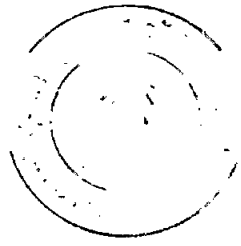
บทที่ 2

การสอบสวนเอกสาร



เอทธิลแอลกอฮอลหรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เอทธานอล เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นผลิตผลจากขบวนการหมัก หรือขบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์พวกยีสต์จะเปลี่ยนสารประกอบพวกแป้งหรือน้ำตาล ซึ่งยีสต์จะปล่อยเอนไซม์ออกมาทำปฏิกิริยากับน้ำตาล โดยน้ำตาล 1 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุลและเอทธิลแอลกอฮอล 2 โมเลกุล ภายใต้สภาพที่ปราศจากอากาศ (Anaerobic condition) (Phaff, 1968)

Pasteur ได้พบว่ายีสต์จะมีในขบวนการหมักทั้งในสภาพที่มีอากาศและปลอดอากาศ โดยที่ในสภาพที่มีอากาศยีสต์จะเจริญเติบโตได้รวดเร็วและหมักแอลกอฮอลได้น้อย ส่วนในสภาพที่ปราศจากอากาศยีสต์จะเจริญได้ช้าแต่หมักแอลกอฮอลได้มากขึ้น (Reed and Peppler, 1973) นอกจากนั้น Robinson, Cori, Neuberg, Harden and Young ยังพบว่าในขบวนการหมักนอกจากจะมีผลิตผลหลัก คือ เอทธานอลและคาร์บอนไดออกไซด์แล้ว ยังมีสารประกอบอื่น ๆ เช่น acetaldehyde (CH_3CHO), glycerol ($CH_2OH.CH.OH.CH_2.OH$) pyruvic acid ($CH_3CO.COOH$) เกิดขึ้นด้วยดังสมการที่เสนอโดย Meyerhof and Embden (Reed and Peppler, 1973)

การผลิตแอลกอฮอลโดยขบวนการหมักมีสิ่งจำเป็นที่ควรคำนึงถึง คือ วัตถุดิบในการผลิต เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ฯลฯ ซึ่งใช้เป็นแหล่ง carbon source (C-source) กับตัวจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เพื่อให้มีขบวนการหมักเกิดขึ้นตลอดทั้งสภาวะต่าง ๆ ที่เป็นส่วนประกอบ

1. วัตถุดิบ

1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักอาจแบ่งได้เป็นประเภทใหญ่ ๆ ตามความเห็นของ Prescott และ Dunn (1959)ดังนี้

1.1.1 Saccharine materials ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล น้ำผลไม้ต่าง ๆ

1.1.2 Starchy materialsได้แก่ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง ข้าวโพด ข้าวต่าง ๆ เช่น ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี

1.1.3 Cellulosis materials ได้แก่ เยื่อกระดาษ เยื่อไม้ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษจากไม้ (sulfite liquor) เป็นต้น

1.2 วัตถุดิบพวกคาร์โบไฮเดรทที่ใช้ในการหมักแอลกอฮอลถูกจัดแบ่งออกตามความเห็นของ Underkofler และคณะ (1954) ออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ saccharine substance และ polysaccharides

1.2.1 Saccharine substance แบ่งเป็น

1.2.1.1 Pure sugar เช่น sucrose, glucose, lactose

1.2.1.2 Blackstrap molasses มีปริมาณน้ำตาลถึง 50%ที่ใช้ในการหมักได้ (50% fermentable sugar) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นซูโครส อินเวิร์ทชูการ์ และสารอนินทรีย์อื่น ๆ

1.2.1.3 Saccharine by-products เช่น whey, sulfite waste liquor, corn molasses, cannery waste, pineapple juice, citrusfruit juice เป็นต้น

1.2.2 Polysaccharides ได้แก่ พวกข้าวชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าวสาลี ข้าวไรน์ ข้าวโพด มันฝรั่ง มันสำปะหลัง เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีของเหลือทิ้งจากการเกษตรต่าง ๆ เช่น ฟางข้าว ฝักข้าวโพด เปลือกถั่ว เป็นต้น

วัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในการผลิตแอลกอฮอลในแต่ละประเทศนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณผลิตผลทางการเกษตรและความเหมาะสมในด้านเศรษฐกิจ เช่น ประเทศไทย กระทรวงอุตสาหกรรม (พ.ศ. 2522) ได้เสนอโครงการผลิตแอลกอฮอลจากวัสดุเกษตรเหลือใช้ ซึ่งได้พิจารณาวัตถุดิบ 4 ชนิด คือ กากน้ำตาล อ้อยสด หัวมันสด และมันเส้น โดยได้พิจารณาถึงราคาวัตถุดิบและค่าใช้จ่ายต่าง ๆ แล้ว ต้นทุนการผลิตแอลกอฮอลจากอ้อยสดจะมีค่าต่ำสุด (วีระ สุสังกรกาญจน์, 2522) ดังตารางต่อไปนี้

