รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนากระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยสารช่วยทำละลาย เพื่อการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนากระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยสารช่วยทำละลายเพื่อการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร. โชคชัย วนภู

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2557-2558

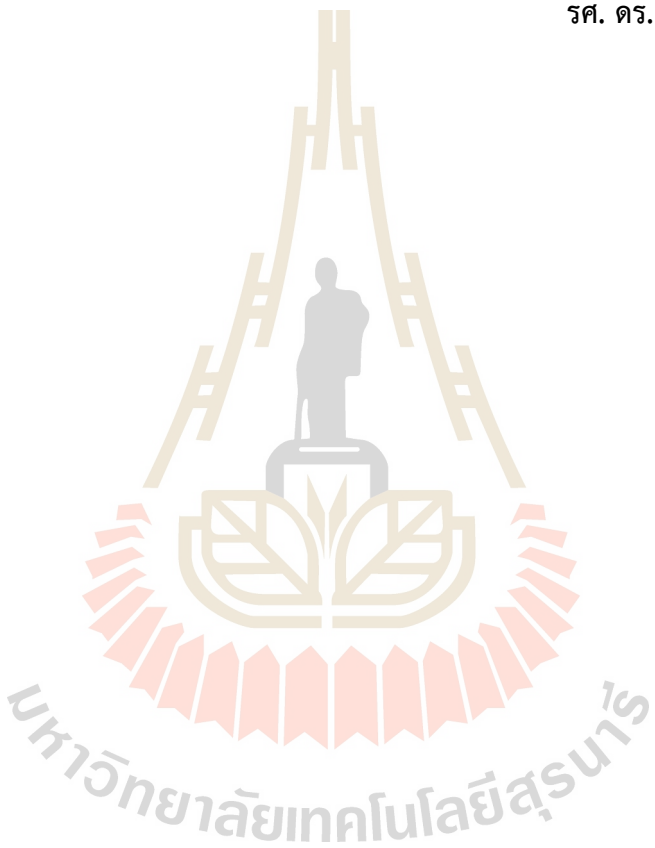
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

กระผมขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สนับสนุนทุนวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ นายฐปณวัชร์ หมื่นแจ้ง ที่ช่วยทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รศ. ดร. โชคชัย วนภู



บทคัดย่อ

การพัฒนากระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยสารช่วยทำละลาย เพื่อการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม

เอทานอล การหมัก สารช่วยทำละลาย

กากมันสำปะหลังเป็นกากของเหลือจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นหนึ่งในชีวมวลที่มีความสามารถสำหรับใช้ในการผลิตเอทานอล เนื่องจากมีแป้งและเส้นใยเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งสามารถเปลี่ยนให้เป็นเอทานอลได้ เนื่องด้วยวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยด้วยเอนไซม์ จึงได้นำโพลีเอทิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นต่างๆ มาใช้ในกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าความเข้มข้น 15 % w/v ของ PEG4000 สามารถช่วยผลิตน้ำตาลรีดิวส์ได้ 85.80 กรัมต่อลิตร จากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% w/v โดยใช้เอนไซม์ผสมของเซลลูเลสอะไมโลกลูโคซิเดส และพูลลูแลนเนส ที่สัดส่วน 1: 1: 1 (% v/v) ในกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและการหมักแยกกันในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำให้ได้เอทานอล 51.78 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่า yield ของเอทานอลที่ 0.32 กรัมต่อกรัมของกากมัน และมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ 3.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ที่ช่วง 6 ถึง 18 ชั่วโมง ระหว่างการหมัก) กระบวนการการเปลี่ยนกากมันสำปะหลังด้วยกระบวนการทางชีวภาพไปเป็นเอทานอลสามารถเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการ pre-treatment และกระบวนการ detoxification นอกจากนี้ ระบบเอนไซม์ผสมนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่มีความสำคัญกับเศรษฐกิจได้

ABSTRACT

Development of saccharification process of cassava residue using solubilizing agent for industrial ethanol production

Ethanol, Fermentation, solubilizing agent

Cassava pulp (CP), a by-product of the tapioca industry, is one of the potential starchy biomass resources that can be used for bioethanol production because it mainly contains starch and fiber which can be converted to ethanol. With the aim to improve the enzymatic hydrolysis efficiency, various molecular weights of polyethylene glycol (PEG) at different concentrations were applied to the enzymatic reaction. The 15% (w/v) addition of PEG4000 showed the reducing sugar production (85.80 g/L) by cellulase, amyloglucosidase (AMG), and pullulanase cocktail enzymes at a ratio of 1: 1: 1 (% v/v) from 16% (w/v) of cassava pulp. In the 5L fermenter of the simultaneous hydrolysis and fermentation (SHF) process, the ethanol production reached to 51.78 g/L which the ethanol yield was achieved at 0.32 g/g CP and the ethanol productivity was 3.4 g/L/h (from 6 h to 18 h of the fermentation period). These promising results indicated that the bioconversion of CP to ethanol is efficient, even without pre-treatment and detoxification process. Furthermore, this cocktail enzyme system is applicable for production of various bio-products of economic importance.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ค
สารบัญ.....ง
บทที่1 บทนำ
1.1 ความสำคัญของงานวิจัย.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....3
1.3 สมมุติฐานของการทดลอง.....4
1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของการศึกษา.....8
บทที่ 2 ทบทวนงานวิจัย.....11
บทที่ 3 วิธีการทดลอง.....18
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....27
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....65
เอกสารอ้างอิง.....66
ประวัติผู้แต่ง.....71

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1 ชุดการทดสอบการศึกษาผลของ $CaCl_2$ ต่อการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ โดยใช้กากมันที่ความเข้มข้น 16 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร.....22

ตารางที่ 3.2 ชุดการทดสอบการศึกษาผลของ debranching enzyme ต่อการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ โดยใช้กากมันที่ความเข้มข้น 16 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร.....23

ตารางที่ 3.3 ขั้นตอนการเติมเอนไซม์.....24

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังแห้ง.....28

ตารางที่ 4.2 ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตจากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนัก ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยแป้งและเส้นใยร่วมกับการเติมและไม่เติม 2 mM $CaCl_2$.....34

ตารางที่ 4.3 ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ สูตรเดี่ยวและสูตรผสมในขั้นตอนแรก และตามด้วยเอนไซม์ Termamyl SC และ AMG 300L 37

ตารางที่ 4.4 ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียวหรือแบบสองขั้นตอนของการเติมเอนไซม์.....40

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ 4.5 ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 100-600 กรัมต่อลิตร.....43

ตารางที่ 4.6 ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% ด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 50-350 กรัมต่อลิตร.....46

ตารางที่ 4.7 ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% ด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 50-350 กรัมต่อลิตร ในกระบวน การหมักแบบ SHF.....48

ตารางที่ 4.8 ค่า yield ของเอทานอลที่ผลิตได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นที่ 16% ด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 50-350 กรัมต่อลิตร ในกระบวนการหมักแบบ SHF.....49

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของเอทานอล.....12

รูปที่ 2.2 การผลิตเอทานอลจากเชื้อเพลิงโลก ในปี พ.ศ. 2558 (ประเทศ พันล้านลิตร, ส่วนแบ่งการผลิตทั่วโลก).....13

รูปที่ 2.3 ในการสังเคราะห์แสง อ้อยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ (H_2O) และพลังงาน จากแสงอาทิตย์ เพื่อผลิตน้ำตาลและโพลีแซคคาไรด์ และปลดปล่อยออกซิเจน (O_2) ออกสู่ชั้นบรรยากาศ หลังจากการเก็บเกี่ยวและหีบอ้อย น้ำตาลจะถูกหมักโดยยีสต์และเปลี่ยนเป็นเอทานอล ซึ่งจะถูกแยกออกโดยการกลั่นและใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพในรถยนต์ การเผาผลาญเอทานอลทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่กลับสู่ชั้นบรรยากาศทำให้เกิดเป็นวัฏจักร.....14

รูปที่ 2.4 กระบวนการหมักเอทานอล 15

รูปที่ 2.5 ส่วนประกอบของชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลส.....17

รูปที่ 4.1 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 4%, 8%,12%, 16%, 20% and 24% w/v โดยเอนไซม์ Termamyl SC และ AMG 300L.....29

รูปที่ 4.2 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตจากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนัก ด้วยเอนไซม์ย่อยแป้ง ได้แก่ Termamyl SC, AMG 300L และ Promozyme D2 ร่วมกับการเติม/ไม่เติม 2 mM $CaCl_2$.....32

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ 4.3 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตจากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนัก ด้วยเอนไซม์ย่อยเส้นใย ได้แก่ xylanase, hemicellulase และ cellulase ร่วมกับการทำงานของเอนไซม์ Termamyl SC และ AMG 300L ร่วมกับการเติม/ไม่เติม2 mM $CaCl_2$.....33

รูปที่ 4.4 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนักที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์สูตรเดี่ยวและสูตรผสมในขั้นตอนแรก และตามด้วยเอนไซม์ Termamyl SC และ AMG 300L 36

รูปที่ 4.5 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนักที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียวหรือแบบสองขั้นตอนของการเติม เอนไซม์.....39

รูปที่ 4.6 ผลของการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 100-600 กรัมต่อลิตร ในการย่อยกากมัน สำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ด้วยเอนไซม์สูตรผสมของ cellulase: pullulanase: AMG ที่สัดส่วน 1: 1: 1 (% โดยปริมาตร).....42

รูปที่ 4.7 ผลของการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 50-350 กรัมต่อลิตร ในการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% w/v เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ โดยเอนไซม์สูตรผสมของ cellulase: pullulanase: AMG ที่สัดส่วน of 1: 1: 1 (% v/v).....45

รูปที่ 4.8 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG1000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร.....50

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ 4.9 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG2000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร.....51

รูปที่ 4.10 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร.....52

รูปที่ 4.11 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร.....53

รูปที่ 4.12 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG1000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร.....54

รูปที่ 4.13 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG2000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร.....55

รูปที่ 4.14 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร.....56

รูปที่ 4.15 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร.....57

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ 4.16 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG1000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร.....58

รูปที่ 4.17 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG2000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร.....59

รูปที่ 4.18 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร.....60

รูปที่ 4.19 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร.....61

รูปที่ 4.20 การเจริญ การใช้น้ำตาลรีดิวส์ และผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในกระบวนการหมักแบบ SHF ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร.....63

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของงานวิจัย

ประเทศไทยมีการส่งเสริมการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ตั้งแต่ปี 2544 จนถึงปัจจุบัน ปริมาณการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ (รวมแก๊สโซฮอล์ E10 ออกเทน 91, แก๊สโซฮอล์ E10 ออกเทน 95, แก๊สโซฮอล์ E20 ออกเทน 95 และแก๊สโซฮอล์ E85) เพิ่มขึ้นเป็น 11.5 ล้านลิตร/วัน (ข้อมูลจากกรมพลังงานทดแทน และอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน 2554) โดยที่แนวโน้มการผลิตเอทานอล สำหรับใช้ผลิตแก๊สโซฮออล์สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากส่วนต่างระหว่างราคาน้ำมันเบนซินและน้ำมันแก๊สโซฮอล์ได้เพิ่มสูงขึ้นมาก ทำให้ประชาชนหันไปนิยมใช้น้ำมัน E10 เนื่องจากมีราคาถูก อีกทั้งรัฐบาลได้ปรับลดอัตราภาษีสรรพสามิตสำหรับรถยนต์ E20 ลง 5 % เมื่อวันที่ 9 พฤศจิกายน 2550 และมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2551 และเพื่อสนับสนุนการใช้น้ำมันที่มีส่วนผสมของเอทานอลเพิ่มมากขึ้นไปอีก คณะรัฐมนตรีได้มีมติเมื่อวันที่ 3 มิถุนายน 2551 เห็นชอบมาตรการภาษีเพื่อสนับสนุนการใช้น้ำมัน E85 เป็นการเพิ่มเติม คือ 1) ยกเว้นอากรขาเข้าชิ้นส่วนสำหรับรถยนต์ E85 ที่มีลักษณะเฉพาะและเป็นอุปกรณ์หลักเพื่อปรับเปลี่ยนมาใช้น้ำมัน E85 และยังไม่มีผลิตในประเทศ เป็นการชั่วคราว 3 ปี และ 2) ลดอัตราภาษีสรรพสามิตน้ำมัน E85 จากเดิม 3.6850 บาท/ลิตร เหลือ 2.5795 บาท/ลิตร

อย่างไรก็ดีปัญหาอุปสรรคของการส่งเสริมการใช้น้ำมันแก๊สโซฮออล์ ในส่วนของการผลิต เอทานอล คือ ปัญหาด้านการขาดแคลนวัตถุดิบที่มีราคาถูก และราคาวัตถุดิบ เช่น มันสำปะหลัง กากน้ำตาล มีราคาสูงขึ้น ซึ่งแนวทางการแก้ไขจึงจำเป็นต้องมีการส่งเสริมการปลูกมันสำปะหลัง อ้อย หรือ ส่งเสริมการปลูกพืชพลังงานอื่นๆ ที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล เช่น ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น จากการวิเคราะห์สถานภาพของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแก๊สโซฮอลล์ ได้แก่ กากน้ำตาล อ้อย และมันสำปะหลังนั้น อ้อยและกากน้ำตาลมีความสัมพันธ์กันในด้านปริมาณ ปัจจุบันอ้อยมีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 6 ล้านไร่ มีปริมาณอ้อยประมาณ 60 ล้านตัน/ปี ซึ่งยังไม่เพียงพอกับการความต้องการของโรงงานน้ำตาล ทั้งนี้ปริมาณกากน้ำตาลมีสัดส่วนประมาณร้อยละ 5 ของอ้อยสด (หรือ

ประมาณ 3 ล้านตัน/ปี) ขณะที่ความต้องการกากน้ำตาลในประเทศแต่ละปีมีประมาณ 1.5 ล้านตัน ที่เหลืออีกประมาณ 1.5 ล้านตันใช้สำหรับส่งออก ซึ่งถ้าไม่มีการส่งออกกากน้ำตาลจะสามารถนำกากน้ำตาลนั้นมาผลิตเอทานอลได้ประมาณ 0.8 ล้านลิตร/วัน แต่ราคากากน้ำตาล ณ ปัจจุบันมีราคาสูงประมาณ 4,800-5,200 บาท/ตัน ทำให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลสูงจนโรงงานไม่สามารถนำมาผลิตเอทานอลได้

จากข้อมูลที่ผ่านมาพบว่าโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ เช่น บ.ไทยง้วน แอลกอฮอล์ หรือ บ.อินเตอร์เนชั่นแนลแก๊สโซฮอล์ คอร์เปอร์เรชัน ยังทำการผลิตได้ไม่เต็มที่ ทั้งนี้อาจมาจากสาเหตุหลายประการ แต่ที่เห็นได้ชัดคือ ปัญหาในการจัดหาวัตถุดิบ กล่าวคือที่กำลังการผลิตเอทานอล 100,000 ลิตรต่อวัน จะมีความต้องการหัวมันสดประมาณ 600 ตันต่อวัน ซึ่งมีมูลค่าค่อนข้างสูงในแต่ละวัน และคิดเป็นความต้องการประมาณ 75% ของความต้องการหัวมันสดของโรงงานแป้งมันสำปะหลังขนาดใหญ่ (200 ตันแป้งต่อวัน หรือเทียบเท่า 800 ตันหัวมันสดต่อวัน) การจัดหาวัตถุดิบในปริมาณมาก จึงจำเป็นต้องรวบรวมมาจากแหล่งอื่นๆ ที่ไกลออกไป ดังนั้นการสร้างโรงงานเอทานอลโดยใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ จำเป็นต้องพิจารณาถึงปัจจัยด้านวัตถุดิบเป็นสำคัญ วัตถุดิบที่น่าจะจัดการได้ง่ายกว่าในกรณีโรงงานเอทานอลจากมันสำปะหลัง จึงน่าจะเป็นมันเส้นที่สามารถเก็บไว้ได้นานกว่าหัวมันสด อย่างไรก็ตาม มันเส้นมีต้นทุนหรือราคาสูงกว่าด้วย

สำหรับมันสำปะหลังพบว่า มีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 6.5 ล้านไร่ ผลผลิตเฉลี่ย 3 ตัน/ไร่ ประมาณการได้ว่าผลผลิตของประเทศในปี 2552 จะมีประมาณ 20 ล้านตัน (หัวมันสด) ซึ่งปริมาณความต้องการใช้มันสำปะหลังมีเพียง 16 ล้านตันในการผลิตแป้ง มันเส้น มันอัดเม็ด ที่เหลือ 4 ล้านตันสามารถนำมาผลิตเอทานอล นอกจากนี้พบว่า มันสำปะหลังยังมีศักยภาพในการเพิ่มผลิตให้ได้มากกว่า 3 ตัน/ไร่ (จนถึง 30 ตัน/ไร่) ทำให้มีมันสำปะหลัง มาเป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลมากพอโดยไม่ต้องเพิ่มพื้นที่ปลูก และไม่มีผลกระทบต่อการบริโภคในประเทศ (กล้าณรงค์ และคณะ 2544)

การผลิตมันเส้นของประเทศไทย โดยทั่วไปเกษตรกรรายใหญ่จะเป็นผู้ผลิตเองโดยจะตั้งโรงงานใกล้กับพื้นที่ที่ปลูกมันสำปะหลัง เครื่องมือในโรงงานจะประกอบไปด้วย เครื่องสับ รถตัก และ ทำการตากแห้งโดยใช้ลานตากซึ่งมักจะมีขนาดตั้งแต่ 5-10 ไร่ จนถึงเป็น 100 ไร่ หัวมันสดจะถูกลำเลียงเข้าเครื่องสับ เมื่อได้มันเส้นสดก็จะถูกนำไปลดความชื้นโดยการตากในลานคอนกรีต มันเส้นซึ่งตากในอยู่ในลานจะถูกกลับโดยใช้คราดซึ่งติดตั้งกับรถแทรกเตอร์ เมื่อมันเส้นแห้ง (ความชื้นประมาณ 14-15%) ก็จะถูกรวมเป็นกองโดยใช้แทรกเตอร์ ซึ่งความต้องการของมันเส้นภายในประเทศได้สูงขึ้นอย่างมากเนื่องจาก

นโยบายการผลิตเอทานอลสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิง ในประเทศและต่างประเทศ ประกอบกับความต้องการมันเส้นไปใช้ทดแทนข้าวโพดเพื่อผลิตอาหารสัตว์ นี่ทำให้ความต้องการมันเส้นเพิ่มขึ้นจาก 1.96 ล้านตัน ในปี 2546 เป็น 2.56 ล้านตัน ในปี 2547 (ปริมาณหัวมันสดที่ใช้ประมาณ 6.25 ล้านตัน) และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ

กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ยังมีผลพลอยได้ (By-product) ในรูปของแข็งเกิดขึ้น คือ เปลือกมันและกากมัน โดยหัวมันสดหนึ่งตันจะให้ปริมาณ เปลือกมัน และกากมัน ประมาณ 30 กิโลกรัม และ 60 กิโลกรัม ตามลำดับ ในปัจจุบันเปลือกมันถูกนำไปใช้เป็นวัสดุในการปลูกเห็ดและทำเป็นอาหารสัตว์ ส่วนกากมันซึ่งมีส่วนประกอบ (น้ำหนักแห้ง) ได้แก่ แป้ง เส้นใย โปรตีน ไขมัน และ เถ้า ในอัตราส่วน 56%, 35.9%, 5.3%, 0.1% และ 2.7% ตามลำดับ กากมันที่ออกมาจากโรงงานจะมีความชื้นสูง หรือ ประมาณ 60-70% และเป็นแหล่งอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ จึงนำไปใช้ประโยชน์ได้ยาก เนื่องจากมีข้อเสียก็คือ มีกลิ่นเหม็นซึ่งรบกวนกับชุมชนที่อยู่รอบข้าง ในปัจจุบันได้มีการใช้เอนไซม์สองชนิด คือ pectinase และ cellulose ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดแป้ง ทำให้ได้กากแป้งที่มีปริมาณแป้งน้อยลงและยังทำให้ง่ายต่อการอบแห้ง ปัจจุบันกากมันจะลดความชื้นโดยการตากบนพื้นคอนกรีตขนาดใหญ่ในช่วง 8 เดือนที่ไม่มีฝนตก แต่ในช่วงเดือนสิงหาคม ถึง เดือนพฤศจิกายน

การพิจารณานำผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง คือ กากมันสำปะหลังมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอล โดยศึกษาให้ครอบคลุมตั้งแต่การแปรรูปกากมันสำปะหลัง (การลดความชื้น การสกัดแป้ง) จนถึงขั้นตอนการผลิตพลังงานในระดับต้นแบบ จะทำให้เกิดการใช้ประโยชน์ได้อย่างสูงสุดของการพัฒนาของประเทศ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทราบถึงปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายแป้งและเซลลูโลสด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส ร่วมกับสารช่วยทำละลาย พร้อมกับการทำงานของ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในกระบวนการหมัก
2. เพื่อศึกษาและพัฒนาต้นแบบการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยเทคนิคการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส ร่วมกับสารช่วยทำละลาย พร้อมกับการทำงานของยีสต์ *S.cerevisiae* ในกระบวนการหมัก

3. เพื่อพัฒนาต้นแบบระบบการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังสำหรับผลิตพลังงานทดแทนขนาด 5 ลิตร

1.3 สมมุติฐานของการทดลอง

เอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงาน

ประเทศไทยจำเป็นต้องนำเข้าพลังงานเชื้อเพลิงที่ใช้ในภาคขนส่งเกือบทั้งหมด ทำให้สูญเสียเงินตราไปต่างประเทศเป็นจำนวนมากกว่าปีละ 2 แสนล้านบาท ซึ่งมีมูลค่ามากกว่ารายได้จากการส่งออกข้าว มันสำปะหลัง ยางพารา น้ำมันปาล์ม และน้ำตาลทรายรวมกัน ประกอบกับแนวโน้มราคาน้ำมันเชื้อเพลิงมีแต่จะสูงขึ้น โดยประเทศไทยแทบไม่มีอำนาจต่อรอง เพราะมีการนำเข้าน้ำมันส่วนย่อย ซึ่งมีปริมาณไม่ถึงร้อยละ 1 ของตลาดโลกเท่านั้น วิกฤติการณ์ด้านพลังงานโดยเฉพาะราคาน้ำมันในตลาดโลกได้เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องมาโดยตลอด สาเหตุหลักๆ มาจากการเกิดความขัดแย้งของประเทศต่าง ๆ ในภาคตะวันออกกลางซึ่งเป็นแหล่งน้ำมันสำคัญของโลก สิ่งเหล่านี้มีผลกระทบต่อประเทศไทย เป็นอุปสรรคของรัฐบาลในการแก้ปัญหาเศรษฐกิจ

การใช้น้ำมันปิโตรเลียมซึ่งมีปริมาณจำกัด อาจจะหมดไปในเร็ววันนี้ ทำให้ประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกต้องเสาะแสวงหาแหล่งเชื้อเพลิงและพลังงานจากทรัพยากรภายในประเทศเพื่อทดแทนการนำเข้า เช่น การใช้ถ่านหิน พลังงานนิวเคลียร์ ก๊าซธรรมชาติ เป็นต้น สำหรับประเทศไทย แหล่งพลังงานดังกล่าวในปริมาณที่ค่อนข้างจำกัดและในสัดส่วนที่ไม่เหมาะสม เช่น การผลิตไฟฟ้าในปัจจุบันต้องใช้ก๊าซธรรมชาติถึงร้อยละ 70 ทำให้ขาดเสถียรภาพด้านพลังงานของประเทศ อย่างไรก็ตาม ไทยเรายังมีแหล่งพลังงานที่สามารถผลิตได้เอง คือ พลังงานทดแทนจากพืชเกษตร ประกอบกับปัญหาราคาพืชผลทางการเกษตรตกต่ำอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะพืชผลที่ต้องพึ่งพาตลาดต่างประเทศ เช่น ข้าว ซึ่งสามารถผลิตได้ประมาณ 27 ล้านตันต่อปี จากที่นา 78 ล้านไร่ มันสำปะหลังมีพื้นที่ปลูกประมาณ 7 ล้านไร่ ซึ่งส่วนใหญ่จะปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและตะวันออก โดยมีจังหวัดนครราชสีมาปลูกมากเป็นอันดับหนึ่ง ทั้งประเทศจะสามารถผลิตหัวสดได้ประมาณ 19 ล้านตันต่อปี ราคาขายอยู่ในระดับ 2-3 บาทต่อกิโลกรัมตามเปอร์เซ็นต์แป้ง อ้อย ก็มีสภาพไม่ต่างกัน และจะมีผลผลิตออกมากกว่า 50 ล้านตัน จากพื้นที่ปลูกประมาณ 6 ล้านไร่

การใช้เชื้อเพลิงเอทานอล ในปัจจุบัน ได้จากการนำเอาพืชผลทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง อ้อย กากน้ำตาล มาแปรรูปด้วยการย่อยสลาย การหมัก และการกลั่น แล้วนำเอาเอทานอลที่ได้มาผสม

กับน้ำมันเชื้อเพลิงปิโตรเลียม หากนำไปผสมกับเบนซินเรียกว่า ก๊าซโซฮอล์ หากนำมาผสมกับน้ำมันดีเซล เรียกว่า ดีโซฮอล์ (Desohol) หรือใช้โดยตรง (Neat Ethanol) ซึ่งมีหลายประเทศ นิยมใช้ เช่น บราซิล สหรัฐอเมริกา และประเทศกลุ่มประชาคมยุโรป การใช้เชื้อเพลิง เอทานอลส่งผลให้ลดมลภาวะทางอากาศ โดยเฉพาะคาร์บอนมอนอกไซด์ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เผาไหม้ไม่หมดซึ่งออกมาจากท่อไอเสียรถยนต์ และยังช่วยลดจำนวนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศที่มีผลกระทบโดยตรงต่อสภาวะเรือนกระจก (Green House Effect)

แนวความคิดเรื่องนี้ พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ทรงได้ทดลองทั้งการผลิตและใช้งานในโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา และได้มีการทดลองโดยการปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย จนได้ผลดีมาแล้ว ต่อมาเมื่อวันที่ 19 กันยายน 2543 คณะรัฐมนตรีได้มีมติเห็นชอบในหลักการ โครงการผลิตแอลกอฮอล์จากพืชเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง ต่อมากระทรวงอุตสาหกรรมได้มีคำสั่งแต่งตั้งคณะกรรมการเอทานอลแห่งชาติ เมื่อวันที่ 16 ตุลาคม 2543 โดยมี ปลัดกระทรวงอุตสาหกรรม เป็นประธาน และผู้อำนวยการสำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม เป็นกรรมการและเลขานุการ คณะรัฐมนตรี ในการประชุมเมื่อวันที่ 26 ธันวาคม 2543 ได้มีมติเห็นชอบแนวทางการส่งเสริมและสนับสนุนการผลิตและการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิง ตามที่กระทรวงอุตสาหกรรมเสนอ ในการนี้รัฐจะสนับสนุนให้ภาคเอกชนลงทุนจัดตั้งโรงงานผลิตเอทานอลเป็นเชื้อเพลิง และให้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กำหนดแผนการผลิตอ้อยและมันสำปะหลัง เพื่อรองรับและสอดคล้องกับการลงทุนผลิต เอทานอล

จากการศึกษาสถานภาพของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตน้ำมันก๊าซโซฮอล์ ซึ่งดำเนินการโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประกอบกับแผนยุทธศาสตร์มันสำปะหลังและแผนพัฒนาการผลิตอ้อยปี 2545-2549 ของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และในการประชุมคณะกรรมการ นโยบายพลังงานแห่งชาติ เมื่อวันที่ 18 เมษายน 2545 และการประชุมคณะรัฐมนตรีเมื่อ 14 พฤษภาคม 2545 ได้มีมติรับทราบตามข้อสรุปในด้านวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล ดังนี้

1. พืชที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลมากที่สุดคือ มันสำปะหลัง ซึ่งมีปริมาณส่วนเกินของตลาดประมาณ 4 ล้านตัน ต่อปี สามารถผลิต เอทานอลได้ประมาณ 2 ล้านลิตร ต่อวัน
2. กากน้ำตาลสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลได้เฉพาะส่วนที่เหลือจากการบริโภค ซึ่งมีประมาณ 0.8 ล้านตัน ต่อปี ผลิตเอทานอลได้ประมาณ 600,000 ลิตร ต่อวัน

3. การใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลไม่เหมาะสม เพราะปริมาณการผลิตอ้อยยังไม่เพียงพอกับความต้องการของอุตสาหกรรมน้ำตาล

สำหรับกากน้ำตาล (molasses) เป็นผลิตภัณฑ์เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากพืชที่ให้ความหวาน เช่น อ้อย หัวบีทชนิดหวาน (sugarbeet) เป็นต้น ปริมาณการผลิตของกากน้ำตาลทั่วโลกประมาณ 125-130 ล้านตันต่อปี ประมาณ 2 ใน 3 ได้มากจากอ้อยและที่เหลือประมาณ 25% ได้มาจากหัวบีทชนิดหวาน กากน้ำตาลจะนำไปใช้เป็นสารอาหารสำหรับการหมักหลายชนิด ที่เหลือจะนำไปเป็นอาหารทั้งคนและสัตว์ กากน้ำตาลประมาณ 75% ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกาและเอเชีย กากน้ำตาลเป็นน้ำตาลที่ไม่สามารถตกผลึกได้ ของแข็งที่ไม่ใช่น้ำตาล และสารเคมีต่างๆ ทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์ในน้ำ

โดยกากน้ำตาลจะได้จากกระบวนการมีปริมาณมากถึงกว่า 33% ของวัตถุตั้งต้น กากน้ำตาลที่ได้จากอ้อยจะมีน้ำตาลสูงถึง 48% เมื่อเทียบกับกากน้ำตาลจากหัวบีทจะไม่มีน้ำตาลเลย จึงทำให้กากน้ำตาลที่ได้จากอ้อยซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากและราคาถูก สามารถนำมาใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในกระบวนการหมักเอทานอลได้โดยตรง ซึ่งต่างจากมันสำปะหลังที่ต้องผ่านกระบวนการ Saccharification เพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อน นอกจากนี้กากน้ำตาลยังมีสารอาหารอื่นๆที่จำเป็นต่อการหมัก เช่น ไนโตรเจนอีกประมาณ 1% และแร่ธาตุๆอีกจำนวนมาก (http://www.suga-lik.com/molasses/ composition. html)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ประเทศไทยมีศักยภาพในด้านวัตถุดิบอย่างเพียงพอที่สามารถผลิตเอทานอลได้เกือบ 3 ล้านลิตรต่อวัน โดยไม่มีการขยายพื้นที่เพาะปลูก ซึ่งมากเกินความต้องการใช้เอทานอลในระยะแรกที่คาดว่าจะไม่เกิน 1 ล้านลิตรต่อวัน

สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง กรมธุรกิจพลังงาน (กรมทะเบียนการค้า) ได้รายงานไว้ว่าเอทานอลเป็นสาร Oxygenated ชนิดหนึ่งซึ่งสามารถใช้ทดแทน Methyl Tertiary Buthyl (MTBE) ได้ ในปัจจุบันน้ำมันเบนซินออกเทน 95 มีสาร MTBE ผสมในปริมาณร้อยละ 5.5-11.0 โดยปริมาตร การนำเอาเอทานอลผสมในน้ำมันเบนซินจะทำให้คุณสมบัติของน้ำมันเบนซินเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม คือ ค่าความดันไอสูงขึ้นประมาณ 1 psi หรือ 6.9 kpa เมื่อใช้เอทานอลร้อยละ 10 ค่าอุณหภูมิการกลั่นที่ปริมาตรร้อยละ 50 ลดลง คุณสมบัติในการรวมตัวกับน้ำลดต่ำลงและจะทำให้การใช้น้ำมันเชื้อเพลิงสิ้นเปลืองมากขึ้น (1-2%) เนื่องจากมีค่า Heating Value ต่ำ

น้ำมันก๊าซโซฮอล์ คือ น้ำมันเบนซินผสมเอทานอล (ใช้ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 ขึ้นไป) สำหรับประเทศไทย กรมทะเบียนการค้าได้กำหนดคุณภาพของน้ำมันก๊าซโซฮอล์ แยกออกจากน้ำมันเบนซิน มีค่าความดันไอไม่สูงกว่า 65 กิโลปาสคาล (kpa) อุณหภูมิการกลั่นที่ปริมาตรร้อยละ 50 ไม่ต่ำกว่า 65 และไม่สูงกว่า 110 องศาเซลเซียส และให้มีการผสมเอทานอลได้ในปริมาณร้อยละ 10-12 โดยปริมาตร ในปี 2544 ประเทศไทยมีการใช้เบนซินออกเทน 95 ในปริมาณ 3,000 ล้านลิตร ต้องนำเข้า MTBE ในปริมาณ 187.464 ล้านลิตร โดยมีราคาเฉลี่ยประมาณ 11.44 บาท ต่อลิตร ดังนั้น หากใช้เอทานอลทดแทน MTBE ได้ทั้งหมด สามารถประหยัดเงินได้ประมาณ 2,144 ล้านบาท แต่ต้องผลิตเอทานอลได้ไม่น้อยกว่าปีละ 300 ล้านลิตร จึงจะเพียงพอกับความต้องการ

จากการประชุมของคณะรัฐมนตรีเมื่อวันที่ 30 กรกฎาคม 2545 ได้มีมติอนุมัติการขอตั้งโรงงานผลิตและจำหน่ายเอทานอลของผู้ประกอบการทั้ง 8 ราย ตามข้อเสนอของคณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ ดังนี้

1. บริษัท พรวิไล อินเตอร์เนชั่นแนล กรุ๊ป เทรดดิ้ง จำกัด อำเภอท่าเรือ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ กำลังการผลิตไม่เกิน 25,000 ลิตรต่อวัน ใช้กากน้ำตาลหรือมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ
2. บริษัท ที.เอส.บี. เทรดดิ้ง จำกัด (บริษัท ไทยอะโกร เอ็นเนอร์ยี่ จำกัด) อำเภอตาคลี จังหวัดนครสวรรค์ ผลิตเอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ของแอลกอฮอล์ 99.5 เปอร์เซ็นต์ กำลังการผลิตไม่เกิน 150,000 ลิตรต่อวัน ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ
3. บริษัท อินเตอร์เนชั่นแนล แก๊สโซฮอล์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด เขตชุมชนอุตสาหกรรมนครินทร์-อินดัสเตรียลปาร์ค อำเภอบ้านค่าย จังหวัดระยองจัดตั้ง ผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ในกำลังการผลิตไม่เกิน 500,000 ลิตรต่อวัน ใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ
4. บริษัท แสงโสม จำกัด อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม ติดตั้งหน่วยผลิตเพิ่มเติมในโรงงานผลิตแอลกอฮอล์ที่มีอยู่เดิม เพื่อผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตไม่เกิน 100,000 ลิตรต่อวัน และใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ
5. บริษัทไทยง้วน เอทานอล จำกัด จังหวัดชัยภูมิ หรือขอนแก่น ผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ขนาดกำลังการผลิตไม่เกิน 130,000 ลิตรต่อวัน ใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ

6. บริษัท น้ำตาลขอนแก่น จำกัด อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ขนาดกำลังการผลิตไม่เกิน 85,000 ลิตร ต่อวัน ใช้กากน้ำตาลหรือมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ

7. บริษัท อัลฟ่า เอ็นเนอร์จี จำกัด อำเภอไพศาลี จังหวัดนครสวรรค์ ผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตไม่เกินวันละ 212,000 ลิตรต่อวัน ใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ

8. บริษัท ไทยเนชั่นแนล พาวเวอร์ จำกัด นิคมอุตสาหกรรมสยาม อีทเทอร์น อินดัสเตรียลปาร์ค อำเภอปลวกแดง จังหวัดระยอง ผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตไม่เกิน 300,000 ลิตรต่อวัน และใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ

ประธานกรรมการเอทานอลแห่งชาติ ได้มอบใบอนุญาตตั้งโรงงานผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงให้แก่ผู้ได้รับอนุญาตทั้ง 8 รายแล้ว เมื่อวันที่ 14 สิงหาคม 2545 โดยผู้ได้รับอนุญาตทั้ง 8 รายจะต้องปฏิบัติตามเอกสารข้อเสนอโครงการ ซึ่งบริษัทได้ยื่นไว้ตามประกาศคณะกรรมการเอทานอลแห่งชาติ ลงวันที่ 20 กรกฎาคม 2544

นอกจากผู้ประกอบการจำนวน 8 ราย ที่ได้รับอนุมัติให้ดำเนินการจัดตั้งโรงงานผลิตเอทานอลเป็นเชื้อเพลิง ซึ่งมีขนาดกำลังการผลิตรวมกันทั้งสิ้น 1,502,000 ลิตร ต่อวันแล้ว ยังมีผู้ประกอบการที่ได้ลงทุนจัดตั้งโรงงานผลิตเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงอีกจำนวน 12 ราย ซึ่งมีขนาดกำลังการผลิตรวมกันถึง 4,530,000 ล้านลิตร ต่อวัน

สำหรับน้ำมันดีโซฮอล์ ซึ่งหมายถึง น้ำมันดีเซลผสมแอลกอฮอล์ ในการผสมน้ำมันดีโซฮอล์อาจจะใช้เอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 (Hydrated Ethanol) หรือสูงกว่าร้อยละ 99 (Anhydrous Ethanol) ผสมกับน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว แต่ต้องมีการผสมสารเติมแต่งประเภท Emulsifier เพื่อช่วยให้เอทานอลละลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว การผสมเอทานอลในน้ำมันดีเซลหมุนเร็วทำให้คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันดีเซลหมุนเร็วเปลี่ยนไปบ้าง ที่สำคัญได้แก่ ค่าซีเทนนัมเบอร์ (Cetane Number) ลดลง และจุดวาบไฟของน้ำมันดีโซฮอล์มีค่าต่ำกว่าน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว ดังนั้น จึงต้องชดเชยค่าซีเทนนัมเบอร์โดยการเติมสารเติมแต่งประเภทเพิ่มซีเทน (Cetane Improver) ลงไปเพื่อเพิ่มค่าซีเทนนัมเบอร์และต้องเติมสารเติมแต่งป้องกันการกัดกร่อน (Corrosion Inhibitor) เพื่อป้องกันหัวฉีดเชื้อเพลิงกัดกร่อน สถาบันวิจัยและพัฒนา ปตท. ได้ทดสอบการใช้น้ำมันดีโซฮอล์กับรถโดยสาร ขสมก. พบว่า สามารถลดควันดำได้ประมาณร้อยละ 30-40

เนื่องจากปัญหาด้านราคาของวัตถุดิบที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอลมีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตหลักเกี่ยวข้องกับพืชอาหารที่ใช้สำหรับการบริโภคและราคาอาหาร จึงมีผลทำให้ต้นทุนของการผลิตสูงขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้น งานวิจัยชิ้นนี้จะช่วยให้การใช้กากของเหลือจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการผลิตพลังงานทางเลือก ซึ่งเป็นพลังงานที่สะอาด และยังช่วยลดมลภาวะที่เกิดจากกากของเสียเหล่านี้ นอกจากนั้น คณะวิจัยยังคาดหวังว่า การใช้สารช่วยทำละลายในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง จะช่วยลดต้นทุนของการผลิตเอทานอลลง และอาจจะช่วยส่งเสริมให้อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจากกาก สามารถเกิดขึ้นได้จากราคาของต้นทุนการผลิตที่ลดลง

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายแป้งและเซลลูโลส ด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส ร่วมกับการใช้สารช่วยทำละลาย แล้วทำการหมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* เพื่อพัฒนาต้นแบบระบบผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถให้ผลผลิตเอทานอลสูง สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบความคุ้มค่าการลงทุนกับลานมันหรือโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังจะใช้ลานมันในจังหวัดนครราชสีมาในการศึกษาเปรียบเทียบ โดยจะดูจากค่าอัตราผลตอบแทนภายในโครงการ (Internal Rate of Return) และค่าอัตราส่วนผลประโยชน์สุทธิการลงทุน (Net Benefit Investment Ratio)

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ผลสำเร็จและความคุ้มค่าของการวิจัยนี้ จัดเป็นผลสำเร็จตามเป้าประสงค์ (G) ซึ่งวัดได้จากได้ซึ่งสามารถใช้ในการเรียนการสอน และการสาธิตการเอทานอลเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่เกษตรกร หรือกลุ่มธุรกิจที่มีความสนใจ สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง นอกจากนี้เกษตรกรหรือกลุ่มธุรกิจยังจะมีข้อมูลที่สามารถใช้ในการประเมินความคุ้มค่าในการผลิตเอทานอล

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งความคุ้มของงานวิจัยได้ออกเป็น ***ด้านวิชาการ*** คือการปรับปรุงเทคโนโลยีทางด้านการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง ***ด้านเศรษฐกิจ*** จะเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตแป้งมัน อีกทั้งผลผลิตที่ได้ยังสามารถนำไปเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลได้ ***ด้านสังคม*** นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมให้เกิดการสร้าง

งานในชนบท ลดการทิ้งถิ่นเพื่อเข้าหางานทำในเมือง ***ด้านสิ่งแวดล้อม*** ลดปัญหาเรื่องกลิ่นอันเนื่องมาจากการทำแห้งกากมันไม่ทัน

บทที่ 2

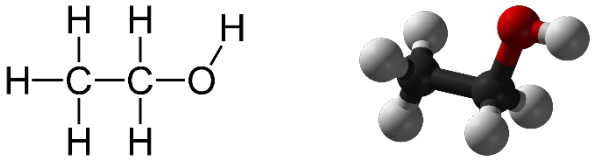
ทบทวนงานวิจัย

2.1 เชื้อเพลิงชีวภาพ

ในปัจจุบัน การขาดแคลนเชื้อเพลิงฟอสซิลของโลก การเพิ่มขึ้นของราคาน้ำมัน และความกังวลด้านสิ่งแวดล้อม เป็นปัจจัยที่ทำให้ตลาดของเชื้อเพลิงชีวภาพมีความสำคัญมากยิ่งขึ้น (USDA ERS, 2009) เชื้อเพลิงชีวภาพมีศักยภาพในการรักษาความมั่นคงด้านพลังงานได้ทั้งในประเทศและทั่วโลก ชนิดของเชื้อเพลิงชีวภาพที่ได้รับการการพัฒนาจะมีความสัมพันธ์กับความสามารถทางด้านเทคโนโลยีและทางด้านกฎหมายที่ที่แต่ละประเทศนั้นสนใจ เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกับผลิตทางการเกษตร การผลิตอาหารและการพัฒนาทางด้านสังคม ในขณะที่เชื้อเพลิงชีวภาพที่มีศักยภาพในการพัฒนาและมีความสำคัญในทางเศรษฐกิจ จะเกี่ยวข้องกับภาคการขนส่งทางถนน เนื่องจากในภาคการขนส่งมีการใช้ยานยนต์ที่ติดตั้งเครื่องยนต์ที่ใช้เชื้อเพลิงเหลวในการเผาไหม้ จึงทำให้ระบบของเชื้อเพลิงชีวภาพในภาคการขนส่งนั้น มุ่งเน้นไปที่เชื้อเพลิงเหลวเช่นน้ำมันเบนซินและดีเซล (Ahman and Nilsson, 2008) เป็นผลให้ประเภทของผู้ให้บริการเชื้อเพลิงชีวภาพที่สามารถนำมาใช้ในระบบของภาคการขนส่งทางถนนมีความจำเพาะเจาะจงและมีความเกี่ยวข้องกับทางสังคมและทางเทคนิคที่มีต่อการขนส่ง (Hodson et al., 2010) เชื้อเพลิงชีวภาพเหลวที่เหมาะสมสำหรับการขนส่งคือเอทานอล ซึ่งมีบทบาทสำคัญเนื่องจากมีโครงสร้างพื้นฐานที่สามารถผสมกับน้ำมันเบนซินได้ ซึ่งมีผลในการลดปริมาณการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ในภาคการขนส่งและสามารถลดการพึ่งพาเชื้อเพลิงฟอสซิลได้โดยการลดการใช้น้ำมันเบนซินลง

2.2 เอทานอล

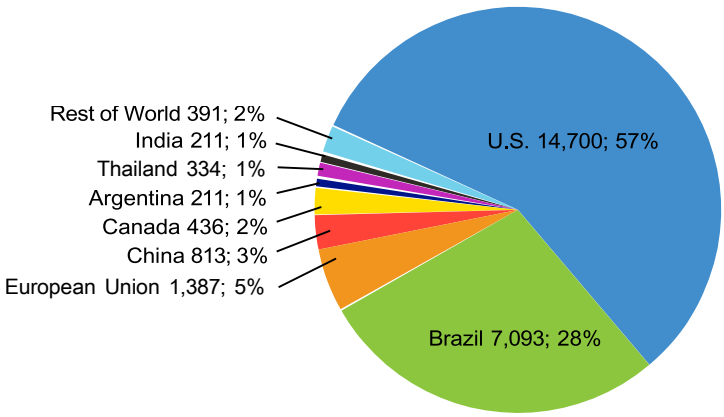
เอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ (รูปที่ 2.1) เป็นสารอินทรีย์ที่สำคัญเนื่องจากมีคุณสมบัติเฉพาและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ในสภาวะปกติเอทานอลเป็นของเหลวที่ระเหยง่าย ไวไฟ ไม่มีสีสามารถผสมกับน้ำและตัวทำละลายที่ไม่ใช่ขั้ว



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของเอทานอล (https://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol)

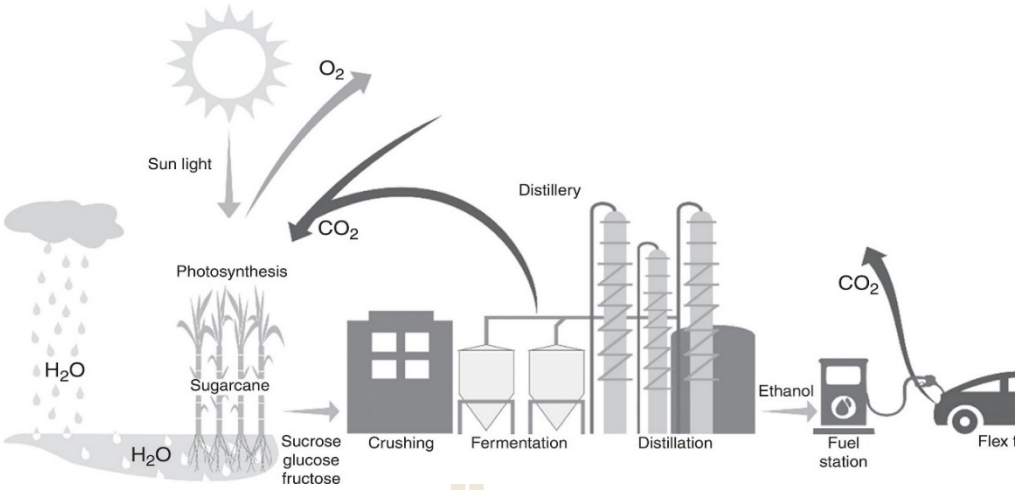
กระบวนการผลิตเอทานอลมี 2 วิธีคือ การสังเคราะห์จากปิโตรเลียมและทางชีวภาพ การผลิตเอทานอลโดยการสังเคราะห์จากการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรเจนของเอทธิลีนในรูปไอและเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี (Logsdon, 2006) เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการนี้ส่วนใหญ่จะใช้เป็นตัวทำละลาย (60%) และสารอนุภัณฑ์ทางเคมี (40%) การผลิตเอทานอลจากการหมักมีสัดส่วน 93% ของการผลิตเอทานอลทั้งหมดในโลก เอทานอลที่ผลิตจากการหมักน้ำตาลที่สกัดจากพืชเป็นส่วนใหญ่ เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตเอทานอล เนื่องจากความสามารถในการผลิตเอทานอลสูงและมีความทนทานต่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงมาก เอทานอลที่ผลิตส่วนใหญ่จะใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ (92%); และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (4%) (Logsdon, 2006)

ในการผลิตเอทานอลเชิงพาณิชย์เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน น้ำตาลและแป้งจะถูกใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในกระบวนการหมัก ในขณะที่เอทานอลจากชีวมวลได้เริ่มต้นการผลิตในปี 2556 (Balan et al. 2013) สหรัฐอเมริกาและบราซิลเป็นประเทศแนวหน้าในการผลิตเอทานอล สหรัฐอเมริกามีการใช้แป้งข้าวโพดส่วนบราซิลจะใช้อ้อยในการผลิตเอทานอล โดยในปี พ.ศ. 2558 ทั้งสองประเทศสามารถผลิตเอทานอลรวมกันได้ถึง 21,793 ล้านลิตร คิดเป็น 85% ของการผลิตในโลกในปีนั้น (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 การผลิตเอทานอลจากเชื้อเพลิงโลก ในปี พ.ศ. 2558 (ประเทศ พันล้านลิตร, ส่วนแบ่งการผลิตทั่วโลก) (RFA, 2016).

ในบราซิลวัตถุดิบหลักคืออ้อย ในขณะที่สหรัฐอเมริกาใช้ข้าวโพดในการผลิตเอทานอล (Monceaux, 2009 Amorim and Lopes, 2009) อ้อย ข้าวโพดและข้าวฟ่างเป็นพืช C4 ที่มีประสิทธิภาพสูงในการสังเคราะห์แสงโดยใช้ CO_2 และน้ำ ในการผลิตน้ำตาลและโพลิเมอร์ เช่นแป้ง เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ในกระบวนการนี้ใช้พลังงานแสงอาทิตย์เพื่อตรึงคาร์บอนและปล่อยออกซิเจนออกสู่อากาศ (Sage and Monson, 1999) ซึ่งเป็นผลให้คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการเผาผลาญเอทานอล จะถูกรีไซเคิลเป็นวัฏจักรโดยการสังเคราะห์แสง (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 ในการสังเคราะห์แสง อ้อยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ (H_2O) และพลังงานจากแสงอาทิตย์ เพื่อผลิตน้ำตาลและโพลีแซคคาไรด์ และปลดปล่อยออกซิเจน (O_2) ออกสู่ชั้นบรรยากาศ หลังจากการเก็บเกี่ยวและหีบอ้อย น้ำตาลจะถูกหมักโดยยีสต์และเปลี่ยนเป็นเอทานอล ซึ่งจะถูกแยกออกโดยการกลั่นและใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพในรถยนต์ การเผาผลาญเอทานอลทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่กลับสู่ชั้นบรรยากาศทำให้เกิดเป็นวัฏจักร (Lopes et al. 2016)

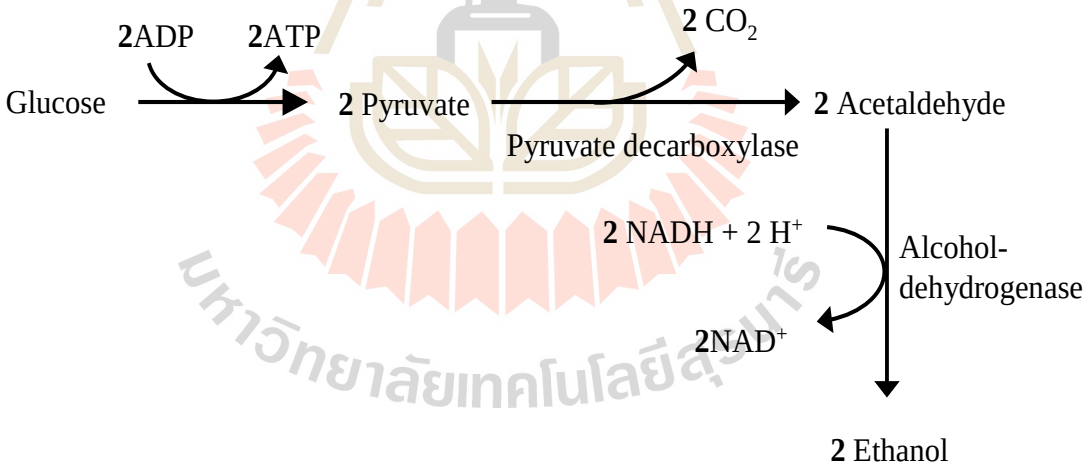
เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลากหลายประเภท เช่น น้ำตาล ได้แก่ น้ำอ้อยและกากน้ำตาล ตลอดจนวัสดุที่ทำจากแป้ง เช่น ข้าวสาลีและข้าวโพด (Jones et al., 1994) อย่างไรก็ตาม เทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากพืชมีมีแป้งและน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอาจไม่เป็นผลิตในระยะยาว เนื่องจากการปลูกข้าวโพดสำหรับการผลิตเอทานอลจะมีทำให้เกิดการแข่งขันและเบียดเบียนพื้นที่เพาะปลูกพืชชนิดอื่น และมีผลคุกคามต่อความมั่นคงด้านอาหารของประเทศ (Giampietro et al., 1997)

2.3 การหมักเอทานอล

ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญในการหมักน้ำตาลไปเป็นเอทานอล ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญกระบวนการหนึ่งสำหรับอุตสาหกรรม เชื้อยีสต์สายพันธุ์

S. cerevisiae, S. uvarum (carlsbergensis), Schizosacchromyces pombe และ *Kluyveromyces* species เป็นสายพันธุ์หลักที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล

ยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสและให้ผลผลิตเป็นเอทานอลโดยกระบวนการไกลโคไลซิส ปฏิกิริยาโดยรวมจะเกิดดังในรูปที่ 2.4 น้ำตาลกลูโคส 1 โมล จะสามารถผลิต 2 โมลของเอทานอล 2 โมลของคาร์บอนไดออกไซด์ และ 2 โมลของเอทีพี ดังนั้นในแต่ละกรัมของน้ำหนักกลูโคสจะสามารถให้แอลกอฮอล์ได้ถึง 51% ในทางปฏิบัติ ผลผลิตของเอทานอลที่ได้จากการหมักจะไม่เกินร้อยละ 90-95 ของค่าทางทฤษฎี แต่เนื่องจากการเติมสารอาหารบางชนิดที่จะนำไปใช้ในกระบวนการเมทาโบลิซึมเพื่อการสังเคราะห์สารชีวมวลใหม่และใช้ในปฏิกิริยาอื่น ๆ เกี่ยวกับการบำรุงรักษาเซลล์ หรือปฏิกิริยาข้างเคียงอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก (โดยปกติจะเป็นกลีเซอรอล) ซึ่งสามารถผลิตได้มากถึง 4-5% ของสารตั้งต้น ซึ่งหากสามารถกระบวนการเหล่านี้ได้ จะทำให้ประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 2.7% (Roehr, 2001)



รูปที่ 2.4 กระบวนการหมักเอทานอล (Norr et al., 2003)

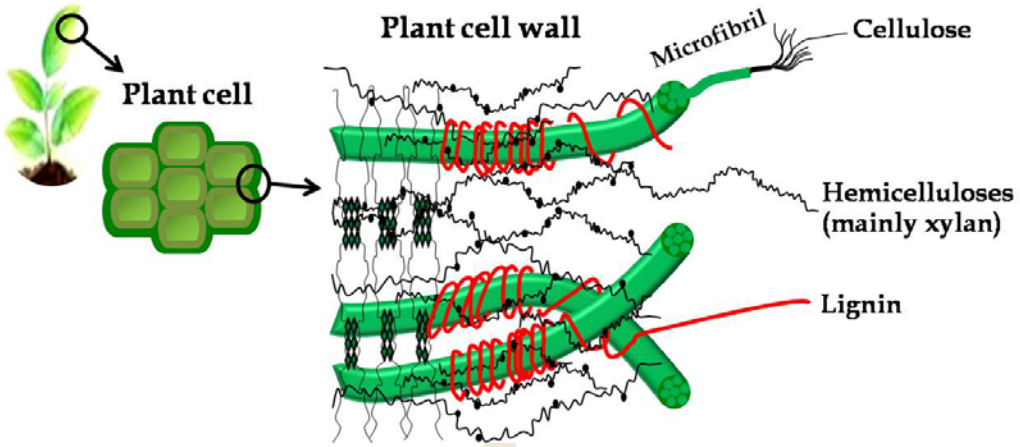
การรีดิวส์ของ NADH ที่ถูกผลิตในกระบวนการไกลโคไลซิส จะถูกส่งไปยังไปยังตัวรับอิเล็กตรอนและถูกเปลี่ยนเป็น NAD^+ เพื่อนำกลับมาใช่ใหม่ acetaldehyde ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จาก

กระบวนการ decarboxylation ของไพรูเวท จะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหมักเอทานอล ซึ่งมีเอนไซม์เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา 2 ปฏิกิริยา โดยในขั้นตอนแรกเอนไซม์ pyruvate decarboxylase จะทำการ decarboxylate กรดไพรูวิก โดยมีthiamine pyrophosphate เป็น cofactor ในขั้นตอนที่สอง จะเกิดปฏิกิริยารีดิวส์ของ acetaldehyde เป็นเอทานอล โดย NADH ซึ่งปฏิกิริยานี้จะถูกเร่งด้วยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งจะถูกกระตุ้นด้วย Zn^{2+} (Ribéreau-Gayon et al., 2000)

2.4 ชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลส

ชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นชีวมวลที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ได้แก่ เศษวัสดุเหลือทิ้งจากไม้ เศษวัสดุจากการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด แกลบ และกากมันสำปะหลัง ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบทดแทนประสิทธิภาพแทนที่แหล่งวัตถุดิบที่มีแป้งและน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นวัสดุที่มีประสิทธิภาพสูงที่สามารถใช้ในการขับเคลื่อนระบบการผลิตพลังงานทางเลือก เนื่องจากวัตถุดิบเหล่านี้มีอยู่อย่างมากมาย มีราคาถูก และมีองค์ประกอบของโพลีแซคคาไรด์สูง (เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส) (Fujii et al., 2009) จากการมุ่งเน้นในการวิจัยและการพัฒนาเกี่ยวกับวัสดุลิกโนเซลลูโลสในทศวรรษที่ผ่านมา ทำให้วัตถุดิบเหล่านี้ได้รับการยอมรับและเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีความสำคัญสำหรับการผลิตเอทานอลในอนาคต (Taherzadeh et al., 2007)

ลิกโนเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบสำคัญของพืชที่ให้โครงสร้างและมักมีอยู่ในราก ลำต้นและใบโดยผนังเซลล์ของพืช (รูปที่ 2.5) ทำจากเซลลูโลส $(C_6H_{10}O_5)_n$, เฮมิเซลลูโลส $(C_5H_80_4)_m$, ลิกนิน $[C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0.9\text{-}1.7}]_x$, เปกติน และ glycosylated proteins (Nanda et al., 2013) ชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสทั่วไปมีองค์ประกอบของเซลลูโลส 35-55%, เฮมิเซลลูโลส 20-40% และ ลิกนิน 15-25% (Sukumaran et al., 2010)



รูปที่ 2.5 ส่วนประกอบของชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลส (Ratanakhanokchai et al., 2013).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

วิธีการศึกษา

3.1 วัตถุดิบ

กากมันสำปะหลังสดจากบริษัท สงวนวงษ์อุตสาหกรรม จำกัด ถูกตากแดดจนความชื้นน้อยกว่า 10% (w/w) เมื่อแห้ง กากมันสำปะหลังจะถูกนำไปบดเป็นผงละเอียดโดยใช้เครื่องบด Cross-Beater (Glen Mill Corp. , Maywood, NJ, USA) และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 250 เมช จากนั้น นำกากมันที่ร่อนได้ใส่ถุงพลาสติกและเก็บในโถพลาสติกที่มีสารดูดความชื้นจนกระทั่งใช้ต่อไป

3.2 เอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส (Cellic CTec2; 150 filter paper unit (FPU)/mL) เอนไซม์อะไมเลส (Termamyl SC; 120 kiloNovo unit (KNU)/g) เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (AMG 300L; 300 unit/mL) พลูลูแลนเนส (Promozyme D2; 1350 new pullulanase unit Novo (NPUN)/g) เฮมิเซลลูเลส (0.3-3.0 unit/mg) และไซแลนเนส (≥2500 unit/g)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์

ในการทดลอง ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ถูกใช้ในการหมักเอทานอล ซึ่งได้รับจากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4 วิธีการวิเคราะห์

3.4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ค่าของปริมาณความชื้น ปริมาณเส้นใย ปริมาณของไนโตรเจน ปริมาณของไขมัน ปริมาณของเถ้า และปริมาณของคาร์โบไฮเดรต ได้ถูกทำการวิเคราะห์โดยวิธีการวิเคราะห์ของ AOAC (1990) การวิเคราะห์หาปริมาณของเยื่อใยที่สกัดด้วยสารละลายที่เป็นกลาง (neutral detergent fiber ,

NDF) ปริมาณของลิกโนเซลลูโลส (acid detergent fiber, ADF) และปริมาณของลิกนิน (acid dertergent lignin, ADL) โดยวิธี detergent analysis (Van Soest et al., 1991)

3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์

ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์จะถูกวิเคราะห์โดยวิธี DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) (Miller, 1959) โดยใช้ปริมาตรของตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร (ในปริมาตร 1 ลิตร ของสารละลาย DNS จะประกอบด้วย 10 กรัมของ 3,5-dinitrosalicylic acid 300 กรัมของ potassium sodium tartrate ที่ละลายด้วย 200 มิลลิลิตรของ 2N โซเดียมไฮดรอกไซด์ และทำการปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำ RO) ทำการผสม และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณของเอทานอล

ทำการวิเคราะห์ โดยใช้เครื่อง GC รุ่น AutoSystem XL, Perkin Elmer, U.S.A คอลัมน์แบบ capillary PE-1 ที่อุณหภูมิ 250 และ 300 องศาเซลเซียส โดยใช้ก๊าซฮีเลียมเป็น carrier gas การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลของตัวอย่างจะเทียบจากกราฟของสารมาตรฐานเอทานอล

3.4.4 การวิเคราะห์การเจริญของยีสต์

การวัดการเจริญของเซลล์ยีสต์ วัดโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้อาหาร YM เป็น blank

การวัดมวลเซลล์ วัดโดยนำอาหารที่มีเซลล์ยีสต์เจริญอยู่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรอง cellulose acetate (13mm, 0.45µm, Whatman, England) แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำ deionized แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การวิเคราะห์มวลเซลล์จะคำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)

3.4.5 การวิเคราะห์ค่าจลพลศาสตร์ของการหมัก

ศึกษาหาค่าจลพลศาสตร์ต่างๆ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate), อัตราการใช้น้ำตาล (consumption rate), อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (productivity) และค่า yield เป็นต้น

อัตราการเจริญจำเพาะ = $(\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$

X_1, X_2 เป็นปริมาณของเซลล์ ณ เวลาที่ t_1 และ t_2

อัตราการใช้น้ำตาล = $(C_2 - C_1) / (t_2 - t_1)$

C_1, C_2 เป็นความเข้มข้นของน้ำตาล ณ เวลาที่ t_1 และ t_2

อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ = $(P_2 - P_1) / (t_2 - t_1)$

P_1, P_2 เป็นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ณ เวลาที่ t_1 และ t_2

ค่า Yield = $(C_i - C_f) / (P_f - P_i)$

C_i เป็นความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น

C_f ความเข้มข้นของน้ำตาลหลังจากการหมัก

P_i เป็นความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ก่อนการหมัก

P_f เป็นความเข้มข้นผลิตภัณฑ์หลังการหมัก

3.5 การทดสอบผลของปริมาณกากมันแห้งต่อความสามารถในการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ด้วยเอนไซม์อะไมเลสและอะไมโลกลูโคซิเดส

ในการทดสอบ ปริมาณของกากมันแห้งที่ 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยเพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ การทดลองทำในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยนำกากมันแห้งปริมาณต่างๆ ใส่ในขวดและปรับปริมาตรเป็น 98 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ RO และนำไปบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส ในตู้เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำมาเติมเอนไซม์ Termamyl SC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (144 KNU) และบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในตู้เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำมาเติมเอนไซม์ AMG 300L ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (300 U) นำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ในตู้เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วไปแยกกากโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ของเหลวที่ได้จากการย่อยจะ

ถูกวัดปริมาตรและวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของกากมัน

3.6 การทดสอบผลของการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ต่อประสิทธิภาพของการย่อยเพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์

ในการทดลองผลของการเติม $CaCl_2$ ต่อประสิทธิภาพของการย่อย จะทำการทดสอบโดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ เอนไซม์สำหรับย่อยแป้ง (Amylolytic enzyme) และเอนไซม์สำหรับย่อยเส้นใย (cellulolytic enzyme) โดยใช้กากมันแห้งที่ความเข้มข้น 16 กรัมในปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 1% โดยปริมาตรของเอนไซม์แต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากการย่อยของเอนไซม์จะถูกวิเคราะห์ที่เวลา 3, 6 และ 9 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเอนไซม์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1 ชุดการทดสอบการศึกษาผลของ $CaCl_2$ ต่อการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ โดยใช้กากมันที่ความเข้มข้น 16 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

	ชุดการทดสอบ	2 mM $CaCl_2$	Debranching enzyme	Termamyl SC	AMG 300L
			T=40°C	T=80°C	T=60°C
			t = 0-3 h	t= 3-6 h	t=6-9 h
Amylolytic enzyme	Control	X	X	X	X
	Termamyl	X	X	O	X
	Termamyl+$CaCl_2$	O	X	O	X
	AMG	X	X	X	O
	AMG+$CaCl_2$	O	X	X	O
	Termamyl+AMG	X	X	O	O
	Termamyl+AMG+$CaCl_2$	O	X	X	X
	Pullulanase	X	Pullulanase	O	O
	Pullulanase+$CaCl_2$	O	Pullulanase	O	O
Cellulolytic enzyme	Xylanase	X	Xylanase	O	O
	Xylanase+$CaCl_2$	O	Xylanase	O	O
	Hemicellulase	X	Hemicellulase	O	O
	Hemicellulase+$CaCl_2$	O	Hemicellulase	O	O
	Cellulase	X	Cellulase	O	O
	Cellulase+$CaCl_2$	O	Cellulase	O	O

X= No added; O=Added

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.7 ผลของ debranching enzyme ต่อประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวส์

ในการทดสอบ ปริมาณของกากมันแห้งที่ความเข้มข้น 16 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยเพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ การทดลองทำในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดย 1 มิลลิลิตรของเอนไซม์แต่ละชนิดจะถูกเติมในกากมัน ดังแสดงในตารางที่ 3.2 จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วไปแยกกากโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ของเหลวที่ได้จากการย่อยจะถูกวัดปริมาตรและวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของกากมัน

ตารางที่ 3.2 ชุดการทดสอบการศึกษาผลของ debranching enzyme ต่อการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ โดยใช้กากมันที่ความเข้มข้น 16 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ชุดการทดสอบ	Debranching enzyme	Termamyl SC	AMG 300L
	T=40°C t = 0-3 h	T=80°C t= 3-6 h	T=60°C t=6-9 h
Control	X	X	X
Xylanase	Xylanase	O	O
Cellulase	Cellulase	O	O
Pullulanase	Pullulanase	O	O
Xylanase+Cellulase	Xylanase+Cellulase	O	O
Xylanase+Pullulanase	Xylanase+Pullulanase	O	O
Xylanase+Cellulase+ Pullulanase	Xylanase+Cellulase+ Pullulanase	O	O

X= No added; O=Added

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.8 การปรับปรุงขั้นตอนการเติมเอนไซม์เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์จากกากมันสำปะหลัง

ในการทดสอบ ปริมาณของกากมันแห้งที่ความเข้มข้น 16 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยเพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ การทดลองทำในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร การทดลองจะแบ่งออกเป็น การเติมเอนไซม์แบบสองขั้นตอนและการเติมเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียว โดย 1 มิลลิลิตรของเอนไซม์แต่ละชนิดจะถูกเติมในกากมัน ดังแสดงในตารางที่ 3.3 จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วไปแยกกากโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ของเหลวที่ได้จากการย่อยจะถูกวัดปริมาตรและวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของกากมัน

ตารางที่ 3.3 ขั้นตอนการเติมเอนไซม์

ชุดการทดสอบ	**Step I**	**Step II**
	T=60°C	**T=60°C**
	t = 0-3 h	**t= 3-6 h**
Control	X	X
AMG	AMG	X
Cel+AMG	Cellulase	AMG
Cel/AMG	Cellulase+AMG	X
Cel/Pul+AMG	Cellulase+Pullulanase	AMG
Cel/Pul/AMG	Cellulase+Pullulanase+AMG	X

X= No added

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.9 การปรับปรุงประสิทธิภาพการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ โดยการเติม PEG

ในการทดสอบ ปริมาณของกากมันแห้งที่ความเข้มข้น 16 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยเพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ การทดลองทำในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยทำการเติม PEG ขนาดน้ำหลักโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 กรัมต่อลิตร ร่วมกับเอนไซม์ cellulase: pullulanase: AMG ที่สัดส่วน 1: 1: 1 โดยปริมาตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วไปแยกกากโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ของเหลวที่ได้จากการย่อย (hydrolysates) จะถูกวัดปริมาตรและวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของกากมัน

3.10 การผลิตเอทานอลจาก hydrolyzates ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์ร่วมกับ PEG ที่น้ำหนักโมกุลและความเข้มข้นต่างๆ โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในกระบวนการหมักแบบ SHF

ในการทดสอบ ปริมาณของกากมันแห้งที่ความเข้มข้น 16 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยเพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ การทดลองทำในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยทำการเติม PEG ขนาดน้ำหลักโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 และ 600 กรัมต่อลิตร ร่วมกับเอนไซม์ cellulase: pullulanase: AMG ที่สัดส่วน 1: 1: 1 โดยปริมาตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วไปแยกกากโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ของเหลวที่ได้จากการย่อย (hydrolysates) จะถูกวัดปริมาตรและวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ และนำไปเตรียมเป็นอาหารสำหรับการหมักเอทานอล โดยจะทำการเติม 2.5 กรัม yeast extract, 5 กรัม peptone, 1 กรัม KH_2PO_4, 0.3 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ และ and 2 กรัม NH_4Cl ต่อปริมาตร 1 ลิตร จากนั้น นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และทำการเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ที่ 5% โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มพร้อมการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หารการเจริญของยีสต์ การลดลงของน้ำตาลรีดิวส์และการผลิตเอทานอล

3.11 การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านหระบวนการย่อยพร้อมกับ PEG4000 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยกระบวนการหมักแบบ SHF

ในการทดสอบ ปริมาณของกากมันแห้งที่ความเข้มข้น 16 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรได้ถูกนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ cellulase: pullulanase: AMG ที่สัดส่วน 1: 1: 1 โดยปริมาตรพร้อมกับการเติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ และนำ hydrolysates ที่ได้มาเตรียมอาหารสำหรับการหมักโดยทำการเติม 2.5 กรัม yeast extract, 5 กรัม peptone, 1 กรัม KH_2PO_4, 0.3 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ และ and 2 กรัม NH_4Cl ต่อปริมาตร 1 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเติมอาหารปริมาตร 3 ลิตรลงในถังหมักและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทำการเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ที่ 5% โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมการกวนที่ 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หารการเจริญของยีสต์ การลดลงของน้ำตาล และการผลิตเอทานอล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังแห้ง

องค์ประกอบของกากมันสำปะหลังแสดงดังในตารางที่ 4.1 โดยพบว่ากากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรต 74.27% (nitrogen-free extract) และมีองค์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ โปรตีนหยาบ (crude protein) 2.15%, เถ้า (ash) 2.32%ม และไขมัน (fat) 0.16%, นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์แบบ Detergent analysis พบว่ากากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบของเยื่อใยหยาบ (crude fiber) 13.47%ม เยื่อใยจากสารละลายที่เป็นกลาง (Neutral detergent fiber; NDF) 36.44%, เยื่อใยจากสารละลายที่เป็นกรด (Acid detergent fiber; ADF) 20.56%, ลิกนิน (acid detergent lignin; ADL) 2.82%, เซลลูโลส 17.73%, และเฮมิเซลลูโลส 15.88% ซึ่งองค์ประกอบดังกล่าวอาจมีความแตกต่างกันจากสายพันธุ์มันสำปะหลัง ฤดูกาล สถานที่เพาะปลูก กระบวนการผลิตและสภาวะที่ใช้ และรวมถึงเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิตของโรงงานแป้งมันสำปะหลัง (Pandey et al., 2000, Sriroth et al., 2000) จากรายงานการวิจัยของ Sriroth et al. (2000) รายงานว่ากากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบของแป้ง 68% และเส้นใย 27% โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งองค์ประกอบของกากมันสำปะหลังที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักนั้น ทำให้กากมันสำปะหลังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบของอาหารคาร์บอนที่มีส่วนสำคัญต่อกระบวนการหมักและการกระบวนการผลิตสารทางชีวภาพ โดยเฉพาะการผลิตเอทานอล นอกจากนี้ ในกากมันสำปะหลัง มีปริมาณของไขมัน โปรตีนและเถ้า ในปริมาณต่ำ ทำให้ง่ายต่อกระบวนการเปลี่ยนในทางชีวภาพ (bioconversion processes) และมีความสำคัญต่อกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลลินทรีย์ (Pandey et al., 2000)

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังแห้ง

องค์ประกอบ	% โดยน้ำหนัก
I. Proximate analysis	
Crude protein	2.15
Moisture	7.63
Ash	2.32
Crude fiber (CF)	13.47
Fat (Ether extract, EE)	0.16
Carbohydrate (Nitrogen-free extract, NFE)	74.27
II. Dietary fiber methods	
Neutral detergent fiber (NDF)	36.44
Acid detergent fiber (ADF)	20.56
Acid detergent lignin (ADL)	2.82
Cellulose	17.73
Hemicellulose	15.88

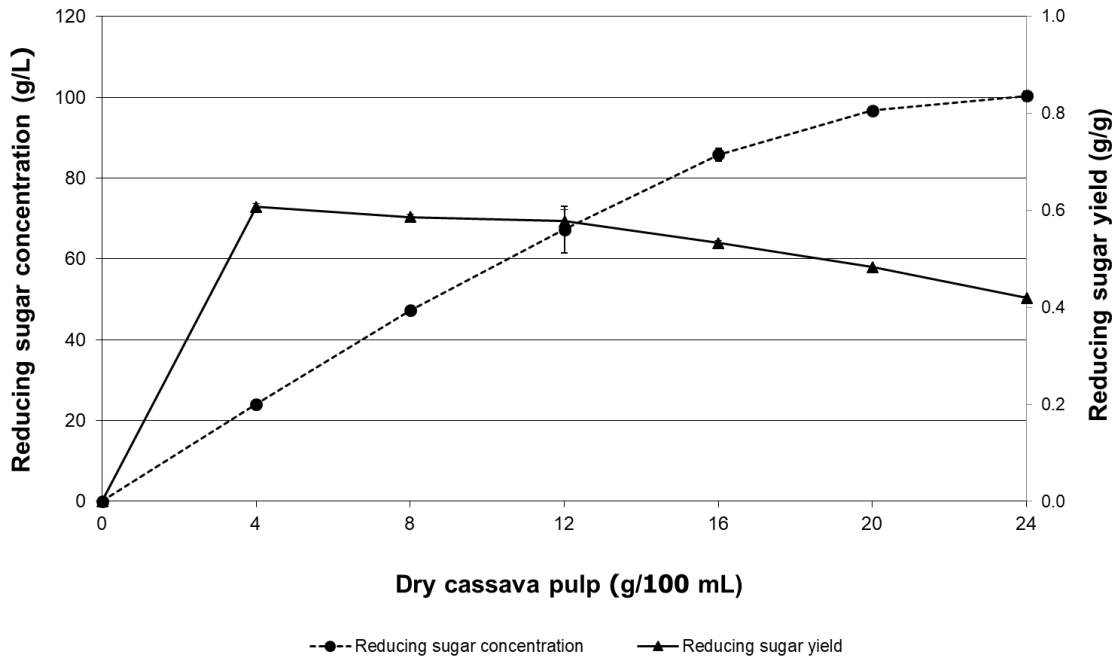
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 การวิเคราะห์การย่อยด้วยเอนไซม์

4.2.1 ความเข้มข้นของกากมันที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ด้วยเอนไซม์ thermostable α-amylase และ AMG

การศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ โดยทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของปริมาณกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นที่ 4-24% โดยน้ำหนัก ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.1

พบว่า ปริมาณของกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นที่ 4% จะให้ค่า yield ของปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ต่อปริมาณกากมันแห้งเริ่มต้นที่สูงสุด อยู่ที่ 0.61 กรัมต่อกรัม และผลิตน้ำตาลรีดิวส์สูงสุดที่ 24.12 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มปริมาณของกากมันสำปะหลังแห้งในกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าจะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ โดยที่ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังที่ 16% สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวส์ที่ 85.60 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่า3.75 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 4% อย่างไรก็ตาม เมื่อความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังที่ใช้ในการย่อยมีความเข้มข้นมากขึ้น ที่ 20% และ 24% โดยน้ำหนัก จะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของความหนืดและทำให้การผสมและการกวนยากขึ้นทำการประสิทธิภาพของการย่อยลดลง



รูปที่ 4.1 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น4%, 8%, 12%, 16%, 20% and 24% w/v โดยเอนไซม์ Termamyl SC และ AMG 300L

การเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณของกากมันสำปะหลังที่ใช้ในการย่อย อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นสูงนั้น มีผลทำให้ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้ลดต่ำลง ซึ่งอาจจะเป็นผลผลมาจากการเกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์จากน้ำตาลที่ผลิตได้ จากรายงานของ Kolusheva and Marinova (2007) สรุปได้ว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจะมีผลทำให้อัตราการย่อยแป้งของเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญและมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

4.2.2 ผลของ $CaCl_2$ ต่อประสิทธิภาพของการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์จากกากมันสำปะหลัง

ในการออกแบบการทดสอบ เอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ เอนไซม์ในการย่อยแป้ง (amylolytic enzyme) ได้แก่ Termamyl SC, AMG 300L และ pullulanase และเอนไซม์ในการย่อยเส้นใย (cellulolytic enzyme) ได้แก่ Cellic CTec2, xylanase และ hemicellulose โดยทำการเปรียบเทียบการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ในสภาวะที่มีการเติม $CaCl_2$ ปฏิกิริยาในการย่อย กับสภาวะที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$

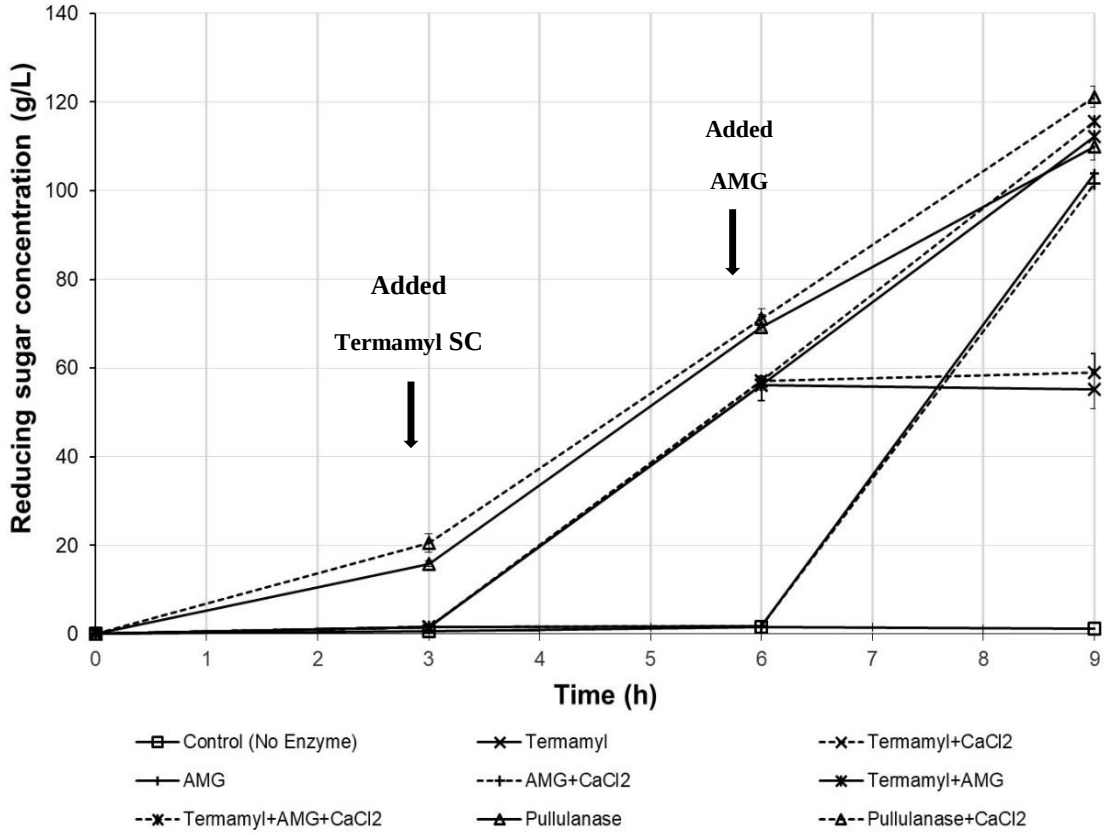
ในขั้นตอนแรกของการย่อยด้วยเอนไซม์ เอนไซม์สูตรเดี่ยว ได้แก่ pullulanase, cellulase, xylanase และ hemicellulose จะถูกเติมลงไปในตัวอย่างกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นที่ 16% โดยน้ำหนัก และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้น ในขั้นตอนที่สองทำการเติมเอนไซม์ Termamyl SC และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และขั้นตอนสุดท้าย เติมเอนไซม์ AMG 300L และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงเสร็จขั้นตอนของการย่อย โดยผลของการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.2 และ 4.3 พบว่า ชุดตัวอย่างที่ทำการเติมเอนไซม์ cellulase และเอนไซม์ cellulase + $CaCl_2$ ให้ผลของการผลิตน้ำตาลรีดิวส์สูงสุดที่ 65.05 และ 69.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ pullulanase มีผลส่งเสริมการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ในขั้นตอนแรกของการย่อยด้วยเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการเติมเอนไซม์ xylanase และ hemicellulose ในขั้นตอนแรกของการย่อย พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิด สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวส์ได้ในปริมาณต่ำ

การเติมเอนไซม์ Termamyl SC ในขั้นตอนที่สอง มีผลอย่างมากต่อการเพิ่มขึ้นของการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ โดยเฉพาะในชุดตัวอย่างของ cellulase และ cellulase + $CaCl_2$ และให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์สูงสุดอยู่ที่ 80.65 และ 82.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

หลังจากเติมเอนไซม์ AMG 300L ในขั้นตอนสุดท้ายและบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในทุกชุดการทดลอง มีผลทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำตาลรีดิวส์มีความเข้มข้นที่ใกล้คียงกันในทุกชุดการทดลอง วิธีที่ใช้เอนไซม์ debranching ร่วมกับ Termamyl SC และ AMG 300L โดยในชุดตัวอย่างของ xylanase + $CaCl_2$ ให้ผลการผลิตน้ำตาลรีดิวส์สูงสุดที่ 0.70 ± 0.04 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลังแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 4.5 อย่างไรก็ตาม ในชุดการทดลอง pullulanase + $CaCl_2$ และ hemecellulase + $CaCl_2$ แสดงให้เห็นว่าผลผลิตของน้ำตาลรีดิวส์ให้ค่า yield ที่สูงที่ 0.68 ± 0.01 และ 0.67 ± 0.03 กรัมต่อกรัมของกากมันสำปะหลังแห้ง ตามลำดับ

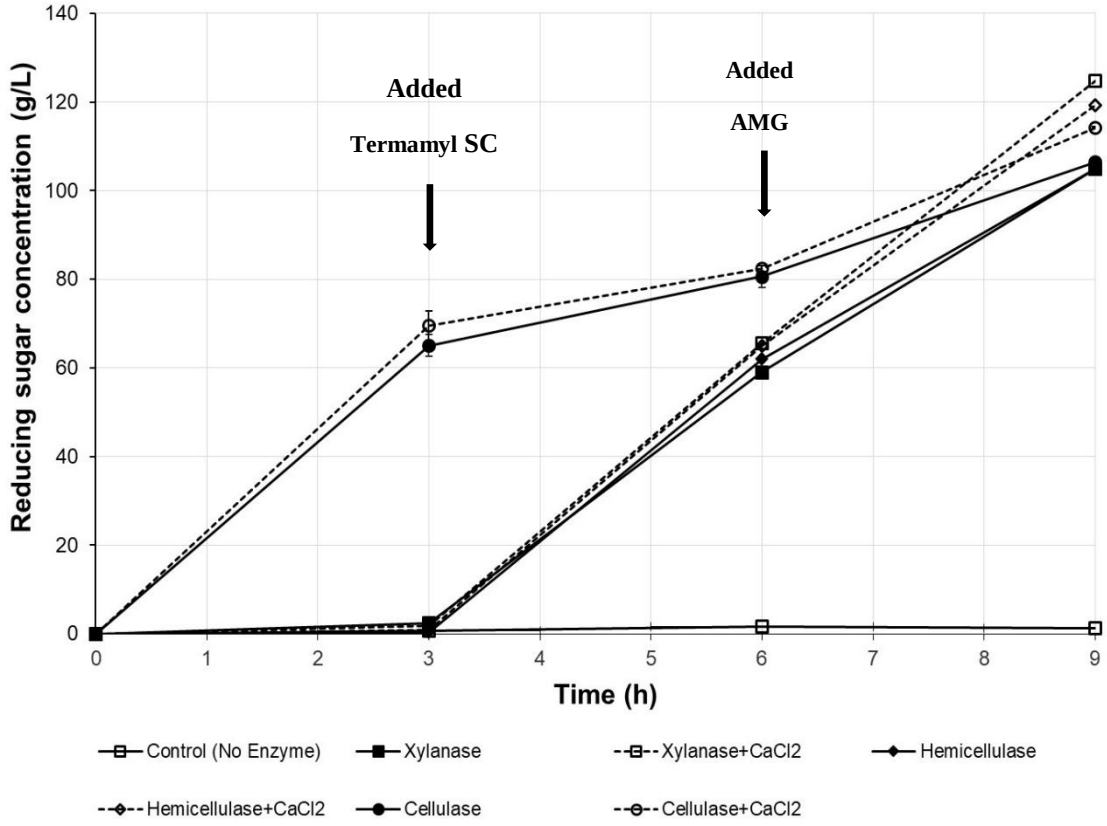
การเติม 2 mM $CaCl_2$ ในปฏิกิริยาขิงการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์สามารถเพิ่มการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ได้เล็กน้อย โดยเฉพาะในขั้นตอนของการเติมเอนไซม์ AMG 300L แคลเซียมไอออนจะมีผลในเชิงบวกต่อความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ที่ใช้สำหรับการย่อยแป้ง (Violet and Meunier., 1989, Brown และ Kelly et al., 1995 และ Dong et al., 1997) นอกจากนี้ Vengadgramana et al. (2012) รายงานว่าแคลเซียมไอออนช่วยเพิ่มเสถียรภาพของ α-amylase จาก *Baccillus icheniformis* ATCC 6346

สำหรับการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ปัญหาหลักในการย่อยคือเม็ดแป้งที่ติดอยู่ภายในเซลล์จะถูกปกคลุมด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ ดังนั้นทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจึงยากต่อการย่อยสลาย และป้องกันไม่ให้แป้งสัมผัสกับเอนไซม์ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ debranching มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยเพื่อทำลายโครงสร้างเส้นใยในผนังเซลล์ ดังนั้นประสิทธิภาพของการย่อยด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนที่สองของ Termamyl SC และ AMG 300L จึงได้รับการส่งเสริม



รูปที่ 4.2 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตจากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนัก ด้วยเอนไซม์ย่อยแป้ง ได้แก่ Termamyl SC, AMG 300L และ Promozyme D2 ร่วมกับการเติม/ไม่เติม 2 mM $CaCl_2$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.3 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตจากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนัก ด้วยเอนไซม์ย่อยเส้นใย ได้แก่ xylanase, hemicellulase และ cellulase ร่วมกับการทำงานของเอนไซม์ Termamyl SC และ AMG 300L ร่วมกับการเติม/ไม่เติม 2 mM $CaCl_2$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.2 ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตจากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนัก ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยแป้งและเส้นใยร่วมกับการเติมและไม่เติม 2 mM $CaCl_2$

	ชุดการทดลอง	ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ (ที่ 9 h) (กรัมต่อกรัมของกากมันสำปะหลังแห้ง)
Amylolytic enzyme	Control	0.01 ± 0.02 [f]
	Termamyl	0.31 ± 0.04 [e]
	Termamyl + $CaCl_2$	0.33 ± 0.02 [e]
	AMG	0.58 ± 0.05 [cd]
	AMG+$CaCl_2$	0.57 ± 0.01 [d]
	Termamyl + AMG	0.63 ± 0.00 [bcd]
	Termamyl + AMG + $CaCl_2$	0.65 ± 0.02 [abc]
	Pullulanase	0.62 ± 0.02 [bcd]
	Pullulanase + $CaCl_2$	0.68 ± 0.01 [ab]
Cellulolytic enzyme	Xylanase	0.59 ± 0.01 [cd]
	Xylanase + $CaCl_2$	0.70 ± 0.04 [a]
	Hemicellulase	0.59 ± 0.01 [cd]
	Hemicellulase + $CaCl_2$	0.67 ± 0.03 [ab]
	Cellulase	0.60 ± 0.01 [cd]
	Cellulase + $CaCl_2$	0.64 ± 0.01 [abc]

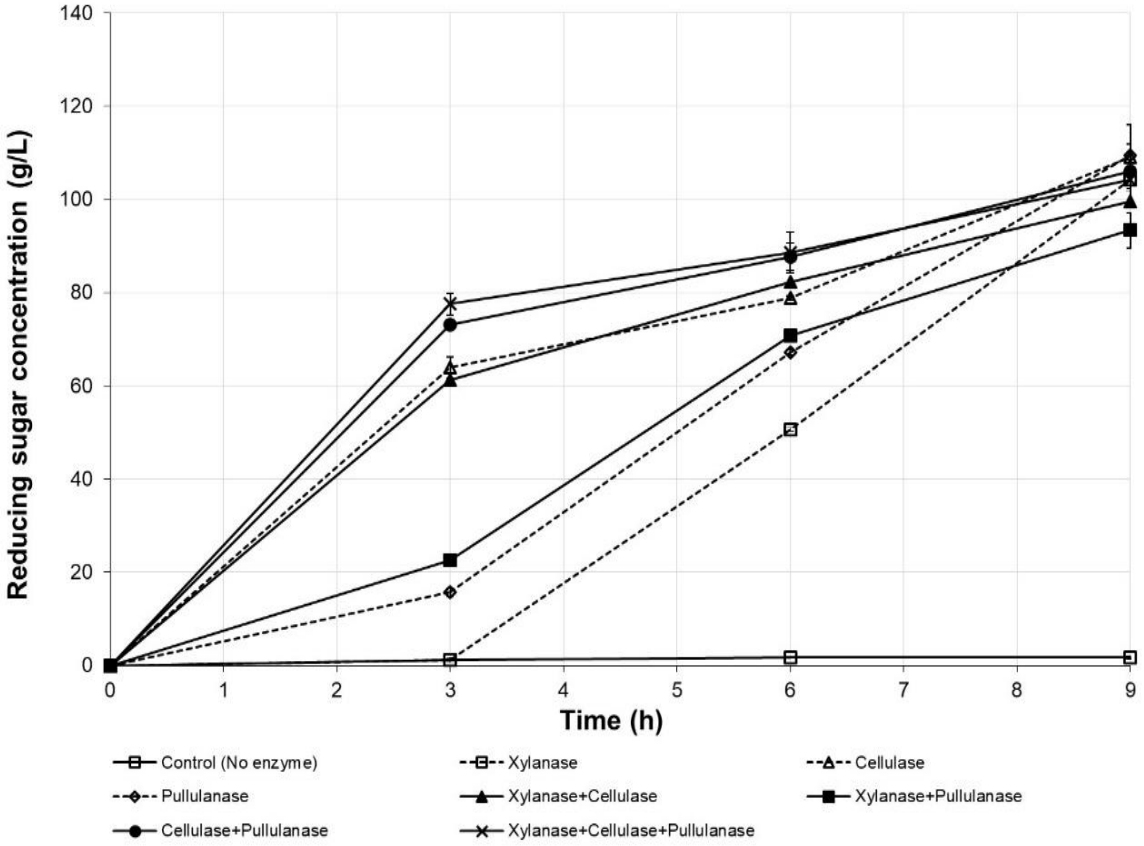
Means (n=2) from same column followed by ± standard deviation and different letter are significantly different ($p<0.05$, Duncan's test).

4.2.3 ผลของเอนไซม์สูตรเดี่ยวและเอนไซม์สูตรผสมต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์

ผลของเอนไซม์ xylanase, cellulase และ pullulanase ทั้งในสูตรเดี่ยวและสูตรผสมได้ถูกนำมาเปรียบเทียบ พบว่าสูตรเอนไซม์ผสมจะสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยของเอนไซม์

เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์จากกากมันสำปะหลังได้เพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ในขั้นตอนแรกของการย่อยด้วยเอนไซม์ เอนไซม์สูตรผสมของ xylanase: cellulase: pullulanase สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวส์สูงสุดที่ 77.51 กรัมต่อลิตร ส่วนในขั้นตอนที่สอง เมื่อทำการเติมเอนไซม์ Termamyl SC และบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เอนไซม์สูตรผสมของ xylanase + cellulase + pullulanase และ cellulase + pullulanase ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงสุดที่ 88.526 กรัมต่อลิตร และ 87.673 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ชุดการทดลองของเอนไซม์ cellulase, pullulanase และ cellulase + pullulanase ก็ให้ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณสูง หลังจากการเติมเอนไซม์ AMG 300L ในขั้นตอนสุดท้าย โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์ที่ 109.13 กรัมต่อลิตร 109.34 กรัมต่อลิตร และ 106.07 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และตารางที่ 4.6 และแนวโน้มของการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ในชุดการทดลองของ xylanase + cellulase + pullulanase และ cellulase + pullulanase ใช้ใกล้เคียงกัน จากทดสอบชุดการทดสอบของ cellulase + pullulanase ได้รับการคัดเลือกเพื่อใช้เป็นเอนไซม์สูตผสมสำหรับการกากมันสำปะหลังเพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ เนื่องจากในชุดการทดลองนี้ใช้ชนิดของเอนไซม์ลดลง (ไม่มี xylanase) นอกจากนี้ เอนไซม์ debranching มีผลในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อย การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Termamyl SC อาจเกิดจากปริมาณสารตั้งต้นในกากมันมีปริมาณน้อยและมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้สูง ซึ่งเกิดจากการย่อยโดยเอนไซม์ debranching ในขั้นตอนแรกของการย่อยด้วยเอนไซม์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.4 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์สูตรเดี่ยวและสูตรผสมในขั้นตอนแรก และตามด้วยเอนไซม์ Termamyl SC และ AMG 300L

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ สูตรเดี่ยวและสูตรผสมในขั้นตอนแรก และตามด้วยเอนไซม์ Termamyl SC และ AMG 300L

ชุดการทดสอบ	ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ (ที่ 9 h) (กรัมต่อกรัมของกากมันสำปะหลังแห้ง)
Control (No enzyme)	0.01 ± 0.00 [d]
Xylanase	0.59 ± 0.01 [ab]
Cellulase	0.61 ± 0.04 [a]
Pullulanase	0.62 ± 0.01 [a]
Xylanase + Cellulase	0.56 ± 0.00 [bc]
Xylanase + Pullulanase	0.53 ± 0.02 [ac]
Cellulase + Pullulanase	0.60 ± 0.01 [ab]
Xylanase + Cellulase + Pullulanase	0.59 ± 0.03 [ab]

Means (n=2) from same column followed by ± standard deviation and different letter are significantly different ($p<0.05$, Duncan's test).

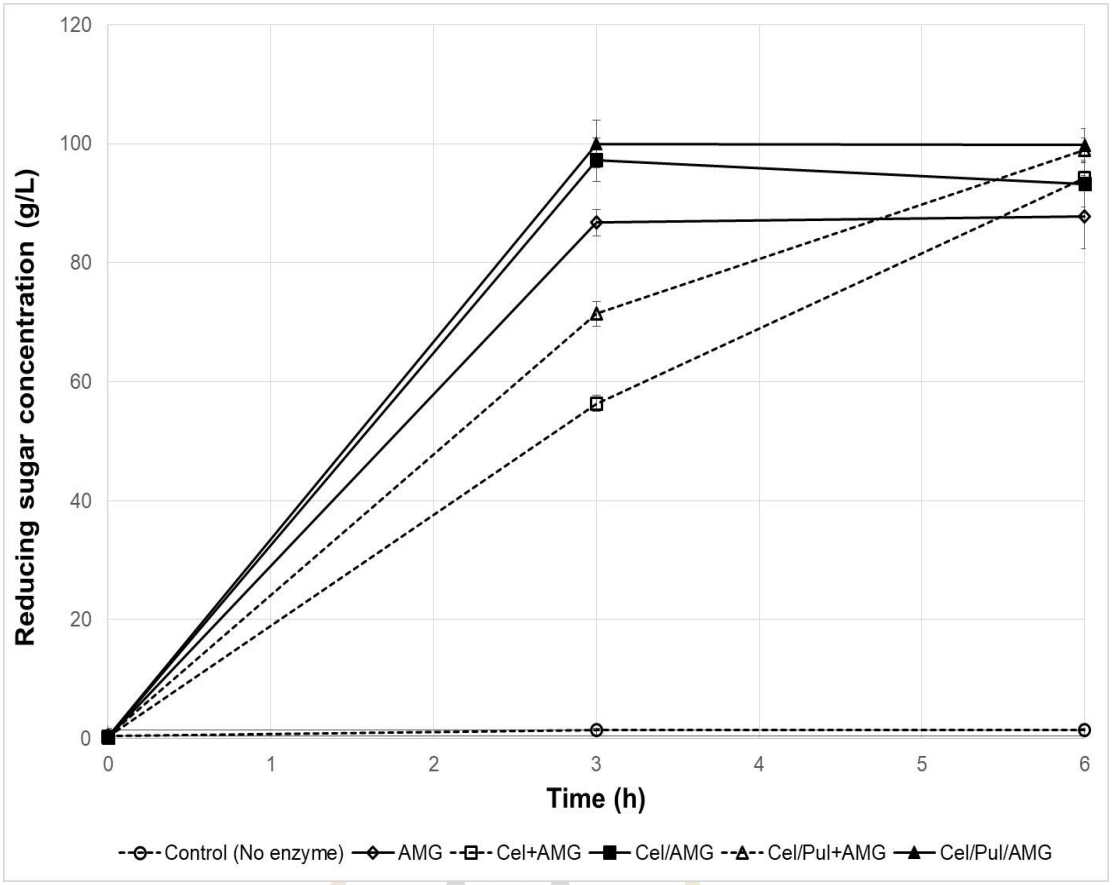
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.3 การปรับปรุงขั้นตอนการเติมเอนไซม์เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์จากกากมันสำปะหลัง

ในการทดลองครั้งนี้ เอนไซม์ Termamyl SC ได้ถูกนำออกจากระบบการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อลดขั้นตอนการย่อยกากมันสำปะหลังลง สามารถลดเวลาและปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง ประสิทธิภาพของการย่อยของเอนไซม์ cellulase และ pullulanase ทั้งในการย่อยแบบขั้นตอนเดียวและการย่อยแบบสองขั้นตอนร่วมกับการเติมเอนไซม์ AMG 300L ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ในการย่อยแบบสองขั้นตอน ในชุดการทดลองของ Cel + AMG และ

Cel / Pul + AMG โดยในชุดการทดลองของ Cel + AMG เอนไซม์ cellulase ถูกเติมลงในกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% ในขั้นตอนแรกของการย่อยและบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม AMG 300L ลงในปฏิกิริยาการย่อยในขั้นตอนถัดมาและบ่มนาน 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนในชุดการทดลองของ Cel / Pul + AMG เอนไซม์ cellulase และ pullulanase ถูกเพิ่มในขั้นตอนแรกของการย่อยและบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้น AMG 300L จะถูกเติมเข้าไปในปฏิกิริยาและบ่มนาน 3 ชั่วโมงที่ 60 องศาเซลเซียส การผลิตน้ำตาลรีดิวส์แสดงในรูปที่ 4.5 ในการเติมเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียว นอกจากนี้ ในชุดการทดลองที่ทำการเติมเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียว ได้แก่ ชุดการทดลอง AMG, ชุดการทดลอง Cel / AMG และชุดการทดลอง Cel / Pul / AMG จะทำการเติมเอนไซม์ทั้งหมดที่ใช้การชุดการทดลองในขั้นตอนแรกของการย่อยและบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง การผลิตน้ำตาลรีดิวส์ของการย่อยแบบขั้นตอนเดียวหรือสองขั้นตอน พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวส์ในปริมาณเกือบเท่ากัน โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์ที่ 87.8-99.7 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวส์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นในสูตรควบคุมและสูตร AMG ดังแสดงในตารางที่ 4.7 จากผลการทดลองนี้ ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียวมีความเหมาะสมสำหรับการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.5 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียวหรือแบบสองขั้นตอนของการเติมเอนไซม์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตาราง 4.4 ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนักที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียวหรือแบบสองขั้นตอนของการเติมเอนไซม์

ชุดการทดลอง	**ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ (ที่ 9 h) (กรัมต่อกรัมของกากมันสำปะหลังแห้ง)**
Control	0.01 ± 0.00 [c]
AMG	0.55 ± 0.05 [b]
Cel+AMG	0.59 ± 0.00 [ab]
Cel/AMG	0.58 ± 0.03 [ab]
Cel/Pul+AMG	0.62 ± 0.02 [ab]
Cel/Pul/AMG	0.62 ± 0.02 [a]

Means (n=2) from same column followed by ± standard deviation and different letter are significantly different ($p<0.05$, Duncan's test).

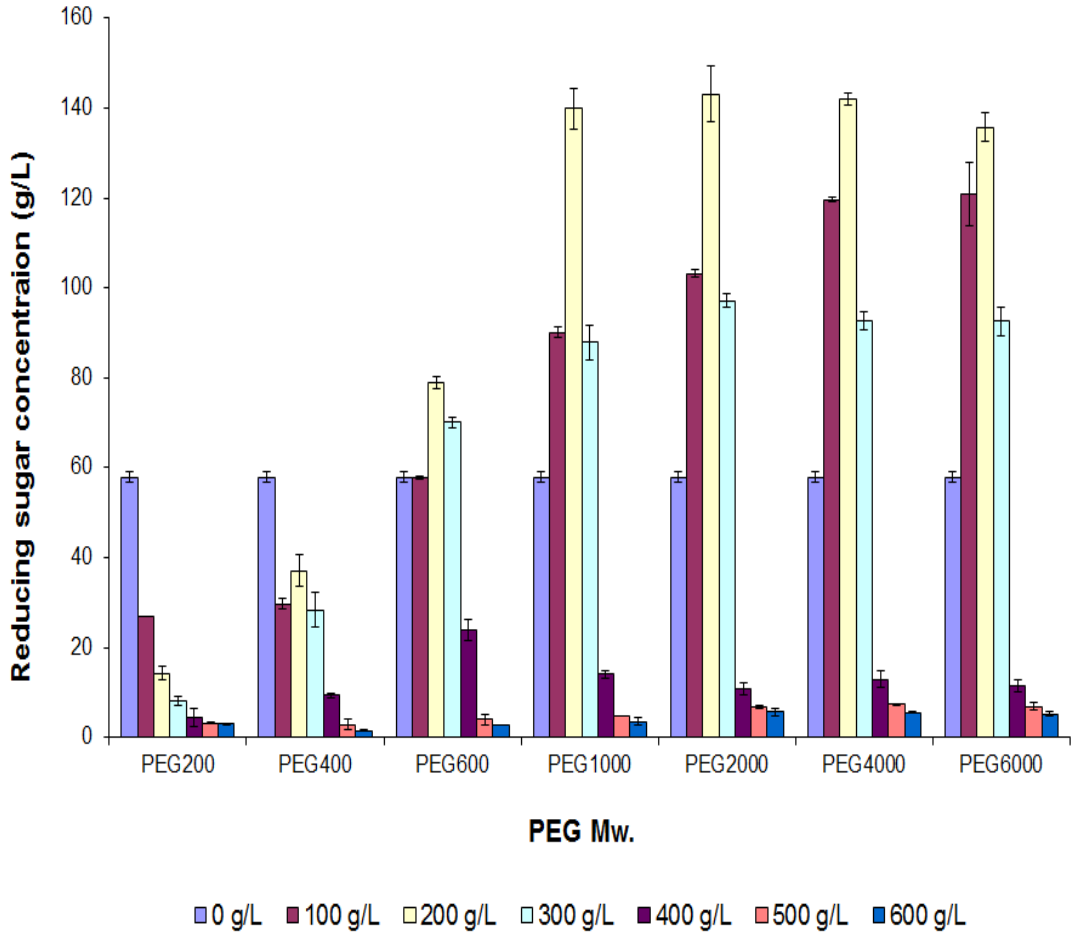
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.4 การปรับปรุงการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์โดยการเติม PEG

ผลของการเติม PEG เข้าไปในระบบของการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ได้ถูกทำการศึกษา โดยผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.6 พบว่า PEG ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ PEG200 และ PEG400 มีผลขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยกากมันสำปะหลัง เป็นผลทำให้การผลิตน้ำตาลรีดิวส์ลดลง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PEG200 และ PEG400 มีผลทำให้เกิดการขัดขวางการย่อยสูงมากขึ้น ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะโมเลกุลที่มีขนาดเล็กของ PEG มีการจับที่ไม่ก่อให้เกิดการย่อย หรืออาจจะไปขัดขวางการจับระหว่างเอนไซม์กับสารซับสเตรต ทำให้เกิดอุปสรรคต่อการย่อยกากมันสำปะหลัง อย่างไรก็ตาม ในชุดทดสอบที่ใช้ PEGที่มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่มากขึ้น ได้แก่ PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ให้ผลเชิง

บวกต่อการเพิ่มขึ้นของการย่อยของกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ โดยที่ความเข้มข้นที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงสุดคือ 200 กรัมต่อลิตรของ PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์ที่ 143.079 กรัมต่อลิตร, 141.970 กรัมต่อลิตร และ 135.759 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และให้ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ 0.87 ± 0.04 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง, 0.88 ± 0.01 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง และ 0.86 ± 0.02 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 เมื่อความเข้มข้นของ PEG ที่เพิ่มสูงขึ้นที่ความเข้มข้น 400 กรัมต่อลิตร, 500 กรัมต่อลิตรและ 600 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพของการย่อยลดลง นอกจากนี้ความเข้มข้นสูงของ PEG ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มีผลต่อความหนืดที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งทำให้เกิดความยากในการผสม

สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการเพิ่มความสามารถในการย่อยของเอนไซม์ในการย่อยลิกโนเซลลูโลส โดยส่วนใหญ่จะใช้สารที่เป็นสารในกลุ่มที่มีโพลีเอธิลีนออกไซด์ (polyethylene oxide) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถละลายน้ำได้ (Kaar and Holtzapple, 1998; Ballesteros et al., 1998; Eriksson et al., 2002; Börjesson et al. , 2007a; Börjesson et al., 2007b) โดยพบว่า PEG เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยเซลลูโลสและเพิ่มความเข้มข้นของ endoglucanase ที่เป็นอิสระ หลังจากการย่อยของฟางข้าวสาลีที่ผ่านกระบวนการ pretreat (Kristensen, 2007) นอกจากนี้ PEG ยังช่วยป้องกันการใช้งานของเอนไซม์และทำให้พื้นผิวสามารถทนต่อการดูดซับโปรตีน (Malmsten et al., 1998; Jeon et al., 1991) จากรายงานของ Börjesson et al. (2007b) อธิบายว่าการเพิ่มขึ้นของความสามารถในการย่อยของเอนไซม์เมื่อมีการเติม PEG จะเกี่ยวข้องกับความยาวของ ethylene oxide ซึ่งอาจจะมีผลต่อ: (i) เมื่อความยาวของ ethylene oxide เพิ่มขึ้นพอลิเมอร์ทำให้ความสามารถในการจับกับลิกนินเพิ่มมากขึ้น (ii) เมื่อ PEG ถูกดูดซับบนพื้นผิวของ substrate, สายยาวของ ethylene oxide จะขยายออกมาจากพื้นผิวปกคลุมลิกนินไว้ ซึ่งจะมีผลทำให้เอนไซม์ไม่ถูกดูดซับ และทำให้เอนไซม์ออกอยู่ในสารละลายและทำงานได้มากขึ้นเพื่อการย่อยเซลลูโลส ปริมาณที่ใช้จะมีผลต่อความยาวของสายพอลิเมอร์ (Malmsten et al., 1998) การดูดซับของเอนไซม์บนพื้นผิวของ substrate จะลดลงอย่างมากเมื่อมีการเติม PEG คล้ายกับผลของผลของสารลดแรงตึงผิว (surfactants) (Eriksson et al., 2002)



รูปที่ 4.6 ผลของการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 100-600 กรัมต่อลิตร ในการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ด้วยเอนไซม์สูตรผสมของ cellulase: pullulanase: AMG ที่สัดส่วน 1: 1: 1 (% โดยปริมาตร)

ตารางที่ 4.5 ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 100-600 กรัมต่อลิตร

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้น (g/L)	Yield (g/g CP)	ชุดการทดลอง	ความเข้มข้น (g/L)	Yield (g/g CP)
Control	0	0.37 ± 0.01 ^{i}			
PEG200	100	0.13 ± 0.00 ^{m}	PEG2000	100	0.64 ± 0.01 ^{c}
	200	0.06 ± 0.01 ^{nop}		200	0.87 ± 0.04 ^{a}
	300	0.03 ± 0.01 ^{opq}		300	0.60 ± 0.01 ^{d}
	400	0.03 ± 0.01 ^{pq}		400	0.06 ± 0.01 ^{nop}
	500	0.02 ± 0.00 ^{q}		500	0.04 ± 0.01 ^{nopq}
	600	0.01 ± 0.00 ^{q}		600	0.03 ± 0.01 ^{pq}
PEG400	100	0.18 ± 0.01 ^{k}	PEG4000	100	0.75 ± 0.00 ^{b}
	200	0.22 ± 0.02 ^{j}		200	0.88 ± 0.01 ^{a}
	300	0.16 ± 0.02 ^{kl}		300	0.57 ± 0.01 ^{e}
	400	0.06 ± 0.00 ^{nop}		400	0.07 ± 0.01 ^{n}
	500	0.01 ± 0.01 ^{q}		500	0.04 ± 0.00 ^{nopq}
	600	0.01 ± 0.00 ^{q}		600	0.03 ± 0.00 ^{opq}
PEG600	100	0.36 ± 0.00 ^{i}	PEG6000	100	0.72 ± 0.04 ^{b}
	200	0.49 ±0.01 ^{g}		200	0.86 ± 0.02 ^{a}
	300	0.43 ±0.01 ^{h}		300	0.56 ± 0.02 ^{e}
	400	0.14 ±0.02 ^{lm}		400	0.07 ± 0.01 ^{no}
	500	0.02 ±0.01 ^{q}		500	0.04 ± 0.01 ^{nopq}
	600	0.02 ±0.00 ^{q}		600	0.03 ± 0.00 ^{pq}
PEG1000	100	0.42 ± 0.01 ^{h}			
	200	0.65 ± 0.03 ^{c}			
	300	0.53 ± 0.02 ^{f}			
	400	0.06 ± 0.01 ^{nop}			
	500	0.02 ± 0.00 ^{q}			
	600	0.01 ± 0.00 ^{q}			

Means (n=2) from same column followed by ± standard deviation and different letter are significantly different ($p<0.05$, Duncan's test).

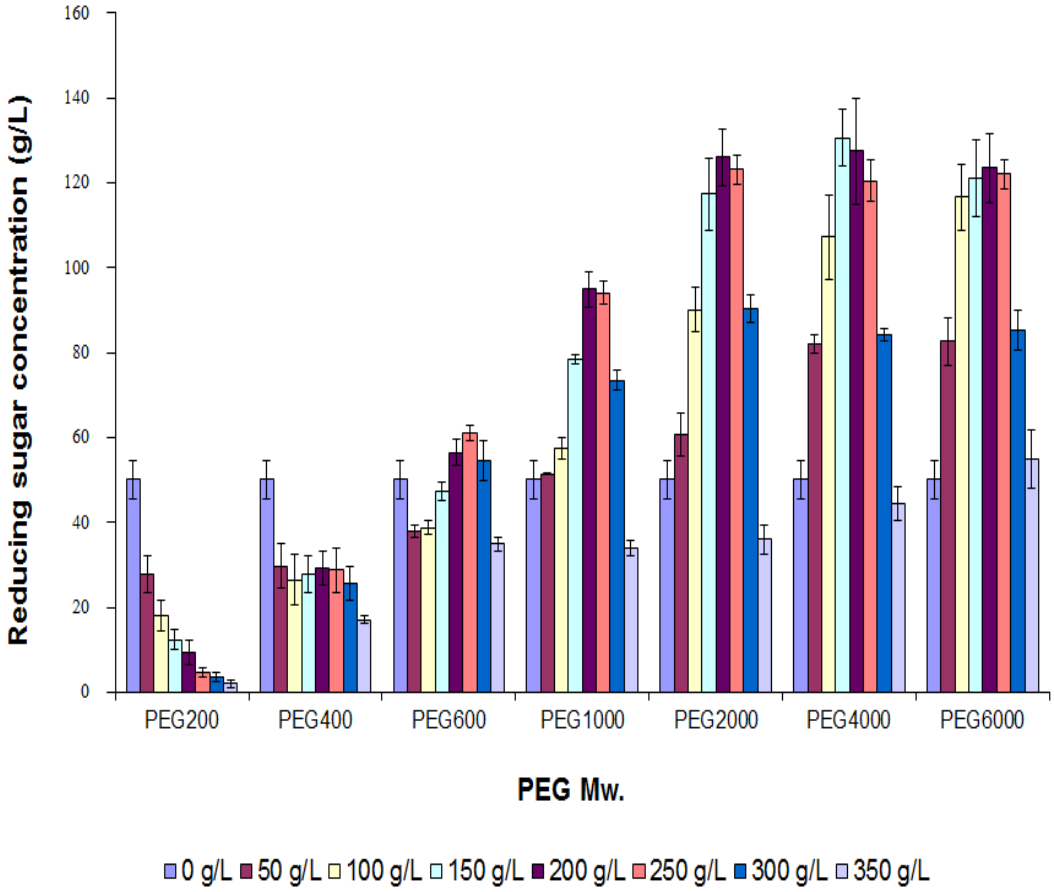
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.5 การหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PEG ต่อการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

จากผลการทดลองก่อนหน้า พบว่าความเข้มข้นของ PEG ที่ 400-600 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ ในการทดสอบหาความชนิดและเข้มข้นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ PEG ที่มีขนาดโมเลกุลและความเข้มข้นต่างๆ ระหว่าง 50-350 กรัมต่อลิตร ได้ถูกนำมาทดสอบเพื่อให้ช่วงของการทดสอบมีกระจ่างมากขึ้น ดังแสดงรูปที่ 4.8 พบว่า PEG200 และ PEG400 มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ ความเข้มข้นของ PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ 100-250 กรัมต่อลิตร ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยและให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวส์สูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตรของ PEG4000 ดังแสดงในตารางที่ 3.9

อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการย่อยของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น เมื่อความยาวของสายไฮดรอกซีเอทิลีนออกเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเมื่อใช้ PEG 4000 และ PEG6000 ตัวลดแรงตึงผิวถูกเปลี่ยนเป็นเอธิลีนออกไซด์พอลิเมอร์โดยมีหมู่ alkyl ที่ยึดติดอยู่ การดูดซับของเอนไซม์ cellulase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเพิ่มสารลดแรงตึงและมีแนวโน้มของการดูดซับลดลง เมื่อความยาวของสายเอธิลีนออกไซด์เพิ่มขึ้น (Börjesson et al., 2007b)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.7 ผลของการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 50-350 กรัมต่อลิตร ในการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% w/v เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ โดยเอนไซม์สูตรผสมของ cellulase: pullulanase: AMG ที่สัดส่วน of 1: 1: 1 (% v/v)

ตารางที่ 4.6 ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% ด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 50-350 กรัมต่อลิตร

ชนิดของ PEG	ความเข้มข้น (g/L)	ค่า Yield (g/g CP)	ชนิดของ PEG	ความเข้มข้น (g/L)	ค่า Yield (g/g CP)
Control	0	0.31 ± 0.01 ^{lmn}			
PEG200	50	0.17 ± 0.00 ^{rst}	PEG2000	50	0.38 ± 0.00 ^{k}
	100	0.11 ± 0.00 ^{u}		100	0.56 ± 0.02 ^{efg}
	150	0.08 ± 0.01 ^{uv}		150	0.73 ± 0.01 ^{c}
	200	0.06 ± 0.01 ^{vw}		200	0.79 ± 0.03 ^{ab}
	250	0.03 ± 0.00 ^{w}		250	0.77 ± 0.02 ^{abc}
	300	0.02 ± 0.00 ^{w}		300	0.57 ± 0.02 ^{ef}
	350	0.01 ± 0.00 ^{w}		350	0.23 ± 0.01 ^{pq}
PEG400	50	0.19 ± 0.02 ^{qrst}	PEG4000	50	0.51 ± 0.01 ^{i}
	100	0.17 ± 0.00 st		100	0.67 ± 0.05 ^{d}
	150	0.17 ± 0.00 ^{rst}		150	0.82 ± 0.02 ^{a}
	200	0.18 ± 0.00 ^{qrst}		200	0.80 ± 0.09 ^{ab}
	250	0.18 ± 0.01 ^{qrst}		250	0.75 ± 0.02 ^{bc}
	300	0.16 ± 0.00 ^{t}		300	0.53 ± 0.01 ^{fgi}
	350	0.11 ± 0.00 ^{u}		350	0.28 ± 0.01 ^{no}
PEG600	50	0.24 ± 0.00 ^{op}	PEG6000	50	0.52 ± 0.02 ^{gi}
	100	0.24 ± 0.01 ^{op}		100	0.73 ± 0.01 ^{c}
	150	0.30 ± 0.01 ^{mn}		150	0.76 ± 0.02 ^{bc}
	200	0.35 ± 0.01 ^{kl}		200	0.77 ± 0.02 ^{abc}
	250	0.38 ± 0.02 ^{k}		250	0.76 ± 0.02 ^{bc}
	300	0.34 ± 0.01 ^{klm}		300	0.53 ± 0.02 ^{fgi}
	350	0.22 ± 0.00 ^{pqr}		350	0.34 ± 0.07 ^{klm}
PEG1000	50	0.32 ± 0.00 ^{lmn}			
	100	0.36 ± 0.01 ^{kl}			
	150	0.49 ± 0.00 ^{ij}			
	200	0.59 ± 0.02 ^{e}			
	250	0.59 ± 0.00 ^{e}			
	300	0.46 ± 0.01 ^{j}			
	350	0.21 ± 0.01 ^{pqrs}			

Means (n=2) from same column followed by ± standard deviation and different letter are significantly different ($p<0.05$, Duncan's test).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.6 การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นต่างๆ โดยเชื้อยีสต์ S. cerevisiae L3109 ในกระบวนการหมักแบบ SHF

ในขั้นตอนแรกของกระบวนการหมักแบบ SHF จะทำการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เพื่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ ในการย่อยด้วยเอนไซม์จะทำการเติม PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ได้แก่ PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 50-350 กรัมต่อลิตร ของเหลวที่ได้จากการย่อย (hydrolysates) จะถูกแยกออกจากกากของแข็งที่เหลือจากการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อใช้ในการเตรียมน้ำหมัก โดยทำการเติมสารอาหารพื้นฐานและนึ่งฆ่าเชื้อ ผลผลิตน้ำตาลรีดิวส์ของขั้นตอนการย่อยแสดงในตารางที่ 4.10 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง เมื่อเติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร ในปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์

ในขั้นตอนการหมัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจะมีความแตกต่างกันตามประสิทธิภาพของการย่อยได้ในแต่ละชุดการทดลอง ขั้นตอนการหมักได้ดำเนินการต่อไปอีกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และผลการตรวจสอบกระบวนการ SHF แสดงในรูปที่ 4.8 ถึงรูปที่ 4.19 กราฟแสดงการเติบโตของเซลล์และแนวโน้มของการผลิตเอทานอล รวมทั้งการบริโภคน้ำตาลรีดิวส์ของเชื้อยีสต์ รูปแบบของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองมีแนวโน้มความคล้ายคลึงกันในแต่ละชุดการทดลอง นอกเหนือจากความเข้มข้นของเอทานอลขั้นสุดท้ายที่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นก่อนการหมัก คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงจะให้ความเข้มข้นของเอทานอลขั้นสุดท้ายและการเติบโตของเซลล์ที่สูง

จากผลการทดลองที่ได้ ในขั้นตอนของการย่อย พบว่าผลลัพธ์ที่ดีที่สุดในแง่ของการผลิตน้ำตาลรีดิวส์จะให้ผลผลิตที่ 0.81, 0.79 และ 0.80 กรัมต่อกรัมของกากมันสำปะหลังแห้ง โดยการเติม 200 กรัมต่อลิตรของ PEG 6000, 150 กรัมต่อลิตรของ PEG 6000 และ 150 กรัมต่อลิตรของ PEG4000 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.10 ส่วนในขั้นตอนการหมัก ผลลัพธ์ที่ได้จากการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.211 กรัมต่อกรัมของกากมันสำปะหลังแห้ง ในชุดการทดลองที่ทำการเติม 150 กรัมต่อลิตรของ PEG 6000 และให้ค่าที่ 0.203 กรัมต่อกรัมของกากมันสำปะหลังแห้ง ในชุดการทดลองที่ทำการเติม 150 กรัมต่อลิตร PEG 4000 ดังแสดงในตารางที่ 4.11 ประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.76 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่เวลา 12 ชั่วโมงแรกของการหมักในชุดการทดลองที่ทำการ

เติม PEG 6000 ที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร และที่ 1.71 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงในชุดการทดลองที่ทำการเติม PEG 4000 ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร

จากรายงานของ Apiwatanapiwat et al. (2013) การผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจาก CP โดยเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5925 ในกระบวนการ SHF มีความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ 5.0% w/v ที่ 42 องศาเซลเซียส หลังจากทำการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยกากมันสำปะหลังแห้งที่ความเข้มข้น 20% w/v และให้ประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลเท่ากับ 2.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่เวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.7 ค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 16% ด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 50-350 กรัมต่อลิตร ในกระบวนการหมักแบบ SHF

ชนิดของ PEG	ความเข้มข้น (g/L)	ค่า yield ของน้ำตาล (g/g กากมัน)	ชนิดของ PEG	ความเข้มข้น (g/L)	ค่า yield ของน้ำตาล (g/g กากมัน)
Control	0	0.32 ± 0.03 ^{lm}			
PEG1000	50	0.26 ± 0.00 ^{mn}	PEG4000	50	0.50 ± 0.00 ^{ij}
	100	0.33 ± 0.02 ^{l}		100	0.68 ± 0.02 ^{de}
	150	0.47 ± 0.02 ^{j}		150	0.80 ± 0.03 ^{ab}
	200	0.52 ± 0.02 ^{hij}		200	0.75 ± 0.00 ^{bc}
	250	0.58 ± 0.02 ^{fg}		250	0.67 ± 0.01 ^{de}
	300	0.40 ± 0.01 ^{k}		300	0.47 ± 0.01 ^{j}
	350	0.21 ± 0.03 ^{n}		350	0.21 ± 0.00 ^{n}
PEG2000	50	0.35 ± 0.04 ^{kl}	PEG6000	50	0.49 ± 0.00 ^{ij}
	100	0.47 ± 0.02 ^{j}		100	0.65 ± 0.03 ^{de}
	150	0.52 ± 0.02 ^{hij}		150	0.79 ± 0.03 ^{ab}
	200	0.64 ± 0.06 ^{ef}		200	0.81 ± 0.06 ^{a}
	250	0.70 ± 0.02 ^{cd}		250	0.66 ± 0.03 ^{de}
	300	0.56 ± 0.00 ^{gh}		300	0.55 ± 0.05 ^{ghi}
	350	0.23 ± 0.03 ^{n}		350	0.26 ± 0.01 ^{n}

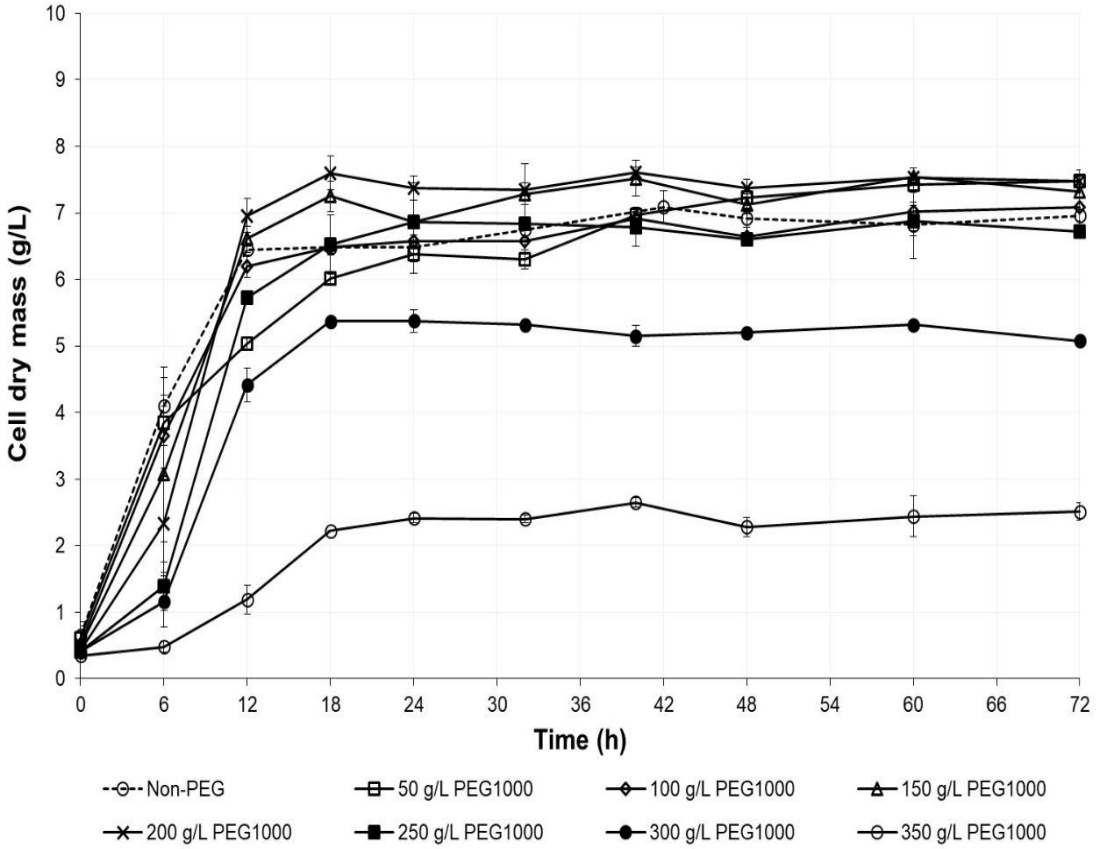
Means (n=2) from same column followed by ± standard deviation and different letter are significantly different ($p<0.05$, Duncan's test)

ตารางที่ 4.8 ค่า yield ของเอทานอลที่ผลิตได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นที่ 16% w/v ด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 50-350 กรัมต่อลิตร ในกระบวนการหมักแบบ SHF

ชนิดของ PEG	ความเข้มข้น (g/L)	ค่า yield เอทานอล (g/g CP)				ชนิดของ PEG	ความเข้มข้น (g/L)	ค่า yield เอทานอล (g/g CP)			
Control	50	0.084	±	0.004	m						
PEG1000	100	0.074	±	0.004	n	PEG4000	50	0.138	±	0.003	fg
	150	0.097	±	0.003	l		100	0.175	±	0.002	e
	200	0.118	±	0.001	i		150	0.203	±	0.001	b
	250	0.139	±	0.000	fg		200	0.190	±	0.002	c
	300	0.141	±	0.003	f		250	0.183	±	0.003	d
	350	0.102	±	0.002	kl		300	0.111	±	0.000	j
	50	0.039	±	0.003	p		350	0.0524	±	0.003	o
PEG2000	100	0.104	±	0.002	k	PEG6000	50	0.128	±	0.002	h
	150	0.143	±	0.003	f		100	0.186	±	0.003	cd
	200	0.175	±	0.001	e		150	0.211	±	0.003	a
	250	0.189	±	0.001	c		200	0.205	±	0.002	b
	300	0.188	±	0.002	cd		250	0.177	±	0.002	e
	350	0.134	±	0.001	g		300	0.181	±	0.002	j
	50	0.0444	±	0.003	p		350	0.198	±	0.000	o

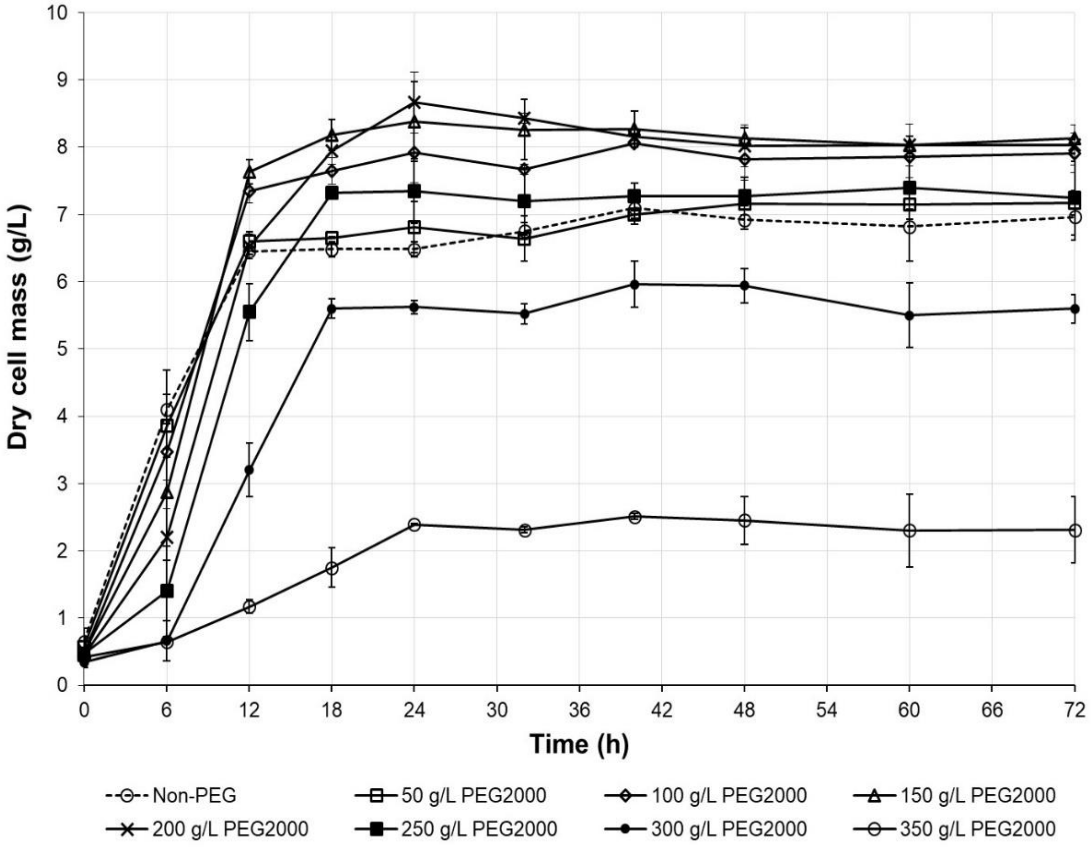
Means (n=2) from same column followed by ± standard deviation and different letter are significantly different ($p<0.05$, Duncan's test).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



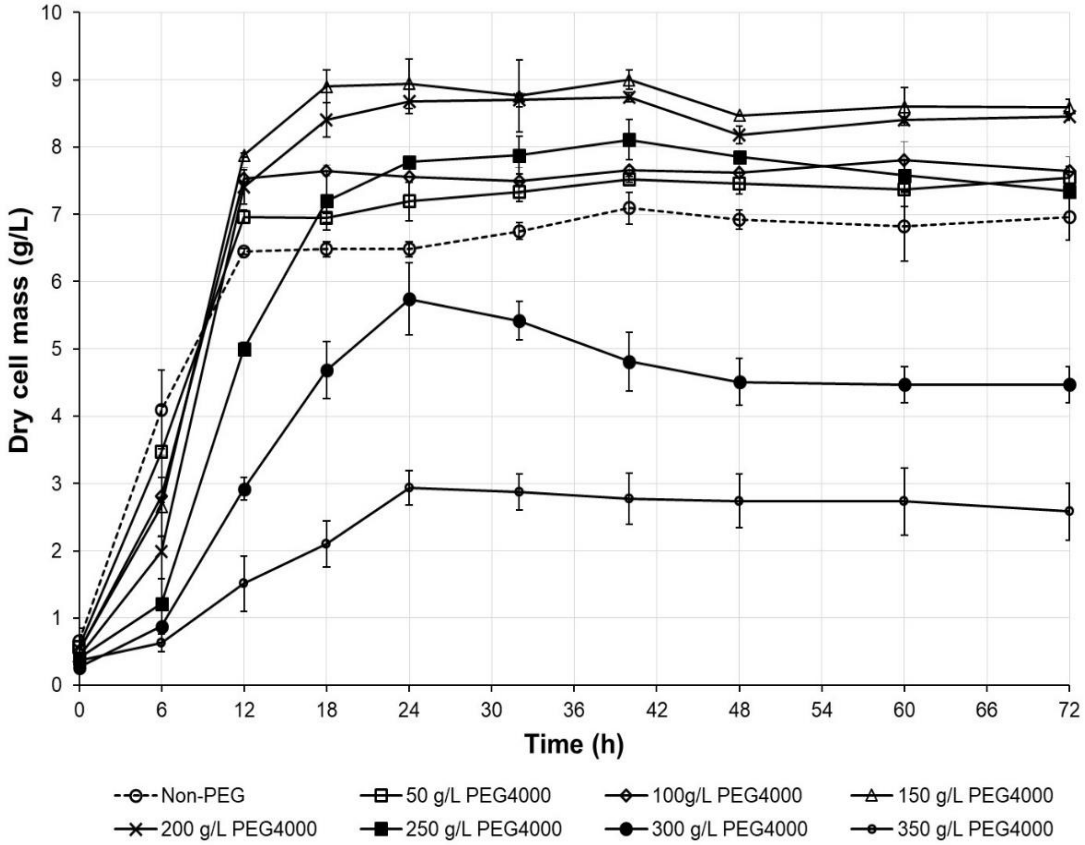
รูปที่ 4.8 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG1000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



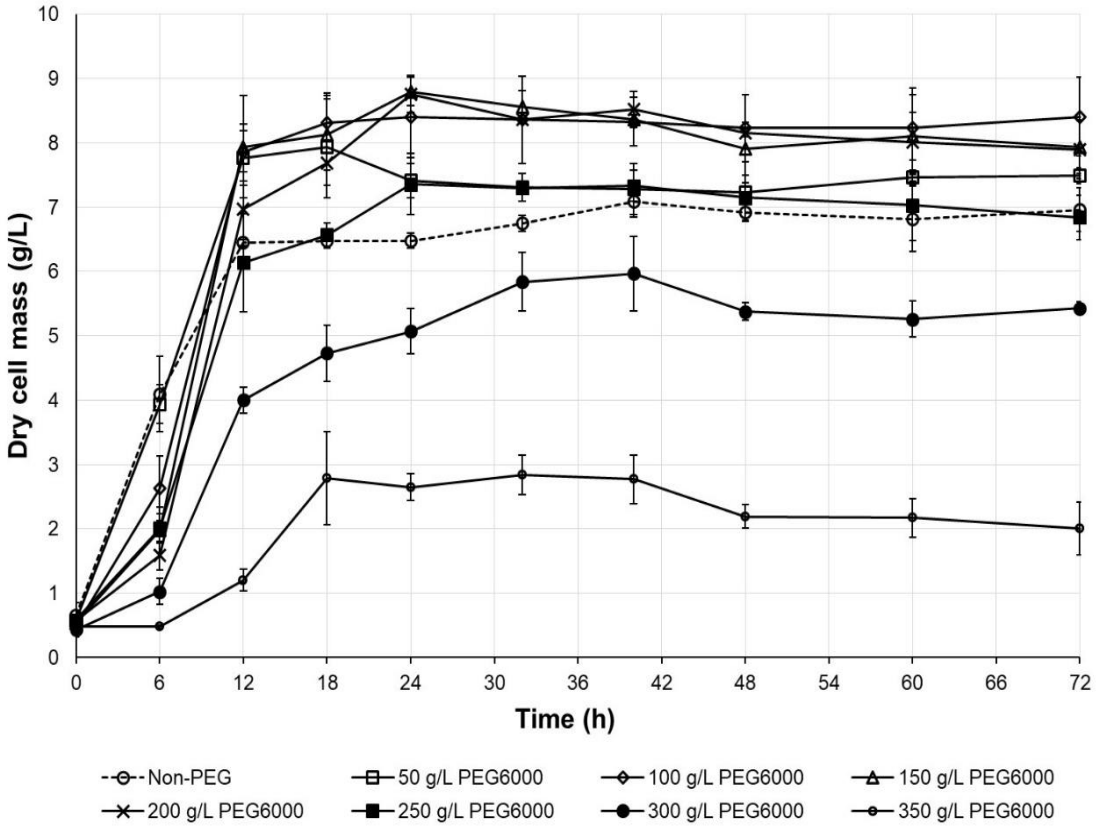
รูปที่ 4.9 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG2000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



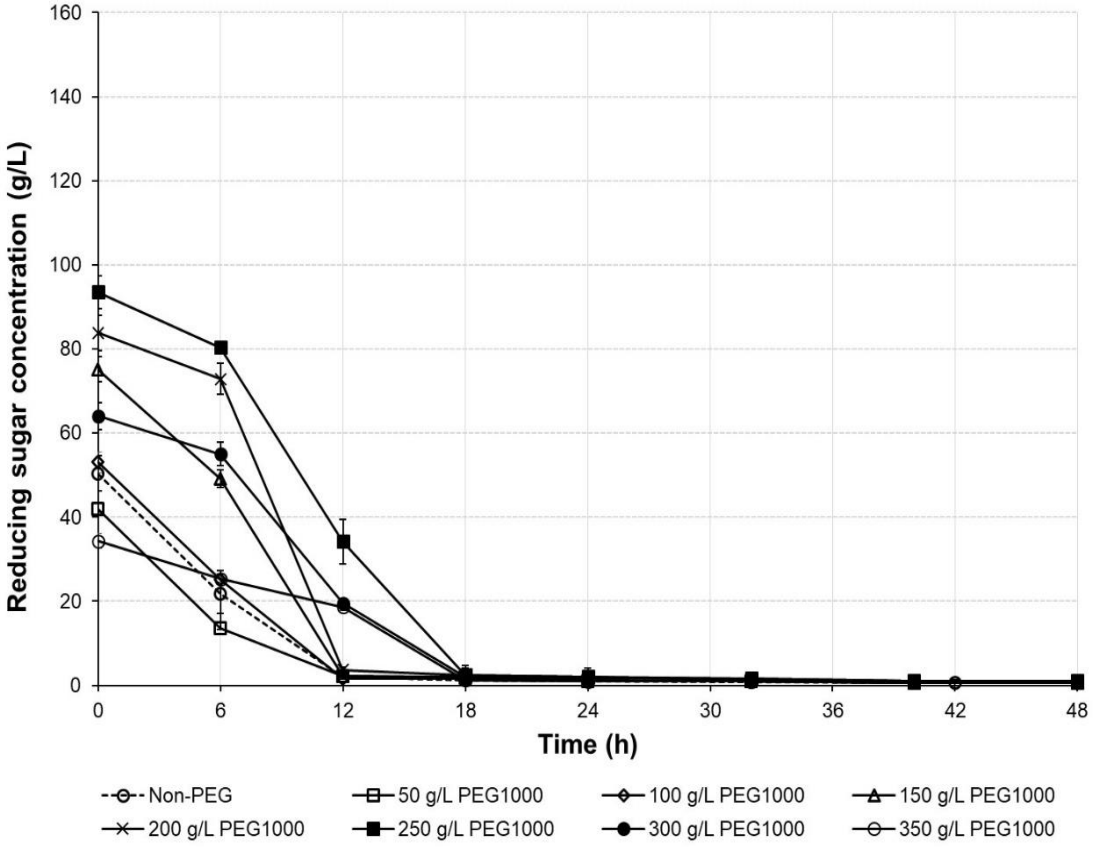
รูปที่ 4.10 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



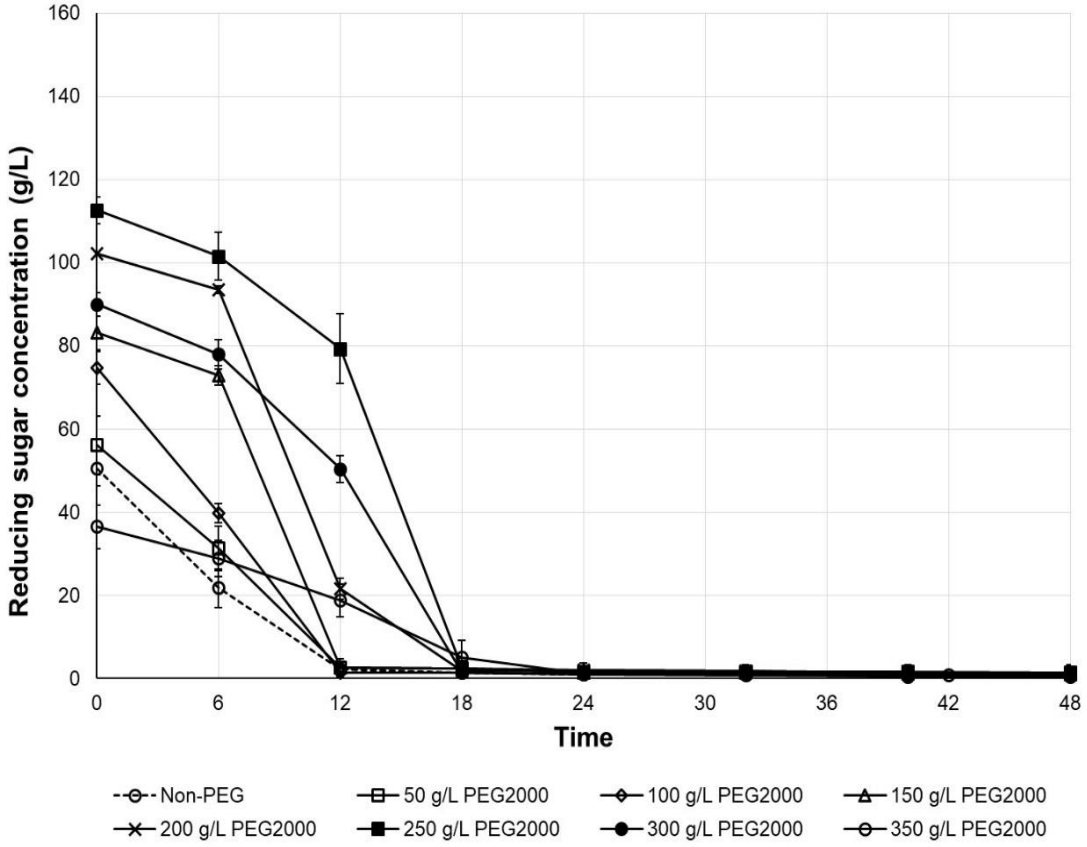
รูปที่ 4.11 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



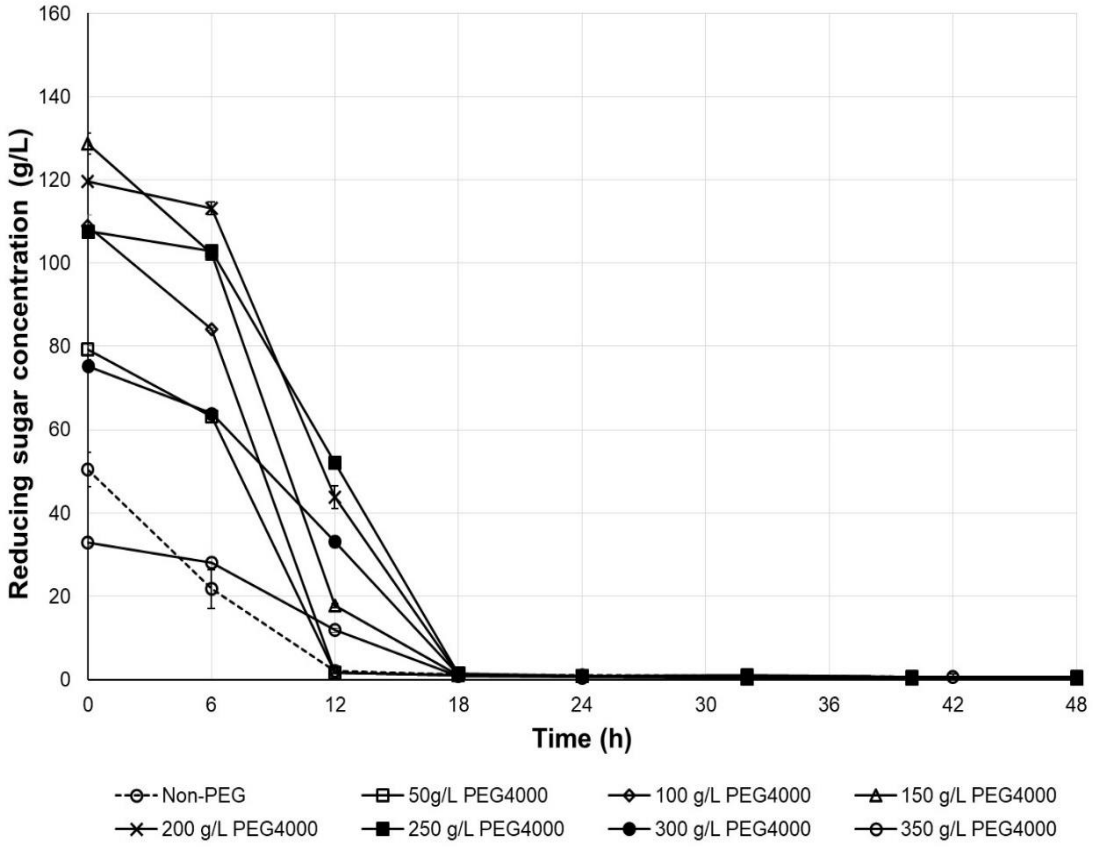
รูปที่ 4.12 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG1000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



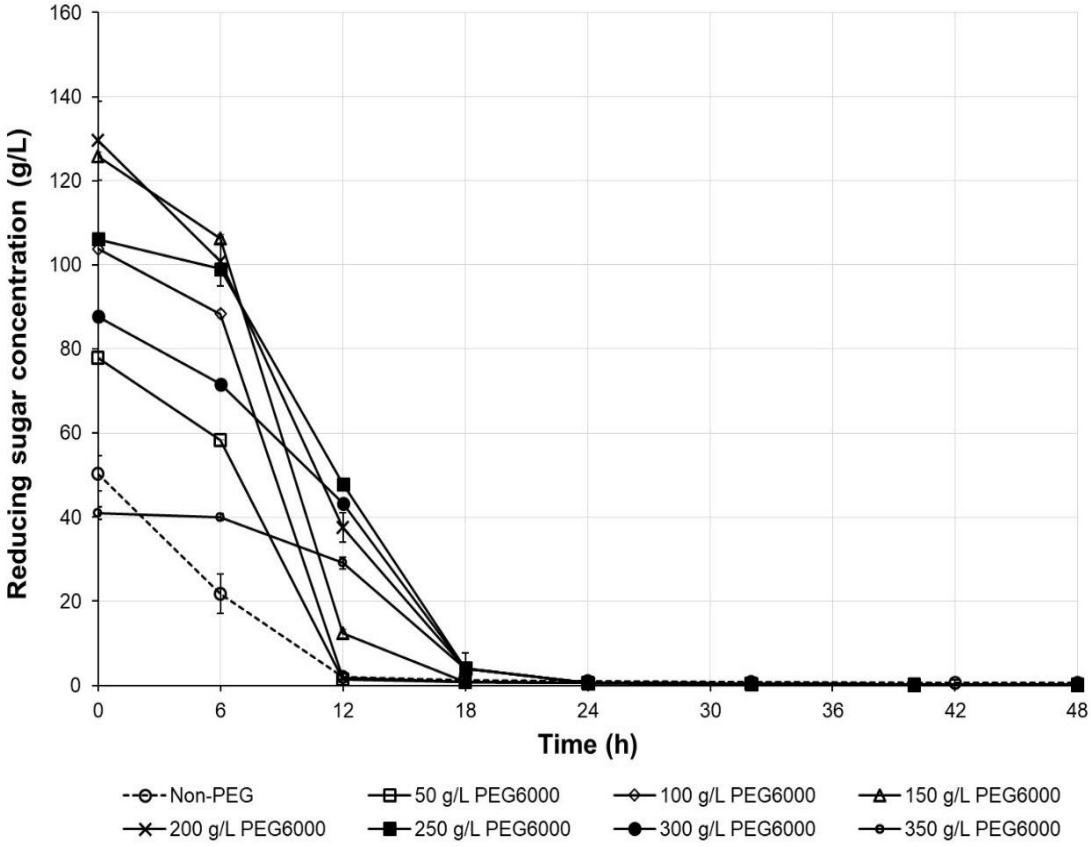
รูปที่ 4.13 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG2000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



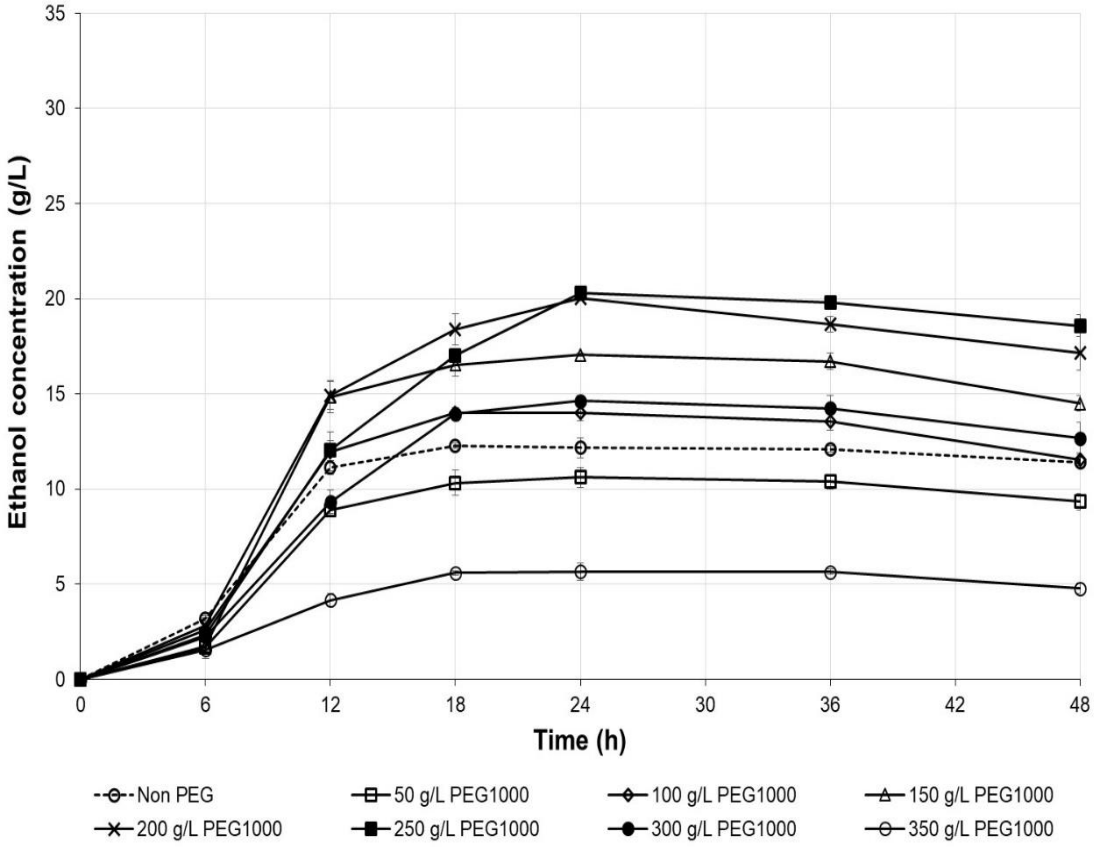
รูปที่ 4.14 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



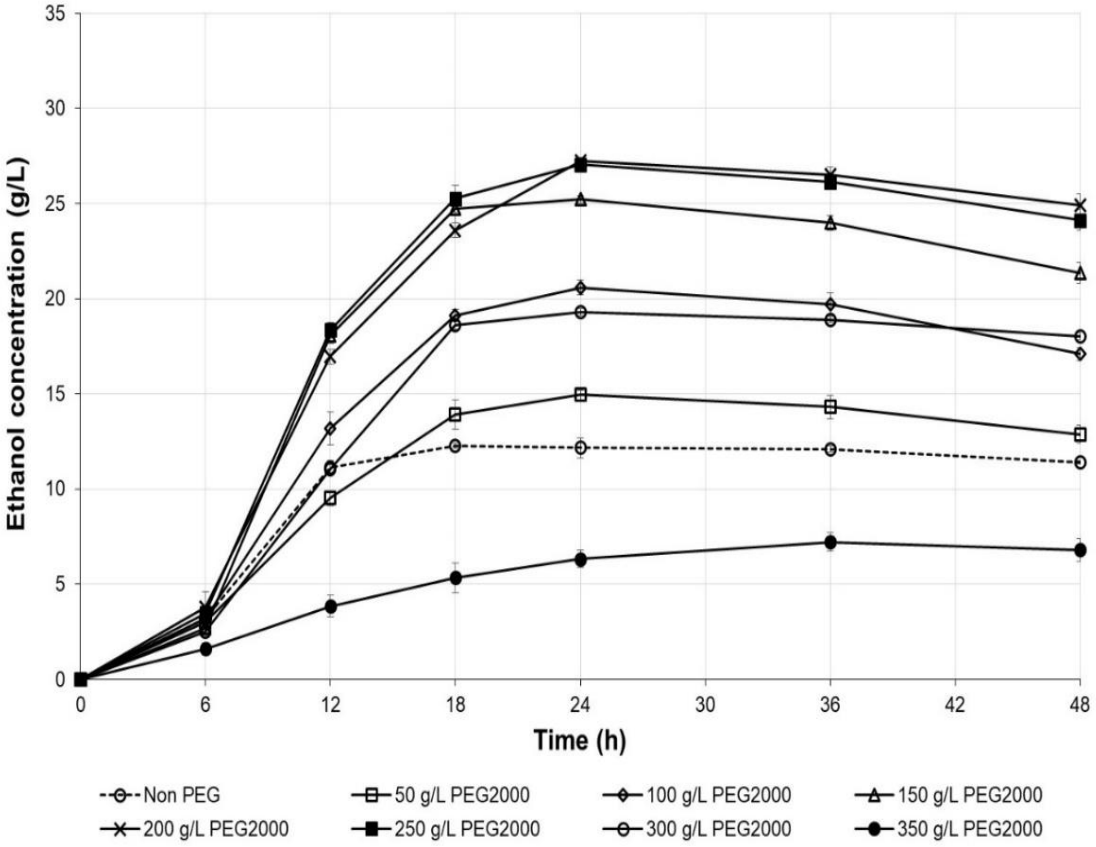
รูปที่ 4.15 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



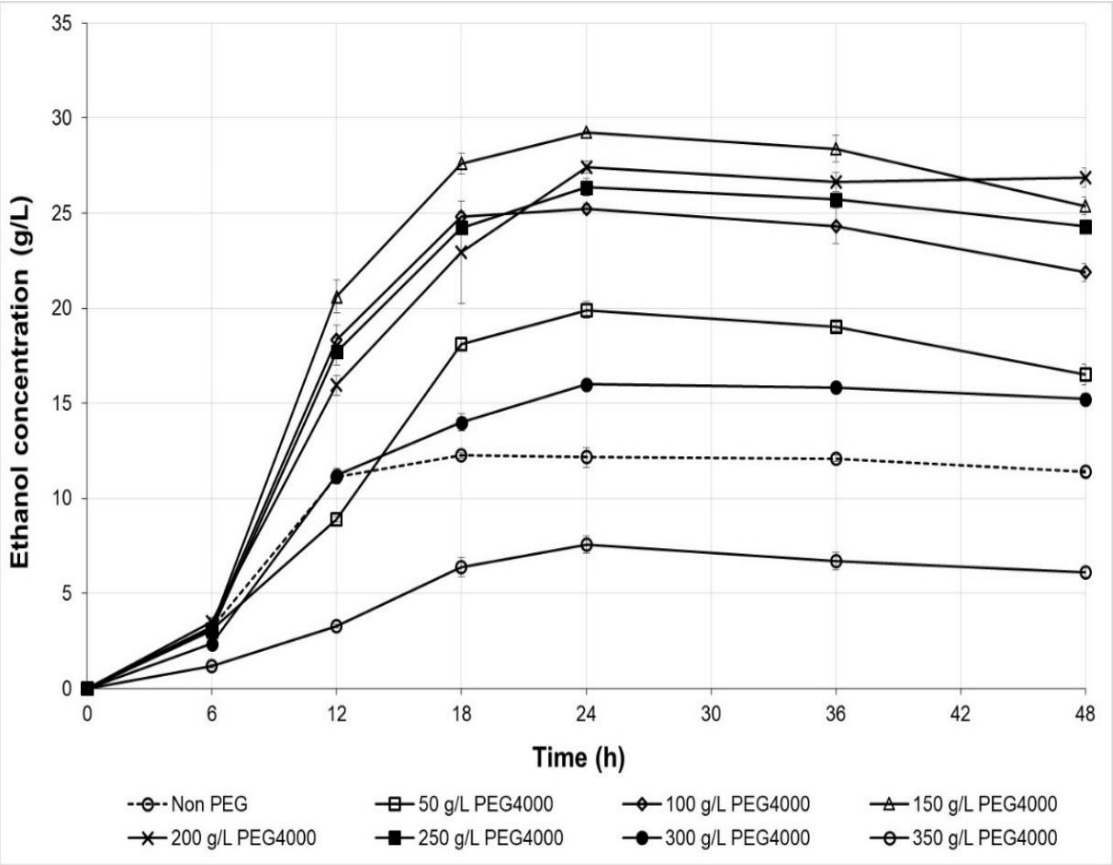
รูปที่ 4.16 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG1000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



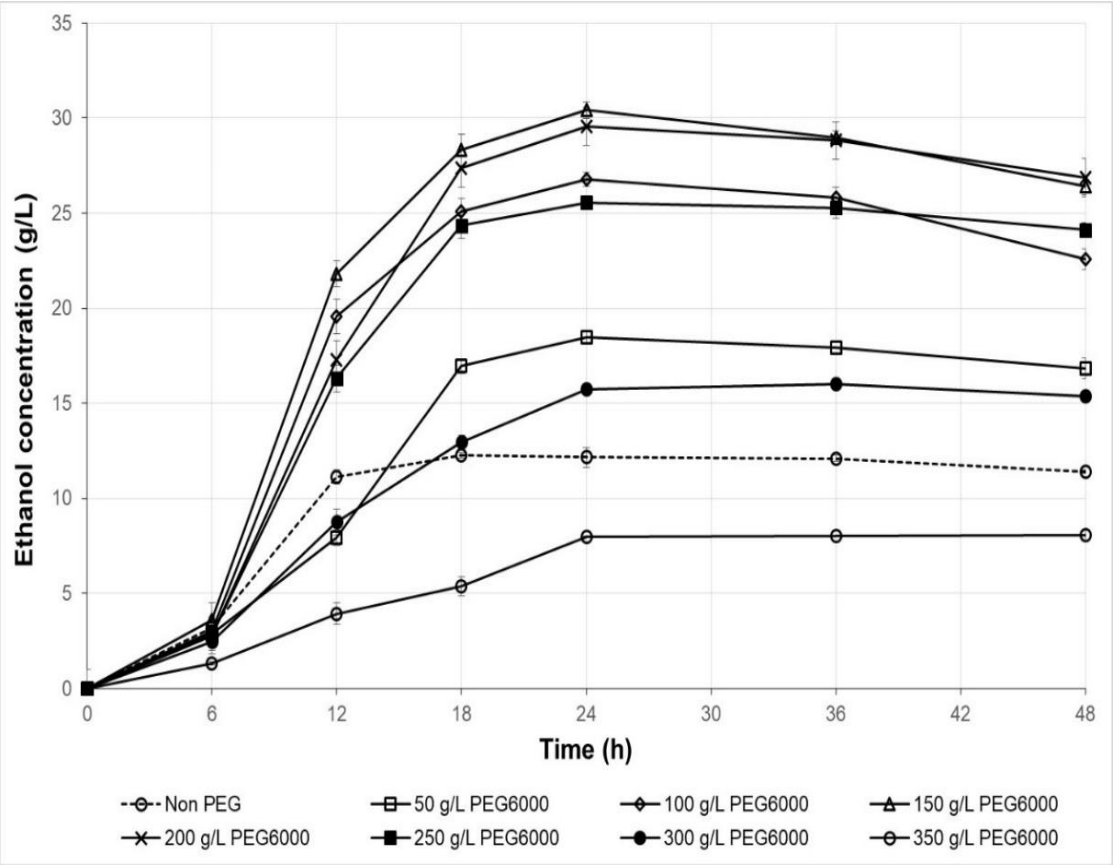
รูปที่ 4.17 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG2000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.18 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.19 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในอาหารเหลวที่เตรียมจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0 - 350 กรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

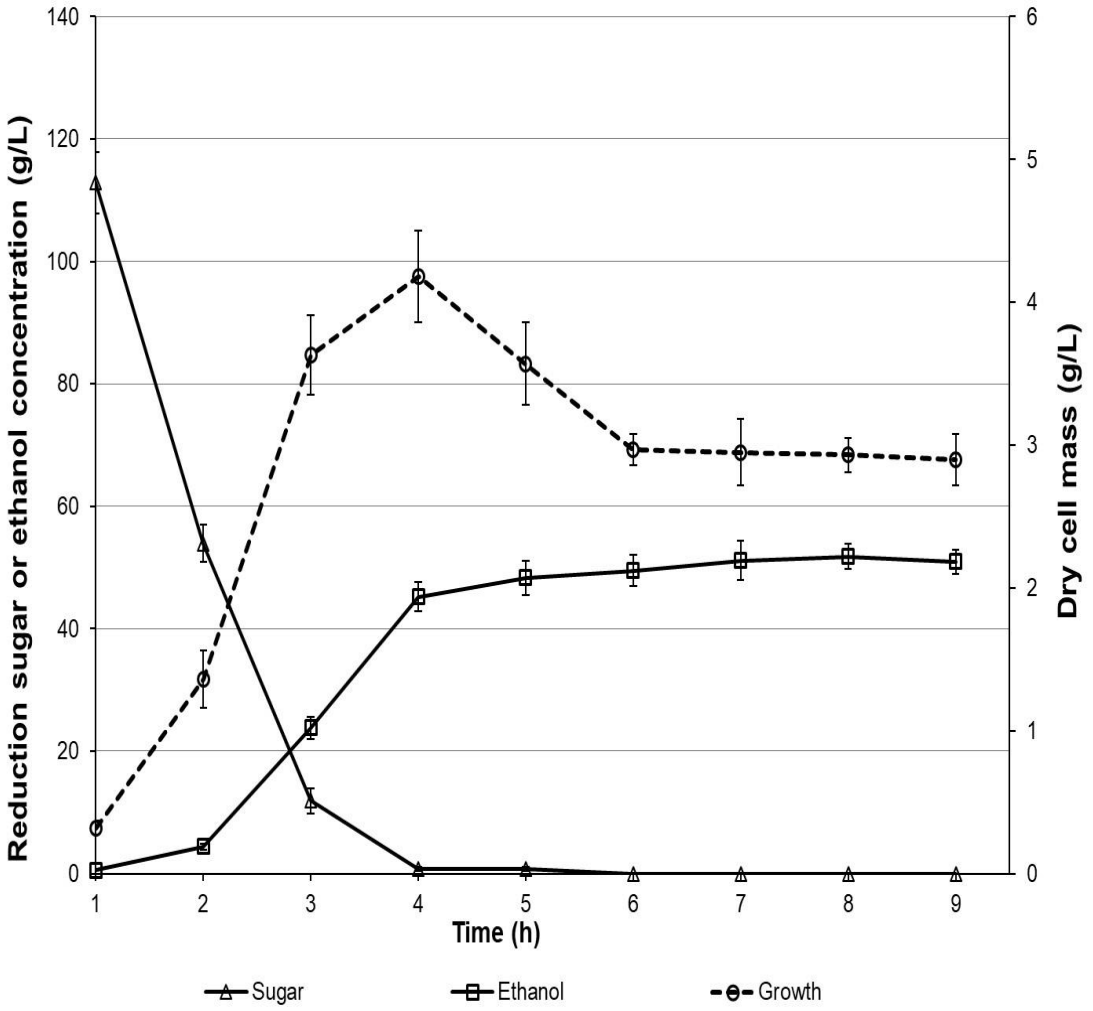
4.8 การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตรด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG4000

ในกระบวนการ SHF ในขั้นตอนแรก กากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นที่ 16% w/v จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์สูตรผสมของ cellulase : pullulanase : AMG ที่อัตราส่วน 1: 1: 1 (% v/v) ร่วมกับการเติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 จะถูกทำการวิเคราะห์ในระหว่างกระบวนการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร จากผลการทดลอง พบว่า การผลิตเอทานอลมีความเข้มข้นสูงสุดที่ 51.78 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังเริ่มการหมัก ความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องจากมี

ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับจุลินทรีย์ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก และเริ่มหยุดนิ่งหลังการหมักผ่านไปเป็นเวลา 18 ชม. อัตราการเจริญของเซลล์ยีสต์และอัตราการผลิตเอทานอลสอดคล้องกับการใช้สารตั้งต้น (น้ำตาลรีดิวส์) ดังแสดงในรูปที่ 4.20

จากผลการทดลองในกระบวนการหมักแบบ SHF ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าค่า yield ของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้ในขั้นตอนของการย่อยอยู่ที่ 0.71 ± 0.03 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลังแห้ง โดยการเติม 150 กรัมต่อลิตรของ PEG4000 และในขั้นตอนการหมัก ค่า yield ของเอทานอลที่ได้เท่ากับ 0.32 ± 0.00 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลังแห้ง และให้ค่าของประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลเท่ากับ 3.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ที่ 6 ชั่วโมงถึง 18 ชั่วโมงในระหว่างการหมัก) นอกจากนี้ ยังสามารถผลิตเอทานอลได้ที่ความเข้มข้น 51.78 ± 0.12 กรัม ต่อลิตร จากผลการทดลอง สามารถสรุปได้ว่ากระบวนการเปลี่ยนกากมันสำปะหลังด้วยกระบวนการทางชีวภาพเพื่อการผลิตเอทานอลเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและในกระบวนการนี้ สามารถลดกระบวนการในการ pre-treatment และกระบวนการ detoxification อีกด้วย

ในการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ พบว่า โดยส่วนมากการผลิตเอทานอลมักจะทำที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่ำ (น้อยกว่า 10%) ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงกระบวนการไฮโดรไลซิสและเพิ่มประสิทธิภาพการหมัก แต่จะเพิ่มความยากลำบากในการประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรม ในรายงานของ Rattanachomsri et al. (2009) สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 14.3 กรัมต่อลิตรจากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นที่ 4% w/v ในทำนองเดียวกัน Akaracharanya et al. (2011) รายงานว่าความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่สามารถผลิตได้อยู่ที่ 11.9 กรัมต่อลิตรจากกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 3% w/v ทั้งนี้ ประสิทธิภาพของการหมักลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง ใน การศึกษาโดย Kosugi et al. (2009) ชี้ให้เห็นว่าการผลิตเอทานอลโดยการหมักด้วยยีสต์ที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรมของผนังเซลล์ให้มีเอนไซม์ glucoamylase พบว่าสามารถหมักกากมันสำปะหลังที่ผ่านการ pre-treatment ที่ความเข้มข้น 30% w/v และมีการผลิตเอทานอลสูงถึง 42.1 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.20 การเจริญ การใช้น้ำตาลรีดิวส์ และผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในกระบวนการหมักแบบ SHF ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับการเติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต (NFE) 74.27% โปรตีน 2.15% เถ้า 2.32% ไขมัน 0.16% และเส้นใยดิบ 13.47% ในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ จะให้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวส์สูงสุดที่ 0.61 กรัมต่อกรัมของกากมันสำปะหลังแห้งจากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 4% w/v ความเข้มข้นของการน้ำตาลรีดิวส์จะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังในปฏิกิริยาของการย่อย เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพการย่อยและเวลาที่ใช้ในการย่อย พบว่าความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังที่ 16% w/v ได้รับเลือกเป็นความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนการย่อยและการหมัก

เอนไซม์สูตรผสมของ AMG, cellulase และ pullulanase ในอัตราส่วน 1: 1: 1 (% v/v) แสดงให้เห็นถึงการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ที่ดีที่สุด การเติมแคลเซียมไอออนมีผลต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ AMG เพียงเล็กน้อย และไม่มีผลต่อการย่อยกากมันสำปะหลังของเอนไซม์ xylanase และ hemicellulase

PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ได้แก่ PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 มีผลในเชิงบวกต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยกากมันสำปะหลัง โดย PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้นของ 100-250 กรัมต่อลิตร มีส่วนช่วยเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกระบวนการย่อย

การผลิตเอทานอลมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เริ่มต้นในขั้นตอนแรกในกระบวนการหมักแบบ SHF คือที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูง ก็จะให้ผลของการผลิตเอทานอลสูงเช่นกัน เช่นเดียวกับการเจริญของเซลล์ ในกระบวนการหมักแบบ SHF ในถังหมักขนาด 5 ลิตร การผลิตเอทานอลมีค่าเท่ากับ 51.78 ± 0.12 กรัมต่อลิตร ซึ่งชี้ให้เห็นว่า กระบวนการการเปลี่ยนกากมัน

สำปะหลังด้วยกระบวนการทางชีวภาพไปเป็นเอทานอลสามารถเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการ pre-treatment และกระบวนการ detoxification

เอกสารอ้างอิง

Akaracharanya, A., Kesornsit, J., Leepipatpiboon, N., Srinorakutara, T., Kitpreechavanich, V., and Tolieng, V. (2011). Evaluation of the waste from cassava starch production as a substrate for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Ann. Microbiol.** 61: 31–436.

AOAC. (1990). Official Methods for Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th Edn. Arlington Virginia, USA: Association of Official Analytical Chemists.

Apiwatanapiwat, W., Rugthaworn, P., Vaithanomsat, P., Thanapase, W., Kosugi, A., Arai, T., Mori, Y., and Murata, Y. (2013). Ethanol production at high temperature from CP by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* strain, TISTR 5925. **AIMS Energy.** 1: 3-16.

Ballesteros, I., Oliva, J.M., Carrasco, J., Cabanas, A., Navarro, A.A., and Ballesteros, M. (1998). Effect of surfactants and zeolites on simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded poplar biomass to ethanol. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 70: 369–81.

Börjesson, J., Engqvist, M., Sipos, B., and Tjerneld, F. (2007a). Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. **Enzyme Microb. Technol.** 41:186-195.

Börjesson, J., Peterson, R., and Tjerneld, F. (2007b). Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 754-762.

Brown, S.H., and Kelly, R.M. (1993). Characterization of amylolytic enzymes, having both **α**-1,4 and **α**-1,6 hydrolytic activity, from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 2614-2621.

Cai, B., Ge, J., Ling, H., Cheng, K., and Ping, W. (2012). Statistical optimization of dilute sulfuric acid pretreatment of corncob for xylose recovery and ethanol production. **Biomass Bioenergy.** 36: 250-257.

Dong, G., Vieille, C., Savchenko, A., and Eikus, J.G. (1997). Cloning, sequencing and expression of the gene encoding extracellular **α**-amylase from *Pyroccus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 3569-3576.

Eriksson, T., Börjesson, J., and Tjerneld, F. (2007). Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme Microb. Technol.** 31(3): 353–64.

Gao, X., Kumar, R., Singh, S., Simmons, B.A., Balan, V., Dale, B.E., and Wyman, C.E. (2014). Comparison of enzymatic reactivity of corn stover solids prepared by dilute acid, AFEX, and ionic liquid pretreatments. **Biotechnol. Biofuels**. 7: 1754-6834.

Jeon, S.I., Lee, J.H., Andrade, J.D., and Degennes, P.G. (1991). Protein surface interactions in the presence of polyethylene oxide: 1. Simplified theory. **J. Colloid Interf. Sci.** 142(1): 149–158.

Kaar, W.E., and Holtzapple, M. (1998). Benefits from Tween during enzymic hydrolysis of corn stover. **Biotechnol. Bioeng.** 59: 419–27.

Kim, S., and Dale, B.E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass Bioenergy.** 26: 361-375.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Kolusheva, T., and Marinova, A. (2007). A study of the optimal conditions for starch hydrolysis through thermostable **α**-amylase. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy.** 42(1): 93–96.

Kosugi, A., Kondo, A., Ueda, M., Murata, Y., Vaithanomsat, P., Thanapase, W., Arai, T., and Mori, Y. (2009). Production of ethanol from cassava pulp *via* fermentation with a surface-engineered yeast strain displaying glucoamylase. **Renew. Energ.** 34: 1354-1358.

Kristensen, J.B., Borjesson, J., Bruun, M.H., Tjerneld, F., and Jørgensen, H. (2007). Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 888–895.

Li, J.H., Li, S.Z., Fan, C.Y., and Yan, Z.P. (2012). The mechanism of polyethylene glycol (PEG)4000 effect on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Colloids Surf. B.** 89: 203–210.

Lin, X.L., Qiu, X.Q., Lou, H.M., Li, Z.H., Zhan, N., Huang, J.H., and Pang, Y.X. (2016). Enhancement of lignosulfonate-based polyoxyethylene ether on enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. **Ind. Crops Prod.** 80: 86–92.

Lou, H.M., Zhu, J.Y., Lan, T.Q., Lai, H.R., and Qiu, X.Q. (2013). PH-Induced lignin surface modification to reduce nonspecific cellulase binding and enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses. **ChemSusChem.** 6: 919–927.

Malmsten, M., Emoto, K., and Alstine, J.M. (1998). Effect of chain density on inhibition of protein adsorption by poly(ethylene glycol) based coatings. **J. Colloid Interf. Sci.** 202: 507–17.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31(3): 426–428.

Nakagame, S., Chandra, R.P., Kadla, J.F., and Saddler, J.N. (2011). The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglasfir on the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Bioresour. Technol.** 102: 4507–4517.

Ouyang, J., Dong, Z., Song, X., Lee, X., Chen, M., and Yong, Q. (2010). Improved enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose (Avicel PH101) by polyethylene glycol addition. **Bioresour. Technol.** 101: 6685–6691.

Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vandenberghe, L.P., and Mohan, R. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresour. Technol.** 74(1): 81–87.

Qin, C.R., Clarke, K., and Li, K.C. (2014). Interactive forces between lignin and cellulase as determined by atomic force microscopy. **Biotechnol. Biofuels.** 7: 65.

Rahikainen, J.L., Evans, J.D., Mikander, S., Kalliola, A., Puranen, T., Tamminen, T., Marjamaa, K., and Kruus, K. (2013). Cellulase–lignin interactions the role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding. **Enzyme Microb. Technol.** 53: 315–321.

Rattanachomsri, U., Tanapongpipat, S., Eurwilaichitr, L., and Champreda, V. (2009). Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. **J. Biosci. Bioeng.** 107: 488–493.

Sriroth, K., Chollakup, R., Chotineeranat, S., Piyachomkwan, K., and Oates, C.G. (2000). Processing of cassava waste for improved biomass utilization. **Bioresour. Technol.** 71: 63-69.

Tu, M.B., Pan, X.J., and Saddler, J.N. (2009). Adsorption of cellulase on cellulolytic enzyme lignin from lodgepole pine. **J. Agric. Food Chem.** 57: 7771–7778.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., and Lewis, B.A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **J. Dairy Sci.** 74: 3583-3597.

Vengadgramana, A., Balakumar, S., and Arasaratnam, V. (2012). Stimulation of thermal stability of **α**-amylase from *Bacillus icheniformis* ATCC 6346 by treating with cations. **Ceylon J. Sci. Biol. Sci.** 41(1): 35-44.

Violet, M., and Mantsala, P. (1990). Characterization of thermostable *Bacillus sterothermophillus* **α**-amylase. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 12: 427-435.

Yang, B., and Wyman, C.E. (2006). BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. **Biotech. Bioeng.** 94(4): 611–617.

Yankov, D., Dobreva, E., Beschkov, V., and Emanuilova, E. (1986). Study of optimum conditions and kinetics of starch hydrolysis by means of thermostable **α**-amylase. **Enzyme Microb. Technol.** 8(11): 665–667.

Zhang, M., Wang, F., Su, R., Qi, W., and He, Z. (2010). Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. **Bioresour. Technol.** 101: 4959-4964.

Zong, Z.Y., Ma, L.J., Yu, L., Zhang, D.Y., Yang, Z.H., and Chen, S.L. (2015). Characterization of the interactions between polyethylene glycol and cellulase during the hydrolysis of lignocellulose. **Bioenergy Res.** 8: 270–278.

Curriculum vitae

Name: **Chokchai Wanapu (Intapruk)**

Sex: Male

Nationality: Thai

Religion: Buddhism

Home Address: 114/246 Ratchsima-Pakthongchai Road, Nong Ja Bok, Muang, Nakhon ratchasima 30000, Thailand.

Present Status: Associate Professor in Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

Education Background and Experience:

From 1978 - 1982: B.Sc. (Chemistry) from Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.

From 1982 - 1984: M.Sc. (Biochemistry) from Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

From 1991 - 1994: Ph.D. (Engineering in Biotechnology) from Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan.

From 1996 – 1997: Head of Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkla 90110, Thailand.

From 1997 – 1999: Director of Center of Scientific and Equipment, Walailak University, Nakonsritummarat 80000, Thailand.

From 1999 – 2001: Director of Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

From 2002 – 2005: Manager of SUT's Farm, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

From 2006 – 2011: Chair, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

Symposium:

Krongjai, T. and **Wanapu, C.** (2004) The transformation of chitinase gene into grape plants. The 4th National Symposium on Graduate Research. 94.

Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd. N. (2004) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. The 4th National Symposium on Graduate Research. 124.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2004) Selection of maolactic bacteria for wine fermentation. The 4th National Symposium on Graduate Research. 128.

Kuapunyakoon, T., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N. and Chervin,C. (2004) What is the gene which expression depends ethylene receptor inhibition in berry of Carbernet Sauvignon at veraison. The 4th National Symposium on Graduate Research. 93.

Cheunkum, O. and **Wanapu, C.** (2002) Production of Lactic acid from cassava solid waste.The 3rd National Symposium on Graduate Research.633-634.

Sripunya, P. and **Wanapu, C.** (2005) Selection of Yeast Strains Containing β-glucosidase for improving Aroma in Grape Wine. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0100.

Tasing, K., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N., Wongkaew, S. (2005) Transformation of grape calli variety shiraz with Leucaena chitinase cDNA. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0109.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2005) Selection of malolactic bacteria for wine fermentation. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0116.

Lertpinyochaithaworn, N., Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2005) Ma-Maow wine production. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0139.

Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, F0028.

Wanapu, C., Rattana, P., Teaumroong, N. and Boonkerd, N. (2005) Success stories of stainable factory Management for the Thai traditional alcoholic beverage enterprises. In International Symposium on "Corporate sustainablility management – approaches and applications" 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-3: 1-8.

Boonkerd N., Teaumroong, N., **Wanapu C.** and Chankhun Y. (2005) Application of Bio and Bioorganic fertilizers in organic farming systems for sustainable agriculture. In International Symposium on "Corporate sustainablility management – approaches and applications" 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-4: 1-7.

Muaenjang, T. and **Wanapu, C.** (2006) The study of ethanol production of thermotolerant yeast S1 strain. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.

Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2006) Isolation and classification of thermotolerant yeast for ethanol production. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.

Wasuwan, R., Boonkerd, N. and **Wanapu, C.** (2006) Classification and nitrogen fixation efficiency analysis of *Azolla* species in rice fields of Thailand. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.

Usansa, U., Wanapu, C. and N. Boonkerd (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand, Chaing Mai, 2005.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Usansa U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C**. Arendt, E. K., Kreisz, S. and Zarnkow, M. (2008) The use of response surface methodology to optimize malting conditions of two black rice varieties (*Oryza sativa* L. indica) as a raw material for gluten- free foods. First International Symposium on Gluten-Free Products and Beverages, Cork, Ireland, September 2008.

Usansa, U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C**. Arendt, E. K., Kreisz, S. and Zarnkow, M. (2009) The optimization of malting condition for Thai rice. 10th RGJ- Congress. Pattaya, April 2009.

Usansa, U, Geiger, E., **Wanapu, C**. and Teaumroong, N. (2009) Improvement of nitrogenous content in wort produced from rice malt. ASBC Annual Meeting. Arizona, USA June 6-10, 2009.

Kongkaew, A., Wanapu, C. and Usansa, U. (2010) Response surface optimization of wort production for brewing from rice malt using commercial enzymes and malt barley. The 16th Asian Agricultural Symposium on Agricultural Technology: Sufficiency Agriculture, August 25 – 27, 2010, Faculty of Agricultural Technology, KMITL, Bangkok, Thailand.

Satsum, A, and **Wanapu, C**. (2010) FT-IR study for hydroxyapatite/alginate nanocomposite beads. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Li, L., **Wanapu, C**., Huang, X., Huang Q., and Huang, T. (2010) Genetic variation of *Brassica napus* cultivars using SSR markers. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Kongkaew, A., Wanapu, C., and Usansa, U. (2010) Beer production from rice malt based in pilot scale brewing : chemical and sensorial properties approach. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Teaumroong, N., Wanapu, C., Chankum, Y., Arjharn, W., Sang-Arthit, S., Teaimthaisong, K. and Boonkerd, N. (2010) Production and application of bioorganic fertilizers for organic farming systems in Thailand: a case study. in: H. Insam, I. Franke-Whittle, M. Goberna (Eds.), Microbes at Work. Springer, Berlin Heidelberg, 293e312.

Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C**. (2012) Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. Burapha University International Conference 2012, July 9-11, 2012, Burapha University, Chonburi Thailand.

Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C**. (2012) High selenium-Enriched Yeast Production. Burapha University International Conference 2012, July 9-11, 2012, Burapha University, Chonburi Thailand.

Muaenjang, T., Ponchana P., and **Wanapu, C**. (2012) Improved Enzymatic Hydrolysis of Cassava Residue by Polyethylene Glycol Addition. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Satsum, A, and **Wanapu, C**. (2012) FT-IR study for Aiginate/Hydroxyapatite/latex Nanocomposite Beads. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C**. (2012) Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C**. (2012) High selenium-Enriched Yeast Production. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pliansrithong P., Usansa U., and **Wanapu, C**. (2012) Protein Properties in Broken Rice for optimizing of Rice Ratio in Beer Production. School of Biotech, IAT, SUT 1st

International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Lertpinyochaithaworn N, and **Wanapu, C**. (2012) Effect of ethanolic on black-kernal rice flavonoids character. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Scientific Publication:

Intapruk, C., Tirawanchai, N., Wilairat, P. and Panyim, S.* (1984) Application of cloned malaria parasite DNA in strain identification. Mahidol University Annual Research Abstracts 11, 297.

Intapruk, C. (1984) in Manual for international laboratory workshop "Genetic engineering techniques in tropical diseases research" to be published by WHO special programme for research and training in tropical diseases, 195-204.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradubkul, S. and Panyim, S.* (1984) Strain characterization of human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, by the use of a cloned parasite DNA probe. Microbial utilization of renewable resources. 4, 210-213.

Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Wilairat, P., Yuthavong, Y. and Panyim, S.* (1985) Cloning of repetitive DNA from *Plasmodium falciparum* and its use in strain and species identification. Mahidol University Annual Research Abstracts, 12, 250.

Intapruk, C. (1985) in Manual for national laboratory workshop "DNA cloning techniques" (in Thai) to be published by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Ministry of Science and Technology, 172-188.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradabkul, S., Sertsrivanich, R., Panyim, S., Yuthavong, Y.* (1985) Recombinant DNA techniques as potential diagnostic means. Ann. Ist. Super. Sanita. 21, 299-305.

Sriroongrueng, W.* and **Intapruk, C.** (1989) The prenatal diagnosis of thalassemias (in Thai). Songkla Med. J. 6, 428-435.

Intapruk, C., Higashimura, N., Yamamoto, K., Okada, N., Shinmyo, A. and Takano M.* (1991) Nucleotide sequences of two genomic DNAs encoding peroxidase of *Arabidopsis thaliana*. Gene 98: 237-241.

Intapruk, C., Yamamoto, K., Fujiyama, K., Shinmyo, A. and Takano, M.* (1993) Cloning of cDNAs encoding two peroxidases of *Arabidopsis thaliana*. J Ferment Bioeng 75: 166-172.

Shinmyo, A., Fujiyama, K., Kawaoka, A. and **Intapruk, C.*** (1993) Structure and expression of peroxidase isozyme genes in horseradish and *Arabidopsis*. *In*: KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel and H Greppin, eds, Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology. Univ Geneva, Switzerland, pp 222-228.

Intapruk, C., Yamamoto, K., Sekine, M., Shinmyo, A. and Takano, M.* (1994) Regulatory sequences involved in the peroxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 13: 123-129.

Intapruk, C., Takano, M. and Shinmyo, A.* (1994) Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 104: 285-286.

Wanapu, C. and Shinmyo, A.* (1996) *cis*-Regulatory of the peroxidase gene in *Arabidopsis thaliana* involved in root specific expression and responsiveness to high-salt stress. Ann New York Acad Sci. 782 (12): 107-114.

Kanchanatawee, S.*, **Wanapu, C.** and Ketudat-Cairns, M. (2000) Biotechnology postgraduate program in Thailand. Thai J. Biotechnol. 2, 55-62.

Sripo, T., Phongdara, A.*, **Wanapu, C.** and Caplan, A.B. (2002) Screening and characterization of aldehyde dehydrogenase gene from *Halomonas salina* strain AS11. J. Biotech. 95, 171-179.

Kuapunyakoon, T. and **Wanapu, C.*** (2003) Effects of diammonium phosphate (DAP) supplementation on growth rate and ethanol production of *Saccharomyces cereviseae* K1-V1116 in tamarind wine. Suranaree J. Sci. Technol. 10: 147-151.

Sripunya, P., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N.* (2005) Effect of β-glucosidase enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* on aroma production during mango (Chok-anan) wine fermentation. Thai J. Biotechnol. 6: 50-56.

Usansa, U., Sompong, N., **Wanapu, C.,** Boonkerd, N. and Teaumroong, N.* (2009) The influences of steeping duration and temperature on the α- and β- amylase activities of six Thai rice malt cultivars (*Oryza sativa* L. indica). J. Inst. Brew. 105 (2) 140-147.

Wanapu, C.*, Sripiromrak, A. and Muaenjang, T. (2009) Ethanol production by *Thermotolerant issatchenkia* spp. S1. Biomolec. Engineer. 25, 2-4.

Teaumroong, N.*, **Wanapu, C**., Chankum, Y., Arjharn, W., Sang-Arthit, S., Teaimthaisong, K. and Boonkerd, N. (2010) Production and application of bioorganic fertilizers for organic farming systems in Thailand: A case study. In: Insam, H. , Franke-Whittle, I. and Goberna, M. (eds). Microbs at work: from wastes to resources. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 294-296.

Usansa, U., Burberg, F., Geiger, E.*, Back, W., **Wanapu, C.,** Arendt, E.K., Kreisz, S., Boonkerd, N., Teaumroong, N. and Zarnkow, M. (2011) Optimization of malting for two black rice varieties, black non-waxy rice and black waxy rice (*Oryza sativa* L. Indica). J. Inst. Brew. 117(1), 39–46.

Vechklang, K., Boonanuntanasarn, S. Ponchunchoovong, S., Pirarat N. and **Wanapu, C.*** (2011) The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at the juvenile stage. Aqua. Nut., 17(6), 685-694.

Li L., **Wanapu, C.***, Huang, X., Huang, T., Li, Q., Peng, Y. and Huang, G. (2011) Comparison of AFLP and SSR for Genetic Diversity Analysis of *Brassica napus* Hybrids. J. Agri. Sc. 3(3), 101-110.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Boonterm, C., **Wanapu, C**., Silapapun, A. and Boonkerd, N.* (2011) Effects of nitrogen, potassium fertilizdf, and clusters per vine on anthocyanins content in cabernet sauvignon wine. Suranaree J. Sci. Technol. 18(1), 41-54.

Li, L., Huang, X., **Wanapu, C**., Li, Q., Huang, G. and Huang, T.* (2011) Genetic diversity analysis of 25 rapeseed varieties from Guizhou rapeseed regional test by SSR marker. Guizhou Agri. Sc. 11, 1-4 (in Chinese).

Wanapu, C.*, Sripunya, P. and Boonkerd, N. (2012) Selection of yeast strains glucosidase for improving wine aroma. J. Agri. Sc. Technol. B, 2, 691-702.

Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.*** (2012) Optimisation of wort production from rice malt using enzymes and barley malt. Af. J. Biotech. 11, 9941-9949.

Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.*** (2012) Beer Production from Rice Malt Based in Pilot-scale: Volatile Compounds and Sensorial Properties Analysis. (Thai) Tech. Ed. J KMUT-NB. 3(1), 86-94.

Vechklang, K., Lim, C., Boonanuntanasarn, S., Welker, T., Ponchunchuwong, S., Klesius, P.H. and **Wanapu, C.*** (2012) Growth performance and resistance to Streptococcus iniae of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets supplemted with GroBiotic-A and Brewtech dried brewers yeast. J App. Aqua. 24, 183-198.

Pliansrithong, P., Usansa, U.* and **Wanapu, C.** (2013) Increasing of Nitrogenous Substances in Wort by Using Commercial Enzymes and Modifying Mashing Method. Inter. J. Biosci. Biochem. Bioinfor. 3 (4),404-407

Pinpeangchan, S. and **Wanapu, C.*** (2015) Impact of Nitrogen Fertilizer (Encapsulated Urea Fertilizer) in Process of Controlled-Release Their Effect on Growth of Chinese Kale (*Brassica alboglabra* Bailey). Glo. Adv. Res. J. Agric. Sci. 4(4), 173-181.

Yuyuen, P., Boonkerd, N. and **Wanapu, C.*** (2016) Effect of grape berry quality on wine quality. Suranaree J. Sci. Technol. (Accepted)

Patents: 3 Thai patents and 3 Trade Secrets.