บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยมีประชากรเพิ่มขึ้น และเศรษฐกิจของประเทศกำลังเติบโต ทำให้ความต้องการใช้พลังงานเชื้อเพลิงสูงขึ้นตามไปด้วย ถึงแม้ประเทศไทยจะมีแหล่งทรัพยากรปิโตรเลียม ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติเป็นของตัวเอง แต่ก็ไม่เพียงพอกับปริมาณที่ต้องการ ทำให้ต้องนำเข้าพลังงานจากต่างประเทศกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณที่ต้องการใช้ ดังเห็นได้จากมูลค่าการนำเข้าเชื้อเพลิงในปี พ.ศ. 2549 มีมูลค่าทั้งสิ้นประมาณ 970,000 ล้านบาท คิดเป็นการนำเข้าน้ำมันดิบ 772,000 ล้านบาท (กระทรวงพาณิชย์, 2007) เพื่อลดปริมาณการนำเข้าน้ำมัน ทางเลือกหนึ่งที่เหมาะสมคือการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถผลิตได้ในประเทศมาใช้เป็นพลังงานทดแทน เป็นการช่วยชาติในการลดการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิง และยกระดับราคาพืชผลทางการเกษตร รวมทั้งช่วยลดมลพิษไอเสียทางอากาศและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

การนำเอาวัตถุดิบทางการเกษตรมาใช้เป็นพลังงานทดแทน ทำได้โดยการนำเอาวัตถุดิบ เช่น อ้อย มันสำปะหลัง รวมทั้งธัญพืช เป็นต้น ไปหมักให้ได้เป็นเอทานอล ซึ่งเอทานอลสามารถนำไปใช้ผสมเข้ากับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วน 10 ต่อ 90 เป็นแก๊สโซฮอล์ สามารถนำมาใช้กับเครื่องยนต์ได้ โดยไม่ต้องปรับปรุงแก้ไขเครื่องยนต์

อย่างไรก็ตาม ในปี 2548 ประเทศไทยได้ออกแผนยุทธศาสตร์ในการผลิตแก๊สโซฮอล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน โดยมีความต้องการใช้เอทานอลประมาณ 1 ล้านลิตรต่อวัน และจะเพิ่มขึ้นในปี 2554 เป็น 3 ล้านลิตรต่อวัน แต่ปัจจุบันมีโรงงานผลิตเอทานอลเพียง 6 โรง คือ บริษัทพรวิไลอินเตอร์เนชั่นแนล กรุ๊ป เทรดดิ้ง จำกัด บริษัทไทยแอลกอฮอล์ จำกัด (มหาชน) บริษัทไทยอะโกรเอนเนอร์จี จำกัด บริษัทไทยง้วนเอทานอล จำกัด บริษัทขอนแก่นแอลกอฮอล์ จำกัด และ บริษัทเพโทกรีน จำกัด รวมแล้วสามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 855,000 ลิตรต่อวัน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2007) ซึ่งไม่เพียงพอกับความต้องการ จึงต้องมีการนำเข้าเอทานอลจากต่างประเทศ เพื่อให้เพียงพอกับความต้องการภายในประเทศ

ต้นทุนในการผลิตเอทานอลประมาณครึ่งหนึ่งมาจากราคาของวัตถุดิบที่นำมาใช้ (Roble, *et al.,* 2003) ดังนั้นในการเลือกวัตถุดิบในการผลิตจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการผลิตเอทานอล สำหรับการผลิตเอทานอลในประเทศไทยวัตถุดิบที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเอทานอลมีเพียง 3 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง แต่อ้อยเป็นวัตถุดิบที่มีราคาแพง อีกทั้งยังปลูกได้ตามฤดูกาล (De Moraes, *et al*., 1995) จึงไม่เหมาะสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต มันสำปะหลังจึงเป็นวัตถุดิบที่มี

ความเหมาะสมที่สุดที่จะใช้ในการผลิตเป็นเอทานอล เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นพืชที่ปลูกง่าย ทนทานต่อสภาพดินฟ้าอากาศที่แปรปรวน สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ๆ ดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และมันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทยรองจาก ข้าวและยางพารา โดยไทยเป็นผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังอันดับหนึ่งของโลกที่ครอบครองตลาดโลกถึง 90 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณการค้าของโลก

ในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังจะต้องนำแป้งไปผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลด้วยวิธีการทางเคมี หรือวิธีการทางชีวภาพ การย่อยแป้งด้วยวิธีทางเคมีจะเป็นการใช้กรดร่วมกับความร้อน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่รุนแรง ทำให้ได้ผลผลิตอย่างอื่นนอกจากน้ำตาลกลูโคส ส่วนการใช้เอนไซม์เป็นวิธีที่ใช้ปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง และยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่จะเพิ่มต้นทุนในกระบวนการผลิต (Altıntas, *et al*., 2002) ดังนั้นการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายแป้งจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่เหมาะสมในการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาล หลังจากนั้นจึงนำน้ำตาลที่ได้ไปเข้าสู่กระบวนการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อยีสต์เพื่อให้ได้เป็นเอทานอล โดยกระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังสามารถแบ่งได้ 3 แบบใหญ่ๆ คือ การหมักแบบใช้เชื้อเดี่ยว การหมักแบบใช้เชื้อร่วม และการหมักแบบแยกกระบวนการหมัก แต่เป็นที่ทราบกันทั่วไปว่าเชื้อที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งได้ จะมีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอลได้น้อย (Reddy, *et al*., 1996) ส่วนการหมักแบบใช้เชื้อร่วมจะได้ปริมาณเอทานอลที่ต่ำ เนื่องจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายแป้งจะถูกเชื้อจุลินทรีย์ใช้ไปเพื่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายแป้ง (Altıntas, *et al*., 2002) และการหมักแบบแยกกระบวนการหมักต้องใช้ต้นทุนสูงในการผลิต ดังนั้นในการทดลองนี้จึงคัดเลือกยีสต์มาจากลูกแป้งที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้ง และสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลได้ และนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังต่อไป

2. การตรวจเอกสาร

2.1 ลูกแป้ง

ลูกแป้ง เป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บไว้ในรูปเชื้อแห้ง คนในสมัยโบราณคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ในรูปแบบของลูกแป้ง นำมาผลิตอาหารหมักหลายชนิดในประเทศแถบเอเชีย เข้าใจว่าลูกแป้งมีกำเนิดมาจากประเทศจีนแล้วเผยแพร่ไปยังประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย ลูกแป้งมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไป (กอ สะแกกรัง, 2545) เช่น ประเทศอินเดีย ประเทศเนปาล และประเทศภูฐาน เรียก “marcha” ประเทศอินโดนีเซีย เรียก “ragi” ประเทศฟิลิปปินส์ เรียก “bubod” ประเทศเกาหลี เรียก “nuruk” ประเทศไต้หวัน เรียกว่า “Chinese yeast” (Tsuyoshi, *et al*., 2005) ประเทศเวียดนาม เรียก “banh men” ประเทศญี่ปุ่น เรียก “koji” และประเทศมาเลเซีย เรียก “ragi tapai” (Limtong, *et al*., 2005)

ลูกแป้งมีหลายชนิด เช่น ลูกแป้งเหล้า ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งน้ำส้มสายชู และลูกแป้งขนมถ้วยฟู ซึ่งในปัจจุบันลูกแป้งน้ำส้มสายชูและลูกแป้งขนมถ้วยฟูหาแทบไม่ได้แล้ว สำหรับลูกแป้งเหล้าและลูกแป้งข้าวหมากยังพอหาได้ในท้องถิ่นต่างๆ แต่เป็นที่น่าเสียดายว่ามีผู้ชำนาญลดน้อยลงไป เนื่องจากในช่วงที่ผ่านมารัฐบาลมีกฎหมายห้ามผลิต ครอบครองและจำหน่ายโดยไม่ได้รับอนุญาต อีกทั้งกรรมวิธีการทำลูกแป้งต้องอาศัยความชำนาญมาก ประกอบกับผู้ที่มีความรู้ทางด้านนี้ในสมัยก่อนมักปิดบังวิชา ไม่ค่อยถ่ายทอดมากนัก โดยมากจะถ่ายทอดให้เฉพาะทายาทหรือผู้ใกล้ชิดเท่านั้น ทำให้เชื้อรายีสต์ และสูตรลูกแป้งดีๆ สูญหายไปอย่างน่าเสียดาย

ลักษณะลูกแป้งจะแตกต่างกันไปแต่ละพื้นที่ ไม่ว่าจะเป็นขนาดของลูกแป้ง สีของลูกแป้ง น้ำหนักของลูกแป้ง กลิ่นรสของลูกแป้ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกรรมวิธีการผลิต และองค์ประกอบที่ใช้ในการทำลูกแป้งของแต่ละพื้นที่

2.1.1 กรรมวิธีการทำลูกแป้ง (กอ สะแกกรัง, 2545)

โดยทั่วไปการผลิตลูกแป้งจะแตกต่างกันไปตามสูตรแต่ละท้องถิ่น ส่วนใหญ่จะมีขั้นตอนการทำลูกแป้งดังนี้

2.1.1.1 นำข้าวเหนียวหรือข้าวเจ้ามาซาวน้ำให้สะอาด แช่น้ำให้อ่อนนุ่ม 2 - 3 ชั่วโมง นำขึ้นมาทำให้สะเด็ดโดยใส่ตะแกรงวางไว้ให้น้ำหยดผ่านไปได้ จากนั้นนำไปบดให้ละเอียด โดยใช้การโม่ด้วยเครื่องหรือตำด้วยครก เสร็จแล้วให้นำเนื้อแป้งขึ้นมาห่อด้วยผ้าวางทับด้วยของหนักๆ จะเป็นหินหรือเขียงไม้ก็ได้จนน้ำแห้ง แล้วนำมาร่อนด้วยกระชอน ถ้ายังมีแป้งที่ติดค้างอยู่บนกระชอนให้นำกลับไปบดใหม่ จนกว่าจะร่อนผ่านกระชอนได้หมด

2.1.1.2 บดสมุนไพรให้ละเอียดจนสามารถร่อนผ่านกระชอนได้ ถ้าไม่ผ่านก็ให้นำกลับไปบดใหม่ แล้วชั่งให้ได้น้ำหนักตามที่ต้องการ

2.1.1.3 บดลูกแป้งเก่าให้ละเอียด

2.1.1.4 นำส่วนผสมทั้งสามอย่างมารวมกัน คือ แป้งข้าวเหนียวหรือข้าวเจ้า สมุนไพร และลูกแป้งเก่า คลุกเคล้าให้เข้ากันเป็นอย่างดี

2.1.1.5 นวดแป้งเพื่อที่จะปั้นเป็นลูกแป้ง โดยการค่อยพรมน้ำฝนหรือน้ำสะอาดลงไปพร้อมกับนวดแป้งไปด้วยจนแป้งเหนียวพอดีที่จะปั้นเป็นก้อนได้ให้หยุดพรมน้ำ

2.1.1.6 ปั้นเป็นลูกแป้งกลมๆ นำไปวางในกระด้งที่รองด้วยใบตองสะอาด แล้วคลุมด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น เพื่อให้เกิดการอบ บ่มไว้ 2-3 วัน ลูกแป้งจะมีราสีขาวเกิดขึ้น จากนั้นนำไปตากแดดให้แห้ง นำไปเก็บไว้ในภาชนะที่แห้งสนิท อย่าให้ถูกความชื้นหรือที่มีความร้อน จะเก็บไว้ได้นาน 6 เดือน

ขนาดของลูกแป้งแต่ละแหล่งจะมีลักษณะที่แตกต่างกัน มีตั้งแต่ลูกเล็กเท่าลูกกระสุน หรือลูกใหญ่ขนาดเท่าลูกมะนาว แต่โดยทั่วไปจะมีขนาดตั้งแต่ 1.5-5.0 เซนติเมตร ในการหมักแอลกอฮอล์โดยปรกติจะใช้ใช้ลูกแป้งหนักประมาณ 2-5 กรัมต่อข้าวเหนียวหรือวัตถุดิบอื่นๆ 1 กิโลกรัม แต่ถ้าต้องการให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงขึ้นก็สามารถเพิ่มปริมาณลูกแป้งให้สูงขึ้นได้อีก แต่หากมีการเพิ่มปริมาณลูกแป้งมากขึ้น ก็จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสของเครื่องเทศมากขึ้นตามไปด้วย

2.1.2 องค์ประกอบต่างๆ ที่สำคัญในการทำลูกแป้ง ได้แก่ (กอ สะแกกรัง, 2545)

2.1.2.1 แป้ง ใช้ได้ทั้งแป้งข้าวเจ้า หรือแป้งข้าวเหนียว หรือ แป้งข้าวเจ้าผสมแป้งข้าวเหนียว ควรใช้แป้งสดที่เตรียมใหม่ๆ และบดแป้งใช้เป็นครั้งๆไป ไม่นิยมใช้แป้งสำเร็จ เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และหลีกเลี่ยงกรดโพรพิโอนิกที่เป็นสารยับยั้งเชื้อรา ซึ่งมักใส่ลงในแป้งสำเร็จ (นภา โล่ทอง, 2537)

2.1.2.2 เครื่องเทศหรือสมุนไพร จะทำหน้าที่คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่ต้องการและควบคุมยับยั้งจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ ที่เราไม่ต้องการ ทั้งชนิดและปริมาณการใช้เครื่องเทศขึ้นอยู่กับแต่ละสูตร

2.1.2.3 น้ำ มีความสำคัญมากในการควบคุมความชื้นของลูกแป้ง ผู้ทำต้องกะให้เหมาะ ไม่แฉะจนเกินไปซึ่งจะทำให้ลูกแป้งเหม็นเปรี้ยวและเสียได้ หรือแห้งจนเกินไปจนได้ลูกแป้งแตกหรือราเจริญในลูกแป้งได้ไม่ดี นอกจากนี้ความชื้นที่พอเหมาะยังมีผลต่อการเก็บรักษาจุลินทรีย์ในลูกแป้งให้อยู่นานอย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย ความชื้นที่พอเหมาะ สำหรับทำลูกแป้งอยู่ประมาณ 45%

2.1.2.4 เชื้อจุลินทรีย์ จะได้จากลูกแป้งเดิม ต้องเป็นลูกแป้งที่ไม่เก็บไว้นานจนเกินไปหรือถูกมอดกิน และไม่มีเชื้อราอื่นปนเปื้อนอยู่ภายนอกจนเห็นได้ชัด

2.1.2.5 อื่นๆ เช่น บางแห่งอาจใส่รำหยาบหรือแกลบ ใส่เพื่อให้ลูกแป้งโปร่งมีอากาศเข้าได้มาก ทำให้จุลินทรีย์สำคัญสามารถเจริญได้ดี (สมพร สินธารา, 2544)

2.1.3 เชื้อจุลินทรีย์ในลูกแป้ง

จุลินทรีย์ที่พบมากในลูกแป้งจะมีทั้งราและยีสต์ ซึ่งราที่พบมากที่สุดอยู่ในตระกูล *Amylomyces* sp. จะพบในลูกแป้งข้าวหมากมากกว่าลูกแป้งเหล้า รองลงมาคือตระกูล *Aspergillus* sp. ส่วน *Rhizopus* sp. จะพบในลูกแป้งเหล้ามากกว่าลูกแป้งข้าวหมาก (กอ สะแกกรัง, 2545) อีกทั้งยังพบตระกูล *Mucor* (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536) และพบว่ายีสต์ในตระกูล *Saccharomycopsis* sp. และ *Pichia* sp. พบมากในลูกแป้งข้าวหมาก ส่วน *Saccharomyces* sp. พบมากในลูกแป้งเหล้า โดยเชื้อราจะทำ

หน้าที่หลักในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล และยีสต์ทำหน้าที่หลักในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ ลูกแป้งแต่ละชนิดจะมีสมุนไพรและเครื่องเทศที่เป็นตัวควบคุมเชื้อยีสต์หรือเชื้อราให้ได้ตามที่ต้องการ

ชัยวัฒน์ จาติกเสถียร (2520) แยกเชื้อยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก และลูกแป้งเหล้า รวมทั้งสิ้น 58 ตัวอย่าง พบว่า ได้เชื้อยีสต์ทั้งหมด 165 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อยีสต์มาจัดจำแนก สามารถจัดจำแนกได้ 3 จีนัส คือ *Endomycopsis, Hansenula* และ *Saccharomyces*

สมพร สินธารา (2544) แยกเชื้อยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก 38 ตัวอย่าง และลูกแป้งเหล้า 19 ตัวอย่าง พบว่า ลูกแป้งส่วนใหญ่จะพบยีสต์ 10^5-10^6 cfu/g ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อยีสต์สายพันธุ์ S*accharomycopsis fibuligera* เมื่อนำเชื้อยีสต์ทั้งหมดมาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง พบว่ายีสต์ *S. fibuligera* มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดีที่สุด และพบว่าเชื้อยีสต์ *Torulaspora globosa, Pichia burtonii, Pichia anomala* และ *Issatchenkia orientailis* ให้ปริมาณแอลกอฮอล์มากกว่า 4 เปอร์เซ็นต์

Dung และคณะ (2006) แยกเชื้อยีสต์ทั้งหมด 51 ไอโซเลต จากลูกแป้ง6 ตัวอย่างของประเทศเวียดนาม เมื่อนำเชื้อยีสต์ที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติในการผลิตเอทานอลในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอลได้สูงสุด คือ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ปริมาณเอทานอล 8.8 เปอร์เซ็นต์ และมีสามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอล (ethanol tolerance) ได้ 9-10 เปอร์เซ็นต์

Dung และคณะ (2007) แยกเชื้อจากลูกแป้งของเวียดนาม 29 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 119 ไอโซเลต ซึ่งประกอบด้วย เชื้อรา 53 ไอโซเลต เชื้อแบคทีเรีย 15 ไอโซเลต และเชื้อยีสต์ 51 ไอโซเลต โดยเชื้อราที่พบมากคือ *Amylomyces rouxii*, *Amylomyces* aff. *rouxii*, *Rhizopus oligosporus* และ *Rhizopus oryzae* ส่วนเชื้อยีสต์ที่พบส่วนใหญ่จะเป็น *Saccharomyces cerevisiae* และมีส่วนน้อยที่เป็นเชื้อ *Candida glabrata* และ *Pichia anomala*

Limtong และคณะ (2002) แยกเชื้อยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก 38 ตัวอย่าง และลูกแป้งเหล้า 19 ตัวอย่าง พบว่า สามารถแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 92 ไอโซเลต เมื่อทำการจัดจำแนกพบว่า ลูกแป้งข้าวหมาก และลูกแป้งเหล้าประกอบด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera, Pichia anomala*, *Issatchenkia orientalis, P. burtonii*, *P. fabianii*, *Candida rhagii, C. glabrata*, *Torulaspora globosa, P. Mexicana*, *P. heimii, Rhodotorula philyla*, *Saccharomyces cerevisiae*, *T. delbrueckii* และ *Trichosporon asahii* และพบว่าเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* ให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์กลุ่มอะไมเลสสูงสุด (amylolytic activity) แต่สามารถผลิตเอทานอลได้เพียง 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 18 เปอร์เซ็นต์ และจากผลการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์ *T. globosa* YKM032, *I. rientalis* YMK036, *P. burtonii* YKM034 และ *P. burtonii* YL048 ที่แยกได้จากลูกแป้ง มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดี

Tsuyoshi และคณะ (2005) แยกเชื้อยีสต์จาก marcha หรือลูกแป้งของประเทศอินเดีย 6 ตัวอย่าง พบว่า สามารถแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อยีสต์มาจัดจำแนกเบื้องต้น

สามารถแบ่งเชื้อยีสต์ได้ 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ *Saccharomyces bayanus* กลุ่มที่ 2 คือ *Candida glabrata* กลุ่มที่ 3 คือ *Pichia anomala* และกลุ่มที่ 4 คือ *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis capsularis*, และ *Pichia burtonii* จากนั้นนำเชื้อยีสต์ทั้ง 4 กลุ่มมาศึกษาหาคุณสมบัติเบื้องต้น พบว่า เชื้อในกลุ่ม 1, 2 และ 3 มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูง ส่วนเชื้อในกลุ่มที่ 4 สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มอะไมเลสได้สูง

2.2 มันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง มีชื่อเรียกต่างๆ กัน เช่น mandioca, yucca, cassava และ tapioca (Schenck and Hebeda, 1992) ถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาใต้ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* Crantz (Eliasson, 2004) มันสำปะหลังเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญเป็นอันดับ 5 รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง เป็นพืชที่เพาะปลูกมากในประเทศเขตร้อน สามารถปลูกได้ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำและแห้งแต่มันสำปะหลังไม่สามารถปลูกได้ในดินที่มีความชื้นสูง ฝนตกหนัก หรือดินเค็ม อีกทั้งยังสามารถขยายพันธุ์ได้ง่าย และต้นทุนการเพาะปลูกไม่สูง จึงทำให้เป็นที่นิยมปลูกกันมาก โดยเฉพาะเกษตรกรที่มีรายได้ต่ำ

ประเทศไทยส่งออกมันสำปะหลังเป็นอันดับ 1 ของโลก รองลงความคือ ประเทศอินโดนีเซีย และประเทศเวียดนาม ตามลำดับ โดยสามารถผลิตมันสำปะหลังแห้งได้ปีละประมาณ 400,000-600,000 ตัน และส่งออกประมาณ 180,000-350,000 ตันต่อปี โดยส่งออกไปยังจีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น สิงคโปร์ มาเลเซีย เกาหลีใต้ และยุโรปตะวันออก สามารถนำรายได้เข้าประเทศไทยปีละประมาณ 2 หมื่นล้านบาท พื้นที่การเพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมาคือภาคกลาง และภาคเหนือตามลำดับ (กะทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2548) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 มันสำปะหลัง : เนื้อที่ ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ เป็นรายภาค พ.ศ. 2543 - 2545

Table 1. Cassava : Area, production and yield by region, 2000 – 2002.

Region	Yield (ton)		
	2543	2544	2545
North	2,669.761	2,549.433	2,298.346
Northeast	10,472.343	9,829.443	8,791.606
Middle	5,922.180	6,016.925	5,778.356
Total	19,064.284	18,395.801	16,868.308

ที่มา: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2548)

2.2.1 องค์ประกอบของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชที่สะสมอาหารไว้ที่ราก องค์ประกอบที่สำคัญได้แก่

2.2.1.1 แป้ง

แป้งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส 2 ชนิด คือ อะไมโลส (α-amylose) และอะไมโลเพกติน (amylopectin) โครงสร้างดังภาพที่ 1 ซึ่งมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2 โดยที่อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อเป็นสายตรงด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4 (α-1,4) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $1x10^5$ ถึง $1x10^6$ (Steinbüchel and Rhee, 2005) และอะไมโลเพกตินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของน้ำตาลกลูโคส โดยน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อเป็นสายตรงจะต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4 และส่วนที่เป็นกิ่ง ซึ่งจะมีพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสสายสั้นประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสประมาณ 24 ถึง 30 หน่วย และจะถูกเชื่อมต่อกับพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่เป็นสายตรงด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,6 (α-1,6) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $1x10^7$ ถึง $1x10^9$ (Steinbüchel and Rhee, 2005) แป้งแต่ละชนิดจะมีอัตราส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกตินที่แตกต่างกัน ซึ่งจะทำให้แป้งแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน (Oates, 1997)

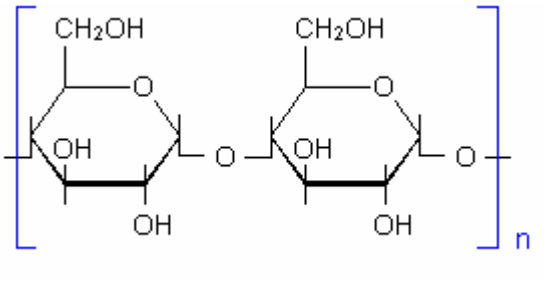
โดยปรกติพบว่ามันสำปะหลังจะประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 32 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 0.7 เปอร์เซ็นต์ (Hongpattarakere and H-Kittikun, 1995) โดยแป้งในหัวมันสำปะหลังจะประกอบไปด้วยอะไมโลสประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง และอะไมโลเพกตินประมาณ 72 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง โดยปริมาณแป้งในหัวมันสำปะหลังจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ อายุ และสิ่งแวดล้อม เช่น ปริมาณน้ำฝนช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยว (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติของอะไมโลส และอะไมโลเพกติน

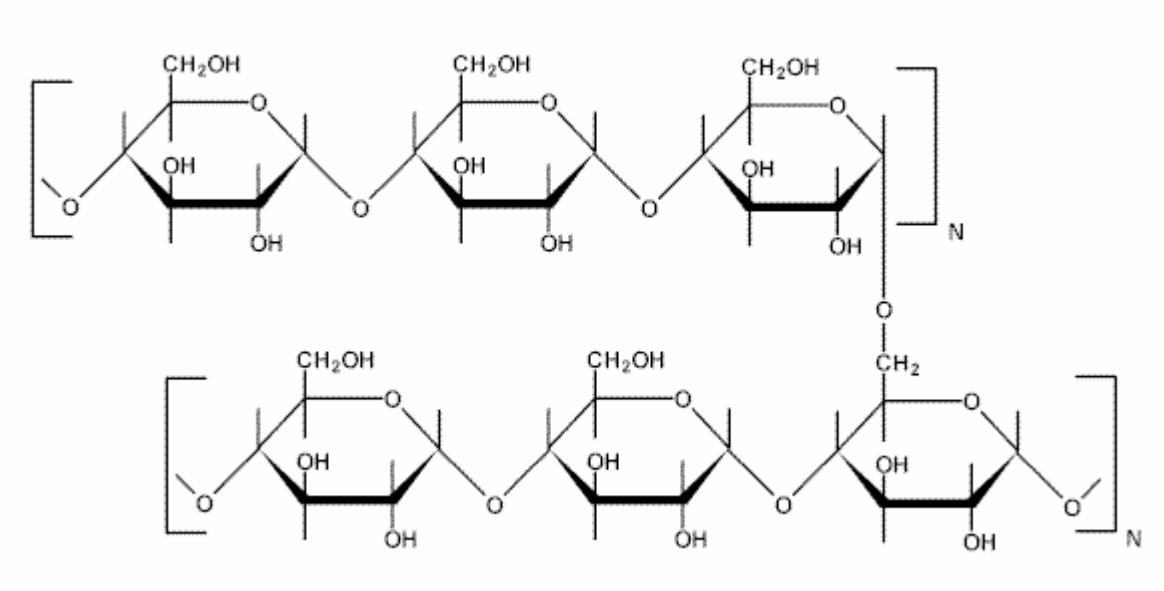
Table 2. Comparison of amylose and amylopectin.

Properties	Amylose	Amylopectin
Basic Structure	Essentially linear	Branched
Stability in aqueous solution	Retrogrades	Stable
Degree of polymerization	C. 10^3	C. 10^4 - 10^5
Average chain length	C. 10^3	C. 20-25
β amylase hydrolysis	87%	54%
β amylase and debranching enzyme hydrolysis	98%	79%
Iodine complex max.	650 nm	550 nm

ที่มา: Aiyer (2005)



amylose



amylopectin

ภาพที่ 1 โครงสร้างของอะไมโลส และอะไมโลเพกติน

Figure 1. The structure of amylose and amylopectin

ที่มา: Voet และ Voet (1990)

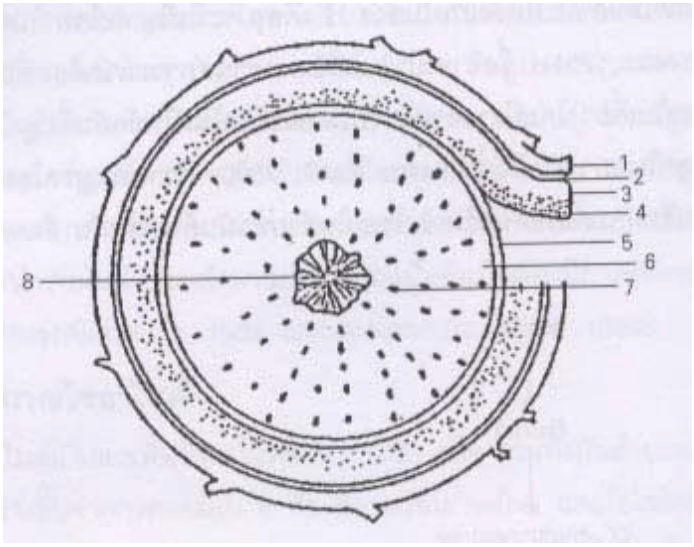
2.2.1.2 ปริมาณไซยาไนด์

ไซยาไนด์เป็นสารพิษที่พบในพืชกว่า 3,000 ชนิด รวมทั้งในมันสำปะหลัง ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาจากกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ เวลีน (valine) และไอโซลิวซีน (isoleucine) โดยทั่วไปจะพบในปริมาณ 14-400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณไซยาไนด์จะขึ้นอยู่กับอายุการเก็บเกี่ยว โดยหัวมันสำปะหลังที่เก็บเกี่ยวในช่วงอายุ 8-10 เดือน จะมีปริมาณไซยาไนด์สูง คือ 210 ไมโครกรัมต่อกรัม แต่หัวมันสำปะหลังที่เก็บช่วงอายุ 12 เดือน จะมีปริมาณไซยาไนด์ต่ำ คือ 16 ไมโครกรัมต่อกรัม ซึ่งอาจเป็น

ผลเนื่องมาจากสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันในระหว่างการเพาะปลูกและการเก็บเกี่ยว (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

2.2.1.3 ปริมาณเปลือก (เยื่อใย)

ปริมาณเปลือก ความหนาของเปลือก ถึงแม้ว่าจะเป็นประโยชน์ในการขนส่ง ทนทานต่อการสูญเสียระหว่างการเก็บเกี่ยว แต่จะเพิ่มภาระในการสกัด หัวมันสำปะหลังประกอบด้วยเนื้อเยื่อเปลือก แสดงดังภาพที่ 2 (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)



1. Periderm หรือ bark
2. Schlerenchyma
3. Cortical parenchyma
4. Phloem
5. Cambium
6. Parenchyma (Starch reverse)
7. Xylem vessels
8. Xylem bundies และ Fibers

ภาพที่ 2 ภาพตัดขวางของหัวมันสำปะหลัง

Figure 2. The cross section of cassava root.

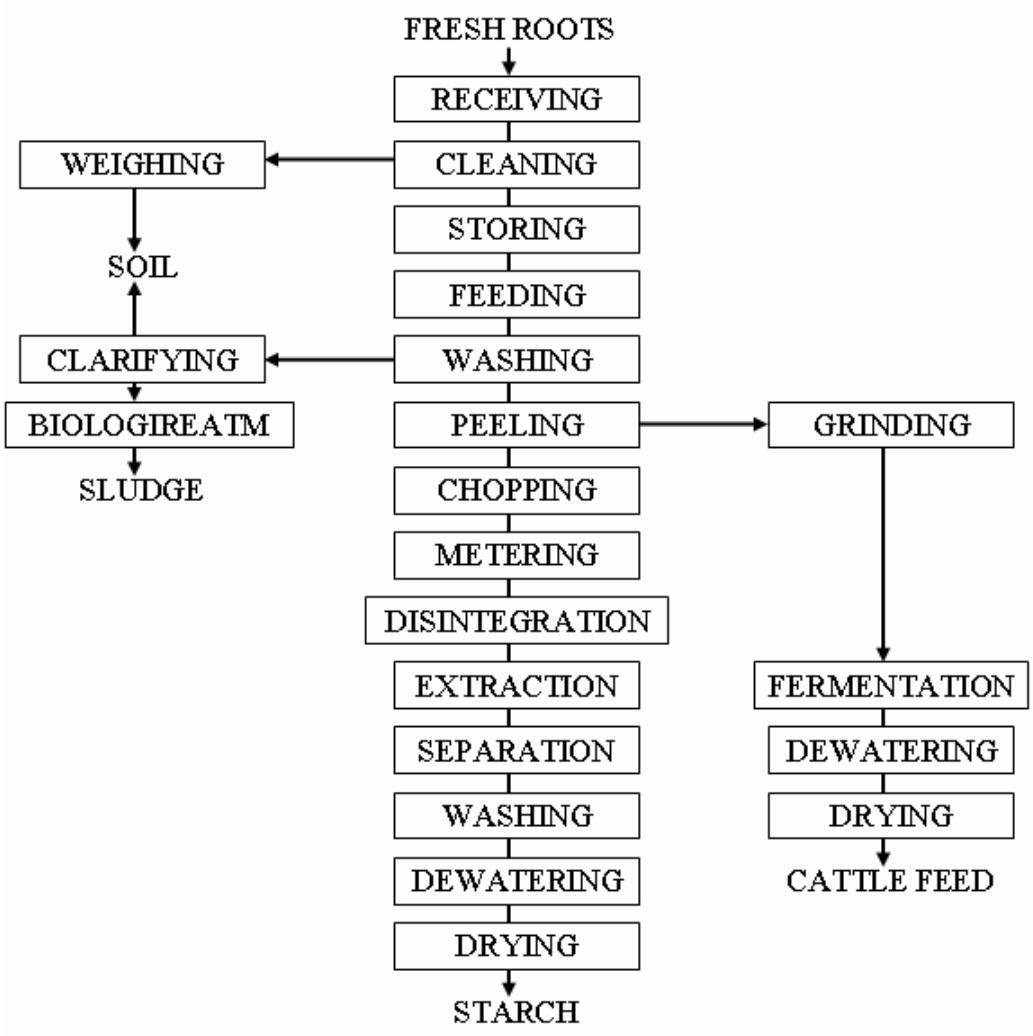
ที่มา: กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ (2546)

2.2.1.4 สารประกอบที่ทำให้เกิดสีในเนื้อแป้ง

หัวมันพันธุ์ต่างๆ กันจะมีสีเนื้อแตกต่างกัน นอกจากสีขาวยังมีสีขาวนวลจนถึงสีเหลือง การเปลี่ยนแปลงสีในเนื้อแป้งเกิดขึ้นจากสารพวกฟีนอลิก (phenolic), leucoanthocyanin และ cathechin ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นสีน้ำเงินและดำ รวมถึงสารประกอบ scopoletin และ coumarin ลักษณะของสีจะมีผลอย่างยิ่งต่อกระบวนการผลิต แม้ว่าสีพวกนั้นจะเป็นพวกละลายน้ำได้ก็ตาม (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

2.2.2 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง

นำหัวมันสำปะหลังมาล้างทำความสะอาด จากนั้นนำไปปอกเปลือกออก แล้วนำไปสับและโม่ให้ละเอียด แล้วส่งเข้าเครื่องแยกกากออก จากนั้นนำน้ำแป้งที่ได้ไปแยกแป้งออกโดยใช้เครื่องสลัดแห้งระบบแรงเหวี่ยง นำแป้งที่ได้ไปอบแห้ง แล้วนำไปเข้าเครื่องร่อนเอาส่วนหยาบออก และบรรจุถุงจำหน่าย แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง

Figure 3. Cassava starch processing.

ที่มา: Dahlberg (1978)

แป้งมันสำปะหลังที่ผลิตได้ในปัจจุบันนั้น นอกจากนำมาเป็นมาอาหาร และเครื่องดื่ม ยังสามารถใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตของอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ใช้เป็นส่วนผสมของครีมบำรุงผิว เพิ่มการยึดเกาะในอุตสาหกรรมกระดาษ สิ่งทอ กาว ไม้อัด บรรจุภัณฑ์ ถุงมือยาง เป็นต้น (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2000) นอกจากนี้แล้วยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตของอุตสาหกรรม

ต่างๆ เช่น การผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมทหรือผลชูรสโดย *Brevibacterium divaricatum* (Jyothi, *et al*., 2005) การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินโดยเชื้อ *Bacillus circulans* DF 9R (Szerman, *et al.,* 2007) การผลิตแอลกอฮอล์โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (Atthasampunna, *et al.,* 1987) เป็นต้น

2.3 เอทานอล

ประเทศไทยนั้นหากพูดถึงมิติด้านพลังงานแล้วต้องยอมรับว่ายังขาดเสถียรภาพ เพราะยังต้องพึ่งพาน้ำมันต่างชาติกว่า 90% สูญเงินตราต่างประเทศเฉพาะนำเข้าน้ำมันประมาณ 8 แสนล้านบาทต่อปี และหากเป็นการนำเข้าพลังงานรวมปีละประมาณ 9 แสนล้านบาท ถ้าโลกเรายังมีพลังงานต่อไปเรื่อยๆ และประเทศไทยหรือประเทศต่างๆ มีเงินซื้อ ปัญหาก็คงไม่เกิด แต่ทว่าความเป็นจริงก็คือ พลังงานของโลกกำลังจะหมดไป ปริมาณน้ำมันเท่าที่มีในปัจจุบันสามารถใช้ได้อีก 42 ปี แก๊สธรรมชาติ 64 ปี และถ่านหินอีก 220 ปี สำหรับประเทศไทยเรามีน้ำมันสำรองใช้ได้อีกเพียง 13 ปี แก๊สธรรมชาติ 14.4 ปี และลิกไนต์ 76 ปี (อาณัติ ประภาสสวัสดิ์, 2545)

ทางออกที่เห็นเด่นชัดก็คือ การนำเอาวัตถุดิบทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิง ซึ่งมีต้นทุนต่ำ ซึ่งจะเป็นเชื้อเพลิงที่มีความยั่งยืนตลอดไป หรือเป็นเชื้อเพลิงที่เรียกกันว่าเป็นชนิดที่สามารถเกิดขึ้นใหม่ได้ (renewable energy) ไม่เหมือนกับเชื้อเพลิงจากซากฟอสซิลซึ่งขุดมาใช้แล้วหมดไป ในการผลิตเอทานอลจากเศษวัตถุดิบการเกษตรไม่ใช่เป็นเรื่องใหม่อะไรแต่มีหลายประเทศได้ดำเนินการมานานแล้ว เช่น ประเทศบราซิล เป็นต้น โดยการนำเอาวัตถุดิบทางการเกษตรมาหมักจนได้เอทานอล ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ที่สามารถนำมาเป็นพลังงานทดแทนได้ ดังนั้นการเอาวัตถุดิบทางการเกษตรมาหมักให้ได้เอทานอล แล้วนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนก็จะช่วยลดปริมาณการนำเข้าน้ำมัน และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

2.3.1 กระบวนการผลิตเอทานอล

เอทานอลเป็นสารอินทรีย์ มีสูตรทางเคมี คือ CH_3CH_2OH ซึ่งเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ โดยทั่วไปจะนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ใช้ในการผลิตเครื่องดื่ม ได้แก่ สุรา ไวน์ เบียร์ เป็นต้น อุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ใช้ในการทำสีและน้ำมันชักเงา เครื่องสำอาง พลาสติกและอื่นๆ เป็นต้น และใช้ทางด้านการแพทย์ อีกทั้งยังนำมาใช้เป็นส่วนผสมของน้ำมันเชื้อเพลิงด้วย เช่น แก๊สโซลฮอล์ เป็นต้น (สมใจ ศิริโภค, 2544) นอกจากนี้ยังใช้เป็นตัวทำละลาย น้ำยาฆ่าเชื้อ สารตั้งต้นในการผลิตสารเคมี

การผลิตเอทานอลสามารถผลิตได้ 2 วิธี (ดุษณี ธนะบริพัฒน์, 2539) คือ

1. การสังเคราะห์ทางเคมีโดยใช้เอทิลีน (ethylene) ที่เป็นผลพลอยได้จากปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบ โดยกระบวนการแคทตาไลติกไฮเดรชัน (Catalytic hydration) ได้เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ เอทานอลที่ได้นี้เรียกว่า เอทานอลสังเคราะห์ (synthetic ethanol) ซึ่งมีปฏิกิริยา ดังนี้

$$C_2H_4 + H_2O \xrightarrow{H_3PO_4} C_2H_5OH$$

2. การหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้น้ำตาลเป็นวัตถุดิบซึ่งอาจเป็นน้ำตาลที่ได้จากพืชโดยตรง เช่น จากอ้อย หัวผักกาดหวาน หรือเป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งหรือเซลลูโลส ซึ่งได้จากวัตถุดิบทางการเกษตร เอทานอลที่ได้นี้เรียกว่า ไบโอเอทานอล (bio-ethanol) วัตถุดิบทางการเกษตรที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งได้ดังนี้

- ประเภทที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ อ้อย ข้าวฟ่างหวาน และกากน้ำตาล
- ประเภทที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวเหนียว ข้าวจ้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เลย์ และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น
- ประเภทที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ต้นไม้ เศษวัสดุทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว วัชพืช ขี้เลื่อย รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่นโรงงานกระดาษ เป็นต้น

แม้ว่าจะมีวัตถุดิบอยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความเหมาะสมในการผลิตเป็นเอทานอล โดยมีหลักเกณฑ์ที่ควรพิจารณา คือ หาได้ง่าย ราคาถูก เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง มีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนสู่โรงงานได้ตลอดปี วัตถุดิบนั้นจะต้องไม่แย่งอาหารของมนุษย์ และสามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบได้สูง แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาตรของเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบชนิดต่างๆ

Table 3. Comparison of ethanol yields from various raw materials

Raw material (one ton)	Ethanol yield (liters)
Molasses	250
Fresh cassava	155
Sorghum	70
Grains (e.g., rice, corn)	385
Coconut juice	83

ที่มา : ธีรภัทร ศรีนรคุตร (2546)

จากข้อพิจารณาในการเลือกใช้วัตถุดิบข้างต้นทำให้แต่ละประเทศที่ผลิตเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงใช้วัตถุดิบที่แตกต่างกันไป เช่น ประเทศบราซิลซึ่งเป็นผู้ผลิตเอทานอลรายใหญ่ที่สุดของโลกใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบหลัก ในขณะที่ประเทศสหรัฐอเมริกาใช้ข้าวโพด เป็นต้น สำหรับประเทศไทยวัตถุดิบที่มีความเหมาะสมในการนำมาผลิตเอทานอลมีเพียง 3 ชนิด ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง โดยเฉพาะมันสำปะหลัง เนื่องจากมันสำปะหลังสามารถปลูกได้ในดินที่มีคุณภาพต่ำ จึงทำให้มีพื้นที่ปลูกได้มากกว่าเมื่อเทียบกับอ้อย อีกทั้งยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ

มันสำปะหลังมักมีปัญหาเกี่ยวกับการส่งออก เกิดภาวะล้นตลาด ทำให้เกษตรกรขายได้ในราคาต่ำ การรณรงค์เพื่อแก้ไขปัญหาให้เกษตรกรหันไปปลูกพืชชนิดอื่นก็เป็นไปได้ยาก เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นพืชที่มีอัตราเสี่ยงต่ำ วิธีการปลูก การดูแลรักษา และการเก็บเกี่ยวไม่ยุ่งยากขึ้นได้ทั่วไป แม้ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำและแห้งแล้ง ที่สำคัญคือการลงทุนต่ำสามารถใช้แรงงานที่มีอยู่ในครอบครัว ทำให้เกษตรกรที่ยากจนนิยมปลูกกันมาก

ในการผลิตเอทานอลพบว่ามันสำปะหลังสดเป็นวัตถุดิบที่มีความเหมาะสมมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ามีเปอร์เซ็นต์แป้งสูงและเส้นใยต่ำ รองลงมาคือมันเส้น ส่วนแป้งมันสำปะหลังไม่เหมาะสมในการใช้เนื่องจากมีราคาสูง ดังแสดงในตารางที่ 4 ในด้านกระบวนการผลิตเอทานอลมันสำปะหลังสดมีขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบมากกว่ามันเส้นและแป้งมันสำปะหลัง กล่าวคือ ต้องทำการปอกเปลือก ล้าง และบด ในขณะที่มันเส้นมีขั้นตอนการกรองแยกสิ่งเจือปนประเภทกรวดทรายออกแล้วทำการบด ส่วนแป้งมันสำปะหลังมีขนาดเหมาะสมแล้วไม่ต้องทำการบดอีก ข้อดีของการใช้มันสำปะหลังสดคือใช้น้ำในกระบวนการผลิตน้อยและใช้อาหารสำหรับยีสต์น้อยหรือไม่ต้องใช้เลย แต่ข้อเสียคือไม่สามารถเก็บหัวมันสำปะหลังไว้ได้นาน ต้องนำไปใช้ในทันทีหรือภายใน 2-3 วัน ในขณะที่ยังมีสภาพสดดีอยู่ สำหรับมันเส้นและแป้งมันสำปะหลังจะไม่มีปัญหาเรื่องการเก็บวัตถุดิบและการขาดแคลนวัตถุดิบ แต่มีข้อเสียคือต้องใช้น้ำและอาหารเสริมมากทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงตามไปด้วย

แป้งมันสำปะหลัง หมายถึง แป้งที่ทำมาจากมันสำปะหลัง มีลักษณะแป้งเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ประกอบด้วย เม็ดแป้งตั้งแต่ 2 ถึง 8 เม็ดมารวมกัน แต่ละเม็ดยาวตั้งแต่ 5 ถึง 35 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15 ไมโครเมตร เม็ดแป้งส่วนมากมีลักษณะเป็นรูปไข่ซึ่งปลายข้างหนึ่งถูกตัดออก และผิวตรงส่วนที่ตัดออกมีลักษณะเว้าเข้าข้างใน บางเม็ดแป้งเหล่านี้จะแสดงให้เห็นรอยบุ๋มอย่างชัดเจนและในบางครั้งอาจเห็นชั้นของแป้งด้วย (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

คุณลักษณะของแป้งมันสำปะหลังที่ต้องการต้องเป็นผงละเอียด มีสีขาว หรือสีครีมอ่อน ไม่เกิดการหมัก ไม่เหม็นอับหรือมีกลิ่นน่ารังเกียจ ไม่มีแมลงและสารแปลกปลอมอื่นๆ ปะปน แป้งมันสำปะหลังแบ่งเป็น 3 ชั้นคุณภาพ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตเอทานอลในโรงงานต้นแบบผลิตเอทานอลของสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่มีกำลังผลิตวันละ 1,500 ลิตร

Table 4. Comparison of production costs of ethanol from various raw meterials in the pliot plant operated by TISTR with a daily production capacity of 1,500 liters.

Raw material	Ethanol production cost (bath/liters)
Fresh cassava	8.94
Cassava strips	9.41
Tapioca flour	13.50
Sugarcane	10.54
Corn	10.65

ที่มา : ธีรภัทร ศรีนรคุตร (2546)

ตารางที่ 5 คุณลักษณะของแป้งมันสำปะหลัง

Table 5. The qualities of cassava starch.

Property	grade 1	grade 2	grade 3
1. Percentage of moisture	13	14	14
2. Percentage of the starch (dry weight)	97.5	96	94
3. Percentage of the ash (dry weight)	0.15	0.3	0.5
4. Percentage of the acid insoluble ash (dry weight)	0.05	0.10	0.15
5. Percentage of the protein (dry weight)	0.3	0.3	0.3
6. Fiber (cm^3/50 g of starch)	0.2	0.5	1.0
7. pH	4.5 – 7.0	3.5 – 7.0	3.0 – 7.0

ที่มา : สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2521)

2.3.2 การผลิตเอทานอลจากแป้ง

การผลิตเอทานอลจากแป้ง จะต้องนำแป้งไปผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลด้วยวิธีการทางเคมี หรือวิธีการทางชีวภาพ เพื่อทำให้แป้งอยู่ในสภาพที่เหมาะสมก่อนจะทำการหมักต่อไป ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลนั้นมี 3 วิธี คือ

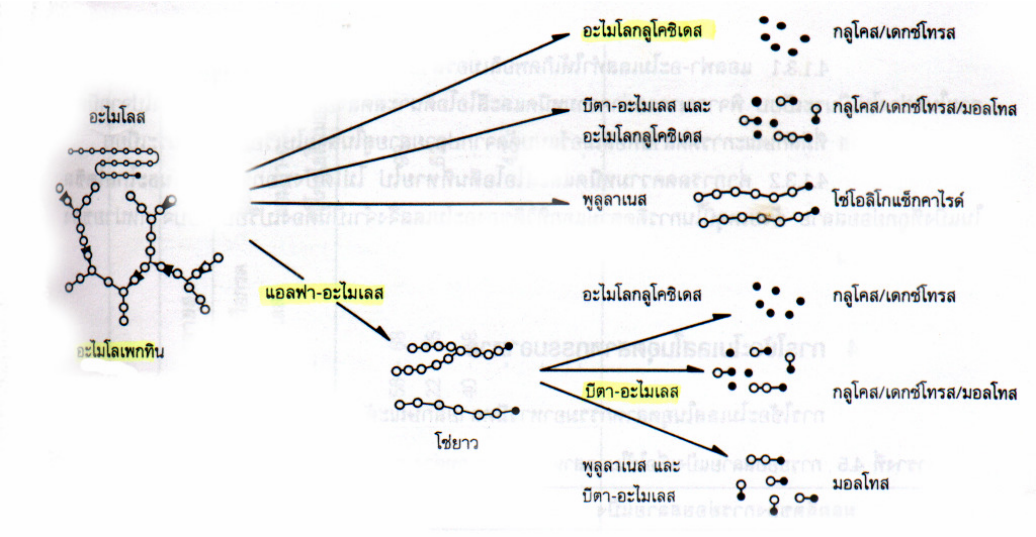
1. การใช้กรด เป็นวิธีการดั้งเดิม โดยจะใช้กรดร่วมกับการใช้ความร้อน ปฏิกิริยาการย่อยจะเกิดแบบสุ่ม เนื่องจากการใช้กรดเป็นปฏิกิริยาที่รุนแรง โดยกรดจะย่อยน้ำตาลกลูโคสที่ได้ให้เป็นผลผลิตอย่างอื่น เช่น 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5-hydroxymethylfurfural) ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการสลายน้ำตาลโดยใช้ความร้อน นอกจากนี้แล้วการใช้กรดยังทำให้เกิดสีในผลิตภัณฑ์ขึ้น (Schenck and Hebeda, 1992)

Agu และคณะ (1997) ศึกษาผลของการใช้ความร้อนและปริมาณความเข้มข้นของกรดต่อการย่อยสลายมันสำปะหลัง เพื่อนำน้ำตาลที่ได้ไปผลิตเอทานอล พบว่าการใช้ปริมาณความเข้มข้นของกรดสูงขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น แต่ก็จะทำให้เกิดสีในผลิตภัณฑ์สูงขึ้นตามไปด้วย โดยสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งคือ ใช้ปริมาณความเข้มข้นของกรด 0.3M H_2SO_4 แล้วนำไปต้มเป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วย 1M NaOH แล้วนำน้ำตาลที่ได้ไปหมักจะทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร

นอกจากนี้ยังอาจใช้กรดควบคู่กับการให้เอนไซม์ในการย่อยแป้ง โดยการย่อยแป้งด้วยกรด แล้วจึงเติมเอนไซม์ย่อยต่อไป ในปัจจุบันการใช้กรดในการย่อยแป้งไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากจะต้องทำการปรับพีเอชให้เป็นกลางก่อนนำไปใช้ ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนในกระบวนการผลิต

2. การใช้เอนไซม์ในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล เอนไซม์ที่ใช้จะอยู่ในกลุ่มเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) เบต้าอะไมเลส (β-amylase) และแกมมาอะไมเลส (γ-amylase) หรือกลูโคอะไมเลส แสดงการทำงานดังภาพที่ 4 โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ตำแหน่งแอลฟา 1,4 ในลักษณะตัดภายในสายของแป้ง ได้ผลผลิตเป็นกลูแคน (glucan) และลิมิตเดกซ์ ทริน (limit dextrin) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสต่อกันประมาณ 2-6 หน่วย ส่วนเอนไซม์เบตาอะไมเลสจะย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ตำแหน่งแอลฟา1,4 ในลักษณะการตัดอย่างเป็นระเบียบจากปลายสายเข้าสู่ภายในทีละ 1 หน่วยของน้ำตาลมอลโตส ได้ผลผลิตเป็น น้ำตาลมอลโทส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ตำแหน่งแอลฟา1,4 และแอลฟา1,6 ในลักษณะการตัดอย่างเป็นระเบียบจากปลายสายเข้าสู่ภายในทีละ 1 หน่วยของน้ำตาลกลูโคส ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

3. การใช้เชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และราบางชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จุลินทรีย์เหล่านี้ถ้าหากนำมาใช้ต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ บางครั้งอาจใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาช่วยปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพสูง เชื้อแบคทีเรียได้แก่ *Bacillus subtillis, B. mesentericus* และอื่นๆ เชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus oryzae, A. niger, A. awamori, Rhizopus oryzae, Mucor* sp., *Amylomyces* และอื่นๆ ส่วนยีสต์ได้แก่ *Endomycosis fibuligera*, *Lipomyces kononenkoae, Trichosporon pullulans, Candida antarctica, Cryptococcus flavus* (Wanderley, *et al*., 2004) เป็นต้น



ภาพที่ 4 ผลผลิตการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์กลุ่มอะไมเลส

Figure 4. Products of starch hydrolysis by amylolytic enzyme.

ที่มา : ปราณี อ่านเปรื่อง (2547)

ขั้นตอนต่อไปหลังจากแป้งถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสคือ การนำเอาน้ำตาลที่ได้เข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อให้ได้เป็นเอทานอลต่อไป โดยกระบวนการหมักเอทานอลขั้นตอนแรกจะต้องเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) เพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่แข็งแรงและมีปริมาณมากเพียงพอสำหรับใช้ในการหมัก รวมทั้งต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ เมื่อเตรียมหัวเชื้อเรียบร้อยแล้วจึงถ่ายลงในถังหมักผสมกับวัตถุดิบ จากนั้นทำการปรับและควบคุมสภาวะของการหมัก เช่น อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน ค่าพีเอช และอุณหภูมิในระหว่างการหมัก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของการหมัก ชนิดของผลิตภัณฑ์ และชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีสำหรับใช้ในการผลิตเอทานอลควรมีคุณสมบัติ คือ ทนต่อเอทานอล ทนต่อแรงดันออสโมซีส ทนต่อกรด ทนต่ออุณหภูมิสูง มีความคงตัวทางพันธุกรรม มีประสิทธิภาพในการหมักเร็ว และเจริญได้ดี ในอาหารทั่วไปหรืออาหารที่มีราคาถูก (Panchal, 1990)

เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอล ได้แก่ แบคทีเรียและเชื้อยีสต์ โดยเชื้อแบคทีเรียที่นิยมใช้ได้แก่ ได้แก่ *Zymomonas mobilis* และอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 6 สำหรับยีสต์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae, S. fragillis, S. uvarum, Nematospora* sp., *Shizosaccharomyces* sp. และ *Kluyveromyces fragillis* อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้ออาจไม่จำเป็นต้องมี หากมีการนำเอาเชื้อจุลินทรีย์แห้ง (dry cell) มาใช้แทน โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์แห้งในปริมาณที่ต้องการผสมกับวัตถุดิบในถังหมักได้เลย

เมื่อเตรียมวัตถุดิบพร้อมแล้ว นำมาถ่ายลงในถังหมัก วัตถุดิบอาจผ่านหรือไม่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของการหมักและวัตถุดิบที่ใช้ เช่น กากน้ำตาลสามารถนำไปหมักเป็นแอลกอออล์โดยไม่ต้องทำการฆ่าเชื้อก่อน เป็นต้น

ขั้นตอนในการหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส ภายใต้สภาพที่ปราศจากออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยให้เป็นแอลกอออล์ โดยทั่วไปการหมักจะใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน เพื่อให้ได้ปริมาณแอลกอออล์ที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร

การผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน แสดงดังภาพที่ 5 ซึ่งเชื้อยีสต์จะมีการเจริญช้ากว่าการเจริญในสภาพที่ใช้ออกซิเจน และไพรูเวตที่ได้จากกระบวนการไกลโคไลซีส (glycolysis) จะถูกเปลี่ยนเป็นแอลซีทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) และก๊าซคาร์บอนออกไซด์ โดยเอนไซม์ pyruvate decarboxylase หลังจากนั้นอะซีตัลดีไฮด์จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลโดยมี $NADH_2$ และ alcohol dehydrogenase เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยา แสดงดังภาพที่ 6

ตามทฤษฎีการเปลี่ยนแป้งให้เป็นเอทานอล แป้ง 90 กรัม จะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม จากนั้นเชื้อยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นแอลกอฮอล์ 51.1 กรัม และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัม (Rose and Harrison, 1993) ซึ่งสามารถเขียนปฏิกิริยาได้ดังนี้

$$(C_6H_{10}O_5)_n + (n\text{-}1)\,H_2O \xrightarrow{\text{enzyme/acid}} n\,(C_6H_{12}O_6) \xrightarrow{\text{yeast}} 2n\,CH_3CH_2OH + 2n\,CO_2$$

starch	water	glucose	ethanol	carbon dioxide
90	10	100	51.1	48.9

แต่ในทางปฏิบัติมีน้ำตาลเพียงร้อยละ 95 เท่านั้นที่จะเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ นอกจากนั้นยีสต์จะใช้สำหรับการเจริญเติบโตของตัวมันเองและเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่น (Paturau, 1969 อ้างโดยสาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) เช่น

แอลซีทาลดีไฮด์	ร้อยละ 0 - 0.03	กรดอะซิติก	ร้อยละ 0.05 - 0.25
กลีเซอรอล	ร้อยละ 2.5 - 3.6	กรดแลกติก	ร้อยละ 0 - 0.2
กรดซักซินิก	ร้อยละ 0.5 - 0.77	ฟูเซลออลย์	ร้อยละ 0.25 - 0.5
เฟอร์ฟูรอล	ปริมาณน้อยมาก		

ตารางที่ 6 แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอล

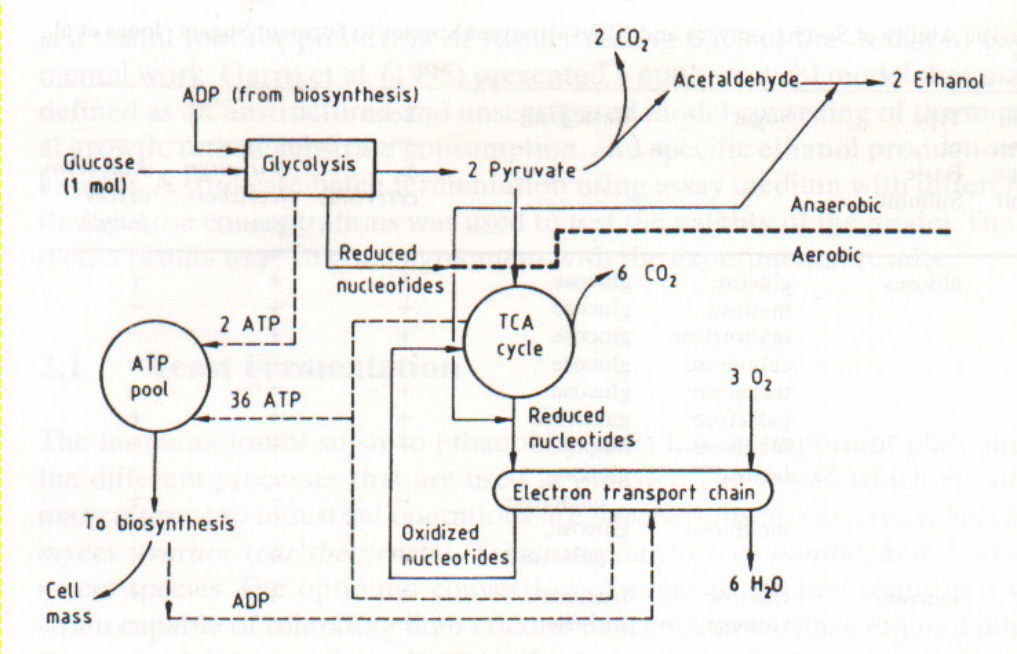
Table 6. Bacterial species producing ethanol as the main fermentation product.

Microorganisms	mmol Ethanol Produced per mmol Glucose Metabolized	T_{max} [^{0}C]
Mesophilic Organisms		
Clostridium sporogenes	up to 4.15[a]	-
Clostridium sphenoides	1.8[a](1.8)[b]	-
Zymomonas mobilis ssp.*pomacea*	1.7	-
Zymomonas mobilis (syn. *anaerobica*)	1.9 (anaerobe)	-
Spirochaeta aurantia	1.5 (0.8)	-
Erwinia amylovora	1.2	-
Leuconostoc mesenteroides	1.1	-
Streptococcus lactis	1.0	-
Sarcina ventriculi (syn. *Zymosarcina*)	1.0	-
Thermophilic Organisms		
Thermoanaerobacter ethanolicus	1.9	78
Clostridium thermohydrosulfuricum	1.6	78
Bacillus stearothermophilus	1.0 (anaerobic above 55 ^{0}C)	78
Thermoanaerobium brockii	0.95	78
Clostridium thermosaccharolyticum	1.1	68
Clostridium thermocellum	1.0	68

[a] In the presence of high amounts of yeast extrct

[b] Values in brackets were obtained with resting cells

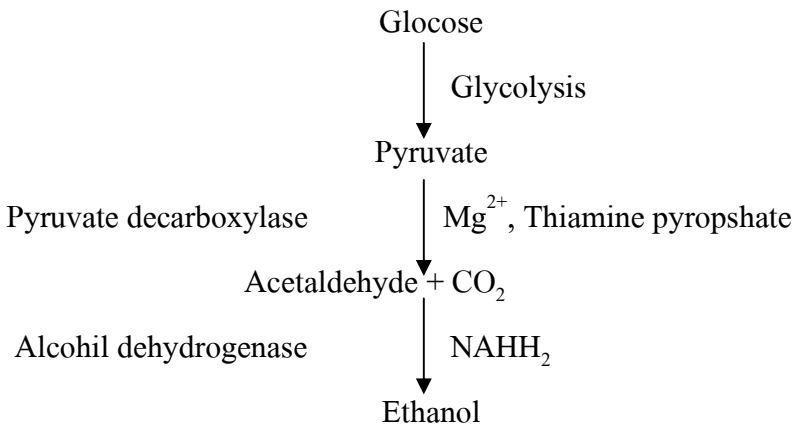
ที่มา : Roehr (2001)



ภาพที่ 5 กลไกลการเมตาบอลิซึมของยีสต์ *S. cerevisiae*

Figure 5. Simplified chart of anaerobic and aerobic catabolism of *S. cerevisiae*.

ที่มา : Roehr (2001)



ภาพที่ 6 การสังเคราะห์เอทานอล

Figure 6. The synthesis of ethanol.

ที่มา : Crueger and Crueger (1989 อ้างโดย สมใจ ศิริโภค, 2544)

เนื่องจากในการผลิตเอทานอลจากแป้งจะต้องย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเสียก่อน จากนั้นจึงนำน้ำตาลที่ได้ไปหมักเป็นเอทานอล ซึ่งจะต้องผ่านหลายขั้นตอนดังแสดงในภาพที่ 7 ดังนั้นในปัจจุบันจึงพยายามหาวิธีการใหม่ๆ เพื่อเพิ่มผลผลิต และลดต้นทุนในการผลิต

กระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งโดยทั่วไปจะประกอบด้วย 3 วิธีคือ

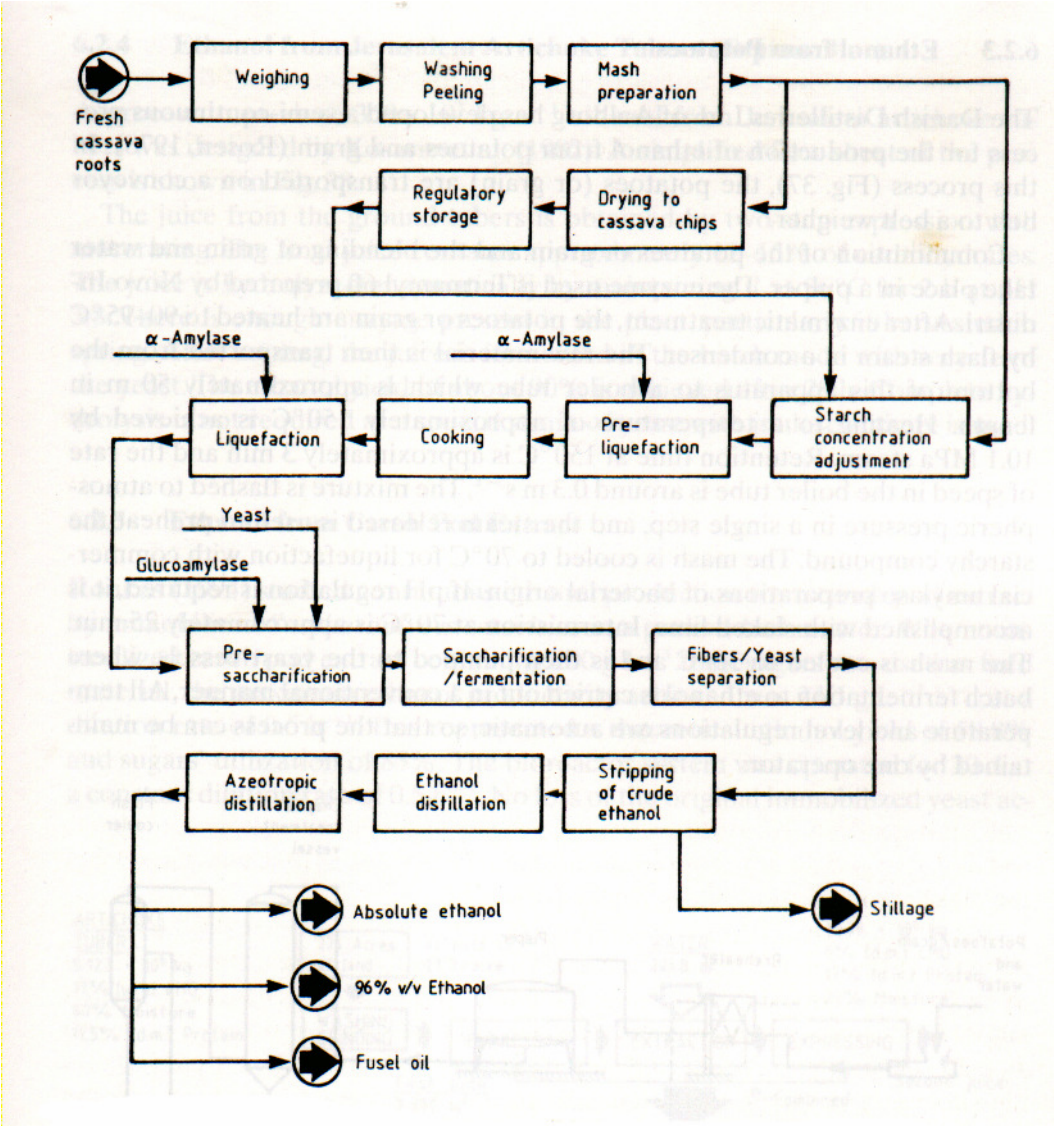
1. การหมักแบบแยกกระบวนการหมัก (two-stage process) เป็นกระบวนการผลิตเอทานอลแบบดั้งเดิม โดยแยกกระบวนการผลิตน้ำตาลออกจากกระบวนการหมัก (separation hydrolysis and fermentation; SHF) ข้อดีของการผลิตเอทานอลแบบแยกกระบวนการหมัก คือ ได้ผลผลิตที่สูง

Amutha และ Gunasekaran (2001) ทำการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยหมักแบบแยกกระบวนการหมัก กล่าวคือ ในขั้นต้นจะย่อยแป้งมันสำปะหลังเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลโดยจะใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 20 โดยปริมาตร จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 45 DUN/g และแคลเซียมคลอไรด์ 0.3 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1.0-1.5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000xg เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วจึงนำน้ำหมักที่ได้ไปผลิตเอทานอล โดยเปรียบเทียบระหว่างการตรึงเซลล์ชนิดเดียว (*Saccharomyces diastaticus*) กับการตรึงเซลล์ชนิดร่วม (*Saccharomyces diastaticus* กับ *Zymomonas mobilis*) พบว่าการตรึงเซลล์ชนิดร่วมจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการตรึงเซลล์ชนิดเดียว กล่าวคือการตรึงเซลล์ชนิดร่วมจะให้ปริมาณเอทานอล 46.7 กรัมต่อลิตร ส่วนการตรึงเซลล์ชนิดเดียวให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 37.5 กรัมต่อลิตร

2. การหมักแบบใช้เชื้อร่วม (coculture process) เป็นการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งและเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอลร่วมกัน หรือเป็นกระบวนการผลิตน้ำตาลและหมักเอทานอลไปพร้อมๆ กัน (simultaneous saccharification and fermentation; SSF process)

Abouzied และ Reddy (1986) เปรียบเทียบกระบวนการหมักเอทานอลโดยตรงจากแป้งมันฝรั่งระหว่างการหมักแบบใช้เชื้อเดียว (*Aspergillus niger*) กับแบบการใช้เชื้อร่วม (*Aspergillus niger* กับ *Saccharomyces cerevisiae*) โดยใช้ปริมาณแป้งมันฝรั่งเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าการผลิตเอทานอลแบบใช้เชื้อร่วมจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการผลิตเอทานอลแบบใช้เชื้อเดียว โดยการหมักแบบใช้เชื้อเดียวให้ปริมาณเอทานอล 2.7 กรัมต่อลิตร และแบบใช้เชื้อร่วมจะได้ปริมาณเอทานอล 19 กรัมต่อลิตร

Abouzied และ Reddy (1987) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งมันฝรั่งระหว่างการหมักแบบใช้เชื้อเดียวกับแบบใช้เชื้อร่วม โดยใช้เชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* หรือ *Lipomyces kononenkoae* กับ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าการหมักแบบใช้เชื้อร่วมจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการหมักแบบใช้เชื้อเดียว และพบว่าการหมักแบบใช้เชื้อร่วมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* กับ *Saccharomyces cerevisiae* ให้ปริมาณเอทานอล17.7 กรัมต่อลิตร สูงกว่าการหมักแบบใช้เชื้อร่วมระหว่าง *Lipomyces kononenkoae* กับ *Saccharomyces cerevisiae* ให้ปริมาณเอทานอล 12.7 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 7 การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง

Figure 7. Production of ethanol from cassava.

ที่มา : Roehr (2001)

Lezinou และคณะ (1995) เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างระหว่างการหมักแบบใช้เชื้อเดียว (*Fusarium oxysporum* F3) กับแบบใช้เชื้อร่วม (*Fusarium oxysporum* F3 กับ *Saccharomyces cerevisiae* 2541) พบว่าการหมักแบบใช้เชื้อเดียว และแบบใช้เชื้อร่วมจะได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 24.4 และ 33.5 กรัมต่อ 100 กรัมของข้าวฟ่าง ตามลำดับ

Piršelová และคณะ (1993) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งโดยการหมักแบบใช้เชื้อร่วมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* กับเชื้อ *S. cerevisiae* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลแบบใช้เชื้อร่วมคือ ปริมาณแป้งเริ่มต้น 20 ถึง 30 กรัมต่อลิตร พีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.8 ถึง

6.0 จะทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 13.7 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 88 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี

3. การหมักแบบใช้เชื้อเดียว (monoculture process) เป็นการใช้เชื้อจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งและผลิตเอทานอลในการผลิตเอทานอลจากแป้งโดยตรง (Direct Microbial Conversion; DMC) หรือเป็นการใช้ร่วมกันของเอนไซม์ที่ย่อยแป้งกับเชื้อที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอล หรือจะเป็นการหมักโดยใช้รีคอมบีแนนท์ยีสต์ (recombinant yeast) เป็นต้น

Ulgen และคณะ (2002) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากแป้งโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YPG/AB ซึ่งผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติในการย่อยแป้ง พบว่าเชื้อจะผลิตเอทานอลสูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งอยู่ 40 กรัมต่อลิตร และมีการเติมน้ำตาลกลูโคสลงไปในระยะเริ่มต้นปริมาณ 4 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชเป็น 4.5 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบ batch และเมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อแบบ batch และแบบ fed-batch พบว่าการเลี้ยงแบบ fed-batch ให้ผลผลิตเอทานอลที่สูงกว่าการเลี้ยงแบบ batch โดยให้ปริมาณเอทานอลถึง 47.5 กรัมต่อลิตร และ 15.6 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

Ward และคณะ (1995) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในระหว่างการหมักด้วยเชื้อทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* IMB3 และมีการเติมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 พบว่า เชื้อ *Kluyveromyces marxianus* IMB3 สามารถผลิตเอทานอลได้สูดสุดเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 74 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ที่ระยะการบ่มที่ 40 ชั่วโมง

Laluce และคณะ (1988) แยกเชื้อยีสต์จากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังในประเทศบราซิล พบว่าเชื้อยีสต์ DI-10 มีความสามารถในการย่อยแป้งได้อย่างรวดเร็ว หลังจากนำเชื้อยีสต์ DI-10 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา พบว่าเชื้อยีสต์ดังกล่าวคือเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces serevisiae* var. *diastaticus* เมื่อนำเชื้อยีสต์ดังกล่าวมาศึกษาการหมักแป้งที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อยีสต์ DI-10 สามารถผลิตเอทานอลได้ 2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มที่ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Altıntas และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งโดยใช้รีคอมรีคอมบีแนนท์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YPB-G ซึ่งได้รับการปรับแต่งยีนให้มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่าปริมาณแป้งที่เหมาะในการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YPB-G คือ 40 กรัมต่อลิตร และพบว่าถ้าเริ่มต้นเติมน้ำตาลกลูโคสลงไป 4 กรัมต่อลิตร จะช่วยทำให้เชื้อผลิตเอทานอลสูงขึ้นจาก 0.118 เป็น 0.183 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Saha และ Ueda (1983) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งมันฝรั่งดิบ โดยเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* ร่วมกับการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Endomycopsis fibuligera* (*Saccharomycopsis fibuligera*) และเอนไซม์ cellulisine HC ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูโลส เอนไซม์เฮมิเซลลูโลส เอนไซม์ไซลาเนส เอนไซม์เปคติเนส เป็นต้น พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันฝรั่งดิบ 50

กรัม คือ ใช้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 1000 ยูนิต เอนไซม์ cellulisine HC 100 มิลลิกรัม เติมสาร potassium pyrosulfite 50 มิลลิกรัม และเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ปริมาณ 3 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปรับค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 แล้วนำไปบ่มที่ 38 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอล (ethanol yield) สูงสุดเท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตามในการผลิตเอทานอลจากแป้งโดยตรงแบบการแยกกระบวนการหมัก แบบใช้เชื้อร่วม และแบบใช้เชื้อเดียวก็มีทั้งข้อดีและข้อเสีย กล่าวคือการผลิตเอทานอลโดยตรงจากแป้งแบบแยกกระบวนการหมักจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าแบบใช้เชื้อร่วม และแบบใช้เชื้อเดียว แต่จะใช้ต้นทุนในการผลิตที่สูงกว่าแบบอื่นๆ เนื่องจากต้องแยกกระบวนการย่อยแป้งและหมักเอทานอลออกจากกัน ส่วนการหมักเอทานอลแบบใช้เชื้อร่วมจะได้ปริมาณเอทานอลที่ต่ำ เนื่องจากแป้งจะถูกใช้ในการเจริญของเชื้อเป็นส่วนใหญ่ และการหมักแบบใช้เชื้อเดียวจะให้ผลิตที่ต่ำ เนื่องจากเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้ง จะมีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอลได้ต่ำ (Reddy, *et al*., 1996) ปัจจุบันจึงได้มีการใช้รีคอมบีแนนท์ยีสต์ (recombinant yeast) ที่ผ่านกระบวนการปรับแต่งพันธุกรรมให้มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งและผลิตเอทานอล เพื่อเพิ่มปริมาณเอทานอลให้สูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการใช้รีคอมบีแนนยีสต์ก็ยังคงพบปัญหาเกี่ยวกับการสูญหายไปของพลาสมิคที่เกี่ยวข้องกระบวนการย่อยแป้งที่เติมเข้าไปในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้ได้ผลผลิตเอทานอลไม่ต่อเนื่อง (Nakamura, *et al.,*1997)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

ในการผลิตเอทานอลด้วยวิธีไบโอเอทานอล (bio-ethanol) ปัจจัยที่สำคัญส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อยีสต์ คือ อุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของน้ำตาล ความเข้มข้นของแป้ง เป็นต้น

2.4.1 ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิมีความสำคัญมากต่อกระบวนการหมักเอทานอล เนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลจะมีความร้อนเกิดขึ้นในระบบ ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของเชื้อยีสต์ โดยการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสจะเกิดความร้อน 140.2 แคลอรี่ต่อกรัมกลูโคส ดังนั้นจึงถ่ายเทลงสู่น้ำหมักทำให้น้ำหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้นซึ่งจะมีอุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส เป็นผลให้ยีสต์หยุดการเจริญของเชื้อยีสต์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ เช่น *K. marxianus* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 49 องศาเซลเซียส และผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Hughes, *et al*., 1984) *Pachysolen tannophilus* เจริญได้ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส (Roebuck, *et al*., 1995) และผลิตเอทานอลดีที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส (Slininger, *et al*., 1982) โดยปกติอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลจะอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส (Barnet, *et al*., 1992) ซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจะสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ 5-10 องศาเซลเซียส (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.4.2 ผลของพีเอชต่อการหมัก

โดยปกติเชื้อยีสต์จะเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่เป็นกรดคือ ในระดับพีเอชอยู่ในช่วง 3.0-6.5 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 3.0 การเจริญของเชื้อจะลดลง Rose และ Harrison (1987) กล่าวว่าถ้าระดับพีเอชสูงขึ้น จะทำให้ได้เอทานอลน้อยลง เนื่องจากไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟต (dihydroxyacetone phosephate) ในกระบวนการไกลโคไลซีสจะเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอล (glycerol) ทำให้ได้กลีเซอรอลสูงขึ้น เมื่อพีเอชสูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 7

เนื่องจากพีเอชมีผลต่ออัตราการหมัก การสร้างผลผลิตหลอยได้ ตลอดจนควบคุมเชื้อปนเปื้อนซึ่งมีผลต่อการเจริญของยีสต์ที่กำลังหมัก ดังนั้นในกระบวนการหมักเอทานอลจึงนิยมจะควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 3.5 – 6.0 (Roehr, 2001) เพื่อให้ยีสต์เจริญได้ดีและยังช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้ด้วย เพราะแบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ในสภาพที่พีเอชเป็นกลาง แต่ก็ยังมีแบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาพที่เป็นกรด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกที่เจริญได้ในระดับพีเอชที่เชื้อยีสต์เจริญ และมักจะสร้างกรดขึ้นมามากเกินไปทำให้เชื้อยีสต์ไม่สามารถเจริญได้

ตารางที่ 7 ปัจจัยของค่าพีเอชในกระบวนการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส

Table 7. Effect of pH value on fermentation of glucose by yeast.

Product	pH					
	3	4	5	6	7	7.5
Ethanol	171	177	173	161	150	130
Carbon dioxide	181	190	188	177	161	149
Glycerol	6.2	6.6	7.8	16.2	22.2	32.3
Acetic acid	0.5	0.7	0.8	4.0	8.7	15.1
Lactic acid	0.8	0.4	0.5	1.6	1.9	1.4
Succinic acid	0.5	0.3	0.3	0.5	0.2	0.7

ที่มา : Rose และ Harrison (1987)

2.4.3 ความเข้มข้นของน้ำตาล

ความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ กล่าวคือ การที่กลูโคสหรือคาร์โบไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นสูง ทำให้ความสามารถในการหายใจเสียไป หรือที่เรียกว่า Crabtree effect หรือ glucose effect ซึ่งเป็นการกดดันแคตาบอไลด์ (catabolite repression) ที่เกิดขึ้นเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีคาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นระดับหนึ่ง คือมีกลูโคสหรือซูโครสความเข้มข้นสูงกว่า

0.02-0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ทำให้การหายใจถูกยับยั้งอย่างรุนแรง (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) จากตารางที่ 8 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้น มีผลทำให้อัตราการเจริญและการผลิต เอทานอลลดลง ดังนั้นในการหมักเอทานอลจึงจำเป็นที่จะต้องควบคุมปริมาณน้ำตาลไม่ให้สูงจนเกินไป เพื่อไม่ให้ไปมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลที่เราต้องการ

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae*

Table 8. Effect of glucose concentration on *S. cerevisiae* growth and fermentration.

Glucose (g/l)	Growth rate (mg dry wt/ml. hr)	Fermentation (mol ethanol/ ml. hr)	Theoretical ethanol yield (%)
100	0.33	54.0	93.5
200	0.24	52.7	66.4
300	0.11	42.5	59.0
400	0.03	14.2	23.6

ที่มา : Panchal (1990)

2.4.4 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจน

ชนิดของแหล่งไนโตรเจนจะมีผลต่อการเจริญของยีสต์ เนื่องจากยีสต์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง (Walker, 1998) ดังนั้นการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ โดยปกติยีสต์สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของอินทรีย์ไนโตรเจน และอนินทรีย์ไนโตรเจนได้ดี สารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ยีสต์จะอยู่ในรูปของแอมโมเนียมไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ยีสต์ทั่วไปใช้ได้ และเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่

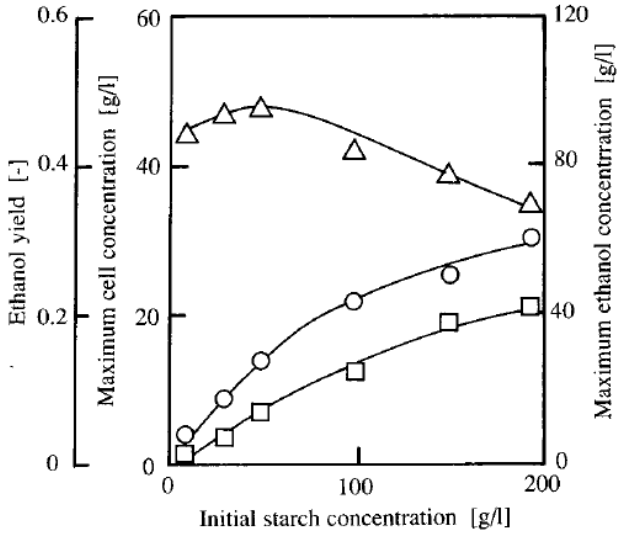
Sato และคณะ (1992) ผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสโดยใช้เชื้อ *Clostridium thermocellum* I-1-B พบว่าการให้ปริมาณยีสต์สกัดที่สูงขึ้นจะทำให้ปริมาณเอทานอลสูงขึ้น การให้ปริมาณยีสต์สกัด 1.4 เปอร์เซ็นต์ เชื้อจะผลิตเอทานอลได้สูงสุด คือ 86.8 มิลลิโมลาร์ แต่ถ้าให้ปริมาณยีสต์สกัดสูงกว่า 1.4 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ได้ปริมาณเอทานอลลดลง

2.4.5 ความเข้มข้นของแป้ง

เมื่อให้ปริมาณแป้งที่สูงขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณเอทานอลที่สูงขึ้น เนื่องจากการย่อยแป้งที่เกิดอย่างสมบูรณ์ แป้ง 1 กรัมน้ำหนักแห้งจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส 1.11 กรัมน้ำหนักแห้ง ดังนั้น

ปริมาณแป้งที่สูงขึ้นเมื่อทำการย่อยอย่างสมบูรณ์จะทำให้ได้น้ำตาลที่มีปริมาณมากกว่าการใช้แป้งในปริมาณที่ต่ำกว่า ซึ่งน้ำตาลจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลต่อไป

Nakamura และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้รีคอมบีแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ *Saccaromyces cerevisiae* SR93 ซึ่งได้ปรับปรุงคุณสมบัติให้มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเมื่อให้ความเข้มข้นของแป้งสูงขึ้น จะทำให้ได้ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้น แต่เมื่อปริมาณเอทานอลสูงกว่า 15 กรัมต่อลิตร เอทานอลที่ได้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสำหรับการผลิตเอทานอลจากรีคอมบีแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* SR93 อยู่ในช่วง 30-50 กรัมต่อลิตร แสดงดังภาพที่ 8 เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อ พบว่าความเข้มข้นของแป้งที่มีปริมาณที่ต่ำกว่า 30 กรัมต่อลิตร น้ำตาลกลูโคสที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะถูกใช้ในการเจริญของเซลล์ก่อนที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล ส่วนความเข้มข้นของแป้งที่สูงกว่า 50 กรัมต่อลิตร น้ำตาลกลูโคสที่ถูกย่อยจะถูกสะสมและกลายเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก เป็นต้น



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์ ความเข้มข้นของเอทานอล ผลผลิตของเอทานอล และปริมาณความเข้มข้นของแป้ง

Figure 8. Relationship between maximum cell concentration (O), maximum ethanol concentration (□), ethanol yield (Δ), and initial starch concentration.

ที่มา: Nakamura และคณะ (1997)

3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

3.1 เพื่อคัดเลือกเชื้อยีสต์จากลูกแป้งที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง และเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอล

3.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลโดยเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง

3.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง

3.4 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตเอทานอลแบบการใช้เชื้อเดียว แบบการใช้เชื้อร่วม และแบบแยกกระบวนการผลิต โดยเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง

4. ขอบเขตการวิจัย

ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลัง และเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลจากลูกแป้งในท้องที่จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ที่แยกได้ ทำการเปรียบเทียบหาประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตเอทานอลในแบบต่างๆ ได้แก่ แบบการใช้เชื้อเดียว แบบการใช้เชื้อร่วม และแบบแยกกระบวนการผลิต เพื่อหากระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิต

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

5.1 เป็นแหล่งข้อมูลในการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์

5.2 เป็นแหล่งข้อมูลในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังและการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง

5.3 เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเปรียบเทียบกระบวนการผลิตเอทานอลในแบบต่างๆ ได้แก่ แบบการใช้เชื้อเดียว แบบการใช้เชื้อร่วม และแบบแยกกระบวนการผลิต