วัตถุดิบ	ราคา (บาท/ตัน)	ผลิตแอลกอฮอลได้เฉลี่ย (ลิตร)	ต้นทุนราคาแอลกอฮอล (บาท/ลิตร)
กากน้ำตาล	1,800	300	6.00
อ้อยสด	410	70	5.86
หัวมันสด	1,100	160	6.87
มันเส้น	2,500	390	6.41

ในประเทศอื่น เช่น บราซิลเป็นประเทศที่ปลูกอ้อยและผลิตน้ำตาลมากเป็นอันดับหนึ่งของโลก คือ ผลิตน้ำตาลได้ถึง 7 ล้านตันต่อปี (Humbert, 1976) เมื่อเผชิญกับวิกฤติการณ์น้ำมันขึ้นราคา จึงได้นำเอาผลผลิตเกษตรที่มีปริมาณแป้งและน้ำตาลสูงมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล (de Menezes, 1978) ได้ช่วยลดความตึงเครียดโดยได้ตั้งโครงการใช้แอลกอฮอลแทนเชื้อเพลิง (The National Alcohol Program of Brazil) ในเดือนพฤศจิกายน 2518 (Jackson, 1976) ดังนั้นบราซิลจึงมีการผลิตแอลกอฮอลจากอ้อยสดและกากน้ำตาล รวมทั้งพืชผลอื่นทางเกษตร

กรรมที่มีมาก เช่น มันสำปะหลัง (Jackson, 1976; Humbert, 1976; de Menezes, 1978) และ babassu-palm ปลูกมากถึง 13.5 ล้านเฮกตาร์ (hectares) ใน 9 มลรัฐ (Carioca and Scares,1978) รัฐบาลบราซิลได้ตั้งเป้าหมายการผลิตแอลกอฮอลไว้ในปี 1985 จะผลิตได้ 4 – 6 ล้านลูกบาศก์เมตรต่อปี เฉพาะพืชมันสำปะหลังอย่างเดียวจะผลิตได้ 1 ล้านลูกบาศก์เมตร (Milfont Jr. 1978) ในสหรัฐอเมริกา การผลิตแอลกอฮอลจะผลิตจากข้าวต่าง ๆ เช่น ข้าวสาลี หมู เกาะฮาวายมีการผลิตจากน้ำสับปะรด สวีเดนมีการผลิตจากน้ำเสียจากโรงงานทำเยื่อกระดาษ (Prescott and Dunn, 1959)

วัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตแอลกอฮอลเป็นพืชผลที่มีปริมาณแป้งและน้ำตาลมากพอสมควร เมื่อนำมาใช้ก็เติมสารอาหารบางชนิดเพื่อให้วัตถุดิบนั้น ๆ มีสภาพอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เพื่อเกิดการหมัก

2. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทมากเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมการหมักคือยีสต์ โดยทั่วไปแล้วคือ ยีสต์พวก Saccharomyces cerevisiae (Kunkee and Amerine, 1970; Prescott and Dunn, 1959; Mehta and Khanna, 1964) สำหรับมาตรฐานในการคัดเชื้อยีสต์จะพิจารณาในแง่ต่าง ๆ เช่น อัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วของตัวจุลินทรีย์ ความทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาล ความสามารถในการเปลี่ยนสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรทไปเป็นแอลกอฮอลได้สูง ความทนต่อการเปลี่ยนอุณหภูมิ เปลี่ยนสภาพความเป็นกรดด่างและความดันเป็นต้น (Underkofler, et al., 1954)

ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมหมักแบ่งเป็นสองพวก คือ พวกที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลเพื่อการสร้างเซลล์ใหม่ได้มากกว่าการหมักแอลกอฮอลกับพวกที่ใช้น้ำตาลไปในการหมักแอลกอฮอลได้ดีกว่าการสร้างเซลล์ใหม่หรือสารประกอบอื่น ๆ (White, 1956)

น้ำตาลที่ยีสต์จะหมักให้เป็นแอลกอฮอล คือ กลูโคส Rose และ Harrison (1971) ได้อ้างว่า Pasteur พบว่ากลูโคสจะถูกใช้ไปในการหมักถึง 95% โดยจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอล 48.4% คาร์บอนไดออกไซด์ 46.6% กลีเซลรอลและกรดซักซินิค 0.6%

ยีสต์บางพวกหมักน้ำตาลกลูโคสได้ 75% แต่หมักฟรุคโตสได้ 50% บางพวกก็หมักกลูโคสและฟรุคโตสได้เท่า ๆ กัน และบางพวกหมักน้ำตาลซูโครสได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนซูโครสไปเป็นอินเวิร์ทชูการ์เสียก่อน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่ายีสต์สามารถหมักอินเวิร์ทชูการ์ได้เร็วเท่า ๆ กับอัตราที่ยีสต์เปลี่ยนซูโครสไปเป็นอินเวิร์ทชูการ์ (Amerine and Cruess, 1967; Kunkee and Amerine, 1970) ดังนั้นสายพันธุ์ของยีสต์จึงมีผลโดยตรงต่อการหมักแอลกอฮอล (Kunkee and Amerine, 1970)

การแยกเชื้อยีสต์โดยธรรมชาติจะพบยีสต์ได้จากพืชและผลไม้ต่าง ๆ เช่น ในน้ำตาลสด น้ำตาลเมา มีผู้พบยีสต์ต่าง ๆ ดังรายงานของ Guilliermond, Reyne พบยีสต์ Saccharomyces chevalieri, Roelfsen พบยีสต์ Saccharomyces chevalieri, Saccharomyces cerevisiae, Ahmad และคณะศึกษาในน้ำตาลโตนดสดในแถบอินโด-ปากีสถาน พบยีสต์ Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces chevalieri Guilliermond และ Saccharomycodes ludwigii Hansen (Ahmad et al., 1954)

หลักการแยกเชื้อยีสต์จะเลือกใช้อาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์นั้น ๆ รวมทั้งการทำให้อาหารมีสภาพไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (Prescott and Dunn, 1959) เช่น การปรับอาหารให้ได้ pH ประมาณ 3 – 4 เพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย

Shehata (1960) ได้แยกเชื้อยีสต์จากน้ำอ้อย โดยเก็บตัวอย่างจาก 5 โรงงานในรัฐ Sao Paulo ประเทศบราซิล โดยเก็บตัวอย่างน้ำอ้อยขณะที่กำลังจะส่งจากท่อไปถังหมัก ในถังหมักขณะกำลังหมัก น้ำส่วนบนสุดและก้นถังหมักและน้ำล้างอ้อย

จากตัวอย่างรวม 77 ตัวอย่างนำมาแยกเชื้อบน malt agar โดยทั่วไปพบว่าในแต่ละตัวอย่างจะมี 1 – 2 ชนิดที่เห็นแตกต่างกัน เชื้อที่พบส่วนใหญ่ได้แก่ Saccharomyces, Pichia, Candida และ Torulopsis

Okafor (1972) แยกเชื้อยีสต์จาก palm-wine จากบางส่วนของ Nigeria โดยการแยกเชื้อ (streak plate) บน glucose yeast extract agar ศึกษาความแตกต่างในรูปพรรณสัณฐานของเชื้อโดยใช้ broth liquid และ solid Wickerman's malt extract medium พบว่าส่วนใหญ่เป็นยีสต์ Saccharomyces คือพบ Saccharomyces 12 genera Candida 4 genera และ Endomycopsis 1 genus

Ethiraj และคณะ (1980) ได้แยกเชื้อยีสต์จากดอกไม้ชนิดหนึ่ง (Mahua flower) ซึ่งมีรายงานว่าบางส่วนในประเทศอินเดียใช้ดอกไม้นี้เป็นวัตถุดิบในการหมักแอลกอฮอล การแยกเชื้อทำโดยเอาดอก Mahua มาบดแล้วใช้ผ้าคั้นน้ำ นำน้ำที่คั้นนี้มาหมักในฟลาสที่อุณหภูมิ 20 °ซ. ทำให้ความเข้มข้นเจือจางลงด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว แยกเชื้อในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มี yeast extract-peptone-dextrose agar ซึ่งมีส่วนประกอบคือ yeast extract 5.0 กรัม peptone 10.0 กรัม glucose 20.0 กรัม และ agar 20.0 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร เมื่อแยกเชื้อได้บริสุทธิ์แล้วเก็บในอาหารสูตรเดิมที่อุณหภูมิ 4 – 5 °ซ. ตัวอย่างเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากดอก Mahua คือ Kloeckera, Candida, Torulopsis, Pichia และ Saccharomyces

ในการทำน้ำตาลเมา (palm wine) จากต้นปาล์ม Elaeis guineensis ในประเทศ Nigeria มักพบปัญหาเกี่ยวกับจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการเสมอ (Contamination) จากการศึกษาจุลินทรีย์จากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของปาล์ม พบว่าส่วนใหญ่จะเป็นยีสต์และแบคทีเรีย ยีสต์ที่พบเสมอคือ Saccharomyces cerevisiae ส่วนแบคทีเรียคือ Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides, Micrococcus sp., Sarcina sp.

การแยกเชื้อทำโดยนำเนื้อเยื่อส่วนที่ต้องการแยกมาปั่นกับสารละลายน้ำเกลือในเครื่องปั่น (waring blender) แล้วทำให้เชื้อเจือจางลง นำไปแยกเชื้อราและยีสต์โดยใช้ malt extract agar ที่ปรับ pH 3.5 และแยกเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ tryptone agar pH 5.8 ตามวิธีการของ Sharf (Faparusi, 1973; Faparusi, 1974)

Rose (1976) แยกเชื้อยีสต์จากโรงงานน้ำตาลโดยแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 20% กลูโคส 5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 4 วัน แล้วจึงไปทดสอบคุณสมบัติความสามารถในการหมักแอลกอฮอล

ปราโมทย์ สิริโรจน์ (2521) แยกเชื้อยีสต์ในน้ำทิ้งจากขบวนการแปรรูปอาหารถั่วเหลือง โดยวิธี cross streak โดยใช้ loop แตะน้ำจากแหล่งที่จะแยกยีสต์ streakลงบนอาหารซึ่งประกอบด้วยน้ำต้มถั่วเติมวุ้น 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อแยกได้เชื้อบริสุทธิ์เก็บยีสต์ไว้ใน slant อาหารน้ำต้มถั่ว

สรุปการแยกเชื้อยีสต์ควรใช้อาหารที่มีส่วนประกอบคล้ายกับแหล่งซึ่งยีสต์ชนิดนั้นอาศัยอยู่ในธรรมชาติก่อน และเติมสารบางชนิดเพื่อให้อาหารนั้นไม่เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์อื่น เช่น ทำให้อาหารเป็นกรดเพิ่มขึ้นเพื่อไม่เหมาะแก่การเจริญของแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น การแยกเชื้อที่เป็น normal flora ในสวนแอปเปิ้ลโดยใช้ apple juice yeast extract agar (Prescott and Dunn, 1959; Beech and Davenport, 1970)

การหมักแอลกอฮอล ถ้าวัตถุดิบที่ใช้เป็น carbon source (C-source) อยู่ในรูปของแป้ง เช่น มันสำปะหลัง จะต้องเปลี่ยนแป้งให้อยู่ในรูปของน้ำตาลอีกขั้นตอนหนึ่งก่อน การหมักจึงเกิดขึ้นได้ดี Ueda และ Koba (1980) ได้พบราชนิด black Aspergillus สามารถให้ enzyme amylase ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงมากในการย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบ (raw cassava starch) พบว่าถ้าเอาแป้ง

มันสำปะหลังดิบคลุกกับ black Aspergillus amylase และ yeast ที่ pH 3.5 อุณหภูมิ 30 °ซ. ภายในเวลา 1 วัน จะเกิดการหมักได้แอลกอฮอลเกิดขึ้น 10% การค้นพบ black Aspergillus amylase ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบนี้มีประโยชน์มาก ช่วยลดค่าใช้จ่ายและลดการใช้พลังงานความร้อนในการทำให้แป้งมันสุกก่อน ในบราซิลการใช้มันสำปะหลังเพื่อการหมักแอลกอฮอลต้องใช้ไม้เป็นเชื้อเพลิงถึง 0.70 กิโลกรัมเพื่อต้มมันสำปะหลัง 1 กิโลกรัมให้สุก (0.70 kg. wood/kg. cassava) (Jackson, 1976)

Moo และ Kim (1980) ได้พบวิธีการใช้จุลินทรีย์ในขบวนการหมักแอลกอ-ฮอลจากฟางข้าวและซังข้าวโพด โดยนำฟางข้าวและซังข้าวโพดหั่นและบดก่อนนำมาแช่ใน 1N NaOH เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วใส่เชื้อรา Trichoderma ซึ่งจะเป็นตัวให้เอ็นไซม์ในการย่อยเซลลูโลส ขณะเดียวกันเติมยีสต์ Saccharomyces เพื่อให้เกิดการหมักเอทธานอล ซึ่งสามารถจะใส่ราและยีสต์ลงไปเกือบพร้อมกัน (single-step saccharification-fermentation process)

แต่ถ้าวัตถุดิบที่จะนำมาผลิตแอลกอฮอลอยู่ในรูปน้ำตาลอยู่แล้ว ก็ไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น เพียงแต่ใช้จุลินทรีย์ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้ยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล นักวิจัยและนักจุลชีววิทยาได้พยายามค้นหาสายพันธุ์ยีสต์และปัจจัยอื่น ๆ ที่ทำให้ยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอลให้ได้ปริมาณสูงและใช้เวลาในการหมักน้อย ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านั้นเช่น pH อุณหภูมิ ตลอดจนอาหารเสริมต่าง ๆ ที่เติมลงในวัตถุดิบเพื่อช่วยให้ยีสต์เจริญได้ดีและส่งผลถึงการหมักแอลกอฮอลได้สูง

3. pH ของอาหาร

pH ของอาหารหรือความเป็นกรดด่างของสารที่นำมาหมัก ยีสต์ส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในช่วง pH 3.5 – 7.0 (Rose and Harrison, 1971) แต่ในอุตสาหกรรมหมักมักปรับให้อยู่ในช่วง pH 3.5 – 4.5 ซึ่งยีสต์สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเป็นกรดได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่น ขณะเดียวกันที่ pH นี้จะยับยั้งการเจริญของ

แบคทีเรียที่ปะปนมาด้วย ความสามารถในการรักษาระดับความเป็นกรดด่างในอาหาร (buffering capacity) ก็เป็นสิ่งสำคัญเพื่อให้ยีสต์สามารถหมักได้ดีตลอดเวลาการหมัก (Prescott and Dunn, 1959) pH ที่เหมาะสมของยีสต์แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน เช่น Candida guilliermondii pH ที่เหมาะสมที่สุดคือ 4.5 (Concone et al., 1976), Hansenula anomala, Candida utilis, pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4.5 – 5.0 (Rose and Harrison, 1971) นอกจากนั้น pH ยังมีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นด้วย (Baker, 1976)

4. อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะแก่การเจริญของยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 25 – 30 °ซ. (Prescott and Dunn, 1959; Rose and Harrison, 1971) แต่ในอุตสาหกรรมหมักส่วนใหญ่จะใช้ประมาณ 30 °ซ. (Prescott and Dunn, 1959; Reed and Peppler, 1973; Rose and Harrison 1971)ผลของอุณหภูมิก็เหมือนผลทางชีววิทยาอื่น ๆ อัตราการหมักจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่สุด (optimal temperature) อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดของยีสต์แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน เช่น Hansenula polymorpha เจริญได้ดีที่ 45 °ซ. เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทธานอล(Levine and Cooney, 1973), Candida tropicalis เจริญได้ดีที่ 37 °ซ. (Rose and Harrison, 1971) ในการผลิต Candida utilis ในขั้นอุตสาหกรรม อุณหภูมิเริ่มต้นของการหมักคือ 25 – 26 °ซ. แต่ระยะหลังอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นเป็น 30 °ซ. เพราะว่าขณะเกิดขบวนการหมักจะมีความร้อนเกิดขึ้น (Rose and Harrison, 1971)

5. อาหารเสริมต่าง ๆ

5.1 ไนโตรเจน ยีสต์ทุกชนิดใช้แอมโมเนียมซัลเฟตได้ ส่วนแอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมโมโนฟอสเฟต ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียนคาร์

โบเนต แอมโมเนียมไบคาร์โบเนต แอมโมเนียมทาร์เทรท และยูเรีย ยีสต์หลายชนิดใช้ได้ดี (Prescott and Dunn, 1959; Rose and Harrison, 1971; Mehta and Khanna, 1964) กากน้ำตาลจากอ้อยประกอบด้วยสารที่มีไนโตรเจนแต่ก็ยังมีปริมาณไม่พอเพียงต่อยีสต์ในการใช้เพื่อการเจริญเติบโต จึงมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต หรือแอมโมเนียมฟอสเฟตเพื่อเพิ่มสารอาหารไนโตรเจน (Reed and Peppler, 1973) การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรียลงในสารละลายนั้นเพื่อเป็นส่วนเพิ่มปริมาณกรดอะมิโน ซึ่งมีส่วนไปเสริมคุณค่าในด้านอาหารของยีสต์ด้วย (Magalhães et al., 1979)

5.2 ฟอสฟอรัส ยีสต์จะดูดซึมโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตได้ดีกว่าไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Rose and Harrison, 1971) ฟอสเฟตเป็นธาตุอาหารที่สำคัญอาจเติมในรูปของไดแอมโมเนียมฟอสเฟต กรดฟอสฟอริกหรือรูปอื่น ๆ (Prescott and Dunn, 1959; Rose and Harrison, 1971) กากน้ำตาลทุกชนิดมีไนโตรเจนและฟอสเฟต แต่ปริมาณไม่เพียงพอและฟอสเฟตบางส่วนรวมอยู่กับสารอินทรีย์ทำให้ยีสต์นำไปใช้ไม่ได้ ในทางอุตสาหกรรมจึงมีการเติมแอมโมเนียมฟอสเฟตหรือเกลืออัลคาไลน์ฟอสเฟต (White, 1956; Reed and Peppler, 1973)

5.3 วิตามินและแร่ธาตุอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์เพื่อเป็น co factor ของเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น แมกนีเซียม โคบอลท์ เหล็ก สังกะสี เป็นต้น และสารบางชนิด เช่น ไบโอติน ไธอามีน ไอโนซิทอล (biotin, thiamine, inositol) เพื่อใช้ในการเจริญ (Prescott and Dunn, 1959; Reed and Peppler, 1973) และมีผลต่อปฏิกิริยาการหมักด้วย (Baker, 1976)

6. <u>ปริมาณและวิธีให้อากาศ</u>

วิธีการให้อากาศแก่ยีสต์ทำได้สองวิธี คือ ใช้เครื่องเขย่า ยีสต์จะมีโอกาสได้รับอากาศมากน้อยขึ้นกับปริมาณช่องว่างของอาหารในฟลาสและอัตราเร็วของ

การเขย่า เพื่อให้เซลล์สัมผัสกับอากาศและอาหารได้ทั่วถึง อีกวิธีคือ การใช้ถังหมัก (fermenter) ซึ่งจะมีเครื่องพ่นอากาศ โดยพ่นอากาศที่ปราศจากเชื้อในลักษณะฟองอากาศลงไป ฟองอากาศยิ่งเล็กเท่าไรผิวหน้าของฟองอากาศเพิ่มขึ้น ออกซิเจนละลายในอาหารมากขึ้น ทำให้ระยะเวลาที่ฟองอากาศสัมผัสกับอาหารนานขึ้น เครื่องพ่นอากาศระดับอุตสาหกรรมสามารถพ่นฟองอากาศที่มีขนาดตั้งแต่ 0.0001 – 1 นิ้ว โดยใช้ท่ออากาศขนาด $\frac{1}{64}$ – $\frac{1}{32}$ นิ้ว นอกจากนี้ถังหมักมีใบพัดกวนให้อากาศและฟองอากาศกระจายได้ดีสม่ำเสมอทั่วถังหมัก ถังหมักที่มีลักษณะแคบและสูง จะดีกว่าถังหมักที่มีลักษณะกว้างและเตี้ย เพราะฟองอากาศให้สัมผัสกับอาหารและเชื้อได้นานขึ้น (Prescott and Dunn, 1959) มีผู้รายงานว่า ปริมาณอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ คือ 1 หน่วยปริมาตรของอากาศ ต่อ 1 หน่วยปริมาตรของอาหารต่อนาที (1 v.v.m.) (ปราโมทย์, 2521; Vananuvat and Kinsella, 1975)

การให้อากาศจะไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์เชื้อหมัก ประสิทธิภาพในการกวนและการให้อากาศดีจะทำให้มีการใช้น้ำตาลมากขึ้น (Reiser, 1954; Bunker, 1963, นิคม ติปะวาโร, 2523) และผลผลิตยีสต์เพิ่มขึ้นด้วย (Vananuvat and Kinsella, 1975) แต่ถ้าหากใช้น้ำตาลไปมากจะทำให้เหลือน้ำตาลที่ใช้ในการผลิตเอทธานอลน้อยลงไป ปริมาณเอทธานอลที่ได้จะน้อยตามไปด้วย (นิคม ติปะวาโร, 2523)

Yoshisawa (1978) เลี้ยงยีสต์เพื่อช่วยในการกำจัดน้ำทิ้งจากการทำเหล้า Seké พบภาวะที่เหมาะแก่การเจริญของ <u>Hansenula anomala</u>, <u>Pichia acaciae</u> คือ ปรับ pH = 5 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. จำนวนรอบการเขย่า 110 rpm ปราโมทย์ ศิริโรจน์ (2521) เลี้ยงยีสต์ที่ให้โปรตีนสูง YK 32 และ YK 43 พบว่ายีสต์ทั้งสองชนิดเจริญได้ดีที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 30 °ซ. โดยใช้ความเร็วจำนวนรอบการหมุนของเครื่องเขย่า 300 rpm.

7. ปัจจัยอื่น ๆ

การหมักแอลกอฮอล นอกจากสิ่งที่ควรคำนึงดังกล่าวข้างต้น ยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น ปริมาณยีสต์ที่ใส่ลงไปใช้ในการหมักแต่ละครั้ง (inoculum size) ชนิดเชื้อยีสต์ ปริมาณอาหารเสริมที่ใช้กับวัตถุดิบแต่ละชนิด การปรับสภาพอาหารต่าง ๆ ให้เหมาะสมสำหรับยีสต์แต่ละสายพันธุ์ เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงและข้อปลีกย่อยอื่น ๆ ซึ่งจะกล่าวรวม ๆ ตามรายงานของนักวิจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

Reiser (1954) ได้รายงานการเลี้ยงยีสต์ Torulopsis utilis ในน้ำทิ้งจากโรงงานมันสำปะหลัง พบว่าในน้ำทิ้งมีโปรตีน 37% น้ำตาล 12% แป้ง 0.8% มีฟอสฟอรัส โปตัสเซียม โซเดียม ปริมาณมากพอที่ยีสต์เจริญได้ และเมื่อปรับอุณหภูมิที่ 28 – 30 °ซ. pH 5 หรือต่ำกว่าจะไม่มีแบคทีเรียขึ้น นอกจากนี้ตัวยีสต์เองยังให้ปริมาณโปรตีนและวิตามินบีคอมเพล็กซ์สูงและใช้ประโยชน์ในการกำจัดน้ำเสียได้ดี คือ พบว่าลด Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.) ได้ 60% หรือมากกว่า และใช้อาหารในน้ำทิ้งไปได้ 40% ในเวลา 5 วัน

Kiuchi และคณะ (1975) คัดยีสต์ Saccharomyces cerevisiae 88/74 จากน้ำต้มถั่วซึ่งเป็นยีสต์ที่เจริญในน้ำต้มถั่วแล้วให้กลิ่นหอม และเมื่อศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมโดยการปรับสภาพต่าง ๆ เพื่อให้ยีสต์มีการเจริญดีที่สุด พบว่ายีสต์จะเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 – 30 °ซ. pH = 4 เพิ่ม C-source คือเติมน้ำตาล 5% และเพิ่มโซเดียมอะซิเตทและเอทธิลแอลกอฮอล เติม nitrogen source (N-source) คือ แอมโมเนียมซัลเฟต คอร์นสตีพลิเคอร์ ยูเรีย โซเดียมกลูตาเมท เปปโตน ซึ่งในสภาพอาหารดังกล่าวในขั้นสุดท้ายพบว่าเอทธิลแอลกอฮอลเป็นผลิตผลหลักที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ Saccharomyces cerevisiae 88/74

Cysewski และ Wilke (1976) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอทธานอลและการสร้างเซลล์ของ Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126 โดยใช้ 2% inoculum size ศึกษาการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด

5 ลิตร สารอาหารที่ใช้คือ กลูโคส ยีสต์เอกซ์แทรกและสารอื่น ๆ (รายละเอียดสูตรอาหารดูในภาคผนวก หน้า 94) ปรับ pH = 4 โดยใช้ 6 M H_2SO_4 หรือ 6M NaOH หมักในที่อุณหภูมิ 35 °ซ. วัดเอทธานอลที่เกิดขึ้นโดยวิธี gas chromatography วัดปริมาณเซลล์โดยการวัดความขุ่นด้วย Fischer Electrophotometer ความยาวคลื่น 560 nm โดยนำตัวอย่างมา 10 มล. วัดผลทุก 4 ชั่วโมง ผลที่ได้คือ ความเข้มข้นและระยะเวลาในการให้น้ำตาลจะมีผลต่อการผลิตเอทธานอล ถ้าเพิ่มอัตราเร็วในการให้น้ำตาลจะทำให้การผลิตเอทธานอลลดลง และยีสต์จะใช้น้ำตาลเพื่อการหมักแอลกอฮอลได้ 70% อีก 30% ใช้ไปในการสร้างเซลล์

005299

Welles และ Blanch (1976) ศึกษาผลของการให้อาหารไม่ต่อเนื่อง (discontinuous feeding) ต่อการผลิตเอทธานอลด้วยยีสต์ Saccharomyces cerevisiae ATCC 18790 ในถังหมัก กวนอาหารด้วยความเร็ว 350 rpm สภาพในถังหมักปราศจากออกซิเจน โดยการพ่นไนโตรเจนเข้าถังหมัก สารอาหารที่ใช้คือ กลูโคส 10 กรัม/ลิตร เพิ่มอาหารเสริมคือยีสต์เอกซ์แทรก 2 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 ± 0.5 °ซ., pH 5 ± 0.2 โดยปรับด้วย 0.5 N NaOH วัดปริมาณเซลล์ยีสต์โดยการวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 610 nm . ผลการศึกษาพบว่าถ้าได้กลูโคสมากหรือน้อยไปยีสต์จะพยายามปรับตัวด้วยการสร้างเอ็นไซม์ที่จำเป็นขึ้นซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองพลังงานมาก และกรรมวิธีนี้ทำให้เอทธานอลที่ผลิตขึ้นได้มีค่าใช้จ่ายสูง

Eroshin และผู้ร่วมงาน (1976) ศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ Saccharomyces cerevisiae TBPM Strain 14 (Academy of Science, U.S.S.R.)โดยศึกษาในถังหมัก สารอาหารที่ใช้เติมไปปริมาณมากคือโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ NH_4Cl ยังมีสารอาหารอื่น ๆ อีกหลายชนิด ผลที่ได้คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญของยีสต์คือ 28.5 °ซ. ที่ pH 4.1 (รายละเอียดสูตรอาหารดูในภาคผนวก หน้า 95)

Mehta และ Khanna (1964) ศึกษาสารอาหารที่ควรเพิ่มในการหมักแอลกอฮอลจากกากน้ำตาล พบว่าสารอาหารยูเรียกับแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลต่อการเพิ่มปริมาณและเร่งการหมักเอทธานอลและปริมาณที่เหมาะสมที่ควรเติมลงไปในกากน้ำตาลชนิด carbonation molasses คือ 0.07% และ 0.13% ตามลำดับ

Concone และคณะ (1976) ศึกษาภาวะของอาหารที่เหมาะต่อการเจริญของยีสต์ Candida guilliermondii โดยใช้น้ำมันดีเซลเป็น C-source พบว่ายีสต์ดังกล่าวจะเจริญได้ดีที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 30 – 35 °ซ. ต้องเพิ่มอาหารเสริม คือ ยีสต์เอกซ์แทรก 0.1 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 0.25 กรัม น้ำมันดีเซล 2 กรัม/ลิตร

Bach และคณะ (1978) ศึกษาการวัดเอทธานอลจากถังหมักเมื่อเลี้ยงยีสต์ Saccharomyces cerevisiae ใช้สูตรอาหารที่มีสารประกอบต่าง ๆ ดังรายละเอียดในสูตรอาหาร ในภาคผนวก หน้า 96 โดยใช้อาหารที่เตรียมขึ้น 20 มล. ในน้ำ 3,300 มล. ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. ปรับ pH 4.5 ด้วย 5N NaOH ขนาดปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ใช้ 180 มล. ซึ่งจะมีปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ 45 มก./มล.

Rankine (1955) ศึกษาสภาพต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสร้างเอทธานอลจากน้ำอุ่นด้วยยีสต์ พบว่าที่ปริมาณเชื้อ 1% อุณหภูมิ 25 ± 1 °ซ. pH 3.5 เมื่อศึกษาปริมาณเอทธานอลที่เกิดขึ้นในกรณีที่ให้ปริมาณน้ำตาลและออกซิเจนต่างกัน พบว่าน้ำอุ่นที่มีปริมาณน้ำตาลสูงและเพิ่มออกซิเจนให้ด้วย จะทำให้เพิ่มปริมาณเอทธานอลสูงขึ้น

de Menezes (1978) ได้กล่าวถึงการผลิตเอทธานอลจากมันสำปะหลังโดยทั่วไปใช้ปริมาณยีสต์ 5 – 10% ในอาหารที่มีอาหารเสริมคือไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 4 – 5 อุณหภูมิ 30 °ซ. ระยะเวลาการหมัก 36 – 48 ชั่วโมง และได้อ้างรายงานของ Nagodawthana ในปี 1974 ว่าการใช้ปริมาณเชื้อมากและเพิ่มอาหารเสริมด้วยจะลดเวลาการหมักได้

Poosaran (1980) ศึกษาการหมักแอลกอฮอลจากแป้งมันสำปะหลังสุกด้วยยีสต์ พบว่าเมื่อใช้สารละลายของแป้งมันสำปะหลัง 15% ความเข้มข้นของเอ็นไซม์

α-amylase TCI 0.1% ปริมาณยีสต์ 1% เพิ่มอาหารเสริมต่าง ๆ คือ โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% ยีสต์เอกซ์แทรก 0.1% ที่ pH 4.6 อุณหภูมิ 30°ซ. ใช้เวลาหมัก 88 ชั่วโมง โดยไม่มีการเขย่าฟลาส วัดปริมาณแอลกอฮอลได้สูงสุด 7%

เชิดชัย เชี่ยวธีรกุล (2518) ได้รายงานว่าสถาบันค้นคว้าอาหารได้มีการทดลองใช้กากน้ำตาลมาเลี้ยงยีสต์เพื่อลดปัญหากากน้ำตาลที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของน้ำในแม่น้ำลำคลอง พบว่าในสารอาหารที่มาใช้เลี้ยงยีสต์ Saccharomyces cerevisise KY 19 ให้ปริมาณสูงกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาล 1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5% โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2% ปรับ pH ด้วย NH_4OH ให้อยู่ในระหว่าง pH 4.5 ที่อุณหภูมิ 28 – 33°ซ. ใช้วิธีให้อากาศโดยเป่าอากาศเข้าถังหมักในอัตรา 5 ลิตร/นาที

Carioca และ Scares (1978) ได้ศึกษาสภาพที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทธานอลจากปาล์มบาบัสสุ หลังจากผ่านขบวนการเปลี่ยนแป้งในผลบาบัสสุเป็นน้ำตาลแล้ว ในสารละลายของบาบัสสุ 1 ลิตร เริ่มขบวนการหมักด้วยการเติมยีสต์ 4 กรัม (Fleischmann pressed yeast) ยีสต์เอกซ์แทรก 5 กรัม หมักที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 – 30°ซ.) ตั้งไว้ให้เกิดการหมักเป็นเวลา 42 ชั่วโมง นำน้ำส่าที่ได้มากลั่นสองครั้ง วัดปริมาณแอลกอฮอลด้วยวิธี gas chromatography ได้แอลกอฮอลที่มีความบริสุทธิ์ 92% จำนวน 90 มิลลิลิตร

Ueda และ Koba (1980) ได้ศึกษาการหมักแอลกอฮอลจากแป้งข้าวโพดดิบ หลังจากที่ใช้เอ็นไซม์ Black-Koji Amylase ย่อยแป้งแล้วในสารละลายแป้ง 50 มล. ปรับ pH 3.5 ด้วยกรดฟอสฟอริค 80% อุณหภูมิ 30°ซ. ใช้ยีสต์ 0.5 กรัม (0.5 gm compressed baker yeast) ซึ่งเทียบเท่าจำนวนเซลล์ 4.4×10^8 เซลล์/มล. เมื่อตั้งให้เกิดการหมักเป็นเวลา 3 วัน ได้ปริมาณเอทธานอล 7% โดยปริมาตรต่อปริมาณทั้งหมด และเอทธานอลจะเพิ่มขึ้นเป็น 11% ถ้ามีการเพิ่มอากาศโดยการเขย่าฟลาส

การเกิดวิกฤตการทางพลังงานทำให้งานวิจัยต่าง ๆ มุ่งไปสู่การผลิตแอลกอฮอล เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน ได้มีการค้นหาเทคนิคต่าง ๆ เพื่อการผลิตที่เหมาะสมกับเศรษฐกิจ เทคนิคการผลิตแอลกอฮอลจากกากน้ำตาลและมันสำปะหลังมีมาก ในปัจจุบันได้มุ่งไปสู่การผลิตแอลกอฮอลจากน้ำอ้อยโดยตรง ซึ่งโรงงานผลิตแอลกอฮอลจากน้ำอ้อยโดยตรงแห่งแรกก็ได้เริ่มการผลิตแล้วเมื่อเดือนพฤศจิกายน 2518 (Humbert, 1976) ในการผลิตแอลกอฮอลจากอ้อย แม้ว่าต้นทุนการผลิตยังสูงอยู่ แต่ถ้าราคาน้ำตาลมีราคาต่ำลง การผลิตแอลกอฮอลจากน้ำตาลจะเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง การผลิตแอลกอฮอลนอกจากจะได้เอทธานอลเป็นผลผลิตหลักแล้ว ยังได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลพลอยได้อีกด้วย (Birkett, 1978)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย