไม่ดี จึงได้ตรวจสอบแบคทีเรียปนเปื้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักพบแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* และแบคทีเรียสกุลนี้มีผลทำให้ปริมาณเอทานอลลดต่ำลงในการหมักแบบแบช เมื่อหมักในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 60 และ 120 กรัมต่อลิตร แต่ไม่มีผลทำให้เอทานอลลดลงที่ความเข้มข้นน้ำตาล 180 และ 220 กรัมต่อลิตร Chang และคณะ(1995) พบว่าเมื่อมีการปนเปื้อนของ *Lactobacillus fermentum* ในระบบการหมุนเวียนเซลล์ยีสต์ในกระบวนการผลิตเอทานอลทำให้อัตราการผลิตเทานอลลดลงเป็น 5.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่ในสภาพปลอดการปนเปื้อนมีอัตราการผลิตเอทานอล 9.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ทั้งในวัตถุดิบและน้ำล่าขณะหมักของกระบวนการหมักเอทานอล มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนหลายชนิดจำนวนมากน้อยแตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดการหมักจะพบจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สามารถเจริญเติบโตแข่งขันกับยีสต์ในถังหมักได้ สาเหตุที่ทำให้แบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* เจริญเด่นกว่ากลุ่มอื่นๆ และเป็นผลให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลลดลงคือ

1.แบคทีเรียสามารถสร้างกรดแลคติกได้และให้ความเป็นกรดสูง ส่งผลกระทบต่อเซลล์ยีสต์ทำให้มีอัตราการเจริญลดลง

2.นอกจากสารอาหารในน้ำล่าแล้ว กรดอะมิโนบางชนิดจากเซลล์ยีสต์ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* (Oliva and Yokoya , 1997)

3.แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชที่กว้างคือ 4-8 และต้องการอากาศในการเจริญน้อยมาก จึงเจริญเด่นกว่ากลุ่มอื่นๆ

4.เมื่อมีแบคทีเรียจำนวนมาก จะเจริญสานกันเป็นร่างแหจับพาเซลล์ยีสต์ตกตะกอนที่ก้นถัง (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, 2530)

1.8 แนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักเอทานอล

เนื่องจากปัญหาพลังงานทำให้เทคโนโลยีการผลิตเอทานอลก้าวหน้าไปอย่างมาก มีการค้นคว้าวิจัยหลายแนวทางโดยมีวิธีการที่แตกต่างกันออกไป แต่ทั้งนี้ก็เพื่อหาทางลดต้นทุนการผลิตลงให้มากที่สุด

1.8.1 การเสาะหาและปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์

จากรายงานของ Morais และคณะ (1996) ได้ทำการแยกจุลินทรีย์สกุล *Saccharomyces* spp. จากอาหารในเขตร้อน เมื่อนำมาหมักเอทานอลพบว่าสามารถทนอุณหภูมิ

ได้ถึง 42 องศาเซลเซียส และยังสามารถหมักเอทานอลได้ที่ความเข้มข้นของซูโครส 500 กรัมต่อลิตร ผลิตเอทานอลได้ 20 กรัมต่อลิตร

1.8.2 การพัฒนารูปแบบของถังหมัก

เป็นการปรับปรุงให้ถังหมักมีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่นถังหมักทรงสูง (tower fermentor) ที่มีรูปร่างต่างๆกัน โดยใช้แก๊สหรืออากาศเป็นตัวช่วยยกเพื่อให้เกิดการหมุนเวียนภายในถัง เป็นการประหยัดพลังงานแทนการใช้มอเตอร์กวนซึ่งต้องใช้กำลังมาก

1.8.3 การเปลี่ยนแปลงรูปแบบและวิธีการหมัก

1.8.3.1การหมักโดยวิธีตรึงเซลล์

เป็นการยึดเซลล์ให้เกาะติดกับตัวกลาง แล้วจึงผ่านสารอาหารสำหรับหมักอย่างต่อเนื่อง ได้ผลผลิตเอทานอลออกมา วิธีนี้มีข้อจำกัดที่ความบริสุทธิ์ของวัตถุดิบ ความสามารถในการเกาะติดกับตัวกลาง เอทานอลที่ได้ก็ไม่สูงมากนัก ตัวอย่างของตัวกลางได้แก่ คาแรคจีแนน (carrageenan) และ อัลจิเนต (alginate) เป็นต้น มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการหมักเอทานอลโดยวิธีตรึงเซลล์ยีสต์มากมายโดยใช้วัสดุตัวกลางแตกต่างกัน (Godia et al.,1987a; Roukas, 1994; Galazzo and Bailey, 1990; Vives et al.,1993; Gosmann and Rehm,1988; Siess and Divies, 1981) ในการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้ calcium alginate เป็นวัสดุตัวกลางในการตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ให้อัตราการผลิตเอทานอลสูงที่สุด (50 กรัมเอทานอลต่อลิตรเจลต่อชั่วโมง) และสภาพเจลยังคงเดิมเมื่อผ่านการหมักที่ยาวนานมากกว่าครึ่งปีอีกทั้งช่วยป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *Acetobacter oxydans* เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารกากน้ำตาลเป็น 4.0 (Nagashima et al, 1984) มีรายงานการใช้วัสดุตัวกลางเป็น carrageenan ตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ได้กำลังการผลิตเอทานอล 27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (Godia et al, 1986b) ซึ่งการหมักโดยใช้ระบบตรึงเซลล์นี้มีข้อดีคือ เซลล์จะไม่หลุดออกนอกระบบ (wash out) แม้ว่าจะทำการหมักที่อัตราเจือจางสูงๆ และสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ในระบบได้ตามต้องการ อีกทั้งการตรึงเซลล์ในวัสดุตัวกลางช่วยป้องกันเซลล์จากภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอีกด้วย ในขณะเดียวกันก็มีข้อเสียคือ ระบบมีการถ่ายเทมวลอาหารและอากาศไม่ดี อาจเกิดภาวะสลายหรือไม่เสถียรของเม็ดตรึงเซลล์และขยายขนาดการผลิต (scale up) ได้ยาก (Chang et al.,1994)

1.8.3.2 การหมักแบบสุญญากาศ

เพื่อลดความเข้มข้นของเอทานอลซึ่งมีผลยับยั้งการหมัก โดยลดความดันลงให้ได้ 32-35 มม.ปรอท ทำให้เอทานอลส่วนใหญ่ระเหยออกจากน้ำหมักได้ตลอดเวลา ให้อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Honorato et al.,1999)

1.8.3.3 การหมักแบบต่อเนื่องและเวียนเซลล์กลับมาใหม่

เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ในถังหมักให้มากขึ้น โดยการแยกเซลล์ออกจากน้ำส่าที่หมักแล้วกลับมาใหม่ ด้วยการใช้เครื่องเหวี่ยง การตกตะกอนของยีสต์ และการกรอง เป็นต้น (Lafforgue-Delorme, 1994; Kuriyama, Ishibashi, Umeda, Murakami and Kobayashi ,1993; Maia and Nelson, 1993)

โดยในทางปฏิบัติเพื่อจะเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักให้มีมากขึ้น วิธีการที่กล่าวมาเหล่านี้จะใช้เสริมกัน เช่น มีงานวิจัยผลิตเอทานอลในถังหมักทรงสูงพร้อมระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์ ได้อัตราการผลิต 28 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จำนวนเซลล์ในถังหมักเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร เวียนกลับโดยใช้การตกตะกอน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ให้กำลังการผลิตสูงกว่าแบบแบชประมาณ 10 เท่า (ศุภพงศ์ ภูวพัฒนะพันธ์, 2527) เป็นต้น

1.9 มูลเหตุในการทำงานวิจัย

การผลิตเอทานอลเพื่อที่จะใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนแก๊สธรรมชาติ หรือน้ำมันปิโตรเลียมแล้ว ยังสามารถผลิตเพื่อเป็นเครื่องดื่ม ใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหาร เครื่องสำอาง และสารเคมี ซึ่งสามารถทำรายได้ให้กับประเทศผู้ผลิตมูลค่ามากกว่าหลายล้านบาทต่อปี จึงมีการพัฒนาระบบการหมักเอทานอลเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตให้สูงขึ้นและลดต้นทุนการผลิต ระบบการหมักแบบแบช (batch fermentation) ซึ่งเป็นระบบที่ใช้อยู่เดิมให้อัตราการผลิตต่ำ ใช้เวลาในการผลิตนานประกอบกับปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ขณะหมัก ทำให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลง จึงได้พิจารณาระบบการหมักแบบต่อเนื่อง(continuous ethanol fermentation) ที่ให้อัตราการผลิตที่สูงกว่าและให้ผลตอบแทนในเชิงเศรษฐศาสตร์มากกว่าระบบหมักแบบแบช มาทดแทนระบบการหมักแบบเดิม พร้อมทั้งระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์ (yeast cell recycling) และระบบเซลล์ยีสต์ตรึงรูป(immobilization) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้มากขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการนำน้ำหมักหลังจากแยกเอทานอลออกแล้วกลับมาใช้เจือจางกากน้ำตาลเตรียมเป็นอาหารกากน้ำตาลสำหรับเติมลงในระบบอีกครั้ง เพื่อเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิต รวมทั้งนำสารอาหารที่เหลือจากการหมักกลับมาใช้ประโยชน์อีกทางหนึ่งด้วย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้ระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์และเซลล์ยีสต์ตรึงรูป เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.10 ขั้นตอนการทำงานวิจัย

1.10.1 ศึกษาการผลิตเซลล์และการผลิตเอทานอลในระบบการหมักแบบแบชของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

1.10.2 ศึกษาภาวะการผลิตเซลล์ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องของยีสต์ *S. cerevisiae*

1.10.3 ศึกษาภาวะการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องที่มีระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

1.10.4 ศึกษาภาวะการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องแบบตรึงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

1.10.5 ศึกษาผลของการนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่ต่ออัตราการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย