บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

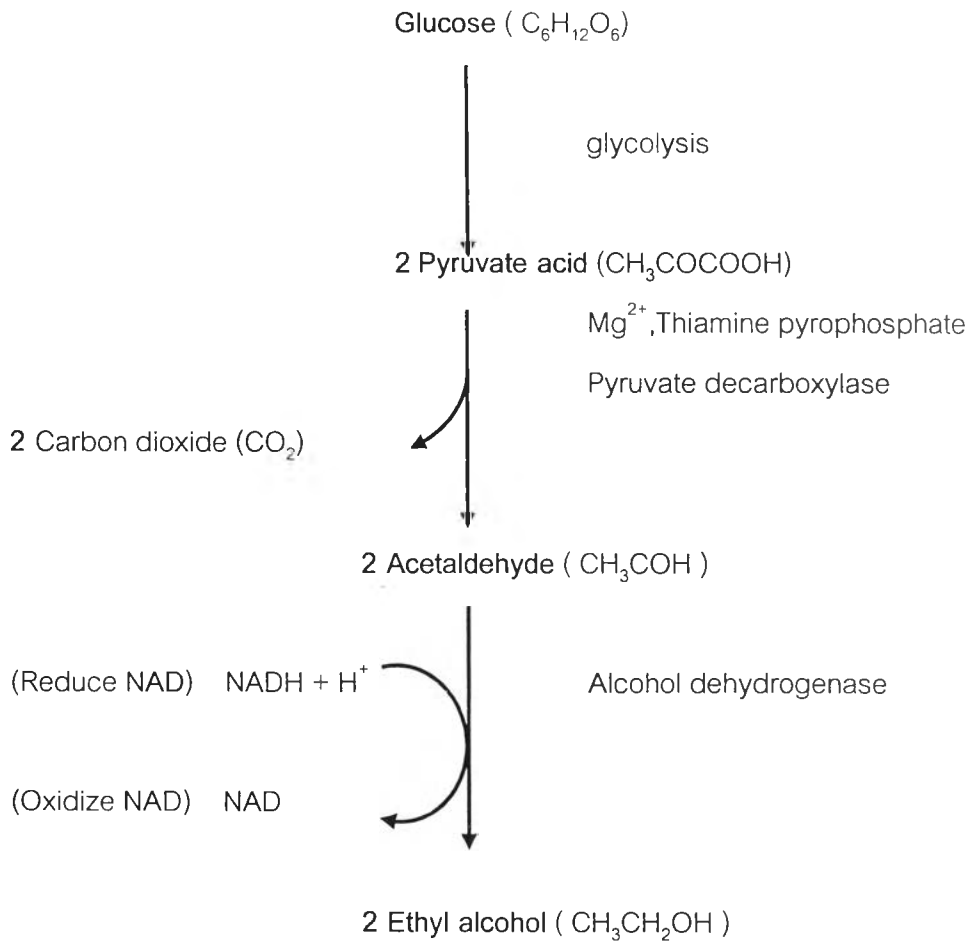
แนวคิดและทฤษฎี

2.1 เอทานอล

เอทานอล (Ethanol) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นสารอินทรีย์ มีสูตรทางเคมี เป็น C_2H_5OH น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46.07 จุดเดือดประมาณ 78 องศาเซลเซียส มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่ายให้เปลวไฟสีน้ำเงินที่ไม่มีควัน และปกติสามารถรวมตัวกับ น้ำ อีเทอร์ หรือคลอโรฟอร์มได้ทุกส่วน (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2529)

เอทานอลที่ได้มากจากกระบวนการหมักจากสิ่งมีชีวิตประเภทจุลินทรีย์ หรือเรียกว่า ไบโอเอทานอล(Bioethanol) จะเป็นสารประเภทเมทาบอไลท์ชนิดปฐมภูมิ (Primary metabolite) คือ เป็นสารที่ผลิตพร้อมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ กระบวนการหลักๆในการผลิตเอทานอลจากเชื้อจุลินทรีย์ เริ่มจาก การที่จุลินทรีย์ กินอาหารที่อยู่ในรูปน้ำตาลที่มันสามารถนำไปใช้ได้เข้าไปในตัว และเปลี่ยนให้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารอื่นๆต่อไป ขั้นตอนนี้เรียกว่า แซคคาริฟิเคชั่น หรือ ไฮโดรไลซีส (Saccharification or Hydrolysis) หลังจากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารที่ได้จาก ขบวนการแซคคาริฟิเคชั่น ให้เป็นสารทั้งที่มีความจำเป็นและไม่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของตัวจุลินทรีย์เอง โดยจะเรียกกระบวนการนี้ว่า การหมัก (Fermentation) และเอทานอลก็เป็นสารตัวหนึ่งที่ได้จากการหมักนี้เอง

จุลินทรีย์บางชนิดมีกลไกล ทำให้น้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม เช่น กลูโคส เฮกโซส เปลี่ยนไปเป็นสารอินเตอร์มิเดียส ต่างๆ อินเตอร์มิเดียสตัวที่สำคัญตัวหนึ่งคือ ไพรูเวท (Pyruvate) ซึ่งสารที่มีคาร์บอน 3 อะตอม หลังจากนั้นจะมีกลไกลทำให้ ไพรูเวทเสียคาร์บอนไดออกไซด์ออกไป 1 โมเลกุล และกลายเป็น อะเซททอลดีไฮด์ (Acetaldehyde) ต่อจากนั้น อะเซททอลดีไฮด์ จะถูกริดิวซ์ด้วย นิโคตินามายอะดีนินไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต หรือ เอนเอดีเอช (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADH) ให้กลายเป็นเอทานอล (มนตรี จุฬาวัฒนทล, 2543) ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงวิถีการเกิดเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส

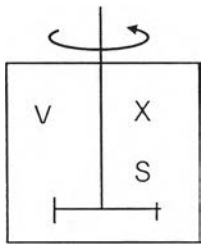
2.2 กระบวนการหมัก (Fermentation)

มีผู้ให้คำนิยามของกระบวนการหมักไว้หลายๆคำนิยาม โดยส่วนใหญ่แต่ละนิยามจะขึ้นอยู่กับลักษณะงานที่ผู้นิยามทำอยู่เช่น ในทาง ชีวเคมี นิยามของการหมัก จะหมายถึง การสร้างพลังงานจากกระบวนการย่อยสารอินทรีย์ หรือ ในทางอุตสาหกรรม การหมักจะหมายถึงกระบวนการผลิตใดๆก็ตาม ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำนวนมากโดยจะครอบคลุมทั้งกระบวนการใช้และไม่ใช้ออกซิเจน

สามารถแบ่งประเภทของการหมักตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้ได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) และการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (fed-batch fermentation) ในงานวิจัยนี้จะสนใจกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและการหมักแบบต่อเนื่องเท่านั้น

2.2.1 การหมักแบบไม่ต่อเนื่องหรือแบบกะ (Batch Fermentation)

การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง เป็นกระบวนการหมักที่ทำโดยเชื้อจุลินทรีย์ในระบบปิดมีปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจำกัด และอาจแสดงเป็นรูปแบบจำลองได้ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงภาพจำลองของถังปฏิกรณ์แบบไม่ต่อเนื่อง

สามารถเขียนเป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เบื้องต้นของการเจริญเติบของจุลินทรีย์ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่องได้ คือ

จากสมการสมดุลมวลสาร :

{อัตราการสะสมในระบบ} = {อัตราการไหลเข้าสู่ระบบ} - {อัตราการไหลออกจากระบบ}
+ {(+) อัตราการเกิดขึ้น หรือ (-) อัตราการหายไป จากระบบ} (1)

สมดุลสับสเตรท :

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_0 - FS - \frac{\mu XV}{Y_{X/S}} \qquad (2)$$

เนื่องจากระบบมีปริมาตรคงที่ จึงสามารถนำค่า V ไปหารสมการ (2) ตลอดทั้งสมการและทำการจัดรูปสมการจะได้

$$\frac{dS}{dt} = \frac{FS_0}{V} - \frac{FS}{V} - \frac{\mu X}{V} \qquad (3)$$

สมดุลเซลล์ :

$$\frac{d(XV)}{dt} = FX_0 - FX + \mu XV \qquad (4)$$

เนื่องจากระบบมีปริมาตรคงที่ สามารถนำ V ไปหารสมการ (3) ตลอดทั้งสมการ และจัดรูปสมการจะได้

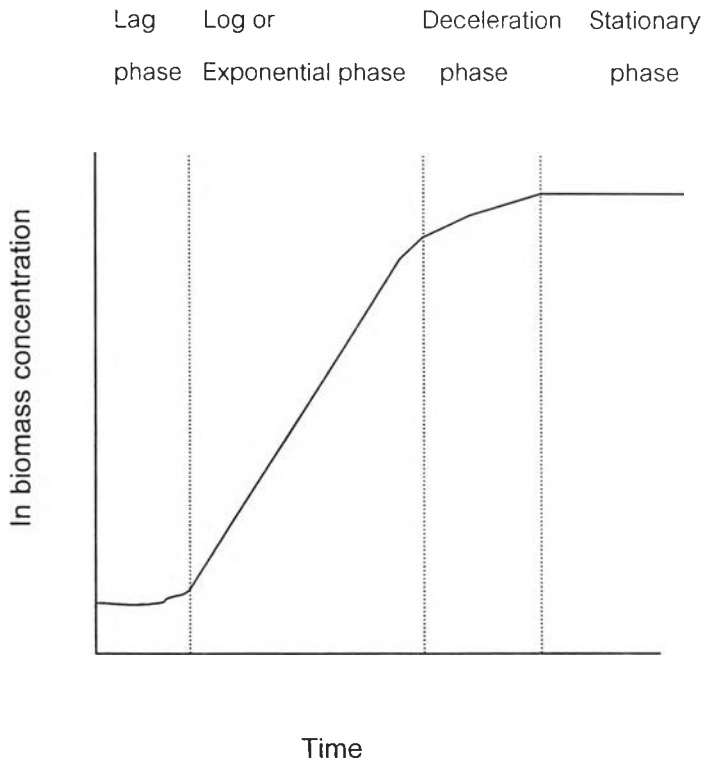
$$\frac{dX}{dt} = \frac{FX_0}{V} - \frac{FX}{V} + \mu X \qquad (5)$$

การหมักแบบไม่ต่อเนื่องนี้จะไม่มีสารเข้าและออกจากระบบในระหว่างการหมัก เพราะฉะนั้นจากสามการ (3) และ (5) อัตราการป้อนสารอาหารจะมีค่าเป็น ศูนย์ ดังนั้นจะได้

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu X}{Y_{X/S}} \qquad (6)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \qquad (7)$$

กระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องนี้จะทำให้จุลินทรีย์มีรูปแบบการเจริญดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในระบบหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

เมื่อใส่จุลินทรีย์ลงอาหาร ระยะแรกเซลล์จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน เรียกระยะนี้ว่าระยะปรับตัว(Lag phase) เนื่องจากเป็นระยะที่เชื้อกำลังปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ ระยะที่ใช้ในการปรับตัวนี้จะมากหรือน้อยมีผลมาจากหลายปัจจัย เช่น ชนิด อายุ ปริมาณของตัวจุลินทรีย์เองตลอดจนปริมาณ และชนิดของสภาพแวดล้อม หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นตามลำดับ จนกระทั่งเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (Log หรือ Exponential phase) ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีการปรับตัวใช้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่แล้ว จุลินทรีย์จะมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเป็นทวีคูณกับเวลาอย่างต่อเนื่องและในระยะนี้เองจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงสุดและคงที่ (Balance growth) การเจริญของจุลินทรีย์ในระยะ log phase นี้สามารถเขียนเป็นสมการ (7) และเมื่อทำการอินทิเกรต สมการ (7) จะได้

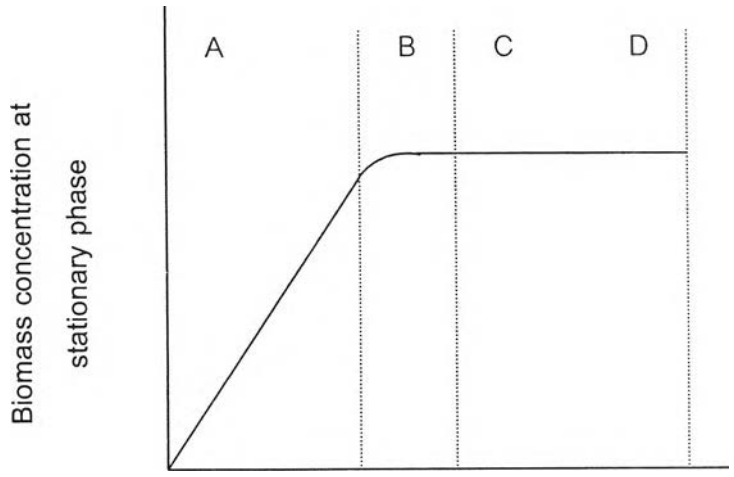
$$X_t = X_0 e^{t\mu} \qquad (8)$$

เมื่อใส่ Natural logarithm (8) จะได้

$$\ln X_t = \ln X_0 + t\mu \qquad (9)$$

ดังนั้นในช่วง log phase เมื่อเขียนกราฟระหว่าง เทอม $\ln X_t$ กับ เวลา จะได้กราฟเส้นตรง ซึ่งมีค่าความลาดเอียง (slope) เท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติ สภาพแวดล้อมที่ขึ้นขณะการหมักจะมีผลต่อเนื่องกับการเจริญของจุลินทรีย์ โดยมีปัจจัยสำคัญเช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของสารอาหาร และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้นต่างกัน พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์สูงสุดที่ระยะ Stationary phase กับความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น สามารถแบ่งได้เป็น 3 โซนคือ A-B, B-C, C-D ดังแสดงในรูปที่ 2.4



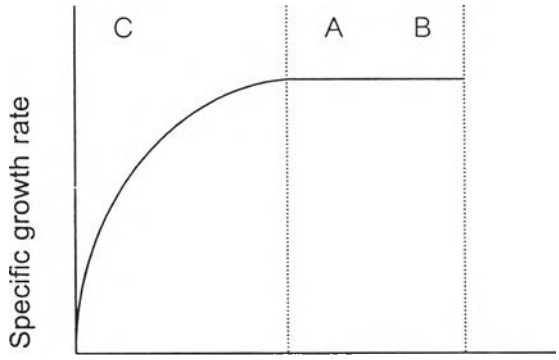
รูปที่ 2.4 แสดงผลของความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้นต่อปริมาณเซลล์สูงสุด

ในโซน A-B ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ stationary phase จะเพิ่มเป็นอัตราส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารอาหารที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$X = Y(S_0 - S) \qquad (10)$$

ในช่วงโซน A-B การเจริญเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์จะหยุดลงเมื่อ S มีค่าเป็นศูนย์ ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการ (10) ในการประมาณค่าปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นจากสารอาหารที่ใช้ไปได้ ในโซน B-C แม้ว่าความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้จะเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณเซลล์ที่ stationary phase จะเพิ่มขึ้นในอัตราที่ลดลงตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากการสะสมสารพิษที่เกิดจากการเจริญของเซลล์นั่นเอง และการสะสมพิษนี้เมื่อเพิ่มขึ้นมากถึงจุดหนึ่งแล้วจะทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารอีกก็ตาม ดังแสดงในโซน C-D

นอกจากนี้การที่จุลินทรีย์ มีอัตราการเจริญลดลงจนกระทั่งหยุดเจริญเนื่องจากอาหารหมดยังสามารถอธิบายได้ในรูปความสัมพันธ์ระหว่าง μ และความเข้มข้นของสารอาหารที่เหลือ เช่นในสมการของ Monod (11) และรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงผลของความเข้มข้นของสารอาหารที่เหลือต่ออัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{KS + S} \qquad (11)$$

เมื่อ Ks = ค่าคงที่ในการใช้สารอาหาร (substrate utilization constant) ซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสารอาหารเมื่อ μ เท่ากับ ½ μ_{max} และเป็นค่าที่แสดงสัมพรรคภาพ (affinity) ของจุลินทรีย์ต่อสารอาหารอีกด้วย

จากรูปที่ 2.5 โซน A-B จะอยู่ในช่วง log phase ซึ่งเป็นช่วงที่มีความเข้มข้นของสารอาหารมากเกินพอและจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงสุด ส่วนโซน C-A จะอยู่ในช่วง deceleration phase ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของสับสารอาหารลดลง จึงมีอาหารไม่เพียงพอที่จะทำให้จุลินทรีย์เจริญในอัตราสูงสุดได้

ในปี ค.ศ. 1975 Pirt ได้อธิบายจลนพลศาสตร์ของการเกิดผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในรูปของ growth-linked product และ non-growth-linked product โดย growth-linked product หมายถึงสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในขณะที่กำลังเจริญเพิ่มจำนวน ซึ่งมีความหมายเทียบเท่ากับสารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ ส่วน non-growth-linked product จะมีความหมายเทียบเท่ากับสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ จลนพลศาสตร์ของการเกิด growth-linked product สามารถเขียนในรูปสมการได้ดังนี้คือ

จากสมการสมดุลของผลิตภัณฑ์ :

$$\frac{d(PV)}{dt} = FP_0 - FP - q_p XV \qquad (12)$$

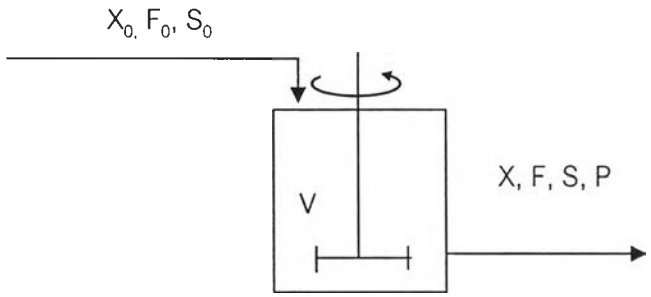
เนื่องจากปริมาตรคงที่และไม่มีการไหลเข้าไหลออกของผลิตภัณฑ์ จากสมการ (12) จะได้

$$\frac{dP}{dt} = q_P X \qquad (13)$$

การหมักแบบไม่ต่อเนื่องนี้ สามารถใช้ได้ทั้งในการผลิตมวลเซลล์ และผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากจุลินทรีย์ โดยในการผลิตมวลเซลล์ ควรใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนได้มากที่สุด ในส่วนของการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากจุลินทรีย์ ก็ควรใช้สภาวะที่เอื้อให้การหมักอยู่ในช่วงที่จุลินทรีย์ผลิตสารนั้นๆออกมายาวนานที่สุด

2.2.2 **การหมักแบบต่อเนื่อง** (Continuous Fermentation)

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบไม่ต่อเนื่อง ถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบบางอย่างของอาหารจำกัดการเจริญของจุลินทรีย์ และการเจริญไม่ถูกจำกัดด้วยสารพิษแล้ว การเจริญของจุลินทรีย์ในระยะ Log phase จะสามารถยืดระยะเวลาให้นานขึ้นได้ โดยการเติมอาหารใหม่ลงไปเรื่อยๆ จนกว่าจะเต็มภาชนะ แต่ถ้ามีการปล่อยอาหารเก่าออกจากภาชนะจำนวนหนึ่งและเติมอาหารใหม่เข้าไปแทนที่ในปริมาณเท่าเดิม ก็จะทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง ระบบการหมักแบบต่อเนื่องนี้สามารถแสดงเป็นรูปภาพแบบง่ายได้ดังในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงภาพจำลองของถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

ถ้ามีการปล่อยอาหารเก่าออกและเติมอาหารใหม่เข้าสู่ภาชนะอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราที่เหมาะสม ก็จะทำให้เกิดสภาวะคงที่ (Steady state) ขึ้น กล่าวคือปริมาณเซลล์ที่เกิดใหม่จะเท่ากับปริมาณเซลล์ในอาหารเก่าที่ปล่อยออกไปจากภาชนะ สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของอาหารเข้าสู่ภาชนะ กับปริมาตรของภาชนะ ที่เรียกว่า อัตราการเจือจาง (dilution rate, D) สามารถเขียนสมการได้ดังนี้

จากสมการสมดุลมวลสาร :

{อัตราการสะสมในระบบ} = {อัตราการไหลเข้าสู่ระบบ} - {อัตราการไหลออกจากระบบ}
+ {(+) อัตราการเกิดขึ้น หรือ (-) อัตราการหายไป จากระบบ}

ถ้ากำหนดให้ อัตราการป้อนสารอาหารเริ่มต้นเท่ากับอัตราการไหลออกของสารอาหาร, สมดุลสารอาหาร (3) สมดุลเซลล์ (5) และสมดุลผลิตภัณฑ์ (12) และ D = F/V จากนั้นแทนค่าอัตราการเจือจางลงใน (3) และ (5) จะได้

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \qquad (14)$$

$$\frac{dX}{dt} = D(X_0 - X) + \mu X \qquad (15)$$

$$\frac{dP}{dt} = DP + q_P X \qquad (16)$$

แต่ที่สภาวะคงที่ ความเข้มข้นของเซลล์จะคงที่ ดังนั้น dx/dt = 0 (อัตราการสะสมจะมีค่าเท่ากับศูนย์) และ เซลล์เริ่มต้นมีค่าน้อยมาก ดังนั้นจากสมการ (15) จะได้

$$0 = D(0 - X) + \mu X$$

ดังนั้น μX จึงเท่ากับ DX อาจจะสรุปได้ว่า

$$D = \mu \qquad (17)$$

หรือกล่าวได้ว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่สามารถทำได้คือ เท่ากับอัตราการเจือจาง ในทำนองเดียวกันที่สภาวะคงที่ dS/dt = 0 (อัตราการสะสมจะมีค่าเท่ากับศูนย์) เราสามารถหาความเข้มข้นของสารอาหารที่สภาวะคงที่ (Sss) ได้จาก สมการ (13) จะได้

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu X_{SS}}{Y_{X/S}}$$

$$0 = DS_0 - S_{SS} - \frac{\mu X_{SS}}{Y_{X/S}}$$

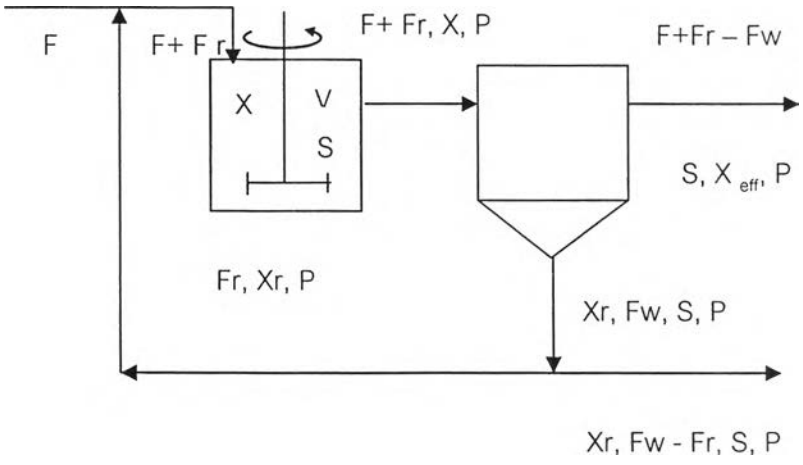
และเนื่องจาก D = μ จะได้

$$S_{SS} = S_0 - \frac{X_{SS}}{Y_{X/S}} \qquad (18)$$

2.2.3 **การหมักต่อเนื่องแบบมีการเวียนกลับเซลล์** (Continuous Fermentation with cell recycle)

การหมักต่อเนื่องแบบเวียนกลับเซลล์ เป็นกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องที่มีการนำบางส่วนหรือทั้งหมดของเซลล์ที่ได้จากระบบกลับมาใช้ในกระบวนการอีก หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ระบบป้อนย้อนกลับ(Feedback system) การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องโดยใช้ ระบบป้อนย้อยกลับ นี้ จะทำให้ได้มวลเซลล์ความเข้มข้นสูงมากกว่าเมื่อใช้ระบบหมักแบบธรรมดา ซึ่งวิธีการเพิ่มความเข้มข้นมวลเซลล์นี้ทำได้โดยจำกัดมวลเซลล์ที่ออกจากระบบ โดยอาจทำให้มวลเซลล์ในสายออกมีความเข้มข้นน้อยกว่ามวลเซลล์ในถังหมัก หรืออาจนำน้ำหมักในสายออก ไปผ่านกระบวนการแยกเซลล์ เช่น การตกตะกอน หรือการเหวี่ยง แล้วจึงนำเซลล์เข้มข้นที่แยกได้ใส่กลับเข้าไปในถังหมักอีกครั้ง ซึ่งนอกจากจะทำให้มวลเซลล์ในถังหมัก มีความเข้มข้นสูงขึ้นแล้วยังทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารที่เหลือน้อยลงกว่าในระบบการหมักแบบธรรมดา ซึ่งเป็นผลให้ได้ผลผลิตและมวลเซลล์สูงสุดเพิ่มขึ้น

ในกรณีใช้สารอาหารที่มีอัตราการเจือจางมากๆใน ระบบป้อนย้อนกลับ จะมีประโยชน์มากเพราะจะทำให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารอาหารได้ดีขึ้น ตัวอย่างเช่นการผลิตเบียร์ และการกำจัดน้ำเสีย นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับระบบที่มีสารอาหารหลายชนิดและสารอาหารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน เช่น ระบบกำจัดน้ำเสีย เป็นต้น ระบบการหมักต่อเนื่องแบบมีการเวียนกลับเซลล์นี้สามารถแสดงเป็นรูปภาพแบบง่ายได้ดังในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 แสดงภาพจำลองของถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องและมีการเวียนกลับเซลล์

สมมุติฐาน

1. ไม่มีเซลล์ในสายน้ำทิ้ง (X eff = 0)
2. ถังตกตะกอนเป็นถังแบบอุดมคติ
3. เชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงขณะตกตะกอน
4. ตะกอนทั้งหมดจะถูกเวียนกลับสู่ระบบ
5. ค่า yield factor คงที่

จากสมการสมดุลมวลสาร :

{อัตราการสะสมในระบบ} = {อัตราการไหลเข้าสู่ระบบ} - {อัตราการไหลออกจากระบบ}
+ {(+) อัตราการเกิดขึ้น หรือ (-) อัตราการหายไป จากระบบ}

สมดุลสารอาหาร :

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_0 - [(F + F_r - F_w)S + (F_w - F_r)S] - \frac{\mu XV}{Y_{X/S}} \qquad (19)$$

เนื่องจาก ปริมาตรคงที่ และตามสมมุติฐานจะได้

$$\frac{VdS}{dt} = FS_0 - FS - \frac{\mu XV}{Y_{X/S}} \qquad (20)$$

ให้อัตราการเจือจาง D = F/V และที่สภาวะคงที่ จะได้

$$D(S_0 - S) = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \qquad (21)$$

สมดุลเซลล์ :

$$\frac{d(XV)}{dt} = FX_0 + F_r X_r + \mu XV - F_w X_r + (F + F_r - F_w)X_{eff} \qquad (22)$$

เนื่องจาก ปริมาตรคงที่ และตามสมมุติฐานจะได้

$$\frac{d(XV)}{dt} = F_r X_r + \mu XV - F_w X_r \qquad (23)$$

$$\frac{d(XV)}{dt} = FrXr + \mu XV - (F + Fr)X \qquad (24)$$

ให้อัตราการเจือจาง D = F/V และที่สภาวะคงที่ จะได้

$$0 = \frac{F_r X_r}{V} + \mu X - \frac{(F + F_r)X}{V} \qquad (25)$$

ถ้าให้ a = Fr/F, b = Xr/X และ overall external dilution rate, D = F/ V จะได้

$$D = \frac{\mu}{1 - a(b-1)} \qquad (26)$$

จากสมการ (26) จะเห็นว่าถ้าความเข้มข้นเซลล์ในสายเวียนกลับมีมากกว่าสายที่ออกจากถังปฏิกรณ์, b>1 จะทำให้สามารถปฏิบัติงานที่อัตราการเจือจางสูงกว่าอัตราการเจริญจำเพาะโดยไม่เกิดการชะล้าง (Wash out) และถ้า เรา นำสมการ (21) และ (26) มารวมกัน จะสามารถหาอัตราการผลิตเซลล์ต่อ 1 หน่วยปริมาตรของถังปฏิกรณ์ ได้ดังนี้

$$\mu X = \frac{\mu Y_{X/S}(S_0 - S)}{1 - a(b-1)} \qquad (27)$$

จาก (26) จะเห็นได้ว่าอัตราการผลิตเซลล์ของระบบต่อเนื่องที่มีการเวียนกลับจะสูงกว่าระบบที่ไม่มีการเวียนกลับเนื่องมาจากเทอม $(1\text{-}a\ (b\text{-}1))^{-1}$ ถ้าเราตั้งสมมุติฐานให้ μ เป็นไปตามสมมุติฐานของ Monod คือ

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \qquad \text{หรือ}$$

$$S = \frac{K_S \mu}{\mu_{\max} - \mu} \tag{28}$$

แทน (26) ลงใน (28) จะได้

$$S = \frac{K_S D(1 - a(b-1))}{\mu_{\max} - D(1 - a(b-1))} \tag{29}$$

แทน (29) ลงใน (27) จะได้

$$X = \frac{Y_{X/S}}{(1 - a(b-1))} \left\{ S_0 - \frac{K_S D(1 - a(b-1))}{\mu_{\max} - D(1 - a(b-1))} \right\} \tag{30}$$

จะเห็นได้ว่าจากสมการ(29) และ (30) ระบบมีการใช้สารอาหารเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นซึ่งทำให้ระบบมีอัตราการผลิตสูงขึ้นตามไปด้วย (Bailey and Ollis, 1944)

สมดุลผลิตภัณฑ์ :

$$\frac{d(PV)}{dt} = FP_0 - [(F + F_r - F_w)P + (F_w - F_r)P] + q_P XV \tag{31}$$

และที่สภาวะคงที่ จะได้

$$0 = -FP + q_P XV \tag{32}$$

ดังนั้นสามารถหาปริมาณผลิตภัณฑ์ได้จากสมการ

$$P = \frac{q_P X}{D} \tag{33}$$

2.3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอทานอลสามารถผลิตได้จาก 2 กระบวนการใหญ่ๆ คือ จากกระบวนการสังเคราะห์จากสารเคมี จะเรียกเอทานอลที่ได้ว่า เอทานอลสังเคราะห์ (Synthetic ethanol) และ การผลิตโดยใช้วิธีการหมักโดยใช้สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก จะเรียกเอทานอลที่ได้ว่า ไบโอเอทานอล (bio-ethanol) ซึ่งเป็นที่นิยมมากกว่าประเภทแรก จากงานวิจัยหลายๆงานพบว่า สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่สามารถผลิตเอทานอลจะเป็นสิ่งมีชีวิตประเภท ยีสต์ แบคทีเรีย หรือแม้กระทั้ง แมลงบางชนิดก็สามารถสังเคราะห์เอทานอลขึ้นมาได้ (Takahashi, 1995) การพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลเกิดขึ้นมาอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาโดยสามารถจะสังเกตได้ว่ามีหลายๆงานวิจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้อง

จากการตรวจเอกสารสามารถแบ่งลักษณะงานที่ถูกนำมาใช้เพื่อพัฒนาการผลิตเอทานอลให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นได้ 2 ลักษณะใหญ่ๆคือ การสรรหาหรือการพัฒนาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้ดีขึ้น รวมทั้งหาสายพันธุ์ที่สามารถใช้วัสดุเหลือใช้หรือของเสียจากกระบวนการผลิตสินค้าและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ทั้งในภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมมาเป็นวัตถุดิบตั้งต้น เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตให้ต่ำลง และอีกประเภทหนึ่งของงานวิจัยที่ทำกันมาก คือ การออกแบบในพัฒนาระบบการผลิตให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

2.3.1 การศึกษาวิจัยในส่วนของการหาและการพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์

จากการศึกษาพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอทานอลได้ (ดังตัวอย่างในตารางที่ 2.1) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีทั้งที่พบได้ตามธรรมชาติและที่เกิดจากการพัฒนาและปรุงปรับพันธุกรรมจากมนุษย์ การปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลจากจุลินทรีย์นั้นมีหลายปัจจัยที่เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ประเภทของเชื้อจุลินทรีย์ เทคนิคหรือวิธีการผลิต รวมทั้งวัสดุที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผู้ทำการศึกษาอย่างมาก

โดยปกติแล้วจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะใช้สารประเภทน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเช่น กลูโคส เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล เพื่อเพิ่มความหลากหลายและการลดต้นทุนในการผลิต จึงมีนักวิจัยหลายๆท่านที่ทำการศึกษาหาวัสดุชนิดอื่นมาใช้ทดแทนกลูโคส เช่น กากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลมาเป็นวัตถุดิบตั้งต้น(Gough, 1998; Takamitsu, 1993; Ergum, 2000) สารจำพวกเซลลูโลส เช่น แกลบ ฟางข้าว เศษพืช เศษไม้ กระดาษเป็นต้น (Schell, 2004; Yu, 2003;Sharma, 2002; Sreenath, 2000; Nilsson, 2001; Stenberg, 2000; Nigam, 2001)

หางนม ซึ่งเป็นผลพลอยได้ในการผลิตเนย (Domingues, 2001; Leite, 2000; Ghaly, 1995) จากส่วนของน้ำและเนื้อจากผลไม้ เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้

Candida brassicae	*Candida psuedotropicalis*	*Candida shehatae*
Clostridium thermocellum	*Escherichia coli*	*Pichia stipitis*
Kluyveromyces lactis	*Kluyveromyces marxianus*	*Saccharomyces bayanus*
Saccharomyces cerevisiae	*Saccharomyces diastaticus*	*Zymomonas mobilis*
Saccharomyces sake		

2.3.2 การศึกษาวิจัยในส่วนของการพัฒนาการผลิต

สามารถแบ่งกระบวนการผลิตเอทานอลตามลักษณะของวิธีการหมักที่ใช้ได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง การหมักแบบต่อเนื่อง และการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง ที่ผ่านมาการหมักแบบไม่ต่อเนื่องจะได้รับความนิยมสูงเพราะง่ายและสะดวกต่อการปฏิบัติงาน แต่ต่อมาความต้องการเอทานอลมีมากขึ้นจนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องไม่สามารถผลิตเอทานอลได้ จึงได้มีแนวคิดที่จะปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิจัยที่ใช้ขบวนการผลิตแบบการหมักแบบต่อเนื่อง และการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องมากขึ้น นอกจากการแบ่งประเภทของการหมักตามวิธีการผลิต เรายังสามารถแบ่งประเภทตามลักษณะอุปกรณ์ที่ใช้ได้ อีกเช่น แบบถังกวน (CSTR) แบบ Packed-bed แบบ Fluidized-bed แบบ Airlift เป็นต้น

นอกจากทั้งสองส่วนที่กล่าวมาแล้วยังมีผู้ทำการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลให้ดีขึ้นโดยใช้เทคนิคที่แตกต่างกันไปโดยได้มีการรวมเทคนิคหรือระบบปฏิบัติการอื่นๆ อื่นๆเข้าไปในกระบวนการผลิตด้วย ดังเช่น Siva (1995) พบว่าการป้อนน้ำตาลเป็นช่วงๆจะช่วยเพิ่มผลผลิต และลดการยับยั้งของสารอาหาร Galy และคณะ(1995) พบว่าการใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่สูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญเติบโตและอัตราการผลิต เอทานอล Won-Chin lee และคณะ(1995)ใช้เชื้อ *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 โดยใช้น้ำตาลซูโครสเพื่อศึกษาการผลิตเอทานอล โดยได้เติมเอนไซม์อินเวอร์เตสที่ตรึงไว้ลงไปเพื่อช่วยใช้การไฮโดรไลซ์

น้ำตาลซูโครส ดีขึ้น พบว่าการสะสมของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโทส จะต่ำกว่าการหมักแบบที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ลงไป การ เกิดสารอื่นลดลง ทำให้เอทานอลเพิ่มขึ้นแบบต่อเนื่อง

Rosario (1998) พบว่าการเติม Zeolite NaY จะสามารถช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces bayanus* จากสารอาหารที่มีความเข้มข้นสูงๆได้ ที่เป็นเช่นนั้นอาจจะเป็นเพราะว่า Zeolite จะทำหน้าที่เป็นตัวค่าปรับความเป็นกรด เป็นด่าง (pH regulator) ทำให้ในถังปฏิกรณ์มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างประมาณ 3.7 – 3.8 ซึ่งสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่เชื้อ จะมีเมทตาบอลิสมดีที่สุด Callieri และคณะ (1996) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ *Zymomonas mobilis* และ *Saccharomyces sp.* พบว่าการหมักแบบใช้เชื้อทั้งสองผสมกันจะให้ผลดีที่สุด คือ สามารถผลิเอทานอลได้ 0.5 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลซูโครส และให้อัตราการผลิต 1.5 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง

Siva และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้ เชื้อ *Zymomonas mobilis* ที่ถูกตรึงไว้บนเม็ดเพคติน แล้วนำไปเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ 2 แบบคือแบบ เบดขยาย (Expanded Bed Reactor) และแบบถังกวน (Stirred Tank Bioreactor) พบว่า อัตราการหมักและผลผลิตที่ได้ในถังปฏิกรณ์ 2 แบบเบดขยาย จะสูงกว่าในถังปฏิกรณ์แบบถังกวน Roukas (1996) ศึกษาการผลิตเอทานอล โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทั้งที่ถูกและไม่ถูกตรึง จากกากน้ำตาล (หัวบีท) ที่ไม่ได้ทำการสเตอริไลซ์เป็นอาหาร ในระบบการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch) และแบบกึ่งต่อเนื่อง (Fed-Batch) พบว่าการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง จะให้ผลดีกว่าแบบไม่ต่อเนื่อง และถ้าเปรียบเทียบของผลการตรึงเซลล์จะพบว่าการตรึงเซลล์จะให้ผลที่ดีกว่าไม่ตรึงเซลล์

Hamid และคณะ (1996) ทำการศึกษาการผลิตเอทานอล โดยการนำ ชีวมวล และกากส่า (Stillage)เวียนกลับมาใช้ในระบบ พบว่าการ นำชีวมวลบางส่วนกลับมาใช้ จะช่วยลดการใช้กากน้ำตาล ลงไปได้ประมาณร้อยละ 8 และการนำเอากากส่าที่ดึงแอลกอฮอล์ออกไปแล้วกลับมาใช้จะทำให้สามารถลดปริมาณกากสุดท้ายลงได้ประมาณร้อยละ 13 - 47 ทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดลงได้ ในขณะที่จะได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ร้อยละ 2 - 7

Leeและคณะ (2000) ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจาก wood hydrolysate ใช้ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยหมักในถังปฏิกรณ์แบบ Internal Membrane Filtration และทำการสเตอริไลซ์ อาหารที่ 60 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ได้เป็น 76.9 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตสูงสุดที่ได้คือ 16.9 กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง ในขณะที่ผลที่ได้จากการหมักแบบกะ จะได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ได้เป็น 57-67 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตสูงสุดที่ได้คือ 0.3-1.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Zajani และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ถูกตรึงไว้บนเม็ดเซลลูโลส นำไปเลี้ยงในถัง

ปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบด พบว่าได้เอทานอลมีความเข้มข้นเฉลี่ย 42 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ประสิทธิภาพของถังปฏิกรณ์เป็นร้อยละ 84 และสามารถผลิตเอทานอลได้ 4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Sreenathan และคณะ (2000) ได้นำเชื้อ *Pichai stipits* และ *Candida Shehate* มาเลี้ยงใน wood hydrolysate ซึ่งจะประกอบด้วยน้ำตาลหลักๆดังนี้ กลูโคส ไซโลส อราบิโนส กาแล็กโทส และ แมนโนส พบว่า *C. Shehate* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดคือประมาณ 34 กรัมต่อลิตร และการใช้การเวียนกลับเซลล์จะช่วยลดเวลาในช่วง Lag phase ลง โดยค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมคือ 5.5-6 จะผลผลิตของเอทานอล เท่ากับ 0.41-0.46 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล