บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เอทิลแอลกอฮอล์เรียกอีกชื่อว่า เอทานอล เป็นสารอินทรีย์ที่ผลิตจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์พวกยีสต์และมีสับสเตรทเป็นสารประกอบพวกแป้งหรือน้ำตาล โดยน้ำตาล 1 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล และเอทานอล 2 โมเลกุล ภายใต้สภาพที่ปราศจากอากาศ (Phaff *et al*., 1968)

เอทานอลนำมา ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการสังเคราะห์สารเคมี พวก อีเทอร์ เอทีลีน กรดแอซีติก เป็นสารช่วยในการเจือจางและตัวทำละลายนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสี การผลิตยาและเวชภัณฑ์ทางการแพทย์ เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

ปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกประสบกับปัญหาราคาน้ำมันในตลาดโลกผันผวน และมีการปรับตัวสูงขึ้น รวมทั้งประเทศไทยหันมาใช้เอทานอลเป็นส่วนผสมในน้ำมันเชื้อเพลิง เช่น แก๊สโซฮอล์ ซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่างน้ำมันเบนซิน 90 % และเอทานอล (บริสุทธิ์ 99.5 %) 10 % (บุณยพัต และคณะ, 2546; มุกดา และคณะ, 2546) นอกจากนี้ยังให้ความสำคัญกับการทำงานวิจัยและเทคนิคต่าง ๆ ในการผลิตเอทานอลจากพืชและวัสดุเหลือใช้เพื่อใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงทดแทน เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกาผลิตเอทานอลจากข้าวโพด ประเทศบราซิลผลิตเอทานอลจากอ้อย นำมาใช้แทนน้ำมันเชื้อเพลิงนานกว่า 50 ปี สำหรับประเทศไทยมีการพัฒนาการนำเซลลูโลสและวัสดุเหลือใช้ รวมทั้งขยะมาผลิตเอทานอล (มุกดา และคณะ, 2546) และมีการศึกษาประเมินความเป็นไปได้ในการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอล โดยวิเคราะห์หาโครงสร้างและรูปแบบที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตเอทานอล เมื่อสร้างขึ้นร่วมกับโรงงานน้ำตาลและโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่มีอยู่เดิม (บุณยพัต และคณะ, 2546) นอกจากนี้ยังมีโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดาที่เร่งพัฒนาการผลิตเอทานอลจากการใช้ยีสต์หมักสับสเตรทพวกแป้งชนิดต่าง ๆ เป็น

พลังงานเชื้อเพลิงทางเลือก เช่น แก๊ซโซฮอล์ ดีโซฮอล์ โดยเมื่อวันที่ 30 กรกฎาคม 2545 คณะรัฐมนตรีอนุมัติให้ผู้ประกอบการ 8 ราย จัดตั้งโรงงานผลิตและจำหน่ายเอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงาน (The Department of Alternative Energy Development and Efficiency of Energy, 2548)

การทำงานของยีสต์ในการหมักเอทานอลโดยทั่วไปมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-35 °ซ (Banat *et al*., 1992) แต่การหมักเอทานอลของยีสต์จะเกิดความร้อนร่วมด้วยจึงต้องควบคุมอุณหภูมิในการหมักให้อยู่ในช่วง 30-35 °ซ ดังนั้นการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมความร้อนที่เกิดขึ้นจึงต้องถูกระบายออกโดยใช้ระบบหล่อเย็น (cooling) การใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการเจริญและหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากใช้เวลาในการหมักสั้นกว่าและไม่ต้องใช้ระบบหล่อเย็น (Singh *et al*., 1998; Abdel-Fattah *et al*., 2000) ทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลง 30-35 % นอกจากนี้การที่ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนมีอัตราการหมักเร็วจึงช่วยลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ และช่วยเพิ่มอัตราการผลิต

การผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนจึงเป็นงานที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้ทำการแยกและคัดเชื้อยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนเพื่อนำมาศึกษาการผลิตเอทานอลในห้องปฏิบัติการ ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นพื้นฐานเพื่อศึกษาในระดับโรงงานนำร่องและต่อเนื่องไปยังระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. กระบวนการผลิตเอทานอล

1.1 คุณสมบัติทั่วไป

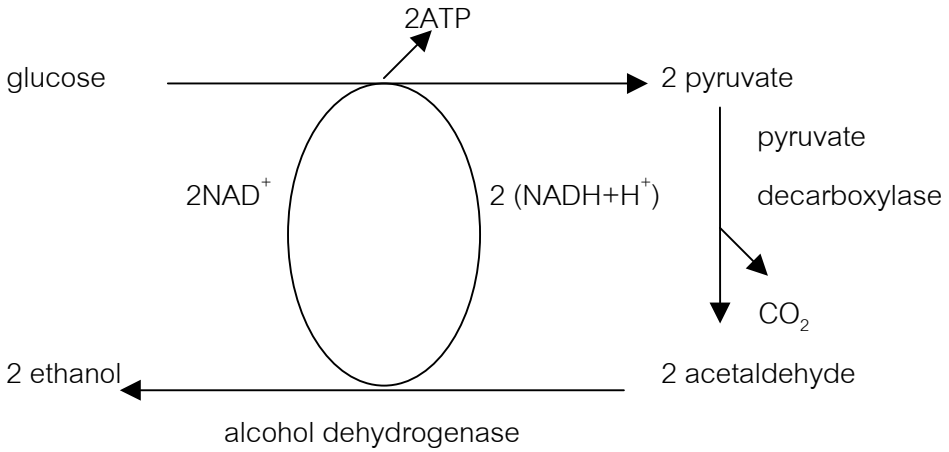
เอทิลแอลกอฮอล์ หรือเอทานอลเป็นสารประกอบอินทรีย์มีคุณสมบัติเป็นของเหลวไม่มีสี จุดไฟติด ระเหยง่าย มีจุดเดือดที่ 78 °ซ เอทานอลบริสุทธิ์มีเนื้อแอลกอฮอล์ประมาณ 99.7% โดยทั่วไปมีน้ำเจือปนไม่เกิน 0.5 % ละลายได้ดีในน้ำ และตัวละลายอินทรีย์อื่น ๆ เช่น เมทิลแอลกอฮอล์ อีเทอร์ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น (สาวิตรี, 2540)

1.2 การหมักเอทานอล

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากและได้มีการค้นคว้าวิจัยกันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน โดยปกติเอทานอลสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยกระบวนการหมักเอทานอลโดยจุลินทรีย์พวกยีสต์และมีสับสเตรทเป็นสารประกอบพวกแป้งหรือน้ำตาล โดยน้ำตาล 1 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็น

คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล และเอทานอล 2 โมเลกุล ภายใต้สภาพที่ปราศจากอากาศ (Phaff *et al*., 1968)

การหมักเอทานอลของยีสต์นั้นเกิดจากการที่น้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนไปตามวิถีไกลโค-ไลซิสจนได้ไพรูเวต จากน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะให้ไพรูเวต 2 โมเลกุล จากนั้นไพรูเวตเกิด decarboxylation โดยเอนไซม์ pyruvate decarboxylase เป็นตัวเร่งการสร้าง acetaldehyde ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นเอทานอล โดยมีเอนไซม์ alcohol dehydrogenase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ (สาวิตรี, 2540; Panchal and Tavares, 1990)



ประสิทธิภาพทางการผลิตเอทานอลของยีสต์

$C_6H_{12}O_6$	⟶	C_2H_5OH + $2CO_2$		+ energy
Glucose	ยีสต์เอนไซม์	Ethanol		ATP
180 g		92 g	88 g	56 Kcal

จากสมการนี้ให้ผลสรุปทางทฤษฎีได้ว่า การผลิตเอทานอลจากกลูโคส 1 กรัม ให้เอทานอล 0.511 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.498 กรัม นั่นคือ มีผลผลิตทางทฤษฎี (theoretical yield) สำหรับการผลิตเอทานอลเท่ากับ 51.1 % เนื่องจากน้ำตาลประมาณ 6-12 % จะถูกยีสต์ใช้เพื่อการเจริญ และบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตพลอยได้บางชนิด เช่น กลีเซอรอล ซัคซิเนท และ higher alcohol หรือ fusel oil ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ต่ำกว่าผลผลิตทางทฤษฎีเสมอ ในทางปฏิบัติเอทานอลที่ได้อยู่ในช่วงไม่เกิน 90-95 % ของผลผลิตทางทฤษฎี โดยผลผลิตพลอยได้ที่เกิดขึ้น เกิดจากการใช้สับสเตรท 4-5 % และถ้าสามารถป้องกันไม่ให้

เกิดการสร้างผลผลิตพลอยได้เหล่านั้น จะได้เอทานอลเพิ่มขึ้น 2.7 % ปัจจุบันการผลิตระดับอุตสาหกรรมเอทานอลที่ได้จะมีค่าเพียง 80-90 % ของผลผลิตทางทฤษฎี ซึ่งกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์นอกจากจะให้ผลผลิตที่ต้องการแล้วยังมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนในรูปของ ATP ด้วย (สาวิตรี, 2540; Panchal and Tavares, 1990)

1.3 ประโยชน์ของเอทิลแอลกอฮอล์ (วสันต์, 2546; The Department of Alternative Energy Development and Efficiency of Energy, 2548)

1. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ต่าง ๆ เช่น ไวน์ สุรา บรั่นดี ว้อดกา สาเก เป็นต้น

2. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้

3. ใช้ในอุตสากรรมเครื่องสำอาง เป็นส่วนประกอบในการทำเครื่องสำอาง เช่น น้ำหอม แชมพูสระผม และน้ำยาบำรุงผิว

4. ใช้ในอุตสาหกรรมยา กระบวนการสกัดสารอื่น ๆ ในสมุนไพร (extraction process) และการทำให้บริสุทธิ์ ใช้เป็นส่วนประกอบในการผสมยาใช้เป็นตัวทำละลายเวชภัณฑ์ที่มีอำนาจในการฆ่าตัวแมลง ฆ่าเชื้อรา ฆ่าเชื้อโรค และยาดับกลิ่น (purification process)

5. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสี เป็นส่วนประกอบในกระบวนการผลิตสีเป็นตัวทำละลายของน้ำยาเคลือบ น้ำมันชักเงา น้ำยาแลกเกอร์

6. ใช้เป็นสารผสมในน้ำมันเครื่องยนต์ (additive) ต่าง ๆ ได้แก่ แก๊สโซฮอล์ ที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันเบนซินในเครื่องยนต์

2. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

2.1 ความสำคัญ

การผลิตเอทานอลโดยทั่วไปนั้นจำเป็นต้องอาศัยยีสต์เป็นตัวสำคัญในกระบวนการหมัก *S. cerevisiae* เป็นสายพันธุ์หลักที่เกี่ยวข้อง และมีความสำคัญในการผลิตในระดับ อุตสาหกรรมเนื่องจาก *S. cerevisiae* เจริญรวดเร็ว มีความคงทนต่อเอทานอล และให้ผลผลิต เอทานอลปริมาณสูง (วราวุฒิ, 2538) สามารถใช้น้ำตาลได้อย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น น้ำตาล Glucose Sucrose Fructose Galactose Maltose Lactose Xylose Arabinose และ Sorbitol (Kiran Sree *et al*., 2000) และ Moltotriose (สาวิตรี, 2540) รวมทั้งสับสเตรทจำพวกแป้งต่างๆ ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า *S. diastaticus* และ *S. uvarum* (*carlsbergensis*) สามารถใช้แป้ง หรือ Dextrin และ Melibiose ได้ตามลำดับ (Spencer *et al*., 1997) ส่วนแบคทีเรียที่นำ

มาใช้ในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงมีเพียงสายพันธุ์เดียว คือ *Zymomonas mobilis* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและผลิตเอทานอลได้สูงกว่า *S. cerevisiae* (Benschoter and Ingram., 1986)

2.2 คุณสมบัติของยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (สาวิตรี, 2540; Panchal and Tavares, 1990)

ยีสต์ที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอลควรมีลักษณะดังนี้

1. สามารถใช้สับเสตรทได้หลากหลายชนิด
2. ให้ผลผลิตสูงและมีอัตราการหมักเอทานอลเร็ว ทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลง
3. มีความทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance) เนื่องจากระหว่างการหมักจะมีเอทานอลบางส่วนสะสมอยู่ในเซลล์ ซึ่งอาจทำให้เซลล์ยีสต์แตก (lysis) ได้ ยีสต์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงจึงส่งผลให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น
4. ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance) เพราะในกระบวนการหมักเอทานอลจะมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนออกมาทำให้อุณหภูมิในการหมักสูงขึ้น มีผลต่อการอยู่รอด และกิจกรรมการทำงานของยีสต์ ยีสต์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงจึงช่วยให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น
5. ทนพีเอชต่ำหรือทนกรด (acid tolerance) ในกระบวนการหมักจะเกิดกรดทำให้พีเอชของอาหารลดลง ยีสต์ที่สามารถทนพีเอชต่ำได้จึงช่วยให้มีผลผลิตเอทานอลสูงขึ้น
6. ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายในสภาวะต่าง ๆ ของการหมักและมีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย ส่งผลให้ประสิทธิภาพและคุณภาพในการผลิตเอทานอลสม่ำเสมอ
7. มีความสามารถในการตกตะกอน (flocculation) ทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยว และสามารถนำเซลล์ยีสต์กับมาใช้ใหม่ได้
8. ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance) ทำให้สามารถใช้อาหารที่มีปริมาณ น้ำตาลเริ่มต้นสูง ๆ และช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ทนต่อแรงดันออสโมซิส จึงมีผลผลิตเอทานอลมากขึ้น

ส่วนสำคัญของการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมที่ควรพิจารณา คือ ต้นทุนการผลิต เนื่องจากยีสต์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักอยู่ในช่วง 25-35 °ซ ในระหว่างการเจริญและการหมักเอทานอลจะมีความร้อนเกิดขึ้นจากกระบวนการเผาผลาญสารอาหารจึงต้องควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ระบบหล่อเย็น ทำให้ราคาเอทานอลต่อหน่วยผลิตสูงขึ้น ดังนั้นการคัดเลือกและใช้ยีสต์ทนร้อนจึงได้รับความสนใจที่นำมาใช้ผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม

2.3 การแยกและการคัดเชื้อยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน

ปัจจุบันหลายประเทศในโลกมีความต้องการเอทานอลเพื่อใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิง และเป็นเครื่องดื่มสำหรับบริโภค ในประเทศเขตร้อน เช่น อินเดีย อียิปต์ การหมักเอทานอลมักทำที่อุณหภูมิของสภาพแวดล้อม ซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 37 °ซ (Kiran Sree *et al*., 2000) ทำให้อุณหภูมิในระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นอีก กระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์จะถูกยับยั้งโดยความร้อน การคัดแยกยีสต์ที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้รับความสนใจศึกษาเป็นอย่างมาก ซึ่งรายงานการคัดแยกยีสต์ทนร้อนมีดังนี้

Hacking และคณะ (1984) นำยีสต์ 55 สายพันธุ์ จากศูนย์เก็บรวบรวมสายพันธุ์มาคัดเลือกยีสต์ทนร้อนเพื่อดูการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 °ซ พบว่ามี 8 สายพันธุ์ ที่ผลิต เอทานอลได้มากกว่า 4 % (w/v) ภายในเวลา 62-78 ชั่วโมง ทั้งหมดจัดอยู่ในจีนัส *Candida, Kluyveromyces* และ *Saccharomyces*

Anderson และคณะ (1986) แยกยีสต์ทนร้อนจากตัวอย่างที่เก็บในระหว่างการผลิตน้ำตาล ที่อุณหภูมิ 45 °ซ ได้ยีสต์ทนร้อน 35 สายพันธุ์ พบยีสต์ *K. marxianus* var. *marxianus* 14 สายพันธุ์ ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลได้สูงกว่า 6 % (w/v) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยเมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 45 °ซ พบว่ายังมีเชื้อรอดชีวิตมากกว่า 80 % ในขณะที่ *K. marxianus* var. *marxianus* CBS712 และ *K. marxianus* var. *marxianus* CBS397 ที่ใช้เปรียบเทียบมีเชื้อรอดชีวิตเพียง 30-50 %

Szczodrak และ Targonski (1988) คัดเลือกได้ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน 7 ไอโซเลต ได้แก่ *Fabospora fragilis* CCY51-1-1, *K. fragilis* FT23, *S. carlsbergensis* FT14, *S. cerevisiae* FTJa(a), *S. muciparus* CCY21-25-1, *K. fragilis* FT25, *S. marxianus* CCY21-40-1 จากยีสต์ 12 จีนัส (58 ไอโซเลต) โดย *Fabospora fragilis* CCY51-1-1 เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกมาใช้ในการผลิตเอทานอลเมื่อใช้กลูโคส 140 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 43 และ 46 °ซ สามารถผลิตเอทานอลได้ 56 และ 35 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในเวลาน้อยกว่า 48 ชั่วโมง

D'Amore และคณะ (1989) คัดเลือกยีสต์จากศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อทั้งหมด 65 สายพันธุ์ จาก 15 จีนัส คัดได้ยีสต์ทนร้อน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. diastaticus* No.62, *S. cerevisiae* No.67, *Saccharomyces* fusion product No.1400, *K. marxianus* 1510, *S. cerevisiae* No.130 และ *K. lactis* No.177 ซึ่งสามารถเจริญและผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 °ซ จากน้ำตาลกลูโคส 150 กรัม/ลิตร ในเวลา 24 ชั่วโมง

Banat และคณะ (1992) แยกยีสต์จากวัตถุดิบ และของเสียที่ได้จากโรงกลั่นสุราในประเทศอินเดีย พบยีสต์ *K. marxianus* IMB 5 สายพันธุ์ (IMB1-IMB5) สามารถเจริญบนจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 52 °ซ เมื่อนำยีสต์ดังกล่าวมาทดสอบการผลิตเอทานอล พบว่า *K. marxianus* ทั้ง 5 สายพันธุ์ มีการเจริญที่อุณหภูมิสูงถึง 50 °ซ โดยผลิตเอทานอลได้ 5.0-5.5 % (w/v) และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.86-0.99 h^{-1} ที่อุณหภูมิสูง 40 °ซ

Kiran Sree และคณะ (2000) แยกได้ยีสต์ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ (SV1-SV4) จากดินบริเวณโรงงานพลังงานความร้อน ทุกสายพันธุ์เจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 44 °ซ เมื่อนำทั้ง 4 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 150 กรัม/ลิตร พบว่า ผลิตเอทานอลได้อยู่ในช่วง 23-58 กรัม/ลิตร

นอกจากนี้ Abdel-Fattah และคณะ (2000) รายงานการแยกยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนจากดินบริเวณรอบ ๆ โรงกลั่นสุรา และกากน้ำตาลที่เก็บไว้ในถัง พบว่า ยีสต์ 3 จีนัส ได้แก่ *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* และ *Candida* เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 40-43 °ซ แต่มีเพียงสองสายพันธุ์ คือ *S. cerevisiae* F111 และ *K. marxianus* WR12 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 °ซ และผลิตเอทานอลได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม (*S. cerevisiae* SIIC) ที่ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล

3.1 สายพันธุ์ยีสต์

ปกติยีสต์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญต่ำกว่าแบคทีเรีย ซึ่งมีรายงานหลายฉบับกล่าวว่า ยีสต์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 30-35 °ซ จนกระทั่งต่อมาพบยีสต์ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 °ซ และจัดเป็นยีสต์ทนร้อน (Banat *et al*., 1992) ความสามารถในการทนร้อนและผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงของยีสต์มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่ ซึ่งยีสต์ทนร้อนส่วนใหญ่มักพบอยู่ในจีนัส*Saccharomyces* และ *Kluyveromyces* ดังที่กล่าวในข้อ 2.3 นอกจากนี้ *Fabospora fragilis* CCY51-1-1 (Szczodrak and Targonski, 1988) และ *Candida* (Hacking *et al*., 1984) ก็เป็นอีก 2 จีนัส ที่ผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้เช่นกัน

Kadam และ Schmidt (1997) รายงานว่า *Candida acidothermophilum* เป็นสายพันธุ์ทนร้อนที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอลโดยใช้สารพวก lignocellulose เป็นสับเสตรทที่อุณหภูมิ 40 °ซ ได้ปริมาณเอทานอลเป็น 80 % ของผลได้ทางทฤษฎี นอกจากนี้ *Candida*

pseudotropicalis สามารถเจริญและผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้เช่นกัน (Hacking *et al*., 1984)

ซึ่งลักษณะทั่วไปของยีสต์ในจีนัส *Saccharomyces* และ *Kluyveromyces* มีดังนี้

Saccharomyces

พบทั่วไปในดิน ผลไม้ สามารถหมักน้ำตาลได้เร็ว และใช้สับสเตรทได้กว้าง เช่น น้ำตาล Glucose Sucrose Fructose Galactose Maltose Xylose Arabinose Sorbitol รวมทั้งสับสเตรท พวกแป้ง (Kiransree *et al*., 2000) ซึ่งการใช้น้ำตาลเป็นคุณลักษณะหนึ่งที่ใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ในจีนัสนี้ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 20-35 °ซ (Banat *et al*., 1992; Abdel-Fattah *et al*., 2000) ความสามารถในการเจริญและผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง รวมทั้งความทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ เช่น *S. cerevisiae* สามารถเจริญ ผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 44 °ซ และทนต่อเอทานอล 12 % (w/v) (Kiransree *et al*., 2000; Kiran Sree *et al*., 2000) ส่วน *S. diastaticus* No.62 เจริญและหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 45 °ซ (D'Amore *et al*., 1989)

สามารถสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อรอบเซลล์ (multipolar budding) บางครั้งอาจสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยการสร้างแอสโค-สปอร์รูปกลม หรือรูปไข่ ที่มีผนังเรียบ จำนวน 1-4 สปอร์/แอสคัส ไม่ใช้ไนเตรท ไม่สร้างเอนไซม์ urease และไม่เกิดปฏิกิริยากับสี Diazonium blue B (Barnett *et al*., 2000; Kurtzman and Fell, 1998)

Kluyveromyces

พบทั่วไปในดิน ผลไม้ และวัสดุพวกพืช สามารถหมักน้ำตาลได้เร็ว และใช้สับสเตรทได้หลายชนิด ยีสต์จีนัสนี้สามารถผลิตเอนไซม์ lactase มาย่อยน้ำตาล Lactose ได้ (วิลาวัณย์, 2539; Brady *et al*., 1994; 1995a, b) มีความสามารถในการเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 °ซ เช่น *K. marxianus* เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 52 °ซ (Banat and Marchant, 1995) และหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 50 °ซ (Banat *et al*., 1992) *K. fragilis* เจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 46 °ซ (Szczodrak and Targonski, 1988) ในขณะที่ *K. lactis* เจริญและผลิต เอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 40 °ซ (D'Amore *et al*., 1989)

มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อรอบเซลล์ (multipolar budding) บางครั้งอาจสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างแอสโค-สปอร์ผิวเรียบรูปร่างคล้ายไต รูปกลม หรือรูปไข่ จำนวน 1-16 สปอร์/แอสคัส ไม่ใช้ไนเตรท ไม่สร้าง

เอนไซม์ urease และไม่เกิดปฏิกิริยากับสี Diazonium blue B (Barnett *et al*., 2000; Kurtzman and Fell, 1998)

นอกจากนี้แล้วการใช้เทคนิคต่าง ๆ เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ทำให้ผลิตเอทานอลได้มากขึ้น เช่น Sridhar และคณะ (2002) นำยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* SV1 และ *S. cerevisiae* SV3 มาปรับปรุงสายพันธุ์ โดยการฉายรังสี UV พบว่าทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 42 °ซ และทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลที่ 350 กรัม/ลิตร เมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดิม

Panchal and Tavares (1990) รายงานถึงสายพันธุ์ของยีสต์ ที่สามารถผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 °ซ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนที่มีความสามารถในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 °ซ

สายพันธุ์	**ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุด (% (v/v))**
K. fragilis YKL1	4.0
K. marxianus NCYC587	5.03
C. lusitaniae Y-5394	4.57
C. psuedotropicalis YCa9	6.87
C. tropicalis NCYC405	3.43
S. cerevisiae ATCC4132	4.39
S. cerevisiae YSa86	6.38
S. cerevisiae NP3	7.58
S. cerevisiae Y24	10.27
Saccharomyces sp. 1400	7.00
S. uvarum inulyticus	7.82
Schizosaccharomyces pombe YSC3	2.15
Hansenula polymorha ATCC4516	1.80

ที่มา : Panchal และ Tavares (1990)

3.2 ชนิดและความเข้มข้นของสับสเตรท

สับสเตรทหรือแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และการผลิตเอทานอล การใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ในการหมักเอทานอลมีผลช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ การใช้สับสเตรทความเข้มข้นสูง ๆ มีผลยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอล การยับยั้งส่วนหนึ่งเกิดจากแรงดันออสโมซิส ทำให้เซลล์เกิดพลาสโมไลซิสเมื่ออยู่ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 14 % โดยน้ำหนัก และมีผลยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลสิส (glycolysis) ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลง (สาวิตรี, 2540; Lachance, 1990; Panchal and Tavares; 1990)

สำหรับความเข้มข้นของน้ำตาลที่ยับยั้งการหมักนั้นเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนโดยแบ่งแยกเป็นชนิดดังนี้

3.2.1 กลูโคส

กลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ยีสต์ทุกชนิดสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ทันทีโดยไม่ต้องผลิตเอนไซม์มาย่อย การศึกษาการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

Hacking และคณะ (1984) ศึกษาการผลิตเอทานอลของ *C. pseudotropicalis*, *S. cerevisiae* และ *K. uvarum* โดยใช้กลูโคส 140 กรัม/ลิตร พบว่า ทั้ง 3 สายพันธุ์ ผลิตเอทานอลได้สูงกว่า 8 % (v/v) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ในเวลา 72 ชั่วโมง

Anderson และคณะ (1986) ใช้ *K. marxianus* var *marxianus* มาผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส 150 กรัม/ลิตร พบว่า ผลิตเอทานอลได้ 6.2 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 45 °ซ ในเวลา 24 ชั่วโมง

D'Amore และคณะ (1989) ใช้น้ำตาลกลูโคส 150 และ 200 กรัม/ลิตร มาผลิตเอทานอล โดยใช้เชื้อ *S. diastaticus* NO.62 พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้ 50 และ 52 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 45 °ซ

Banat และคณะ (1992) นำ *K. marxianus* IMB1-IMB5 มาผลิตเอทานอลจากกลูโคส 140 กรัม/ลิตร พบว่า ทั้ง 5 สายพันธุ์ ผลิตเอทานอลได้ในช่วง 5.8-7.2 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 45 °ซ

3.2.2 กากน้ำตาล

กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากการผลิตน้ำตาลทราย มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้ม ไม่สามารถตกผลึกน้ำตาลได้อีกและมีส่วนประกอบของสิ่งที่ไม่ใช่น้ำตาลปนอยู่ (สืบศักดิ์ และคณะ, 2547) การผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่อาจทำโดยการหมักจากน้ำอ้อยโดยตรง หรืออาจใช้กากน้ำตาลเป็นสับเสตรท เนื่องจากกากน้ำตาลมีราคาถูก ส่งผลให้ลดต้นทุนในการผลิตเอทานอลลงประมาณ 60-70 % ของต้นทุนการผลิตของโรงงาน (สาวิตรี, 2540) แต่กากน้ำตาลมีองค์ที่ประกอบซับซ้อน มีทั้งน้ำตาลที่ยีสต์นำไปใช้ได้และนำไปใช้ไม่ได้ มีธาตุต่าง ๆ เช่น ไนโตรเจน และฟอสเฟตในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการในการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ มีรายงานการวิจัยหลายฉบับที่นำยีสต์ทนร้อนมาผลิต เอทานอลโดยใช้กากน้ำตาลเป็นสับสเตรท

Banat และคณะ (1992) ทดลองนำ *K. marxianus* IMB1-IMB5 มาผลิตเอทานอล จากอาหารที่ใช้กากน้ำตาล 16 % (w/v) เป็นสับเสตรท ที่อุณหภูมิ 40 °ซ พบว่าทั้ง 5 สายพันธุ์ ผลิตเอทานอลได้ 5.6-6.0 % (w/v) เมื่อทดลองเติมสารอาหารต่าง ๆ ได้แก่ โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และแมงกานีสในกากน้ำตาลความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น เป็น 6.5-7.0 % (w/v) ทั้งนี้เนื่องจากกากน้ำตาลอยู่ในรูปที่ซับซ้อนกว่าน้ำตาลกลูโคส ขาดสารอาหารรวมทั้งแร่ธาตุที่ยีสต์ต้องการในการเจริญ และการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง จึงทำให้ยีสต์ใช้น้ำตาลได้ไม่สมบูรณ์ ซึ่งการที่ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 45-50 °ซ นี้ อาจนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลแบบย่อยโพลิเมอร์เป็นน้ำตาล และการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล (simultaneous saccharification and fermentation) ได้เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการนี้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 45-50 °ซ

Gough และคณะ (1996) ทดลองนำกากน้ำตาลความเข้มข้นในช่วง 5-44 % (w/v) มาผลิตเอทานอล ที่อุณหภูมิ 45 °ซ โดยใช้ยีสต์ *K. marxianus* IMB3 พบว่า เมื่อใช้กากน้ำตาลเข้มข้น 23 % (w/v) ยีสต์ผลิตเอทานอลได้สูงถึง 7.4 % (w/v) และมีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 8.5 % (w/v) เมื่อเติมสารอาหารพวก แมกนีเซียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และน้ำมันจากต้นแฟล็กส์ (linseed oil)

Kiransree และคณะ (2000) นำ *S. cerevisiae* 2 สายพันธุ์ คือ *S. cerevisiae* SV1 และ *S. cerevisiae* SV3 มาผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล 14 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ นาน 48 ชั่วโมง พบว่า *S. cerevisiae* SV1 และ *S. cerevisiae* SV3 ผลิตเอทานอลได้ 30 และ 45 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งเอทานอลที่ผลิตได้นี้น้อยกว่าที่ผลิตได้จากน้ำตาลซูโครส ทั้งนี้เนื่องจาก

น้ำตาลซูโครสมีความบริสุทธิ์มากกว่ากากน้ำตาล ซึ่งมีทั้งน้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้ได้และใช้ไม่ได้ นอกจากนี้กากน้ำตาลยังมีความหนืดและปนเปื้อนสูง จึงอาจมีผลยับยั้งการหมักเอทานอล

3.2.3 ซูโครส

ซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ การใช้น้ำตาลซูโครสมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เตสเพื่อไฮโดรไลท์น้ำตาลซูโครสเป็นกลูโคส

Anderson และคณะ (1986) ใช้ *K. marxianus* var. *marxianus* มาผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้น 15.5 19 และ 22 องศาบริกส์ ที่อุณหภูมิ 43 °ซ พบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 19 องศาบริกส์ ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ 7.6 % (w/v) และผลิตเอทานอลได้มากกว่าที่ผลิตได้จากอาหารที่มีน้ำตาลเข้มข้น 15.5 องศาบริกส์ ซึ่งผลิตได้เพียง 6.8 % (w/v)

Fleming และคณะ (1993) ใช้ *K. marxianus* IMB3 ผลิตเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส 100 กรัม/ลิตร พบว่ายีสต์ดังกล่าวสามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 45 °ซ มีการผลิตมวลชีวภาพสูงสุดที่เวลา 20 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.7 h^{-1} และผลิตเอทานอลได้ 35 กรัม/ลิตร ในเวลา 13 ชั่วโมง ซึ่งการเจริญและการผลิตเอทานอลนี้ต่ำกว่าเมื่อใช้กลูโคสปริมาณเท่ากันเป็นสับเสตรท

Kiransree และคณะ (2000) ใช้ *S. cerevisiae* SV1 และ *S. cerevisiae* SV3 มาผลิตเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส 150 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 °ซ พบว่า *S. cerevisiae* SV1 และ *S. cerevisiae* SV3 สามารถผลิตเอทานอลได้ 52 และ 64 กรัม/ลิตร

3.2.3 แลคโตส

แลคโตสได้รับการนำมาใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอทานอล ยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลนี้ได้ เช่น *K. marxianus* IMB3 ซึ่งสามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ 3.8 กรัม/ลิตร จากน้ำตาลแลคโตส 4 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 45 °ซ ภายในเวลา 50 ชั่วโมง โดยขณะที่มีการเจริญจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ β-galactosidase มาย่อยแลคโตสเป็นกลูโคส และกาแลคโตสก่อนแล้วจึงเปลี่ยนเป็นเอทานอลภายหลัง (Brady *et al*., 1994; 1995a, b)

3.2.4 เซลโลไบโอส

เซลโลไบโอสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ได้มาจากการย่อยเซลลูโลสโดยเอนไซม์ เซลลูเลส Banat และ Marchant (1995) พบว่า *K. marxianus* IMB3 สามารถเจริญและผลิต เอทานอลได้ 3.1 กรัม/ลิตร จากเซลโลไบโอส 10 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 45 °ซ โดยมีมวลเซลล์ 1.4 กรัม/ลิตร

3.2.5 เซลลูโลส แป้ง และอื่นๆ

แป้ง เป็นสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ที่พืชสังเคราะห์ขึ้น เพื่อเก็บไว้เป็นอาหารสะสมอยู่ในเซลล์ของพืช พืชที่มีแป้งในปริมาณสูง เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด และ ข้าว ส่วนเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช พืชมีองค์ประกอบที่เป็น เซลลูโลสประมาณ 35-45 % เฮมิเซลลูโลส ประมาณ 30-45 % แหล่งของเซลลูโลส ได้แก่ ลำต้น ใบ และส่วนอื่น ๆ ของพืช ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย เศษไม้ เศษขี้เลื่อยเศษกระดาษ รวมทั้งเยื่อกระดาษ เป็นต้น (มุกดา และคณะ, 2547) การผลิตเอทานอลโดยใช้แป้งเป็นสับสเตรท มักพบว่า ต้องใช้จุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิด โดยอาศัยกระบวนการเปลี่ยนโพลิเมอร์พวกแป้งเป็นน้ำตาลและหมักน้ำตาลเป็นเอทานอล ทำให้มีการผลิตเอทานอลได้เร็วและยังช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นอีกด้วย

Nilsson และคณะ (1995) ใช้ *K. marxianus* IMB3 มาทดลองผลิตเอทานอล ที่อุณหภูมิ 45 °ซ โดยใช้กระบวนการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาล และเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล พบว่า เมื่อใช้กรดฟอสฟอริกย่อยเซลลูโลสก่อนนำมาผลิตเอทานอล ยีสต์มีการผลิตเอทานอลมากกว่าการใช้เซลลูโลสที่ไม่ย่อยด้วยกรด โดยผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 2.6 เป็น 4.2 กรัม/ลิตร ในเวลา 60 ชั่วโมง เท่ากัน เอทานอลที่เพิ่มขึ้นนี้ คิดเป็น 42 % ของผลได้สูงสุดทางทฤษฎี

Barron และคณะ (1995) นำเชื้อ *K. marxianus* IMB3 มาผลิตเอทานอลจากกระดาษบดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 0.75 % (v/v) พบว่า ยีสต์ผลิตเอทานอลได้ 10 กรัม/ลิตร จากกระดาษบด 5 % (w/v) คิดเป็น 39 % ของผลได้สูงสุดทางทฤษฎี ที่อุณหภูมิ 45 °ซ

Kadam และ Schmidt (1997) ใช้ *C. acidothermophilum* ผลิตเอทานอลจาก lignocellulose 3.5 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ โดยใช้กระบวนการเปลี่ยน lignocellulose เป็นน้ำตาลและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล พบว่า ได้ปริมาณเอทานอล 82 % ของผลได้ทางทฤษฎี

Boyle และคณะ (1997) ทดลองนำฟางข้าวที่ย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซค์มาใช้เป็นสับสเตรทก่อนนำใช้ไปผลิตเอทานอล ด้วยเชื้อ *K. marxianus* IMB3 พบว่า จากการใช้ฟางข้าว 60 กรัม/ลิตร ยีสต์ผลิตเอทานอลได้ 12 กรัม/ลิตร ซึ่งให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าฟางข้าวที่ไม่ย่อยด้วยด่างที่ให้ผลผลิตเอทานอลเพียง 3.6 กรัม/ลิตร ยิ่งไปกว่านั้นการย่อยฟางข้าวด้วยด่างก่อนนำมาใช้ผลิตเอทานอลยังช่วยลดปริมาณการใช้เอนไซม์เซลลูเลสด้วย ทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลง

Kiran Sree และคณะ (1999) ทดลองผลิตเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงโดยอาศัยกระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล และการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล จากสับสเตรทพวกข้าวฟ่างผสมกับมันฝรั่งหวาน โดยใช้จุลินทรีย์ร่วมกัน 2 ชนิด คือ *S. cerevisiae* SV3 และ *Bacillus*

sp. (VB9) พบว่าผลิตเอทานอลสูงสุด 5 และ 3.5 กรัม/สับสเตรท 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 37 และ 42 °ซ ตามลำดับ

Kiransree และคณะ (2000) นำเชื้อ *S. cerevisiae* SV1 และ *S. cerevisiae* SV3 มาผลิตเอทานอลโดยใช้ข้าวฟ่าง มันฝรั่งหวาน แป้งสาลี แป้งข้าวเจ้า สารละลายแป้ง และแป้งมันฝรั่ง เป็นสับสเตรท เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการผลิตเอทานอลสูงสุดเมื่อใช้ ข้าวสาลีเป็นสับสเตรท โดย *S. cerevisiae* SV1 และ *S. cerevisiae* SV3 สามารถผลิตเอทานอลได้ 6.9 และ 8.5 กรัม/สับสเตรท 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 42 °ซ

Khishana และคณะ (2001) เปรียบเทียบการใช้ *S. cerevisiae* NRRL-Y-132 และ *K. fragilis* NCIM3358 มาผลิตเอทานอลจาก lignocellulose โดยใช้กระบวนการเปลี่ยน lignocellulose เป็นน้ำตาลและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล ในเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า *K. fragilis* NCIM 3358 ผลิตเอทานอลได้ 3.5 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 43 °ซ สูงกว่าเอทานอลที่ *S. cerevisiae* NRRL-Y-132 ผลิตได้ (2.5 % (w/v)) และใช้อุณหภูมิในการผลิตเพียง 40 °ซ จากสับสเตรท 10 % (w/v) เท่ากัน

Kadar และคณะ (2004) เปรียบเทียบการใช้ยีสต์ขนมปัง คือ *S. cerevisiae* กับยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* Y01070 มาผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการหมักแบบการเปลี่ยน lignocellulose เป็นน้ำตาลและการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล จากการใช้กระดาษลอนเก่า ๆ โคลนกระดาษ และผงเซลลูโลสบริสุทธิ์เป็นสับเสตรท ที่อุณหภูมิ 40 °ซ นาน 72 ชั่วโมง พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกันในทุกสับเสตรทที่ทดสอบ โดย *S. cerevisiae* และ *K. marxianus* Y01070 ผลิตเอทานอลได้ 17.8 และ 16.6 จากผงเซลลูโลสบริสุทธิ์ ผลิตเอทานอลได้ 14.1 และ 14.2 จากกระดาษลอน และผลิตเอทานอลได้ 8.8 และ 9 กรัม/ลิตร จากโคลนกระดาษ ตามลำดับ

3.3 แหล่งไนโตรเจน

ยีสต์ต้องการไนโตรเจนในการเจริญและผลิตเอทานอล เนื่องจากเป็นแร่ธาตุที่สำคัญในการสร้างโปรตีนของเซลล์ ผนังเซลล์ของยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10 % ของน้ำหนักแห้ง (Walker, 1998) ยีสต์แต่ละชนิดสามารถใช้แอมโมเนียไนโตรเจนได้ (Spencer *et al*., 1997) ยีสต์สกัดและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยยีสต์สกัดเป็นแหล่งวิตามินที่สำคัญช่วยในการเจริญ แบ่งเซลล์ และฟื้นฟูความสามารถในการเจริญของยีสต์ (สืบศักดิ์ และคณะ, 2547; Dombek and Ingram, 1986)

D'Amore และคณะ (1989) ทดลองใช้เชื้อ *S. diastaticus* NO.62 มาผลิตเอทานอลจากอาหาร PYN ที่มียีสต์สกัด 0.3 % เทียบกับอาหาร PYN ที่เพิ่มส่วนประกอบของอาหารเป็น 2 เท่า (มียีสต์สกัด 0.6 %) พบว่าเมื่อใช้อาหาร PYN ที่เพิ่มส่วนประกอบของอาหารเป็น 2 เท่า ยีสต์มีการผลิตเอทานอลสูงขึ้นและมีการบริโภคน้ำตาลอย่างสมบูรณ์ โดยผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 7 % เป็น 9.1 % (w/v) จากน้ำตาลกลูโคส 200 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 °ซ

3.4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอล มีรายงานหลายฉบับที่ผลิตเอทานอลโดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่าง ๆ กัน

D'Amore และคณะ (1989) เปรียบเทียบการใช้เชื้อ *S. diastaticus* NO.62 เริ่มต้นในปริมาณที่ต่างกัน ได้แก่ 0.35 1 2 และ 3.5 % มาผลิตเอทานอลจากกลูโคส 200 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 °ซ พบว่า ยีสต์มีการเจริญและผลิตเอทานอลใกล้เคียงกันทุกระดับที่ศึกษาที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมีการผลิตเอทานอลได้ 70 78 82 และ 80 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

Gough และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล 23 % (w/v) โดยใช้เชื้อ *K. marxianus* IMB3 ปริมาณเริ่มต้น 5 % พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้ 7.4 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 45 °ซ

Abdel-Fattah และคณะ (2000) ทดลองใช้ *S. cerevisiae* F111 และ *K. marxianus* WR12 เริ่มต้น 5 % เท่ากันมาผลิตเอทานอล พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้ 7.7 และ 7.4 % (w/v) ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 43 °ซ จากน้ำอ้อยเข้มข้น 19 องศาบริกส์

Kiransree และคณะ (2000) ใช้เชื้อ *S. cerevisiae* SV1 และ *S. cerevisiae* SV3 เริ่มต้น 5 % มาผลิตเอทานอล พบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ผลิตเอทานอลได้ 53 และ 63 กรัม/ลิตร ตามลำดับ จากน้ำตาลกลูโคส 150 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 °ซ

Anderson และคณะ (1986) ใช้เชื้อ *K. marxianus* var. *marxianus* เริ่มต้น 10 % มาผลิตเอทานอล พบว่าให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่า 6 % (w/v) จากน้ำตาลกลูโคส 150 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 45 °ซ

Banat และคณะ (1992) ทดลองผลิตเอทานอลโดยใช้ปริมาณเชื้อ *K. marxianus* IMB3 เริ่มต้น 10 % พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ 7 % (w/v) จากน้ำตาลกลูโคส 140 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 45 °ซ

ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าส่วนใหญ่มักใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5-10 % ในการผลิตเอทานอล

3.5 พีเอชเริ่มต้นของอาหาร

การปรับพีเอชของอาหารมีความสำคัญอย่างมากโดยเฉพาะการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากยีสต์เจริญดีที่พีเอชระหว่าง 4.5-6.5 แต่การเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างขึ้นอยู่กับสปีชีส์ (Walker, 1998) พีเอชของอาหารมีผลต่ออัตราการหมัก อีกทั้งมีบทบาทในการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นอีกด้วย ปกติเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ยอมให้ประจุไฮโดรเจนหรือประจุไฮดรอกซิลผ่านเข้าออกได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น รวมทั้งภายในไซโตรพลาสซึมของเซลล์มีระบบบัฟเฟอร์ควบคุมการเปลี่ยนแปลงพีเอช (วราวุฒิ, 2538) การเลือกพีเอชเริ่มต้นของอาหารขึ้นอยู่กับ buffer capacity ของอาหารที่ใช้ในการหมัก ในอาหารที่มี buffer capacity ต่ำ พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมประมาณ 5.5 ส่วนอาหารที่มี buffer capacity สูง พีเอชที่ควรใช้อยู่ในช่วง 4.5-4.7 (สาวิตรี, 2540) ส่วนใหญ่ในการทดลองนิยมใช้อาหารที่ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วงความเป็นกรด Hacking และคณะ (1984) ทดลองผลิตเอทานอลจากกลูโคสโดยมีพีเอชเริ่มต้นของอาหาร 3.8-4.0 ส่วน Abdel-Fattah และคณะ (2000) ใช้กากน้ำตาลที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5 ในขณะที่ Anderson และคณะ (1986) Szczodrak และTargonski (1987) และ Banat และคณะ (1992) ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 5.5 ในการผลิตเอทานอล

Kiransree และคณะ (2000) ทดลองเลี้ยง *S. cerevisiae* SV3 ในอาหารที่ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 2-12 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อหาพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญ พบว่ายีสต์ที่ทดสอบสามารถเจริญได้ในพีเอชตั้งแต่ 2-10 และมีพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ที่ 5.5 แต่เมื่อเปลี่ยนสับเสตรทเป็นแป้งโมเลกุลใหญ่ เช่น แป้งข้าวสาลี แป้งมันฝรั่ง หรือสารละลายแป้ง กลับปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 5.0 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพีเอชนี้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสับสเตรท

3.6 อุณหภูมิ

ยีสต์ในห้องปฏิบัติการและในระดับอุตสาหกรรมเจริญได้ดี เมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 20-30 °ซ แต่มีอุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 35-43 °ซ (Walker, 1998) ความทนต่ออุณหภูมิสำหรับการเจริญ และการหมักเอทานอลเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ เช่น *S. cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic strain) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 25-30 °ซ (Banat *et al*., 1992; Abdel-Fattha *et al*., 2000) แต่ยีสต์ทนร้อนเป็นยีสต์ที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 °ซ (Banat and Marchant., 1995)

อุณหภูมิมีผลต่อสัณฐานวิทยา และความอยู่รอดของเซลล์ ยีสต์ที่เจริญในระยะ exponential จะมีความทนทานต่ออุณหภูมิสูง ๆ น้อยกว่ายีสต์ที่อยู่ในระยะ stationary และพบว่า

อุณหภูมิสูงมีผลทำให้การแตกหน่อของยีสต์ผิดปกติ ผนังเซลล์เจริญไม่สมบูรณ์ การเพิ่มขนาดของเซลล์ผิดปกติ มีปริมาณของเหลวในเซลล์เพิ่มขึ้น ความสามารถในการเลือกผ่านของสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง ลดกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเมมเบรนทำให้ความทนต่ออุณหภูมิสูงของเซลล์ลดลง ทำลายพันธะไฮโดรเจนทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิคเสื่อมสภาพ ขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนหลายชนิด เมื่อมีการสังเคราะห์โปรตีนลดลงส่งผลให้กิจกรรมการขนส่งน้ำตาลเข้าเซลล์ยีสต์ลดลงด้วย ยับยั้งกระบวนการหายใจและกระบวนการหมัก สำหรับการหมักเอทานอล พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในกระบวนการหมักจะสูงกว่าอุณหภูมิสำหรับการเจริญ 5-10 °ซ และกระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์ในที่มีออกซิเจนจะเบนไปทางการหมัก เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 25 °ซ เป็น 38 °ซ เนื่องจากเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับการออกซิเดชั่น 4 ชนิดถูกยับยั้ง ทำให้เกิดการสะสมไพรูเวตและเอทานอล มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มเป็น 40 °ซ อัตราการหมักในช่วงแรกจะเพิ่ม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase เกิดได้สูงสุดที่อุณหภูมิใกล้เคียง 40 °ซ (สาวิตรี, 2540)

อย่างไรก็ตาม จากรายงานการวิจัยหลายฉบับพบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 °ซ ยีสต์ทนร้อนสามารถเจริญได้ แต่มีการผลิตเอทานอลลดลง

Anderson และคณะ (1986) เลี้ยง *K. marxianus* var *marxianus* ที่อุณหภูมิ 39 41 43 45 48 และ 50 °ซ ในน้ำอ้อยที่มีน้ำตาลเข้มข้น 19 ° บริกซ์ พบว่า ยีสต์ผลิตเอทานอลได้ 8 7.8 7.6 6.4 และ 5.6 % (w/v) ตามลำดับ โดยมีการผลิตเอทานอลสูงสุดที่ อุณหภูมิ 39 °ซ และมีอัตราการรอดชีวิตของยีสต์ 10 % ในขณะที่ ที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ไม่มียีสต์รอดชีวิตเลย เมื่อตรวจวัดที่เวลา 24 ชั่วโมง

D'Amore และคณะ (1989) ทดลองผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 43 และ 45 °ซ โดยใช้ *S. diastaticus* NO.62 จากน้ำตาลกลูโคส 150 กรัม/ลิตร พบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นยีสต์มีการผลิตเอทานอลลดลง โดยผลิตเอทานอลได้ 65 60 และ 14 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

Banat และคณะ (1992) ทดลองผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 25 37 40 45 48 และ 50 °ซ พบว่า *K. marxianus* IMB1-IMB5 มีการอัตราเจริญจำเพาะสูงสุดอยู่ในช่วง 0.86-0.99 h^{-1} ที่อุณหภูมิ 40 °ซ และผลิตเอทานอลได้สูงสุด 6.5-6.8 % (w/v) ที่อุณหภูมิเดียวกันนี้ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 50 °ซ ทั้ง 5 สายพันธุ์ มีการเจริญและผลิตเอทานอลลดลง โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะเพียง 0.15-0.22 h^{-1} และผลิตเอทานอลได้ 5.1-5.5 % (w/v)

Kiran Sree และคณะ (2000) ทดสอบการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* SV1, *S. cerevisiae* SV2, *S. cerevisiae* SV3 และ *S. cerevisiae* SV4 ที่อุณหภูมิ 30

35 40 42 และ 44 °ซ ยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีปริมาณมวลเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 °ซ สูงกว่าที่อุณหภูมิอื่น คือมีมวลเซลล์ 3 2.5 3.2 และ 2.6 กรัม/ลิตร เท่ากันทั้ง 2 อุณหภูมิ และมีมวลเซลล์ต่ำสุดที่อุณหภูมิ 44 °ซ คือ 0.8 0.4 0.9 และ 0.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งการผลิตเอทานอลก็เป็นไปในทางเดียวกัน คือ ผลิตได้สูงสุดที่ 30 °ซ คือ 66 48 75 และ 52 กรัม/ลิตร และผลิตได้เพียง 40 20 58 และ 23 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 44 °ซ จากน้ำตาลกลูโคส 150 กรัม/ลิตร

3.7 ปริมาณของออกซิเจน

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ทั้งนี้นอกจากออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายและเป็นองค์ประกอบของไซโตรโครมในกระบวนการลูกโซ่หายใจแล้ว (Spencer *et al*., 1997) ยังเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันพันธะคู่ และสเตอรอลของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งช่วยให้ยีสต์ทนต่อความเป็นพิษของเอทานอลได้มากขึ้น (Walker, 1998) แต่กระบวนการผลิตเอทานอลต้องการออกซิเจนในปริมาณไม่มากนัก

Banat และคณะ (1992) พบว่า เมื่อใช้อัตราการเขย่า 250 รอบ/นาที *K. marxianus* IMB1-IMB5 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.86-0.99 h^{-1} เมื่อใช้อัตราการเขย่า 100 รอบ/นาที ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ผลิตเอทานอลได้ 6.7 6.4 6.5 6.5 และ 6.8 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ

3.8 เอทานอล

เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและผลิตเอทานอลของยีสต์นอกจากนี้มีผลให้ยีสต์ที่เจริญอยู่ในระยะ exponential มีอัตราการเจริญลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเอทานอลมีผลต่อการแบ่งเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA โปรตีน ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ ยับยั้งการหมักโดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายหรือมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป เหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวของไขมัน ยับยั้งการขนถ่ายสารอาหารเข้าสู่เซลล์ เพิ่มความเป็นพิษของออกซิเจน และอาจมีผลต่อเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) และ เฮกโซไคเนส (hexokinase) ซึ่งการยับยั้งจะรุนแรงขึ้นเมื่อระดับของอุณหภูมิและความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้น (สาวิตรี, 2540; Walker, 1998)

Kiransree และคณะ (2000) รายงานว่า *S. cerevisiae* SV3 ทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้ 4-12 % (w/v) ที่เอทานอลเข้มข้น 4 % (w/v) ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 1.9 กรัม/ลิตร และผลิตเอทานอลได้ 1.2 % (w/v) ซึ่งการเจริญและผลิตเอทานอลลดลง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเอทานอลเข้มข้น 12 % (w/v) คือ ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 1.5 กรัม/ลิตร และมีการผลิตเอทานอลเพียง 0.95 % (w/v)

3.9 สารอื่น

การเจริญและการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงของยีสต์ต้องการธาตุอาหารบางอย่างเพิ่มเพื่อรักษาเซลล์ให้สามารถเจริญได้ ธาตุเหล่านั้นคือ โคลีน คาร์นีตีน ลูซีน แมงกานีส เหล็ก (สาวิตรี, 2540) ซึ่งยีสต์สามารถใช้ฟอสฟอรัสในรูปของไดไฮโดรเจนฟอสเฟตได้ดี นอกจากนี้ ธาตุอื่น เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม สังกะสี และทองแดง ช่วยให้การเจริญของยีสต์ดีขึ้น (วิลาวัณย์, 2539)

Dombek and Ingram (1986) พบว่าการเติมแมกนีเซียม 0.5 mM ช่วยให้การเจริญในระยะ exponentail นานขึ้น ทำให้ให้ยีสต์มีมวลชีวภาพเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการใช้น้ำตาลกลูโคสได้เร็วขึ้น และมีผลผลิตเอทานอลสูงกว่าการไม่เติมแมกนีเซียม ซึ่งบทบาทของแมกนีเซียมเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในช่วงกว้าง

นอกจากนี้ Brady และคณะ (1995a) พบว่า การเติมแมงกานีส 1 mM ในขั้นตอนของการเตรียมเอนไซม์ส่งเสริมให้การผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงเพิ่มขึ้น เนื่องจากแมงกานีสช่วยให้เอนไซม์ β-galactosidase มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 45 $^{\circ}$ซ เพิ่มขึ้น

Gough และคณะ (1996) พบว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.567 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.288 กรัม/ลิตร และน้ำมันจากเมล็ดแฟล็กส์ 0.36 % ช่วยให้ *K. marxianus* IMB3 มีอัตราการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 7.4 % เป็น 8.5 % (w/v) และเป็นไปได้ว่ากรดไขมันในน้ำมันจากเมล็ดแฟล็กส์ (line seed oil) ถูกนำไปใช้ซ่อมแซมเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ยีสต์ทนต่อเอทานอลเพิ่มขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เก็บรวบรวมเชื้อยีสต์ที่เป็นสายพันธุ์ทนร้อน
2. คัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนที่ผลิตเอทานอลได้ดี
3. ศึกษาสมบัติบางประการของยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนที่คัดเลือกได้เพื่อการผลิตเอทานอล
4. ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเจริญและกระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่คัดเลือกได้